

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

**„Antivirale Strategien  
als gentherapeutische Behandlungsoption bei  
Coxsackievirus-Infektionen im kardialen System“**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von  
Diplom Biologin Sandra Pinkert  
aus Leipzig

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann  
Institut für Chemie / Biochemie  
Freie Universität Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Poller  
Klinik für Kardiologie und Pulmologie  
Charité - Universitätsmedizin, Campus Benjamin Franklin

Disputation am 05.11.2009

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie

Die Myokarditis ist eine entzündliche Erkrankung des Herzmuskels, die durch histologische und immunologische Kriterien diagnostiziert und charakterisiert wird. Sie kann durch idiopathische, autoimmune oder infektiöse Agenzien ausgelöst werden. Zurzeit sind eine Reihe infektiöser Erreger (Bakterien, Einzeller, Pilze u. a.) bekannt, die eine Myokarditis verursachen, wobei vor allem Viren nach neusten Daten eine Prävalenz in bis zu 70 % der betroffenen Patienten zeigen (Bowles et al., 2003; Maisch et al., 2007; Martino et al., 1994).

Dabei ist die Ätiologie verschiedener Viren bei Myokarditisfällen jedoch noch nicht vollständig geklärt. Als erwiesen gilt sie bei Coxsackieviren der Gruppe B und einigen Enterovirustypen. Hinweise auf einen ursächlichen Zusammenhang gibt es weiterhin bei Adenoviren, Zytomegalieviren (CMV), Ebstein-Barr-Viren (EBV), Influenzaviren, dem humanen Herpesvirus 6 (HHV6) und Hepatitis-C-Viren (Matsumori, 2000; Pauschinger et al., 1999a; Bowles et al., 2003; Kuhl et al., 2005a). Die Häufigkeit der gefundenen Viren in Myokarditispatienten beträgt z. B. bei Enteroviren zwischen 6,7 % - 40 % (Pauschinger et al., 1999b; Bowles et al., 1986; Jin et al., 1990) und bei Adenoviren 8 % - 23 % (Bowles et al., 2003; Pauschinger et al., 1999a). Vor allem bei Neugeborenen und Kindern sind Enteroviren und Adenoviren die am häufigsten auftretenden myokardialen Viren (Bowles et al., 2003). Auch Parvovirus B19 wird seit kurzem als infektiöses Agens im Zusammenhang mit dem Auftreten von Myokarditiden diskutiert (Kuhl et al., 2003a; Tschope et al., 2005).

In der Regel verlaufen Virus-induzierte Herzmuskelerkrankungen akut, und obwohl die Datenlage bis heute sehr unzureichend ist, gibt es Hinweise, dass die 10-Jahres-Mortalität der akuten, nicht-fulminanten Myokarditis bis zu 45 % beträgt. Dabei weisen im Speziellen Enterovirusinfektionen eine noch schlechtere Prognose mit einer Mortalität von bis zu 67 % auf (McCarthy, III et al., 2000; Felker et al., 2000).

Virusinduzierte Entzündungen des Herzens gehen mit Schädigung der kardialen Myozyten und einer leuko- bzw. lymphozytären Entzündungszellinfiltration einher. Dabei variieren das klinische Bild und der Schweregrad der akuten Myokarditis abhängig von der Virulenz und Invasivität des Erregers, immunologischen Reaktionen, der genetischen Prädisposition und dem Erkrankungsalter. Eine moderat

verlaufende Myokarditis heilt in der Mehrzahl der Fälle ohne erkennbare Störungen der Herzmuskelfunktion aus. Bei schwereren Fällen kommt es dagegen zu einer ausgebreiteten Myozytenlyse mit Fibrose und Vernarbung des Gewebes, die zu einer akuten Herzinsuffizienz mit Störung der systolischen und diastolischen Funktionen des Herzmuskels führen.

Im chronischen Verlauf kann die Myokarditis weiterhin die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) bedingen, die von auffälligen Strukturveränderungen des Herzmuskels in Form von Fibrotisierung und Remodeling der extrazellulären Matrix begleitet wird. Dies führt zu einer fortschreitenden Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion bei gleichzeitiger Dilatation beider Ventrikel. Der Rückgang der hämodynamischen Parameter ist vor allem durch eine Verschlechterung der systolischen Pumpleistung und der diastolischen Relaxation des Herzmuskels gekennzeichnet (Felker et al., 2000; McCarthy, III et al., 2000; Pauschinger et al., 1999c; Pauschinger et al., 2002).

Die DCM stellt neben der koronaren Herzkrankheit die häufigste Ursache der Herzinsuffizienz, der Unfähigkeit des Herzens, die vom Körper benötigte Pumpleistung zu erbringen, dar. So entwickelt sich bei ca. 30 % der untersuchten Patienten die Herzinsuffizienz auf dem Boden der DCM. In Deutschland liegt derzeit die Prävalenz der Herzinsuffizienz bei ca. 1,5 Mio. Patienten, so dass davon auszugehen ist, dass mindestens 500.000 Patienten an einer DCM leiden. Vor allem bei jüngeren Menschen (3. - 5. Lebensdekade) ist sie dabei häufiger vertreten. Da die Krankheit zurzeit nur symptomatisch behandelt werden kann, stellt die DCM trotz neuer verbesserter Therapieformen neben der koronaren Herzkrankheit die Hauptursache für eine Herztransplantation dar (Strauer et al., 2001; Schultheiss et al., 2005).

Die Therapie virusbedingter Kardiomyopathien basiert gegenwärtig hauptsächlich auf symptomatischen Behandlungsschemata, und trotz neuer medikamentöser Therapiemaßnahmen, liegt bei der DCM die 5-Jahres-Mortalität noch immer über 50 % (Dec and Fuster, 1994). Letztendlich stellt neben der symptomatischen medikamentösen Behandlung die Herztransplantation für die meisten Patienten die derzeit einzige akzeptierte palliative Therapieoption dar.

Infolge der großen klinischen Relevanz dieses Krankheitsbildes werden neue kausale Therapiemöglichkeiten dringend gesucht. Molekulare und gentherapeutische Verfahren nehmen dabei einen breiten Raum ein, da sie gezielt gegen definierte

molekulare Strukturen gerichtet werden können und somit vor allem das Potential besitzen, die Spezifität einer Therapie bedeutend zu erhöhen.

## 1.2 Das Coxsackievirus

Erstmals wurden Coxsackieviren 1948 in einem Fall von febriler Paralyse isoliert (Coxsackie-A-Gruppe), welcher sich in der Stadt Coxsackie im Staate New York ereignete. Der natürliche Wirt ist der Mensch, experimentell sind jedoch auch Mäuse, Hamster, Ratten und Schimpansen infizierbar (Dalldorf and Sickles, 1948; Pallausch and Ross R, 2007).

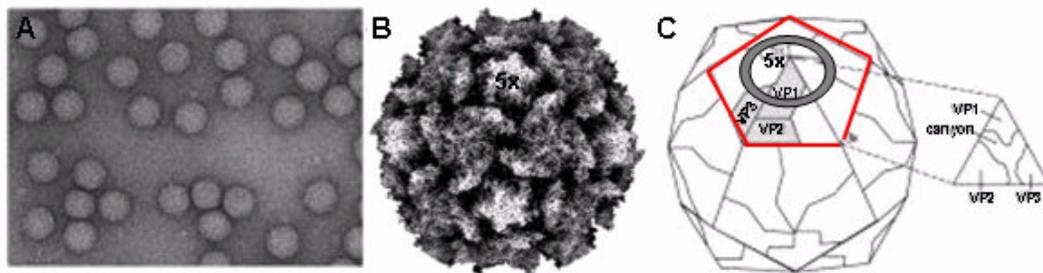
Das Coxsackievirus gehört zur Familie der Picornaviridae, deren Name sich von „klein“ (pico) und der Art des Virusgenoms (rna) ableitet. Bei Picornaviren handelt es sich um hüllenlose Viren deren Nukleokapsid einen Durchmesser von ca. 30 nm besitzt. Hinsichtlich ihrer molekularen Eigenschaften und damit verbundenen Pathogenese können Picornaviren in zwei große Untergruppen eingeteilt werden. Säurelabile Picornaviren (Genera Rhino- und Aphthovirus) infizieren überwiegend den Hals-Nasen-Rachenraum. Säurestabile Picornaviren dagegen können die Passage durch das im Magen vorliegende saure Milieu überstehen, ohne ihre Infektiosität zu verlieren und infizieren somit bevorzugt den Verdauungstrakt. Zu dieser Gruppe gehören die Genera Cardiovirus, Hepatovirus und Enterovirus (Pallausch and Ross R, 2007). Besonders Vertreter aus dem Genus Enteroviren sind Ursache für eine Vielzahl von teils schwer verlaufenden Erkrankungen beim Menschen, wie z. B. Kinderlähmung hervorgerufen durch Polioviren sowie Pneumonien und Meningitis durch Echoviren.

Auch Coxsackieviren, die ebenfalls zum Genus der Enteroviren gehören, können im Mensch zu vielfältigen Symptomen führen, von leichten Erkältungskrankheiten bis hin zu Meningitis mit Lähmungserscheinungen, Pankreatitis und vor allem Myokarditis (Melnick J.L., 1996; Romero, 2008). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Organotropismen sowie der damit verbundenen Gewebeschädigungen in der Maus werden die Coxsackieviren in Gruppe-A-Viren (Serotypen 1-24) und in Coxsackie-B-Viren mit 6 Serotypen unterteilt. Gruppe-A verursacht dabei hauptsächlich diffuse Myositis, während Gruppe-B-Viren dagegen herdförmige Myositis, aber auch

Enzephalitis, nekrotisierende Fettgewebsentzündungen, Pankreatitis, Endokarditis und Myokarditis hervorrufen (Melnick J.L., 1996; Melnick, 1996).

### 1.2.1 Aufbau, Genomorganisation und Replikation

Wie alle Picornaviren besitzt das Coxsackievirus ein ikosaedrisches Nukleokapsid mit einer Größe von 28-30 nm. Es besteht aus jeweils zwölf Pentameren, welche ihrerseits aus fünf Protomeren der vier Strukturproteine VP1 - VP4 zusammengesetzt sind. VP1, VP2 und VP3 bilden dabei die Oberfläche des Virus, während VP4 auf der inneren Seite des Viruskapsides lokalisiert und mit dem RNA-Genom assoziiert ist (Fricks and Hogle, 1990b). 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 (Muckelbauer et al., 1995). Variabilitäten in der dort befindlichen Aminosäuresequenz (AS)-Sequenz können zu unterschiedlichen Rezeptorprevalenzen führen (Abb. 1.1).

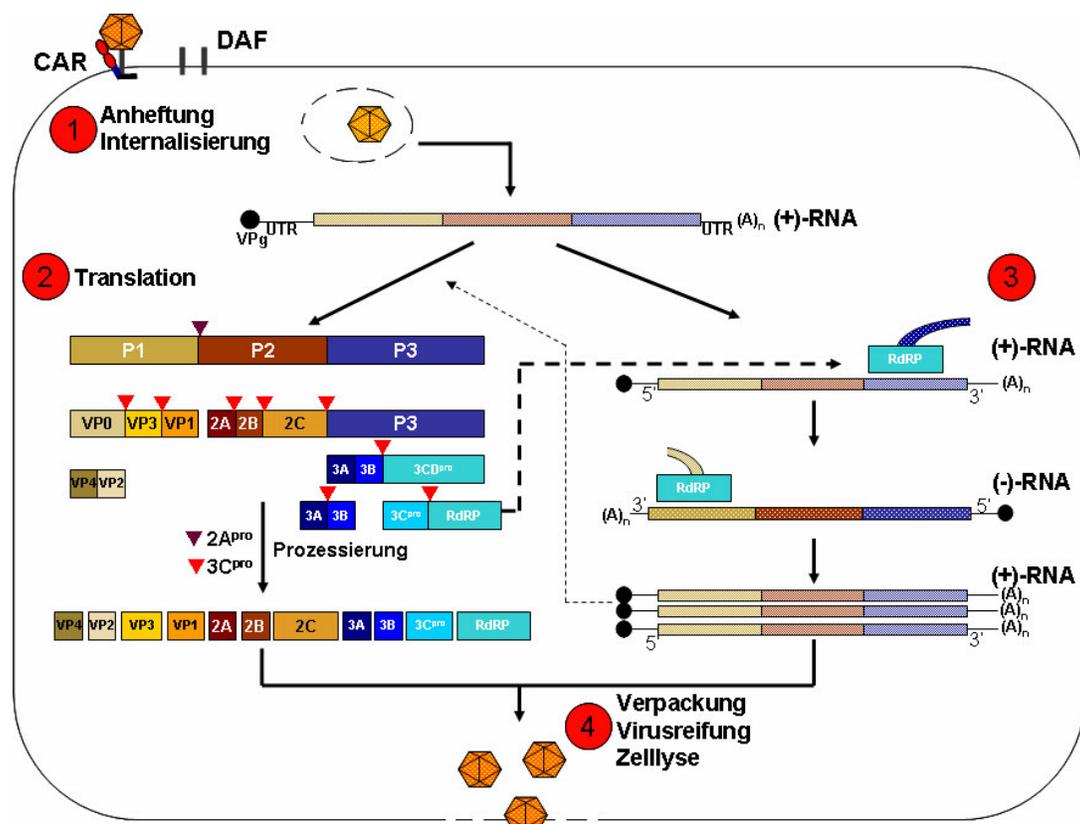


**Abb. 1.1:** Strukturelle Eigenschaften von Picornaviren nach Fields, 2007. **(A)** Elektromikroskopische Aufnahme von Polioviren 270.000-fache Vergrößerung. **(B)** Röntgenkristallstrukturanalyse eines Picornaviruskapsides am Beispiel von Poliovirus Typ I **(C)** Schematischer Aufbau eines Picornaviruspartikels bestehend aus den Kapsidproteinen VP1 - VP4. Das „biologische“ Protomer (grau) ist nicht identisch mit der kristallographischen Untereinheit (Dreieck). VP4 befindet sich im Inneren des Kapsides. Jeweils fünf Protomere bilden um eine der 5-fachen Symmetrieachsen ein Pentamer (rot). Die Bindungsstelle wird von einer kreisförmigen Vertiefung, dem ‚Canyon‘ gebildet und verläuft um jede der 5-fachen Symmetrieachsen (Ring).

