

Aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Antivirale Wirksamkeit des Fc-gekoppelten CAR-Like-Soluble-Proteins
(CLSP-Fc) bei Coxsackie- und Adenovirusinfektionen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christopher Schwemmler

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.10.2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Virusassoziierte Myokarditiden und Kardiomyopathien	1
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Verlauf und Prognose	3
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese	4
1.1.4	Therapie	5
1.1.4.1	Symptomatische Therapie	6
1.1.4.2	Spezifische Therapieoptionen	6
1.1.4.3	Präklinische Therapieansätze	8
1.2	Coxsackieviren und Adenoviren	9
1.2.1	Einteilung und Aufbau	9
1.2.2	Infektionsverlauf	11
1.2.3	Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR)	12
1.2.3.1	Physiologische Zellfunktion	12
1.2.3.2	CAR als Virusrezeptor	13
1.3	Lösliche Rezeptorproteine als antiviraler Therapieansatz	13
1.3.1	Antivirales Anwendungsspektrum	14
1.3.2	Soluble CAR (sCAR)	15
1.4	CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP)	16
1.4.1	Aufbau, Vorkommen und Funktion	16
1.4.2	CLSP im antiviralen Kontext	19
1.5	Regulierbare Genexpressionssysteme	20
1.5.1	Tet-On-System	20
1.5.2	pAdG12-Expressionssystem	21
1.6	Zielstellung der Arbeit	22

2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Lösungen und Puffer	26
2.1.3	Enzyme	26
2.1.4	Antikörper	27
2.1.5	Molekulargewichtsstandards	27
2.1.6	Plasmide	27
2.1.7	Primer	28
2.1.8	Bakterienstämme und –medien	28
2.1.9	Zelllinien und -medien	29
2.1.10	Viren und virale Vektoren	29
2.1.11	Kits - Kommerzielle Testsysteme	29
2.1.12	Sonstige Materialien	30
2.1.13	Geräte	30
2.2	Arbeiten mit Bakterien	32
2.2.1	Kultivierung von Bakterien	32
2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	32
2.2.3	Transformation chemisch kompetenter Zellen	32
2.2.4	Konservierung von Bakterienstämmen	33
2.3	DNA-Arbeitstechniken	33
2.3.1	DNA-Isolation aus Bakterien	33
2.3.2	DNA-Auftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese	34
2.3.3	DNA-Extraktion aus Agarosegel	34
2.3.4	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	35
2.3.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	35
2.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.4	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	36
2.4.1	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	36
2.4.2	Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung	36
2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.6	Sequenzierung von DNA	38
2.7	Plasmid-Konstruktion	39

2.8	Zellbiologische Methoden	40
2.8.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	40
2.8.2	Trypsinierung adhärent wachsender Zellen und Zellpassagierung	40
2.8.3	Bestimmung der Zellzahl	41
2.8.4	Konservierung und Reaktivierung von Zellkulturen	41
2.8.5	Transiente Zelltransfektion	41
2.8.5.1	Calciumphosphat-Methode	42
2.8.5.2	Transfektion mit Lipofectamin 2000	42
2.9	Transkriptions- und Expressionsanalysen	43
2.9.1	Northern Blot	43
2.9.1.1	RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen	43
2.9.1.2	RNA-Auftrennung in der Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese	43
2.9.1.3	RNA-Transfer auf Nylonmembranen mittels Kapillar-Blot	44
2.9.1.4	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	45
2.9.1.5	RNA-Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden	46
2.9.1.6	Nachweis der DNA/RNA-Hybridisierungsprodukte	47
2.9.2	Western Blot	47
2.9.2.1	Protein-Auftrennung in der SDS-PAGE	47
2.9.2.2	Protein-Transfer auf Nylonmembranen	48
2.9.2.3	Immunochemischer Proteinnachweis	48
2.9.3	ELISA	49
2.10	Virologische Methoden	50
2.10.1	Adenovirus-Inhibitions-Assay	50
2.10.1.1	Infektion von Zellkulturen mit adenoviralen Vektoren	50
2.10.1.2	Bestimmung der Viruslast im Luciferase-Assay	51
2.10.2	Coxsackievirus-Inhibitions-Assay	51
2.10.2.1	Anzucht von Coxsackieviren	51
2.10.2.2	Infektion von Zellkulturen mit Coxsackieviren	52
2.10.2.3	Bestimmung der Coxsackievirus-Konzentration im Plaque-Assay	52
2.11	Statistische Evaluierung	53

3	Ergebnisse	54
3.1	Konstruktion und Klonierung des CLSP-Fc in den Dox-regulierbaren Plasmidvektor pAdG12	54
3.1.1	Klonierung von pAdG12-CLSP-Fc	54
3.1.2	Sequenzverifizierung des pAdG12-CLSP-Fc	56
3.2	Zelltransfektionsexperimente mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc und pEGFP-C1	58
3.3	Charakterisierung der Expression des CLSP-Fc und des sCAR-Fc im pAdG12-Vektorkonstrukt	60
3.3.1	Transkriptionsnachweis des CLSP-Fc und sCAR-Fc sowie Nachweis deren Dox-Abhängigkeit mittels Northern Blot	60
3.3.2	Translationsnachweis des CLSP-Fc und sCAR-Fc sowie Darstellung deren Dox-Abhängigkeit mittels Western Blot	61
3.3.3	Darstellung der Dox-abhängigen Expression und Quantifizierung des CLSP-Fc und sCAR-Fc mittels ELISA	63
3.4	Adenovirus-Inhibitions-Assay	66
3.4.1	Prüfung verschiedener Testsysteme und Optimierung der Versuchsabläufe	67
3.4.2	Antiadenovirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc im Luciferase-Assay	68
3.4.3	Dosis-Wirkungs-Experiment: Konzentrationsabhängige, antiadenovirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc im Luciferase-Assay ...	70
3.5	Coxsackievirus-Inhibitions-Assay: Anticoxsackievirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc im Plaque-Assay	72
4	Diskussion	74
4.1	Auswahl des pharmakologisch regulierbaren pAdG12 als Gen-Vektor	74
4.2	Expression des CLSP-Fc und sCAR-Fc im Dox-abhängigen pAdG12-Vektorsystem	76
4.3	Antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc	78
4.3.1	Antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc bei Adenovirusinfektionen	79
4.3.2	Antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc bei Coxsackievirusinfektionen ...	83

5 Zusammenfassung	89
Abstract	92
6 Literaturverzeichnis	94
Anhang	112
Danksagung	117
Lebenslauf	118
Eidesstattliche Versicherung	119

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest. / A. bidest.	destilliertes Wasser / zweifach destilliertes Wasser
Ad	Adenovirus
AdV	adenoviraler Vektor
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
bGH	<i>bovine growth hormon</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CAR	Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor
CLSP	CAR-Like-Soluble-Protein
CLSP-Fc	Fc-Teil gekoppeltes CAR-Like-Soluble-Protein
Glu	Glutamat
CMV	Cytomegalovirus
CTX	Cortical Thymocyte Marker des <i>Xenopus</i> (Gttg.: Krallenfrösche)
CV	Coxsackievirus
CVA	Coxsackievirus der Gruppe A
CVB	Coxsackievirus der Gruppe B
d	Tag (= <i>day</i>)
DAF	Decay Accelerating Factor
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Ebstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMB	Endomyokardbiopsie
et al.	<i>et alii</i>
f.	für
FKS	Fetales Kälberserum
FUDR	5-Fluoro-2'-Deoxyuridine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GITC	Guanidinisothiocyanat
Gln	Glutamin
Gttg.	Gattung
h	Stunde
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
hCAR	humaner Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor
HEK	<i>human epithelial kidney</i>
HEK 293T	HEK 293-Zelllinie mit SV40 large T-Antigen
HeLa	humane zervikale Adenokarzinomzellen- 1951 isoliert aus der Tumorpatientin Henrietta Lacks
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HHV-6	Humanes Herpesvirus Typ 6
HI-Virus = HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes-Simplex-Virus
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
IgG	Immunglobulin G
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
INF- α / β	Interferon- α / β
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
Kan	Kanamycin
KanR	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
KRAB	<i>Kruppel-associated box</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LRA	lösliches Rezeptoranalogen
Luc	Luciferase
Lys	Lysin
mA	Milli-Ampere
mCAR	Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor der Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)
mCLSP	CAR-Like-Soluble-Protein der Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)
min	Minute
mod.	modifiziert
moi	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Met	Methionin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NB	Northern Blot
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NusA-CLSP	Escherichia coli N-utilizing substance A-CLSP Fusionsprotein
OD	Optische Dichte

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFU	<i>plaques forming units</i>
Phe	Phenylalanin
poly A	Polyadenylierungssignal
PV	Poliovirus
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotation per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rtTA	<i>reverse tetracyclin dependent transactivator</i>
s	Sekunde
s.	siehe
sCAR	solubler Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
sCAR-Fc	Fc-Teil gekoppelter, solubler Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Serin
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	sogenannt
SSC	<i>saline buffered sodium citrate</i>
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween 20</i>
Tet	Tetrazyklin
TetO	Tetrazyklin-Operator
Tet-System	Tetrazyklin-regulierbares Genexpressionssystem
TRE	Tetrazyklin-responsives Element
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	<i>tetracyclin dependent transactivator</i>
tTS	<i>tetracyclin dependent transcriptional silencer</i>
U	<i>units</i>
V	Volt
v. a.	vor allem
Val	Valin
vgl.	vergleiche
Vol	Volumenteil
WB	Western Blot
Wdh.	Wiederholung
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Virusassoziierte Myokarditiden und Kardiomyopathien

Die Erkrankungsbezeichnung „Myokarditis“ steht für einen Sammelbegriff inflammatorischer Herzmuskelprozesse unterschiedlicher Ätiologie. Es gibt sowohl primär infektiöse (Viren, Bakterien, Einzeller, Pilze) als auch nicht-infektiöse (autoimmunologische, toxische) Krankheitsgesenen sowie idiopathische Formen (1). In den westlichen Industrieländern werden kardiotope Viren, hierbei v. a. Coxsackieviren der Gruppe B (CVB), aber auch humanpathogene Adenoviren als häufigste Auslöser der Erkrankung angenommen bzw. als mit dieser im ursächlichen Zusammenhang stehend betrachtet (2-5). Heutzutage basiert die Diagnosestellung auf der Gesamtbeurteilung von anamnestischen und klinischen Kriterien, ergänzt durch bildgebende Untersuchungsverfahren und der invasiven Abklärung im Rahmen einer Endomyokardbiopsie (EMB) mit histologischer, molekularbiologischer und immunhistochemischer Analyse (6-10).

Die klinische Manifestation gestaltet sich sehr variabel. Klinisch inapparenten Verläufen stehen moderat symptomatische Erscheinungsbilder bis hin zu schweren hämodynamisch relevanten Ausprägungsformen mit kardiogenem Schock und plötzlichem Herztod gegenüber (8, 11). Dabei sind Form und Ausmaß der myokardialen Störung abhängig von der Art des infektiösen Agens, dem Erkrankungsalter, den genetischen Dispositionen sowie der betroffenen kardialen Struktur (6). Hierbei werden myokardiale Läsionen im Zusammenhang mit viralen Myokarditiden durch zytolytische Virusmechanismen sowie die angeborene und adaptiv antiinfektiöse Immunantwort verursacht (6).

Das Spektrum der Krankheitsdynamik ist ebenfalls vielgestaltig und reicht von akuten oder fulminanten Verläufen bis zu chronischen Ausprägungsformen und der möglichen Entwicklung einer inflammatorischen oder dilatativen Kardiomyopathie (DCM) (8, 12, 13).

Bei der DCM handelt es sich um einen ätiologisch heterogenen, irreversiblen Strukturumbau des Herzwebes, welcher mit kardialen Funktionsstörungen und einer schlechten Langzeitprognose der Betroffenen einhergeht (14). Im Vordergrund stehen eine links- oder biventrikuläre Dilatation und die Verschlechterung hämodynamischer Parameter aufgrund mangelnder systolischer Pumpleistung und diastolischer Relaxation (15). Im Gegensatz zur DCM steht bei der Pathologie der inflammatorischen Kardiomyopathie, neben der kardialen Dysfunktion, ein

andauernder Entzündungsprozess zum Diagnosezeitpunkt im Vordergrund (13). Ein Großteil dieser infektiös vermittelten Kardiomyopathien entstammt einer viralen Genese (15).

Antivirale Therapieansätze, wie sie momentan in der Erprobung sind, bieten vielversprechende Möglichkeiten das zumeist symptomatisch orientierte, klinische Behandlungsrepertoire zu erweitern und damit dringend erforderliche, gezielt-antivirale Therapiealternativen zu liefern.

1.1.1 Epidemiologie

Die tatsächliche Prävalenz der Myokarditis, respektive virus-indizierter Myokarditiden, ist nach wie vor schwer zu ermitteln (1). Auch aufgrund der häufig subklinischen Manifestation der Erkrankung sowie der Missinterpretation unspezifischer Krankheitssymptome mit zum Teil zurückhaltender Anwendung spezifischer Diagnosemöglichkeiten ist von einer höheren Betroffenenzahl als bisher angenommen auszugehen (1, 6).

In Abhängigkeit von der untersuchten Studienpopulation und den zugrunde liegenden Diagnosekriterien konnten in autopsiebasierten Studien Häufigkeiten von 0,1 – 12 % festgestellt werden (16-20). Daten bezüglich der Neuerkrankungsrate zeigen ebenfalls eine große Variabilität und schwanken zwischen 1-10 pro 100.000 Einwohner/Jahr (21-23). Bei bis zu 43 % der an einem plötzlichen Herztod verstorbenen jungen Erwachsenen und Sportlern konnte eine Herzmuskelentzündung nachgewiesen werden (20, 24-27). Auch bei Kindern stellt diese eine häufige Ursache für plötzliche Herztode und Kardiomyopathien dar (28-30). Insgesamt wird das Auftreten einer Myokarditis während einer viralen Infektion auf 3-6 % geschätzt (31). Seit der Einführung EMB-basierter, molekularbiologischer Nachweismethoden wurde mit geographisch unterschiedlichen Häufigkeiten bei Patienten mit dem klinischen Verdacht einer Myokarditis oder DCM in bis zu 67 % der Fälle Virusgenom nachgewiesen (4, 32-35).

Fallstudien legen nahe, dass etwa 12 % der Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Myokarditis und 40 % mit biopsiebewiesener Myokarditis eine DCM entwickeln (23, 36, 37). Die alterskorrigierte Inzidenz für die DCM liegt beispielsweise in den USA bei 36 pro 100.000 Einwohner/Jahr. Das prädominante Manifestationsalter befindet sich zwischen der 3. und 5. Lebensdekade, wobei Männer doppelt so oft betroffen sind wie Frauen (38). 30 % der untersuchten Herzinsuffizienzpatienten entwickeln ihre Erkrankung im Zusammenhang mit einer DCM. Damit ist sie die am häufigsten vorkommende Kardiomyopathie und neben der koronaren Herzkrankheit (KHK) die häufigste Ursache der Herzinsuffizienz überhaupt (39, 40). Ebenfalls stellt die DCM die häufigste Herzinsuffizienzentität da, welche eine Herztransplantationstherapie erforderlich macht (14, 23, 30). Neben primären, idiopathischen Formen der DCM und mit

Gendefekten vergesellschafteten Varianten werden insbesondere virale Myokarditiden bzw. inflammatorische Kardiomyopathien als häufigste Ursache für die Ausprägung einer sekundären DCM betrachtet (15).

Die aktuelle Inzidenz der durch Viren verursachten oder mitbedingten DCM ist nach wie vor nicht eindeutig etabliert (6). Gründe hierfür sind u. a. in den oft klinisch inapparenten Verläufen und der mangelnden diagnostischen Abklärung der Myokarditisfälle zu suchen. Vorherrschende Symptome der DCM treten mit einer variablen Verzögerung nach dem primären, entzündlichen Herzmuskelgeschehen auf und werden daher mit diesem nicht in Zusammenhang gebracht. Eine nachträgliche Zuordnung zu einem virusinduzierten Prozess gestaltet sich oft schwierig (6). Somit ist davon auszugehen, dass zusätzlich ca. 20-30 % der idiopathischen DCM-Formen, die insgesamt ca. 50 % der Fälle ausmachen, mit einem viralen Entstehungsmechanismus assoziiert sind (4, 38).

1.1.2 Verlauf und Prognose

Allgemein gilt, dass Patienten mit moderaten, klinisch weniger auffälligen Verläufen, aber auch jene mit initial fulminanter Krankheitspräsentation, in der Mehrzahl der Fälle eine folgenlose Ausheilung erfahren und eine gute Langzeitprognose besitzen (6, 41, 42). Hingegen zeigen verschiedene prospektive Studien, dass die 5- bis 10-Jahresüberlebensrate bei akuten, nicht-fulminanten Myokarditiden lediglich zwischen 46 und 25 % liegt (41, 43-45). Auch im Rahmen einer großen Myokarditisbehandlungsstudie wurden 1- bzw. 5-Jahresüberlebensraten von nur 80 % bzw. 44 % beobachtet (46).

Von einer insgesamt schlechteren Prognose wird für Patienten mit fortbestehender ventrikulärer Dysfunktion und andauerndem Entzündungsprozess berichtet (41, 43, 47). Auch der Nachweis einer viralen Erregerpersistenz, insbesondere das Vorhandensein replikationsfähigen Virusgenoms, ist sowohl für Myokarditis- als auch DCM-Patienten ein negativer prognostischer Prädiktor (32, 34, 43, 44, 48). Kardiale Enterovirusinfektionen weisen mit einer Mortalität von bis zu 67 % hierbei eine besonders schlechte Prognose auf (41, 48-50). Fallstudien legen nahe, dass etwa 12 % der Patienten mit klinischem Verdacht einer Myokarditis und 40 % mit biopsiebewiesener Myokarditis eine DCM entwickeln (23, 36, 37). Die 5-Jahresüberlebensrate der DCM-Patienten liegt trotz Anwendung der gegenwärtigen Herzinsuffizienztherapie nur bei ca. 50 % (26, 45, 51). In 80 % der Fälle ist langfristig eine Herztransplantation erforderlich (8, 23). Als häufige Komplikationen treten thrombembolische Ereignisse und lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen auf (15).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Neben Enteroviren, insbesondere Coxsackieviren der Gruppe B (CVB) mit gesicherter Ätiopathogenese, wurden in den vergangenen Jahren auch Adenoviren, Erythroviren (Parvovirus B19), verschiedene Herpesviren (HHV-6, CMV, EBV, HSV), Hepatitis-C-Viren, Influenzaviren und HI-Viren als potenziell kardiotope Erreger im menschlichen Herzen identifiziert (4, 33, 34, 52-55).

Während für zahlreiche Viren der ätiopathogenetische Krankheitskontext noch nicht vollständig geklärt ist, stehen die zur Gattung der Enteroviren gehörenden CVB-Viren nachweislich im kausalen Zusammenhang sowohl mit akuten und chronischen Myokarditisverläufen, als auch der inflammatorischen und dilatativen Kardiomyopathie (32, 34, 36, 56-59). Auch Adenoviren werden mit Herzmuskelinfektionen und DCM als im ursächlichen Zusammenhang stehend betrachtet (4, 5, 60, 61). Bei Neugeborenen und Kindern zählen Enteroviren und Adenoviren zu den am häufigsten auftretenden kardiotropen Viren (4, 61). Des Weiteren gelten in den westlichen Industrieländern Enteroviren auch bei Erwachsenen als wichtigster Auslöser für besonders schwere Myokarditiden und DCM-Verläufe (6, 50, 62). So konnte mit entsprechender geographischer, zeitlicher und mengenmäßiger Variabilität bei 6,7 - 40 % der untersuchten Myokarditispatienten und 8 - 45 % der DCM-Patienten Enterovirusgenom aus gewonnenen Herzmuskelbiopsien nachgewiesen werden (32-34, 56, 57, 62). Der Adenovirusgenomnachweis erfolgte bei Myokarditispatienten in 8,1 - 23 % bzw. bei DCM-Patienten in 1,6 - 12 % der Fälle (4, 33, 34, 60).

Anhand von Studien an Tiermodellen ist bekannt, dass es sich bei der Pathogenese der viralen Myokarditis um einen multifaktoriellen Prozess handelt, der vom Virusgenom, vom Wirtsgenom und der Umgebung, in der sie interagieren, abhängt (6).

Der unterschiedliche Zelltropismus kardiotroper Viren bedingt unterschiedliche pathogenetische Prinzipien. Daraus resultieren unterschiedliche Prädispositionsstellen für die Virusinfektion am Herzen sowie differente Virulenz- und Invasivitätseigenschaften der Erreger (63-65). Verschiedene Virusvarianten und eine variable Viruslast mögen darüber hinaus die Heterogenität im Hinblick auf Krankheitspräsentation und Prognose viraler Herzmuskelerkrankungen erklären (6). Genetische Prädispositionen können die virale Immunität des Wirts zusätzlich beeinflussen und somit die Schwere und den Verlauf einer viralen Myokarditis mitbestimmen (6, 63, 66). Myokardiale Läsionen werden sowohl durch zytolytische Virusmechanismen als auch durch die angeborene und adaptive, antiinfektiöse Immunantwort verursacht (2, 6).

Die pathophysiologische Entwicklung der virusinduzierten Myokarditis besteht aus unterschiedlichen Phasen und ist derzeit für Enterovirusinfektionen am besten verstanden (2, 23, 67). Zunächst gelangen kardiotope Viren durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Kardiocyten. Nach Replikation des Virusgenoms werden unter Zelllyse die neu gebildeten Virionen zur weiteren Ausbreitung freigesetzt (68). In der anschließenden Phase kommt es zur vermehrten Einwanderung von Makrophagen und natürlichen Killerzellen mit konsekutiver Freisetzung antiviraler Zytokine und Eliminierung virusinfizierter Zellen (12, 23, 69). Auf diese erste, angeborene Immunreaktion folgt im Rahmen der subakuten Phase die zweite adaptive Immunantwort mit der Infiltration des Myokards durch antigenspezifische, zytotoxische T-Zellen. Diese erkennen auf der Kardiomyozytenoberfläche über Major-Histokompatibilitäts-Komplexe (MHC-1) präsentierte, degradierte Virusproteinfragmente, woraufhin sie die Lyse der virusinfizierten Herzzellen bewirken (70, 71). An dieser Stelle ist eine vollständige Eliminierung virusbeladener Kardiomyozyten und eine, von der Schwere des Myokardschadens abhängende, folgenlose Defektheilung möglich.

Bei einem Ungleichgewicht zwischen Virusbeseitigung und immunologischer Reaktion kann es jedoch hiernach zu einer Chronifizierung des Entzündungsprozesses kommen. Inadäquate Verteidigungsmechanismen mit der Folge der Erregerpersistenz sowie andauernde T-Zellaktivierung mit teils überschießenden, autoimmunologischen Reaktionen erhöhen das Risiko einer folgenschweren, strukturellen Veränderung des Herzgewebes (23, 72-77). Die virusinduzierte Spaltung des zytoskelettalen, die Kardiomyozytenintegrität-vermittelnden Proteins Dystrophin, trägt zusätzlich zur Ausprägung einer Kardiomyopathie bei (63, 78). Interstitielle Fibrosierung und Remodelingvorgänge der extrazellulären Matrix führen darüber hinaus zur vermehrten Steifigkeit und irreversiblen Ventrikeldilatation (45, 79-82). Unter diesen Umständen kann als Endstadium eine sekundäre, infektiionsbedingte DCM stehen. Das Vollbild dieser myokardialen Umbauprozesse ist funktionell durch mangelnde systolische Pumpleistung bei verzögerter und inkompletter diastolischer Relaxation des Myokards gekennzeichnet (15).

1.1.4 Therapie

Allgemein richtet sich die Behandlungsstrategie bei virusassoziierten Myokarditiden und Kardiomyopathien nach dem Schweregrad der klinischen Manifestation und diagnostischen Klassifikation der Erkrankung. In der klinischen Praxis steht das symptomatisch orientierte Behandlungsregime immer noch an erster Stelle. Kenntnisse bezüglich der zugrunde liegenden Pathomechanismen bei entsprechenden Ausprägungsformen mit schlechter Krankheitsprognose

legen den Bedarf gezielter antiviraler und antiinflammatorischer Therapiestrategien nahe (32, 34, 41, 43). Aufgrund des spezifischen Interaktionspotentials mit definierten, für die Virusaufnahme und -vermehrung essentiellen Zielstrukturen nehmen molekulare und gentherapeutische Verfahren hierbei einen vielversprechenden Stellenwert ein (83). Gentherapeutische antivirale Behandlungsansätze konzentrieren sich u. a. neben dem Einsatz der posttranskriptionell wirksamen Genregulation mittels RNA-Interferenz auf die transgene Expression von löslichen Virusrezeptorproteinen (84, 85).

1.1.4.1 Symptomatische Therapie

Bei milden bis moderaten klinischen Symptomen und kaum beeinträchtigter linksventrikulärer Funktion brauchen Myokarditispatienten keine spezielle medizinische Behandlung. Dennoch, sollten EKG-Auffälligkeiten sowie erhöhte Herzenzymlevel bestehen bleiben, ist eine Hospitalisierung und eine Überwachung angezeigt, um lebensbedrohliche Komplikationen zu entdecken und ihnen vorzubeugen. Körperliche Aktivitäten sollten generell vermieden werden, bis die Infektion und der Entzündungsprozess am Herzmuskel abgeklungen sind (6). Bei schweren, renitenten ventrikulären Rhythmusstörungen oder AV-Blockierungen kann eine pharmakologische Therapie mit antiarrhythmischen Präparaten oder nach Ausschöpfung konservativer Maßnahmen eine Kardioverter-Defibrillator- (ICD) bzw. temporäre Schrittmacherimplantation indiziert sein (6). Liegt eine symptomatische Einschränkung der systolischen oder diastolischen Ventrikelfunktion vor, sollte eine Herzinsuffizienztherapie getreu entsprechender Behandlungsleitlinien eingeleitet werden (86). Auch die gegenwärtige Behandlung der DCM entspricht in erster Linie der symptomatischen Herzinsuffizienztherapie und beinhaltet, neben der ärztlichen Aufklärung bezüglich einer angepassten Lebensführung, sowohl pharmakotherapeutische Elemente als auch invasive Maßnahmen (15). Im therapieresistenten Endstadium der Erkrankung bleibt als Ultima ratio, sofern realisierbar, nur die Transplantation des geschädigten Organs (15).

1.1.4.2 Spezifische Therapieoptionen

Obwohl viele der Patienten, die sich mit moderater bis schwerer hämodynamischer Beeinträchtigung im Rahmen einer nicht-fulminanten, viralen Myokarditis präsentieren, sich innerhalb von Wochen bis Monaten unter der regulären Herzinsuffizienztherapie verbessern, ist insgesamt ihre Langzeitprognose nach wie vor schlecht (41, 43-45). Zahlreiche Studien belegen als negative prognostische Prädiktoren bei Myokarditiden und virusassoziierten

Kardiomyopathien, neben anhaltender ventrikulärer Dysfunktion, die Persistenz viraler Erreger und einen andauernden myokardialen Entzündungsprozess (32, 34, 41, 43, 44, 47, 48, 87). Gezielte antivirale bzw. antiinflammatorische Therapieoptionen sind anhaltend Gegenstand der Forschung und bereits in einigen randomisierten klinischen Studien erprobt worden.

Dabei zeigte sich, dass eine immunsuppressive Therapie mit Glucocorticoiden teils in Kombination mit Azathioprin oder Cyclosporin bei Myokarditiden und inflammatorischen DCM keinen wesentlichen Vorteil brachte (46, 88). Ähnliche Resultate erzielte eine prospektive, placebokontrollierte Studie beim Einsatz intravenöser Immunglobuline bei Patienten mit neu aufgetretener DCM (89). In diesen Fällen verbesserten sich zahlreiche Patienten auch spontan ohne immunmodulatorische Therapie (46, 88, 89). Allerdings fand hier das Vorhandensein einer viralen Infektion keine Berücksichtigung. So weisen jüngere Daten aus Behandlungsstudien darauf hin, dass Patienten mit chronischem Erkrankungsprozess bei genauer Charakterisierung der Ziel-Kohorte und dem Ausschluss viraler Persistenz, im Zustand postviraler Inflammation, von einer immunsuppressiven Therapie profitieren (90-93). Währenddessen stellte der Nachweis viraler Persistenz eine der Schlüsselursachen für das Nichtansprechen auf eine immunmodulatorische Therapiestrategie dar (90).

Weitere Therapieversuche wurden mit antiviral-immunmodulatorisch wirkenden Cytokinen, den Typ-1 Interferonen (INF- α/β), unternommen. INF- α/β ist in der Lage die Replikation zahlreicher kardiotroper Viren *in vitro* zu inhibieren. Auch *in vivo* konnte die antivirale Wirksamkeit in Bezug auf kardiotope Viren bewiesen werden, wobei die Sensibilität verschiedener Viren und sogar die einzelner Virusstämme variierte und darüber hinaus vom infizierten Zelltyp abhing (94-100). In einer Phase-II-Studie an Patienten mit EMB-bewiesener, chronisch-persistierender enteroviraler oder adenoviraler Herzmuskelinfektion zeigte sich unter INF- β -Behandlung bei allen Patienten eine komplette Viruselimination begleitet von einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Funktion, einer Abnahme der Ventrikelgröße sowie der klinischen Besserung von Herzinsuffizienzsymptomen und der deutlichen Abnahme von entzündlichem Zellinfiltrat (101). Dabei wurde die Medikation von allen Probanden gut vertragen und keiner der Patienten verschlechterte sich unter der Therapie. Während kardiale Entero- und Adenovirusinfektionen scheinbar gut auf INF- β -Behandlung ansprechen, gelang bei anderen viralen Erregern hiermit keine komplette Viruselimination (101, 102). In einer kleinen, offenkettierten Studie an Patienten mit enteroviruspositiver DCM bei zunehmender hämodynamischer Verschlechterung gelang es nach halbjähriger Gabe von INF- α eine Verbesserung klinischer und hämodynamischer Parameter bei allen Probanden zu erreichen. Allerdings kam es hier nur in der Hälfte der Fälle zu einer Viruselimination (103). Ebenfalls

konnte ein Behandlungserfolg im Rahmen einer randomisierten Studie mit Myokarditis- und DCM-Patienten erzielt werden, bei denen nach dreimonatiger Gabe von INF- α zusätzlich zur konventionellen Herztherapie eine signifikant höhere, stabil bleibende linksventrikuläre Funktionsverbesserung beschrieben wurde (104).

Jedoch sind antivirale Therapiemaßnahmen nach wie vor begrenzt auf klinische Studien und spezialisierten Therapiezentren vorbehalten. Eine spezifische, antioxsackievirale oder antiadenovirale Therapie ist derzeit nicht etabliert und ungebrochen von klinischer Relevanz.

1.1.4.3 Präklinische Therapieansätze

Basierend auf den Kenntnissen molekularbiologischer Abläufe der viralen Replikationszyklen waren in den vergangenen Jahren zahlreiche pharmakologische und molekulare Behandlungsansätze Gegenstand der Forschung. Insbesondere im Hinblick auf CVB-verursachte Herzmuskelfektionen konnten neue, hochspezifische Substanzgruppen experimentell entwickelt und hinsichtlich ihres klinischen Anwendungspotentials untersucht werden (83). Mögliche Angriffspunkte für antivirale Wirkeffekte stellen neben dem Prozess der Virusanheftung und -internalisierung, virale Replikations- und Zellfreisetzungsvorgänge dar.

So wurden eine Reihe niedermolekularer Pharmakosubstanzen gegen *Picornaviridae* erprobt, die entweder durch Bindung an das Viruskapsid die Virusaufnahme in die Zelle (z. B. WIN, Pleconaril) (105-111) oder durch Interaktion mit replikationsrelevanten Virusproteinen (111-114) bzw. entsprechenden Zellproteinen (115-117) die Virusreplikation zu inhibieren vermochten. Nachteilige Eigenschaften bezüglich der biologischen Verfügbarkeit, des Nebenwirkungsprofils, der rapiden Entwicklung von Escape-Mutanten und die zum Teil geringer Wirkeffektivität limitieren allerdings ihre bisherige Einsatzfähigkeit bei myokardiale CVB-Infektionen im Menschen (83).

Eine andere vielversprechende Substanzgruppe stellen die biotechnologisch hergestellten Biologicals dar. Diese beinhalten zum einen kleine DNA- oder RNA-Moleküle, die durch spezifische RNA-Interferenz (RNAi) die Blockade und Degradierung der entsprechenden Zielstruktur herbeiführen und damit die für die Virusaufnahme oder -replikation elementaren Translationsprozesse in der Wirtszelle unterbinden (118, 119). Hierbei zeigten erfolgreiche Anwendungen von RNAi-Molekülen eine breite Wirksamkeit gegen zahlreiche humanpathogene Viren (119-121), so auch bei Adenovirus- (122) und kardialen CVB-Infektionen (123, 124). Weitere Fortschritte auf diesem Gebiet konnten u. a. durch die virusvektorvermittelte, ektope Expression von short hairpin RNAs (shRNA) sowie die veränderte Auswahl und parallele

Kombination unterschiedlicher Interferenz-Zielstrukturen erzielt werden (84, 122, 123, 125-127). Auch durch die RNAi-vermittelte Ausschaltung des für die Virusaufnahme in die Zelle erforderlichen Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptors (CAR) konnten CVB- und Adenovirusinfektionen *in vitro* inhibiert werden (128, 129). Gegen eine perspektivreiche *In-vivo*-Anwendung dieser Strategie spricht allerdings die Tatsache, dass bei der Gen-Inaktivierung des CAR auch andere physiologische Zellfunktionen betroffen sein könnten (130-133).

Eine weitere Untergruppe biopharmakologischer Substanzen, die der löslichen Rezeptoranaloga, konzentriert sich ebenfalls auf die Verhinderung der Virusbindung und -aufnahme in die Wirtszelle (s. auch Kapitel 1.3). Durch Besetzung und sterische Inhibierung der viralen Rezeptorbindungsstellen sowie zusätzlich im Falle von CVB durch irreversible A-Partikel-formation gelang es die Infektiosität der Viruspartikel erfolgreich herabzusetzen bzw. gänzlich auszuschalten (134-136). Die antivirale Effektivität dieser Strategie konnte *in vivo* mehrfach bestätigt werden (85, 137-139). Mit der transgenen Expression einer rekombinanten Rezeptoranalogenvariante (sCAR-Fc) über ein Doxycyclin-regulierbares Genexpressionssystem konnte im CVB3-Myokarditis-Mausmodell neben der Reduktion der kardialen Infektion, Inflammation und des Gewebeschadens auch maßgeblich eine Verbesserung hämodynamischer Parameter nachgewiesen werden (85).

Ergänzt durch den Einsatz der mesenchymalen Stammzelltherapie (140) bietet sich ein breites, vielversprechendes Spektrum neuer antiviraler Therapieoptionen. Nichtsdestotrotz sind weitere Untersuchungen und Erkenntnisse hinsichtlich ihrer sicheren und effektiven klinischen Anwendbarkeit erforderlich.

1.2 Coxsackieviren und Adenoviren

1.2.1 Einteilung und Aufbau

Bei Coxsackieviren, welche zur Familie der *Picornaviridae* und Gattung der säurestabilen Enteroviren gehören, handelt es sich um weltweit auftretende, unbehüllte Einzel(+)-Strang-RNA-Viren mit einem kleinen Nukleokapsiddurchmesser von ca. 30 nm. Das Nukleokapsid besteht aus jeweils zwölf Pentameren, die ihrerseits aus fünf Protomeren der vier Strukturproteine VP1 bis VP4 zusammengesetzt sind (Abb. 1.1). VP1, VP2 und VP3 bilden dabei die Oberfläche des Virons, während VP4 auf der Innenseite des Viruskapsids lokalisiert und mit dem RNA-Genom assoziiert ist (141). An den Berührungspunkten der 5-fachen Symmetrieachse des VP1-Proteins liegt eine Vertiefung, der so genannte „Canyon“, über den das

Virus mit seinem zellulären Rezeptor interagiert (142). Variabilitäten in der dort befindlichen Aminosäuresequenz können zu unterschiedlichen Rezeptorprävalenzen führen. Basierend auf verschiedenen Organotropismen und Gewebeschädigungen in der Maus werden zwei unterschiedliche Gruppen klassifiziert: Gruppe-A-Coxsackieviren bestehend aus 23 (CVA1-22, 24) und Gruppe-B-Viren aus 6 Serotypen (CVB1-6) (143).

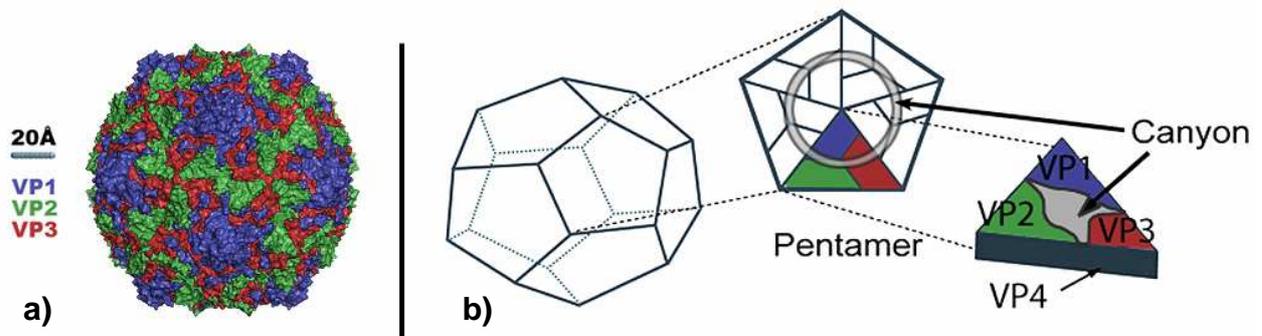


Abb. 1.1: Strukturelle Eigenschaften von Picornaviren

(a) Röntgenkristallstrukturanalyse eines Picornaviruskapsids am Beispiel von CVB3. [nach Muckelbauer JK *et al.*, 1995; (142)]

(b) Schematischer Aufbau eines Picornaviruspartikels bestehend aus zwölf identischen Pentameren, deren fünf kristallographische Untereinheiten (Dreiecke) jeweils die Kapsidproteine VP1-VP4 enthalten. Die Rezeptorbindungsstelle wird von einer kreisförmigen Vertiefung, dem sog. Canyon, gebildet (grauer Ring). [mod. nach Gonzalez-Mariscal L *et al.*, 2009; (144)]

Humane Adenoviren (Ad), welche zur Familie der *Adenoviridae* und Gattung der Mastadenoviren gehören, sind hingegen unbehüllte, doppelsträngige DNA-Viren (Abb. 1.2). Ihr lineares Genom wird von einem stabilen, ca. 60-90 nm im Durchmesser betragenden, ikosaederischen Kapsid umgeben, aufgrund dessen sie sich durch eine langanhaltende Infektiosität auch außerhalb des Wirtskörpers auszeichnen (145). Die Kapsidhülle besteht aus 252 Kapsomeren (240 Hexone und 12 Pentone) (146). Hexone und Pentone, welche benannt sind nach der Anzahl der ihnen benachbarten Kapsomere, setzen sich aus drei bzw. fünf jeweils identischen Polypeptidketten zusammen (147). An jeder der zwölf Pentonbasen inseriert eine antennenartige, in Abhängigkeit von der Spezies längenvariable Fiber, welche aus drei glykosylierten Polypeptiden besteht und eine Verdickung an ihrem freien Ende, den Fiberknop, aufweist (148). Über diesen erfolgt die initiale Kontaktaufnahme des Virions mit Rezeptoren der Wirtszelloberfläche (149, 150). Eine Klassifikation der über 50 unterschiedlichen serologischen Ad-Subtypen in sechs Untergruppen (Humanes Adenovirus A-F) erfolgt vornehmlich aufgrund ihrer Hämagglutinationseigenschaften, ihres onkogenen Potentials sowie genomischer Merkmale (151).

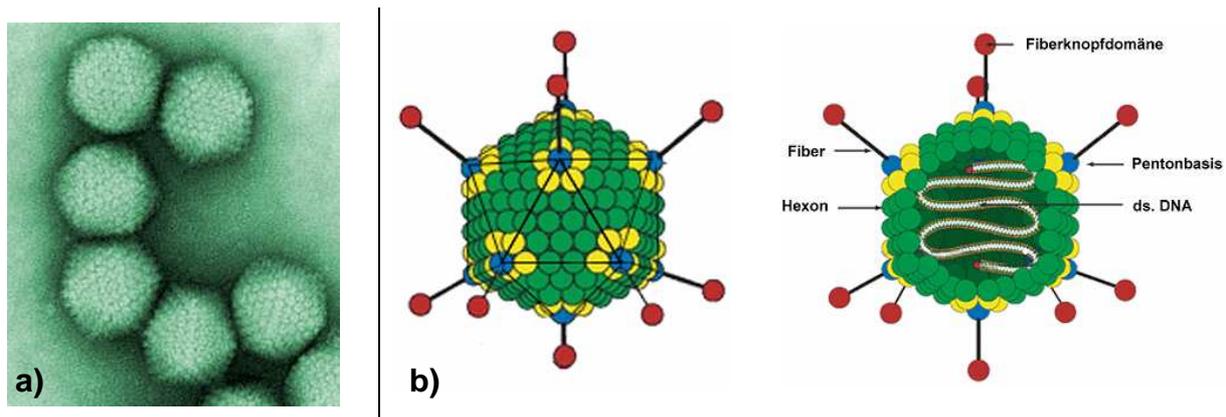


Abb. 1.2: Strukturelle Eigenschaften von Adenoviren

(a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme humaner Adenoviren. Die Visualisierung der Viruspartikel erfolgte mittels negativer Kontrastierungstechnik. (Quelle: Via www.mediendatenbank.de, Online im Internet unter URL: <http://media.internisten-im-netz.de/mediadb/media/krankheitserreger/elektronenmikroskopie/adenovirus.jpg>; Stand 07.01.2013)

(b) Schematische Darstellung eines Adenoviruspartikels. (Quelle: Via Qbiogene Molecular Biology. Online im Internet: URL: <http://www.qbiogene.com/adenovirus/about>, Stand 07.01.2013)

1.2.2 Infektionsverlauf

Humane CV-Infektionen, welche endemisch auftretend als Schmier- oder Tröpfcheninfektionen übertragen werden und eine Inkubationszeit von einigen Tagen bis zu 3 Wochen besitzen, führen meist nur zu harmlosen, grippeähnlichen Beschwerden. Des Weiteren sind sie je nach Serotyp Auslöser zahlreicher eher unbedeutender Krankheitsbilder wie beispielsweise der Hand-Fuß-Mund-Krankheit, Herpangina, epidemischer Pleurodynie oder einfacher Durchfallerkrankungen. Unter gewissen Umständen allerdings wird die lokale Immunabwehr des Wirts überwunden und eine lebensbedrohliche Ausbreitung mit Beteiligung von ZNS, Bauchspeicheldrüse, Leber, Lunge oder der des Herzens droht (143, 152). Insbesondere bei Neonaten kommt es in diesem Zusammenhang zu schweren Komplikationen mit hohen Mortalitätsraten (153). CVB, allen voran CVB3, sind typischerweise als kardiotope Erreger häufig an Infektionen des Herzens beteiligt und in diesem Kontext entsprechend oft nachgewiesen worden (32, 56, 62).