Das Genom der Coxsackieviren ist eine einzelsträngige RNA in (+)-Strang-Orientierung und hat eine Größe von ca. 7,4 kb (Klump et al., 1990). Es ist am 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende kovalent an das kleinste virale Protein, VPg (Virus Protein, genome encoded), gebunden (Chatterjee and Nejman, 1985). Der 5'-untranslatierte etwa 700 nt lange Bereich (5'-UTR) ist durch eine komplexe

Sekundär- und Tertiärstruktur gekennzeichnet. Sie ist innerhalb der Gruppe der Enteroviren stark konserviert, was auf eine große Bedeutung innerhalb des viralen Replikationszyklus schließen lässt. Als interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) binden sowohl zelluläre als auch virale Kofaktoren daran und ermöglichen so die cap-unabhängige Translation (Pelletier and Sonenberg, 1988; Pelletier and Sonenberg, 1989; Meerovitch et al., 1989).

Nach Anheftung an die Zelle und Internalisierung des Virus in das Zytoplasma **(1)**, bindet das (+)-RNA-Genom direkt mittels IRES an die Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums und es wird ein 243 kDa großes Polyprotein **(2)** translatiert, das posttranslational autokatalytisch oder durch virale und zelluläre Proteinasen proteolytisch zu elf viralen Einzelproteinen prozessiert wird. Es entstehen die drei Strukturproteine (VP1, VP3 und VP0), die Proteinasen 2A<sup>pro</sup> und 3C<sup>pro</sup>, VPg, drei Nichtstrukturproteine (2B, 2C, 3A) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase 3D<sup>pol</sup> - nachfolgend RdRP genannt.



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung des Replikationszyklus von CVB. Das virale RNA-Genom besitzt am 5'-Ende ein kovalent gebundenes Protein VPg, am 3'-Ende ist es polyadenyliert (A)<sub>n</sub>. Im 5'-untranslatierten Bereich (UTR) befindet sich die *internal ribosomal entry site* IRES. Nach Translation entsteht ein Polyprotein welches durch virale Proteasen 2A und 3C in verschiedene Struktur und Nichtstrukturproteine prozessiert wird. Durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) wird das RNA-Genom über ein (-)-Strang-Intermediat vervielfältigt.

Die zelluläre Protein-, RNA- und DNA-Synthese wird während der ersten drei Stunden der viralen Replikation weitgehend gehemmt. Für diesen „shut off“ ist unter anderem die proteolytische Spaltung des zellulären Initiationsfaktors eIF-4G verantwortlich, ein Bestandteil des „cap-binding complex“ eIF4F, der an der Translationsinitiation der zellulären mRNAs beteiligt ist (Liebig et al., 1993; Lamphear et al., 1993).

Nach Translation der viralen (+)-Strang-RNA und Prozessierung synthetisiert die virale RdRP (3D<sup>pol</sup>) über ein (-)-Strang-Intermediat **(3)** das neue (+)-Strang-RNA-Genom, welches entweder als Ausgangspunkt eines weiteren Replikationszyklus dient oder in neue gebildete Viruspartikel verpackt wird. Die einzelnen Schritte der Virusreifung **(4)** sind noch nicht zur Gänze geklärt. Es wird jedoch von einem terminalen Reifungsschritt durch die autokatalytische Spaltung des Kapsid-Vorläuferproteins VP0 in die Kapsidproteine VP4 und VP2 ausgegangen, wodurch die Virionstruktur geschlossen wird (Abb. 1.2). Die Freisetzung der neu gebildeten Viren erfolgt durch virusinduzierte Zellyse normalerweise 6 - 8 Stunden nach der Infektion und beträgt etwa  $10^4$  -  $10^5$  neue Viren pro Zelle (Lee et al., 1993; Arnold et al., 1987; Krausslich et al., 1988; Zeichhardt et al., 2002).

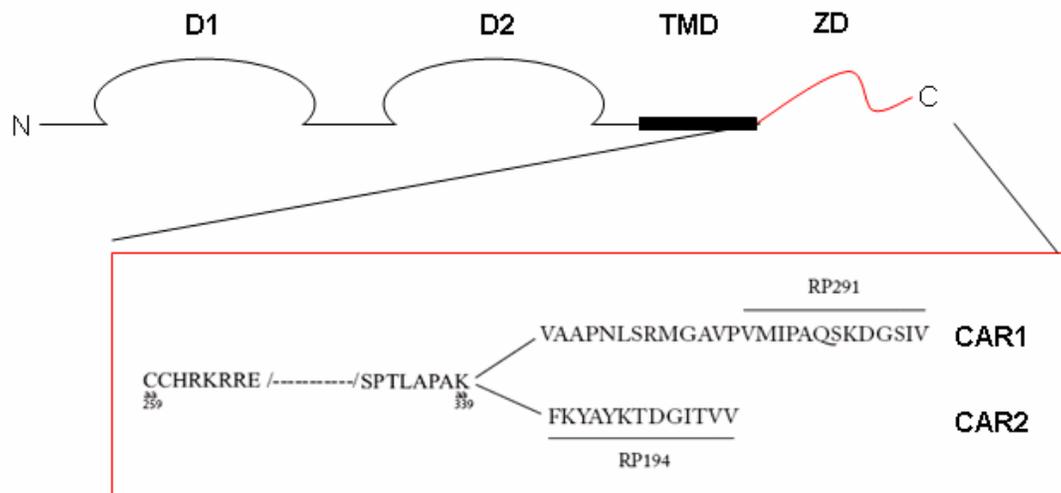
### **1.2.2 Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR)**

Die Anheftung eines Virus an die Zelloberfläche durch spezifische Rezeptoren initiiert die Infektion der Zielzelle. Damit ist die unterschiedliche Expression von Oberflächenrezeptoren eine wichtige Determinante bei der Permissivität von Zellen für spezielle Viren sowie dem viralen Tropismus in verschiedenen Geweben. Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) wurde erstmals beschrieben als ein zelluläres Protein, welches eine wichtige Rolle bei der Anheftung und Infektion von Gruppe-B-Coxsackieviren spielt (Mapoles et al., 1985; Bergelson et al., 1997; Carson et al., 1997). Weiterhin stellte sich heraus, dass er ebenfalls als Rezeptor für die Anheftung von Adenoviren A und C-F an die Zelle fungiert (Tomko et al., 1997; Bergelson et al., 1997).

CAR ist ein Typ-1-Transmembranprotein und gehört in die CTX-Familie innerhalb der Immunglobulin Superfamilie (IgSF), in die auch eine ganze Reihe weiterer Proteine mit gleicher struktureller Organisation eingruppiert werden, beispielsweise die

Junctional Adhesion Proteine A-C (JAM-A-C), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) oder das CAR Like Membrane Proteine (CLMP) (Philipson and Pettersson, 2004; Raschperger et al., 2004).

Das CAR-Gen beim Menschen umfasst 7 Exons und ist auf Chromosom 21 (21q11.2) lokalisiert (Bowles et al., 1999). Das translatierte Protein hat eine Molekülmasse von 38 kDa, zeigt durch Glykosylierung jedoch eine Größe von 46 kDa im SDS-Polyacrylamid-Gel (van't and Crystal, 2002). CAR beinhaltet eine Transmembrandomäne, die den extrazellulären (216 AS) vom intrazellulären Teil (107 AS) trennt. Der extrazelluläre Teil besteht aus zwei Ig-ähnlichen Domänen D1 (80 AS zwischen Cys41 und Cys120) und D2 (51 AS zwischen Cys162 und Cys212) (Carson, 2001). Der intrazelluläre Teil kann variable Längen aufweisen (CAR Varianten: CAR1 und CAR2) und besitzt potentielle Phosphorylierungsstellen, wodurch es an der Signaltransduktion in die Zelle beteiligt sein könnte (Abb. 1.3) (Dorner et al., 2004; Thoelen et al., 2001).



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung des CAR. Der extrazelluläre Teil besitzt zwei Ig-ähnliche Domänen D1 und D2 sowie eine Transmembran-Domäne (TMD). Die intrazelluläre Domäne (ZD) weist variable Längen auf; Subtyp CAR1 und CAR2. Die Antikörper RP291 und RP194 sind spezifisch gegen beide Subtypen gerichtet. Verändert nach (Shaw et al., 2004).

Außer beim Menschen konnte CAR auch bei vielen anderen Säugern, wie Schimpanse, Maus, Ratte, Hund und Schwein, aber auch bei Fischen, und Fröschen nachgewiesen werden (Tomko et al., 1997; Bergelson et al., 1998; Noutsias et al., 2001; Thoelen et al., 2001; Petrella et al., 2002). Die Homologie zum humanen CAR beträgt dabei zwischen 45 - 97% (Ref.: *Gene Bank blast search*).

Die Expressionsstärke von CAR zeigt große Unterschiede in verschiedenen Organen und während der Entwicklung. Im Embryonalstadium von Mäusen und Ratten ist die Expression von CAR besonders in Herz und Gehirn sehr hoch, nimmt aber in den ersten Tagen und Wochen nach der Geburt ab. Ebenso konnte eine starke CAR-Expression im Herzen von humanen Föten aber nicht in Kindern und Erwachsenen gefunden werden (Noutsias et al., 2001; Honda et al., 2000; Xu and Crowell, 1996; Fechner et al., 2003b).

In polaren Epithelzellen ist CAR an den Zell-Zell-Kontaktstellen (Tight-Junctions) lokalisiert, ebenso in diversen unpolaren Zellkulturen (HeLa-, HL-1- und HEK293T-Zellen), während im Herzen CAR ein Bestandteil der *Disci intercalares* (Z-Banden) und des Sarkolem ist (Selinka et al., 2004; Shaw et al., 2004). Weiterhin wird CAR im Muskelgewebe an den neuromuskulären Junctions exprimiert und ist dort kolokalisiert mit Acetylcholin-Rezeptoren (Sinnreich et al., 2005).

#### *1.2.2.1 Zelluläre Funktionen des CAR*

Über die zelluläre Bedeutung von CAR ist trotz intensiver Forschungen der letzten Jahre bisher wenig bekannt. Wie bereits erwähnt wird CAR der Klasse der Immunglobuline zugeordnet, in der zahlreiche Vertreter an Adhäsionsprozessen beteiligt sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre D1-Domäne Homodimere bildet (van Raaij et al., 2000). Dies und die Beobachtung, dass die CAR-Expression vor allem in der embryonalen Phase (vor allem in Herz und Gehirn) und bei unreifen Zellen z. B. unreifen Skelettmuskelfasern bzw. sich regenerierenden Skelettmuskelfasern hoch ist, lässt eine Beteiligung an Adhäsionsprozessen und Prozessen der Zell-Zell-Kontaktfindung vermuten. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass in Kardiomyozyten von Patienten mit DCM CAR erhöht exprimiert wird (Sinnreich et al., 2005; Noutsias et al., 2001). Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von CAR bei der Zell-Zell-Kontaktfindung ist, dass CAR verstärkt in den Filopodien der Wachstumszapfen und Neuriten von primären Neuronen des Hippocampus exprimiert wird, ebenso an den Kontaktstellen zwischen Neuronen und Skelettmuskelfasern (Honda et al., 2000; Shaw et al., 2004; Sinnreich et al., 2005)

Untersuchungen an CAR *knock out*-Mäusen zeigten, dass die Expression von CAR gerade in der frühen embryonalen Entwicklung von eminenter Bedeutung ist. Dieser

*knock out* führte zur Letalität am 11./12. Tag der Embryonalentwicklung und war gekennzeichnet durch schwere Fehlentwicklungen des kardialen Systems mit Hämorrhagien im gesamten Thoraxbereich (Asher et al., 2005). Wurde der CAR-*knock out* nach Tag 11 der Embryonalentwicklung induziert, so überlebten die Tiere zwar, zeigten aber kardiale Auffälligkeiten, wie Hyperplasie der linken Ventrikelwand und gesteigerte Proliferation von Kardiomyozyten (Chen et al., 2006; Dorner et al., 2005). Auch ein induzierter *knock out* im adulten Tier führt laut neuesten Studien zu kardialer Dysfunktion u. a. zum Block der atrioventrikularen Reizweiterleitung (Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008).

Des Weiteren besitzt CAR in seiner Funktion als Zell-Adhäsionsprotein wachstumsinhibierende Eigenschaften auf Tumorzellen und verringert das Risiko der Methastasierung. Tumorzellen in denen die CAR-Expression erniedrigt ist, neigen dagegen verstärkt zur Metastasierung (Matsumoto et al., 2005; Huang et al., 2005; Kim et al., 2003).

Durch die Bildung homophiler Bindungen und durch die intrazelluläre Interaktion mit ZO-1 und MUPP1 ist CAR außerdem an der Ausbildung der Tight Junctions in Endothelien beteiligt (Cohen et al., 2001; Coyne and Bergelson, 2005; Coyne et al., 2004).

#### 1.2.2.2 CAR als Virusrezeptor

Bekannt wurde CAR durch seine Rezeptorfunktion für Coxsackieviren der Gruppe B und Adenoviren (Bergelson et al., 1997). Bei Adenoviren der Untergruppe A, D, E und F vermittelt er über die Interaktion mit der Fiber-Domäne die Anheftung an die Zelle. Dabei ist die Bindungsaffinität der Fiber-Domäne zur D1-Domäne des CAR 1.000-fach höher als die, der CAR-CAR-Interaktion, was dazu führt, dass Adenoviren die CAR-CAR-Bindungen aufbrechen und so mit CAR interagieren können. Sekundäre Interaktion des viralen Penton mit  $\alpha_V$ -Integrinen an der Zelloberfläche führt dann zur Endocytose der viralen Partikel (Davison et al., 1997; Mathias et al., 1998; Wickham et al., 1993).