In Abhängigkeit der verschiedenen Gewebetropismen unterschiedlicher Serotypen lösen Ad, deren Übertragung oft endemisch auf fäkal-oralem Wege erfolgt, in der Regel milde respiratorische, gastrointestinale oder konjunktivale Infektionen aus. Allerdings kommt es in manchen Fällen, insbesondere bei Kindern und immunsupprimierten Personen, aufgrund Ausbreitung der Infektion zu disseminierten Verläufen oder zu schweren Organbeteiligungen wie von Lunge, Leber, Herz, Pankreas oder ZNS mit teils tödlichem Ausgang (154-158). Auch wird ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Ad und Herzmuskelinfektionen bzw. DCM angenommen (4, 5, 60, 61). Trotz einer Reihe von verheißungsvollen Behandlungsansätzen

(159-161) steht eine etablierte spezifische antiadenovirale Therapie derzeit immer noch nicht zur Verfügung und prospektive, randomisierte Behandlungsstudien diesbezüglich fehlen (145).

1.2.3 Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR)

Generell erfolgt die Virusanheftung an die Wirtszelle, welche für die Initiation der Infektion einen obligatorischen Vorgang darstellt, über spezifische zelloberflächenständige Rezeptoren. Die unterschiedliche Ausstattung an Oberflächenrezeptoren ist daher eine wichtige Determinante bei der Permissivität von Zellen für spezielle Viren als auch dem viralen Gewebetropismus. Der Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR) dient in seiner membranständigen Form nachweislich Coxsackieviren der Gruppe B und den Adenovirus-Subtypen A, C, D, E und F als primärer Virusbindungs- bzw. Virusinternalisierungsfaktor (162-165).

1.2.3.1 Physiologische Zellfunktion

CAR, der seit seiner Entdeckung 1997 in zahlreichen Spezies mit einem hohen Maß an Sequenzhomologie nachgewiesen werden konnte, ist ein einzelsträngiges Typ I Transmembranprotein und Mitglied der CTX-Unterfamilie innerhalb der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) (163, 165-169). Er besitzt N-terminal zwei extrazelluläre, immunglobulinähnliche Domänen (D1, D2), welche über den alpha-helikalen Transmembranteil mit dem zytoplasmatischen C-Terminus in Verbindung stehen.

Das humane CAR-Gen enthält sieben Exons und befindet sich auf Chromosom 21 (21q 11.2) (170). Das translatierte und glykosylierte humane CAR-Protein weist eine Molekülmasse von 46 kDa auf (171). Die Expressionsstärke von CAR zeigt große Unterschiede zwischen und innerhalb verschiedener Organe und Gewebe sowie während der Entwicklung (130, 169, 172, 173). In gesunden, adulten Herzen ist die CAR-Expression relativ niedrig und beschränkt auf interstitielle Zellen und subendotheliale glatte Muskelzellen, während explantierte Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) eine hohe Expression von CAR in den Kardiomyozyten aufweisen (169).

Beobachtungen, wie die der Homodimerbildung über die extrazelluläre D1-Domäne (174) oder der Lokalisation im Bereich von Zell-Zell-Kontakten wie beispielsweise Tight Junctions (175) und kardialen Disci intercalares (169, 176), legen neben der elementaren embryogenetischen Bedeutung für das Herz-Kreislaufsystem (130, 132, 133) physiologische Funktionen u. a. als Zelladhäsionsprotein nahe. So wiesen adulte CAR-Knockout-Mäuse Erregungsleitungsstörungen am Herzen auf, welche sich v. a. im Rahmen atrioventrikulärer Überleitungsstörungen

manifestierten (131). Das Fehlen von CAR während der frühen Mausembryogenese führte zu Herzanomalien mit letalem Ausgang (130).

1.2.3.2 CAR als Virusrezeptor

Sowohl Coxsackieviren der Gruppe B als auch die Adenovirus-Subtypen A und C-F interagieren jeweils mit spezifischen Berührungspunkten der extrazellulären, distal gelegenen D1-Domäne des CAR (177).

Für alle CVB-Serotypen fungiert CAR als primärer Internalisierungsrezeptor (164). CVB2, 4 und 6 nutzen ihn zusätzlich als Virusbindungsrezeptor, während die Serotypen 1, 3 und 5 den Decay-Accelerating Rezeptor (DAF, CD55) als Co-Rezeptor für den Schritt der Virusanheftung benötigen (178, 179). Im Rahmen des Internalisierungsprozesses bindet CAR mit seiner D1-Domäne im so genannten Canyon, wodurch die Vesikelendozytose von Virusbestandteilen eingeleitet wird (180). Hierbei kommt es unter Verlust des VP4-Strukturproteins [= A(Iterations)-Partikel] und Freigabe des viralen RNA-Genoms zur irreversiblen Konformationsänderung des Viruskapsids (181). Die A-Partikelbildung, welche auch bei anderen Vertretern der Picornavirenfamilie weit verbreitet ist (141, 182), wird bei CVB ausschließlich durch CAR, jedoch nicht durch den Co-Rezeptor DAF, hervorgerufen (136).

Auch ein Großteil der Adenoviren nutzt CAR als Virusbindungsrezeptor (162). Dabei wird die initiale Andockung des Virions an die Zielzelle über die hochaffine Bindung des adenoviralen Fiberknops mit der D1-Domäne des CAR vermittelt (183). Die nachfolgende Virusinternalisierung mittels rezeptorvermittelter Endozytose erfolgt über die spezifische Interaktion der viralen Pentonbasis mit membranständigen Integrinen (184, 185).

Obwohl die Bindungsstellen für die adenovirale Fiberdomäne in der D1-Region des CAR liegt, können Ad nicht mit einem in der D2-Domäne deletierten CAR-Rezeptor interagieren (186). Daher scheint auch die D2-Domäne, zumindest als strukturelle Komponente bei der Virus-Rezeptor-Interaktion eine signifikante Bedeutung zu haben.

1.3 Lösliche Rezeptorproteine als antiviraler Therapieansatz

Mit der Kenntnis und Identifikation bestimmter für die Virusaufnahme in die Wirtszelle essentieller Zelloberflächenrezeptoren wurde die Grundlage für eine gezielt-antivirale Therapiestrategie mittels löslicher (= solubler, s) Virusrezeptorvarianten geschaffen. Das Wirkungsprinzip der löslichen Rezeptoranaloga (LRA) beruht in erster Linie auf der kompetitiven Hemmung und sterischen Inhibierung viraler Rezeptorbindungsstellen und der damit verbundenen Prävention der

Virusanheftung und nachfolgenden -aufnahme in die mögliche Zielzelle. Für Viren der Picornafamilie konnte darüber hinaus durch Bindung mit LRAs, in Analogie zum physiologischen *Uncoating*-Mechanismus der A-Partikelformation (181), eine irreversible Konformationsänderung der Kapsidhülle mit Verlust des viralen RNA-Genoms und konsekutiv der Partikelinfektiosität nachgewiesen werden (134, 182, 187).

Ausgehend von natürlich vorkommenden LRAs, denen meist durch Fehlen der für die Verankerung in der Zellmembran notwendigen Transmembrandomäne eine nach extrazellulär gerichtete Diffusion und Akkumulation ermöglicht ist, wurden in zunehmendem Maß gentechnologisch modifizierte, rekombinante oder transgen exprimierte LRA-Varianten erfolgreich entwickelt und hinsichtlich ihrer antiviralen Potenz erprobt.

1.3.1 Antivirales Anwendungsspektrum

Ein protektiver Effekt durch physiologisch vorkommende oder entsprechend modifizierte LRAs ist für eine Vielzahl von Viren beschrieben worden.

So wurde beispielsweise eine gegen HI-Viren wirksame lösliche Variante des CD4-Oberflächenrezeptorproteins getestet (188, 189) und das Vorkommen von löslichen CCR5-Co-Rezeptorvarianten als Möglichkeit für eine natürliche HIV-Immunität diskutiert (190).

Lösliche Formen des Membrane Cofactor Proteins (sMCP, sCD46) konnten im gesteigerten Maße nach Kombination mit dem C-terminalen Anteil des C4b Binding Proteins (sCD46-C4bp α) unter Ausbildung einer homooktameren, spinnenartigen Raumstruktur Masernviren *in vitro* und *in vivo* erfolgreich neutralisieren (191, 192). So konnte das transgen exprimierte sCD46-C4bp α , nicht jedoch das monomere sCD46, exponierte Mäuse vor einer tödlichen Masernencephalitis bewahren (192).

Auch beim Humanen Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) konnte durch Einsatz von sCD46 eine Blockade der Virusbindung an die Zielzelloberfläche beobachtet werden (193).

Sowohl gegen Adenoviren (139) als auch zahlreiche Familienvertreter der *Picornaviridae* (134, 182, 187, 194) sind LRAs erfolgreich erprobt worden. Demnach vermochten lösliche Varianten des Intercellular Adhesion Molecules 1 (ICAM-1), die gegen humane Rhinoviren getestet wurden (182), ebenso wie lösliche Poliovirusrezeptoren (sPVR) bei Poliovirusinfektionen (187) die Virus-Rezeptorbindung und Zielzellinfektion *in vitro* wirkungsvoll zu verhindern und den für diese Virusfamilie typischen Mechanismus der A-Partikelformation zu induzieren. Selbiges gelang beim Einsatz löslicher CAR-Varianten gegen CVB (134, 136). LRAs gegen CVB

konnten bereits mehrfach in tierexperimentellen Untersuchungen ihre antivirale Wirkeffektivität unter Beweis stellen (85, 137-139).

1.3.2 Soluble CAR (sCAR)

Wie auch bei anderen Vertretern der Immunglobulin-Superfamilie existieren von CAR natürlich vorkommende, durch alternatives Spleißen entstandene, lösliche Rezeptorvarianten, denen ein antivirales Wirkpotential gegen CVB (135) und Ad (195) nachgewiesen werden konnte.

Durch gentechnologische Kopplung der LRAs mit dem c-terminalen Fc-Teil des humanen IgG1 gelang es wünschenswerte Proteineigenschaften im Hinblick auf die antivirale Wirkeffizienz weiter zu verbessern (196). Das neuartige Fusionsprotein sCAR-Fc, welches durch Disulfidbrückenbildung zwischen den Fc-Domänen zur Homodimerisierung neigt, weist neben gesteigerten Löslichkeitseigenschaften, einer deutlich verlängerten Halbwertszeit auch die Möglichkeit einer immunologischen Wirkkomponente auf, da Virus-Rezeptorkomplexe einer Fc-Teil-vermittelten Phagozytose durch entsprechende Abwehrzellen zugeführt werden können (197). *In-vivo*-Experimente bei CVB3-induzierten Myokarditiden im Mausmodell zeigten dabei eine deutliche Wirküberlegenheit des sCAR-Fc gegenüber der Fc-gekoppelten, löslichen Variante des Decay-Accelerating Rezeptors (sDAF-Fc) (137, 138). Diese lässt sich zum einen durch eine vergleichsweise stärkere Bindungsaffinität des sCAR-Fc zu CVB3 (134) und zum anderen durch dessen exklusive Fähigkeit der A-Partikelinduktion (136) erklären.

Mit der transgenen Expression von sCAR-Fc über ein Adenovektor-vermitteltes, Doxycyclin-regulierbares Genexpressionssystem (AdG12) konnte neben der Vermeidung bzw. Reduktion der kardialen Infektion, Inflammation und des virusinduzierten Gewebeschadens auch erstmalig eine Verbesserung der aus klinischer Perspektive so bedeutenden hämodynamischen Parameter im CVB3-Mausmodell nachgewiesen werden (85). Hierbei gelang es durch streng Doxycyclin-abhängige sCAR-Fc-Induktion wirksame Serumlevelkonzentrationen zu erreichen. Während bei präventiver Anwendung eine im Vergleich zur Kontrollgruppe unbeeinflusste kardiale Pumpleistung und histopathologische Gewebedarstellung bei den CVB3-exponierten Versuchstieren ermittelt werden konnte, vermochten peri- und postinfektiös induzierte sCAR-Fc-Serumlevel immer noch, wenn auch geringergradige, therapeutische Effekte zu erzielen.

Auch lösliche Hybridfusionsproteine wurden hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität untersucht sowie *in vitro* und *in vivo* erfolgreich angewendet (139). Die LRA-Chimäre hCAR-hDAF-Fc zeigte im hierfür verwendeten CVB3-Infektionsmodell den größten Protektiveffekt und bewirkte nach erfolgreicher Transfektion und transgener Expression sogar eine im Vergleich zum

sCAR-Fc höhere Überlebensrate der Versuchstiere. Eine Überlegenheit bezüglich des antiadenoviralen Potentials von hCAR-hDAF-Fc gegenüber sCAR-Fc zeigte sich ebenfalls im Rahmen von *In-vitro*-Inhibitionsexperimenten.

Die Kombination von sCAR-Fc mit anderen antiviralen Therapieansätzen scheint ein weiteres bisher wenig erforschtes Behandlungsspektrum zu eröffnen. In einer persistent CVB3-infizierten kardialen Fibroblastenzelllinie gelang es durch Kopplung von transgener sCAR-Fc-Expression mit siRNAs gegen die RNA-abhängige RNA-Polymerase des CVB3 synergistische Wirkeffekte zu erzielen (198).

1.4 CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP)

Unlängst wurde ein neues, in entscheidenden Teilen der Sequenz und Struktur dem CAR ähnelndes, lösliches Protein, das CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP), nachgewiesen und charakterisiert (199). Das scheinbar nur in Nagetieren wie Mäusen und Ratten, nicht aber in Menschen oder anderen Säugetieren vorkommende CLSP ist wie CAR Mitglied der CTX-Unterfamilie innerhalb der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF).

Initiale Infektionsexperimente mit Maus-CLSP (mCLSP) konnten die Bindungsfähigkeit zu Adenovirusvektoren (AdV) und einen hierüber vermittelten antiadenoviralen Effekt nachweisen (199). Weitere Untersuchungen bezüglich eines darüber hinausgehenden, antioxsackieviralen Wirkpotentials sind bisher nicht durchgeführt worden und Gegenstand dieser Arbeit.

1.4.1 Aufbau, Vorkommen und Funktion

Aufgrund struktureller Analysen und phylogenetischer Betrachtungsaspekte ist das CLSP der CTX-Familie zuzuordnen und damit ebenso Bestandteil der IgSF (199). Des Weiteren zeigte sich unter den angewandten Analysemethoden sein alleiniges Vorkommen innerhalb der Klasse der Säugetiere bei der Ordnung der Nagetiere (Abb. 1.3).

Vertreter der IgSF zeichnen sich untereinander durch ein hohes Maß an Sequenzhomologie aus. Große Strukturverwandtschaft des CLSP besteht somit nicht nur zum CAR, sondern auch zu anderen Mitgliedern der CTX-Familie wie beispielsweise dem CAR-Like-Membrane-Protein (CLMP) (201), dem Brain- and Testis-specific IgSF Protein (BT-IgSF) (202), dem Endothelial Cell Selective Adhesion Molecule (ESAM) (203), den Junctional Adhesion Proteinen A-C (JAM-A-C) (204) oder dem Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) (205). Gemeinsames Strukturmerkmal der u. a. an Zelladhäsionsprozessen beteiligten Proteinuntergruppe ist das

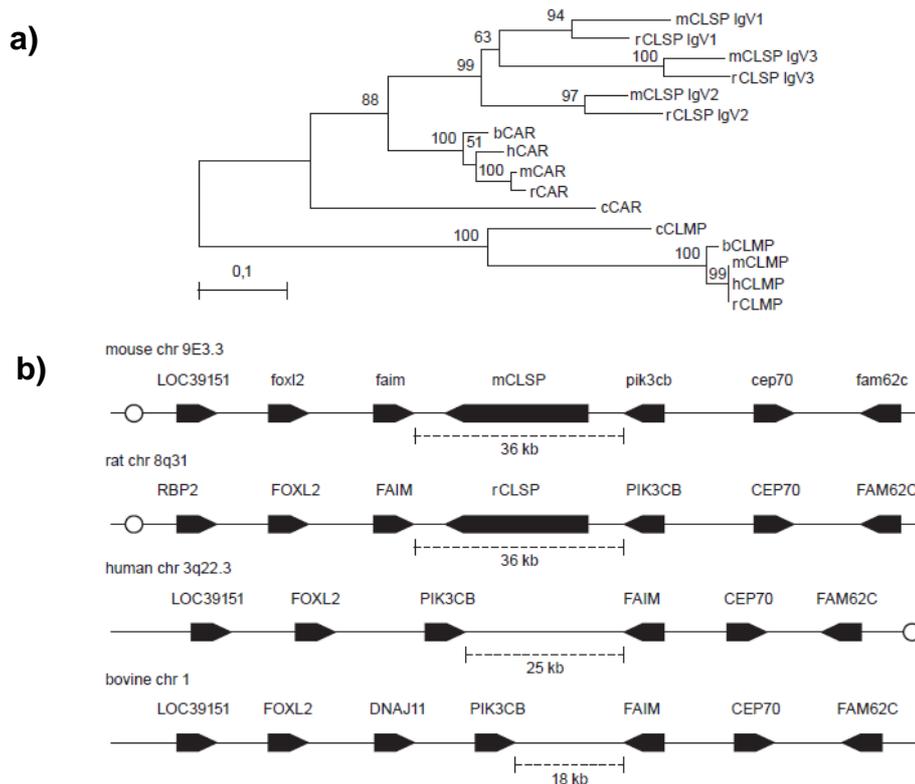


Abb. 1.3: Phylogenese des CLSP in Säugetieren [nach Kawabata K *et al.*, 2007; (199)]

(a) Phylogenetischer Stammbaum der CAR-Gruppe. Es wurden Aminosäuresequenzen der IgV-Domänen des CAR, CLSP und CLMP in unterschiedlichen Wirbeltieren [m = (*mouse*) Maus, r = (*rat*) Ratte, h = (*human*) Mensch, b = (*bovine*) Rind, c = (*chicken*) Haushuhn] miteinander verglichen und anhand dessen ein phylogenetischer Stammbaum konstruiert [Statistische Verfahren: Neighbor-Joining-Methode (200), Angabe der Bootstrap-Mittelwerte aus 1000 Analyse-Wiederholungen an den Knotenpunkten]. Während scheinbar zeitlich nacheinander gelagerte Duplikationsprozesse der IgV-Domäne bei der Ordnung der Nagetiere zur Ausbildung des CLSP führten, fehlt, wie auch beim Vergleich der entsprechenden CLSP-Genloci (b) deutlich wird, bei Primaten und anderen Säugern das CLSP-Gen. CAR = Cocksackievirus- und Adenovirusrezeptor; CLSP = CAR-Like-Soluble-Protein; CLMP = CAR-Like-Membrane-Protein

Aufweisen von IgV-ähnlichen und IgC2-ähnlichen Domänen (166, 174, 206), welche der N-terminalen D1- bzw. D2-Domäne des CAR entsprechen (199) (Abb. 1.4).

Das mCLSP-Gen befindet sich auf Chromosom 9 und codiert mit einer Länge von 1567 bp für ein 390 AS starkes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 43.009 Da (199). mCLSP besitzt im Gegensatz zu mCAR keine Transmembrandomäne und weist daher Eigenschaften eines natürlich vorkommenden LRA auf. Es enthält drei homologe IgV-Domänen (IgV1-3), welche ihrerseits mit einer direkten AS-Sequenzidentität von über 40 % jeweils strenge Homologie zur D1-Domäne des mCAR zeigen (Abb. 1.5). Eine ausgeprägt hydrophobe Proteinregion am N-Terminus legt das Vorhandensein einer Signalpeptidsequenz mit möglicher Schnittstelle zwischen Ser-19 und Val-20 nahe (199, 207).

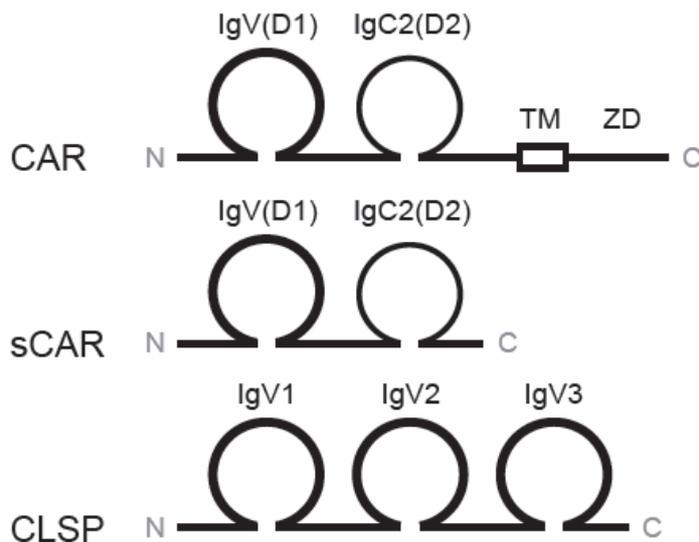


Abb. 1.4: Schematischer Vergleich der Proteinstruktur von CAR, sCAR und CLSP

Während der membranständige Coxssackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR) eine Transmembrandomäne (TM) und einen zyttoplasmatischen Proteinanteil (ZD) aufweist, fehlen diese bei der löslichen Spleißvariante sCAR und dem strukturverwandten CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP). CLSP besitzt hingegen drei IgV-ähnliche Domänen (IgV1-3), welche signifikante Homologie zur extrazellulären, CVB- und Ad-bindenden D1-Domäne des CAR/sCAR aufweisen. [mod. nach Kawabata K *et al.*, 2007; (199)]

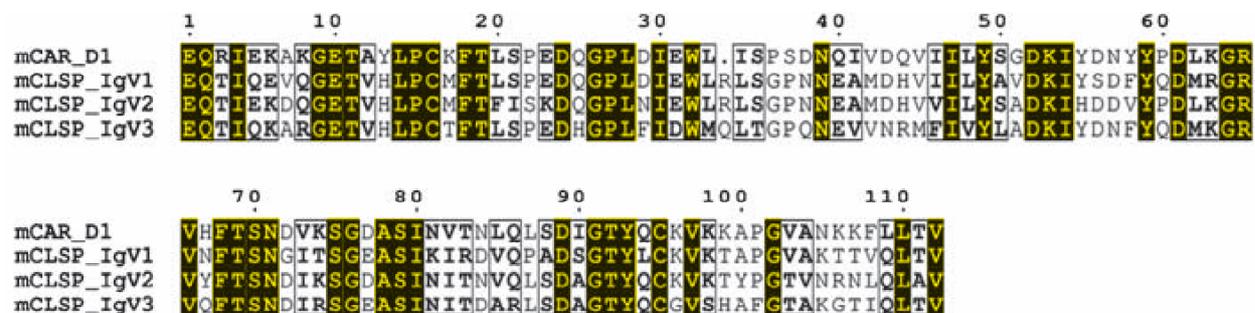


Abb. 1.5: Sequenzhomologie der D1-Domäne des Maus-CAR (mCAR) mit den IgV-Domänen (IgV1-3) des Maus-CLSP (mCLSP) [mod. nach Kawabata K *et al.*, 2007; (199)]

mCLSP-RNA-Nachweise in adulten, weiblichen Mäusen ergaben eine vergleichsweise hohe Gen-Expression in Gehirn und Ovarien. Während in Herz, Lunge, Nieren und Uterus noch geringe Transkriptionsraten ermittelt werden konnten, blieb der RNA-Nachweis in anderen Organen aus. Ein ubiquitär negativer Proteinnachweis im Western-Blot lässt hingegen auf ein insgesamt eher niedriges Proteinexpressionslevel in den untersuchten Mäusen schließen (199).

Charakteristischerweise entstehen innerhalb der IgSF durch alternative Spleißvorgänge oder posttranslationale, proteolytische Proteinmodifikationen lösliche Rezeptorvarianten, die sich durch das Fehlen transmembraner Proteindomänen auszeichnen (208). Für den Entstehungsmechanismus des CLSP, dessen codierender DNA-Abschnitt in der Maus auf Chromosomen 9 lokalisiert ist, wohingegen sich das mCAR-Gen auf Chromosom 16 befindet, trifft dies jedoch nicht zu (199). Da nachweislich keine CLSP-Varianten mit zellmembranverankernder Domäne existieren und seine physiologische Funktion weiter ungeklärt ist, liegt die Vermutung nahe, dass es, ähnlich löslicher Spleißvarianten des CAR (135), als primär lösliches

Protein eventuell Teil einer natürlichen antiviralen Wirtsabwehr bei Nagetieren sein könnte (199).

1.4.2 CLSP im antiviralen Kontext

Aufgrund der dreifach vorhandenen IgV-Domänen im mCLSP, welche signifikante Sequenzhomologie zur virusbindenden D1-Domäne des mCAR aufweisen, wurden bereits initial im Rahmen der Proteinerstbeschreibung Ad-Inhibitions- und -Bindungs-Experimente durchgeführt (199).

Hierbei konnte die Bindungsfähigkeit des mCLSP zu Adenovirusvektoren (AdV) mittels ELISA erstmals verifiziert werden. Eine resultierende inhibitorische Wirkung bezüglich Ad-Infektionen wurde daraufhin in Ad-permissiven, CAR-positiven und transgen mCLSP-produzierenden Zellen nachgewiesen. Während der Zelleintritt der eingesetzten reportergetragenden AdVs, welche CAR als Virusbindungsrezeptor nutzten, um bis zu 60 % reduziert werden konnte, war die Zellpermissivität für andere, CAR-unabhängige AdVs vergleichsweise unverändert. Diese Beobachtung bekräftigte die Annahme, dass das lösliche mCLSP mit dem zelloberflächenständigen mCAR um die Bindungsstellen entsprechender adenoviraler Fiberknopdomänen im Sinne eines LRA konkurriert.

Bei der anschließenden Verwendung des Zellkulturüberstandes von transgen mCLSP-produzierenden Zellen für Ad-Inhibitions-Experimente stellte sich ebenfalls eine Reduktion der Zielzellinfektion da. Diese fiel allerdings mit ca. 20 % deutlich geringer aus. Als Ursache für diese Beobachtung wurde eine partielle postsekretorische Bindung des mCLSP mit der Zellmembranoberfläche postuliert, deren Annahme durch durchflusszytometrische Untersuchungen bestärkt werden konnte. Nichtsdestotrotz vermochte auch der separate Einsatz von mCLSP bzw. eines neu konstruierten Fusionsproteins (NusA-mCLSP) in dosisabhängigen Experimenten, mit einer Reduktion der Virusvektoraufnahme von ca. 10 - 30 %, nur eine vergleichsweise abgeschwächte Wirkung zu erzielen.

Wie auch für andere Virusarten und ihre löslichen Rezeptorvarianten beschrieben (209-211) vermag mCLSP in CAR-defizienten Zellen eine Virusinfektion zu fördern. So zeigten CAR-negative, transgen mCLSP-produzierende Zellen bei Infektionsexperimenten verstärkte AdV-Reportergenaktivität und Ad-DNA-Level (199).

Strukturelle Ähnlichkeiten des CLSP mit der CVB-bindenden D1-Domäne des CAR sowie Erkenntnisse aus den beschriebenen Ad-Inhibitions-Experimenten lassen auch eine anticoxsackievirale Proteinwirkung vermuten. Analysen, die eine eventuelle Bindung bzw.

Inhibierung von CV durch CLSP untersuchen, wurden zuvor nicht durchgeführt und sind Gegenstand dieser Arbeit.

1.5 Regulierbare Genexpressionssysteme

Für eine effiziente und möglichst sichere Anwendung gentherapeutischer Verfahren spielen regulierbare Genexpressionssysteme eine wichtige Rolle. Die Expressionsregulation des Transgens ermöglicht es das Transgenprodukt innerhalb eines therapeutischen Bereiches auszusteuern und somit einerseits ausreichend hohe pharmakologische Wirkspiegel zu erzielen, jedoch andererseits toxischen Substanzeinflüssen bzw. eventuell auftretenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen und Komplikationen entgegenwirken zu können. Wichtige Eigenschaften eines extern regulierbaren Expressionssystems sind, neben einer niedrigen Basalaktivität, eine effiziente Induzierbarkeit des Transgens und eine zeitnahe Induktor-abhängige Systemregulation (212, 213). Darüber hinaus sollte eine möglichst nebenwirkungsarme Einbringung in den Trägerorganismus realisierbar sein. Hierbei stellen v. a. virale Vektoren ein wirksames Mittel dar Fremd-DNA effizient und unter Berücksichtigung gewebespezifischer Aspekte einzuschleusen (214, 215). Die den *In-vivo*-Anwendungen vorgelagerten Zellkulturexperimente mit entsprechenden Plasmidkonstrukten sind Voraussetzung für eine weiterführende, zeitaufwändigere Integration des jeweiligen Genexpressionssystems in einen Virusvektor und liefern bereits grundlegende Erkenntnisse über die regulatorischen Eigenschaften des verwendeten Transgens bzw. seines exprimierenden Systems.

1.5.1 Tet-On-System

Das Tetrazyklin-regulierbare Genexpressionssystem (Tet-System), welches sich vom Tet-Resistenzoperon des *E. coli* ableitet, basiert auf der reversiblen Tet-abhängigen Regulierbarkeit eines transkriptionalen Transaktivatorproteins (tTA) (216). Im Tet-On-System, in dem die Transgenaktivierung durch Zugabe des Tet-Derivats Doxycyclin (Dox) erfolgt, kommt eine modifizierte Transaktivatorvariante zum Einsatz. Das reverse Tet-abhängige Transaktivatorprotein (rtTA) besteht als chimäres Protein aus der C-terminalen Domäne des VP16-Proteins des Herpes-Simplex-Virus und der mutierten Variante des DNA-bindenden tet-Repressors (tetR) (217). Letztere Teilkomponente bindet in Anwesenheit von Dox an eine spezifische Regulatorregion der DNA (Tet-*responsives* Promotorelement = TRE), bestehend aus einer sich siebenfach wiederholenden tet-Operator-Sequenz (tetO7) *upstream* eines minimalen

CMV-Promotors (CMV_{Min}), wodurch die Transkriptionsaktivierung des Zielgens forciert wird. In erneuter Abwesenheit des Induktors Dox kommt es zu einer Loslösung des Transaktivatorkomplexes mit konsekutiver Drosselung der Zielgenexpression.

Eine weitere Verbesserung bezüglich der Regulierbarkeit des Tet-On-Systems gelang durch die Kombination des tetR mit der KRAB (Kruppel-*associated-Box*)-Repressionsdomäne des humanen Kid-Proteins (218). Das entstandene Konstrukt des Dox-abhängigen transkriptionalen Silencers (tTS) bindet in Abwesenheit von Dox an die Regulatorregion tetO7 und reprimiert somit zusätzlich die Promotoren des Zielgens (219). Weitere Optimierungen der Induktorsensitivität und Basalaktivität des Systems führten durch Verwendung modifizierter rtTA-Mutanten (u. a. rtTA2^s-M2) (220, 221) und abgewandelter TREs (222, 223) zu einer strengeren Regulierbarkeit der Zielgenexpression.

1.5.2 pAdG12-Expressionssystem

Das in dieser Arbeit verwendete pAdG12-Plasmidexpressionssystem enthält zwei in einem adenoviralen Shuttleplasmid befindliche Expressionskassetten (Abb. 1.5). Die erste Kasette kodiert für die kontinuierliche Expression des Dox-abhängigen Transaktivators rtTA2^s-M2 und die zweite Kasette für die regulierbare Expression des Zielgens durch einen Dox-abhängigen TREtight1-Promoter, einem minimalen CMV-Promoter mit *upstream* befindlicher tetO7-Regulatorregion. Die beiden Kassetten wurden in unterschiedlicher Orientierung zueinander in den Vektor kloniert, um eine mögliche Beeinflussung des TREtight-Promotors durch andere Promotorregionen, wie dem CMV-Promoter der rtTA2^s-M2 Expressionskasette, zu minimieren. Über dieses System konnten wünschenswerte Eigenschaften wie eine hohe Dox-Sensitivität bei kaum zu detektierender Background-Aktivität sowie eine gute zeitliche und quantitative Induktor-abhängige Regulation erreicht werden (224). Das pAdG12-Plasmidvektorkonstrukt konnte bereits erfolgreich in adenovirale Vektoren eingebracht und gentherapeutisch im CVB3-Myokarditismausmodell angewendet werden (85).

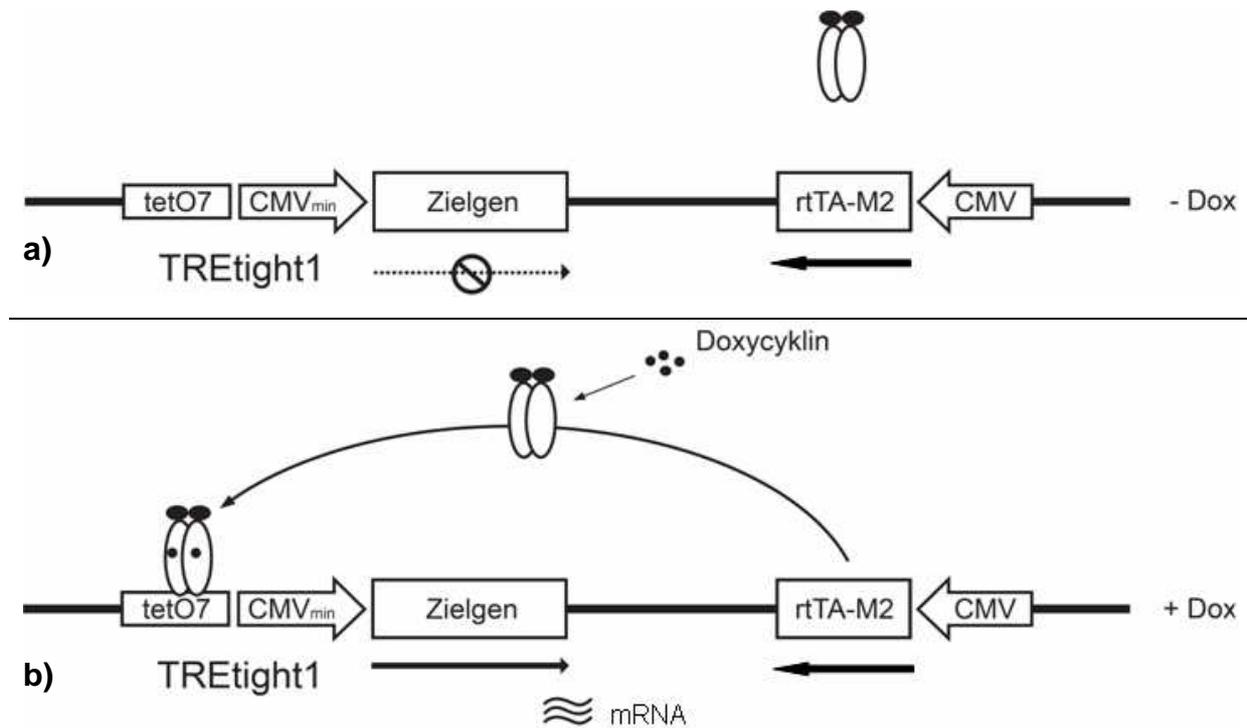


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Dox-regulierbaren Plasmidexpressionssystems pAdG12

(a) In Abwesenheit des Induktors Doxycyclin (Dox) bleibt das kontinuierlich exprimierte, Dox-abhängige Transaktivatorprotein $rtTA^{2^s}$ -M2 inaktiv. (b) In Anwesenheit von Dox bindet dieses am $rtTA^{2^s}$ -M2 und führt über eine Konformationsänderung des Transaktivators zur spezifischen Kontaktaufnahme mit der Regulatorregion (tetO7) des TREtight1-Promotors und konsekutiv zur Expression des Zielgens.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Der Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR) fungiert in seiner membranständigen Form als wichtiger, primärer Virusbindungs- bzw. Internalisierungsfaktor für zahlreiche humanpathogene Adenoviren bzw. Gruppe-B-Coxsackieviren (162, 163). Er kann in seiner löslichen, solublen Variante (sCAR) durch sterische Inhibierung der viralen Rezeptorbindungsstellen und zusätzlich im Falle der Coxsackieviren durch A-Partikelformation die Infektiosität der Viruspartikel herabsetzen bzw. gänzlich ausschalten (135, 136, 195). Eine weitere Verbesserung seiner antiviralen Wirksamkeit konnte durch Kopplung mit der Fc-Domäne des humanen IgG1 (sCAR-Fc) erreicht werden, welche zu einer Steigerung der Löslichkeitseigenschaften und Verlängerung der Halbwertszeit des Fusionsproteins führte (196). Ein in entscheidenden Teilen der Sequenz und Struktur dem sCAR ähnelndes, lösliches Protein, das CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP), wurde unlängst entdeckt und charakterisiert (199). Dem scheinbar nur in Mäusen und Ratten vorkommenden CLSP konnte bereits in ersten

Experimenten die Bindungsfähigkeit zu Adenoviren und eine daraus resultierende antivirale Wirksamkeit nachgewiesen werden (199).

Ziel dieser Arbeit war es ein neues Fusionsprotein, das Fc-Teil-gekoppelte CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP-Fc) zu konstruieren und in einen Doxycyclin-regulierbaren Plasmidvektor zu klonieren. Darüber hinaus sollte das antivirale Potential des CLSP-Fc erstmalig im Hinblick auf CVB-Infektionen, aber auch im Bezug auf Adenovirusinfektionen überprüft und vergleichende Daten mit dem bereits etablierten antiviral-wirksamen sCAR-Fc erhoben werden. Hierzu sollten beide rekombinanten Proteine im gleichen Expressionssystem eingesetzt und dessen Induktor-abhängige Regulierbarkeit sowie das transgene Proteinexpressionsprofil posttransfektionell vergleichend untersucht werden. Mit den fusionsproteinhaltigen Zellkulturüberständen galt es *in vitro* CVB- und Ad-Inhibitions-Experimente durchzuführen. Mit den Ergebnissen dieser experimentellen Arbeit sollte abschließend die Frage beantwortet werden können, ob das neuartige Fusionsprotein CLSP-Fc das Potential besitzt als antivirale Therapieoption Verwendung zu finden und sich somit weitere Untersuchungen mit dem Ziel einer funktionellen Erprobungen im Tiermodell anschließen sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller/Vertrieb
Agar NOBIE	DIFCO Laboratories, Lawrence/US
Agarose	Biozym, Oldendorf/D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München/D
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich, München/D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München/D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, München/D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München/D
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Mannheim/D
Doxycyclinehyclat	Sigma-Aldrich, München/D
Eagle-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe/D
Ethanol absolut [96 % (w/v)]	J.T. Baker, Philipsburg/US
Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinumbromid)	Roth, Karlsruhe/D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München/D
Express Hyb - Hybridisierungslösung	Clontech, Mountain View/US
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin/D
Formaldehyd [37 % (w/v)]	Sigma-Aldrich, München/D
Formamid	Fluka, Buchs/CH
FUDR	Sigma-Aldrich, München/D
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin/D
Glucose	Fluka, Buchs/CH
Glycerol [60 % (v/v)]; Glycerin [60% (v/v)]	Fluka, Buchs/CH; Roth, Karlsruhe/D
HEPES	Sigma-Aldrich, München/D
Isopropanol [99,8 % (v/v)]	Roth, Karlsruhe/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, München/D
Kanamycin	Merck, Darmstadt/D

LB-top Agar	Sigma-Aldrich, München/D
Magermilchpulver	Bio-Rad, Hercules/US
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, München/D
Methanol	J.T. Baker, Philipsburg/US
Milchpulver	Fluka, Buchs/CH
Mineralöl	Sigma-Aldrich, München/D
MOPS (6-Morpholinpropansulfonsäure)	Fluka, Buchs/CH
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München/D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München/D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, München/D
Natriumhydrogencarbonate (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt/D
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München/D
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka, Buchs/CH
Neutralrot	Merck, Darmstadt/D
Nystatin	Invitrogen, Karlsruhe/D
PBS Dulbecco's (1x) w/o Ca & Mg	PAA, Pasching/A
Penicillin	Biochrom AG, Berlin/D
Phenol	Sigma-Aldrich, München/D
Phenolrot	Sigma-Aldrich, München/D
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, München/D
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, München/D
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, München/D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, München/D
SDS	Sigma-Aldrich, München/D
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich, München/D
Streptomycinsulfat	Biochrom AG, Berlin/D
Trizma®-HCl	Sigma-Aldrich, München/D
Trypanblau	Gibco, Karlsruhe/D
Trypsin	Biochrom AG, Berlin/D
Triton X 100	Sigma-Aldrich, München/D
TRIZOL® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe/D
Tween 20	Promega, Mannheim/D
Wasser RNase frei (DEPC behandelt)	USB Coporation, Cleveland/US

2.1.2 Lösungen und Puffer

Allgemeine Lösungen und Puffer

2 x HBS: 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 150 mM Na₂HPO₄, pH 7.05

10 x TE-Puffer: 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0 (autoklaviert)

Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese

50 x TAE: 2 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8.0

DNA-Loading-Buffer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/D)

Lösungen und Puffer für den Northern Blot

10 x MOPS Puffer: 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, 200 mM MOPS, pH 7.0

10 x RNA-Ladepuffer: 720 µl Formamid, 80 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung, 180 µl 37%-ige (w/v) Formaldehyd-Lösung, 160 µl 10 x MOPS-Puffer, 1.5 µl Ethidiumbromid ad 1.5 ml A. bidest.

20 x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat, pH-Wert 7.

Waschlösung I: 0.1 x SSC, 0.1 % (v/v) SDS

Waschlösung II: 2 x SSC, 0.05 % (v/v) SDS

Lösungen und Puffer für den Western Blot

1 x TBS: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, pH 8.0

1 x TBST: 1 x TBS + 0.005% Tween 20, pH 8.0

4 x Ladepuffer: NuPage™ LDS Sample Puffer (Invitrogen, Karlsruhe/D) + DTT 1:5

Laufpuffer: 20 x NuPAGE Running Buffer (Invitrogen, Karlsruhe/D)

Transferpuffer: 50 ml NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen, Karlsruhe/D), 200 ml Methanol ad 1 l A. dest.

Stripping-Puffer: 15 g Glycine, 100 ml 10 % SDS, 1 ml Tween 20 ad 1 l A. dest., pH 3.2

2.1.3 Enzyme

Bezeichnung

Hersteller/Vertrieb

Alkaline Phosphatase (CIP)

Roche, Mannheim/D

Pfu-Polymerase

Applied Biosystem, Carlsbad/US

Restriktionsenzyme

New England Biolab, Frankfurt M./D

T4-DNA-Ligase	New England Biolab, Frankfurt M./D
T4-DNA-Polymerase	New England Biolab, Frankfurt M./D
Taq-Polymerase	Applied Biosystem, Carlsbad /US
Trypsin	Biochrom AG, Berlin/D

Alle Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt und gelagert.

2.1.4 Antikörper

primäre Antikörper

Goat anti-Human IgG	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery/US
Mouse anti-hCAR (RmCB)	Upstate, Lake Placid/US

sekundäre Antikörper

Goat anti-Human IgG-HRP	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery/US
Goat anti-Human IgG-HRP	Amersham Biosciences, Piscataway/US
Swine anti-Rabbit IgG-HRP	DAKO, Hamburg/D

2.1.5 Molekulargewichtsstandards

DNA-Größenstandards

1 kb-DNA-Leiter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/D
DNA-Leiter Mix	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/D
peq Gold o'range	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/D

Protein-Größenstandard

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe/D
-------------------------------------	-------------------------

2.1.6 Plasmide

Bezeichnung	Selektionsmarker	Herkunft/Bezugsquelle
pCLSP	KanR	Gene Art, Regensburg/D
pCRTOPO-sCAR-Fc	AmpR + KanR	AG Fechner, Berlin/D
pAdG12-sCAR-Fc	AmpR	AG Fechner, Berlin/D
pAdG12-sCAR-Fc _{trunk}	AmpR	AG Fechner, Berlin/D
pEGFP-C1	KanR	AG Fechner, Berlin/D

pCRTOPO-CLSP-Fc	AmpR + KanR	AG Fechner, Berlin/D
pAdG12-CLSP-Fc	AmpR	AG Fechner, Berlin/D

Siehe auch Plasmidkarten im Anhang.

2.1.7 Primer

Bezeichnung	Sequenz in 5`-3`-Richtung	Beschreibung
CLSP-Fc 1	gtg acg gag atc gaa gga g	Sequenzierung von CLSP-Fc
CLSP-Fc 2	atg tgc gtc ttc tcg gag a	Sequenzierung von CLSP-Fc
CLSP-Fc 3	ctc ttg gtg tcc aca tgt	Sequenzierung von CLSP-Fc
CLSP-Fc 4	tct ggg act cca gtt caa g	Sequenzierung von CLSP-Fc
CLSP-Fc 5	aat ggt cac acc gca cag agt	Sequenzierung von CLSP-Fc
CLSP-Fc 6	cag ata atg gtg agg tct cg	Sequenzierung von CLSP-Fc
CLSP-Fc 7	cat ata aat gta agt agt cg	Sequenzierung von CLSP-Fc
CLSP-Fc 8	tgg tac act agt agg aca t	Sequenzierung von CLSP-Fc
CLSP-1262as	ggc cgc gcc cac cac tgt cag ctg	Herstellung CLSP-Sonde f. NB
SV40polyAas	gtt tca ggt tca ggg gga ggt	Herstellung Fc-Sonde f. NB
rtTA2-M2-BamHIas	ctc gga tcc acc atg tca gag ctg gac aag	Herstellung M2-Sonde f. NB
BA2307as	ctc ctt aat gtc acg cag ga	Herstellung β -Aktin-Sonde f. NB

Alle Primer wurden von der Firma Oligoservice (Berlin/D) oder Metabion (Berlin/D) synthetisiert und in sterilem Aqua dest. gelöst (Konzentration 100 μ M).

2.1.8 Bakterienstämme und -medien

E. coli Top 10 (Invitrogen, Mannheim/D):

F {lacIq Tn10 (TetR)} mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZM15 lacX74 recA1 deoR araD139 (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

E. coli XL-10 Gold (Stratagene, Heidelberg/D):

TetR Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (TetR) Amy CmR]

Bakterienmedien **Hersteller/Vertrieb**

LB-Medium Invitrogen, Mannheim/D

LB-Agar Invitrogen, Mannheim/D

LB-Medium: Hefeextrakt (5 g/l), Trypton (10 g/l), NaCl (10 g/l);

LB-Agar: LB-Medium + Agar (15 g/l); pH: 7.00 (autoklaviert 20 min bei 121 °C)

Selektionsmedien: + 100 µg/ml Ampicillin, + 50 µg/ml Kanamycin

2.1.9 Zelllinien und -medien**Bezeichnung****Beschreibung****Kultivierungsmedium**

HEK 293T

humane embryonale Nierenzellen

DMEM (Gibco BRL/US)*

HeLa

humane zervikale Adenokarzinomzellen

DMEM (Gibco BRL/US)*

Transfektionsmedium: Opti-MEM® I- serumfreies Medium (Invitrogen, Karlsruhe/D)

Trypsin/EDTA-Lsg.: Trypsin 0.25 % (w/v), EDTA 0.2 % (w/v) (Invitrogen, Karlsruhe/D)

Eagle-Overlay: 9.61 g Eagle-Pulver, 0.5 ml Nystatin, Penicillin 1 Mio IE, Streptomycin
759 U/mg, 1.7 g NaHCO₃ ad 750 ml H₂O

*DMEM: mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin supplementiert

2.1.10 Viren und virale Vektoren

AdVCMV-Luc

(AG Fechner, Berlin/D)

Coxsackievirus B3 (CVB3)

(Prof. Zeichhardt, Berlin/D)

2.1.11 Kits – Kommerzielle Testsysteme**Bezeichnung****Hersteller/Vertrieb**

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

Applied Biosystems, Carlsbad/US

ECL Plus Western Blotting Detection Reagents

Amersham, Piscataway/US

EndoFree® Plasmid Maxi Kit

Qiagen, Hilden/D

Human IgG ELISA

Bethyl Lab Inc., Montgomery/US

Calcium-Phosphat Transfektion-Kit

Stratagene, La Jolla/US

Luciferase Detection Kit

Roche, Mannheim/D

Plasmid Minipräparation Kit

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/D

QIAEX®II Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden/D

Zero Blunt® TOPO Kit

Invitrogen, Mannheim/D

2.1.12 Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller /Vertrieb
[³² P]dCTP	Amersham, München/D
Gene Construction Kit (Version 3.0)	Textco BioSoftware, West Lebanon/US
GraphPad Prism 5 (Version 5.00.288)	GraphPad Software Inc., La Jolla/US
Hybond TM N Nylonmembran	Amersham, Buckinghamshire/GB
Hybridisierungsröhre	Biometra GmbH, Göttingen/D
Hyperfilm TM ECL	Amersham, Piscataway/US
Kodak Biomax MS Film	Integra Biosciences, Fernwald/D
Lipofectamin TM 2000	Invitrogen, Karlsruhe/D
Luciferin	Promega, Mannheim/D
dNTPs	Rapidozym, Berlin/D
NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe/D
Pipettenspitzen Biosphere® Filter Tips	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht/D
Pipettenspitzen für Accu-jet®pro - BD Falcon TM	BD Biosciences, Franklin Lakes/US
PVDF Membran	Bio-Rad, Hercules/US
Reaktionsgefäß 0.5-2.0 ml Safe Lock	Eppendorf, Hamburg/D
Reaktionsgefäß PCR	Eppendorf, Hamburg/D
Whatman-Papier	Whatman International Ltd., Maidstone/GB
Zellkulturflaschen - BD Falcon TM	BD Biosciences, Franklin Lakes/US
Zellkulturplatten - BD Falcon TM	BD Biosciences, Franklin Lakes/US
Zentrifugenröhrchen 15/50 ml - BD Falcon TM	BD Biosciences, Franklin Lakes/US

2.1.13 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller/Vertrieb
ABI Prism 310 Genetic Analyzer + Software	Perkin Elmer, Wellesley/US
Accu-jet® pro	Brand, Wertheim/D
Agarosegel-Kammer Hoefer® HE 33	Pharmacia Biotech, Uppsala/S
Anthos reader 2001	Anthos Labtec Instruments, Boston/US
Axiovert 25 CFL Mikroskop	Zeiss, Jena/D
Brutschrank Modell 5420	Labotect Labortechnik, Göttingen/D
Centrifuge 5415 D, 5415 R, 5810 R	Eppendorf, Hamburg/D

DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus, Wellesley/US
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen/D
Elektrophoreseeinheit PP3000	Biometra GmbH, Göttingen/D
Elektrophoreseeinheit XCell SureLock™	Invitrogen, Karlsruhe/D
Feinwaage BL 310	Sartorius, Göttingen/D
Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City/US
Heizplatte + Magnetrührer IKAMAG® RH	Janke IKA-Labortechnik, Staufen/D
Hybridisierungsofen Compact Line OV 4	Biometra GmbH, Göttingen/D
Immunfluoreszenzmikroskop Olympus IX 50	Olympus, Hamburg/D
Inkubator Modell C200	Labotect Labortechnik, Göttingen/D
Kamera Coolpix 990	Nikon, Tokyo/Jap
Lumat LB 9501	Berthold GmbH, Bad Wildbad/D
Mikrowelle	Bosch, München/D
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/D
Olympus BX60 Microscope	Olympus, Hamburg/D
pH-Meter HI 8314 membrane pHmeter	HANNA Instruments, Woonsocket/US
Pipetten (verschiedene Modelle)	Eppendorf, Hamburg/D
Sterilwerkbank	The Baker Company, Sanford/US
Strahlendetektor Bioscan QC 2000	Bioscan, Washington/US
Thermomixer 5436 compact/comfort	Eppendorf, Hamburg/D
Transferpette® 12	Brand, Wertheim/D
Transilluminator BioDoc Analyze	Biometra GmbH, Göttingen/D
TRIO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen/D
UV Stratalinker®1800	Stratagene, La Jolla/US
UV-/Weißlicht-Leuchttisch NU-72	Konrad Benda, Wiesloch/D
Vacunsafe comfort	INTEGRA Biosciences GmbH, Gießen/D
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia/US
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach/D
Zentrifuge Avanti™J-25	Beckman Coulter, Fullerton/US
Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus Sepatech, Osterode/D

2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* Bakterien erfolgte in LB-Medium bei 37 °C im Inkubationsschüttler (225 rpm) als Übernachtskultur (18 - 24 h). Zur Herstellung der Selektionsmedien wurden die benötigten Antibiotika dem Medium in der gewünschten Konzentration (s. 2.1.8) zugegeben. Für die Selektion und kurzfristige Lagerung wurden LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen verwendet.

2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien wurden nach der Calciumchloridmethode hergestellt (225). Die tiefgefrorenen *E. coli*-Bakterien wurden aus dem -80 °C Tiefkühlschrank entnommen, mit Hilfe einer Impföse auf einer Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. 5 ml LB-Medium wurden dann mit einer Einzelkolonie angeimpft und über eine weitere Nacht bei 37 °C im Brutschrank geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 50 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit 500 µl dieser Vorkultur inokuliert und bei 37 °C bis zum Beginn der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 0.5) schüttelnd vermehrt. Die Bakterienkultur wurde anschließend in ein 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen überführt, für 10 min auf Eis inkubiert, bei 4°C zentrifugiert (4000 rpm, 5 min) und das Zellpellet in 10 ml kalter, 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 15 min auf Eis wurden die Zellen bei 4 °C zentrifugiert (5000 rpm, 5 min) und das Pellet in 2 ml kalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h auf Eis gestellt und mit 20%iger Glycerin-Lösung versetzt. Die nun kompetenten Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung in vorgekühlte 1,5 ml-Röhrchen zu je 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Transformation von chemisch kompetenten Bakterien wurde ein 50 µl Zell-Aliquot *E. coli* Top 10 oder *E. coli* XL-Gold auf Eis aufgetaut, anschließend mit 25 µl des DNA-haltigen Ligationsansatzes vorsichtig vermischt und für 10 bzw. 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 30 s einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad ausgesetzt und im Anschluss für eine weitere Minute auf Eis inkubiert. Hiernach wurde die Zellsuspension in 250 µl (*E. coli* Top 10) bzw. 900 µl (*E. coli* XL-10 Gold) vorgewärmten LB-Medium aufgenommen und für 30–60

min bei 37 °C (225 rpm) vorinkubiert. Die Zellsuspension wurde nun auf Agar-Platten mit gewünschtem Selektionsmedium ausplattiert und für 18–24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Konservierung von Bakterienstämmen

Für die Langzeitlagerung wurden Bakterienzellen in Form von Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 800 µl einer *E. coli*-Übernachtskultur mit 200 µl Glycerin (60 % (v/v)) versetzt und in einem Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

2.3 DNA-Arbeitstechniken

2.3.1 DNA-Isolation aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA zur Transfektion eukaryotischer Zellen für Analysezwecke oder Klonierungen wurde mittels kommerzieller Kits durchgeführt und geschah entsprechend des Bedarfs im kleineren Maßstab (Minipräparation) oder größerem Maßstab (Maxipräparation).

Minipräparation:

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden 5 ml des gewünschten LB-Selektionsmediums in einem 15 ml-Röhrchen vorbereitet und anschließend mit einer entsprechenden *E. coli*-Bakterienkolonie beimpft. Aus 1,5 ml der Übernachtskultur (37 °C, 225 rpm) wurde am nächsten Tag mit Hilfe des Plasmid-Minipräparations-Kits (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/D) nach den Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA gewonnen.

Maxipräparation:

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in größeren Mengen wurden 250 ml des gewünschten LB-Selektionsmediums in einem Erlenmeyerkolben vorbereitet und anschließend mit einer entsprechenden *E. coli*-Bakterienkolonie inokuliert. Aus der Übernachtskultur (37 °C, 225 rpm) wurde am nächsten Tag mit Hilfe des QIAEX®II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden/D) nach den Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA gewonnen. Für die Isolierung von hochreiner DNA, wie sie beispielsweise für die Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendet wird, wurde das EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden/D) getreu dem Hersteller-Protokoll eingesetzt.

Die DNA-Konzentration und Qualität wurde abschließend sowohl photometrisch (s. 2.4.1) als auch gelelektrophoretisch (s. 2.4.2) bestimmt und gegebenenfalls die Proben mit sterilem A. dest. auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.3.2 DNA-Auftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese

In einer Gelmatrix wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren nach Anlegen einer Spannungsquelle ihrer Größe entsprechend auf die Anode zu. Nach diesem Prinzip erfolgt im elektrischen Feld die Auftrennung der durch Restriktionsverdau (s. 2.3.4) oder PCR (s. 2.5) entstandenen DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Fragmentlänge.

Für die Auftrennung der DNA wurden 1%-ige (w/v) Agarosegele hergestellt. Als Längenmarker kamen je nach Größe der zu trennenden DNA verschiedene DNA-Leiter zum Einsatz (1 kb-DNA-Leiter: Fragmente > 1000 bp, DNA-Leiter Mix: Fragmente < 500 bp, peq Gold o'range: Fragmente < 100 bp).

Zur Herstellung der Agarosegele wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1 x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle für einige Minuten erhitzt. Nach dem Kochen ließ man das Gemisch auf ca. 55 °C abkühlen und gab dann eine Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration ca. 0,005 % (v/v)) hinzu. Anschließend wurde das noch flüssige Gel in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm zur Formung der Auftragstaschen eingesetzt. Nach dem Aushärten des Gels wurde der Kamm entnommen und die Kammer vollständig mit 1 x TAE-Puffer gefüllt, so dass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Loading-Puffer im Verhältnis 5:1 vermischt und in die Taschen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 140 V/200 mA über 30 bis 90 min. Anschließend wurde das Bandenmuster der aufgetrennten DNA-Fragmente durch Anregung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid mittels eines UV-Transilluminators visualisiert und abfotografiert. Anhand des mitgeführten Längenmarkers war eine Größen- und Mengenabschätzung der einzelnen DNA-Fragmente möglich.

2.3.3 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus der Gelmatrix zur weiteren Verwendung im Rahmen von Ligationsansätzen erfolgte mit dem QIAEX®II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden/D).

Dazu wurden die gewünschten DNA-Fragmente nach der Auftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.3.2) und Dokumentation des Bandenmusters mittels eines scharfen, sauberen Skalpellens ausgeschnitten und entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Im Anschluss wurde die Extraktions-Ausbeute photometrisch quantifiziert (s. 2.4.1).

2.3.4 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurden sowohl eingesetzt um Plasmide anhand spezifischer Restriktionsmuster im so genannten „Testverdau“ zu identifizieren, als auch zur Herstellung definierter DNA-Fragmente für Klonierungsansätze.

Typ II-Restriktionsendonukleasen erkennen spezifisch meist palindromische Tetra- bis Oktanukleotidsequenzen und hydrolysieren die doppelsträngige DNA innerhalb dieser Erkennungssequenzen. Dabei entstehen entweder glatte („blunt-ends“) oder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden („sticky-ends“). Ihre Aktivität wird in Units (U) angegeben, wobei 1 Unit der Menge eines Restriktionsenzym entspricht, welche unter Standardbedingungen ein Mikromol (μmol) Substrat pro Minute umsetzt.

Die Restriktionen wurden für alle Experimente nach den Angaben des Herstellers (New England Biolab, Frankfurt M./D) in den jeweils mitgelieferten Puffersystemen durchgeführt. Gemäß den Herstellerangaben wurde je 1 U Restriktionsenzym pro μg DNA eingesetzt. In Abhängigkeit der zu schneidenden DNA-Menge wurden Restriktionsansätze mit unterschiedlichem Volumen angesetzt (20 μl -Ansatz: 0,5-1 μg DNA, 100 μl -Ansatz: 2-10 μg DNA). Die Restriktionsansätze wurden zwischen 1 und 24 h bei empfohlener Temperatur inkubiert und anschließend in der Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.3.2) analysiert.

2.3.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation (s. 2.3.6) ist die Rezirkularisierung des linearisierten Vektors mit seinen kompatiblen Enden gegenüber der Integration des Inserts begünstigt. Um dies zu vermeiden wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen dieser DNA-Restriktionsprodukte durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP = Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) entfernt.

Hierzu wurden in einem ersten Schritt die Restriktionsendonukleasen aus den Restriktionsansätzen bei ihrer jeweiligen Denaturierungstemperatur für 20 min hitzeinaktiviert. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden im nächsten Schritt 0,1 U CIP je μg DNA hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von EDTA und 20-minütigem Erhitzen bei 75 °C gestoppt. Zur Entfernung der alkalischen Phosphatase wurde das dephosphorylierte Vektorprodukt gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel extrahiert (s. 2.3.3) und quantifiziert (s. 2.4).

2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Linearisierte DNA-Moleküle lassen sich durch die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden miteinander verbinden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Verknüpfung unter Hydrolyse von ATP.

Die Ligationsreaktionen wurden mit dem zur T4-DNA-Ligase mitgelieferten Puffersystem nach Angaben des Herstellers (New England Biolab, Frankfurt M./D) durchgeführt. Für Klonierungszwecke wurden 50 bis 70 ng des linearisierten Vektorplasmids mit 100 bis 200 ng des zu ligierenden DNA-Fragments (Insert) zusammenpipettiert (Vektorplasmid-Insert-Verhältniss von 1:2 bis 1:3). Der Ligationsansatz wurde für mindestens 4 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert und entweder sofort zur Transformation chemisch kompetenter Zellen (s. 2.2.3) eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

2.4.1 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Nukleinsäuren zeigen aufgrund der Purin- und Pyrimidinbasen in ihren Sequenzen ein Absorptionsmaximum von Strahlung im ultravioletten Bereich bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Messung der Extinktion (OD) wässriger DNA- oder RNA-Lösungen bei 260 nm gegen Wasser als Referenz lässt näherungsweise folgende Beziehung zur Nukleinsäure-Konzentration zu: **Nukleinsäure-Konzentration (µg/ml) = Faktor x OD₂₆₀**

Dabei beträgt der Faktor bei Doppelstrang-DNA 50, bei Einzelstrang-DNA 40 und bei RNA 33. Diese Angaben beziehen sich auf RNA-freie DNA bzw. auf DNA-freie RNA. Als Verunreinigungen treten häufig auch Phenolreste oder Proteine auf, die stark bei 280 nm absorbieren. Die Reinheit der Präparation lässt sich aus dem Quotienten von OD₂₆₀/OD₂₈₀ abschätzen. Für eine hinreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäuren gilt dabei folgender Richtwert: OD₂₆₀/OD₂₈₀ ≥ 1,8. Die DNA- und RNA-Konzentrationen der Proben sowie deren Reinheitsgrad wurden am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/D) gegen RNA-freies Wasser als Referenz getreu der Herstellerangaben gemessen und über die geräteeigene Computersoftware ausgewertet.

2.4.2 Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung

Zur semiquantitativen Bestimmung kleinerer DNA-Konzentrationen wurde ein Aliquot der zu untersuchenden Probe in der Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.3.2) analysiert. Zum Vergleich

wurde eine DNA-Referenz-Probe mit bekannter Konzentration aufgetragen und die Nukleinsäure-Konzentration anhand der Referenz-Probe abgeschätzt. Eine weitere Orientierung bezüglich der in der Probe enthaltenen DNA-Menge konnte durch die Inrelationsetzung zum mitgeführten Längenmarker gewonnen werden.

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein mehrzyklisches Verfahren, durch das definierte Nukleotidsequenzen (Templates) *in vitro* mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase exponentiell vermehrt werden können. Der zu amplifizierende Bereich wird dabei von zwei dem Template komplementären Oligonukleotiden (Primern) determiniert (226).

Die PCR-Technologie wurde zur Amplifizierung und zum Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte, aber auch zur Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden (s. 2.9.1.4) eingesetzt. Die Auswahl der geeigneten DNA-Polymerase und der entsprechenden PCR-Reaktionsbedingungen erfolgte in Abhängigkeit von Primer-Längen, Basenzusammensetzung und von der Länge und Struktur des zu amplifizierenden Templates. Für Klonierungszwecke wurde Pfu-Polymerase eingesetzt, welche eine ausgeprägte Korrekturlesefunktion besitzt, die es ihr ermöglicht, DNA-Stränge mit einer geringeren Fehlerrate zu synthetisieren. PCR-Reaktionen zum Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen erfolgten mittels Taq-Polymerase. Die Enzyme wurden jeweils in den mitgelieferten Puffer-Systemen nach Herstellerangaben (Applied Biosystems, Carlsbad/US) eingesetzt.

Die PCR erfolgte im Thermocycler Gene Amp® PCR System 9700. Die Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes, sowie die Reaktionsbedingungen sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 angegeben.

Tab. 2.1: Beispiel für einen 50 µl- PCR-Reaktionsansatz

Reagenzien	Reaktionsvolumen (50 µl-Ansatz)
10 x Polymerasepuffer	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
Forward-Primer (100 µM)	1 µl
Reverse-Primer (100 µM)	1 µl
DNA-Template (0,1-0,5 µg)	x µl
DNA-Polymerase (2,5-5 U/µl)	1-0,5 µl
A. dest. (RNA-frei)	auf 50 µl auffüllen

Tab. 2.2: PCR-Reaktionsbedingungen

Abfolge der Reaktionsschritte	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung von Template-DNA	95 °C	4 min	1
Denaturierung von Template-DNA	95 °C	30 s	2-30 * ³
Annealing/Bindung von Primern an Template-DNA	50-68 °C * ¹	30 s	2-30 * ³
Elongation/DNA-Synthese	72 °C	0,5-4 min * ²	2-30 * ³
Finale Elongation	72 °C	10 min	31
Kühlung	4 °C	∞	32

*¹ Die Wahl der Annealing-Temperatur orientierte sich an der Primer-spezifischen Schmelztemperatur.

*² Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit der DNA-Template-Länge gewählt.

*³ Die Anzahl der Zyklus-Wiederholungen wurden entsprechend der gewünschten DNA-Menge variiert (25-30 Wdh.).

2.6 Sequenzierung von DNA

Das im Rahmen dieser Arbeit klonierte Plasmid-Konstrukt pAdG12-CLSP-Fc wurde durch Sequenzierung der Expressionskassette auf mögliche Mutationen überprüft.

Zunächst wurde die Amplifizierung der zu untersuchenden DNA-Sequenz mit dem Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad/US) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde 1 µg DNA mit 2 µl Sequenzierungspuffer und 0,25 µl Sequenzierungsprimer (100 µM) versetzt und der Ansatz mit RNA-freiem A. dest. auf 10 µl aufgefüllt. Nachdem das Reaktionsgemisch 4 min bei 98 °C im Thermocycler Gene Amp® PCR System 9700 erhitzt worden war, wurden 2 µl Big Dye Terminator Prämix zugegeben und die PCR-Reaktion über 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tab. 2.3: Reaktionsbedingungen für die Sequenzierungs-PCR

Abfolge der Reaktionsschritte	Temperatur	Zeit
Denaturierung von Template-DNA	96 °C	10 s
Annealing/Bindung von Primern an Template-DNA	50 °C	5 s
Elongation/DNA-Synthese	60 °C	4 min
Kühlung	4 °C	∞

Im Anschluss an die PCR-Reaktion musste die DNA für die nachfolgende Sequenzierung aufgearbeitet werden. Dazu wurden 90 µl RNA-freies A. dest., 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 250 µl Ethanol (96 % (w/v)) zum PCR-Ansatz gegeben und für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das DNA-Pellet mit 400 µl Ethanol (70 %

(v/v)) gewaschen und erneut bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet bei 56 °C im Thermoblock getrocknet und in 30 µl RNA-freiem A. dest. gelöst. Die Sequenzierung und Auswertung erfolgten über den Gene Analyzer ABI 310 Kapillar-Sequenzierautomaten unter Verwendung der ABI DNA Sequencing Analysis Software.

2.7 Plasmid-Konstruktion

Die verwendeten Plasmide (s. auch Plasmidkarten im Anhang) wurden mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft.

pCLSP

Dieses Plasmid enthält die kodierenden Konsensussequenzen für das aus der Hausmaus (*Mus musculus*) stammende CLSP. Dabei wurde die angeforderte Sequenz aus der Genom-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) entnommen (Locus: AB 262662) und deren Produktion über die Firma Gene Art (Regensburg/D) in Auftrag gegeben.

pCRTOPO-CLSP-Fc

Dieses Plasmid diente als Zwischenklonierungsprodukt für die Konstruktion des pharmakologisch regulierbaren pAdG12-CLSP-Fc und wurde aus den beiden Ausgangsplasmiden pCLSP und pCRTOPO-sCAR-Fc kloniert.

Hierbei wurde zunächst die cDNA für CLSP aus pCLSP sowie die cDNA für sCAR aus pCRTOPO-sCAR-Fc jeweils mit *Bam*HI und *Kpn*I geschnitten. Die Restriktionsprodukte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.3.2), aus dem Gel extrahiert (s. 2.3.3) und quantifiziert (s. 2.4.1). Im anschließenden Schritt fand die Ligation (s. 2.3.6) der CLSP cDNA mit dem TOPO-Vektor statt, womit die kodierende Sequenz für das CLSP-Fc-Fusionsprotein entstand.

pAdG12-CLSP-Fc

Um das Fusionsprotein CLSP-Fc in einen pharmakologisch regulierbaren Plasmid-Vektor für die folgenden Expressions- und Virus-Inhibitions-Experimente einzusetzen, wurde die CLSP-Fc cDNA in das Doxycyclin-regulierbare AdG12-Vektor-Konstrukt kloniert.

Dafür wurde zunächst die cDNA für CLSP-Fc aus pCRTOPO-CLSP-Fc, sowie die cDNA für sCAR-Fc aus pAdG12-sCAR-Fc jeweils mit *Kpn*I und *Mlu*I geschnitten. Die Restriktionsprodukte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.3.2), aus dem Gel extrahiert (s. 2.3.3) und quantifiziert (s. 2.4.1). Im abschließenden Schritt fand die Ligation (s. 2.3.6) der CLSP-Fc cDNA mit dem AdG12-Vektor-Konstrukt statt.

pCRTOPO-sCAR-Fc, pAdG12-sCAR-Fc und pAdG12-sCAR-Fc_{trunk}

Hierbei handelte es sich um bereits fertig klonierte Plasmide, welche von der Arbeitsgruppe (AG Fechner, Berlin/D) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Planung der Plasmidkonstrukte und deren Darstellung als Vektorkarte sowie nachfolgende Restriktionsanalysen wurden unter Zuhilfenahme der Plasmidkonstruktions-Software Gene Construction Kit 3.0 (Textco BioSoftware, US) vorgenommen.

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Arbeit mit HEK 293T- und HeLa-Zellen wurde unter sterilen Bedingungen in einer dafür standardisierten Sterilwerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in antibiotikahaltigem Medium (s. 2.1.9) in 25 cm² bzw. 75 cm² großen Zellkulturflaschen kultiviert und im Inkubator gelagert (bei 37 °C; 5 Vol% CO₂). Je nach gewünschter Zelldichte wurden die Kulturen nach 2-3 Tagen ausgezählt (s. 2.8.3) und in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:30 passagiert (s. 2.8.2).

2.8.2 Trypsinierung adhärent wachsender Zellen und Zellpassagierung

Die Anheftung adhärent wachsender Zellen an die Oberfläche eines Zellkulturträgers sowie der Zell-Zell-Kontakt werden über Oberflächenproteine vermittelt. Trypsin als proteolytisch wirkendes Enzym spaltet hydrolytisch Peptidbindungen nach bestimmten Aminosäureresten innerhalb der Proteinstruktur und führt somit zur Lösung der Zellen aus ihrem Verband. EDTA als Chelatbildner fördert ebenfalls über die Bindung von zweiwertigen Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen die Zellablösung.

Zur Ablösung und Passagierung von HEK 293T- und HeLa-Zellen wurde zunächst das alte Medium aus der Kulturflasche vorsichtig abgesaugt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung hinzupipettiert. Nach anschließender Inkubation bei 37 °C für ca. 3-5 min wurde die Trypsinierungsreaktion durch die Zugabe von 10 Vol% FKS-haltigem Medium gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden nun in dem eingesetzten Medium resuspendiert und je nach gewünschter Zelldichte wurde ein Teil dieser Stammlösung in eine neue Zellkulturflasche ausgesät und mit frischem Medium auf das Ausgangsvolumen verdünnt.

2.8.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl und dem Anteil lebensfähiger Zellen wurden diese mit einer Trypanblau-Lösung angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Trypanblau färbt lediglich tote Zellen aufgrund ihrer defekten Membranstruktur. Dafür wurden 150 µl der als Stammlösung angefertigten Zellsuspension mit 150 µl Trypanblau-Lösung und 150 µl 1 x PBS vorsichtig vermischt und ein Tropfen auf die Zählkammer übertragen. Es wurden jeweils alle 4 Großquadrate (Q) ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = [Q1 + Q2 + Q3 + Q4 / 4] \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 .$$

2.8.4 Konservierung und Reaktivierung von Zellkulturen

Konservierung von Stammkulturen

Die Zellen wurden zunächst in einer 75 cm²-Kulturflasche bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert, trypsiniert (s. 2.8.2) und in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15 ml-Zentrifugen-Röhrchen überführt und bei 4 °C zentrifugiert (1.200 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde im Einfriermedium (95 Vol% FKS, 5 Vol% DMSO) resuspendiert. Anschließend wurden 1 ml-Aliquots in Cryo-Röhrchen gefüllt und sofort in einer Einfrierbox unter kontrollierter Abkühlung (1 °C/min) für mindestens 16 h bei -80 °C gelagert und danach in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt.

Reaktivierung konservierter Kulturen

In ein 15 ml-Röhrchen wurden 10 ml kaltes Kulturmedium (4 °C) gegeben, das bei 37 °C aufgetaute Zell-Aliquot direkt hinzupipettiert und vorsichtig durchmischt. Die Zellsuspension wurde nun bei 4 °C zentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert, in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums und die Zellen wurden bis zum Erreichen der gewünschten Dichte weiter inkubiert.

2.8.5 Transiente Zell-Transfektion

Als transiente Transfektion wird das zeitweilige Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Dafür stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung.

Für die Transfektion wurden die Zellen am Vortag auf den entsprechenden Zellplatten (6-Well- bzw. 12-Well-Platten) ausgesät (6×10^5 bzw. 4×10^5 Zellen/Well) und bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte (90%ige Konfluenz) zugewartet.

2.8.5.1 Calciumphosphat-Methode

Bei der Transfektion der Zellen mit Calciumphosphat wird die Plasmid-DNA mit Calciumchlorid (CaCl_2) und einem Phosphatpuffer ($2 \times \text{HBS}$) vermischt um DNA-Calciumphosphat-Kopräzipitate zu bilden. Diese treten dann mit der Zelloberfläche in Kontakt, werden über Endozytose aufgenommen und gelangen anschließend in den Zellkern.

Vor Beginn der Transfektion wurde der pH-Wert des HBS-Puffers kontrolliert und gegebenenfalls auf 7,05 eingestellt. Um Kontaminationen der Versuchsansätze zu vermeiden, wurden sowohl der HBS-Puffer als auch die eingesetzte CaCl_2 -Lösung zuvor sterilfiltriert. Je nachdem, ob auf 6-Well- oder 12-Well-Platten transfiziert wurde, enthielt ein Transfektionsansatz pro Well 1,5-2,5 μg Plasmid-DNA, 150 bzw. 300 μl CaCl_2 -Lsg. (0,25 M) und 150 bzw. 300 μl 2 x HBS-Puffer. Dabei wurden zuerst die Plasmid-DNA und die CaCl_2 -Lsg. miteinander vermischt und anschließend 2 x HBS tropfenweise dazugegeben. Nach 1 min Inkubationszeit wurde das Gemisch ebenfalls tröpfchenweise vorsichtig auf die Zellen pipettiert und nach 18 h Inkubation (37°C , 5 Vol% CO_2) das Medium behutsam gewechselt, sowie Transfektionsausbeute und Zellvitalität bestimmt.

2.8.5.2 Transfektion mit Lipofectamin 2000

Bei der Transfektion mit Lipofectamin 2000 beruht der erwünschte Gentransfer auf der Lipofektion, bei der die DNA mit Liposomen bzw. Vesikeln aus kationischen Lipiden komplexiert, welche endozytotisch in die Zelle aufgenommen werden. Beim Zerfall des Endosoms penetriert die DNA ins Zytoplasma und gelangt in den Zellkern.

Vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium gegen serum- und antibiotikafreies Medium (Opti-MEM® I) ausgetauscht. Für eine 12-Well-Platte wurden je Well 1,5 μg Plasmid-DNA benötigt. Diese wurde in 100 μl serumfreiem Medium gelöst. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 5 μl Lipofectamin 2000 in 100 μl serumfreiem Medium gelöst. Nach 5 min wurde das Lipofectamin zu der DNA gegeben und der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig tropfenweise auf die Zellen pipettiert und nach 4-6 h Inkubation (37°C , 5 Vol% CO_2) das serumfreie Medium gegen Vollmedium ausgetauscht. Nach ca. 18 h konnten Transfektionsrate und Zellvitalität bestimmt werden.

2.9 Transkriptions- und Expressionsanalysen

2.9.1 Northern Blot

Beim Northern Blot handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Übertragung (Blotten) der in der Gelelektrophorese aufgetrennten RNA auf ein geeignetes Trägermaterial. Auf diesem ist die spezifische Markierung von RNA-Sequenzen durch die Hybridisierung mit komplementären Gensonden möglich.

2.9.1.1 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Die Isolation der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte nach dem Prinzip der „Single-Step“-Methode (227). Dafür wurde TRIzol® Reagent verwendet, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat (GITC). GITC führt als chaotrope Substanz zur Auflösung geordneter Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophober Wechselwirkungen in Proteinstrukturen, wodurch diese damit denaturiert werden. Die Denaturierung membranständiger Proteine führt über die Lyse von Zell- und Kernmembranen zur Freisetzung der RNA-Moleküle und gleichzeitig zur wirksamen Inhibierung RNA-spaltender Enzyme (RNasen). Das enthaltene Phenol bewirkt im sauren Milieu, dass sich denaturierte Proteine und kleinere DNA-Fragmente aus dem Lysat nach Zentrifugation von den in der wässrigen Phase enthaltenen RNA-Molekülen trennen lassen.

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurde 48 h nach erfolgter Zelltransfektion das Medium von den Kulturplatten abgesaugt und die Zellen mit $1 \times$ PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml TRIzol® Reagent-Lsg. pro Well auf die Zellen gegeben, durch Auf- und Abpipettieren durchmischt und das Zelllysat in 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt. Die RNA wurde dann nach den weiteren Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe/D) isoliert und anschließend in 30 μ l DEPC-Wasser gelöst und 10 min bei 60 °C inkubiert. Die Konzentration und der Reinheitsgrad der RNA-Proben wurde abschließend photometrisch bestimmt (s. 2.4.1).

2.9.1.2 RNA-Auftrennung in der Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Gesamt-RNA nach ihrer Länge erfolgte elektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarose/Formamid-Gel.

Zur Herstellung des Gels wurde 1 % (w/v) Agarose in 5/6 Volumenteilen $1 \times$ MOPS-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, auf ca. 60 °C abkühlen gelassen und dann 1/6 Volumenteile 37%ige (w/v) Formaldehyd-Lsg. (Endkonzentration: 2,2 M) hinzugefügt. Anschließend wurde das noch

flüssige Gel in die zuvor gründlich gesäuberte Gelkammer gegossen und nach vollständiger Auspolymerisierung mit dem späteren Laufpuffer ($1 \times$ MOPS-Puffer) überschichtet. Es wurden zunächst jeweils $10 \mu\text{g}$ der präparierten Gesamt-RNA-Probe (s. 2.9.1.1) mit $5 \mu\text{l}$ Ethidiumbromid- und Formamid-haltigen RNA-Ladepuffer (s. 2.1.2) vermischt, für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend unmittelbar auf Eis gelagert. Nun wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und die Trennung der RNA erfolgte solange, bis die Bromphenolblau-Markerbanden des Ladepuffers bis zu $2/3$ das Gel durchwandert hatten über etwa 1 h bei 140 V. Anschließend wurden die RNA-Moleküle durch Anregung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid im UV-Transilluminator visualisiert. Durch Überprüfung der 28S- und 18S-rRNA-Bande konnte eine mögliche Degradierung der Proben abgeschätzt werden.

2.9.1.3 RNA-Transfer auf Nylonmembranen mittels Kapillar-Blot

Der Transfer der in der Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese aufgetrennten RNA (s. 2.9.1.2) erfolgte in diesem Fall auf eine positiv geladene Nylonmembran. Hierfür wurde die Methode des Kapillar-Blots verwendet (s. Abb. 2.1). Dabei wird der Transfer der Nukleinsäuren durch eine gerichtete Ionenwanderung mittels Kapillarkräften bewirkt.

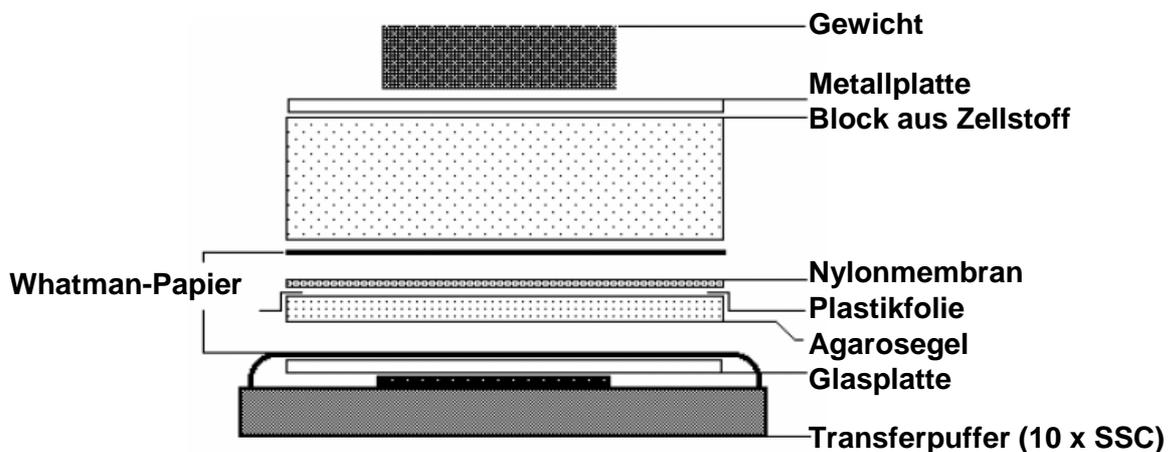


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau eines Kapillar-Blots (mod. nach Sipo, Isaac: „Entwicklung und Charakterisierung von Tamoxifenregulierbaren onkolytischen adenoviralen Vektoren zur Behandlung von Tumorerkrankungen Antivirale Strategien als gentherapeutische Behandlungsoption bei Coxsackievirus-Infektionen im kardialen System“. Diss. Freie Universität Berlin, 2006)

Für diesen Blot wurde Whatman-Papier in $10 \times$ SSC-Puffer eingelegt und auf einem glatten Untergrund positioniert, wobei die Enden des Whatman-Papieres in eine mit $10 \times$ SSC-Transferpuffer gefüllte Schale eingetaucht wurden. Auf diese Vorrichtung wurde das zuvor über 2×30 min mit $10 \times$ SSC-Puffer äquilibrierte, zurechtgeschittene Agarosegel gelegt und an allen Seiten mit Plastikfolie isoliert. Diese diente dazu, einen Flüssigkeitsstrom außerhalb des Gels

vorzubeugen. Nun wurden der ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtete Nylonmembran-Filter sowie ein feuchtes und ein trockenes, zugeschnittenes Whatman-Papier luftblasenfrei auf das Gel geschichtet. Zum Abschluss wurde ein Stapel trockener Papiertücher aufgelegt und der Blot mit einem Gewicht beschwert. Dieser Aufbau wurde über Nacht belassen. Der vollständige Transfer der Nukleinsäuren auf die Membran wurde am nächsten Tag mit dem Transilluminator überprüft und die Positionen der 18S- und 28S-rRNA markiert. Nach anschließender Trocknung der Membran für 30 min an der Luft wurden durch zweimaliges UV-Crosslinking ($\lambda = 254 \text{ nm}$; 120 mJ/cm^2) die Nukleinsäuren kovalent an die Membran gebunden.

2.9.1.4 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Herstellung radioaktiv markierter, linearisierter DNA-Fragmente, die später als Hybridisierungs-Sonden zur Detektion entsprechender RNA-Transkriptate verwendet wurden, erfolgte mittels PCR (s. 2.5). Dabei fand die Synthese eines komplementären DNA-Stranges unter dem Einsatz radioaktiv markierter Nukleotide statt.