Bei der Infektion von Coxsackie-B-Viren (CVB) fungiert CAR in erster Linie als Internalisierungsrezeptor, kann aber auch die Bindung an die Zelle vermitteln (He et al., 2001). Trotzdem gilt für die Serotypen CVB1, 3 und 5 der Decay-Accelerating-

Rezeptor (DAF, CD55) als Rezeptor für die Virusanheftung an die Zelle (Bergelson et al., 1995; Shafren et al., 1995). Wie auch bei den Adenoviren interagiert das Coxsackievirus ebenfalls mit der D1-Domäne des CAR, jedoch an anderen spezifischen Stellen als die Adenoviren (Coyne and Bergelson, 2005).

Nach wie vor sind die Vorgänge nach der Anheftung des Virus an die Zielzelle nicht vollständig geklärt, aber es kommt zur Internalisierung durch Vesikelbildung, wahrscheinlich Zelltyp spezifisch durch Clathrin (HeLa-Zellen) oder Caveolin (polare CoCa-Zellen) beschichtete Vesikel (Chung et al., 2005; Coyne and Bergelson, 2006).

Die zelluläre Infektion mit CVB kann in drei Schritte eingeteilt werden. Anheftung (1) an die Zielzelle über z. B. DAF, Interaktion mit CAR (2) an den Zell-Zell-Kontaktstellen und Internalisierung (3) durch Bildung von A-Partikel („A'-Alteration: Abwandlung, Umbau) und Vesikelendozytose. Untersuchungen an polaren Zellen haben gezeigt, dass es durch die Bindung der CVB3-Partikel an DAF zu einer Zusammenlagerung von DAF an der Zellmembran, der so genannten Clusterbildung kommt. Daraus resultiert eine Umorganisation des Aktinskelettes und der Transport der DAF-Cluster mit dem CVB3-Partikel zum CAR hin. Dort bindet der CAR über die D1-Domäne an den Canyon der Coxsackieviruspartikel und vermittelt die Endozytose mittels Caveolinvesikel. Entweder innerhalb der Vesikel oder direkt nach dem Kontakt mit CAR kommt es zu einer irreversiblen Umstrukturierung des Coxsackieviruskapsides unter Verlust des VP4-Proteins (A-Partikel) (Coyne and Bergelson, 2006). Diese A-Partikel-Bildung ist bei Picornaviren weit verbreitet und wird durch die Bindung des jeweiligen Rezeptors mit dem Canyon des Viruskapsides ausgelöst (Fricks and Hogle, 1990a). Die entstandenen Partikel sind durch den Umbau des viralen Kapsides und Verlust des VP4 nicht mehr infektiös. Untersuchungen haben gezeigt, dass der Verlust des VP4 und die daraus resultierende Bildung von A-Partikeln bei CVB nur durch den CAR hervorgerufen werden, jedoch nicht durch den Co-Rezeptor DAF (Milstone et al., 2005; Goodfellow et al., 2005).

Noch nicht genau bekannt ist, wie das einzelsträngige RNA-Genom in die Zelle gelangt; doch wird vermutet, dass nach dem Verlust des VP4 das Genom direkt durch die Zellmembran oder durch die Membran des Vesikels in die Zelle gelangt (Coyne and Bergelson, 2006; Hogle, 2002).

### 1.2.3 Infektion und Pathogenese

Coxsackieviren werden fäkal-oral übertragen und vermehren sich nach Aufnahme über virusspezifische zelluläre Rezeptoren primär im lymphatischen Gewebe des Nasenrachenraums. Durch die Säurestabilität der CVB kommt es nach Passage des Magens zur Infektion der Darmepithelien (Peyersche Plaques), in denen eine lokale Vermehrung stattfindet mit nachfolgender Virämie (Pallausch and Ross R, 2007). Unter bestimmten Umständen, die sowohl genetisch bedingt als auch von der individuellen Disposition der Person abhängig zu sein scheinen, kann es zu einer systemischen Ausbreitung der Infektion kommen, mit einer sekundären Manifestation in Pankreas, Herz, Gehirn der Haut und in Muskeln. Die Inkubationsperiode beträgt von einem Tag bis zu 3 Wochen, wobei die Mehrzahl der Infektionen unter Ausbildung neutralisierender Antikörper ausheilen (Kim et al., 2001). Jedoch können die Symptome auch von leichten fieberhaften Infekten bis zu schweren zentralvenösen und kardialen Erkrankungen reichen (Kim et al., 2001).

#### 1.2.3.1 CVB3-induzierte Myokarditis

Die Häufigkeit enteroviraler Infektionen im Herzen bei Patienten mit Myokarditis und DCM beträgt zwischen 7 und 40 % (Jin et al., 1990); (Pauschinger et al., 1999b; Baboonian and Treasure, 1997). Sowohl das Vorhandensein von CVB3-RNA im Herzen nach einem akuten Verlauf der Infektion als auch die schlechte Prognose von Patienten mit Myokarditis bei enteroviraler Beteiligung bekräftigt die Annahme, dass CVB3-Virusinfektionen bei der Entstehung von Myokarditiden eine ursächliche Funktion haben können (Kuhl et al., 2005b; Kandolf, 2004; Kandolf et al., 1993).

Im Mausmodell konnte diese Theorie im Falle der akuten CVB3-induzierten Myokarditis weiter gefestigt werden, da nicht nur das erste und zweite Kochsche Postulat erfüllt wurde, wie bereits durch Patientenuntersuchungen bestätigt, sondern auch das dritte und vierte. So rief das aus CVB3-Myokarditis Tieren isolierte Virus in gesunde Tiere appliziert dieselbe Krankheit hervor (3. Postulat) und konnte auch aus diesen Tieren erneut isoliert werden (4. Postulat). Für die DCM steht dieser Beweis jedoch noch aus, da CVB3 in DCM-Patienten zwar regelmäßig nachgewiesen wird (1. Kochsche Postulat), aber bis jetzt nicht vollständig replikativ isoliert werden

konnte (2. Kochschen Postulat) (Klingel et al., 1992). So wird zurzeit von einer Assoziation von Coxsackieviren im Falle der DCM, aber nicht von einer ursächlichen Beziehung ausgegangen (Knowlton, 2008).

Allerdings konnte während der myokardialen Infektion von CVB3 sowohl (+)-Strang-RNA als auch (-)-Strang-RNA (50 % der Patienten) nachgewiesen werden. Letzteres gilt dabei als Indikator für eine Virusreplikation. Während der akuten Phase ist der (+)-Strang jedoch in einem höheren Level vorhanden als der (-)-Strang. Dieses Verhältnis verschiebt sich bei einer persistierenden Infektion auf die Seite der (-)-Strang RNA; was bei den Patienten eine Aussage über den Status der Infektion und eine Prognose möglich macht (Klingel et al., 1992; Pauschinger et al., 1999b).

Zwei unterschiedliche Pathogenitätsmechanismen sind bei der Entwicklung einer Myokarditis nach CVB3-Infektion zu unterscheiden. Dabei handelt es sich um direkte, primär virusvermittelte und in Folge der Virusinfektion, reaktive sekundäre Mechanismen des Immunsystems, die zum charakteristischen Krankheitsbild Myokarditis führen (Knowlton and Badorff, 1999; McManus et al., 1993; Huber et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass CVB3 sowohl im Human- als auch im Maussystem kardiale Zellen *in vitro* und *in vivo* infiziert, was darauf hindeutet, dass von den primär viral verursachten Pathogenitätsmechanismen vor allem die Kardiomyozyten betroffen sind, z. B. replikationsbedingte Lyse der Wirtszelle (Kandolf et al., 1985; Yajima et al., 2006). Des Weiteren spaltet die virale Protease 2A Dystrophin, was zu einem Verlust der Integrität des Zytoskeletes führt (Badorff et al., 1999). Ebenfalls induziert eine CVB3-Infektion Apoptose über verschiedene Kaspase-Wege und das Kapsidprotein VP2 steht im Verdacht über die Interaktion mit zellulären Proteinen (z. B. *siva*) ebenfalls Apoptose zu induzieren (Henke et al., 2000; Chau et al., 2007).

Sekundär kann es in Folge der viralen Infektion zur Infiltration des Myokards mit Entzündungszellen kommen, einhergehend mit Fibrose, Umbauprozessen der extrazellulären Matrix und Verschlechterung der kardialen Integrität und Kontraktilität (Pauschinger et al., 2002; Pauschinger et al., 1999c). In den meisten Fällen gelingt bei einem intakten Immunsystem die vollständige Eliminierung des Virus aus dem Körper. Wurde das Immunsystem durch Immunsuppressiva geschwächt oder mittels *knock out* partiell ausgeschaltet, konnte im Tiermodell eine Erhöhung der kardialen Pathogenität und der viralen Replikation beobachtet werden (McManus et al., 1993; Zaragoza et al., 1998).

Gelingt eine Eliminierung des viralen Erregers in der akuten Phase der Infektion nicht, kann dies eine chronische kardiale Entzündungsreaktion nach sich ziehen mit weiteren kardialen Umbauprozessen, Veränderung der Herzgeometrie (Dilatation) mit kontinuierlich fortschreitender Verschlechterung der Myokardfunktion. Dieser Prozess scheint u. a. durch bisher noch nicht näher geklärte genetische Faktoren beeinflusst zu werden. Des Weiteren greift in einigen Fällen das Immunsystem z. B. durch T-Lymphozyten in einer „überschießenden“ Reaktion vermehrt Kardiomyozyten an und zerstört diese. Neueste Untersuchungen zeigen jedoch, dass beim Fortschreiten der sekundären Entzündungsreaktion nicht zwangsläufig eine persistierende Virusinfektion vorliegen muss, da klinische Befunde eine postvirale Immunpathogenese der Myokardschäden ohne Viruspersistenz belegen (Kandolf, 2004). Ein Grund dafür ist der Mechanismus der molekularen Mimikry, da zwischen CVB3-Epitopen und myokardialen Proteinen Ähnlichkeit besteht, so dass diese als Antigen erkannt werden und sich das Immunsystem mit Antikörpern oder zytotoxischen T-Lymphozyten gegen diese kardialen Strukturen richtet, was zu einer weiteren Verstärkung der kardialen Infiltration, Lyse der Kardiomyozyten und Verschlechterung der Herzfunktion führt (Huber, 1997; Schwimmbeck et al., 1994).

#### *1.2.3.2 CVB3-Myokarditis im Mausmodell*

Wie eingangs erwähnt konnten bis jetzt CVB3-Infektionen nur bei Menschen festgestellt werden, jedoch können Mäuse experimentell mit diesem Virus infiziert werden und bilden im Laufe der Infektion je nach Mausstamm eine akute oder chronische Myokarditis aus, ähnlich der humanen Erkrankungen (Kim et al., 2001; Gauntt and Huber, 2003). Dabei verläuft bei BALB/c und C57BL/6 die Krankheit akut, während SWR und A/J-Mäuse einen chronischen Verlauf mit Langzeitpersistenz der viralen RNA bis zu 90 Tagen zeigen (Leipner et al., 2004; Reetoo et al., 2000).

Auch im CVB3-Myokarditis-Mausmodell lassen sich prinzipiell zwei verschiedene pathologisch wirksame Mechanismen unterscheiden. Zum einen die direkte virale und zum anderen die durch die Immunantwort vermittelte Schädigung des Herzgewebes. Dabei bewirken die CVB3-Viren hauptsächlich die Schädigung in den ersten Tagen nach der Infektion, während später die Auswirkungen des aktivierten Immunsystems dafür verantwortlich sind.

Der Verlauf der viralen Myokarditis im Mausmodell lässt sich in drei verschiedene Phasen einteilen: die akute Phase (0.-3.Tag), die subakute Phase (4.-14. Tag p.i.) und die chronische Phase (>15. Tag p.i.) (Kawai, 1999).

In der akuten Phase der Virusmyokarditis zeigt sich wie eingangs erwähnt eine virusinduzierte Zytotoxizität in Abwesenheit von Entzündungszellen mit fokalen Nekrosen der Myozyten bei Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$  TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$ . Vereinzelt zelluläre Infiltrate sind ab dem 3. Tag nachweisbar (Shioi et al., 1996; Matsumori, 1997).

In der subakuten Phase der Myokarditis tritt ab Tag 7 p.i. eine Infiltration des Myokards mit immunologischen Zellen auf, wobei hauptsächlich T-Lymphozyten [natürliche Killerzellen (NK-Zellen), CD8+- und CD4+-T-Zellen] und Makrophagen nachweisbar sind (Leipner et al., 2004). Besonders aktivierte NK-Zellen werden als protektiv gegen die virale Infektion angesehen, da sie die Virusreplikation durch Eliminierung infizierter Myozyten (Perforinausschüttung) limitieren (Lodge et al., 1987; Godeny and Gauntt, 1986). Ebenfalls kommt es zu einem Anstieg der Expression von inflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-4 und IL-10 ebenso von TNF- $\alpha$  und TNF- $\gamma$ , wobei jedoch nicht geklärt ist, ob dieser Vorgang viral induziert ist oder durch die gesteigerte Anzahl immunologischer Zellen im Myokard hervorgerufen wird (Kawai, 1999).

Im Mausmodell der akuten CVB3-Myokarditis (Balb/c und C57BL/6) können am Tag 21 p.i. keine Anzeichen einer CVB3-induzierten Inflammation mehr beobachtet werden. Nur wenige vereinzelte interstitielle inflammatorische Zellen und Areale geringer Fibrose sind dann noch nachweisbar. Darüber hinaus sind ab Tag 10 p.i. Serum, Pankreas und Milz virusfrei. Nur im Herzen ist bis zum Tag 14 p.i. der Nachweis von geringen Mengen infektiösem CVB3 möglich, wobei hier die stärkste Viruslast zwischen Tag 4 und Tag 7 p.i. vorliegt, während bei den übrigen untersuchten Organen das Maximum am Tag 2 erreicht wird (Leipner et al., 2004).