Hierfür wurden mit dem β -strahlenden Phosphorisotop ^{32}P markierte Cytidintriphosphat-Bausteine (^{32}P -dCTP) und entsprechende antisense-Primer nach folgendem Protokoll verwendet:

Tab. 2.4: PCR-Reaktionsansatz zur Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Reagenzien	Reaktionsvolumen (25 μl -Ansatz)
10 x Taq-Polymerasepuffer	2,50 μl
MgCl_2	2,50 μl
dNTPs ohne dCTP (1 mM)	0,50 μl
^{32}P -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	5,00 μl
Antisense-Primer (100 μM)	0,30 μl
DNA-Matritze (0,25-0,75 μg)	x μl
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,25 μl
A. bidest. (RNA-frei)	auf 25 μl auffüllen

Tab. 2.5: PCR-Reaktionsbedingungen für die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Abfolge der Reaktionsschritte	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung von Template-DNA	94 °C	2 min	1
Denaturierung von Template-DNA	96 °C	30 s	2-33
Annealing/Bindung von Primern an Template-DNA	56 °C	30 s	2-33
Elongation/DNA-Synthese	72 °C	90 s	2-33
Finale Elongation	72 °C	5 min	34
Kühlung	4 °C	∞	35

Die Reinigung der PCR-Produkte von nicht inkorporierten Radionukleotiden erfolgte über Dextrangelfilter-Säulen. Dafür wurde Sephadex G-50 in A. dest. gelöst und luftblasenfrei in eine Pasteurpipette geschichtet. Die radioaktiven Fragmente wurden dann hinter Plexiglasschutz auf die Säule pipettiert und mit 1 ml A. dest. überschichtet. Die ersten ca. 500 µl Eluat wurden verworfen. Von den nächsten 10 Fraktionen zu je 50 µl wurde die Radioaktivität mittels Strahlendetektor (Bioscan QC 2000) gemessen. Anschließend wurden die Fraktionen mit der höchsten Strahlenaktivität vereinigt und für die RNA-Hybridisierung genutzt (s. 2.9.1.5).

2.9.1.5 RNA-Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden

Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen lagern sich die radioaktiv markierten DNA-Sonden an komplementäre Abschnitte der einzelsträngigen, auf die Membran geblotteten RNA-Moleküle an (Hybridisierung). Die Hybridisierung ist umso exakter, je länger die Sonden-Sequenz und je genauer die Komplementarität erfüllt ist.

Die Nylonmembran wurde in den zuvor mit 1%igem SDS und A. bidest. gereinigten Hybridisierungsröhren mit 5-10 ml erwärmter ExpressHyb – Hybridisierungslösung für 30 min bei 68 °C im Hybridisierungsofen erwärmt. Anschließend wurden 300 µl der entsprechenden radioaktiv markierten und aufbereiteten DNA-Sonden (s. 2.9.1.4) dazugegeben und die Membran für 1 h bei 68 °C hybridisiert. Danach wurde die Membran für 15 min in 10 ml Waschlösung I (s. 2.1.2) bei RT und anschließend zweimal für 20 min in jeweils 10 ml Waschlösung II (s. 2.1.2) bei 50 °C gewaschen. Zum Schluss wurde die feuchte Membran entnommen und in Klarsichtfolie eingeschlagen.

Zur Rehybridisierung der markierten Membran wurden die DNA-Sonden mit Hilfe eines Wasserbades bei 95-98 °C durch 10-minütiges Schwenken in 0,5%igem SDS vom Filter gelöst. Nach diesem als „Strippen“ bezeichneten Vorgang konnte die Membran anschließend für weitere Hybridisierungen genutzt werden.

2.9.1.6 Nachweis der DNA/RNA-Hybridisierungsprodukte

Zur Detektion der radioaktiv markierten DNA/RNA-Hybridisierungsprodukte wurde die vorbehandelte, in Klarsichtfolie eingeschlagene Membran (s. 2.9.1.5) in eine Röntgenfilmkassette eingelegt und nach Auflegen eines Filmes entsprechend der Signalintensität für 1 h bis hin zu mehreren Tagen bei -80 °C inkubiert. Nach Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte seine Auswertung visuell. Bei positivem Nachweis des entsprechenden RNA-Transkriptats konnten zusätzlich semiquantitative Aussagen über die vergleichende Betrachtung der Signalintensitäten getroffen werden.

2.9.2 Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Übertragung (Blotten) der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf ein geeignetes Trägermaterial. Nach dem Proteintransfer lassen sich diese mittels spezifischer Antikörper nachweisen und partiell quantifizieren.

48-72 h nach erfolgter Zelltransfektion wurden die proteinhaltigen Zellkulturüberstände entweder bei -20 °C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt untersucht oder direkt in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.9.2.1 Protein-Auftrennung in der SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem SDS (Natriumdodecylsulfat)-haltigen Polyacrylamid-Trenngel. SDS überdeckt als anionisches Tensid die Eigenladung der Proteine, so dass diese eine konstante, negative Ladungsverteilung aufweisen und im denaturierten, reduzierten Zustand vornehmlich nach ihrer Größe getrennt werden können.

Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen wurde ein 2-Komponenten-SDS-Gel bestehend aus Trenn- und Sammelgel verwendet. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Darin wandern die Proteine mit höherer Geschwindigkeit und ohne eine Auftrennung als scharfe Bande zu erfahren in einem Gebiet hoher Feldstärke. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird ihre Laufgeschwindigkeit drastisch verringert und erfolgt nun in Abhängigkeit von ihrer Größe.

Es wurden jeweils 25 µl Zellüberstand mit 5 µl 4 x Ladebuffer (s. 2.1.2) versetzt, für 5 min in siedendem Wasser denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Trennung der Proben erfolgte in einem 4-12%igem SDS-Fertig-Gel (NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel) in 1 x Laufpuffer (s. 2.1.2) für 2,5-3 h bei 120 V. Parallel wurden 7,5 µl eines Protein-Größenmarkers (SeeBlue®

Plus2 Pre-Stained Standard: 3-188 kDa) mit aufgetragen. Zum Nachweis des CLSP-Fc- und sCAR-Fc-Proteins in seiner nicht-reduzierten, dimerischen Form wurde zum einen auf die Proteindenaturierung im Wasserbad verzichtet, zum anderen DDT-freier Ladepuffer verwendet.

2.9.2.2 Protein-Transfer auf Nylonmembranen

Der Protein-Transfer erfolgt elektrophoretisch, wobei ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode auf die Membran wandern lässt, an der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben.

Für den Protein-Blot auf eine Nylonmembran wurde diese zuvor für 10 s in Methanol geschwenkt und anschließend mit A. dest. gespült. Um ein Austrocknen des Trenngels während des Transferprozesses zu verhindern, wurden Schaumstoff-Schwämmchen und Whatmanpapier gründlich in Transferpuffer (s. 2.1.2) eingeweicht. Für den Blot-Aufbau wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt und in einem möglichst luftblasenfreien „Blot-Sandwich“ bestehend aus Schaumstoff, Whatman-Papier, Gel, Nylonmembran, Whatman-Papier, Schaumstoff eingebettet. Diese Anordnung wurde so in eine Blotapparatur mit Transferpuffer eingespannt, dass das Gel zwischen Anode und Membran lag. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 200 mA für 1,5-2 h. Um eine Überhitzung der Apparatur zu vermeiden wurde während des Blotvorganges von außen ein Eispacket angebracht. Bei der Entnahme der Nylonmembran wurden zunächst die Größemarker-Banden mit Kugelschreiber markiert. Anschließend wurde der Erfolg des Transfers durch Schwenken der Nylonmembran in Ponceau S Solution überprüft, welche eine reversible Anfärbung der Proteine erlaubte. Das Entfärben und Lagern bei 4 °C der feucht zu haltenden Membran erfolgte in TBST-Puffer (s. 2.1.2). Die Membran wurde nun für den immunochemischen Proteinnachweis (s. 2.9.2.3) am darauf folgenden Tag vorbereitet.

2.9.2.3 Immunochemischer Protein-Nachweis

Die Visualisierung der geblotteten Proteine gelingt mittels Immundetektion. Hierbei bindet zunächst ein Primärantikörper epitopspezifisch an das membrangebundene, nachzuweisende Protein. Ein sekundärer, enzymgekoppelter Markierungsantikörper bindet anschließend am Fc-Teil des ersten Antikörpers und ermöglicht nach Substratzugabe einen dektierbaren Stoffumsatz. Der Nachweis von CLSP-Fc und sCAR-Fc gelang durch den ausschließlichen Einsatz eines HRP-gekoppelten, sekundären Antikörpers, da dieser direkt an den Fc-Teil der Fusionsproteine binden konnte.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membran wurde diese nach dem Blot-Vorgang (s. 2.9.2.2) über Nacht bei 4 °C in einem 5 % Milchpulver/TBST-Gemisch blockiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 10-20 min in TBST-Puffer schüttelnd gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten, sekundären Antikörper. Dieser wurde verdünnt in 5 % Milchpulver/TBST (1:100-1:500) und für 1 h bei RT mit der Membran schüttelnd inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde in drei 10-20 minütigen Waschschritten mit einem möglichst großen TBST-Volumen entfernt. Für die Detektion der Proteinbanden wurde das ECL-Plus-Reagenz gemäß den Herstellerangaben (Amersham, Piscataway/US) verwendet. Dabei wird das enthaltene Substrat Luminogen durch die HRP unter Licht-Emission (Chemolumineszenz) oxidiert. Mit diesem Licht wurde ein Hyperfilm™ ECL belichtet, womit der visuelle Nachweis und die partielle Quantifizierung der Proteine gelangen.

Nach Entfernung („Strippen“) der detektierenden Antikörper kann die Membran erneut für den immunochemischen Proteinnachweis eingesetzt werden. Hierfür wurde die Membran zuvor mit Stripping-Puffer für 1 h bei 55 °C im Wasserbad inkubiert.

2.9.3 ELISA

Der Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper. Im sogenannten „Sandwich-ELISA“ wird eine Mikrotiterplatte zunächst mit einem ersten coating-Antikörper beschichtet. Dieser bindet spezifisch nach Inkubation mit antigenhaltigen Proben das nachzuweisende Protein, welches sich dann nach Zugabe eines weiteren, enzymgekoppelten Antikörpers durch Umsatz eines chromogenen Substrats detektieren lässt. Für quantitative Nachweise wird eine Verdünnungsreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, anhand derer die Erstellung einer Kalibrierungskurve und die Ermittlung der Probenkonzentrationen gelingt.

Zur Quantifizierung von CLSP-Fc und sCAR-Fc wurde ein den Fc-Teil des humanen IgG nachweisendes ELISA-Kit verwendet (s. 2.1.11). Es wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren (Bethyl Lab Inc., Montgomery/US). Die genaue quantitative Probenanalyse konnte durch Mitführung eines IgG-Fc-Standards realisiert werden, wobei sowohl die Proben der Standard-Verdünnungsreihe als auch die verdünnten Proteinproben unbekannter Konzentration in Doppelbestimmung untersucht wurden. Als Negativkontrolle und zur Ermittlung des Backgrounds wurden Zellüberstände von mit pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfizierten Zellen eingesetzt.

2.10 Virologische Methoden

2.10.1 Adenovirus-Inhibitions-Assay

Die antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc in Bezug auf Adenovirusinfektionen kann im Rahmen eines Adenovirus-Inhibitions-Assays untersucht werden. Man bestimmt hierbei vergleichend die Viruslast der Zellen nach deren Infektion mit Luciferase-kodierenden Adenovirus-Vektoren jeweils mit bzw. ohne Fusionsprotein-haltiger Zellüberstände. Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation des Substrats Luciferin unter Abgabe eines Photons in Form einer messbaren Biolumineszenz und wurde somit als Reporter für Infektionen mit adenoviralen Vektoren verwendet.

2.10.1.1 Infektion von Zellkulturen mit adenoviralen Vektoren

Es wurden HEK 293T-Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät (4×10^5 Zellen/Well), am nächsten Tag entweder mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc oder pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} (je 2 μg /Well) transfiziert (s. 2.8.5.1) und mit Doxycyclin (1000 ng/ml pro Tag) kultiviert. 48 h posttransfektionell wurden die fusionsproteinhaltigen Zellüberstände abgenommen, gepoolt und für 30 min bei 4 °C mit AdVCMVLuc preinkubiert. Danach erfolgte die vorsichtige Gabe von 450 μl /Well der viruspartikelhaltigen Zellüberstände (150 Pa/Zelle) für 1,5 h bis 24 h auf tags zuvor ausgesäte HeLa-Zellen ($1,8 \times 10^5$ Zellen/Well; 24-Well-Platte). 24 h später wurde die Luciferase-Aktivität gemessen (s. 2.10.1.2).

Für die Dosis-Wirkungs-Experimente wurden hingegen 48 h posttransfektionell die Zellüberstände abgenommen, gepoolt und nach Quantifizierung der CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Konzentrationen im ELISA (s. 2.9.3) auf 10, 100 und 1000 ng/ml verdünnt. Im Anschluss wurden die Proben für 30 min bei 4 °C mit AdCMVLuc preinkubiert, um danach 450 μl /Well der viruspartikelhaltigen Zellüberstände (150 Pa/Zelle) für 1,5 h auf HeLa-Zellen ($1,8 \times 10^5$ Zellen/Well; 24-Well-Platte) zu geben. 24 h später erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität (s. 2.10.1.2).

Während bzw. nach der Inkubation der HeLa-Zellen mit dem Viruspartikel-Fusionsprotein-Gemisch wurde die Beschaffenheit des Zellrasens und die Zellmorphologien in regelmäßigen Abständen mikroskopisch überprüft, um im abschließenden Luciferase-Assay nur unbeschadete Ansätze zu verwenden.

2.10.1.2 Bestimmung der Viruslast im Luciferase-Assay

Die nach Adenovirus-Vektoraufnahme in der Wirtszelle synthetisierte Luciferase kann anschließend nach Zugabe des Substrats Luciferin dieses in einer ATP-abhängigen Reaktion umsetzen. Die dabei entstehende Lichtemission wird von einem Luminometer detektiert und ist proportional zu der zuvor in die Zellen gelangten Virusmenge.

Der Nachweis der Luciferase-Expression erfolgte mit dem Luciferase Detection Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Roche, Mannheim/D). Nach vorsichtiger Abnahme des Mediums und Waschen der HeLa-Zellen mit 1 x PBS wurden diese mit 250 µl Lysispuffer/Well lysiert. Hierbei wurden die Zellen einige Minuten mit dem tensidhaltigen Lysispuffer bei RT inkubiert und anschließend durch kräftiges Auf- und Abpipettieren gelöst und vollständig in Reaktionsgefäße überführt. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 10 °C (13.000 rpm, 30 s). Nun wurden jeweils 10 µl des Überstandes mit 50 µl Luciferase-Substrat vermischt und die Luciferase-Aktivität durch Messung der Lumineszenz (Einheit: RLU) im Luminometer über ein Messintervall von 20 s unmittelbar bestimmt. Als Leerwert wurden zuvor RLU-Werte von nicht befüllten Messröhrchen ermittelt. Die Infektion der HeLa-Zellen mit Fusionsprotein-freien Überständen aus der Zelltransfektion mit pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} wurden dabei als maximal (= 100 %) betrachtet.

2.10.2 Coxsackievirus-Inhibitions-Assay

Um die antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc in Bezug auf Coxsackievirusinfektionen zu untersuchen, wurden fusionsproteinhaltige Zellüberstände zusammen mit Coxsackieviren (CVB3) preinkubiert, auf HeLa-Zellen gegeben und die Virusreplikation mittels Plaque-Assay quantifiziert. Hierbei wird die zelllysierende Eigenschaft des Virus genutzt, aus der die aktive Viruskonzentration abzuleiten gelingt.

2.10.2.1 Anzucht von Coxsackieviren

Zur Anzucht der Coxsackieviren (CVB3) wurde ein gelagerter Virusstock als Ausgangsmaterial benutzt. 24 h vorher wurden HeLa-Zellen in eine Zellkulturflasche (150 cm²) ausgesät, so dass Tags darauf ein konfluenten Zellrasen gewachsen war. Der Virusstock (1 ml) wurde nun mit 19 ml FKS-freiem Medium vermischt und auf den konfluenten Zellrasen gegeben, von dem zuvor das Kultivierungsmedium entfernt worden war. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Brutschrank (bei 37 °C, 5 Vol% CO₂) wurde das virushaltige Medium abgenommen und 40 ml frisches Medium mit 2 Vol% FKS auf die Zellen gegeben. Nach kompletter, virusbedingter

Zellyse, die nach etwa 6 bis 8 h eintrat, wurde die Kulturflasche samt Virus/Zellysat bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Am Folgetag wurde die Flasche bei RT aufgetaut und das Zellysat mit einem Mörser durch mehrmaliges Auf- und Abziehen weiter zerkleinert. Anschließend wurden die Zelltrümmerreste bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert (3.000 rpm, 20 min), das Viruslysats aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.10.2.2 Infektion von Zellkulturen mit Coxsackieviren

Zur Untersuchung der anticoxsackieviralen Wirkung des CLSP-Fc und sCAR-Fc wurden zunächst HEK 293T-Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät (4×10^5 Zellen/Well), am nächsten Tag entweder mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc oder pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} (je $2\text{ }\mu\text{g}$ /Well) transfiziert (s. 2.8.5.1) und mit Doxycyclin (1.000 ng/ml pro Tag) kultiviert. 48 h posttransfektionell wurden die Zellüberstände abgenommen und gepoolt. Für die Infektion der Zellkultur wurde ein Virusaliquot unmittelbar vorher aus dem Gefrierschrank entnommen und zügig bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Je nach Konzentration des Virusaliquots (Angabe in pfu/ml) und der gewünschten Ratio zwischen Viruspartikeln und zu infizierenden Zellen (*moi* = *multiplicity of infection*) wurde das Virus jeweils mit CLSP-Fc-, sCAR-Fc-haltigen bzw. fusionsproteinfreien Zellüberständen auf 0,005 *moi* bzw. 0,001 *moi* verdünnt und 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ preinkubiert. Nun wurde auf die tags zuvor ausgesäten, konfluent wachsenden HeLa-Zellen (1×10^6 Zellen/Well, 6-Well-Platte) nach der Abnahme des Zellkulturmediums vorsichtig je 1 ml Preinkubat pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde der Virusüberstand abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium überschichtet. Die Quantifizierung der CVB3-Replikation in den Zellen fand 24 h später im Plaque-Assay statt (s. 2.10.2.3).

Die Angabe „*moi*“ ergibt sich aus der zu infizierenden Zellzahl und der Konzentration des verwendeten Virus. Die Virus-Konzentration wird in pfu (= *plaques forming units*)/ml angegeben, wobei ein Plaque einem infektiösen Viruspartikel entspricht. Somit ergibt sich bei einer *moi* von 1 eine Gabe von einem infektiösen Viruspartikel pro Zelle der Zellkultur; analog dazu entsprechen 0,001 *moi* einem Viruspartikel auf 1000 Zellen.

2.10.2.3 Bestimmung der Coxsackievirus-Konzentration im Plaque-Assay

Um die Quantifizierung der Coxsackievirus-Replikation unter dem Einfluss von CLSP-Fc bzw. sCAR-Fc vergleichend zu ermitteln, wurde diese im Plaque-Assay bestimmt. Aufgrund des zytopathischen Virus-Effekts kommt es zur Lyse von infizierten Zellen und deren unmittelbaren Nachbarzellen. Nach Fixierung und Anfärbung des Zellrasens werden Lyse-

Areale als Plaques demarkiert. Diese werden ausgezählt und dienen als Maß für die Menge bzw. Konzentration an infektiösen Viruspartikeln in der in Verdünnungsstufen aufgegebenen Probe. Hierbei kommt es, anders als bei der Virus-PCR, ausschließlich zum Nachweis des meist deutlich geringeren Anteils der effektiv-infektiösen Viruspartikel.

Bereits vor der Inokulation des Virus-Fusionsprotein-Gemisches mit der Zellkultur wurde der Agar-Overlay, bestehend aus zwei Lösungen, vorbereitet. In Lösung A wurde 0,32 g Agar mit 10 ml A. dest. gemischt und in einem Topf mit Wasser über einem Bunsenbrenner für 15 min gekocht, bis sich der gesamte Agar aufgelöst hatte. Für Lösung B wurden 30 ml Eagle Overlay (s. 2.1.8) mit 4 ml FKS vermischt und im Wasserbad auf 41,5°C erwärmt. Nun wurden beide Lösungen miteinander gut vermischt und im Wasserbad bei 41,5 °C für weitere 30 min temperiert. Nach Entfernung des Virus-Fusionsprotein-Gemisches von den HeLa-Zellen (s. 2.10.2.2) wurden die Zellen mit 2 ml Agar-Overlay überschichtet und nach Erkalten und Verfestigung des Overlay 24 h im Brutschrank inkubiert (bei 37 °C, 5 Vol% CO₂). Zum Anfärben des Zellrasens wurde 0,02 g Neutralrot in 50 ml PBS gelöst, filtriert und jeweils 2 ml auf den Agar-Overlay pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für 2,5-4 h wurde die Färbelösung vorsichtig abgesaugt. Anschließend konnten die Plaques ausgezählt und die Virus-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$\text{gezählte Plaques} / \text{Inokulationsvolumen [ml]} \times \text{Virusverdünnung} = \text{pfu/ml.}$$

2.11 Statistische Evaluierung

Alle Versuchsansätze waren voneinander unabhängig und wurden unter Annahme einer Normalverteilung der Messergebnisse mit dem ungepaarten, zweiseitigen Student-t-Test verglichen. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die p-Werte sich kleiner als 0,05 erwiesen.

Die Berechnung der statistischen Parameter erfolgte unter Verwendung der Computersoftware GraphPad Prism 5 (Version 5.00.288, GraphPad Software Inc., La Jolla/US).

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion und Klonierung des CLSP-Fc in den Dox-regulierbaren Plasmidvektor pAdG12

Die Wahl des pAdG12-Expressionssystems (s. Kap. 1.5.2) begründet sich auf einer Reihe erwünschter Eigenschaften. Zum einen konnte das Konstrukt in der Vergangenheit bereits in adenoviralen Vektoren eingebaut und damit eine effiziente Expression des Transgens und Anwendbarkeit *in vivo* erzielt werden (85). Zum anderen war die transgene Expression streng Induktor-abhängig. Deren Initiation gelang ausschließlich und effizient über Zufuhr von Doxycyclin, während sie nach Absetzen des Induktors zeitnah eingestellt wurde.

Neben der niedrigen Basalaktivität sind die gute Regulierbarkeit des Expressionssystems sowie dessen Integrationsfähigkeit in einen adenoviralen Vektor wichtige Eigenschaften im Hinblick auf möglicherweise folgende, funktionelle Erprobungen im Tiermodell.

3.1.1 Klonierung von pAdG12-CLSP-Fc

Um das mCLSP (im Weiteren CLSP genannt) mit der Fc-Domäne des humanen IgG1 zu verknüpfen und das neuartige Fusionsprotein (CLSP-Fc) über einen pharmakologisch regulierbaren Plasmidvektor exprimieren zu können, waren zwei Klonierungsschritte erforderlich.

Zunächst wurde aus den beiden Ausgangsplasmiden pCLSP und pCRTOPO-sCAR-Fc das Zwischenklonierungsprodukt pCRTOPO-CLSP-Fc gebildet. Hierfür wurden beide Ausgangsplasmide jeweils mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Kpn*I geschnitten und die CLSP-cDNA aus dem pCLSP mit dem TOPO-Vektor ligiert. Somit entstand das Zwischenklonierungsprodukt pCRTOPO-CLSP-Fc mit der kodierenden Sequenz für das CLSP-Fc-Fusionsprotein. Im anschließenden Klonierungsschritt wurden pCRTOPO-CLSP-Fc und pAdG12-sCAR-Fc mit den Restriktionsenzymen *Kpn*I und *Mlu*I geschnitten und die cDNA des CLSP-Fc aus dem pCRTOPO-CLSP-Fc in das Doxycyclin-regulierbare pAdG12-Vektorkonstrukt eingebracht. Hierfür wurden die entsprechenden Fragmente zum Klonierungsendprodukt, dem pAdG12-CLSP-Fc, ligiert (Abb. 3.1). Zur Plasmid-Konstruktion siehe auch Kapitel 2.7.

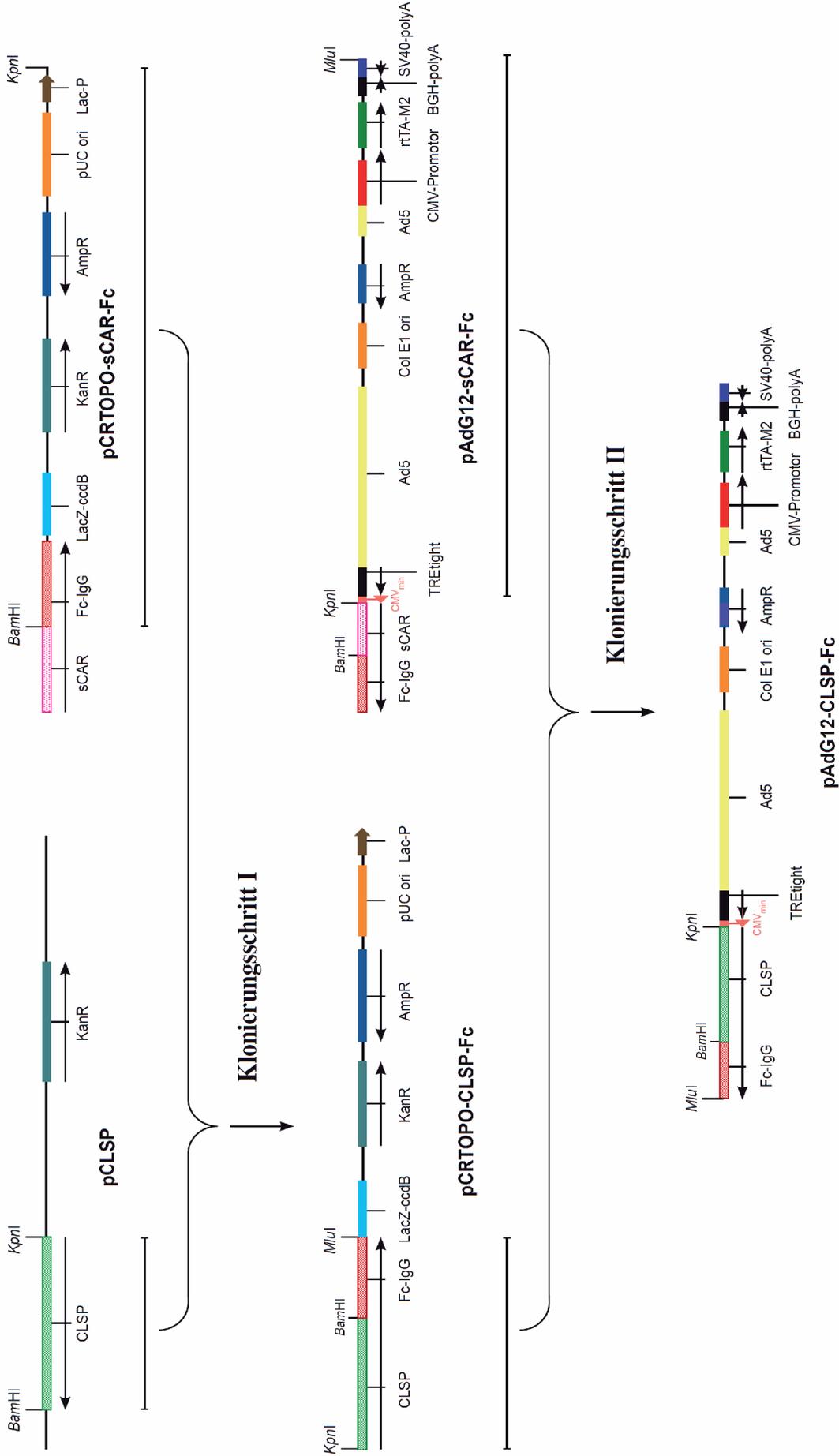


Abb. 3.1: Klonierungsstrategie - Liniiarisierte Plasmidherstellung
 Klonierungsschritt I: Verdau von pCLSP und pCRTOPO-sCAR-Fc mit *KpnI* und *BamHI*, Ligation von Insert (CLSP) mit Backbone (pCRTOPO-Fc) führt zu pCRTOPO-CLSP-Fc (Zwischenklonierung); Klonierungsschritt II: Verdau von pCRTOPO-CLSP-Fc und pAdG12-sCAR-Fc mit *KpnI* und *MluI*, Ligation von Insert (CLSP-Fc) mit Backbone (pAdG12) führt zu pAdG12-CLSP-Fc (Klonierungsendprodukt)

3.1.2 Sequenzverifizierung des pAdG12-CLSP-Fc

Für die nachfolgenden Proteinexpressionsanalysen und Virus-Inhibitions-Experimente war die erfolgreiche Klonierung und Validierung des pAdG12-CLSP-Fc von elementarer Bedeutung.

Um den korrekten Fragmenteinbau und die Expressionskassette auf mögliche Mutationen zu überprüfen, wurde zunächst eine Restriktionsanalyse des Plasmids durchgeführt. Dabei konnten auf Basis der vorliegenden Plasmidkartierung geeignete Restriktionsenzyme ausgewählt und die zu erwartenden Fragmentlängen errechnet werden. In der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese gelang es, das ermittelte, plasmidspezifische Bandenmuster aufzuzeigen und die Korrektheit der Klonierungsschnittstellen des pAdG12-CLSP-Fc darzulegen (Abb. 3.2).

Eine Übersicht über die einzelnen Restriktionsenzym-Schnittstellen im Plasmid pAdG12-CLSP-Fc ist aus der Abb. 3.3 zu entnehmen.

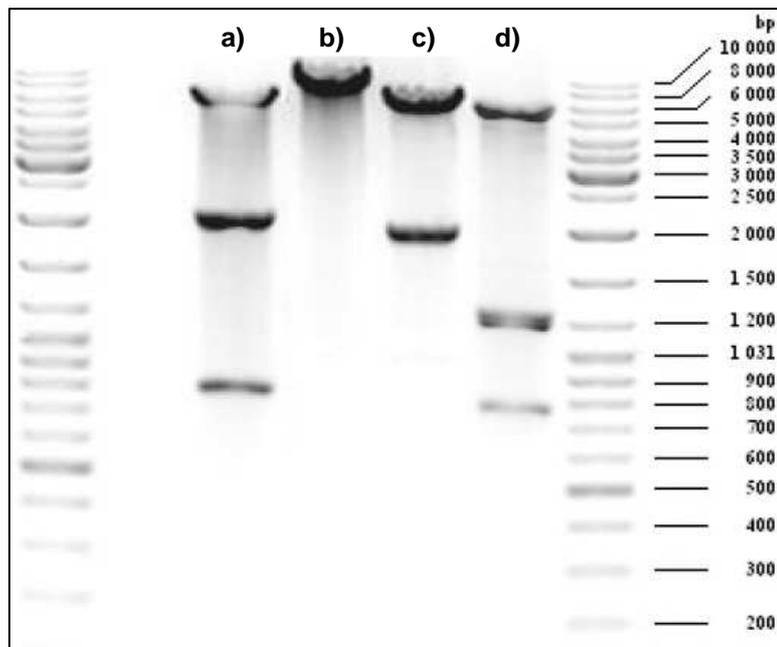


Abb. 3.2: Restriktionsanalyse des Vektor-Plasmids pAdG12-CLSP-Fc.

Testverdau von pAdG12-CLSP-Fc mit (a) *MluI* und *NotI* (erwartete Fragmentlängen: 6827/2023/780 bp), (b) *XbaI* (erwartete Fragmentlänge: 9630 bp) (c) *MluI* und *KpnI* (erwartete Fragmentlängen: 7672/1958 bp), (d) *EcoRI* und *BamHI* (erwartete Fragmentlängen: 6423/1266/1178/763, beachte Bandenfusion der beiden mittleren Fragmente aufgrund ähnlicher Längen)

Des Weiteren wurde zur exakten Verifizierung der Insertionsstelle diese einer vollständigen Sequenzanalyse unterzogen. Aufgrund der Insertlänge von knapp 2000 bp (1958 bp) kamen acht Primer (CLSP-Fc 1-8) zum Einsatz, mit denen in der PCR die entsprechenden Abschnitte zunächst amplifiziert und hiernach sequenziert wurden. Dabei konnte die Richtigkeit der Basenabfolge im Bereich der Klonierungsschnittstellen sowie des CLSP-Fc-kodierenden

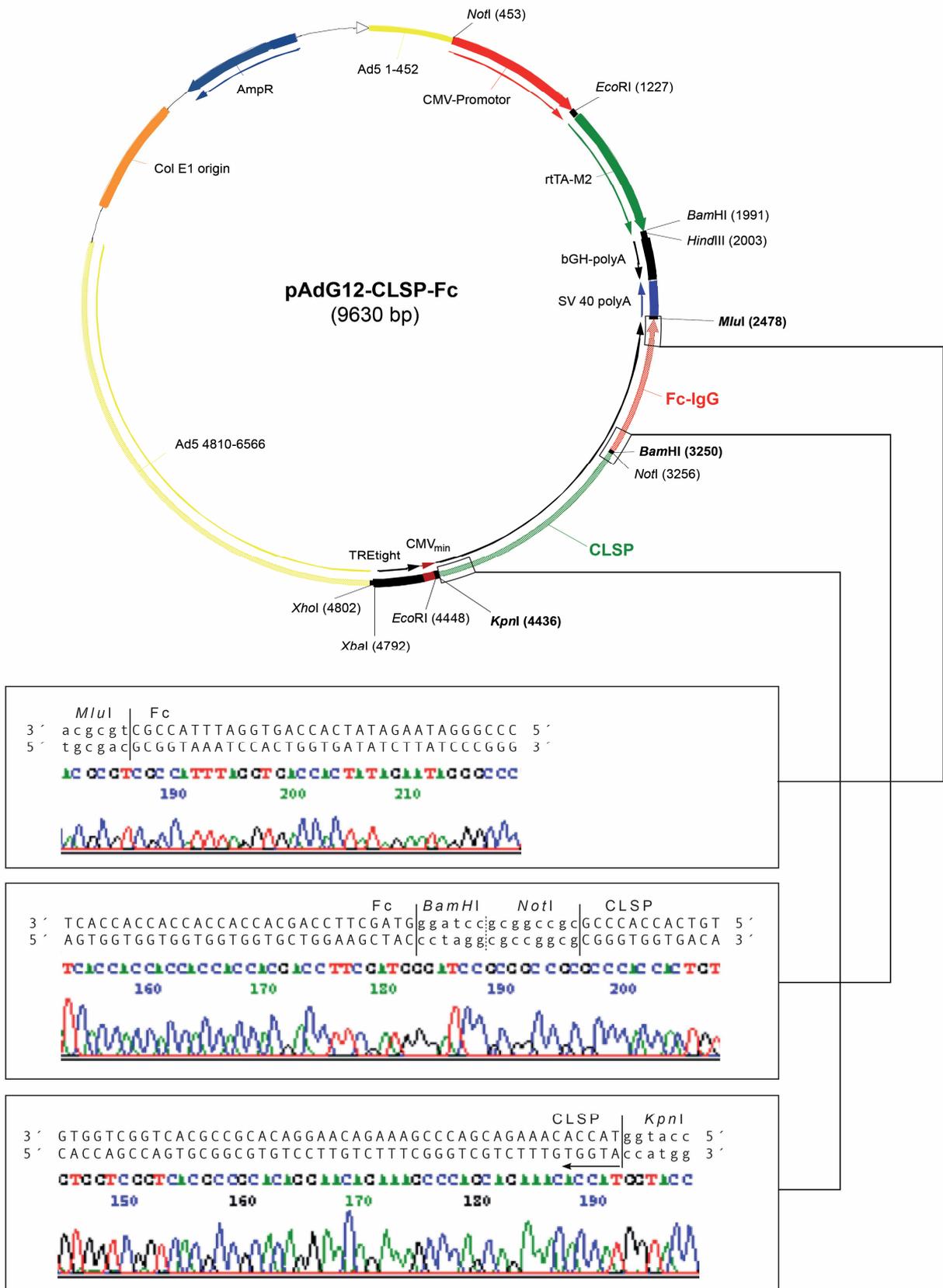


Abb. 3.3: Sequenzierung des CLSP-Fc im Vektor-Plasmid pAdG12-CLSP-Fc
 oben: Plasmidkarte des pAdG12-CLSP-Fc mit Darstellung der Restriktionsenzym-Schnittstellen; unten: Elektropherogramme der drei Klonierungsschnittstellen (*Mlu*I, *Bam*HI, *Kpn*I) mit vergleichender Darstellung der entsprechenden Plasmid-Mustersequenzen - Plasmid-Sequenzierung mittels Gene Analyzer ABI 310 und Auswertung unter Verwendung der ABI DNA Sequencing Analysis Software (Perkin Elmer, Wellesley/US)

Plasmidabschnittes anhand des Abgleichs mit der vorliegenden Plasmid-Mustersequenz bewiesen werden. Abb. 3.3 zeigt exemplarisch die Bestätigung der drei Klonierungsschnittstellen *KpnI*, *MluI* und *BamHI*.

Demzufolge konnten Mutationen in Bereichen des einklonierten CLSP-Fc sicher ausgeschlossen werden und das pAdG12-CLSP-Fc für nachfolgende Experimente Verwendung finden.

3.2 Zelltransfektionsexperimente mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc und pEGFP-C1

Die effektive Einschleusung (= Transfektion) der pAdG12-Shuttleplasmide in eukaryotische Zellen war wichtige Voraussetzung für nachfolgende Proteinexpressionsanalysen und Virus-Inhibitions-Experimente. Um diesbezüglich vergleichende Daten für das neu zu untersuchende CLSP-Fc zu erheben, wurden nachfolgende Untersuchungen parallel mit dem bereits etablierten antiviral-wirksamen sCAR-Fc durchgeführt.

Der Transfektionserfolg ist stets von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Um eine möglichst hohe ektope Proteinexpression des CLSP-Fc und sCAR-Fc-Proteins zu erreichen, wurde eine hohe Transfektionsrate bei andauernder, ausreichender Zellvitalität angestrebt. Hierfür wurden in dieser Arbeit unterschiedliche chemische Transfektionsmethoden (Calciumphosphat-Präzipitation, Lipofectamin 2000) und Rahmenbedingungen erprobt. Zur Beurteilung der Zielvorgaben wurden initial Zellen mit dem Indikator-Plasmid pEGFP-C1 transfiziert. Hierbei handelt es sich um ein für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierende Plasmid.

Fluoreszenzmikroskopisch konnte somit die Transfektionsrate posttransfektionell anhand der Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen abgeschätzt werden. Des Weiteren erfolgte die Einschätzung der Zellvitalität über lichtmikroskopische Begutachtung der Zellmorphologien.

Unter Variation der zu transfizierenden Zelllinie (HeLa, HEK 293T), der Transfektionsmethode (Calciumphosphat-Präzipitation, Lipofectamin 2000), der Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion (60-100%ige Konfluenz) sowie der Dauer bis zum posttransfektionell durchgeführten Mediumwechsel (16-25 h posttr.) und der eingesetzten Plasmid-DNA-Menge (1-3 µg/Well) konnten mit folgenden Parametern die höchsten Transfektionsraten und die beste Zellvitalität zum Zeitpunkt der Proteinernte nach 2 bis 3 Tagen erzielt werden: HEK 293T, Calciumphosphat-Präzipitation, 90%ige Konfluenz, Mediumwechsel 18 h posttransfektionell, 1,5-2,5 µg DNA/Well (Tab. 3.1, 3.2).

Diese als Standardbedingungen erarbeiteten Transfektionsparameter wurden in den darauf folgenden Experimenten beibehalten. Mit ihnen konnten konstante Transfektionsraten von 80-90 % erzielt werden (Abb. 3.4).

Transfektionsmethode	Zelldichte bei Transfektion	Transfektionsrate nach 18 h	Zellvitalität	
			nach 48 h	nach 72 h
Calciumphosphat	60 %	50 %	+	-
	80 %	80 - 90 %	+++	++
	100 %	60 - 70 %	++	+
Lipofectamin 2000	60 %	30 %	+	-
	80 %	40 - 50 %	+	+
	100 %	60 - 70 %	+	-

Tab. 3.1: Empirische Daten zur Zelltransfektion: Variation der Transfektionsmethode und Zelldichte

Die Transfektion von HEK 293T-Zellen erfolgte jeweils mit 2 µg DNA/Well pEGFP-C1 unter Variation der Transfektionsmethode (Calciumphosphat-Präzipitation, Lipofectamin 2000) und der entsprechenden Zelldichte zum Transfektionszeitpunkt. Der Mediumwechsel und die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Transfektionsrate wurden 18 h posttransfektionell durchgeführt. Die lichtmikroskopische Beurteilung der Zellvitalität geschah 48 und 72 h posttransfektionell.

Zelllinie	Transfektionsrate nach 18 h	Zellvitalität	
		nach 48 h	nach 72 h
HEK 293T	80 - 90 %	+++	++
HeLa	60 %	++	+

Tab. 3.2: Empirische Daten zur Zelltransfektion: Variation der Zelllinie

Die Zelltransfektion erfolgte jeweils mit 2 µg DNA/Well pEGFP-C1 unter Variation der zu transfizierenden Zelllinie (HEK 293T-Zellen, HeLa-Zellen). Als Transfektionsmethode wurde die Calciumphosphat-Präzipitation gewählt. Die Konfluenz der Zellen zum Transfektionszeitpunkt betrug 80 %. Der Mediumwechsel und die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Transfektionsrate erfolgte 18 h posttransfektionell. Die lichtmikroskopische Beurteilung der Zellvitalität geschah 48 und 72 h posttransfektionell.

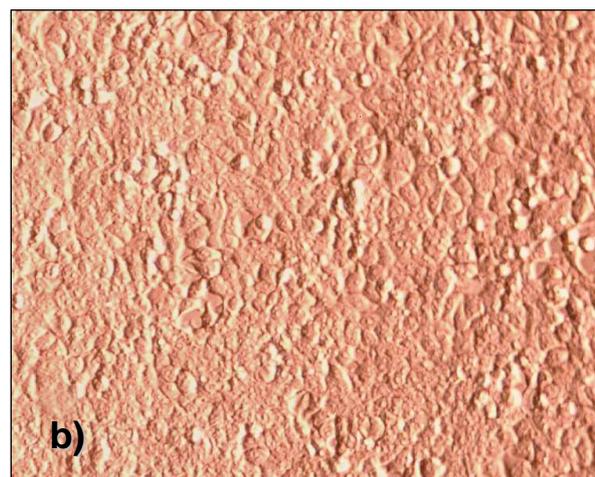
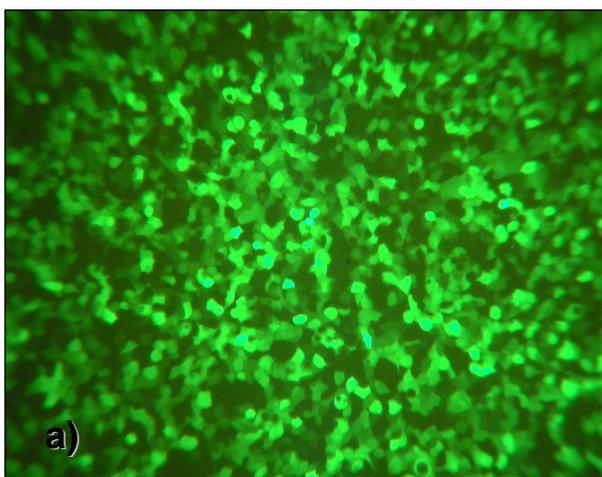


Abb. 3.4: Foto-Zelltransfektion

Die Transfektion (Methode: Calciumphosphat-Präzipitation) von HEK 293T-Zellen erfolgte mit 2 µg DNA/Well pEGFP-C1. Die Konfluenz der Zellen zum Transfektionszeitpunkt betrug 90 %. Mediumwechsel und Fotografie: 18 h posttransfektionell. Die somit erzielte Transfektionsrate betrug 80-90 %. (a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; (b) Durchlichtmikroskopische Aufnahme

3.3 Charakterisierung der Expression des CLSP-Fc und des sCAR-Fc im pAdG12-Vektorkonstrukt

Nachdem stabile und effiziente Transfektionsbedingungen erarbeitet wurden, konnte im folgenden Schritt die Expression beider rekombinanter Proteine bezüglich ihrer Doxycyclin-abhängigen Regulierbarkeit und ihres quantitativen Charakters vergleichend untersucht werden. Dabei galt es besonders die bereits bekannten, erwünschten Eigenschaften der sCAR-Fc-Expression im pAdG12-Expressionssystem auch für das CLSP-Fc zu überprüfen. Die Expressionsanalysen fanden sowohl auf Transkriptionsebene mittels Northern Blot als auch auf Proteinebene durch Western Blot und ELISA statt. Zur internen Transfektionskontrolle wurde bei den folgenden Transfektionsexperimenten jeweils ein Ansatz pro Zellplatte mit der gleichen Menge des GFP-kodierenden Indikatorplasmids pEGFP-C1 transfiziert.

3.3.1 Transkriptionsnachweis des CLSP-Fc und sCAR-Fc sowie Nachweis deren Dox-Abhängigkeit mittels Northern Blot

Um zunächst die Expression des CLSP-Fc und sCAR-Fc auf Transkriptionsebene nachzuweisen wurde die mRNA beider Proteine mittels Northern Blot-Hybridisierung detektiert.

Hierfür wurden HEK 293T-Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät (4×10^5 Zellen/Well), am nächsten Tag mit pAdG12-CLSP-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc (je $2 \mu\text{g}/\text{Well}$) transfiziert und ohne bzw. mit Doxycyclin (1000 ng/ml pro Tag) kultiviert. Zur Negativ- und internen Transfektionskontrolle im Northern Blot, wurde parallel ein Well pro Zellplatte mit dem GFP-kodierenden Plasmid pEGFP-C1 ($2 \mu\text{g}/\text{Well}$) transfiziert. Die Isolierung der Gesamt-RNA fand 48 h posttransfektionell statt. Dabei wurden je zwei Wells gepoolt und von den so gewonnenen Proben Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Transkriptanalyse erfolgte mittels ^{32}P -markierten, spezifischen Antisense-Hybridisierungs sonden gegen IgG1-Fc bzw. CLSP. Zusätzlich wurde die rtTA2^s-M2-mRNA, deren Sequenz sich auf den pAdG12-Plasmidvektoren befindet und für das Doxycyclin-bindende Transaktivator-Protein rtTA2^s-M2 kodiert, detektiert. Der Nachweis der β -Aktin-mRNA diente zur Ladekontrolle (Abb 3.5).

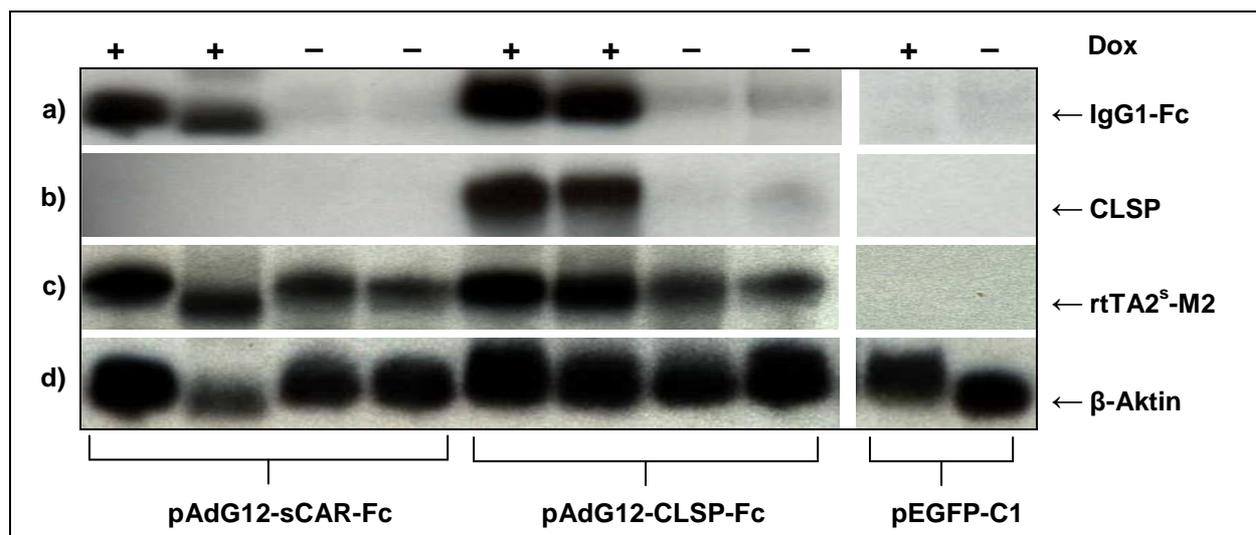


Abb. 3.5: Nachweis der CLSP-Fc- und sCAR-Fc-mRNA mittels Northern Blot (Doppelbestimmung)

HEK 293T-Zellen wurden mit pAdG12-sCAR-Fc, pAdG12-CLSP-Fc oder pEGFP-C1 (je 2 µg/Well) transfiziert (Methode: Calciumphosphat-Präzipitation). Anschließend erfolgte die Gabe von 1000 ng/ml Doxycyclin pro Tag (+ Dox) bzw. keine Doxycyclin-Gabe (- Dox). Die RNA-Präparation und -Analyse mittels Northern Blot erfolgte 48 h später. (a) Detektion der sCAR-Fc-mRNA und CLSP-Fc-mRNA mittels spezifischer Sonde gegen IgG1-Fc; (b) Detektion der CLSP-Fc-mRNA mittels spezifischer Sonde gegen CLSP; (c) Detektion von rtTA2^S-M2-mRNA mittels spezifischer M2-Sonde; (d) Ladekontrolle: Detektion von β-Aktin-mRNA

Die Analyse ergab einen deutlich positiven Nachweis der CLSP-Fc- und sCAR-Fc-Transkription im Falle der + Dox-Proben sowie keine bis abgeschwächte Signale bei den - Dox-Proben. Damit konnte die effiziente, Doxycyclin-abhängige Transkription von CLSP-Fc und sCAR-Fc bei niedriger bis unterhalb der Nachweisgrenze befindlicher, basaler Aktivität des Genexpressionssystems in Abwesenheit des Induktors aufgezeigt werden. Die in Relation zu den sCAR-Fc-Banden etwas stärkere Intensität der CLSP-Fc-Banden deutet auf eine vergleichsweise höhere Transkriptionsrate des CLSP-Fc im pAdG12-Expressionssystem hin.

Die Doxycyclin-unabhängige rtTA2^S-M2-Transkription konnte erwartungsgemäß in allen pAdG12-transfizierten Versuchsansätzen nachgewiesen werden.

3.3.2 Translationsnachweis des CLSP-Fc und sCAR-Fc sowie Darstellung deren Dox-Abhängigkeit mittels Western Blot

Um die Doxycyclin-abhängige CLSP-Fc- und sCAR-Fc-Expression sowie deren Regulierbarkeit nachzuweisen wurde der Zellkulturüberstand von mit pAdG12-CLSP-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc transfizierten Zellen mittels Western Blot untersucht. Dabei galt es auch die bezüglich seiner antiviralen Funktion elementare Löslichkeit des CLSP-Fc und damit dessen suffiziente Abgabe ins Zellkulturmedium erstmalig zu überprüfen.

Für die Proteinanalyse wurden HEK 293T-Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät (4×10^5 Zellen/Well), am nächsten Tag mit pAdG12-CLSP-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc (je 2 $\mu\text{g}/\text{Well}$) transfiziert und mit unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen (0-10.000 ng/ml pro Tag) kultiviert. Die Abnahme und Analyse der proteinhaltigen Zellkulturüberstände fand 48 h posttransfektionell statt. Die Proteindetektion erfolgte mittels eines gegen den Fc-Teil des humanen IgG1 gerichteten Antikörpers (sheep anti human IgG-HRP) (Abb. 3.6).

Als Negativkontrolle für den Protein-Blot wurde zusätzlich ein Well pro Zellplatte mit pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} (2 $\mu\text{g}/\text{Well}$) transfiziert und ebenfalls mit Doxycyclin (1000 ng/ml pro Tag) kultiviert. Hierbei handelt es sich um einen mit dem pAdG12-sCAR-Fc fast identischen Plasmidvektor, der sich von diesem lediglich durch eine Punktmutation an Nukleotidposition 10 im sCAR-Fc-kodierenden Genabschnitt unterscheidet (vgl. Plasmidkarte mit Detailansicht im Anhang). Aufgrund einer Deletion an besagter Stelle kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters (frameshift) und konsekutiv zu einem frühzeitigen Translationsabbruch. Es resultiert ein trunkiertes sCAR-Fc-Protein aus lediglich 12 Aminosäuren, welches von dem verwendeten Antikörper nicht detektiert werden kann.

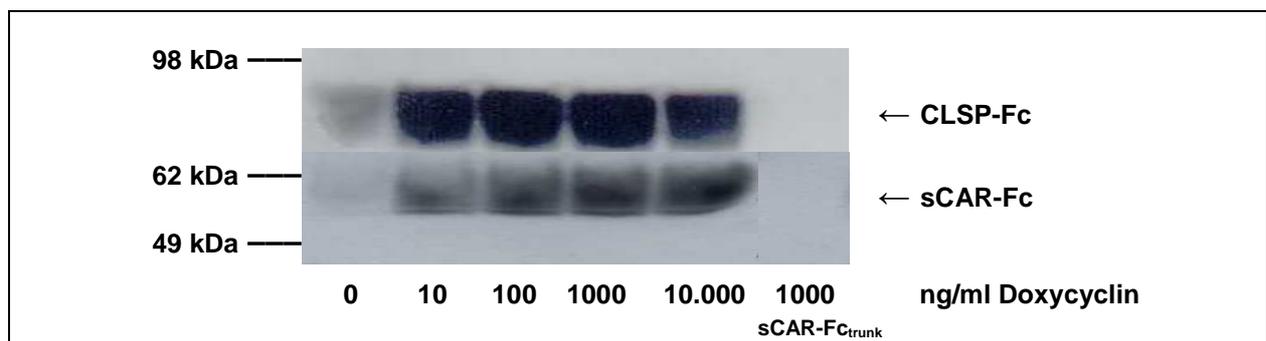


Abb. 3.6: Expressionsnachweis von CLSP-Fc und sCAR-Fc im Zellkulturüberstand mittels Western Blot
HEK 293T-Zellen wurden mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc oder pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfiziert (Methode: Calciumphosphat-Präzipitation). Die Kultivierung erfolgte anschließend mit unterschiedlichen Doxycyclin-Dosen (0-10.000 ng/ml). Die Zellkulturüberstandsabnahme und Proteinbestimmung durch Western Blot-Analyse geschah 48 h später. Der Nachweis der IgG1-Fc-Domäne des CLSP-Fc und sCAR-Fc im Zellkulturüberstand erfolgte mittels sheep anti human IgG-HRP (Amersham, Piscataway/US).

Die Analyse mittels Western Blot ergab einen deutlich positiven Nachweis des CLSP-Fc im Zellkulturüberstand und damit eine effiziente Translation und Sekretion des Fusionsproteins in das Kulturmedium. Dabei stellte sich sowohl die CLSP-Fc- als auch die sCAR-Fc-Produktion bei niedriger Basalaktivität Doxycyclin-abhängig dar. Bei steigenden Doxycyclin-Konzentrationen konnten allerdings keine wesentlichen Zunahmen der Proteinmengen detektiert werden, während schon bei geringen Induktorkonzentrationen (10 ng/ml pro Tag) eine effektive CLSP-Fc- und sCAR-Fc-Synthese stattfand.

Insgesamt ließ sich aufgrund der stärkeren Signalintensität der CLSP-Fc-Banden auf eine vergleichsweise höhere Proteinexpression des CLSP-Fc schließen, womit diesbezüglich die Resultate des Northern Blots bestätigt wurden. Ein Proteinnachweis im Zellkulturüberstand der mit pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfizierten Zellen blieb erwartungsgemäß aus.

Aufgrund seiner IgG1-Fc-Domäne ist mit einer posttranslationalen Dimerisierung des CLSP-Fc-Moleküls zu rechnen. Die sich unter physiologischen Bedingungen ausbildenden Disulfidbrückenbindungen werden unter reduzierenden Eigenschaften des Western Blots wieder gespalten. Der Nachweis des CLSP-Fc-Monomers erfolgte bei ca. 75 kDa. Unter nicht reduzierenden Western Blot-Bedingungen konnte die physiologisch vorkommende Form bei ca. 150 kDa detektiert werden (Abb. 3.7).

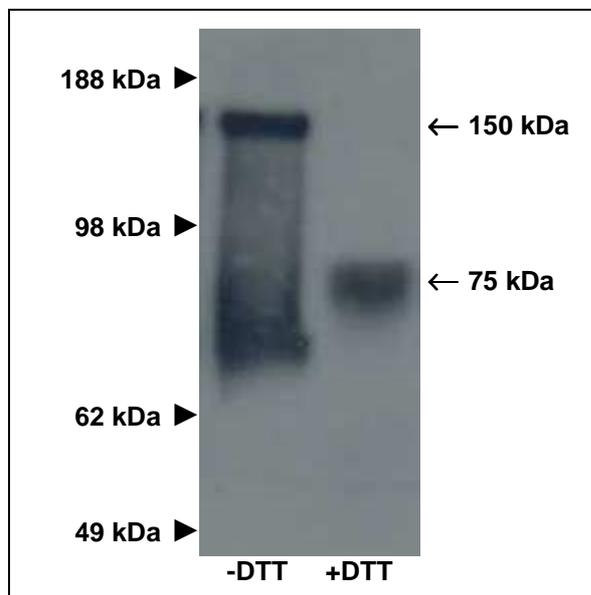


Abb. 3.7: Nachweis des CLSP-Fc-Dimers im Zellkulturüberstand mittels Western Blot

HEK 293T-Zellen wurden mit pAdG12-CLSP-Fc transfiziert (Methode: Calciumphosphat-Präzipitation). Die Kultivierung erfolgte anschließend mit 1000 ng/ml Doxycyclin pro Tag. Die Abnahme des Zellkultur-überstandes und die Proteinbestimmung mittels Western Blot geschah 48 h später. Der Blot wurde unter nicht reduzierenden (- DTT) und reduzierenden (+ DTT) Bedingungen durchgeführt. Antikörper: sheep anti human IgG-HRP (Amersham, Piscataway/US)

3.3.3 Darstellung der Dox-abhängigen Expression und Quantifizierung des CLSP-Fc und sCAR-Fc mittels ELISA

Um die Doxycyclin-abhängige CLSP-Fc- und sCAR-Fc-Expression sowie deren Regulierbarkeit exakt zu quantifizieren wurde der Zellkulturüberstand von mit pAdG12-CLSP-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc transfizierten Zellen mittels ELISA untersucht.

Für die Konzentrationsbestimmung beider Fusionsproteine wurde ein den Fc-Teil des humanen IgG nachweisendes ELISA-Kit (Bethyl Lab Inc., Montgomery/US) verwendet. Die quantitative Probenanalyse konnte über die Mitführung eines IgG-Fc-Standards und die Anfertigung einer Kalibrierungskurve realisiert werden. Dabei wurden sowohl die Proben der Standart-

Verdünnungsreihe als auch die zu untersuchenden Protein-Proben in Doppelbestimmung analysiert. Als Negativkontrolle und zur Ermittlung des Backgrounds fungierten Zellkulturüberstände von mit pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfizierten Zellen.

Für die Untersuchung der Doxycyclin-abhängigen Regulierbarkeit der CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Expression wurden Transfektion und Probenzeitpunktentnahme wie unter 3.3.2 gewählt (Abb. 3.8).

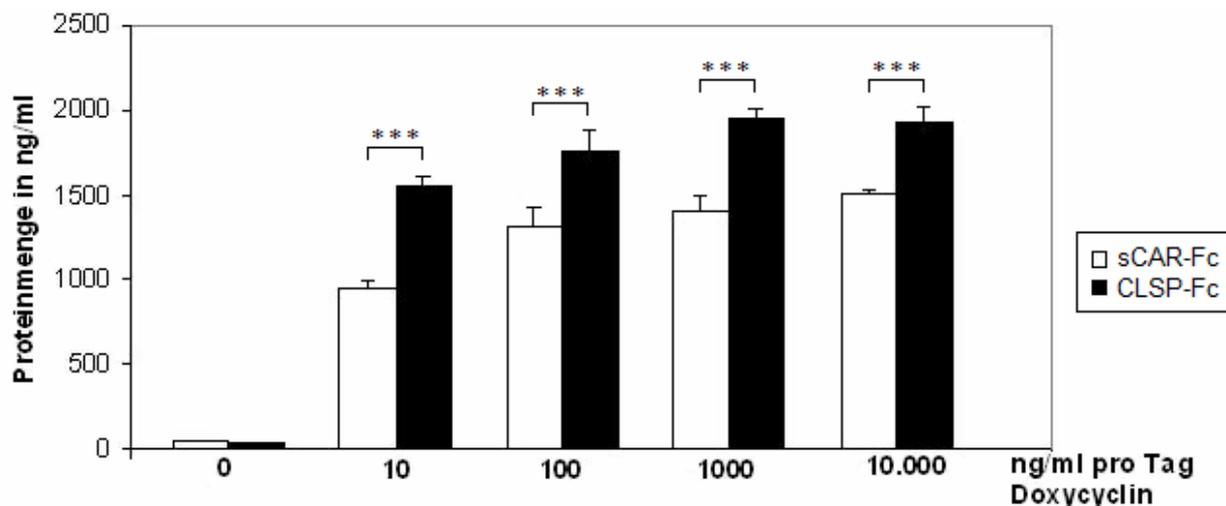


Abb. 3.8: Messung der Dox-regulierbaren CLSP-Fc/sCAR-Fc-Expression mittels ELISA

HEK 293T-Zellen wurden mit pAdG12-CLSP-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc (je 2 µg/Well) transfiziert (Methode: Calciumphosphat-Präzipitation) und mit unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen (0-10.000 ng/ml pro Tag) kultiviert. Die Abnahme und Analyse der Zellkulturüberstände im ELISA erfolgte 48 h später. (***) $p < 0,001$ für CLSP-Fc- vs. sCAR-Fc-Konzentration bei identischen Doxycyclin-Dosen)

Auch im ELISA zeigten beide Proteine eine deutlich Doxycyclin-abhängige Expression sowie nachfolgende Sekretion in den Zellkulturüberstand. Die in Abwesenheit des Induktors gemessene Basalaktivität (CLSP-Fc: 38 +/- 1 ng/ml; sCAR-Fc: 50 +/- 1 ng/ml) war um den Faktor 42 bzw. 19 geringer als die Proteinexpression unter der niedrigsten Doxycyclin-Dosierung (10 ng/ml pro Tag). Entsprechend der Ergebnisse aus dem Western Blot konnte selbst bei geringen Induktorkonzentrationen (10 ng/ml pro Tag) eine effektive Expression beider Proteine nachgewiesen werden (CLSP-Fc: 1560 +/- 44 ng/ml; sCAR-Fc: 946 +/- 51 ng/ml). Diese war allerdings nur begrenzt steigerbar, so dass unter höheren Induktordosen keine signifikanten Proteinmengen zunahmen mehr detektiert wurden. In jenem Bereich, vor allem zwischen 100 und 10.000 ng/ml Doxycyclin pro Tag, war daher eine weniger gute Doxycyclin-regulierbare CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Sekretion aus den mit dem pAdG12-Expressionssystem transfizierten Zellen zu konstatieren und demzufolge bereits ein Maximalwertniveau erreicht.

Bei diesem Versuchsansatz konnte nach 48 h eine maximale Proteinausbeute von 1924 +/- 96 ng/ml (CLSP-Fc) bzw. 1506 +/- 21 ng/ml (sCAR-Fc) erzielt werden. Insgesamt zeigte sich eine um 22 – 39 % signifikant höhere Expression des CLSP-Fc gegenüber dem sCAR-Fc bei vergleichbarer Basalaktivität.

In einem weiteren Expressionsexperiment wurden die CLSP-Fc- und sCAR-Fc-Produktion bei konstanten Induktorkonzentrationen über 72 h vergleichend untersucht. Hierfür wurden HEK 293T-Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät (4×10^5 Zellen/Well), am nächsten Tag mit pAdG12-CLSP-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc (je 2 µg/Well) transfiziert und mit 1000 ng/ml pro Tag Doxycyclin kultiviert. Die Abnahme und Analyse der fusionsproteinhaltigen Zellkulturüberstände fanden 0, 18, 24, 48 und 72 h posttransfektionell statt (Abb. 3.9 a).

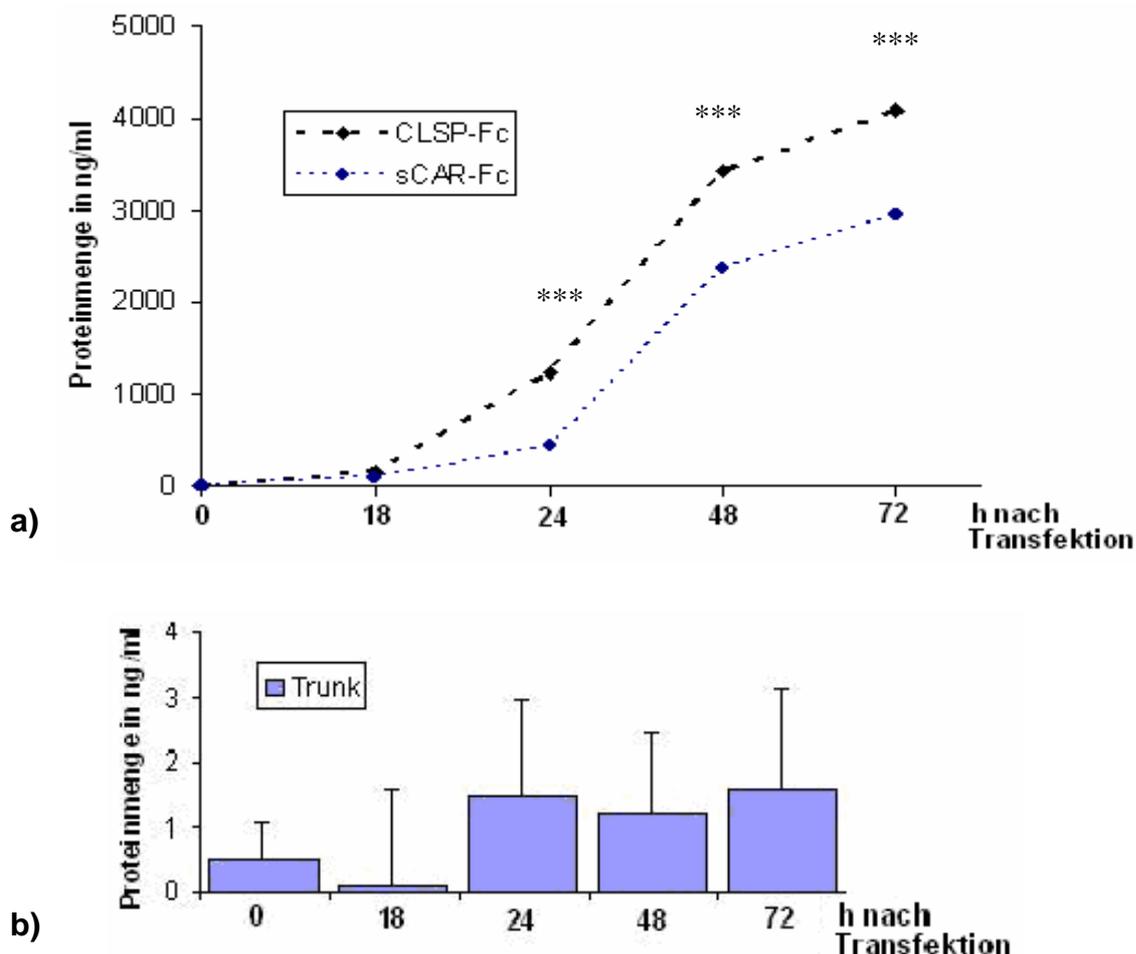


Abb. 3.9: Messung der CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Expression über 72 h mittels ELISA

(a) HEK 293T-Zellen wurden mit pAdG12-CLSP-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc (je 2 µg/Well) transfiziert (Methode: Calciumphosphat-Präzipitation) und mit 1000 ng/ml pro Tag Doxycyclin kultiviert. Die Abnahme und Analyse der Zellkulturüberstände im ELISA erfolgte 0, 18, 24, 48 und 72 h später. (***) $p < 0,001$ für CLSP-Fc- vs. sCAR-Fc-Konzentration nach definierten posttransfektionellen Zeitintervallen) (b) Darstellung der Negativkontrollen: Die Messung der Zellkulturüberstände mittels ELISA nach Transfektion mit pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} (2 µg/Well) und konstanter Doxycyclin-Gabe (1000 ng/ml pro Tag) erfolgte 0, 18, 24, 48, 72 h posttransfektionell.

Bei dieser Expressionsanalyse konnten bereits 18 h posttransfektionell erste CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Mengen im Zellkulturmedium detektiert werden. Es zeigte sich, dass zwischen 24 und 48 h posttransfektionell die stärkste CLSP-Fc- bzw. sCAR-Fc-Sekretion stattfand (durchschnittlich 91 bzw. 80 ng/ml pro h), während anschließend, bis zur letzten Überstandsabnahme nach 72 h, die Höhe der Proteinsekretion wieder abnahm (durchschnittlich nur noch 28 bzw. 24 ng/ml pro h). Auf weitere Messungen (> 72 h posttransfektionell) wurde aufgrund des zu jenem Zeitpunkt schon sehr dichten Zellwachstums und konsekutiver Abnahme der Zellvitalität verzichtet.

In diesem Versuchsansatz konnte nach 72 h eine maximale Proteinausbeute von 4088 +/- 88 ng/ml (CLSP-Fc) bzw. 2943 +/- 50 ng/ml (sCAR-Fc) erzielt werden. Auch hier zeigte sich eine um 24 – 64 % höhere Expression des CLSP-Fc gegenüber dem sCAR-Fc, so dass insgesamt von einer deutlich besseren Expressions-Induzierbarkeit des entsprechenden Zielgens im pAdG12-CLSP-Fc-Vektorkonstrukt auszugehen ist.

Ein Fusionsproteinnachweis im Zellkulturüberstand der mit pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfizierten Zellen blieb erwartungsgemäß aus (Abb. 3.9 b).

3.4 Adenovirus-Inhibitions-Assay

Die antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc in Bezug auf Adenovirusinfektionen wurde im Rahmen eines Adenovirus-Inhibitions-Assays untersucht.

Dabei wurde die Viruslast der Zellen nach deren Infektion mit einem replikationsdefizienten, Luciferase-kodierenden Adenovirus-Vektor (AdVCMVLuc), welcher als morphologischer Vertreter des Ad-Subgenus C (Serotyp 5) CAR als Virusbindungsrezeptor benutzt, jeweils mit bzw. ohne fusionsproteinhaltigen Zellkulturüberständen vergleichend bestimmt.

Aufgrund der sterischen Inhibierung der Adenovirus-Rezeptorbindungsstellen durch die N-terminale D1-Domäne des sCAR-Fc bzw. der drei dazu homologen IgV-Domänen des CLSP-Fc sollte die Zellinfektion bei Vorbehandlung mit den fusionsproteinhaltigen Zellkulturüberständen entsprechend geringer ausfallen (139, 199). Entscheidend war hierbei die Frage, ob das CLSP-Fc wegen der multiplen, antiadenoviral-wirksamen IgV-Domänen eine vergleichsweise stärkere inhibitorische Wirkung aufweisen würde.

Die nach Vektoraufnahme in der Wirtszelle synthetisierte Luciferase katalysiert die Umsetzung des Substrats Luciferin. Die dabei entstehende Lichtemission diente als Reporter für die zelluläre Transduktion mit dem eingesetzten adenoviralen Vektor und war proportional zu der in die Zellen gelangten Virusmenge. Der Nachweis der Luciferase-Expression erfolgte im entsprechenden Assay mit dem Luciferase Detection Kit.

3.4.1 Prüfung verschiedener Testsysteme und Optimierung der Versuchsabläufe

Für die Untersuchung der antiadenoviralen Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc wurden verschiedene Testsysteme erprobt und technische Abläufe hinsichtlich der zuverlässigen Reproduzierbarkeit der Messergebnisse optimiert.

Variablen in der Versuchsanordnung waren beispielsweise die zu infizierende Zelllinie, die Dauer der Inkubation mit viruspartikelhaltigen Zellkulturüberständen oder der Messzeitpunkt nach der Infektion. Kriterien für ein zufriedenstellendes Versuchsprotokoll waren die Intaktheit des Zellrasens und eine ausreichende Zellvitalität zum Messzeitpunkt, welche sich als grundlegend für die Reproduzierbarkeit und damit die Validität der Ergebnisse darstellten.

Bei der sich durchgesetzten Methodik wurden zunächst HEK 293T-Zellen entweder mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfiziert und mit Doxycyclin kultiviert. Aus den Expressionsanalysen (s. Kap. 3.3.3) war bekannt, dass 48 h posttransfektionell bereits hohe Protein-Wirkspiegel erreicht wurden, weshalb zu jenem Zeitpunkt die Abnahme der Zellkulturüberstände stattfand. Diese wurden in einem weiteren Schritt mit AdVCMVLuc präinkubiert und für einen definierten Zeitraum auf HeLa-Zellen gegeben, welche aufgrund ihrer ausgeprägten Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR)-Expression als besonders permissiv für Adenoviren gelten. 24 h postinfektios wurde die Luciferaseaktivität in den HeLa-Zellen gemessen, wobei die Proben mit Zellkulturüberständen aus den mit pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfizierten Zellen als Negativkontrolle fungierten und dementsprechend deren Infektion als maximal (= 100 %) angenommen wurde.

Während bzw. nach der Inkubation der HeLa-Zellen mit den viruspartikelhaltigen Zellkulturüberständen wurden die Beschaffenheit des Zellrasens und die Zellmorphologien in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch überprüft, um im abschließenden Luciferase-Assay nur unbeschadete Ansätze zu verwenden.

Die einzelnen Handlungsschritte bei der Durchführung der Adenovirus-Inhibitions-Experimente sind im nachfolgenden Fließdiagramm nochmals schematisch veranschaulicht (Abb. 3.10).

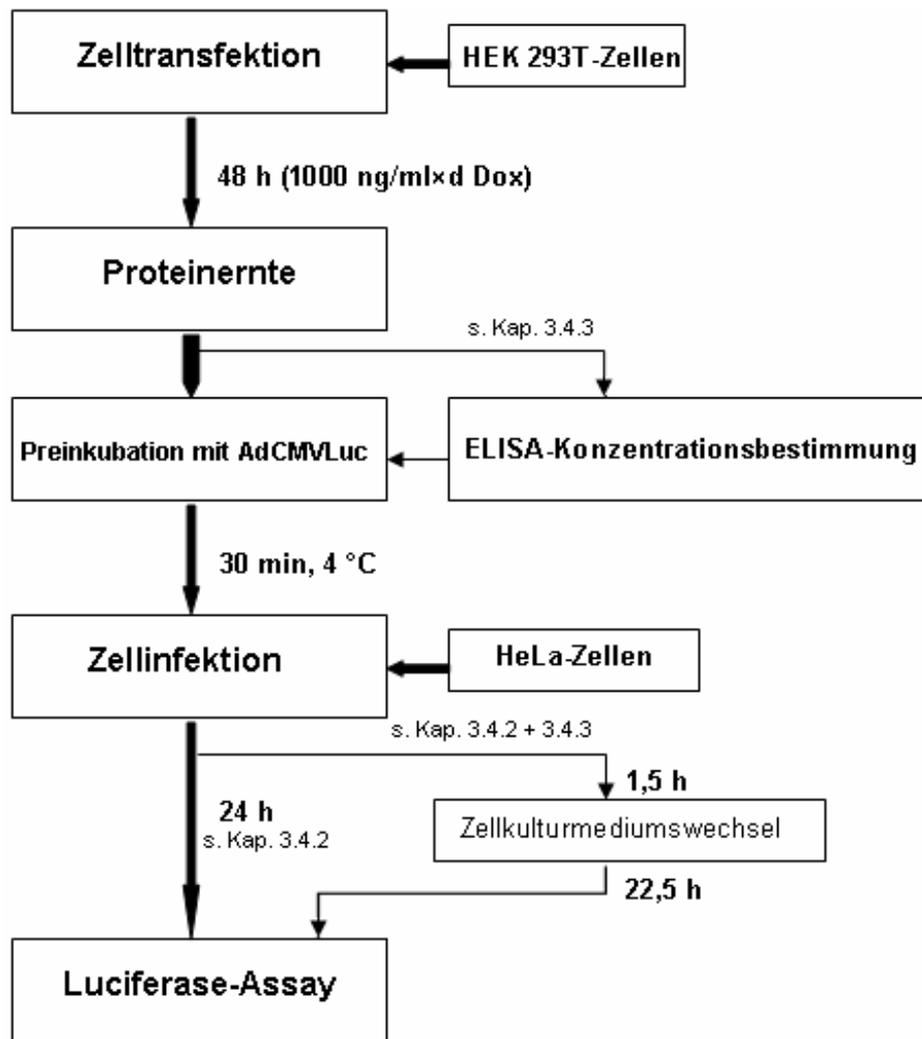


Abb. 3.10: Schematische Darstellung über den Ablauf der Adenovirus-Inhibitions-Experimente

3.4.2 Antiadenovirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc im Luciferase-Assay

Mit dem zuvor erarbeiteten Versuchsprotokoll wurde die antiadenovirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc initial überprüft und vergleichend quantifiziert. Durch Variation der Kontaktzeit des Virusgemisches mit der zu infizierenden HeLa-Zelllinie wurde hierbei dieser Einflussfaktor parallel untersucht.

Zunächst wurden HEK 293T-Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät (4×10^5 Zellen/Well), am nächsten Tag entweder mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc oder pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} (je 2 μ g/Well) transfiziert und mit Doxycyclin (1000 ng/ml pro Tag) kultiviert. 48 h posttransfektionell wurden die fusionsproteinhaltigen Zellkulturüberstände abgenommen,

gepoolt und für 30 min bei 4 °C mit AdVCMVLuc präinkubiert. Danach erfolgte die Gabe von 450 μ l/Well der viruspartikelhaltigen Zellkulturüberstände (150 Pa/Zelle) für 1,5 h bzw. 24 h auf tags zuvor ausgesäte HeLa-Zellen ($1,8 \times 10^5$ Zellen/Well; 24-Well-Platte). 24 h später wurde die Bestimmung der Luciferase-Aktivität durchgeführt (Abb. 3.11).

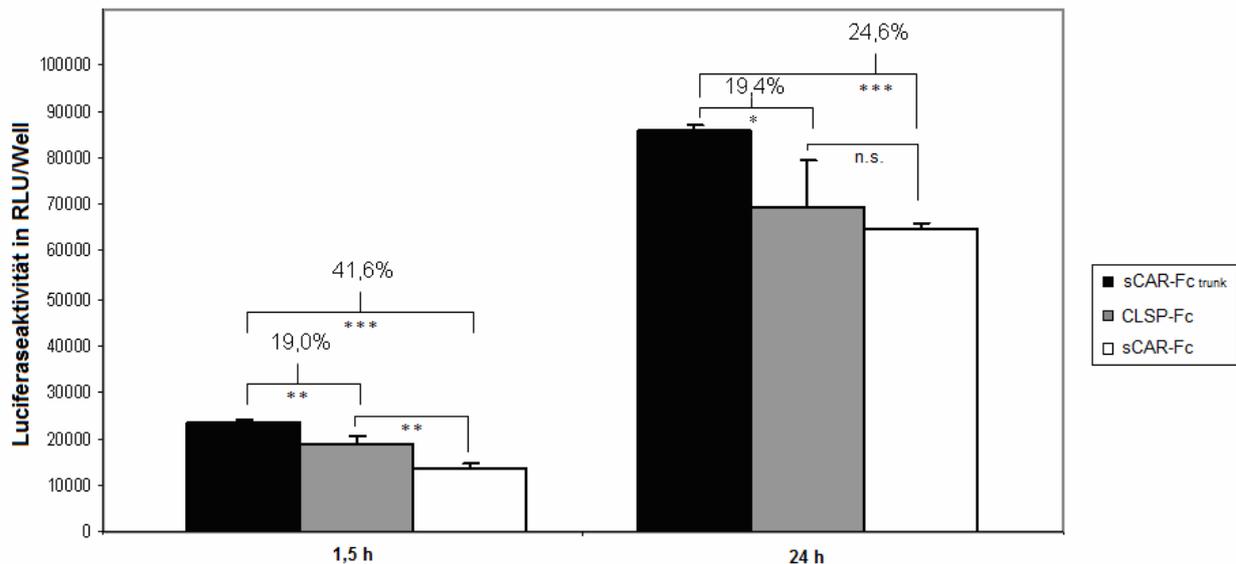


Abb. 3.11: Adenbitions-Assay mit CLSP-Fc und sCAR-Fc

HEK 293T-Zellen wurden mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfiziert (Methode: Calciumphosphat-Präzipitation) und mit 1000 ng/ml Doxycyclin kultiviert. Die Abnahme der Zellkulturüberstände geschah 48 h posttransfektionell. Nach Präinkubation der Zellkulturüberstände mit AdVCMVLuc für 30 min bei 4 °C erfolgte deren Gabe auf HeLa-Zellen (= 150 VP/Zelle) für 1,5 h bzw. 24 h (jeweils Dreifachbestimmungen). Die Messung der Luciferase-Aktivität wurde 24 h nach der Transduktion durchgeführt. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ für die Reduktion der Viruspartikelaufnahme: Kontrolle vs. CLSP-Fc/sCAR-Fc bzw. CLSP-Fc vs. sCAR-Fc)

Die Messung der Luciferase-Aktivität ergab bei den CLSP-Fc-haltigen Proben eine Reduktion der Viruspartikelaufnahme in die Zellen um 19,0 % +/- 8,3 % (Inkubationszeit: 1,5 h) bzw. 19,4 % +/- 12,9 % (Inkubationszeit: 24 h) und bei den sCAR-Fc-haltigen Proben um 41,6 % +/- 6,3 % (Inkubationszeit: 1,5 h) bzw. 24,5 % +/- 2,4 % (Inkubationszeit: 24 h). Hiermit konnte die antiadenovirale Wirksamkeit der löslichen Fusionsproteine CLSP-Fc und sCAR-Fc bestätigt werden. Dabei deutete sich eine vergleichsweise stärkere Wirksamkeit des sCAR-Fc an.

Insgesamt stieg das Infektionsniveau über die zunehmende Dauer der Kontaktzeit mit dem Viruspartikelgemisch erwartungsgemäß an, während der inhibitorische Effekt der Proteine mit zunehmender Dauer der Inkubationszeit bei abnehmender Zellvitalität tendenziell geringer ausfiel. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Inkubationszeit in den Folgeexperimenten auf 1,5 h limitiert.

3.4.3 Dosis-Wirkungs-Experiment: konzentrationsabhängige, antiadenovirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc im Luciferase-Assay

In weiterführenden, dosisabhängigen Experimenten sollte das Wirkungsverhältnis beider Proteine genauer quantifiziert werden. Um für beide Fusionsproteine ein vergleichendes Dosis-Wirkungs-Profil zu erstellen, wurden zunächst CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Konzentrationen im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt und anschließend definierte Proteinmengen im Adenovirus-Inhibitions-Assay eingesetzt.

Für die Dosis-Wirkungs-Experimente wurden HEK 293T-Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät (4×10^5 Zellen/Well), am nächsten Tag entweder mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc oder pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} (je 2 μg /Well) transfiziert und mit Doxycyclin (1000 ng/ml pro Tag) kultiviert. 48 h posttransfektionell wurden die fusionsproteinhaltigen Zellkulturüberstände abgenommen, gepoolt und nach Quantifizierung der CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Konzentrationen mittels ELISA auf 10, 100 und 1000 ng/ml verdünnt. Im Anschluss wurden die Proben für 30 min bei 4 °C mit AdVCMVLuc präinkubiert, um danach 450 μl /Well der viruspartikelhaltigen Zellkulturüberstände (150 VP/Zelle) für 1,5 h auf tags zuvor ausgesäte HeLa-Zellen ($1,8 \times 10^5$ Zellen/Well; 24-Well-Platte) zu geben. 24 h später erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität (Abb. 3.12).

Insgesamt vermochten sowohl die CLSP-Fc- als auch die sCAR-Fc-haltigen Proben eine signifikante Reduktion der Viruspartikelaufnahme in die Zellen zu bewirken. Es zeigte sich für beide Proteine eine, wenn auch teils moderate, Zunahme des antiadenoviralen Effekts in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration. Signifikante Wirkungszunahmen bei steigenden Wirkproteinkonzentrationen konnten hierbei für das CLSP-Fc von 10 auf 100 ng/ml und für das sCAR-Fc von 100 auf 1000 ng/ml gemessen werden.

Für niedrige Fusionsprotein-Konzentrationen (10 ng/ml) konnten lediglich geringe Effekte erzielt werden (p-Werte Kontrolle vs. 10 ng/ml: $p = 0,1$ für CLSP-Fc; $p < 0,05$ für sCAR-Fc). Während unter der getesteten Höchstkonzentration von 1000 ng/ml das CLSP-Fc eine maximale Inhibition von 19,5 % +/- 5,4 % erreichte, lag der inhibitorische Maximaleffekt des sCAR-Fc doppelt so hoch bei 40,7 % +/- 7,6 %. Damit bestätigten sich die in den Vorexperimenten erzielten Ergebnisse des vergleichsweise höheren antiadenoviralen Potentials des sCAR-Fc.