In den Mäusestämmen, die nach einer CVB3-Infektion einen chronischen Krankheitsverlauf ausbilden (SWR, A/J) kommt es, ähnlich dem Bild der DCM beim Menschen, zu einer fortwährenden Inflammation des Herzens mit Zerstörung der Kardiomyozyten, Fibrose und Umbauprozessen der extrazellulären Matrix. Ebenfalls konnte im Herz, dieser Tiere auch 15 Tage nach der Infektion CVB3-RNA, allerdings kein replikatives Virus nachgewiesen werden (Wee et al., 1992; Pauschinger et al., 2002). Des Weiteren zeigt die virale RNA aus den Herzen Mutationen, u. a. eine

Deletion der 5'-UTR (Nukleotid 7-49), wodurch die Replikation des Virus stark inhibiert bzw. fehlerhaft ist [verpacktes (-)-Strang-Genom], das Virus allerdings bis zu 5 Monate im Myokard verbleibt. Diese persistierende virale RNA gilt als potentieller Promotor einer fortbestehenden Gewebeeinfiltration des Myokards durch T-Lymphozyten während der chronischen Phase der Infektion (Klingel et al., 1992) (Klingel et al., 1992; Kim et al., 2008; Chapman and Kim, 2008; Kim et al., 2005). Ebenso wie im humanen System, ist eine Viruspersistenz nicht obligat mit der Entwicklung einer chronischen Myokarditis verknüpft, und somit scheint die Art der Immunantwort auf das Virus von entscheidender Bedeutung zu sein. So können Autoimmunvorgänge, wie kreuzreagierende Autoantikörper oder autoantigen präsentierende Makrophagen am Fortschreiten der Inflammation und Entstehen kardialer Läsionen in der chronischen Phase beteiligt sein (Fairweather et al., 2001; Fairweather et al., 2005).

### *1.2.2.3 Pathogenese anderer CVB-Serotypen*

Alle sechs Serotypen der Coxsackie-B-Viren treten endemisch mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Dabei sind die Serotypen 1 - 5 unter den 15 häufigsten isolierten Enteroviren (gemessen von 1970 - 2005; CDC 2006) und bilden damit ca. 25 % der jährlich isolierten Enteroviren. Ähnlich wie bei CVB3 und anderen Enteroviren laufen eine Vielzahl von Infektionen asymptomatisch ab oder werden begleitet von einzelnen milden Erkältungssymptomen und geringem Temperaturanstieg (Hall and Miller, 1969; Jenista et al., 1984). Neben den am häufigsten auftretenden schweren Erkrankungen wie Kardiomyopathie und Pankreatitis sind klinische Manifestationen bei einer Vielzahl von CVB-Serotypen ähnlich und äußern sich vor allem in dermatologischen, respiratorischen und neurologischen Symptomen.

Die Pankreatitis wird vor allem mit CVB4 assoziiert und kann sowohl einen akuten als auch einen chronischen Krankheitsverlauf aufweisen, meist aber mit mildem Verlauf (Kingsnorth and O'Reilly, 2006). Allerdings können Autoimmunprozesse, die zur Zerstörung von Insulin produzierenden Zellen im Pankreas und somit zu Typ-1-Diabetes führen mit CVB-Infektion assoziiert werden (Szopa et al., 1993).

Während dermatologische Manifestationen mit großflächigen Rötungen und masernartigem Ausschlag besonders häufig bei CVB5 und CVB6 beobachtet

wurden, treten respiratorische Syndrome vor allem bei Infektionen mit CVB1, 2 und 3 auf und manifestieren sich sowohl in den oberen respiratorischen Organen (Entzündung der Mundschleimhaut und des Rachens) als auch in den unteren (Bronchitis, Pneumonia) (Cherry et al., 1963). Mittelohrentzündung und Ohrspeichelentzündung können ebenfalls mit CVB4 assoziiert auftreten.

Weiterhin sind Coxsackieviren mit Infektionen des ZNS, im speziellen mit Meningitis, seltener mit Enzephalitis oder Meningoenzephalitis assoziiert. Dabei konnten bei Patienten, die jünger als zwei Jahre waren, in 50 % der Fälle CVB2, CVB4 und CVB5 in der Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden (Cherry et al., 1963; Mirand et al., 2008). Auch Fälle von akuter Paralyse, ähnlich wie bei Poliomyelitis, wurden unter Beteiligung von CVB-Serotypen diagnostiziert (Romero, 2008). Genauso wie Herzmuskelzellen infiziert werden können, stellen auch Skelletmuskeln ein mögliches Ziel für Coxsackie-B-Viren aller Serotypen dar. Besonders Infektionen der Brust- und Abdomenmuskulatur und Entzündungen des Rippenfells treten häufig mit Infektionen von CVB3 und CVB5 auf, einhergehend mit starken Schmerzen und Verschlechterung der Atemfunktion (Bornholmkrankheit) (Zaoutis and Klein, 1998; Romero, 2008).

Für alle Krankheitsbilder konnte übereinstimmend beobachtet werden, dass sie fulminanter auftreten, je jünger die Patienten sind. So steigt die Mortalitätsrate bei Neugeborenen bis auf 11 % (CVB2), 18,8 % (CVB3) oder sogar 40 % (CVB4) nach Infektionen mit Coxsackie-B-Viren und übersteigt damit sogar die Mortalitätsraten von Echovirus 9 und 11, den häufigsten enteroviralen Infektionserregern in der neonatalen Periode (Khetsuriani et al., 2006).

#### **1.2.4 Antivirale Therapie gegen CVB-Infektionen**

Die in den letzten Jahren entwickelten antiviralen Therapien gegen Coxsackieviren können hinsichtlich ihrer Wirkungsweise in drei Gruppen eingeteilt werden. Wirkstoffe der ersten Gruppen versuchen, die Infektion der Zielzellen zu verhindern, indem sie die Bindungsstellen für den zellulären Rezeptor blockieren.

So bindet z. B. Pleconaril, ein niedermolekulares Medikament, das sich bereits in klinischer Studie befindet, an das virale Kapsid und inhibiert die Rezeptoranheftung *in vitro*, sowohl bei Coxsackieviren der Gruppe A und B als auch bei einigen

Echoviren. Des Weiteren konnte bei CVB3-infizierten Mäusen die Mortalität und auch die Viruslast im Herz und Pankreas durch Pleconaril signifikant verringert werden (Pevear et al., 1999). In ähnlicher Weise wirken lösliche Rezeptormoleküle (DAF-Fc und CAR-Fc) sowohl *in vitro* als auch im CVB3-Mausmodell. Dieses Prinzip der antiviralen Therapie wird ausführlich unter Kapitel 1.4 beschrieben.

Ein weiterer Wirkstoff WIN bindet ebenfalls an das Kapsid von Picornaviren, blockiert jedoch nicht die Anheftung und Internalisierung des Virus, sondern wahrscheinlich das *Uncoating* in der Zelle. *In vivo* schützte es dabei Mäuse zwar vor viralbedingter Mortalität, verringerte jedoch nicht die virusbedingte Inflammation im Herzen (Woods et al., 1989) (Fohlman et al., 1996a).

Die antivirale Strategie der zweiten Gruppe ist gegen das virale RNA-Genom gerichtet und beinhaltet kurze DNA- oder RNA-Moleküle, wie antisense Oligonukleotide und siRNAs bzw. shRNAs. Dabei besteht die Wirkungsweise darin, spezifisch an das Genom des Virus zu binden und die Translation zu inhibieren oder das virale RNA-Genom zu zerstören. Unter Kapitel 1.3 wird auf die Wirkungsweise und Effizienz dieses Ansatzes ausführlich eingegangen.

Bei der dritten Therapieform handelt es sich um immunmodulatorische Therapeutika, welche unterstützend auf die körpereigene Abwehr von Pathogenen wirken sollen. Da die meisten kardiopathogenen Effekte bei der viralen Myokarditis oder DCM vom Immunsystem induziert werden (Kapitel 1.2.3.1), wurden immunsupprimierende Pharmazeutika auf ihren therapeutischen Effekt hin untersucht. Dabei haben sowohl *in vivo*-Experimente als auch klinische Studien mit klassischen immunsupprimierenden Medikamenten wie Prednisolone, Cyclosporine, FK-506 und Azathiaprine keinen positiven Effekt aufgezeigt (Kawai, 1999; Liu et al., 2005). Nur mit dem Medikament FTY720 konnte bei der akuten viralen Myokarditis im Mausexperiment und auch in ersten klinischen Anwendungen eine Verbesserung durch Verminderung der peripheren Lymphozyten und deren Infiltration in das betroffene Gewebe erzielt werden (Miyamoto et al., 2001; Chiba et al., 1998).

Neuere Ansätze sind immunmodulatorische Substanzen, die die körpereigene Abwehr nicht unterdrücken, sondern positiv hinsichtlich der antiviralen Effizienz beeinflussen sollen.

Untersuchungen mit Interferon- $\gamma$  und Interferon- $\alpha$  zeigten dabei eine Verbesserung der Überlebensrate im Mausmodell und auch einen positiven Einfluss bei Patienten mit enteroviral induzierter Myokarditis und DCM (Henke et al., 2003; Daliento et al.,

2003; Miric et al., 1996). Einer der vielversprechendsten Ansätze dahingehend scheint der Einsatz von Interferon- $\beta$  zu sein (Wang et al., 2007). In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass in enteroviral positiven Patienten nach der Behandlung kein Virus im Myokard mehr gefunden wurde und dass sich außerdem die hämodynamischen Parameter verbessert haben (Kuhl et al., 2003b).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass zurzeit keine spezifische antivirale, klinisch angewandte Therapie gegen Coxsackieviren vorhanden ist. Neue kausale Therapieoptionen sind durch die große klinische Relevanz vor allem bei durch Coxsackievirus-induzierter Myokarditis dringend von Nöten.

### **1.3 Antivirale Therapie mittels RNA-Interferenz**

#### **1.3.1 RNA-Interferenz (RNAi)**

Bei dem Prozess der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um eine posttranskriptionale sequenzspezifische Genregulation, hervorgerufen durch doppelsträngige RNA (dsRNA). Der Ursprung der dsRNAs kann dabei sowohl exogen als auch endogen sein; z. B. Replikationsintermediate einiger Viren, artifiziell eingebrachte dsRNAs oder Faltstrukturen einzelsträngiger RNAs, wie z. B. Haarnadelstrukturen von microRNA-Vorläufermolekülen (Fire et al., 1998).

Die RNAi ist eine sehr effiziente und hochspezifische Methode zum *Silencing* von Genen. Diese Technik basiert auf einem natürlichen Prozess, der zuerst in *Cenorhaptits elegans* später auch in weiteren Eukaryoten entdeckt wurde. Dabei konnte das erste Mal belegt werden, dass es durch 300 – 1.000 bp lange dsRNAs zu einer sequenzspezifischen und effektiven Inhibition der Genexpression kommt (Fire et al., 1998). Dabei ist eine hundertprozentige Übereinstimmung der Zielsequenz innerhalb der mRNA und der Sequenz der RNAi-induzierenden Moleküle notwendig.

Bei der RNAi werden zwei verschiedene Phasen unterschieden. Während der Initiationsphase wird die dsRNA durch den Ribonuclease-III Enzymkomplex DICER im Zytoplasma in 21-23 Nukleotid lange small interfering (si)RNAs enzymatisch geschnitten (Ketting et al., 2001; Bernstein et al., 2001b; Bernstein et al., 2001a). Anschließend wird der DICER/siRNAs-Komplex mittels *transactivating response RNA - binding protein* (TRBP) zum *RNA Induced Silencing Enzymcomplex* (RISC)

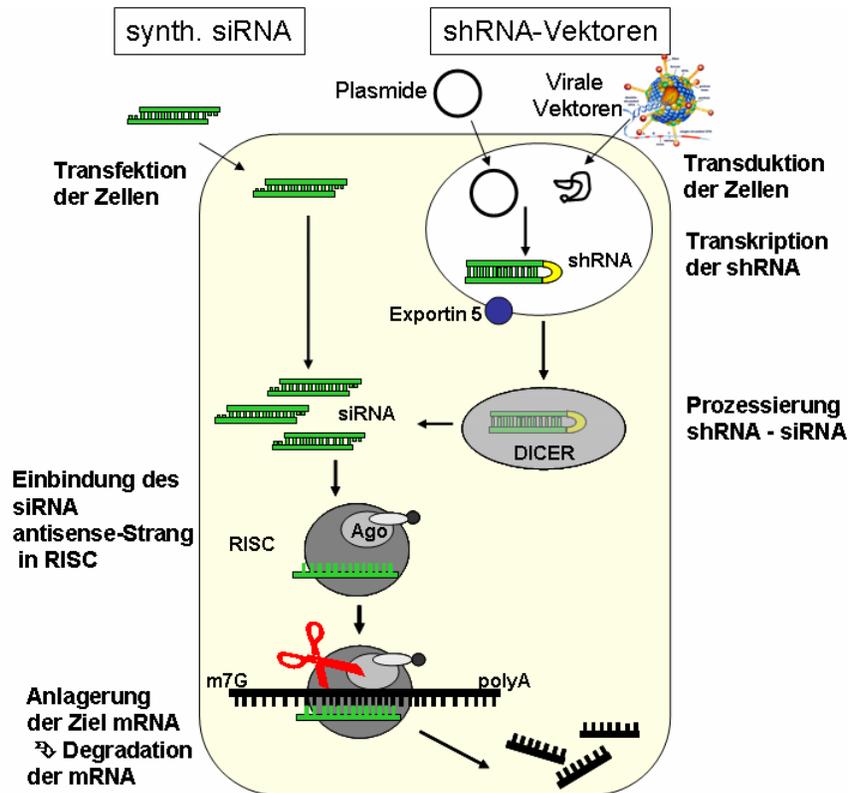
transportiert und dort ein Strang der siRNA, meist der antisense-Strang, in den RISC-Komplex integriert, während der sense-Strang unter Beteiligung von Argonaut 2 abgespalten und aus dem Komplex eliminiert wird (Martinez et al., 2002; Schwarz et al., 2002; Tomari and Zamore, 2005).