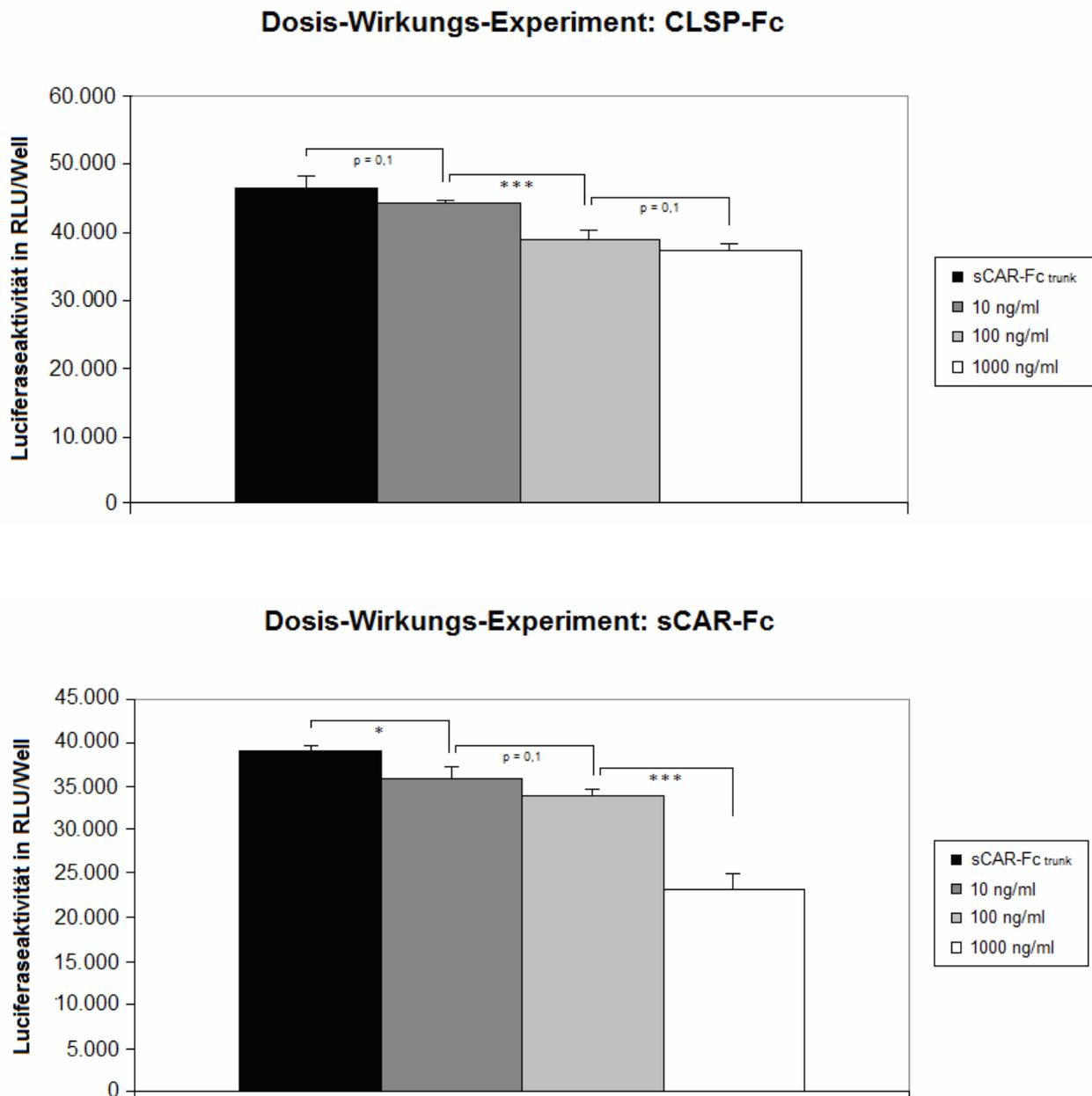


Abb. 3.12: Adenovirus-Inhibitions-Assay mit CLSP-Fc und sCAR-Fc (Dosis-Wirkungs-Experimente)

HEK 293T-Zellen wurden mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfiziert (Methode: Calciumphosphat-Präzipitation) und mit 1000 ng/ml pro Tag Doxycyclin kultiviert. Die Abnahme der Zellkulturüberstände und Bestimmung der CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Konzentration mittels ELISA geschah 48 h posttransfektionell. Anschließend wurden die Proben auf 10, 100 und 1000 ng Fusionsprotein/ml verdünnt. Nach Präinkubation der Zellkulturüberstände mit AdVCMVLuc für 30 min bei 4 °C erfolgte die Gabe auf HeLa-Zellen (= 150 VP/Zelle) für 1,5 h (jeweils Mehrfachbestimmungen). Die Messung der Luciferase-Aktivität wurde 24 h nach der Transduktion durchgeführt. (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$ für die Reduktion der Viruspartikelaufnahme; Vergleich unterschiedlicher Wirkprotein-Konzentrationen zueinander)

3.5 Cocksackievirus-Inhibitions-Assay: Anticocksackievirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc im Plaque-Assay

Die antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc und sCAR-Fc in Bezug auf Cocksackievirus-Infektionen wurde im Rahmen eines Cocksackievirus-Inhibitions-Assays untersucht.

Hierbei wurden fusionsproteinhaltige Zellkulturüberstände zusammen mit Cocksackieviren der Subgruppe B (CVB3) präinkubiert, auf viruspermissive HeLa-Zellen gegeben und die Virusreplikation mittels Plaque-Assay quantifiziert. Wegen des cytopathischen Viruseffektes kommt es zur Lyse von infizierten Zellen und deren unmittelbaren Nachbarzellen. Nach Anfärbung des Zellrasens können die lytischen Bereiche in Form von nicht angefärbten Stellen (sog. Plaques) ausgezählt und als Maß für die Menge an infektiösen Viruspartikeln im Inkubationsaliquot (Angabe in PFU/ml = plaque forming units pro Milliliter Virusaliquot) angenommen werden.

Aufgrund der sterischen Inhibierung der CVB-Rezeptorbindungsstellen und zusätzlich des irreversiblen Verlustes der Viruspartikelinfektiösität durch Interaktion mit der N-terminalen IgV-Domäne des sCAR-Fc sollte die Zellinfektion mit sCAR-Fc-haltigen Zellkulturüberständen bekanntermaßen geringer ausfallen. Ob die drei homologen IgV-Domänen des CLSP-Fc ebenfalls ein anticocksackievirales Potential besitzen, wurde dabei analog erstmals überprüft.

Zur Untersuchung der anticocksackieviralen Wirkung des CLSP-Fc und sCAR-Fc wurden zunächst HEK 293T-Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät (4×10^5 Zellen/Well), am nächsten Tag entweder mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc oder pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} (je 2 µg/Well) transfiziert und mit Doxycyclin (1000 ng/ml pro Tag) kultiviert. 48 h posttransfektionell erfolgte die Abnahme der Zellkulturüberstände. Das Virusaliquot wurde jeweils mit CLSP-Fc-, sCAR-Fc-haltigen bzw. fusionsproteinfreien Zellkulturüberständen auf 0,005 moi bzw. 0,001 moi verdünnt und 30 min bei 4°C präinkubiert. Anschließend wurde auf die tags zuvor ausgesäten HeLa-Zellen (1×10^6 Zellen/Well, 6-Well-Platte) je 1 ml Präinkubat gegeben und für 30 min bei 37 °C belassen. Die Quantifizierung der CVB3-Replikation in den Zellen fand 24 h später im Plaque-Assay statt (Abb. 3.13). Fusionsproteinfreie Überstände aus den mit pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfizierten Zellen fungierten hierbei als Negativkontrolle und dementsprechend wurde die Infektion relativ zu diesen Proben dargestellt.

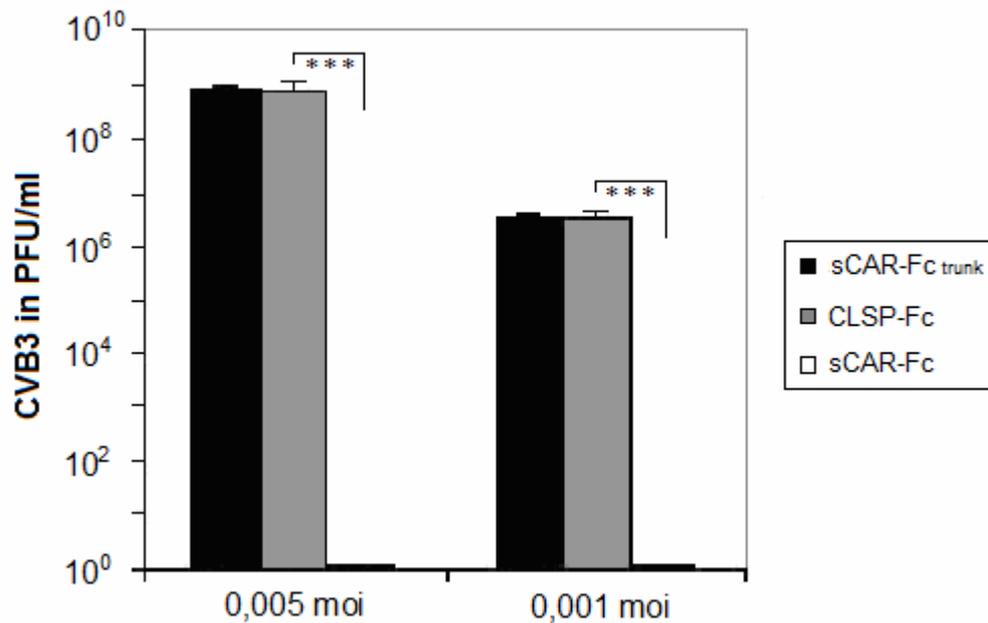


Abb. 3.13: Coxsackievirus-Inhibitions-Assay

HEK 293T-Zellen wurden mit pAdG12-CLSP-Fc, pAdG12-sCAR-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc_{trunk} transfiziert (Methode: Calciumphosphat-Präzipitation) und mit 1000 ng/ml pro Tag Doxycyclin kultiviert. Die Abnahme der Zellkulturüberstände geschah 48 h posttransfektionell. Nach Präinkubation der Zellkulturüberstände mit CVB3 (0,005 bzw. 0,001 moi) für 30 min bei 4 °C erfolgte die Gabe des Virusgemisches auf HeLa-Zellen für 30 min bei 37 °C. Die Quantifizierung der CVB3-Replikation gelang 24 h später mittels Plaque-Assay. (***) $p < 0,001$ für CLSP-Fc vs. sCAR-Fc)

Die Auswertung des Plaque-Assays ergab, dass selbst beim Einsatz verhältnismäßig geringer Mengen Viruspartikel pro Zelle (0,005 bzw. 0,001 moi) und unverdünnter CLSP-Fc-haltiger Überstände diese keine antioxsackievirale Wirkung aufwiesen. Daher entsprach die Anzahl der jeweils ermittelten Plaques trotz maximaler CLSP-Fc-Konzentrationen der der in den fusionsproteinfreien Ansätzen (sCAR-Fc_{trunk}) ermittelten. Hingegen konnte in allen Ansätzen mit sCAR-Fc-haltigen Zellkulturüberständen keine Virusreplikation mehr nachgewiesen werden (PFU/ml = 0), welches einen effizienten antioxsackieviralen Effekt des sCAR-Fc bestätigt und die Validität des Inhibitions-Assays untermauert. Aufgrund dieses Ergebnisses erschien die Durchführung weiterführender Experimente als nicht angezeigt, da die Fragestellung bereits zu diesem Zeitpunkt hinreichend beantwortet werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Auswahl des pharmakologisch regulierbaren pAdG12 als Gen-Vektor

Basierend auf den Kenntnissen molekularbiologischer Abläufe der viralen Replikationszyklen waren in den vergangenen Jahren zahlreiche molekulare und biopharmakologische Behandlungsansätze Gegenstand der Forschung. Insbesondere im Hinblick auf CVB-verursachte Herzmuskelinfektionen konnten neue, hochspezifische Substanzgruppen experimentell entwickelt und hinsichtlich ihres klinischen Anwendungspotentials untersucht werden (83). Ziel dieser Arbeit war es das neuartige Fusionsprotein CLSP-Fc bezüglich seines antiadenoviralen und anticoxsackieviralen Potentials erstmalig zu überprüfen und bei entsprechender Datenlage weiterführende tierexperimentelle Untersuchungen zu initiieren.

Bei der experimentellen Erprobung neuer Biopharmaka, den sogenannten Biologics, nehmen Gen-Vektoren eine wichtige Funktion ein. Sie ermöglichen nach erfolgreicher Klonierung die Amplifikation des gewünschten Genprodukts sowie im Rahmen von *In-Vivo*-Anwendungen das Erzielen hoher Wirkspiegel im Untersuchungssetting. Der Transfer biopharmakologisch wirksamer Nukleinsäuren gelingt prinzipiell über unterschiedliche Methoden bzw. Zellintegrationsmechanismen, wobei als Transport- und Trägervehikel üblicherweise Plasmide oder virale Vektoren genutzt werden (228). Transiente, plasmidbasierende Expressionssysteme, wie sie in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, ermöglichen eine verhältnismäßig schnelle und für experimentelle Zwecke quantitativ ausreichende Herstellung von Proteinprodukten. Das über das pAdG12-Shuttleplasmid exprimierte Fusionsprotein CLSP-Fc konnte nach erfolgreicher Transfektion aus eukaryotischen Zellen in hinreichender Menge erzeugt und durch seine löslichen Eigenschaften direkt aus dem Zellkulturüberstand für initiale *In-Vitro*-Inhibitions-Experimente eingesetzt werden.

Zwar gelang es nach intramuskulärer Injektion und anschließender Transfektion mittels Elektroporation über Plasmid-exprimierte LRAs in Mäusen CVB3-verursachte Herzmuskelentzündungen zu verhindern bzw. abzuschwächen (139), jedoch weisen Plasmidvektoren im Hinblick auf *In-vivo*-Erprobungen entscheidende Defizite auf. Nachteile und Limitationen der Plasmidanwendung stellen zytotoxische und allgemein gewebeschädigende Transfektionseinflüsse, niedrigere Transferraten und eine daraus resultierende ineffektivere Transgenexpression dar (229).

Hingegen gelingt bei der Transduktion von Zielzellen mittels viraler Vektoren ein effektiverer, vergleichsweise zellschonender Gentransfer. In der Vergangenheit konnte das pAdG12-Plasmidvektorkonstrukt bereits erfolgreich in einen adenoviralen Vektor (AdV) eingebracht und im CVB3-Myokarditismausmodell angewendet werden (85). Mit der transgenen Expression des LRAs sCAR-Fc über das AdV-vermittelte Genexpressionssystem AdG12-sCAR-Fc konnte so im CVB3-Myokarditismausmodell neben der Reduktion der kardialen Infektion, Inflammation und des Gewebeschadens auch eine Verbesserung hämodynamischer Parameter nachgewiesen werden (85). Aus diesen Gründen fanden parallel Vorarbeiten zur Konstruktion eines CLSP-Fc exprimierenden AdV (AdG12-CLSP-Fc) statt (Daten nicht gezeigt).

Neben der Auswahl des geeigneten Gen-Vektors kommt regulierbaren Expressionssystemen im experimentellen wie im gentherapeutischen Kontext eine wichtige Bedeutung zu (213). Die Expressionsregulation des Zielgens ermöglicht das Transgenprodukt innerhalb eines therapeutischen Bereichs auszusteuern und somit einerseits ausreichend hohe pharmakologische Wirkspiegel zu erzielen, jedoch andererseits toxischen Substanzeinflüssen bzw. eventuell auftretenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen und -reaktionen entgegenwirken zu können. Wichtige Eigenschaften eines extern regulierbaren Expressionssystems sind, neben einer niedrigen Basalaktivität, eine effiziente Induzierbarkeit des Transgens und eine zeitnahe Induktor-abhängige Systemregulation (212, 213). Des Weiteren sollte der eingesetzte Induktor, auch bei wiederholter Anwendung, eine bekanntermaßen gute Verträglichkeit aufweisen und über eine einfache, möglichst orale Applikationsform verabreicht werden können (223-213).

Das für die Experimente dieser Arbeit ausgewählte pharmakologisch-regulierbare Tet-On-Expressionssystem pAdG12 weist in vielerlei Hinsicht erwünschte Eigenschaften auf. So konnten Pinkert *et al.* selbiges Plasmid-Konstrukt in einen AdV einbauen und hierüber eine effektive Expression des LRA sCAR-Fc und dessen therapeutisch wirksame Anwendung *in vivo* erzielen (85). Darüber hinaus war die transgene Expression streng Induktor-abhängig und deren Initiation gelang ausschließlich und effizient über die orale Zufuhr von Doxycyclin, während sie nach Absetzen des Induktors zeitnah eingestellt wurde.

Argumente für die initiale Erprobung des neuartigen Fusionsproteins CLSP-Fc im entsprechenden Shuttleplasmidvektor (pAdG12-CLSP-Fc) ergaben sich aus der zunächst zellkulturexperimentell angelegten Aufgabenstellung. So konnten nach Plasmidvektorherstellung und erfolgreicher Transfektion unmittelbar vergleichende *In-vitro*-Expressionsanalysen und Virus-Inhibitions-Experimente durchgeführt werden ohne zuvor eine zeitaufwändigere Virusvektorherstellung in Kauf nehmen zu müssen. Transfektionsnachteile wie geringere Gentransferraten und zytotoxische Zelleffekte spielten hierbei eine untergeordnete Rolle. Da die

Vorzüge eines viralen Vektors v. a. bei nachfolgenden *In-vivo*-Anwendungen zum Tragen gekommen wären, ließen die experimentellen Erkenntnisse aus den Plasmid-Experimenten retrospektiv betrachtet eine derartige Konstruktion und Verwendung nicht rechtfertigen.

4.2 Expression des CLSP-Fc und sCAR-Fc im Doxycyclin-abhängigen pAdG12-Vektorsystem

In dieser Arbeit wurde nach erfolgreicher Vektorklonierung und Erarbeitung stabiler und effektiver Transfektionsbedingungen die Expression des CLSP-Fc in eukaryotischen Zellen qualitativ und quantitativ erfasst. Parallel wurde der sCAR-Fc im gleichen Expressionssystem eingesetzt und dessen Induktor-abhängige Regulierbarkeit sowie dessen transgenes Proteinexpressionsprofil mit dem des CLSP-Fc vergleichend untersucht.

Sowohl in der Northern Blot- als auch in der Western Blot-Analyse und dem ELISA ergab sich eine verhältnismäßig stärkere Expression des CLSP-Fc gegenüber der des sCAR-Fc im pAdG12-Expressionssystem, wobei für beide Proteine eine ähnlich hohe Basalaktivität detektiert werden konnte. Im ELISA wurde demnach bei unterschiedlichen Induktorkonzentrationen eine vergleichsweise um 22 - 39 % höher liegende Expression des CLSP-Fc ermittelt. Diese lag bei der Untersuchung der Proteinsekretion unter konstanten Induktorkonzentrationen über 72 h sogar bei 24 - 64 % über dem sCAR-Fc-Niveau. Diese Mehrexpression scheint durch eine effektivere Transaktivierbarkeit des CLSP-Fc im pAdG12-Expressionssystem zustande zu kommen. Darüber hinaus wäre eine effektivere Zellausschleusung und -sekretion des CLSP-Fc denkbar, wodurch die besonders deutlichen Proteinkonzentrationsunterschiede bei der vergleichenden Analyse der Zellkulturüberstände mittels Western-Blot und ELISA mitbedingt sein könnten. So wurden beispielsweise für natürlich vorkommende lösliche Spleißvarianten des humanen CAR quantitative Unterschiede bezüglich ihrer Sekretionsrate festgestellt (135). Hierbei scheinen insbesondere Unterschiede in der cytoplasmatischen Proteinregion zelluläre Proteintransportprozesse zu determinieren (171, 230).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *In-vitro*-Expressionsanalysen konnte die in Abwesenheit des Induktors gemessene Basalaktivität (CLSP-Fc: 38 +/- 1 ng/ml; sCAR-Fc: 50 +/- 1 ng/ml) durch Transaktivierung maximal um das 100-fache (CLSP-Fc) bzw. 60-fach (sCAR-Fc) gesteigert werden. Bei der *In-vitro*-Anwendung vergleichbarer plasmidgebundener Tet-On-Systeme, welche dieselbe Transaktivatorkomponente rtTA2^S-M2 enthielten, wurde von teils niedrigeren Backgroundaktivitäten und insbesondere von höheren Transaktivierungsraten berichtet (220, 221). So gelang es Urlinger *et al.* die Transgenexpression auf das 10³-fache der

Basalexpression zu steigern. Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten lediglich eine 3,4-fache Steigerung zur Basalexpression erreichen (231). Mit den ursprünglichen Tet-On-Systemen, welche die Transaktivator Komponente rtTA enthielten, konnte ebenfalls eine bis zu 10^3 -fache Steigerung zur Basalexpression erreicht werden, allerdings mit deutlich höheren Basalexpressionslevel und höheren Induktor-Dosen bei insgesamt herabgesetzter Dox-Sensitivität des Systems (217, 221, 232).

Pinkert *et al.* gelang es über die Integration des in dieser Arbeit verwendeten AdG12-Expressionssystems in einen adenoviralen Vektor die Basalaktivität *in vitro* im Northern Blot und Western Blot sowie *in vivo* im ELISA auf ein undetektierbares Minimum zu reduzieren (85). Hierbei konnte *in vitro* eine bis zu 2700-fache Expressionsmengen Zunahme beobachtet werden. Eine Erklärung für die geringere Basalaktivität und bessere Induzierbarkeit des sCAR-Fc im adenoviralen Vektor AdG12 gegenüber der im Shuttleplasmid pAdG12 scheinen die dahingehend vergleichsweise positiven Eigenschaften des Virusvektors zu sein. So ist zum einen durch die AdV-vermittelte Zelltransformation eine weitaus effektivere und zellschonendere Transgeneinschleusung sowie nachgeschaltete Proteininduktion möglich, zum anderen scheint diese einer strengeren Induktorabhängigkeit zu unterliegen. Auch in der Vergangenheit erzielten genomintegrierende Verfahren im Vergleich zu transienten Transfektionsverfahren geringere Basalaktivitäten (221, 232-235).

Bei den hier durchgeführten Expressionsuntersuchungen gelang es bereits mit geringen Induktorkonzentrationen (10 ng/ml Dox) eine effektive Proteinexpression zu bewirken. Jedoch war die Doxycyclin-abhängige CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Sekretion nur begrenzt steigerbar, so dass unter höheren Induktordosen (> 100 ng/ml Dox) keine signifikanten Proteinmengen zunahmen mehr detektiert wurden und daher in jenem Bereich eine weniger gute Systemregulierbarkeit zu konstatieren ist. Hingegen ist eine konzentrationsabhängige Regulierbarkeit des Proteinexpressionssystems bei kleineren, unterhalb des Sättigungsbereichs des Systems liegenden, Doxycyclin-Dosen (1-100 ng/ml) zu vermuten. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen aus anderen *In-vitro*-Expressionsstudien, bei denen ebenfalls Plasmidvektoren mit der Transaktivator Komponente rtTA^S-M2 Verwendung fanden und bei denen im Rahmen einer insgesamt sigmoidal verlaufenden Expressionskinetik das Konzentrationsfenster der Doxycyclin-regulierbaren Transgenexpression unter 100 ng/ml pro Tag lag (220, 231).

Während bei *In-vitro*-Experimenten mit dem adenoviralen Vektor AdG12 bei geringen Induktorkonzentrationen von 10 ng/ml Dox lediglich 5 % der maximalen Proteinausbeute erreicht werden konnte (224), betrug diese beim pAdG12 bereits über 80 % (CLSP-Fc) bzw. 60 % (sCAR-Fc). Demzufolge wies das plasmidgebundene Expressionssystem eine höhere

Doxycyclin-Sensitivität auf, wohingegen der Adenovirusvektor eine vergleichsweise bessere induktorabhängige Regulierbarkeit der Proteinexpression für die experimentell eingesetzten Doxycyclin-Dosen (10-1000 ng/ml) zeigte (85).

Bei der hier durchgeführten Untersuchung der Proteinsekretion unter konstanten Induktorkonzentrationen (1000 ng/ml Dox) über 72 h mittels ELISA konnten bereits 18 h posttransfektionell erste CLSP-Fc-/sCAR-Fc-Mengen im Zellkulturmedium detektiert werden. Es zeigte sich hierbei für beide Proteine ein sigmoidaler Kurvenverlauf der Proteinsekretion über die Zeit mit maximalen Sekretionsraten 24 bis 48 h nach der Zelltransfektion (CLSP-Fc: 91 ng/ml pro h, sCAR-Fc: 80 ng/ml pro h). Trotz des insgesamt veränderten Expressionsprofils bei entsprechenden *In-vivo*-Anwendungen gelang auch hier über den Virusvektor AdG12 ein frühzeitiger Proteinnachweis im Serum transduzierter Mäuse nur 16 h nach Induktorzugabe (224). Lim *et al.* konnten hingegen bei der *In-vivo*-Anwendung einer nicht-regulierbaren sCAR-Fc-exprimierenden Plasmidvariante erst 3 Tage nach der Transfektion ein sCAR-Fc-Anstieg im Serum der Versuchsmäuse feststellen (139). Die vergleichsweise schnelle und ausreichend hohe Transgeninduktion im pharmakologisch regulierbaren pAdG12/AdG12 stellt eine wichtige Eigenschaft im Hinblick auf mögliche antivirale Anwendungen im CVB-Myokarditismodell dar, da bei schnell replizierenden Viruspopulationen im Rahmen eines akuten Infektionsprozesses nur ein sehr kleines Zeitfenster für die wirkungsvolle Inhibierung einer systemischen Virusausbreitung zur Verfügung stünde (224).

Zusammenfassend betrachtet konnte über den pharmakologisch regulierbaren Plasmidvektor pAdG12 eine effektive, Doxycyclin-abhängige und zumindest für kleinere Induktordosen Doxycyclin-regulierbare Produktion des neuartigen Fusionsproteins CLSP-Fc erreicht werden. Beim parallelen Einsatz des sCAR-Fc im gleichen Expressionssystem stellte sich eine signifikant höhere CLSP-Fc-Sekretion bei vergleichbarer Basalaktivität dar. Auch wenn für den Fall einer *In-vivo*-Erprobung des CLSP-Fc in einem regulierbaren Expressionssystem die Integration in einen adenoviralen Virusvektor aus pharmakodynamischer Sicht entscheidende Vorteile böte, gelang es nichtsdestotrotz über den eingesetzten Plasmidvektor ausreichend hohe Fusionsproteinmengen für anschließende Virus-Inhibitions-Experimente und damit für die Beantwortung der zentralen Fragestellung zu erzielen.

4.3 Antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc

Lösliche Rezeptoranaloga (LRA) konnten in der Vergangenheit bereits erfolgreich im Rahmen antiviraler Therapieansätze Verwendung finden (139, 188-193). Ihr Wirkungsprinzip beruht in

erster Linie auf der kompetitiven Hemmung und sterischen Inhibierung viraler Rezeptorbindungsstellen und der damit verbundenen Prävention der Virusanheftung und nachfolgenden -aufnahme in die mögliche Zielzelle. Für Viren der Picornafamilie konnte darüber hinaus durch Bindung mit LRAs, in Analogie zum physiologischen *Uncoating*-Mechanismus der A-Partikelformation (181), eine irreversible Konformationsänderung der Kapsidhülle mit Verlust des viralen RNA-Genoms und konsekutiv der Partikelinfektiosität nachgewiesen werden (134, 182, 187).

Der Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR) dient in seiner membranständigen Form Coxsackieviren der Gruppe B (CVB) sowie diversen Adenovirus (Ad)-Untergruppen (A, C-F) als primärer Virusbindungs- bzw. Virusinternalisierungsfaktor (162-165). Lösliche Rezeptorvarianten des CAR, die charakteristischerweise keine zelloberflächenverankernde Transmembrandomäne aufweisen, zeigten antivirales Wirkpotential gegen CVB und Ad (135, 195). Durch Kopplung löslicher Varianten des humanen CAR-Proteins mit dem c-terminalen Fc-Teil des humanen IgG1 gelang es wünschenswerte Proteineigenschaften im Hinblick auf die antivirale Wirkeffizienz weiter zu verbessern (196). Mehrere tierexperimentelle Untersuchungen mit dem chimären sCAR-Fc bewiesen, insbesondere in Bezug auf CVB-Infektionen, einen ausgeprägten virusinhibitorischen Effekt (85, 138, 139).

Dem in entscheidenden Teilen der Sequenz und Struktur zum CAR homologen, ebenfalls löslichen CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP) konnte in initialen Experimenten eine Bindungsfähigkeit und eine daraus resultierende inhibitorische Wirkung bezüglich Ad-Infektionen nachgewiesen werden (199). Strukturelle Ähnlichkeiten des CLSP mit der CVB-bindenden D1-Domäne des CAR sowie Erkenntnisse aus den beschriebenen Ad-Inhibitions-Experimenten ließen darüber hinaus eine anticoxsackievirale Proteinwirkung vermuten.

In dieser Arbeit wurde ein neues Fusionsprotein, das Fc-Teil-gekoppelte CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP-Fc) konstruiert. Das antivirale Potential des CLSP-Fc wurde erstmalig im Hinblick auf CVB-Infektionen, aber auch im Bezug auf Adenovirusinfektionen überprüft und *in vitro* im Rahmen von Virus-Inhibitions-Experimenten vergleichende Daten mit dem bereits etablierten sCAR-Fc erhoben.

4.3.1 Antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc bei Adenovirusinfektionen

Nachdem im anfänglichen Ad-Inhibitions-Assay eine signifikante Reduktion der Viruspartikelaufnahme in die Zellen durch Präinkubation der reportergentragenden AdVs mit

CLSP-Fc-haltigen Zellkulturüberständen bestätigt werden konnte, erfolgte in dosisabhängigen Experimenten eine weiterführende Quantifizierung des virusinhibitorischen Wirkpotentials.

Hierbei zeigte sich unter den gewählten Testbedingungen eine Zunahme des antiadenoviralen Effekts in Abhängigkeit von der eingesetzten CLSP-Fc-Konzentration. Während unter den hier verwendeten Proteinhöchstmengen von 1000 ng/ml mit dem CLSP-Fc eine maximale Reduktion der Viruspartikelaufnahme von ca. 20 % (19,5 % +/- 5,4 %) erreichte wurde, war beim analog eingesetzten sCAR-Fc der inhibitorische Maximizeffekt mit ca. 40 % (40,7 % +/- 7,6 %) deutlich höher. Auch in den eingangs durchgeführten Ad-Inhibitionsexperimenten bestätigte sich diesbezüglich die Überlegenheit des sCAR-Fc.

Die Hypothese, dass sich aufgrund der dreifach vorhandenen IgV-Domänen im CLSP, welche jeweils strenge Sequenzhomologie zur virusbindenden D1-Domäne des CAR aufweisen (199), ein verhältnismäßig größeres inhibitorisches Potential ergeben könnte, ist damit nicht zu bestätigen. Grund hierfür mag die im CLSP-Fc fehlende D2-Domäne sein, welche nachweislich die Bindungsfähigkeit der adenoviralen Fiberknopdomäne zum CAR beeinflusst. So konnte zwar in zahlreichen Untersuchungen die D1-Domäne des CAR als primäre Bindungs- und Kontaktomäne für die Ad-CAR-Interaktion identifiziert werden (183, 236, 237), jedoch wiesen D2-defiziente CAR-Proteine eine deutlich reduzierte Virusaffinität auf (186). Welche konkrete Rolle die D2-Domäne hierbei spielt, ob beispielsweise als weitgehend unspezifischer Platzhalter zwischen Zelloberfläche und Viruskapsid oder als eine beim Virusinternalisierungsprozess interagierende Struktur, ist bisweilen unklar. Allerdings legt die Beobachtung, dass eine Zellinfektion nach stattgehabter Virus-Rezeptor-Bindung auch über D2-defiziente CAR-Proteine unverändert erfolgen kann, eher einen Einflussfaktor der D2-Domäne bei der Virusanheftung nahe (186). Auf der anderen Seite zeigten Bindungsexperimente mit rekombinant hergestelltem sCAR bzw. seiner isoliert exprimierten D1-Domäne, dass beide Proteinstrukturen im gleichen Maße mit der Fiberknopdomäne des Ad-Serotyps 5 (Ad5) interagieren konnten. So wurden hierbei annähernd gleiche bindungskinetische Parameter (Assoziations- und Dissoziationskonstanten) ermittelt, sowie für beide Strukturen eine gleichermaßen suffiziente inhibitorische Wirkung in *in vitro* durchgeführten Infektionsexperimenten mit Ad5 und Ad-permissiven CHO Zellen nachgewiesen (237). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der isolierten Verwendung der D1-Domäne des CAR, welche HeLa-Zellen vor der Infektion mit Ad2 schützte, erzielt (238). Im Gegensatz zu Freimuth *et al.* schlussfolgerten andere Autoren, dass die adenovirale Fiberknopdomäne eine größere Affinität zu CAR in zellmembranständiger Interaktionsumgebung aufweisen würde und daraus resultierend eine vergleichsweise geringere Bindungsneigung von Ads zu sCAR bzw. entsprechenden LRAs vorläge (239).

Ein weiterer Grund für die verhältnismäßig geringere antiadenovirale Wirkung des CLSP-Fc gegenüber der des sCAR-Fc mag darin liegen, dass trotz ausgeprägter Sequenzhomologie der drei IgV-Domänen des CLSP zu der virusbindenden D1-Domäne des mCAR bzw. der des nahezu sequenzidentischen humanen CAR einige AS-Schlüsselpositionen unterschiedlich besetzt sind (Abb. 4.1).

CAR-D1	28	E E M I E K A K G E T A Y L P C K F T L S P E D Q G P L D I E W L I S
CLSP-IgV1		E Q T I Q E V Q G E T V H L P C M F T L S P E D Q G P L D I E W L R S
CAR-D1	63	P A D N Q K V N Q V I I L Y S G D K I Y D D Y Y P D L K G R V H F T S
CLSP-IgV1		G P N N E A M D H V I I L Y A V D K I Y S D F Y Q D M R G R V N F T S
CAR-D1	98	N D L K S G D A S I N V T N L Q L S D I G T Y Q C K V K K A P G V A N
CLSP-IgV1		N G I T S G E A S I K I R D V Q P A D S G T Y L C K V K T A P G V A K
CAR-D1	133	K K I H L V V
CLSP-IgV1		T T V Q L T V

Abb. 4.1: Adenovirus-CAR-Interaktion - Sequenzvergleich CAR-D1 mit CLSP-IgV1

Die mit blau markierten AS-Reste zeigen die bei der Interaktion des Ad12 mit der D1-Domäne des humanen CAR involvierten Sequenzbereiche. Mit gelb markierte AS-Reste der vergleichend dargestellten IgV1-Domäne des CLSP weisen auf bindungsrelevante Sequenzabweichungen hin. [nach Coyne CB *et al.*, 2005; (177)]

Die AS-Sequenzen der Fiberknopdomänen verschiedener Ad-Serotypen variieren untereinander stark. Die Sequenzabweichung der Fiberknopdomäne des in dieser Arbeit verwendeten Adenovirusvektors (AdVCMVLuc, Vertreter des Ad-Serotyps 5) zu anderen Serotypen beträgt beispielsweise bis zu 66 % (240). Nichtsdestotrotz können nahezu alle Ad-Untergruppen, abgesehen vom Ad-Subgenus C und von kurzfibrigen Vertretern der F-Gruppe, effektiv mit CAR interagieren (162). Ermöglicht wird dies über konservierte AS-Sequenzen mit hohem Übereinstimmungsgrad im Bereich der mit der D1-Domäne in Wechselwirkung tretenden Fiberknopanteile (240). So führten Mutationen in diesen Bereichen bei durchgeführten Bindungsexperimenten zu einer deutlichen Herabsetzung oder gar zum Verlust der viralen Bindungsfähigkeit zu CAR (237, 240). Auf der anderen Seite handelt es sich bei den wechselwirkenden Zielstrukturen der D1-Domäne ebenfalls um konservierte Regionen, die für die Rezeptor-Liganden-Interaktion eine entscheidende Rolle spielen. Kristallstrukturanalysen von Ad12-CAR-Komplexen legen hierbei u. a. einen elementaren Stellenwert der AS 77 (Ser) und 85 (Tyr) der D1-Domäne nahe (236, 241), welche in der IgV1-Domäne des CLSP durch Ala bzw. Phe ersetzt sind. Auch wenn andere mutmaßliche Schlüsselpositionen für die Virus-Rezeptor-Interaktion (AS 58, 72, 75, 82, 123, 125) in der IgV1-Domäne identisch besetzt sind

(199, 241), ist hierdurch bereits eine Abschwächung der LRA-Affinität zur Faserknopfdomäne der Ads denkbar.

Im Rahmen der durchgeführten Kristallstrukturanalysen von Ad12-CAR-D1-Komplexen konnte festgestellt werden, dass zeitgleich drei CAR-D1-Domänen mit dem trimären adenoviralen Faserknopf interagieren, wobei die Bindung jeweils an der Schnittstelle zwischen den benachbarten Knob-Monomeren erfolgt (236). Die Ad-CAR-D1-Bindung führt hierbei zu keiner nennenswerten Konformationsänderung des Bindungskomplexes, wobei die proximal gelegene D2-Domäne des CAR nicht direkt mit dem Faserknopf in Wechselwirkung tritt (239, 242). Diese Beobachtung lässt als Wirkmechanismus analog zur D1-Domäne im CAR auf die alleinige Virusinteraktion der distal gelegenen IgV1-Domäne im CLSP schließen. Somit hätten die ebenfalls zur D1-Domäne des CAR sequenzhomologen IgV2- und IgV3-Domänen keinen zusätzlich begünstigenden Einfluss auf die Besetzung viraler Rezeptorbindungsstellen und damit auf die virusinhibitorische CLSP-Funktion.

Mit dem in dieser Arbeit angewandten Messverfahren gelang es für das CLSP-Fc eine maximale Reduktion der Ad-Partikelaufnahme in Ad-permissive HeLa-Zellen von ca. 20 % nachzuweisen. Diese Ergebnisse decken sich mit den vorbeschriebenen Resultaten bezüglich des Ad-inhibitorischen Effekts des CLSP aus der Literatur. Hier konnte ebenfalls bei der Präinkubation von AdV-Partikeln mit CLSP-haltigen bzw. mit CLSP-Fusionsprotein (NusA-CLSP)-haltigen Zellkulturüberständen und anschließenden Infektionsexperimenten (100 VP/Zelle) eine etwa 10 - 30%ige Reduktion der Virusvektoraufnahme in SK HEP-1-Zellen festgestellt werden (199). Kawabata *et al.* zeigten hingegen auch, dass bei der direkten Infektion von CLSP-produzierenden SK HEP-1-Zellen, sogar mit einer dreifach so hohen Menge an Viruspartikeln (300 VP/Zelle), eine Reduktion der AdV-Partikelaufnahme von ca. 60 % und damit ein deutlich stärkerer antiadenoviraler Wirkeffekt zu erzielen war. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde ein experimentelles Verfahren erprobt, in dem transgen CLSP-Fc-produzierende HEK 293T-Zellen direkt mit reportergetragenden AdVs infiziert wurden. Jedoch zeigte sich hierbei, dass die verwendete Zelllinie dem Zellstress bestehend aus Transfektion, Transduktion und den damit verbundenen Zellmediumswechseln nicht standhielt. Aufgrund mangelnder und variabler Zellvitalität zum Messzeitpunkt und daraus resultierend schwer reproduzierbaren Ergebnissen im Luciferase-Assay wurden weitere Ad-Inhibitions-Experimente nach dem in 3.4.1 eingehend dargestellten Verfahren entwickelt. Ein möglicher Grund für die Ergebniskonstellation des größeren virusinhibitorischen Effekts bei transgen CLSP-produzierenden Zellen mag die hier vorliegende verstärkte Bindung des CLSP an membranständige CAR-Proteine sein, welche über die Blockade zellulärer Oberflächenstrukturen zusätzlich die Virusanheftung verhindern könnte.

So konnte mittels durchflusszytometrischer Analysen auf CLSP-produzierenden Zellen eine vergleichsweise höhere Rate an zelloberflächen-assoziierten CLSP nachgewiesen werden als auf den lediglich mit CLSP-haltigen Zellkulturüberstand inkubierten Zellen (199). Der hierfür zugrunde liegende Mechanismus der post- oder perisekretorischen Zelloberflächenassoziation des CLSP ist bislang ungeklärt.

Zusammenfassend betrachtet stellte sich in den hier durchgeführten Ad-Inhibitionsexperimenten für das CLSP-Fc eine ähnlich hohe antivirale Wirkstärke wie für das ungekoppelte CLSP heraus. Dabei konnten die Ergebnisse von Kawabata *et al.* bezüglich des antiadenoviralen Wirkpotentials des CLSP bestätigt werden (199). Deutlich wurde auch, dass das CLSP-Fc im Vergleich zum sCAR-Fc bei den hier verwendeten maximalen Proteinkonzentrationen einen signifikant geringeren virusinhibitorischen Effekt aufwies. Gründe hierfür mögen in der fehlenden D2-Domäne und der zum Teil in bindungsrelevanten Bereichen abweichenden AS-Sequenz des CLSP-Fc liegen, wodurch die Virus-LRA-Affinität und damit das resultierende antivirale Proteinpotential entscheidend zu Gunsten des sCAR-Fc ausgestaltet zu sein scheint.

4.3.2 Antivirale Wirksamkeit des CLSP-Fc bei Coxsackievirusinfektionen

Zur Überprüfung eines antiviralen Effektes des CLSP-Fc gegen CAR-bindende Coxsackieviren wurden in dieser Arbeit CLSP-Fc-haltige Zellkulturüberstände mit CVB3 inkubiert und die Virusvermehrung auf permissiven HeLa-Zellen mittels Plaque-Assay quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass selbst bei verhältnismäßig geringen Viruspartikelmengen (0,005/0,001 moi) und maximalen CLSP-Fc-Konzentrationen (3500 ng/ml) für das neuartige Fusionsprotein keine anticoxsackievirale Wirkung nachgewiesen werden konnte. Hingegen führten sCAR-Fc-haltige Zellkulturüberstände in allen Ansätzen zu einer vollständigen Inhibierung der CVB3-Replikation.

Ein zentraler Erklärungsansatz für die Wirkdiskrepanz der beiden eingesetzten Fusionsproteine scheint die Fähigkeit des sCAR-Fc zu sein, neben der reversiblen kompetitiven Hemmung der Virusrezeptorbindungsstellen eine irreversible Konformationsänderung des Viruskapsids herbeizuführen (134, 136). Durch die so genannte A-Partikelformation, welche auch für andere Vertreter der Picornavirenfamilie beschrieben ist (141, 182), kommt es unter Freigabe des viralen RNA-Genoms zum vollständigen Verlust der Viruspartikelinfektiosität. Hieraus resultiert ein besonders effektiver antiviraler Effekt für LRAs mit A-Partikel-induzierenden Eigenschaften (182, 187). So konnte sowohl für natürlich vorkommende wie auch rekombinant exprimierte

sCAR- bzw. sCAR-Fc-Varianten über diesen Mechanismus eine ausgeprägte CVB-inhibitorische Wirkung beobachtet werden (85, 135, 138, 139, 243).

Die A-Partikelbildung, welche während des viralen Infektionsprozesses im Rahmen der Virusinternalisierung an der Zielzelloberfläche abläuft, wird durch die spezifische Interaktion der Virusoberfläche mit entsprechenden Kontaktbereichen des Rezeptors ausgelöst (181). Hierbei bindet die distal gelegene D1-Domäne des CAR im so genannten Canyon, eine jeweils die Berührungspunkte der 5-fach Symmetrieachsen der viralen VP1-Proteine umgebende Vertiefung in der Viruskapsidhülle (s. Abb. 1.1). Durch die Virus-Rezeptor-Wechselwirkung kommt es vermutlich unterhalb der Bindungstasche des Canyons zum Verlust eines VP1-assoziierten `Pocketfactors` und konsekutiv zum Stabilitätsverlust des Virions (244).

Auch wenn hierbei alle äußeren Virusproteine (VP1, VP2, VP3) beteiligt sind, weiß man aufgrund kryoelektronenmikroskopischer Strukturanalysen von CVB3-CAR-Komplexen, dass die Kontaktaufnahme mit CAR überwiegend über bestimmte AS-Reste des VP1-Proteins erfolgt (164, 245; s. Abb. 4.2 a).

Diese Schlüsselregionen erwiesen sich innerhalb der verschiedenen CVB-Serotypen als konservierte Areale vornehmlich im Zentrum des Canyon (245, 246). Auf der Gegenseite handelt es sich auch bei den bindungsinvolvierten AS-Resten der D1-Domäne um molekulare Strukturen, welche ihrerseits bei CAR-Proteinen unterschiedlicher Spezies hoch konserviert sind (247). Aufgrund der Abweichung einiger bindungsrelevanter Schlüsselaminosäuren in der distalen IgV1-Domäne des CLSP-Fc (Pos. 28, 29, 136) von der AS-Sequenz der D1-Domäne des sCAR-Fc ist ein Verlust der Bindungsfähigkeit und daraus resultierend die fehlende Fähigkeit des CLSP-Fc zur A-Partikelinduktion denkbar (Abb. 4.2 b).

So führten beispielsweise Virusmutationen im Bereich des am Unterrand des Canyons befindlichen VP2-Proteins (N2165D) zu einer Reduktion der CVB-CAR-Interaktion und damit zur Abschwächung der Zellinfektion durch die betroffene CVB3-Mutante (248). Die hierbei beschriebene Mutation im VP2-Protein grenzt an die AS Lys 2166 und Ser 2164, welche mutmaßlich bei der Rezeptorbindung mit den AS Glu 29 und Met 30 der CAR-D1-Domäne elektrostatisch in Wechselwirkung treten (164). Die für die Virusbindung bedeutenden AS Glu 29 (polarer Rest) und Met 30 (unpolare Rest) der CAR-D1-Domäne sind in der IgV1-Domäne des CLSP-Fc durch Gln (elektroneutraler Rest) bzw. Arg (polarer Rest) ersetzt, wodurch das Bindungsverhalten des CLSP-Fc maßgeblich beeinflusst sein könnte (Abb. 4.2).

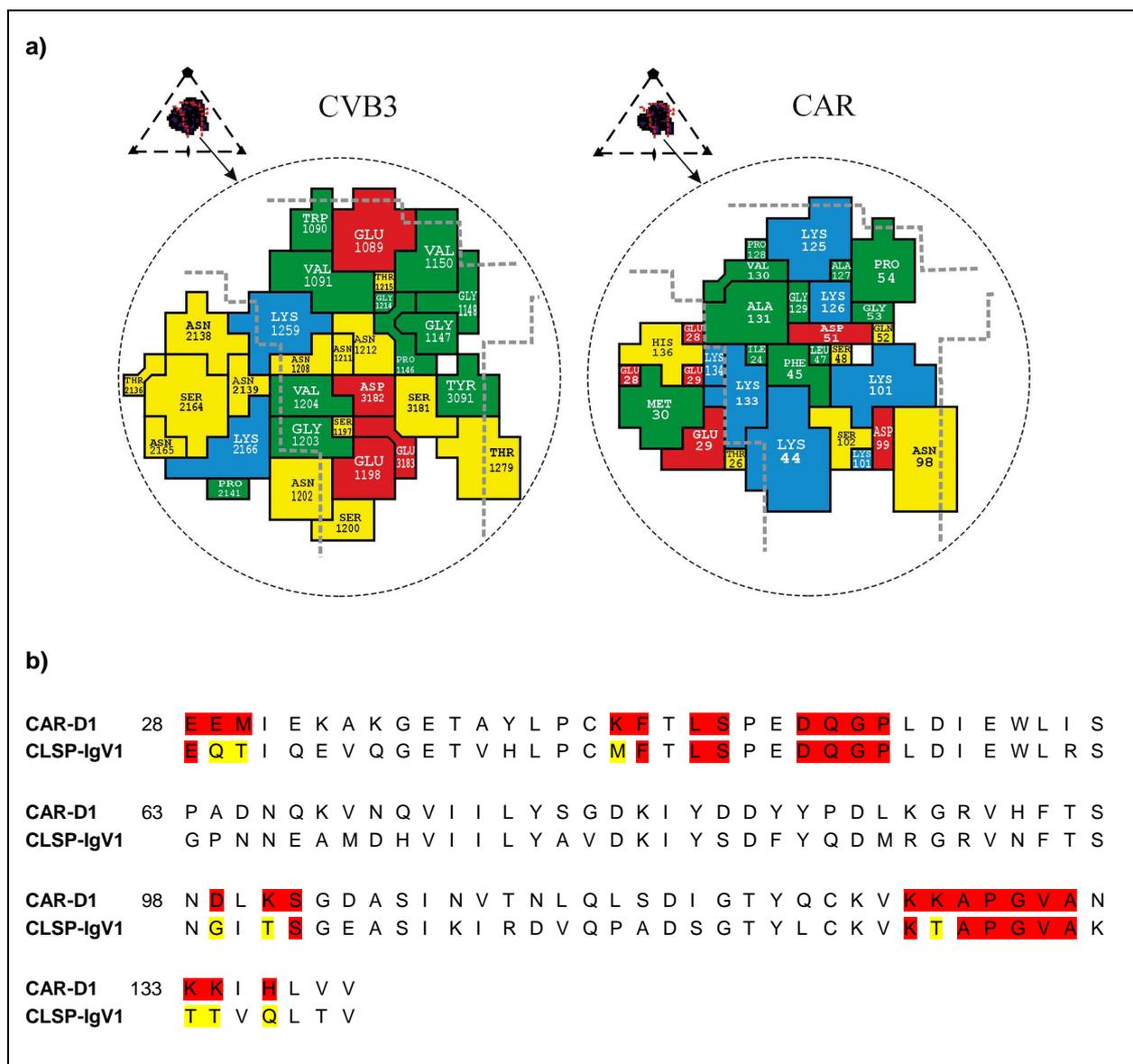


Abb. 4.2: Coxsackievirus-CAR-Interaktion

(a) Interaktionsprofil der CVB3-Oberfläche mit der CAR-D1-Domäne. Gezeigt sind die bei der Virus-Rezeptorbindung unmittelbar beteiligten AS-Reste. Schematisch angedeutet ist eine asymmetrische Virusuntereinheit mit dem zentral gelegenen Bindungscanyon. Die gestrichelten Linien markieren die Grenzen des Canyons. Farbcodierung der AS-Reste: rot für sauer, blau für basisch, gelb für polar, grün für hydrophob. [nach He *et al.*, 2001; (164)] (b) Sequenzvergleich CAR-D1 mit CLSP-IgV1. Die mit rot markierten AS-Reste zeigen die für die Interaktion von CVB3 mit der D1-Domäne des humanen CAR involvierten Proteinbereiche. Mit gelb markierte AS-Reste weisen auf bindungsrelevante Sequenzabweichungen der IgV1-Domäne des CLSP hin. [nach Coyne CB *et al.*, 2005; (177)]

Diese Schlüsselregionen erwiesen sich innerhalb der verschiedenen CVB-Serotypen als konservierte Areale vornehmlich im Zentrum des Canyon (245, 246). Auf der Gegenseite handelt es sich auch bei den bindungsinvolverten AS-Resten der D1-Domäne um molekulare Strukturen, welche ihrerseits bei CAR-Proteinen unterschiedlicher Spezies hoch konserviert sind (247). Aufgrund der Abweichung einiger bindungsrelevanter Schlüsselaminosäuren in der distalen IgV1-Domäne des CLSP-Fc (Pos. 28, 29, 136) von der AS-Sequenz der D1-Domäne des

sCAR-Fc ist ein Verlust der Bindungsfähigkeit und daraus resultierend die fehlende Fähigkeit des CLSP-Fc zur A-Partikelinduktion denkbar (Abb. 4.2 b).

So führten beispielsweise Virusmutationen im Bereich des am Unterrand des Canyons befindlichen VP2-Proteins (N2165D) zu einer Reduktion der CVB-CAR-Interaktion und damit zur Abschwächung der Zellinfektion durch die betroffene CVB3-Mutante (248). Die hierbei beschriebene Mutation im VP2-Protein grenzt an die AS Lys 2166 und Ser 2164, welche mutmaßlich bei der Rezeptorbindung mit den AS Glu 29 und Met 30 der CAR-D1-Domäne elektrostatisch in Wechselwirkung treten (164). Die für die Virusbindung bedeutenden AS Glu 29 (polarer Rest) und Met 30 (unpolare Rest) der CAR-D1-Domäne sind in der IgV1-Domäne des CLSP-Fc durch Gln (elektroneutraler Rest) bzw. Arg (polarer Rest) ersetzt, wodurch das Bindungsverhalten des CLSP-Fc maßgeblich beeinflusst sein könnte (Abb. 4.2).

Obwohl bei der CAR-CVB-Interaktion ausschließlich die D1-Domäne des CAR den Kontakt zur Virusoberfläche herstellt, zeigten kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen, dass beim isolierten Einsatz der CAR-D1-Domäne (CAR-D1) keine Bindung zur CVB3-Oberfläche detektiert werden konnte (164). Hingegen wiesen Protein-Fragmente bestehend aus der D1- und D2-Domäne des CAR (CAR-D1/D2) die Fähigkeit zur Besetzung viraler Rezeptorbindungsstellen auf. Unter den gewählten Untersuchungsbedingungen zeigte das vollständige CAR-Molekül bestehend aus D1-, D2-, Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne die effektivste Sättigung viraler Bindungsstellen (164). Die Art und Weise wie CAR bzw. CAR-D1/D2 mit dem Virus interagierten unterschied sich hierbei nicht voneinander. Konsistent mit diesen Beobachtungen besaßen CAR und CAR-D1/D2 eine vergleichsweise stärkere virusinhibitorische Wirkung im Plaque-Assay mit HeLa-Zellen als die alleinige CAR-D1-Domäne (164). Diese Erkenntnisse legen eine zusätzliche Funktion der CAR-D2-Domäne bzw. proximaler Rezeptoranteile nahe, welche auf ligandeninduzierter Veränderungen der Tertiärstruktur des Virusrezeptors und sterischen Wechselwirkungen zwischen benachbarten C-terminalen Rezeptoranteilen der bivalent bindenden CAR-Moleküle basieren könnte. Hieraus ergäbe sich eine sekundäre Stabilisierung des Virus-Rezeptor-Komplexes. So zeigten kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen, dass nach erfolgter Virus-Rezeptorinteraktion eine Achsabweichung des c-terminalen Anteils der CAR-D1-Domäne von ca. 125° vorliegt, welche auf eine bindungsinduzierte Änderung der Tertiärstruktur des CAR hinweist (164). Das CLSP-Fc-Molekül besitzt lediglich drei zur CAR-D1-Domäne homologe IgV-Domänen. Eine vom ursprünglichen Rezeptormuster abweichende Tertiärstruktur des CLSP-Fc ohne D2-Domänen-ähnlichen Komponente könnte somit bindungsrelevanten Einfluss haben und die Affinität des LRA zur Zielstruktur deutlich herabsetzen. He *et al.* wandten jedoch bei ihren

elektronenmikroskopischen Strukturanalysen der CVB-CAR-Bindungskomplexe unterschiedliche Expressionsverfahren für die entsprechenden Testrezeptoren an, wodurch eine Modifikation der bindungssensiblen N-terminalen D1-Domäne und daraus resultierend eine Einflussnahme auf das beobachtete Bindungsverhalten nicht ausgeschlossen werden konnte (164).

Die antivirale Wirküberlegenheit des sCAR-Fc gegenüber der des CLSP-Fc könnte darüber hinaus auf dessen Eigenschaft beruhen, effektiver mit den Viruspartikeln um die Bindung zu membranständigen CAR-Proteinen zu konkurrieren. So zeigten lösliche Isoformen des CAR die Fähigkeit mit der extrazellulären D1-Domäne des humanen CAR zu interagieren (135). Hierbei wies eine CAR-Isoform (CAR 2/7), welche lediglich in den ersten 70 AS mit der D1-Domäne des humanen CAR übereinstimmte, die Eigenschaft auf, zwar nicht CVB3-Partikel binden zu können, wohl aber eine Bindungsfähigkeit zur CAR-D1-Domäne aufzuweisen. Auch HeLa-Zellen, die mit der nicht-virusbindenden Variante CAR 2/7 transfiziert wurden, zeigten einen, wenn auch im Vergleich zu anderen virusbindenden Isoformen (CAR 3/7, CAR 4/7) abgeschwächten, Schutz vor CVB3-Infektionen (135). Diese Beobachtung legt nahe, dass ähnlich der physiologischen CAR-CAR-Interaktion, welche als Homodimerbildung über die D1-Domänen membranständiger CAR-Moleküle im Rahmen von Zell-Zell-Kontakten beschrieben ist (174, 175), eine CAR-LRA-Interaktion ein zusätzlicher antiviraler Wirkmechanismus löslicher CAR-Proteine sein könnte. Hierbei wäre aufgrund der gesamtstrukturellen Abweichung des CLSP-Fc sowie der teils abweichenden AS-Sequenz der IgV1-Domäne des CLSP-Fc zur D1-Domäne des sCAR-Fc bzw. zur D1-Domäne des membranständigen CAR (s. Abb. 4.3) eine daraus resultierende Wirküberlegenheit des sCAR-Fc zu postulieren.

CAR-D1	28	E E M I E K A K G E T A Y L P C K F T L S P	E D Q	G P L	D I E W L I S			
CLSP-IgV1		E Q T I Q E V Q G E T V H L P C M F T L S P	E D Q	G P L	D I E W L R S			
CAR-D1	63	P A D N Q K V N Q	V I I	L Y	S G D K I	Y D D	Y Y	P D L K G R V H F T S
CLSP-IgV1		G P N N E A M D H	V I I	L Y	A V D K I	Y S D	F Y	Q D M R G R V N F T S
CAR-D1	98	N D L K S G D A S I N V T N L Q L S D I G T Y Q C	K V	K K	A P	G V A N		
CLSP-IgV1		N G I T S G E A S I K I R D V Q P A D S G T Y L C	K V	K T	A P	G V A K		
CAR-D1	133	K K I H L V V						
CLSP-IgV1		T T V Q L T V						

Abb. 4.3: CAR-CAR-Interaktion - Sequenzvergleich CAR-D1 mit CLSP-IgV1

Die mit grün markierten AS-Reste zeigen die bei der Homodimerbildung des humanen CAR über die D1-Domänen involvierten Sequenzbereiche. Mit gelb markierte AS-Reste der vergleichend dargestellten IgV1-Domäne des CLSP weisen auf bindungsrelevante Sequenzabweichungen hin. [nach Coyne CB *et al.*, 2005; (177)]

Nichtsdestotrotz wies auch das CLSP insbesondere bei seiner transgenen Expression in Zellkulturen eine ausgeprägte Bindungsfähigkeit zu Zelloberflächenstrukturen auf (199).

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse bezüglich des antiviralen Wirkpotentials des CLSP-Fc bei CVB3-Infektionen lassen sich sehr wahrscheinlich auch auf andere CVB-Serotypen (CVB1 bis 6) übertragen. Aufgrund struktureller Übereinstimmungen der verschiedenen CVB-Serotypen in CAR-bindungsrelevanten Bereichen ist daher auch für diese keine antivirale Wirkung des CLSP-Fc zu erwarten (245, 246).

Zusammenfassend betrachtet stellte sich in den hier durchgeführten CVB-Inhibitionsexperimenten für das CLSP-Fc keine antioxsackievirale Wirkung dar. Trotz ausgeprägter Sequenzhomologie der IgV1-Domäne des CLSP-Fc zur virusbindenden D1-Domäne des CAR/sCAR-Fc (> 50 % AS-Übereinstimmung) vermochte das neuartige Fusionsprotein mit den hier eingesetzten Proteinmaximalkonzentrationen nicht die Zielzellinfektion zu reduzieren. Punktuelle Sequenzabweichungen im Bereich bindungsrelevanter Regionen der IgV1-Domäne sowie differente Strukturmerkmale des CLSP-Fc zum originären Rezeptor könnten die im Vergleich zum sCAR-Fc fehlende Fähigkeit zur viralen A-Partikelinduktion erklären und sowohl für eine herabgesetzte oder fehlende Virus-Rezeptoraffinität wie auch für eine verminderte Bindungsfähigkeit zu viralen Zielzelloberflächenstrukturen verantwortlich sein.

5 Zusammenfassung

Coxsackie- und Adenoviren sind als humanpathogene Erreger Verursacher zahlreicher, meist harmlos verlaufender Infektionskrankheiten beim Menschen. Unter gewissen Umständen allerdings kann die lokale Immunabwehr des Wirts überwunden werden und eine lebensbedrohliche Erregerausbreitung mit gravierenden Organmanifestationen folgen (143, 145). So werden beide Virusgruppen u. a. mit einer Reihe kardialer Erkrankungen in Verbindung gebracht (2, 3). Allen voran das zur Gattung der Enteroviren gehörende Coxsackievirus B3 (CVB3) steht nachweislich sowohl im kausalen Zusammenhang mit akuten und chronischen Myokarditisverläufen als auch der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) (5, 32, 56, 57). Auch Adenoviren (Ad) konnte eine Assoziation mit Herzmuskelinfektionen und DCM nachgewiesen werden (4, 5, 60). Die als Inflammation des Herzmuskels definierte Myokarditis kann zu einer schweren, teils irreversiblen Schädigung der kontraktiven Myokardstrukturen mit terminaler Herzinsuffizienz führen.

Antivirale Therapieansätze, wie sie momentan in der Erprobung sind, bieten vielversprechende Möglichkeiten das zumeist symptomatisch orientierte, klinische Behandlungsrepertoire zu erweitern und damit eine dringend erforderliche, gezielt-antivirale Therapieoption zu liefern. Molekulare und biopharmakologische Verfahren besitzen dahingehend ein großes Potential, da sie gezielt gegen definierte molekulare Strukturen vorgehen und somit die Spezifität und Effizienz der Behandlung bedeutend erhöhen können. Entsprechende Ansätze konzentrieren sich neben dem Einsatz der posttranskriptionell wirksamen Genregulation mittels RNA-Interferenz (122, 123) auf die transgene Expression von löslichen Rezeptorproteinen (85). Der Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR) fungiert in seiner membranständigen Form als wichtiger primärer Virusbindungs- bzw. Internalisierungsfaktor für zahlreiche humanpathogene Adenoviren bzw. Gruppe-B-Coxsackieviren (162, 163). In seiner löslichen (solublen) Form (sCAR) besitzt CAR ein ausgeprägt antivirales Wirkpotential. Durch sterische Inhibierung der viralen Rezeptorbindungsstellen und zusätzlich im Falle der Coxsackieviren durch A-Partikelformation kann er als lösliches Rezeptoranalogen (LRA) die Infektiosität der Viruspartikel herabsetzen bzw. gänzlich ausschalten (135, 136, 195). Eine weitere Verbesserung der antiviralen Wirksamkeit konnte durch Kopplung mit der Fc-Domäne des humanen IgG1 (sCAR-Fc) erreicht werden, welche zu einer Steigerung der Löslichkeitseigenschaften und Verlängerung der Halbwertszeit des Fusionsproteins führte (196).

Ein in entscheidenden Teilen der Sequenz und Struktur dem sCAR ähnelndes, lösliches Protein, das CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP), wurde unlängst entdeckt und charakterisiert (199). Dem scheinbar nur in Mäusen und Ratten vorkommenden CLSP konnte bereits in ersten Experimenten die Bindungsfähigkeit zu Adenoviren und eine daraus resultierende antivirale Wirksamkeit nachgewiesen werden (199).

In dieser Arbeit wurde ein neues Fusionsprotein, das Fc-Teil-gekoppelte CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP-Fc) konstruiert und in einen Doxycyclin-regulierbaren Plasmidvektor (pAdG12) kloniert. Das antivirale Potential des CLSP-Fc konnte erstmalig im Hinblick auf CVB- und Adenovirusinfektionen überprüft und vergleichende Daten mit dem bereits etablierten antiviral-wirksamen sCAR-Fc erhoben werden.

Hierzu wurden beide rekombinanten Proteine im gleichen Expressionssystem (pAdG12-CLSP-Fc bzw. pAdG12-sCAR-Fc) eingesetzt und zunächst deren Induktor-abhängige Regulierbarkeit sowie das transgene Proteinexpressionsprofil vergleichend untersucht. Dabei zeigte sich nach Transfektion von 293-T-Zellen für beide Fusionsproteine eine effektive, Doxycyclin-abhängige Expression und Sekretion in den Zellkulturüberstand. Bei den durchgeführten *In-vitro*-Expressionsanalysen konnte die in Abwesenheit des Induktors gemessene Basalaktivität (CLSP-Fc: 38 +/- 1 ng/ml; sCAR-Fc: 50 +/- 1 ng/ml) durch Doxycyclinzugabe bis auf das 100-fache (CLSP-Fc) bzw. 60-fach (sCAR-Fc) gesteigert werden. Der CLSP-Fc-produzierende Plasmidvektor vermochte hierbei eine signifikant höhere Proteinmenge zu erzeugen.

Mit den fusionsproteinhaltigen Zellkulturüberständen wurden *in vitro* CVB3- und Ad5-Inhibitions-Experimente durchgeführt. Hierbei zeigte sich in Dosis-Wirkungs-Experimenten eine Zunahme des antiadenoviralen Effekts in Abhängigkeit von der eingesetzten CLSP-Fc-Konzentration. Während unter den verwendeten Proteinhöchstmengen von 1000 ng/ml mit dem CLSP-Fc eine maximale Reduktion der Viruspartikelaufnahme in HeLa-Zellen von ca. 20 % (19,5 % +/- 5,4 %) erreicht wurde, war beim analog eingesetzten sCAR-Fc der inhibitorische Maximaleffekt mit ca. 40 % (40,7 % +/- 7,6 %) deutlich höher. In den zur Testung des antioxsackieviralen Potentials durchgeführten Plaque-Assays mit HeLa-Zellen zeigte sich, dass selbst bei verhältnismäßig geringen Viruspartikelmengen (0,005/0,001 moi) und maximalen CLSP-Fc-Konzentrationen (3500 ng/ml) für das neuartige Fusionsprotein keine antioxsackievirale Wirkung nachgewiesen werden konnte. Hingegen führten sCAR-Fc-haltige Zellkulturüberstände in allen Ansätzen zu einer vollständigen Inhibierung der CVB3-Replikation.

Trotz ausgeprägter Sequenzhomologie der IgV1-Domäne des CLSP-Fc zur virusbindenden D1-Domäne des CAR/sCAR-Fc scheinen punktuelle Sequenzabweichungen im Bereich

bindungsrelevanter Regionen der IgV1-Domäne sowie differente Strukturmerkmale des CLSP-Fc zum originären Rezeptor das beobachtete Wirkverhalten zu erklären. Somit ist zu konstatieren, dass aller Voraussicht nach das CLSP-Fc bei vergleichsweise geringer antiadenoviraler Wirkpotenz und fehlender anticoxsackieviraler Wirksamkeit gegenüber dem etablierten Rezeptoranalogen sCAR-Fc als zukünftig einsetzbares Pharmakon keinen Vorteil erbringen würde. Eine mögliche therapeutische Weiterentwicklung im untersuchten Kontext stellt sich somit als nicht erforderlich heraus. Auch wenn sich die Erwartung in die Entdeckung und Entwicklung eines neuen, perspektivreichen LRAs zur Behandlung von Cocksackievirus- und Adenovirusinfektionen nicht erfüllen ließ, so schließt diese Arbeit dennoch notwendigerweise eine Lücke auf der systematischen Suche nach neuen antiviral-wirksamen Molekülstrukturen.

Abstract

Coxsackie- and adenoviruses cause numerous, for the most part harmless illnesses in humans. However, under certain conditions the local immune defenses of the host can be overwhelmed and a life-threatening increase of the pathogen can occur with grave organ manifestations (143, 145). Both virus groups are associated with a number of cardiac illnesses, among others (2, 3). Above all, the coxsackievirus B3 (CVB3), which belongs to the genus of enteroviruses, has been shown to play a causal role not only in acute and chronic myocardial disorders, but also in dilated cardiomyopathy (DCM) (5, 32, 56, 57). Adenoviruses (Ad), as well, have been shown to be associated with cardiac muscle infections and DCM (4, 5, 60). Myocarditis, which has been defined as an inflammation of the heart muscle, can result in a serious, partially irreversible damage of the contractile myocardial structures, leading to terminal cardiac insufficiency.

Current antiviral therapeutic approaches offer attractive opportunities for extending the mainly symptom-oriented clinical treatment repertoire. Molecular and bio-pharmacological procedures have a great potential in this field since they target defined molecular structures and thus can significantly increase the specificity and efficiency of treatment. Corresponding approaches are focused, on the one hand, on post-transcriptionally effective gene regulation by means of RNA interference (122, 123) and, on the other, on the transgene expression of soluble receptor proteins (85). In its membrane-bound form, the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is an important primary virus binding factor and/or internalization factor for numerous human pathological adenoviruses and group B coxsackieviruses (162, 163). In its soluble form (sCAR) CAR has a pronounced antiviral potential: by means of steric inhibition of the viral receptor binding sites and - in addition in the case of the coxsackieviruses - by means of A-particle formation, it is able, as a soluble receptor analog to reduce the infectivity of the virus particles or even overcome it completely (135, 136, 195). A further improvement of antiviral effectiveness has been attained by coupling with the Fc domain of human IgG1 (sCAR-Fc), which enhanced the solubility properties and extended the half-life of the fusion protein (196).

Recently, a soluble protein was discovered and characterized which resembles sCAR in decisive regions of its sequence and structure, the CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP) (199). CLSP, which apparently is present only in mice and rats, has been shown in first experiments to have a binding capacity for adenoviruses and, as a result, to have an antiviral effectiveness (199).

In the present investigation a new fusion protein was created, the Fc-coupled CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP-Fc), and cloned into a doxycycline-regulatable plasmid vector (pAdG12). For the

first time the antiviral potential of CLSP-Fc was analyzed with respect to CVB and adenovirus infections, and comparative data obtained for the already established antiviral sCAR-Fc. To this end the two recombinant proteins (CLSP-Fc and sCAR-Fc) were employed in the same expression system and their inductor-dependant regulatory capability and their transgene protein expression profiles compared. After transfection of 293-T-cells both fusion proteins showed an effective doxycycline-dependant expression and secretion in the cell culture supernatant. In the *in vitro* expression analyses the background activity measured in the absence of the inductor (CLSP-Fc: 38 +/- 1 ng/ml; sCAR-Fc: 50 +/- 1 ng/ml) was increased by a factor of 100 for CLSP-Fc and 60 for sCAR-Fc on the administration of doxycycline. Here, the CLSP-Fc producing plasmid vector generated a significantly greater amount of protein.

The following CVB3 and Ad5 inhibition experiments were carried out with the cell culture supernatants containing the fusion protein. Dose response experiments showed that there was an increase in the anti-adenoviral effect dependent on the concentration of the CLSP-Fc. Given the highest protein amounts of 1000 ng/ml, with CLSP-Fc a maximum reduction of virus particle uptake in HeLa cells of about 20 % (19.5 % +/- 5.4 %) was achieved, whereas with analogously employed sCAR-Fc the maximum inhibitory effect was clearly higher at about 40 % (40.7 % +/- 7.6 %). In the plaque assays conducted with HeLa cells for testing the anti-coxsackievirus potential it was determined that even with comparatively low concentrations of virus particles (0.005/0.001 moi) and maximal CLSP-Fc concentrations (3500 ng/ml) the new fusion protein showed no anti-coxsackievirus effect. On the other hand, cell culture supernatant containing sCAR-Fc resulted in all approaches in a complete inhibition of CVB3 replication.

Despite a pronounced sequence homology of the IgV1 domain of the CLSP-Fc with the virus-binding D1 domain of the CAR/sCAR-Fc, it seems that the observed lack of effectiveness can be explained by local sequence divergences in binding-relevant regions of the IgV1 domain, as well as by different structural properties between the CLSP-Fc and the original receptor. This leads to the conclusion that in all probability, given the comparatively low anti-adenovirus effectivity and the lack of anti-coxsackie virus effectivity, CLSP-Fc in comparison with the established receptor analog sCAR-Fc offers no advantage as a pharmacological substance. A possible further therapeutic development within the context investigated here is not required. While the hope of discovering and developing a new promising for the treatment of coxsackievirus and adenovirus infections has not been fulfilled, the present investigation has nonetheless performed necessary work in closing a gap in the systematic search for new effective anti-viral molecular structures.

6 Literaturverzeichnis

1. Blauwet LA, Cooper LT. Myocarditis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2010; 52:274-88.
2. Liu PP, Schultheiss HP. Myocarditis. In: Libby P, editor. *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine.* 8th ed. Philadelphia (PA): WB Saunders Co., 2008: 1775-92.
3. Maisch B, Alter P, Karatolius K, Ruppert V, Pankuweit S. The heart in cases of viral, bacterial and parasitic infections. *Internist* 2007; 48:255-67.
4. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, *et al.* Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42:466-72.
5. Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom P, *et al.* Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiol* 1999; 54:83-88.
6. Kühl U, Schultheiss HP. Viral myocarditis: diagnosis, aetiology and management. *Drugs* 2009; 69:1287-302.
7. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, *et al.* The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50:1914-31.
8. Cooper LT Jr. Myocarditis. *N Engl J Med.* 2009; 360:1526-38.
9. Abdel-Aty H, Boye P, Zagrosek A, *et al.* Diagnostic performance of cardiovascular magnetic resonance in patients with suspected acute myocarditis: comparison of different approaches. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45:1815-22.
10. Friedrich MG, Strohm O, Schulz-Menger J, Marciniak H, Luft FC, Dietz R. Contrast media enhanced magnetic resonance imaging visualizes myocardial changes in the course of viral myocarditis. *Circulation* 1998; 97:1802-9.
11. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation* 2006; 113:876-90.
12. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999; 99:1091-100.
13. Schultheiss HP, Kühl U. State of diagnostics and therapy of inflammatory cardiomyopathie. *Internist* 2008; 49:7-16.
14. Elliot P. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2000; 84:106-112.

15. Kuk A, Ahn E, Soor GS, Butany J. Dilated cardiomyopathy: a review. *J Clin Pathol.* 2009; 62:219-25.
16. Wakafuji S, Okada R. Twenty year autopsy statistics of myocarditis incidence in Japan. *Jpn Circ J* 1986; 50:1280-93.
17. Carniel E, Sinagra G, Bussani R, *et al.* Fatal myocarditis: morphologic and clinical features. *Ital Heart J* 2004; 5:702-706.
18. Kyto V, Saraste A, Voipio-Pulkki LM, *et al.* Incidence of fatal myocarditis: a population-based study in Finland. *Am J Epidemiol* 2007; 165:570-574.
19. Gravanis MB, Sternby NH: Incidence of myocarditis. A 10-year autopsy study from Malmo, Sweden. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115:390-392.
20. Doolan A, Langlois N, Semsarian C: Causes of sudden cardiac death in young Australians. *Med J Aust* 2004; 180:110-112.
21. Gravanis MG, Sternby NH. Incidence of myocarditis. *Arch Pathol Lab Med* 1991;15:390-2.
22. Karjalainen J, Heikkilä J. Incidence of three presentations of acute myocarditis in young men in military service: a 20-year experience. *Eur Heart J* 1999; 20:1120-5.
23. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000; 343:1388-98.
24. Drory Y, Turetz Y, Hiss Y, *et al.* Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. *Am J Cardiol* 1991; 68:1388–1392.
25. Phillips M, Robinowitz M, Higgins JR, Boran KJ, Reed T, Virmani R. Sudden cardiac death in Air Force recruits. A 20-year review. *JAMA* 1986; 256:2696–2699.
26. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non ischaemic causes of sudden cardiac death: a UK experience. *Heart* 2005; 92:316-20.
27. Maron BJ. Sudden death in young athletes. *N Engl J Med.* 2003; 349:1064-75.
28. Rasten-Almqvist P, Eksborg S, Rajis J. Myokarditis and sudden infant death syndrome. *Apmis* 2002; 110:469-480.
29. Nugent AW, Daubeney PE, Chondros P, *et al.* The epidemiology of childhood cardiomyopathy in Australia. *N Engl J Med* 2003; 348:1639-1646.
30. Weber MA, Ashworth MT, Risdon RA, *et al.* Clinicopathological features of paediatric deaths due to myocarditis: an autopsy series. *Arch Dis Child* 2008; 93:594-598.
31. Kereiakes DJ, Parmley WW. Myocarditis and cardiomyopathy. *Am Heart J* 1984; 108:1318-26.

32. Pauschinger M, Dörner A, Kühl U, *et al.* Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* 1999; 99:889-95.
33. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, *et al.* High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005; 111:887-93.
34. Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, *et al.* Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005; 112:1965–1970.
35. Pankuweit S, Ruppert V, Eckardt H, *et al.* Pathophysiology and aetiological diagnosis of inflammatory diseases with a special focus on parvovirus b19. *J Vet Med B* 2005; 52:344-7.
36. Baboonian C, Treasure T. Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart* 1997; 78:539–543.
37. D`Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, *et al.* The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart*. 2001; 85:499-504.
38. Olbrich HG. [Epidemiology-etiology of dilated cardiomyopathy]. *Z Kardiol*. 2001; 90 Suppl 1:2-9.
39. Strauer BE, Kandolf R, Mall G, *et al.* [Update 2001. Myocarditis--cardiomyopathy]. *Med. Klin. (Munich)* 2001; 96:608-625.
40. Schultheiss HP, Noutsias M, Kühl U, *et al.* Cardiomyopathies. I: classification of cardiomyopathies--dilated cardiomyopathy. *Internist* 2005; 46:1245-56.
41. McCarthy RE 3rd, Boehmer JP, Hruban RH, *et al.* Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med*. 2000; 342:690-5.
42. Aoyama N, Izumi T, Hiramori K, *et al.* National survey of fulminant myocarditis in Japan: therapeutic guidelines and long-term prognosis of using percutaneous cardiopulmonary support for fulminant myocarditis (special report from a scientific committee). *Circ J*. 2002; 66:133-44.
43. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, *et al.* A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J* 2007; 28:1326-33.
44. Magnani JW, Danik HJ, Dec GW Jr., DiSalvo TG. Survival in biopsy-proven myocarditis: a long-term retrospective analysis of the histopathologic, clinical, and hemodynamic predictors. *Am Heart J*. 2006; 151:463-70.

45. Dec GW Jr, Palacios IF, Fallon JT, *et al.* Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *N Engl J Med* 1985; 312:885-90.
46. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, *et al.* A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. *N Engl J Med* 1995; 333:269-75.
47. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, *et al.* Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118:639-48.
48. Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura, *et al.* Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *A J Am Coll Cardiol.* 2000; 36:1920-6.
49. Felker GM, Jaeger CJ, Klodas E, *et al.* Myocarditis and long-term survival in peripartum cardiomyopathy. *Am. Heart J* 2000; 140:785-791.
50. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, *et al.* Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 89:2582-2589.
51. Michels VV, Driscoll DJ, Miller FA, *et al.* Progression of familial and non-familial dilated cardiomyopathy: long term follow up. *Heart.* 2003; 89:757-61.
52. Matsumori A. Hepatitis C virus and cardiomyopathy. *Herz* 2000; 25:249-254.
53. Sudano I, Spieker LE, Noll G, Corti R, Weber R, Luscher TF. Cardiovascular disease in HIV infection. *Am Heart J* 2006; 151:1147-55.
54. Schonian U, Crombach M, Maser S, Maisch B. Cytomegalovirus-associated heart muscle disease. *Eur Heart J* 1995; 16(Suppl O):46-9.
55. Moulik M, Breinhold JP, Dreyer WJ, *et al.* Viral epidemiologic shift in inflammatory heart disease: the increasing involvement of parvovirus B19 in the myocardium of pediatric cardiac transplant patients. *J Heart Lung Transplant.* 2010; 29:739-46.
56. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, Archard LC. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1986; 1:1120-1123.
57. Jin O, Sole MJ, Butany JW, *et al.* Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation* 1990; 82:8-16.
58. Weiss LM, Liu XF, Chang KL, Billingham ME. Detection of enteroviral RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy and other human cardiac tissues. *J Clin Invest* 1992; 90:156-9.
59. Grasso M, Arbustini E, Silini E, *et al.* Search for Coxsackievirus B3 RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Am J Cardiol.* 1992; 69:658-664.

60. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, *et al.* Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1999; 99:1348-54.
61. Martin AB, Webber S, Fricker FJ, *et al.* Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation* 1994; 90:330-9.
62. Andreoletti L, Venteo L, Douche-Aourik F, *et al.* Active Coxsackieviral B infection is associated with disruption of dystrophin in endomyocardial tissue of patients who died suddenly of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:2207-14.
63. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, *et al.* Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* 1999; 5:320-6.
64. Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Kühl U, Rauch U, Seeberg B, Schultheiss HP. Differential aspects of endothelial function of the coronary microcirculation considering myocardial virus persistence, endothelial activation, and myocardial leukocyte infiltrates. *Circulation* 2005; 111:1784-91.
65. Tschöpe C, Bock CT, Kasner M, *et al.* High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation*. 2005; 111:879-86.
66. Maekawa Y, Ouzounian M, Opavsky MA, Liu PP. Connecting the missing link between dilated cardiomyopathy and viral myocarditis: virus, cytoskeleton, and innate immunity. *Circulation* 2007; 115:5-8.
67. Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res*. 2003; 60:5-10.
68. McManus BM, Chow LH, Wilson JE, *et al.* Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68:159-169.
69. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994; 72:561-6.
70. Seko Y, Tsuchimochi H, Nakamura T, *et al.* Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3. *Circ Res* 1990; 67:360-7.
71. Ayach B, Fuse K, Martino T, Liu P. Dissecting mechanisms of innate and acquired immunity in myocarditis. *Curr Opin Cardiol* 2003; 18:175-81.
72. Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, Rose NR. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun*. 2001; 16:175-86.

73. Andreoletti L, Bourlet T, Moukassa D, *et al.* Enteroviruses can persist with or without active viral replication in cardiac tissue of patients with end-stage ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2000; 182:1222-7.
74. Fuse K, Chan G, Liu Y, *et al.* Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of coxsackievirus B3 induced myocarditis, and influences type I interferon production. *Circulation* 2005; 112:2276–2285.
75. Lawson CM. Evidence for mimicry by viral antigens in animal models of autoimmune disease including myocarditis. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:552–560.
76. Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 2002; 4:411-417.
77. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* 1996; 94:2930–2937.
78. Lee GH, Badorff C, Knowlton KU. Dissociation of sarcoglycans and the dystrophin carboxyl terminus from the sarcolemma in enteroviral cardiomyopathy. *Circ Res* 2000; 87:489–495.
79. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, *et al.* Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99:2750-2756.
80. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J, Schwimmbeck PL, Noutsias M, Schultheiss HP. [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz* 2002; 27:677-682.
81. Heymans S. Inflammation and cardiac remodeling during viral myocarditis. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006; 55:197–218.
82. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Schultheiss HP. Myocardial remodeling in viral heart disease: possible interactions between inflammatory mediators and MMP-TIMP system. *Heart Fail Rev.* 2004; 9:21-31.
83. Fechner H, Pinkert S, Geisler A, Poller W, Kurreck J. Pharmacological and biological antiviral therapeutics for cardiac coxsackievirus infections. *Molecules* 2011; 16:8475-503.
84. Fechner H, Sipo I, Westermann D, *et al.* Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. *J Mol Med.* 2008; 86:987-97.
85. Pinkert S, Westermann D, Wang X, *et al.* Prevention of cardiac dysfunction in acute coxsackievirus B3 cardiomyopathy by inducible expression of a soluble coxsackievirus adenovirus receptor. *Circulation.* 2009; 120:2358-66.
86. Hunt SA, Baker DW, Chin MH, *et al.* ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice

- Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol*. 2001; 38:2101-13.
87. Chapman NM, Kim KS. Persistent coxsackievirus infection: Enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2008, 323:275-292.
 88. Parrillo JE, Cunnion RE, Epstein SE, *et al*. A prospective, randomized, controlled trial of prednisone for dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1989; 321:1061-8.
 89. McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, *et al*. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2001; 103:2254-9.
 90. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003; 107:857-63.
 91. Frustaci A. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy. *ESC Congress; 2008 Aug 30-Sep 3; Munich. Eur Heart J* 2008.
 92. Maisch B, Schönian U, Hengstenberg C, *et al*. Immunosuppressive treatment in autoreactive myocarditis--results from a controlled trial. *Postgrad Med J*. 1994; 70 Suppl. 1: S29-34.
 93. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, *et al*. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation* 2001; 104:39-45.
 94. Karupiah G. Type 1 and type 2 cytokines in antiviral defense. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998; 63:105-9.
 95. Heim A, Canu A, Kirschner P, *et al*. Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackievirus B3-infected carrier cultures of human myocardial fibroblasts. *J Infect Dis*. 1992; 166:958-965.
 96. Matsumori A, Tomioka N, Kawai C. Protective effect of recombinant alpha interferon on coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Am Heart J*. 1988; 115:1229-1232.
 97. Noah DL, Blum MA, Sherry B. Interferon regulatory factor 3 is required for viral induction of beta interferon in primary cardiac myocyte cultures. *J Virol*. 1999; 73:10208-13.
 98. Stewart MJ, Smoak K, Blum MA, Sherry B. Basal and reovirus-induced beta interferon (IFN-beta) and IFN-beta-stimulated gene expression are cell type specific in the cardiac protective response. *J Virol*. 2005; 79:2979-87.
 99. Wessely R, Klingel K, Knowlton KU, Kandolf R. Cardiospecific infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication. *Circulation*. 2001; 103:756-61.