In der Effektorphase bindet der im RISC eingebaute siRNA-Einzelstrang sequenzspezifisch an die komplementäre Ziel-mRNA (target), die dann durch Argonaut 2 endonukleolytisch geschnitten und anschließend durch Exonukleasen vollständig abgebaut wird (Elbashir et al., 2001a; Scherr et al., 2003). Dabei ist eine exakte Übereinstimmung zwischen der siRNA und der Ziel-mRNA von Nöten, um einen effizienten Abbau der Ziel-mRNA zu erreichen.

Neben dem völligen Abbau der Ziel-mRNA kommt es manchmal bei nicht vollständiger Basenpaarung der siRNA zu einer Inhibierung der Translation. Die Menge der vorhandenen mRNA ändert sich dabei nicht, jedoch wird kein Protein gebildet, was durch eine Blockade der Translationsinitiation oder durch einen Translationsstopp an den Ribosomen hervorgerufen werden kann (Olsen and Ambros, 1999; Bartel, 2004).

Innerhalb kurzer Zeit hat sich die RNAi sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Therapie von Krankheiten zu einem wichtigen Werkzeug etabliert. Allerdings konnte diese Technik lange Zeit nur in niederen Modelorganismen wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* angewandt werden, da lange doppelsträngige RNA-Moleküle in Säugerzellen eine unspezifische Interferonantwort auslösen (Stark et al., 1998; Williams, 1997).

Durch die Arbeiten von Tuschel et al. wurde es möglich, die RNAi auch in höheren Eukaryoten einzusetzen. Sie zeigten, dass durch doppelsträngige kleine RNA-Moleküle mit einer Länge von 21 Nukleotiden (siRNA) sequenzspezifisch die Expression von Zielgenen effizient inhibiert werden kann, ohne die Interferonantwort zu induzieren (Elbashir et al., 2001a). Aufgrund empirisch gewonnener Erkenntnisse über Struktur und Effizienz der siRNAs wurden anschließend grundlegende Empfehlungen für das Design von siRNAs ermittelt (Elbashir et al., 2001c; Elbashir et al., 2001c; Elbashir et al., 2001b).



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus nach Einbringen exogen synthetisierter siRNA und shRNA exprimierender Vektoren.

Die chemisch synthetisierten siRNAs werden in die Zellen transfiziert, binden dort direkt an den RISC und initiieren so den Abbau der Ziel-mRNA (Abb. 1.4). Jedoch wirken diese transfizierten siRNAs nur über einen begrenzten Zeitraum von einigen Tagen. Für ein länger anhaltendes *Silencing* werden daher Plasmide als Vektoren verwendet, die ebenfalls in die Zelle transfiziert werden und dort durch einen RNA-Polymerase-III-Promotor (H1- oder U6-Promoter) kontinuierlich short hairpin-RNAs (shRNA) transkribieren (Yu et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002). Diese werden anschließend durch das nukleäre Protein Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert, dort von DICER durch Entfernung des *loops* prozessiert und wie die siRNAs anschließend in den RISC-Komplex eingelagert (Lund et al., 2004).

Alternativ können auch virale Vektoren, wie Adenovektoren (Xia et al., 2002), retrovirale Vektoren (Barton and Medzhitov, 2002; Brummelkamp et al., 2002) oder adenoassoziierte Virusvektoren (Tomar et al., 2003) zur Expression von shRNAs genutzt werden. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Transduktion von schwer zu transfizierenden Zellen, wie Primärzelllinien, aber auch im Rahmen von

gentherapeutischen Ansätzen *in vivo*. Gerade hier sind Langzeitexpression und eine hohe Transduktionseffizienz von entscheidender Bedeutung und ermöglichen den Einsatz *in vivo*.

### **1.3.2 Antivirale Therapie mittels RNAi gegen virale Zielstrukturen**

In den letzten Jahren gab es bereits große Fortschritte, mit Hilfe der RNAi antivirale Therapieformen zu etablieren, wobei unterschiedliche Ansatzpunkte gewählt wurden. Überwiegend wurden virale Gene als Zielstruktur genutzt, wie zum Beispiel bei antiviralen Ansätzen gegen Herpes Simplex Virus 2 (Palliser et al., 2006), SARS (Li et al., 2005), Hepatitis-B und -C (McCaffrey et al., 2003; Takigawa et al., 2004), HHV6 (Yoon et al., 2004), CMV (Wiebusch et al., 2004) und HIV (Park et al., 2003). Dabei konnten sowohl *in vitro* als auch bei *in vivo*-Ansätzen eine Inhibierung der viralen Replikation festgestellt und pathologische Effekte verringert werden (van Rij and Andino, 2006).

Ein therapeutischer RNAi-Ansatz basierend auf siRNAs gegen das Respiratorische Syncytialvirus (RSV), das vor allem bei Kindern und immunsupremierten Menschen tödliche Infektionen auslösen kann, hat gegenwärtig die klinische Phase I abgeschlossen, ohne auftretenden Nebenwirkungen (Bitko et al., 2005).

Durch die hohe Mutationsrate vor allem bei RNA-Viren besteht dabei jedoch die Möglichkeit, dass resistente Varianten entstehen, welche in der siRNA-Zielsequenz Mutationen aufweisen, wodurch die siRNA/shRNA wesentlich ineffizienter arbeitet oder gar keinen inhibitorischen Effekt mehr zeigt (Gitlin et al., 2005; Das et al., 2004; Boden et al., 2003; Wilson and Richardson, 2005). Dabei reicht unter Umständen bereits eine einzelne Punktmutation in der Sequenz um den RNAi-Ansatz wirkungslos zu machen (Merl and Wessely, 2007). Dies kann unter anderem verhindert werden, indem mehrere siRNA/shRNAs simultan gegen unterschiedliche Sequenzen im viralen Genom eingesetzt werden. So konnte gezeigt werden, dass ein Mehrfachexpressionssystem von shRNAs die Replikation von HIV langfristig blockiert, weil durch die Anwendung von drei oder vier shRNAs die Bildung von Escape-Mutanten effizient verhindert wird (Ter et al., 2006). Des Weiteren kann die RNAi als Bestandteil eines Mehrfach-Therapiekonzeptes gegen virale Infektionen eingesetzt werden.

### 1.3.3 antivirale Therapie mittels RNAi gegen zelluläre Zielstrukturen

Weitere vielversprechende Ziele für einen antiviralen Ansatz basierend auf RNAi bieten Gene, die zwar zellulären Ursprungs sind, aber wichtig für die Infektion bzw. Replikation des Virus sind. Zwei Strategien können dabei unterschieden werden. Die Herunterregulation des Rezeptors auf der Zelloberfläche strebt die Blockade der Rezeptor-Virus-Interaktion an, um in einer frühen Phase die zelluläre Virusaufnahme zu inhibieren, so zum Beispiel bei HIV (Anderson and Akkina, 2005; Arrighi et al., 2004). Ein zweiter Ansatz ist die Inhibierung der viralen Replikation durch Reduktion zellulärer Proteine, die in den viralen Replikationszyklus involviert sind (Gao et al., 2004; Ping et al., 2004). So zeigt die RNAi basierte Herunterregulation der Rab9 GTPase, die in den Endosomen-*trans*-Golgi-Transport involviert ist, eine effiziente Inhibierung der HIV-Replikation. Ebenfalls kann an dieser Stelle die Replikation von Masernvirus und Marburg- bzw. Ebolavirus inhibiert werden, da diese ebenfalls auf die Rab9 GTPase angewiesen sind (Murray et al., 2005).

### 1.3.4 RNAi als antivirale Therapie bei CVB3-Infektionen

Um das Potential der RNAi als Therapiekonzept gegen CVB3-Infektionen zu testen, wurden eine Reihe von siRNAs und antisense Oligonucleotide gegen verschieden virale Zielstrukturen hinsichtlich ihrer Effizienz evaluiert. Unterschiedliche Sequenzen auf dem CVB3-Genom wurden dabei als Zielstruktur ausgetestet, u. a. das Kapsidproteine VP1, die virale Polymerase (RdRP), die UTR-Bereiche und die virale Protease (2A) (Yuan et al., 2004; Merl et al., 2005; Schubert et al., 2005; Werk et al., 2005). Die Inhibierung der CVB3-Replikation war je nach Ansatz unterschiedlich hoch, die effizienteste betrug jedoch meist ca. 1 - 3log<sub>10</sub>-Stufe *in vitro*. Dabei wurde eine Reduktion der CVB3-RNA, der CVB3-Proteine und infektiösen Partikel beobachtet. Ebenfalls konnten die Zellen vor einer replikationsbedingten Lyse geschützt werden; ein Effekt, der jedoch meist nur über wenige Stunden bis hin zu maximal zwei Tagen anhielt (Werk et al., 2005). Auch *in vivo* Untersuchungen wurden mit einigen siRNAs vorgenommen, die in den *in vitro* Studien eine besonders gute inhibitorische Effizienz zeigten. Dabei wurden die siRNAs mittels hydrodynamischer Transfektion in Mäuse eingebracht und die Effizienz der

antiviralen Therapie hinsichtlich Mortalitätsrate, Virusreplikation und Pathohistologie bewertet. Innerhalb eines Beobachtungszeitraums von bis zu 42 Stunden nach der Infektion konnte eine Inhibierung der CVB3-Infektion beobachtet werden, gekennzeichnet durch eine starke Reduktion der viralen Proteinexpression und Virusreplikation. Des Weiteren verringerte sich die Mortalitätsrate der behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Merl et al., 2005).

Als ein Vertreter der RNA-Viren zeigen Coxsackieviren, ebenso wie Retroviren, eine hohe Mutationsrate, welche die Bildung von Escape-Mutanten beschleunigt. So wurde in einer Untersuchung beobachtet, dass mit einer hocheffizienten siRNA zwar eine Inhibierung der CVB3-Replikation um  $5\log_{10}$ -Stufen erzielt werden konnte. Wurden jedoch die Nachkommen-Viren erneut auf Zellen gegeben, die mit der gleichen siRNA behandelt wurden, zeigte diese keinerlei inhibierende Wirksamkeit. Sequenzanalysen ergaben, dass diese Viren genau in der Zielsequenz der siRNA eine Punktmutation aufwiesen, wodurch der RNAi-Mechanismus wirkungslos wurde. Die Bildung von Escape-Mutanten konnte verhindert werden, indem von der ersten Behandlung an die CVB3-Infektion mit zwei oder drei unterschiedlichen siRNAs gegen verschieden Zielstrukturen auf dem CVB3-Genom behandelt wurde (Merl and Wessely, 2007).

Um das Problem der Escape-Mutanten zu umgehen, wurde zusätzlich in einem initialen Ansatz versucht, die Infektion und Replikation von CVB3-Viren durch Herunterregulation des zellulären Rezeptors CAR auf den Zielzellen zu inhibieren. Dabei konnte in den behandelten Zellen eine Inhibierung der Virusreplikation von 60 % im Vergleich zur Kontroll-siRNA gemessen werden (Werk et al., 2005).

#### **1.4 Lösliche Rezeptoren als antivirale Therapieansätze**

Die Identifikation der zellulären Rezeptoren über die Viren Zielzellen infizieren, ermöglichte einen antiviralen Therapieansatz mittels rekombinanter löslicher Virusrezeptoren. Dazu wurden natürlich vorkommende bzw. gentechnisch hergestellte, oft mit strukturellen Modifikationen versehene, rekombinant oder als Transgen exprimierte lösliche Rezeptormoleküle im Rahmen von antiviralen Therapieansätzen getestet. Die prinzipielle Wirkungsweise beruht dabei vor allem auf

einer sterischen Inhibierung der viralen Rezeptorbindungsstellen durch das lösliche Rezeptorprotein.

Ein protektiver Effekt dieser löslichen Virusrezeptoren wurde für eine ganze Reihe von Viren beschrieben, beispielsweise für HIV (Fisher et al., 1988; Deen et al., 1988), Adenoviren (Lim et al., 2006), Masernviren (Seya et al., 1995) und HHV6 (Santoro et al., 1999). So wird z. B. das Vorhandensein von löslichem CCR5 im Serum, ein Corezeptor für HIV im Zusammenhang mit natürlich vorkommender HIV-Immunität diskutiert (Tsimanis et al., 2005).

Bei Picornaviren kann die Interaktion von löslichen Rezeptoren mit den Virusrezeptordeterminanten zusätzlich zur Bildung von A-Partikeln führen, was durch eine irreversible Konformationsänderung mit Verlust der Infektiösität gekennzeichnet ist. So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Rhinovirus mit zwei unterschiedlichen löslichen (solublen, s)ICAM-Varianten den Verlust des VP4 und des RNA-Genoms nach sich zieht, was zu einem wirksamen Schutz der Zielzellen vor replikationsbedingter Zellyse führte (Greve et al., 1991).

Auch bei Polioviren wurde dieser Effekt gezeigt. Dabei konnte löslicher PVR (Polivirusrezeptor) die Zielzellen effizient vor einer Infektion mit Polioviren schützen. Diese protektive Eigenschaft gründete einerseits auf der Blockierung der Bindungsdomänen des Virions und andererseits auf Bildung von A-Partikeln mit Verlust der Infektiösität (Kaplan et al., 1990).

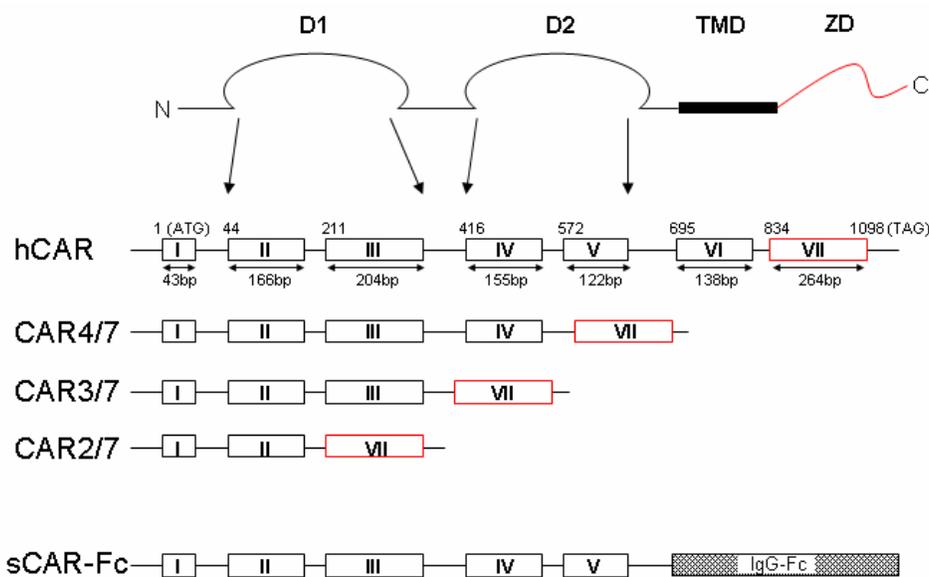
Auch gegen Coxsackie-B-Viren und speziell gegen CVB3 wurden verschiedene antivirale Strategien auf der Basis von löslichen Rezeptoren getestet. Sowohl löslicher CAR (sCAR) als auch löslicher DAF (sDAF) wurden dabei hinsichtlich ihrer Effizienz *in vitro* und *in vivo* untersucht (Kapitel 1.4.2).

#### **1.4.1 Natürlich vorkommende lösliche CAR-Varianten**

Durch alternatives Splicing können neben dem zellulären membranständigen CAR, verschiedene lösliche CAR-Varianten gebildet werden, die im Interstitium und in der Zirkulation auftauchen (Abb. 1.5). Zwei von drei der bisher nachgewiesenen löslichen CAR-Varianten, CAR3/7 und CAR4/7, sind in der Lage, mit dem CVB3-Virion zu interagieren und dadurch eine CVB3-Infektion zu inhibieren (Dorner et al., 2004). Voraussetzung für die Interaktion mit CAR scheint dabei eine intakte D1-Domäne zu

sein, da sich dort die Bindungsstellen für CVB3 befinden. Interessanterweise konnte auch eine dritte natürlich vorkommenden CAR-Variante, CAR2/7, welche eine im C-Terminus deletierte D1-Domäne besitzt, die CVB3-Infektion in HeLa Zellen inhibieren (Dorner et al., 2004). Dieser inhibierenden Wirkung scheint jedoch ein bisher nicht näher determinierter Mechanismus zu Grunde zu liegen, da CAR2/7 CVB3 nicht wie die anderen sCAR-Isoformen binden kann.

Obwohl die Bindungsstellen für die Adenovirus-Fiber-Domäne ebenfalls in der D1-Region des CAR liegen, können Adenoviren nicht mit einem in der D2-Domäne deletierten CAR-Rezeptor interagieren. Dies deutet darauf hin, dass die D2-Domäne als strukturelle Komponente, möglicherweise jedoch auch nur als Spacer, bei der Virus-Rezeptor-Interaktion eine signifikante Bedeutung haben könnte (van Raaij et al., 2000; Excoffon et al., 2005).



**Abb. 1.5:** CAR und lösliche CAR-Varianten (sCAR)

In Maus und Ratte, jedoch nicht beim Menschen, konnte ein weiteres, als CAR-Like-Soluble-Protein (CLSP) bezeichnetes, Protein nachgewiesen werden. Dieses Protein gehört ebenso wie CAR zur Immunglobulin-Superfamilie, besitzt drei nahezu sequenzidentische IgV1-Domänen, welche jeweils eine signifikante Sequenzhomologie zur D1-Domäne des Maus-CAR aufweisen. Auf Grund des Fehlens einer Transmembran-Domäne ist es ein lösliches Protein. Ein homologes Protein beim Menschen existiert offensichtlich nicht. CLSP ist in der Lage, an Adenoviren zu binden und die Infektion der Zelle zu inhibieren, da eine Vielzahl von

AS, mit denen CAR über die D1-Domäne an Adenoviren bindet, mit diesem Protein übereinstimmen. Letzteres wurde auch für Coxsackieviren festgestellt, aber Analysen, die eine eventuelle Bindung bzw. Inhibierung von Coxsackieviren durch CLSP untersuchen, wurden bis jetzt noch nicht durchgeführt (Coyne and Bergelson, 2005; Kawabata et al., 2007).

#### **1.4.2 Antivirale Wirksamkeit von löslichen CVB-Rezeptoren**

Neben dem antiviralen Effekt von natürlich vorkommenden löslichen CAR-Varianten *in vitro* konnte in weiterführenden Untersuchungen ebenfalls eine Wirksamkeit *in vivo* gezeigt werden. Dafür wurde CAR4/7 rekombinant hergestellt und in einem Maus-Myokarditismodel getestet. Überraschender Weise konnte dadurch zwar eine Verringerung der CVB3-Menge im Herzen erreicht werden, aber im Vergleich zu Kontrolltieren keine Abnahme der kardialen Inflammation (Dorner et al., 2006).

Weiterführend wurden auch antivirale Effekte von modifizierten löslichen Varianten der CVB3-Rezeptoren DAF und CAR analysiert. Diese wurden entweder rekombinant hergestellt und als aufgereinigte Proteine appliziert oder von Plasmidvektoren exprimiert. Um die Stabilität des Proteins zu erhöhen, wurde dabei die extrazelluläre Domäne von CAR bzw. DAF mit der Fc-Domäne des humanen IgG1 fusioniert. Die entstehenden löslichen Rezeptorproteine bilden Dimere und besitzen eine deutlich verlängerte Halbwertszeit und verbesserte Solubilisierungseigenschaften. So konnte durch Fusion des sDAF mit der IgG1-Fc-Domäne die Halbwertszeit im Serum von Ratten auf das 100-fache von 20 min auf 33 h erhöht werden (Harris et al., 2002). Weiterhin vermittelt der Fc-Teil die Aufnahme des gebundenen Virus durch Makrophagen und damit die Eliminierung durch das Immunsystem (Marchant et al., 2008).

Im direkten Vergleich war sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die antivirale Wirksamkeit des sDAF-Fc um ein Vielfaches niedriger als die des sCAR-Fc, was sich auch in einer deutlichen Verringerung der patho-histologischen Veränderungen bei CVB3 infizierten Mäusen *in vivo* zeigte (Yanagawa et al., 2004; Goodfellow et al., 2005; Yanagawa et al., 2003). Ursächlich verantwortlich hierfür scheinen unterschiedliche Wirkmechanismen beider löslichen Rezeptorproteine zu sein. Zum einen ist die Bindungsaffinität von sDAF-Fc zu CVB3 10.000-fach niedriger als die zwischen

sCAR-Fc und dem CVB3-Kapsid. Des Weiteren basiert die Inhibierung des CVB3 durch sDAF-Fc auf einer reversiblen Blockierung der Bindungsdomänen für den zellulären Rezeptor auf dem Virion. Dagegen induziert die Interaktion von sCAR-Fc mit dem CVB-Kapsid die Bildung von A-Partikeln, gekennzeichnet durch einen irreversiblen Verlust der Infektiösität (Kapitel 1.4) (Goodfellow et al., 2005).

Neben der virus-neutralisierenden Wirkung von sCAR-Fc und sDAF-Fc wurden sCAR-DAF-Fc und sDAF-CAR-Fc Hybridfusionsproteine analysiert. Nur sCAR-DAF-Fc wies dabei *in vitro* und *in vivo* eine ähnliche hohe, zum Teil sogar höhere CVB3-inhibierende Wirkung als sCAR-Fc auf. sDAF-CAR-Fc war hingegen nahezu ohne Wirkung. Es scheinen deshalb auch strukturelle Unterschiede in den generierten Fusionsproteinen von großer Bedeutung für Ihre Wirksamkeit zu sein (Lim et al., 2006). Wurden sDAF-Fc und sCAR-Fc nach einer CVB3-Infektion appliziert, konnte zwar ein inhibitorischer Effekt auf die virale Replikation im Herzen nachgewiesen werden, jedoch keine Verringerung der patho-histologischen Veränderungen (Yanagawa et al., 2003; Yanagawa et al., 2004).

## 1.5 Regulierbare Genexpressionssysteme

Regulierbare Genexpressionssysteme spielen eine wichtige Rolle für die Effizienz und Sicherheit in der Gentherapie. Dabei bietet die Regulation der Transgenexpression, eine Möglichkeit die Konzentration des Transgenproduktes in einem therapeutisch notwendigen, aber nicht toxischen Maß aufrechtzuerhalten. Weiterhin kann im Fall unerwarteter Nebenwirkungen oder Komplikationen, die Expression abgeschaltet und somit die Therapie beendet werden.

Die wichtigsten Eigenschaften, die ein regulierbares Expressionssystem aufweisen sollte, sind eine niedrige Basalaktivität, eine hohe Expression nach der Induzierung, eine gute Regulierbarkeit der Expression über die Menge des Induzer und die Möglichkeit der einfachen und nebenwirkungsfreien Verwendung *in vivo* (Mizuguchi et al., 2003).

In den letzten Jahren wurden verschiedene regulierbare Expressionssysteme in Säugierzellen entwickelt, wie zum Beispiel das Tetrazyklin-regulierbare System (Gossen and Bujard, 1992; Gossen et al., 1995), das Ecdysone-induzierbare Expressionssystem (No et al., 1996), das Mifepristone-induzierbare Expressions-

system (Tsai et al., 1998) und das Dimerizer-induzierbare Expressionssystem (Ho et al., 1996; Magari et al., 1997).

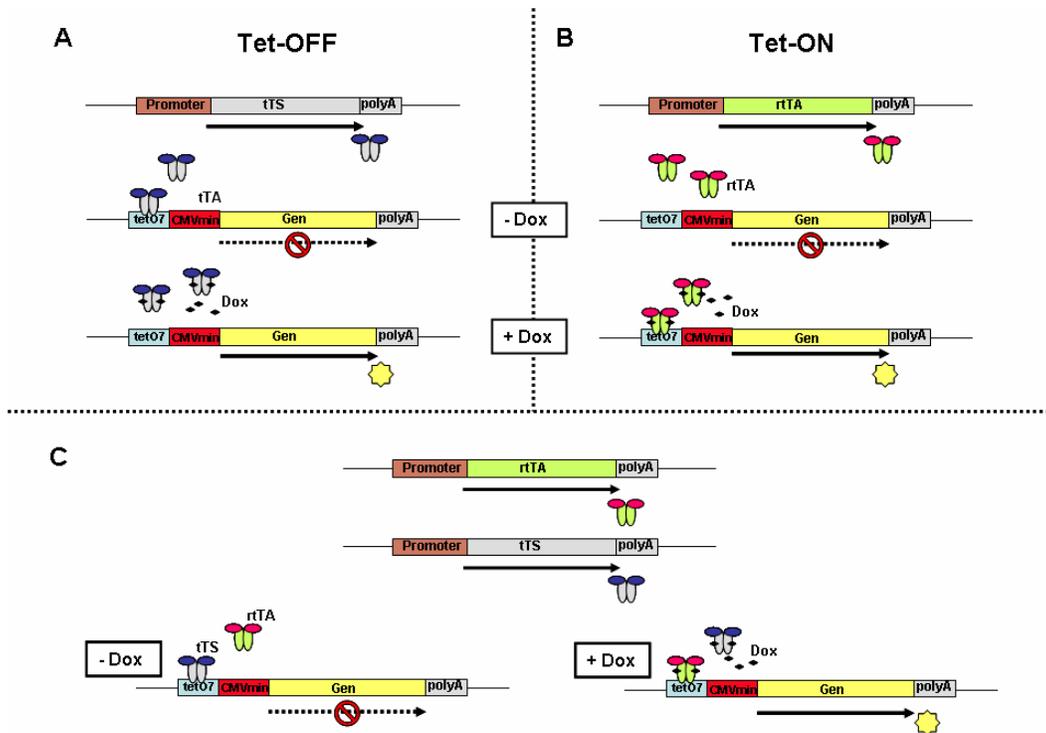
### 1.5.1 Das Tetrazyklin-regulierbare Expressionssystem

Das Tetrazyklin-regulierbare System (Tet-System) ist das am häufigsten verwendete Regulationssystem. Es basiert auf dem Tetrazyklin-Resistenzoperon von *Escherichia coli*. Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Ansätze, wie mit diesem System die Genexpression reguliert werden kann (Gossen and Bujard, 1992; Gossen et al., 1995).

#### Tet-OFF-Regulierung

Das Tet-OFF-System (Abb. 1.6\_A) besteht aus dem chimerischen Protein tTA, welches aus der c-terminalen-Domäne (127 AS) des Herpes-Simplex Virus VP16-Protein (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000) und dem tet-Repressors (tetR) ein DNA-bindendes Protein besteht. Der tTA ist konditionell aktiv und bindet in Abwesenheit von Tetrazyklin oder seinem Derivat Doxyzyklin (Dox) mit hoher Spezifität und Affinität an eine spezifische regulatorische DNA-Region, bestehend aus einer sich siebenmal wiederholenden tet-Operator-Sequenz (tetO<sub>7</sub>) *upstream* eines minimalen CMV-Promotors (Tetrazyklin-regulierter Promotor, TRE). Anschließend transaktiviert die VP16-Domäne des tTA die Expression des distal sich befindenden Transgens, indem sie den Zusammenbau des transkriptionalen Initiationskomplexes vermittelt. Die Bindung von Tetrazyklin bzw. Dox an tTA führt zu einer Konformationsänderung in der tetR-Region, die die Loslösung des tTA vom tetO<sub>7</sub> und dadurch den Verlust der Transaktivierung bewirkt (Baron and Bujard, 2000). Die Expression des Transgens wird unterbrochen (Gossen and Bujard, 1992).