100. Wang YX, da Cunha V, Vincelette J, *et al.* Antiviral and myocyte protective effects of murine interferon-beta and $-\alpha_2$ in coxsackievirus B3-induced myocarditis and epicarditis in Balb/c mice. *Am J Physiol* 2007; 293:69-76.
101. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, *et al.* Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2003; 107:2793-8.
102. Schultheiss HP, Piper C, Sowade K, *et al.* The effect of subcutaneous treatment with interferon-beta-1b over 24 weeks on safety, virus elimination and clinical outcome in patients with chronic viral cardiomyopathy. *Circulation* 2008; 118:3352.
103. Stille-Siegener M, Heim A, Figulla HR. Subclassification of dilated cardiomyopathy and interferon treatment. *Eur Heart J.* 1995; 16 Suppl O:147-9.
104. Mirić M, Misković A, Vasiljević JD, Keserović N, Pesić M. Interferon and thymic hormones in the therapy of human myocarditis and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 1995; 16 Suppl O:150-2.
105. Heim A, Pfetzing U, Muller G, Grumbach IM. Antiviral activity of WIN 54954 in coxsackievirus B2 carrier state infected human myocardial fibroblasts. *Antivir. Res.* 1998; 37:47-56.
106. Woods MG, Diana GD, Rogge MC, Otto MJ, Dutko FJ, McKinlay MA. In vitro and in vivo activities of WIN 54954, a new broad-spectrum antipicornavirus drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33:2069-2074.
107. See DM, Tilles JG. Treatment of Coxsackievirus A9 myocarditis in mice with WIN 54954. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36:425-428.
108. See DM, Tilles JG. Efficacy of a polyvalent inactivated-virus vaccine in protecting mice from infection with clinical strains of group B coxsackieviruses. *Scand. J. Infect. Dis.* 1994; 26:739-747.
109. Kyto V, Saraste A, Fohlman J, *at al.* Cardiomyocyte apoptosis after antiviral WIN 54954 treatment in murine coxsackievirus B3 myocarditis. *Scand. Cardiovasc. J.* 2002; 36:187-92.
110. Pevear DC, Tull TM, Seipel ME, Groarke JM. Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:2109-15.
111. De Palma, AM Vliegen, I de Clercq E, Neyts J. Selective inhibitors of picornavirus replication. *Med. Res. Rev.* 2008; 28:823-84.
112. De Palma AM, Heggermont W, Leyssen P, *et al.* Anti-enterovirus activity and structure-activity relationship of a series of 1H,3H-thiazolo[3,4-a]benzimidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 353:628-632.
113. Saura M, Zaragoza C, McMillan A, *et al.* An antiviral mechanism of nitric oxide: Inhibition of a viral protease. *Immunity* 1999; 10:21-28.

114. Badorff C, Fichtlscherer B, Rhoads RE, *et al.* Nitric oxide inhibits dystrophin proteolysis by coxsackieviral protease 2A through S-nitrosylation: A protective mechanism against enteroviral cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 102:2276-81.
115. Luo H, Zhang J, Cheung C, Suarez A, McManus BM, Yang D. Proteasome inhibition reduces coxsackievirus B3 replication in murine cardiomyocytes. *Am. J. Pathol.* 2003; 163:381-385.
116. Si X, McManus BM, Zhang J, *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate reduces coxsackievirus B3 replication through inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Virol.* 2005; 79:8014-23.
117. Si X, Wang Y, Wong J, Zhang J, McManus B.M, Luo H. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system by curcumin suppresses coxsackievirus B3 replication. *J. Virol.* 2007; 81:3142-50.
118. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270:1628-44.
119. Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B. RNA interference against viruses: Strike and counterstrike. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25:1435-43.
120. Mescalchin A, Restle T. Oligomeric nucleic acids as antivirals. *Molecules* 2011; 16:1271-96.
121. DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107:8800-805.
122. Eckstein A, Grössl T, Geisler A, *et al.* Inhibition of adenovirus infections by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions. *Antiviral Res.* 2010; 88: 86-94.
123. Schubert S, Grunert HP, Zeichhardt H, Werk D, Erdmann VA, Kurreck J. Maintaining inhibition: siRNA double expression vectors against coxsackieviral RNAs. *J. Mol. Biol.* 2005; 346:457-65.
124. Merl S, Michaelis C, Jaschke B, Vorpahl M, Seidl S, Wessely R. Targeting 2A protease by RNA interference attenuates coxsackieviral cytopathogenicity and promotes survival in highly susceptible mice. *Circulation* 2005; 111:1583-92.
125. Kim JY, Chung SK, Hwang HY, *et al.* Expression of short hairpin RNAs against the coxsackievirus B3 exerts potential antiviral effects in Cos-7 cells and in mice. *Virus Res.* 2007; 125:9-13.
126. Lee HS, Ahn J, Jee Y, *et al.* Universal and mutation-resistant anti-enteroviral activity: Potency of small interfering RNA complementary to the conserved cis-acting replication element within the enterovirus coding region. *J. Gen. Virol.* 2007; 88:2003-12.

127. Kim YJ, Ahn J, Jeung SY, *et al.* 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* 2008; 36:141-46.
128. Werk D, Schubert S, Lindig V, *et al.* Developing an effective RNA interference strategy against a plus-strand RNA virus: Silencing of coxsackievirus B3 and its cognate coxsackievirus-adenovirus receptor. *Biol. Chem.* 2005; 386:857-63.
129. Fechner H, Pinkert S, Wang X, *et al.* Coxsackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited by vector-mediated RNA interference targeting their common receptor. *Gene Ther.* 2007; 14:960-71.
130. Asher DR, Cerny AM, Weiler SR, *et al.* Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. *Genesis* 2005; 42:77-85.
131. Lisewski U, Shi Y, Wrackmeyer U, *et al.* The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *J. Exp. Med.* 2008; 205:2369-79.
132. Lim BK, Xiong D, Dorner A, *et al.* Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart. *J. Clin. Invest.* 2008; 118:2758-70.
133. Pazirandeh A, Sultana T, Mirza M, *et al.* Multiple phenotypes in adult mice following inactivation of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (Car) gene. *PLoS One* 2011; 6(6):e20203.
134. Goodfellow IG, Evans DJ, Blom AM, *et al.* Inhibition of coxsackie B virus infection by soluble forms of its receptors: binding affinities, altered particle formation, and competition with cellular receptors. *J Virol* 2005; 79:12016-24.
135. Dörner A, Xiong D, Couch K, Yajima T, Knowlton KU. Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection. *J Biol Chem* 2004; 279:18497-503.
136. Milstone AM, Petrella J, Sanchez MD, Mahmud M, Whitbeck JC, Bergelson JM. 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.* 2005; 79:655-660.
137. Yanagawa B, Spiller OB, Choy J, *et al.* Coxsackievirus B3-associated myocardial pathology and viral load reduced by recombinant soluble human decay-accelerating factor in mice. *Lab. Invest.* 2003; 83:75-85.
138. Yanagawa B, Spiller OB, Proctor DG, *et al.* Soluble recombinant coxsackievirus and adenovirus receptor abrogates coxsackievirus b3-mediated pancreatitis and myocarditis in mice. *J. Infect. Dis.* 2004; 189:1431-39.
139. Lim BK, Choi JH, Nam JH, *et al.* Virus receptor trap neutralizes coxsackievirus in experimental murine viral myocarditis. *Cardiovasc. Res.* 2006; 71:517-526.

140. Van Linthout S, Savvatis K, Miteva K, *et al.* Mesenchymal stem cells improve murine acute coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Eur Heart J.* 2010; 32:2168-78.
141. Fricks CE, Hogle JM. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 1990; 64:1934-45.
142. Muckelbauer JK, Kremer M, Minor I, *et al.* The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure* 1995; 3:653-67.
143. Melnick JL. Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In *Fundamental Virology*; Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Eds.; Raven Press: New York, NY, USA, 1996; pp. 655-712.
144. Gonzalez-Mariscal L, Garay E, Lechuga S. Virus interaction with the apical junctional complex. *Front Biosci.* 2009; 14:731-68.
145. Lynch JP 3rd, Fishbein M, Echavarría M. Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011; 32:494-511.
146. Norrby E. The structural and functional diversity of adenovirus capsid components. *J. Gen. Virol.* 1969; 5:221-36.
147. Horwitz MS, Scharff MD, Maizel JV. Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly and morphogenesis of the virion. *Virology* 1969; 39:682-94.
148. Ruigrok RWH, Barge A, Albiges-Rizo C, Dayan S. Structure of adenovirus fiber. II. Morphology of single fibers. *J. Mol. Biol.* 1990; 215:589-96.
149. Chardonnet Y, Dales S. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. *Virology* 1970; 40:462-77.
150. Louis N, Fender P, Barge A, Kitts P, Chroboczek J. Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *J. Virol.* 1994; 68:4104-06.
151. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus taxonomy: Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press; San Diego: 2005.
152. Romero JR. Pediatric group B coxsackievirus infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 323:223-39.
153. Khetsuriani N, Lamonte A, Oberste MS, Pallansch M. Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983-2003. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2006; 25:889-93.
154. Davis D, Henslee PJ, Markesbery WR. Fatal adenovirus meningoencephalitis in a bone marrow transplant patient. *Ann. Neurol.* 1988; 23:385-89.

155. Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43:331-39.
156. Ljungman P, Gleaves CA, Meyers JD. Respiratory virus infection in immunocompromised patients. *Bone Marrow Transplant.* 1989; 4:35-40.
157. Shields AF, Hackman RC, Fife KH, Corey L, Meyers J D. Adenovirus infections in patients undergoing bone-marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1985; 312:529-533.
158. Echavarría M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21:704-15.
159. Ljungman P. Treatment of adenovirus infections in the immunocompromised host. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 23:583-88.
160. Hoffman JA, Shah AJ, Ross LA, Kapoor N. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2001; 7:388-94.
161. Arav-Boger R, Echavarría M, Forman M, Charache P, Persaud D. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000; 19:1097-1100.
162. Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 1998; 72:7909-15.
163. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275:1320-23.
164. He Y, Chipman PR, Howitt J, *et al.* Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nat. Struct. Biol.* 2001; 8:874-78.
165. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; 94:3352-56.
166. Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, *et al.* The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol.* 1998; 72:415-19.
167. Thoelen I, Magnusson C, Tagerud S, Polacek C, Lindberg M, Van Ranst M. Identification of alternative splice products encoded by the human coxsackie-adenovirus receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 287:216-22.
168. Petrella J, Cohen CJ, Gaetz J, Bergelson JM. A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus. *J. Virol.* 2002; 76:10503-506.
169. Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, *et al.* Human Coxsackie-Adenovirus Receptor Is Colocalized With Integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the Cardiomyocyte

- Sarcolemma and Upregulated in Dilated Cardiomyopathy: Implications for Cardiotropic Viral Infections. *Circulation* 2001. 104:275-80.
170. Bowles KR, Gibson J, Wu J, Shaffer LG, Towbin JA, Bowles NE. Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene. *Hum. Genet.* 1999; 105:354-59.
 171. van't Hof W, Crystal RG. Fatty acid modification of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *J. Virol.* 2002; 76:6382-86.
 172. Honda T, Saitoh H, Masuko M, *et al.* The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000; 77:19-28.
 173. Sinnreich M, Shaw CA, Pari G, Nalbantoglu J, Holland PC, Karpati G. Localization of coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR) in normal and regenerating human muscle. *Neuromuscul. Disord.* 2005; 15:541-48.
 174. van Raaij MJ, Chouin E, van der Zandt H, Bergelson JM, Cusack S. Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure. Fold. Des.* 2000; 8:1147-55.
 175. Coyne C, Voelker T, Pichla S, Bergelson J. The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J Biol Chem* 2004; 279:48079-84.
 176. Shaw CA, Holland PC, Sinnreich M, *et al.* Isoform-specific expression of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in neuromuscular junction and cardiac intercalated discs. *BMC. Cell Biol.* 2004; 5:42.
 177. Coyne CB, Bergelson JM. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv. Drug Deliv. Rev* 2005; 57:869-82.
 178. Shafren DR, Bates RC, Agrez MV, Herd RL, Burns GF, Barry RD. Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J. Virol.* 1995; 69:3873-77.
 179. Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, St John NF, Lublin DM, Finberg RW. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J. Virol.* 1995; 69:1903-06.
 180. Fricks CE, Hogle JM. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 1990; 64:1934-45.
 181. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell.* 2006; 124:119-31.
 182. Greve JM, Forte CP, Marlor CW, *et al.* Mechanisms of receptor-mediated rhinovirus neutralization defined by two soluble forms of ICAM-1. *J. Virol.* 1991; 65:6015-23.

183. Defer C, Belin MT, Caillet-Boudin ML, Boulanger P. Human adenovirus-host cell interactions: Comparative study with members of subgroups B and C. *J. Virol.* 1990; 64:3661-73.
184. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993; 73:309-10.
185. Mathias P, Galleno M, Nemerow GR Interactions of soluble recombinant integrin $\alpha\beta5$ with human adenoviruses. *J. Virol.* 1998; 72:8669-75.
186. Excoffon KJ, Traver GL, Zabner J. The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2005; 32:498-503.
187. Kaplan G, Freistadt MS, Racaniello VR. Neutralization of poliovirus by cell receptors expressed in insect cells. *J. Virol.* 1990; 64:4697-702.
188. Fisher RA, Bertonis JM, Meier W, *et al.* HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* 1988; 331:76-78.
189. Deen KC, McDougal JS, Inacker R, *et al.* A soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature* 1988; 331:82-84.
190. Tsimanis A, Kalinkovich A, Bentwich Z. Soluble chemokine CCR5 receptor is present in human plasma. *Immunol. Lett.* 2005; 96:55-61.
191. Seya, T.; Kurita, M.; Hara, T, *et al.* Blocking measles virus infection with a recombinant soluble form of, or monoclonal antibodies against, membrane cofactor protein of complement (CD46). *Immunology* 1995; 84:619-25.
192. Christiansen D, Devaux P, Reveil B, *et al.* Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 2000; 74:4672-78.
193. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999; 99:817-27.
194. Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, *at al.* Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat. Med.* 2009; 15:798-801.
195. Bernal RM, Sharma S, Gardner BK, *et al.* Soluble coxsackievirus adenovirus receptor is a putative inhibitor of adenoviral gene transfer in the tumor milieu. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:1915-23.
196. Harris CL, Williams AS, Linton SM, Morgan BP. Coupling complement regulators to immunoglobulin domains generates effective anti-complement reagents with extended half-life in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 2002; 129:198-207.
197. Marchant D, Si X, Luo H, McManus B, Yang D. The impact of CVB3 infection on host cell biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 323:177-98.

198. Werk D, Pinkert S, Heim A, *et al.* Combination of soluble coxsackievirus-adenovirus receptor and anti-coxsackievirus siRNAs exerts synergistic antiviral activity against coxsackievirus B3. *Antivir. Res.* 2009; 83:298-306.
199. Kawabata K, Tashiro K, Sakurai F, *et al.* Positive and negative regulation of adenovirus infection by CAR-like soluble protein, CLSP. *Gene Ther.* 2007; 14:1199-207.
200. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4:406-25.
201. Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, Fuxe J. CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 2004; 279:796–804.
202. Suzu S, Hayashi Y, Harumi T, Nomaguchi K, Yamada M, Hayasawa H *et al.* Molecular cloning of a novel immunoglobulin superfamily gene preferentially expressed by brain and testis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1215–21.
203. Hirata K, Ishida T, Penta K, Rezaee M, Yang E, Wohlgemuth J *et al.* Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 200; 276:16223–31.
204. Williams LA, Martin-Padura I, Dejana E, Hogg N, Simmons DL. Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Mol Immunol.* 1999; 36:1175-88.
205. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* 1986; 137:1270.
206. Howitt J, Bewley MC, Graziano V, Flanagan JM, Freimuth P. Structural basis for variation in adenovirus affinity for the cellular coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Biol Chem* 2003; 278: 26208–15.
207. von Heijne G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 4683-90.
208. Fernandez-Botran R, Chilton PM, Ma Y. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy. *Adv Immunol* 1996; 63: 269-336.
209. Koike S, Horie H, Ise I, Okitsu A, Yoshida M, Iizuka N *et al.* The poliovirus receptor protein is produced both as membranebound and secreted forms. *EMBO J* 1990; 9: 3217–24.
210. Damico R, Bates P. Soluble receptor-induced retroviral infection of receptor-deficient cells. *J Virol* 2000; 74: 6469-75.
211. Lopez M, Cocchi F, Avitabile E, Leclerc A, Adelaide J, Campadelli-Fiume G *et al.* Novel, soluble isoform of the herpes simplex virus (HSV) receptor nectin1 (or PRR1-HIgr-HveC) modulates positively and negatively susceptibility to HSV infection. *J Virol* 200; 75:5684-91.

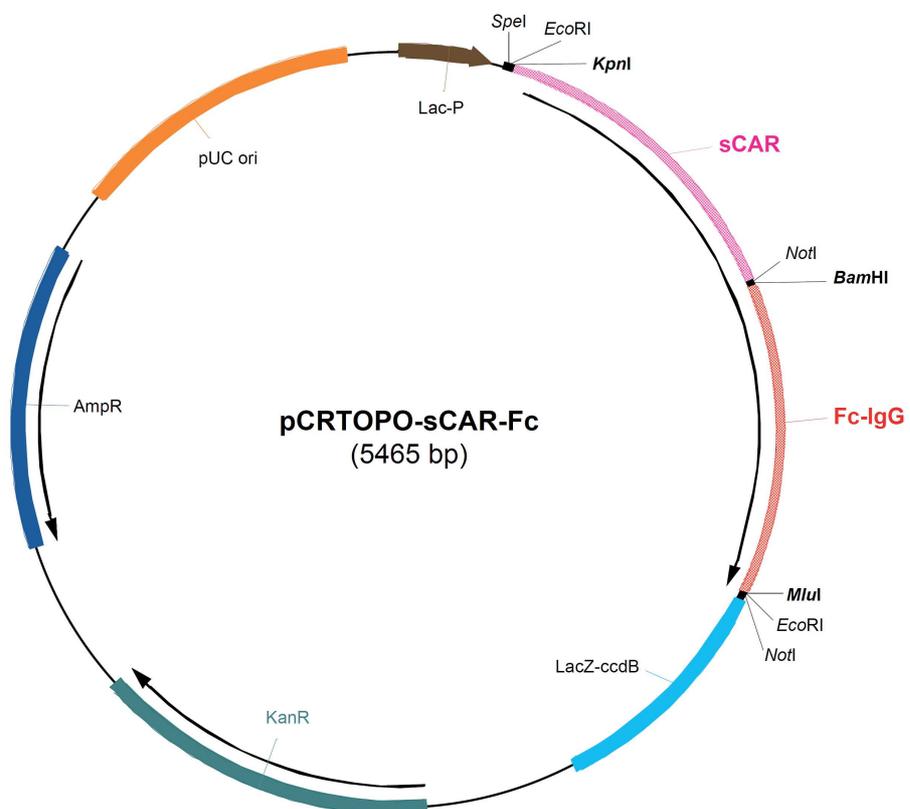
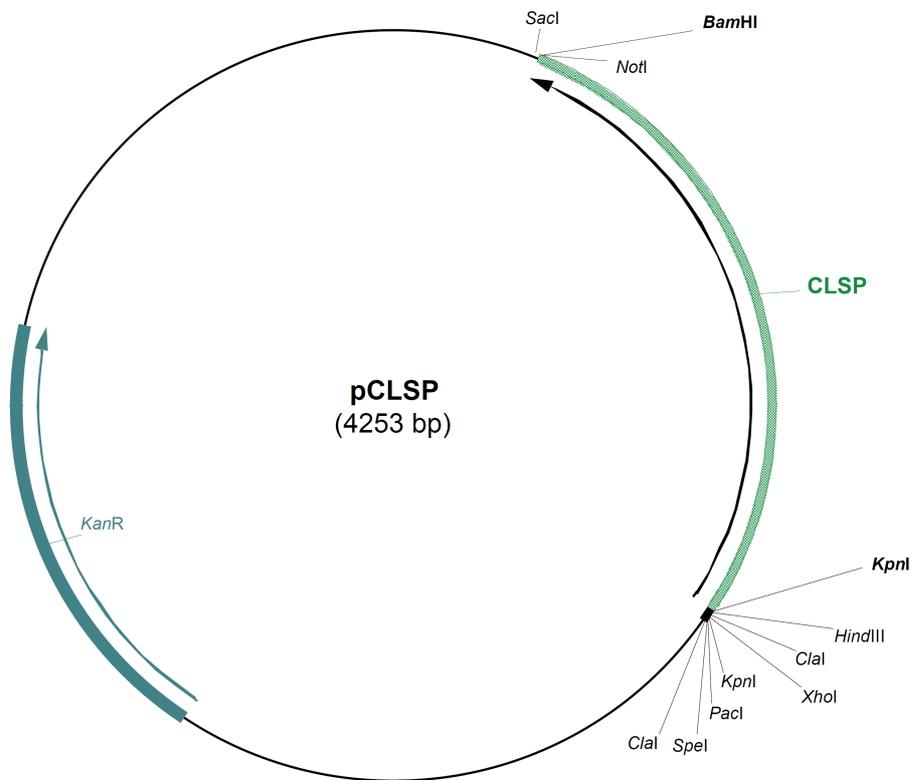
212. Harvey DM, Caskey CT. Inducible control of gene expression: prospects for gene therapy. *Curr Opin Chem Biol.* 1998; 2:512-8.
213. Agha-Mohammadi S, Lotze MT. Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J Clin Invest.* 2000; 105:1177-83.
214. Miller N, Vile R. Targeted vectors for gene therapy. *FASEB J.* 1995; 9:190-99.
215. Van Vliet KM, Blouin V, Brument N, Agbandje-McKenna M, Snyder RO. The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer. *Methods Mol Biol.* 2008; 437:51-91.
216. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:5547-51.
217. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. 1995. Transcriptional activation of tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 1995; 268:1766-69.
218. Deuschle U, Meyer WK, Thiesen HJ. Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15:1907-14.
219. Freundlieb S, Schirra-Muller C, Bujard H. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J. Gene Med.* 1999; 1: 4-12.
220. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. 97:7963-68.
221. Lamartina S, Roscilli G, Rinaudo CD, *et al.* Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum. Gene Ther.* 2002; 13:199-210.
222. Agha-Mohammadi S, O'Malley M, Etemad A, Wang Z, Xiao X, Lotze M T. Secondgeneration tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *J Gene Med.* 2004; 6:817-28.
223. Pluta K, Luce MJ, Bao L, Agha-Mohammadi S, Reiser J. Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *J Gene Med.* 2005; 7:803-17.
224. Pinkert, Sandra: Antivirale Strategien als gentherapeutische Behandlungsoption bei Coxsackievirus-Infektionen im kardialen System. Dissertation Freie Universität Berlin, 2009.
225. Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 1979; 6:23-8.
226. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51 Pt 1:263-73.

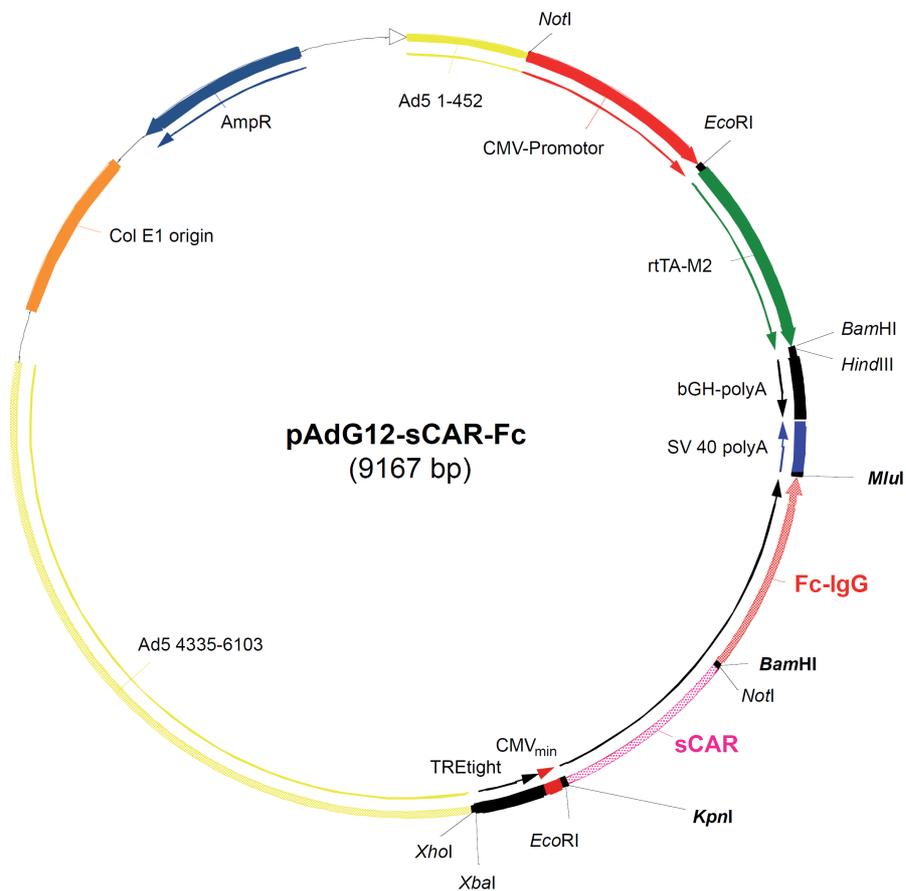
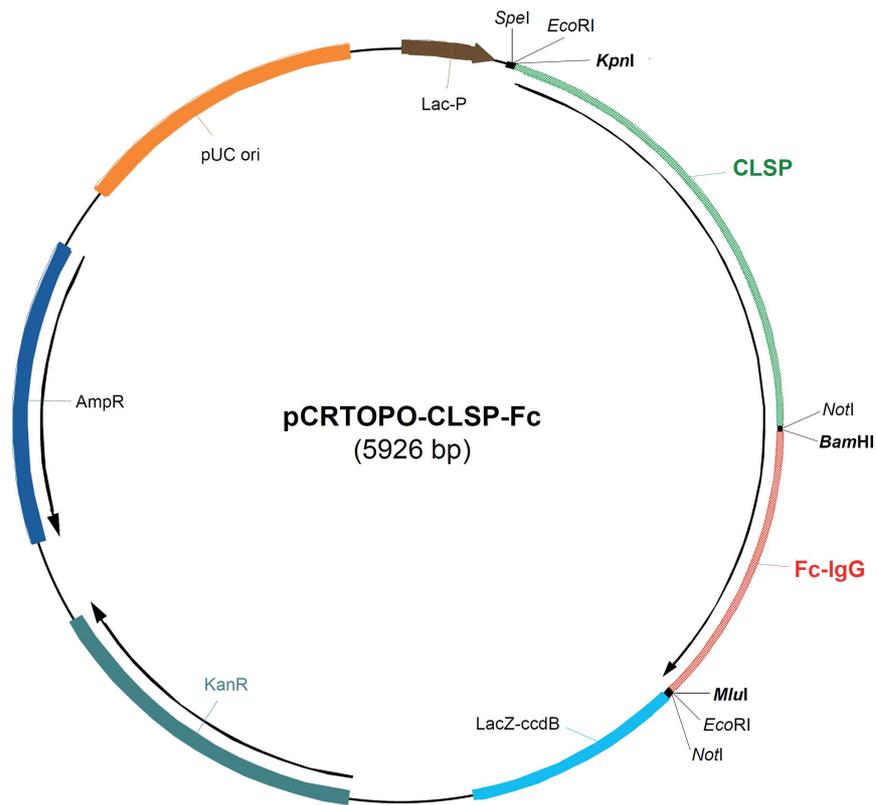
227. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006; 1:581-5.
228. Gruchala M, Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Gene therapy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2004; 10:407-23.
229. Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74:711-38.
230. Cohen CJ, Gaetz J, Ohman T, Bergelson JM. Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. *J Biol Chem.* 2001; 276:25392-8.
231. Baron U, Bujard H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* 2000; 327:401-21.
232. Molin M, Shoshan MC, Ohman-Forslund K, Linder S, Akusjärvi G. Two novel adenovirus vector systems permitting regulated protein expression in gene transfer experiments. *J Virol.* 1998; 72:8358-61.
233. Burcin MM, Schiedner G, Kochanek S, Tsai SY, O'Malley BW. Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:355-60.
234. Pollock R, Issner R, Zoller K, Natesan S, Rivera VM, Clackson T. Delivery of a stringent dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:13221-6.
235. Baron U, Bujard H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* 2000; 327:401-21.
236. Bewley MC, Springer K, Zhang YB, Freimuth P, Flanagan JM. Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 1999; 286:1579-83.
237. Kirby I, Davison E, Beavil AJ, *et al.* Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J Virol* 2000; 74:2804-13.
238. Freimuth P, Springer K, Berard C, Hainfeld J, Bewley M, Flanagan J. Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12. *J. Virol.* 1999; 73:1392-98.
239. Lortat-Jacob H, Chouin E, Cusack S, van Raaij MJ. Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 2001; 276:9009-15.
240. Roelvink PW, Lee GM, Einfeld DA, Kovesdi I, Wickham TJ. Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* 1999; 286:1568-71.

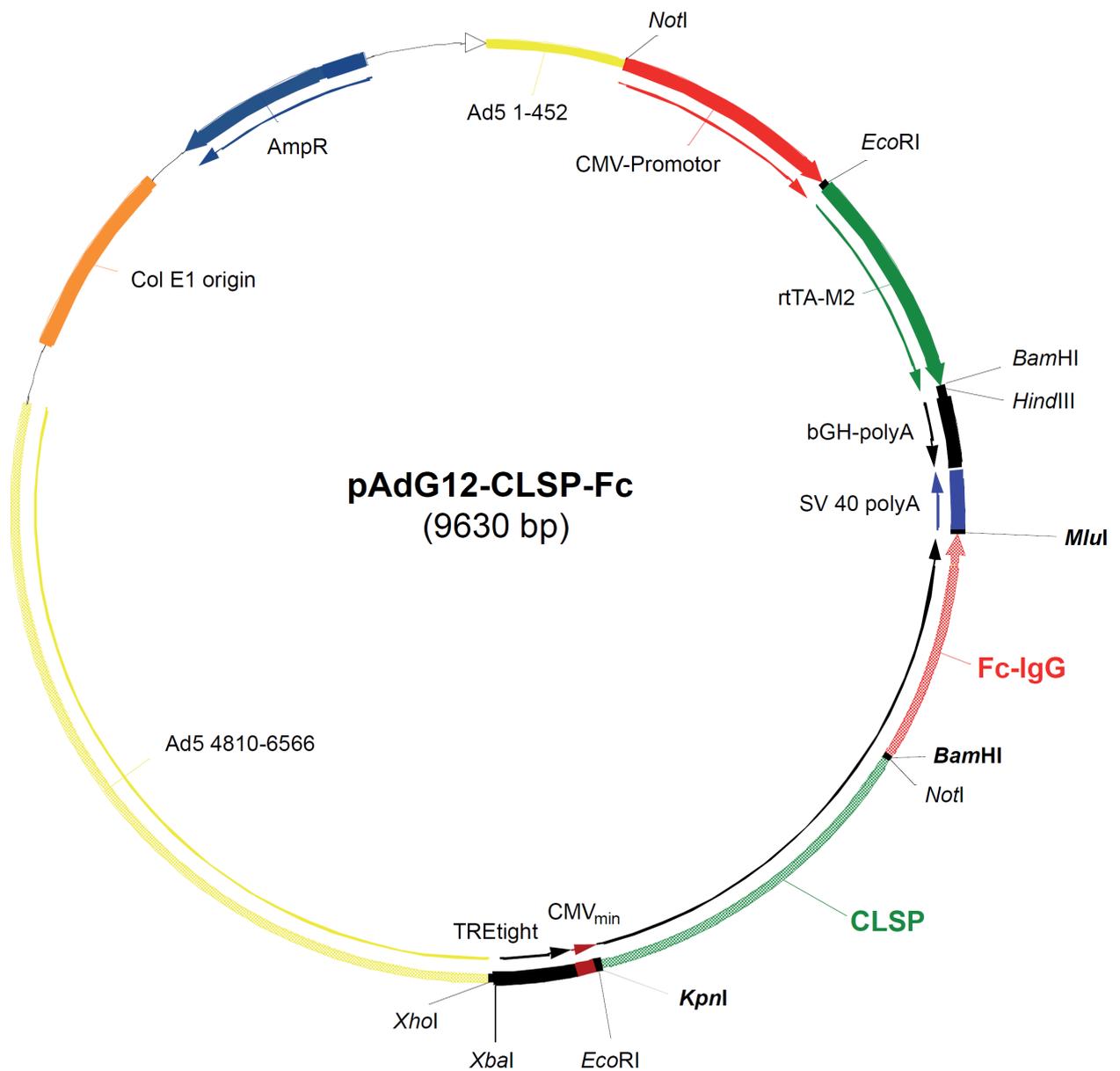
241. Law LK, Davidson BL. What does it take to bind CAR? *Mol Ther.* 2005; 12:599-609.
242. Xia D, Henry LJ, Gerard RD, Deisenhofer J. Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure* 1994; 2:1259-70
243. Dörner A, Grunert HP, Lindig V, *et al.* Treatment of coxsackievirus-B3-infected BALB/c mice with the soluble coxsackie adenovirus receptor CAR4/7 aggravates cardiac injury. *J. Mol. Med.* 2006; 84:842-51.
244. Rossmann MG. Viral cell recognition and entry. *Protein Sci.* 1994; 3:1712–25.
245. Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 2002; 10:324-31.
246. Colonno RJ, Colonno RJ, Condra JH, *et al.* Evidence for the direct involvement of the rhinovirus canyon in receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988; 85:5449–53
247. Martino TA, Petric M, Weingartl H, *et al.* The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus. *Virology* 2000; 271:99-108.
248. Knowlton KU, Jeon ES, Berkley N, Wessely R, Huber S. A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J. Virol.* 1996; 70:7811–18.

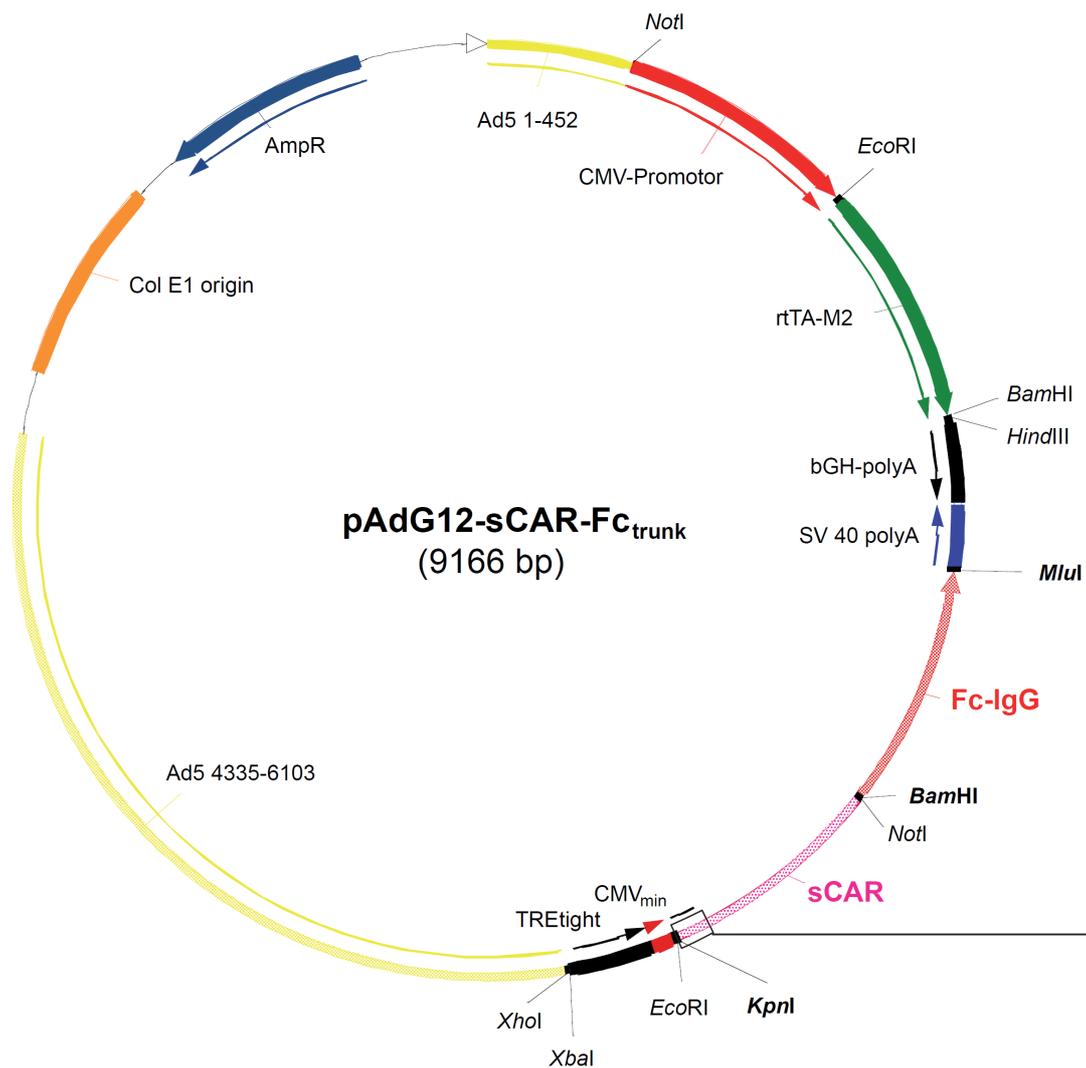
Anhang

Plasmidkarten



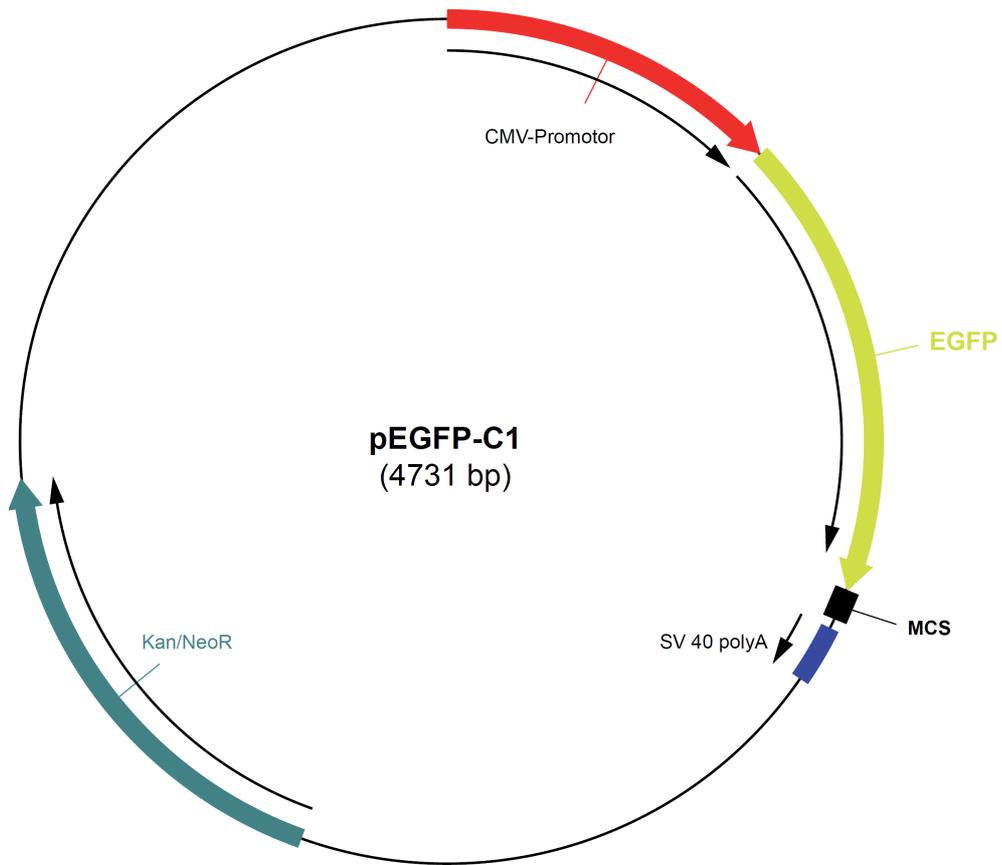






	<i>KpnI</i>	sCAR _{trunk}												▼			
sense	3'	ggtacc	cagc	ATG	GCG	CTC	TGC	TGT	GCT	TCG	TGC	TCC	TGT	GCG	GAG	TAG	5'
AS				Met	Ala	Leu	Cys	Cys	Ala	Ser	Cys	Ser	Cys	Ala	Glu	Stoppcodon	
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	<i>KpnI</i>	sCAR															
sense	3'	ggtacc	cagc	ATG	GCG	CTC	CTG	CTG	TGC	TTC	GTG	CTC	CTG	TGC	GGA	GTA	G... 5'
AS				Met	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Phe	Val	Leu	Leu	Cys	Gly	Val	...
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	

Vergleichssequenz aus pAdG12-sCAR-Fc



Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Poller danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Doktorvaterschaft und für die positive Wertschätzung der Tätigkeitsinhalte.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Henry Fechner für die interessante Aufgabenstellung als auch für sein jederzeit vorhandenes persönliches Engagement bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit, nebst konstruktiven Diskussionen.

Bei Prof. Dr. Heinz Zeichhardt (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin Institut für Infektionsmedizin, Abteilung für Virologie) möchte ich mich für die Bereitstellung der Laborräume zur Realisierung der CVB-Infektionsversuche bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der AG Fechner/AG Poller für die fachliche und zwischenmenschliche Unterstützung während der Durchführung der experimentellen Tätigkeiten. Hierbei sei besonders ein wesentlicher Beitrag von Frau Dr. Sandra Pinkert zum Gelingen der Arbeit erwähnt. Weitere Personen die ich in diesem Zusammenhang gerne namentlich hervorheben möchte sind Frau Dr. Tanja Pozzuto, Herrn Tobias Gröbl sowie Frau Xiaomin Wang.

Abschließend gilt mein Dank vor allem denjenigen, denen ich außerordentlich viel im wahrsten Wortsinn zu verdanken habe, die mir in den Höhen und Tiefen des Entstehungsprozesses der Promotion stets beratend, unterstützend und helfend zur Seite standen: meinen Eltern, meiner Schwester, meiner Lebensgefährtin, meinem besten Freund Herrn Bastian Otto.

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christopher Schwemmler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *"Antivirale Wirksamkeit des Fc-gekoppelten CAR-Like-Soluble-Proteins (CLSP-Fc) bei Coxsackie- und Adenovirusinfektionen"* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 25.10.2013

Christopher Schwemmler