Das Tet-OFF-System wurde in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien angewandt, hat jedoch für eine therapeutische Anwendung den Nachteil, dass eine kontinuierliche Zugabe von Tetrazyklin oder Dox für die Inaktivierung der Transgenexpression erforderlich ist.



**Abb. 1.6:** Schematische Darstellung des Tet-On- und Tet-OFF-System

### Tet-ON-Regulierung

Gossen *et al* entwickelten 1995 durch Mutagenese des tTA den reversen tTA (rtTA), der im Gegensatz zu tTA die Transkription des Zielgens in Gegenwart von Dox aktiviert und ohne den Inducer inaktiv ist (Abb. 1.6\_B) (Gossen et al., 1995). Diese Version zeigte ihrerseits jedoch neben einer hohen Instabilität *in vivo* (Mizuguchi and Hayakawa, 2002) wesentliche Nachteile: Zum einen war die Affinität des rtTA zu Dox gering, so dass eine hohe Dosis vom Inducer für eine effiziente Aktivierung erforderlich war, zum anderen war das System mit einer relativ hohen basalen Aktivität aufgrund der unspezifischen Bindung des rtTA an tetO<sub>7</sub> in Abwesenheit des Inducers verbunden.

Eine weitere bedeutende Verbesserung des Tet-Systems stellte die Entwicklung des Dox-abhängigen transkriptionalen Silencer (tTS) dar (Deuschle et al., 1995). Dabei wurde der tTS durch Fusion des tetR mit der KRAB (Kruppel-associated-Box)-Repressionsdomäne des humanen Kid-Proteins generiert. Der tTS bindet durch tetR an die Regulatorregion tetO<sub>7</sub> in Abwesenheit von Dox und KRAB reprimiert die Promotoren. Durch Dox-Zugabe dissoziiert der tTS vom tetO<sub>7</sub> und die transkriptionelle Suppression wird aufgehoben.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Dimerisierungsdomänen im rtTA und tTS war es möglich, beide miteinander zu kombinieren (Abb. 1.6\_C). Dabei bindet in Anwesenheit von Dox der Transaktivator rtTA an tetO<sub>7</sub> und das Transgen wird abgelesen. Durch Weglassen des Dox, dissoziiert einerseits rtTA vom tetO<sub>7</sub> und die transaktivierende Wirkung wird aufgehoben. Andererseits bindet tTS an die Regulatorregion und reprimiert zusätzlich die Transkription. So konnte die Basalaktivität des rtTA weiter verringert und somit eine strengere Regulation der Transgenexpression erreicht werden (Freundlieb et al., 1999).

Durch weitere Mutationsexperimente am rtTA sollte eine weitere Optimierung des Tet-Systems erzielt werden. Dies führte zu zwei rtTA-Mutanten (rtTA2<sup>S</sup>-M2 und rtTA2<sup>S</sup>-S2), die verbesserte Eigenschaften gegenüber dem ursprünglichen rtTA zeigten (Urlinger et al., 2000). Dabei zeichnete sich der rtTA2<sup>S</sup>-S2 durch eine strenge Regulierbarkeit, eine nicht detektierbare Aktivität in Abwesenheit vom Inducer bei einem vergleichbaren Aktivierungspotential wie rtTA aus. Dagegen zeigte rtTA2<sup>S</sup>-M2 eine höhere Affinität zu Dox bei kaum zu detektierender Background-Aktivität. Dabei konnte eine maximale Aktivierung mit rtTA2<sup>S</sup>-M2 bei 10-fach niedrigerer Doxyzyklin-Dosis im Vergleich zu rtTA und rtTA2<sup>S</sup>-S2 erreicht werden (Urlinger et al., 2000).

In einem *in vivo* Experiment konnte sowohl der rtTA2<sup>S</sup>-M2 als auch rtTA2<sup>S</sup>-S2 benutzt werden, um die Expression eines Transgens (Erythropoetins) nach DNA-Mikroinjektion in adulten Mäuse zu regulieren. Beide Varianten zeigten dabei über zehn Monate eine sehr hohe Induzierbarkeit der Transgenexpression bei deutlich niedrigerer Basalaktivität (Lamartina et al., 2002). Auch durch die Entwicklung von neuen TRE-Promotoren war es möglich die Basalaktivität in Abwesenheit des Inducers zu minimieren (Agha-Mohammadi et al., 2004; Pluta et al., 2005).

### **1.5.2 Das Tetrazyklin-regulierbare Expressionssystem in adenoviralen Vektoren**

Nicht nur die Basalaktivität und Transaktivierbarkeit eines regulierbaren Gen-expressionssystem ist wichtig für die Anwendung *in vitro* oder *in vivo*, sondern auch die Methode der Einbringung dieses Systems in die Zellen. Der Einsatz von viralen Vektoren, vor allem Adenovektoren (Hu et al., 1997; Nakagawa et al., 2001) (Corti et al., 1999b; Corti et al., 1999a) AAV-Vektoren (Rendahl et al., 2002) und retrovirale

Vektoren (Pluta et al., 2005) stellt eine wirksame Methode dar, Fremd-DNA effizient in eine Vielzahl von Zelltypen *in vitro* und *in vivo* einzuschleusen.

Dabei wurde beobachtet, dass die Regulierbarkeit und Basalaktivität des Tet-Systems oft negativ durch die Integration in ein adenovirales Vektorgenom beeinflusst wird. So zeigte z. B. das Tet-ON-System in einem Adenovektor eine viel niedrigere Regulation der Genexpression als bei einem Tet-OFF-System, mit einer maximalen Expression des Transgens bei Tet-ON von weniger als 1/10 des Tet-OFF-Systems. Zusätzlich hatte das Tet-ON-System eine hohe Basalaktivität in Abwesenheit des Inducers Dox (Mizuguchi and Hayakawa, 2002). Wie bereits erwähnt, ist der Einsatz des Tet-OFF-Systems *in vivo* im Rahmen gentherapeutischer Anwendungen nur schwer realisierbar, da eine ständige Gabe des Inducers von Nöten wäre, um das System abzuschalten und dies letztendlich eine erhebliche Belastung des Patienten darstellen würde.

Durch den zusätzlichen Einsatz des tTS konnte auch in Adenovektoren, sowohl die Basalaktivität des Tet-ON-Systems in Abwesenheit von Dox verringert, als auch die Transaktivierbarkeit nach Zugabe des Inducers erhöht werden. Dabei wurde tTS, rtTA und das Transgen von einem Adenovektor kodiert (Rubinchik et al., 2005).

Die Basalaktivität des TRE-Promotors ist ebenfalls vom Insertionsort der einzelnen Bestandteile des Tet-Systems im adenoviralen Genom abhängig. Mizuguchi et al. zeigten, dass die Integration der Expressionskassette für Transaktivator (rtTA), Repressor (tTS) und Transgen in möglichst weit von einander entfernten Regionen im adenoviralen Vektorgenom (Transgene mit TRE-Promotor in E1-Region; rtTA in E3-Region; tTS in E4-Region und 3'ITR) die beste Regulierbarkeit aufwies. Dabei ist die Applikation von nur einem Adenovektor ein weiterer positiver Effekt (Mizuguchi et al., 2003).

Durch Kombination des tTS mit rtTA2<sup>S</sup>-M2 oder rtTA2<sup>S</sup>-S2 wurde gezeigt, dass auch die Replikation von adenoviralen Vektoren Dox-abhängig gemacht werden kann. Fechner et al. kombinierten rtTA2<sup>S</sup>-M2 und tTS zur Regulierung der E1A-Expression in einem E1B-, E3-deletierten replikationskompetenten adenoviralen Vektor und zeigten eine effiziente Regulation der Replikation dieser onkolytischen Adenovektoren (Fechner et al., 2003a).

## 1.6 Gentherapie mittels viraler Vektoren

Bei der Gentherapie handelt es sich im weitesten Sinne um das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen mit dem Ziel einen palliativen oder kurativen Effekt zu erzielen. Dabei wird die Gentherapie in drei grundlegenden Strategien unterteilt. In der *Substitutionstherapie* soll durch Einbringen von Genen eine nicht vorhandene oder fehlerhafte Genexpression ersetzt werden. Diese Strategie wird hauptsächlich bei monogenen Erkrankungen angewandt und wurde bereits in zahlreichen klinischen Studien getestet (Blaese et al., 1995; Blaese, 1995a).

Bei dem Großteil der heute durchgeführten Gentherapiestudien handelt es sich um Anti-Krebs-Therapien (66 %). Dabei wird am häufigsten das Prinzip der *Additionstherapie* verwendet, bei der die physiologische Funktion eines Gens, beispielsweise in der Immunabwehr bei Infektionskrankheiten und Krebs, verstärkt wird (Blaese, 1995b).

Dem gegenüber gestellt ist die *Suppressionstherapie*, bei der durch Einbringen von Nukleinsäuren, die pathologische Wirkung von exprimierten Genen inhibiert werden soll. RNAi und dominant negative Mutanten kommen dabei am häufigsten zum Einsatz. Vor allem auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten scheint die RNAi eine vielversprechende neue Therapiemöglichkeit zu sein, bei der spezifisch das Pathogen mit minimaler Beeinflussung des menschlichen Organismus inhibiert wird.

Das effiziente Einbringen der Nukleinsäuren in das Gewebe ist essenziell für den Erfolg der Therapie und stellt neben Fragen der Sicherheit eine der zentralen Aufgabenstellungen der gentherapeutischen Forschung dar. Virale Vektoren ermöglichen einen effizienten Gentransfer *in vitro* und *in vivo*. Dabei werden Retro-, Adeno- und AAV-Vektoren unter einer Vielzahl von Vektortypen am häufigsten verwendet. Adeno- und AAV-Vektoren kommen, bedingt durch neue Entwicklungen der letzten Jahre, bevorzugt für kardiologische Fragestellungen zum Einsatz.

### 1.6.1 Adenovirale Vektoren

Adenoviren (Adenoviridae) sind nicht umhüllte, doppelsträngige DNA-Viren mit einem Durchmesser von 80 bis 110 nm. Die humanpathogenen Adenoviren werden der Gattung Mastadenovirus zugeordnet und sind in die Subgenera A - F unterteilt (Berk, 2006). Zu den ausführlichsten untersuchten Adenoviren gehören die nahe verwandten

Serotypen 2 und 5 des Subgenus C, die als Wildtypviren nur meist milde Erkältungskrankheiten verursachen. Das ca. 36 kb große Genom enthält am 5'- und 3'-Ende invertierte Sequenzwiederholungen (*inverted terminal repeats*; ITR), die während der DNA-Replikation für die Initiation der Doppelstrangsynthese wichtig sind. Ebenfalls befinden sich im Bereich der 5'-ITR das Verpackungssignal ( $\Psi$ ) und Promotorelemente (Chroboczek et al., 1992; Grable and Hearing, 1990). Das Genom besteht aus frühen Genen E1 - E4, die zeitig, während der Infektion transkribiert werden und den späten Genen (L1 - L5), die für die Expression der Strukturproteine zuständig sind. Das ikosaedrische Kapsid besteht aus sieben verschiedenen Proteinen, unter ihnen Hexon, Penton-Basis und Fiber. Das Fiberprotein sitzt an den, durch das Penton-Basis-Protein gebildeten, Ecken des Kapsids und vermittelt die Anheftung an den Rezeptor auf den Zielzellen. Der zelluläre Rezeptor für die initiale Anheftung vieler Adenoviren (Adenovirus A und C-F) ist der CAR, während für die Internalisierung des Virus Integrine genutzt werden (Bergelson, 1999).

Adenoviren können teilende, aber auch postmitotisch ruhende Zellen des Hals-Nasen-Rachenraumes, der Lunge und des Verdauungstraktes infizieren. Nach Infektion der Zielzelle wird das Genom im Zellkern entpackt. Durch Transkription der frühen Gene, ca. 8 Stunden nach Infektion, werden die DNA-Replikation und später die Kapsid-Produktion initiiert. Die Dauer eines Infektionszyklus beträgt zwischen ein und drei Tagen und unter optimalen Bedingungen entstehen dabei, durch Lyse der infizierten Zelle, etwa 1.000 - 10.000 neue Viruspartikel.

Adenovirale Vektoren (AdV) werden häufig als Gentransfervektoren (besonders Serotyp 2 und 5) eingesetzt. Sie besitzen die Vorzüge, dass sie relativ große Transgenkassetten aufnehmen und ein sehr breites Spektrum an Zelltypen und Geweben transduzieren können. Sie integrieren nicht in das Wirtszellgenom und gewährleisten eine hohe Expression des Transgens (Majhen and mbriovic-Ristov, 2006; Harui et al., 1999). Ebenso können sie mit einfachen Mitteln in großen Mengen und hohen Konzentrationen hergestellt werden (Wilson, 1996). Nach systemischer Applikation *in vivo* weisen sie einen ausgesprochenen Lebertropismus auf (Fechner et al., 1999; Schiedner et al., 2003; Smith et al., 2002).

Bei adenoviralen Vektoren wird zwischen Vektoren der ersten, zweiten und dritten Generation unterschieden. Adenovirale Vektoren der ersten Generation enthalten Deletionen der für die Replikation essentiellen E1- und optional der E3-Genregion.

Dadurch verlieren die Vektoren in den meisten Zellen ihre Replikationskompetenz. Die Transgenkapazität der E1/E3-deletierten Vektoren beträgt ca. 8,2 kb (Danthinne and Imperiale, 2000; Lai et al., 2002). Adenovektoren der ersten Generation lösen eine starke Immunantwort aus, hauptsächlich verursacht durch die *de novo* Synthese viraler Proteine (Gilgenkrantz et al., 1995; Yang et al., 1996). Dies führt zur Eliminierung der transduzierten Zellen aus dem Organismus durch das Immunsystem, wodurch die Transgenexpression meist nur auf einen kurzen Zeitraum begrenzt ist (Majhen and mbriovic-Ristov, 2006).

In den adenoviralen Vektoren der zweiten Generation wurden weitere Deletionen der E2- und E4-Region eingeführt, wodurch die Transgenkapazität auf etwa 14 kb erhöht werden und die Attenuierung verbessert werden konnte (Gorziglia et al., 1996; Lusky et al., 1998; Gao et al., 1996). Durch die fehlende Genexpression der späten Gene konnte bei diesen Vektoren auch die Immunantwort gegen transduzierte Zellen verringert werden (Russell, 2000; Amalfitano et al., 1998). Die Vermehrung dieser replikationsinkompetenten Viren wird durch transkomplementierende Zelllinien, die stabil die fehlenden Gene exprimieren, ermöglicht (Zhou et al., 1996; Wang et al., 1995).

Die einzigen essentiellen Sequenzen im adenoviralen Genom sind die ITRs und das Verpackungssignal ( $\Psi$ ), das sich im Bereich der 5'-ITR befindet. Daher wurden in einer neuen Generation von adenoviralen Vektoren alle weiteren DNA-Sequenzen (alle E- und L-Gene) entfernt und nur ca. 400 bp am 3'-Ende und ca. 120 bp am 5'-Ende beibehalten (Fisher et al., 1996a; Kochanek et al., 1996). Die so entstandenen *High capacity*- oder *gutless*-Vektoren (3. Generation) besitzen eine Kapazität von etwa 36 kb, wodurch das Einsatzspektrum erheblich vergrößert (z. B. Einbringen des 14 kb großen Dystrophingen) und ebenso eine Erhöhung der Spezifität (gewebsspezifische Promotoren) und Sicherheit (Verwendung von regulierbaren Expressionssystemen) der Transgenexpression ermöglicht wird (Kumar-Singh and Chamberlain, 1996; Hardy et al., 1997). Ein zusätzlicher Vorteil ist das Fehlen einer viralen Genexpression, wodurch zytotoxische und immunogene Eigenschaften ebenfalls minimiert wurden. Dadurch garantieren diese Vektoren eine Langzeitexpression der Transgene. Ein Nachteil stellt aber immer noch eine relativ komplizierte und ineffiziente Vektorproduktion dar (Maione et al., 2000).

Die Bandbreite, in der adenovirale Vektoren eingesetzt werden, reicht von Impfvektoren, z. B. für Vakzine gegen HIV (Catanzaro et al., 2006), Ebola (Sullivan et

al., 2006) und Influenza (Gao et al., 2006), über Vektoren zur Tumorthherapie (Hoffmann et al., 2007) bis hin zu Einsätzen in der Gentherapie bei Krankheiten durch angeborene Gendefekte wie cystischer Fibrose (Harvey et al., 1999), Ornithin-Transcarbamylase Defizienz (Raper et al., 2002) oder Hämophilie A (High, 2003).

### 1.6.2 Adeno-assoziierte-Virus Vektoren

Adeno-assoziierte Viren (AAV) gehören zur Familie der Parvoviridae, und in dieser zum Genus der Dependoviren. Wie der Name schon sagt, benötigen sie sogenannte Helferviren, wie z. B. Adenoviren oder Herpesviren, um in Zielzellen zu replizieren. Über 100 verschiedene Serotypen konnten bis jetzt aus Menschen und Primaten isoliert werden. Sie bestehen aus einem 20 – 25 nm großen Kapsid ohne Hülle und einem einzelsträngigen DNA-Genom mit einer Größe von ca. 4,7 kb (Berns, 1990; Berns and Giraud, 1996). Diese DNA besteht aus zwei Genen, *rep* und *cap*, wobei *rep* für Proteine kodiert, die in die DNA-Replikation involviert sind, während *cap* durch differenzielles Splicen drei Proteine exprimiert, die das Kapsid bilden (Hermonat et al., 1984).

AAV-Vektoren besitzen wie auch Adenovektoren einen breiten Gewebetropismus und transduzieren sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen. Besonders herausragend ist ihre Eigenschaft, eine Langzeitstabilität der Transgenexpression bis über mehrere Jahre zu gewährleisten (Hermonat et al., 1984; Kaplitt et al., 1994a; Xiao et al., 1996c).

Obwohl AAV an definierten Stellen in das Wirtszellgenom integrieren können, wurde dieses Phänomen bei den AAV-Vektoren nicht beobachtet, was negative Effekte, wie z. B. bei retroviralen Vektoren minimiert (Kay and Nakai, 2003; Nakai et al., 2001). Ein weiterer Vorteil dieser viralen Vektoren ist, dass bis jetzt keine mit AAV assoziierten Krankheitsbilder beobachtet wurden und dass sie in den infizierten Zellen nicht autonom replizieren. Des Weiteren wurde nur eine minimale zellvermittelte Immunantwort gegen AAV-Vektoren beobachtet und auch Microarray-Studien zeigten eine minimale Beeinträchtigung des zellulären Expressionslevels in AAV-Vektor-transduzierten Zellen (Stilwell et al., 2003). Ebenfalls konnte in Geweben, die mit AAV-Vektoren transduziert wurden generell keine Inflammation festgestellt werden (Conrad et al., 1996).

Ursprüngliche AAV-Vektoren wurden auf Basis des Serotyps AAV2 entwickelt. Allerdings zeigten diese Vektoren eine geringe Transduktionseffizienz *in vivo* und einen ausgesprochenen Lebertropismus. Durch die Entwicklung pseudotypisierter AAV-Vektoren, die das virale *backbone* mit ITR, Verpackungssignal und rep-Gen vom AAV2-Serotyp besitzen, jedoch die Kapsidproteine von anderen AAV-Serotypen aufweisen, konnte die Gewebespezifität und Transduktionseffizienz entscheidend verbessert werden (Rabinowitz et al., 2002). So weisen AAV2/1-, AAV2/7- und AAV2/9-Vektoren (Kapsidproteine von AAV1, AAV7 und AAV9-Serotyp) beispielsweise einen deutlich verbesserten muskelspezifischen Gentransfer auf (Gao et al., 2002) und AAV2/6 transduziert effizienter Lungenepithelzellen als AAV2 (Halbert et al., 2001). Für den herzspezifischen Gentransfer stellten sich AAV2/8 und AAV2/9 als am besten geeignet heraus (Palomeque et al., 2007; Pacak et al., 2006). So konnte z. B. eine 80 %ige Transduktionseffizienz des Herzens bei systemischer Applikation von  $1 \times 10^{11}$  Partikel AAV2/9 erreicht werden (Inagaki et al., 2006; Lyon et al., 2008). Neben der hohen Transduktionsrate stellt eine rasche Genexpression für viele Anwendungen eine essentielle Voraussetzung dar. Bei konventionellen AAV-Vektoren mit einzelsträngigem Vektorgenom wird die Transgenexpression *in vivo* aufgrund einer ineffizienten Doppelstrangsynthese zum Teil um Wochen verzögert (Ferrari et al., 1996; Fisher et al., 1996b). Durch neu entwickelte so genannte selbstkomplementierende (sc)AAV-Vektoren, die aufgrund einer Mutation in der terminal resolution site (trs) ein dimerisches Vektorgenom in das Kapsid verpacken, wird so, eine schnelle und hohe Transgenexpression binnen weniger Tage nach Applikation erreicht (McCarty et al., 2003; McCarty et al., 2001). Besonders vorteilhaft für den Einsatz von AAV-Vektoren im Rahmen therapeutischer *in vivo* Anwendungen, hat sich darüber hinaus eine in den letzten Jahren erzielte Verbesserung der Produktionstechnologie ausgewirkt, die es ermöglicht, die Vektoren in hohen Titern und großer Reinheit zu produzieren (Xiao et al., 1998; Drittanti et al., 2000).

## 1.7 Ziel der Arbeit

Die Myokarditis ist eine häufig vorkommende entzündliche Erkrankung des Myokards mit unterschiedlicher klinischer Ausprägung und kann durch idiopathische, autoimmune und vor allem infektiöse Agenzien ausgelöst werden (D'Ambrosio et al., 2001). Besonders Enteroviren und speziell Coxsackieviren der Gruppe B (CVB) können eine akute Myokarditis hervorrufen und stehen ebenfalls im Verdacht ein auslösendes Pathogen bei Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) zu sein (Knowlton and Badorff, 1999).

Bei viralverursachter Myokarditis infiziert das Virus vor allem Kardiomyozyten und führt so Replikationsbedingt zu deren Lyse (Kandolf et al., 1985; Kandolf et al., 1985; Yajima et al., 2006). Reaktiv kommt es zur Infiltration von leuko- bzw. lymphozytären Entzündungszellen (Kawai, 1999). Während im akuten Verlauf das Virus aus dem Herzen eliminiert wird und die Inflammation abklingt, kommt es im chronischen Verlauf, zu einer fortlaufenden Inflammation und Strukturveränderungen des Herzens, bedingt durch Fibrose und interstitiellem Remodeling (Kawai, 1999; Pauschinger et al., 2002). Klinisch manifestiert sich die DCM in der Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion bis hin zur Herzinsuffizienz, dem Unvermögen des Herzens, die vom Körper benötigte Leistung zu erbringen (Kuhl et al., 2005c).

Neben der klassischen symptomatischen Pharmakotherapie, gibt es bis zum heutigen Tag keine, die Ursache bekämpfende klinisch angewandte Therapieform (Pauschinger et al., 2004).

Infolge der großen klinischen Relevanz, ist das Finden neuer kausaler Therapiestrategien deshalb von eminenter Bedeutung (Pauschinger et al., 2004; Richardson et al., 1996). Molekulare und gentherapeutische Verfahren besitzen dahingehen ein großes Potenzial, da sie gezielt gegen definierte molekulare Strukturen vorgehen und somit die Spezifität und Effizienz bedeutend erhöhen können.

Im Hinblick darauf, sollten in dieser Arbeit drei verschiedene gentherapeutische Strategien untersucht und miteinander verglichen werden. Dabei ging es in erster Linie darum, die Infektion kardialer Zellen durch CVB3, dessen Replikation und damit verbunden die Schädigung der Wirtszelle zu verhindern.

Die ersten beiden Strategien basierten auf RNA-Interferenz (RNAi). Dabei sollte untersucht werden, wie sich die Herunterregulation des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR), als zelluläre Zielstruktur, inhibierend auf die Infektion der Zellen durch CVB3 auswirkt. Durch Verwendung von adenoviralen Vektoren (AdV) sollte dabei eine effiziente Transduktion und quantitativ hohe und andauernde Expression der RNAi induzierenden shRNAs gewährleistet werden.

Als virale Zielstruktur sollte in der zweiten RNAi-basierten antiviralen Strategie die Expression der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP), durch zwei simultan exprimierte shRNAs gegen die RdRP, inhibiert werden, um eine virale Replikation wirkungsvoll und lang anhaltend zu unterdrücken. Adeno-assoziierte Virus (AAV)-Vektoren sollten dabei der effizienten Transduktion primären Kardiomyozyten dienen. Bei einer wirkungsvollen CVB3-Inhibierung *in vitro* sollte die Wirkung dieses antiviralen Ansatzes auf die CVB3-Infektion im Herzen, in einem Myokarditis-Mausmodell untersucht werden. Kardiotrope AAV-Vektoren, sollten dabei einen kardiospezifischen Gentransfer gewährleisten.

Im Gegensatz zu den RNAi-basierenden antiviralen Strategien sollte im dritten Teil der Arbeit ein lösliches rekombinantes Rezeptorprotein (sCAR-Fc) mittels pharmakologisch regulierbarer Adenovektoren exprimiert und dessen inhibitorische Wirkung auf die CVB3-Infektion untersucht werden. Nach erfolgreichen *in vitro*-Studien, sollte weiterhin die Effizienz und Sicherheit der gentherapeutischen Applikation von sCAR-Fc im CVB3-Myokarditis-Mausmodell untersucht werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Agar NOBIE	DIFCO Laboratories, Lawrence/US
Agarose	Biozym, Oldendorf/D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München/D
4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, München/D
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München/D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München/D
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, München/D
Cesiumchlorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, München/D
Chloroform	Sigma-Aldrich, München/D
Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)	Fluka, Buchs/CH
Cy3-conjugated Streptavidin	Dianova, Hamburg/D
Kristallviolett	Merck, Darmstadt/D
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, München/D
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Mannheim/D
Doxycyclinehyclat	Sigma-Aldrich, München/D
Eagle-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe/D
Entellan	Merck, Darmstadt/D
Ethanol absolut	J.T. Baker, Philipsburg/US
Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiumbromide), 10 mg/ml	Roth, Karlsruhe/D
Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	Sigma-Aldrich, München/D
Express Hyb – Hybridisierungslösung	Clontech, Mountain View/US
Fluoromount GTM	Southern Biotech, Birmingham/US
Fötale 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

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe/D
Glycerol [60% (v/v)]	Fluka, Buchs/CH
Glycerin	Roth, Karlsruhe/D
Glycin	Fluka, Buchs/CH
HEPES ( <i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N</i> '-2-ethanesulfonic acid)	Sigma-Aldrich, München/D
Horse-Serum (HS)	Biochrom AG, Berlin/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, München/D
Ketanest	Parke-Davis GmbH, Berlin/D
LB-top agar	Sigma-Aldrich, München/D
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe/D
Magermilchpulver	Bio-Rad, Hercules/US
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, München/D
Methanol	J.T. Baker, Philipsburg/US
Mineralöl	Sigma-Aldrich, München/D
MOPS (6-Morpholinpropansulfonsäure)	Fluka, Buchs/CH
Natriumhydroxide	Merck, Darmstadt/D
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München/D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München/D
Natriumhydrogencarbonate	Merck, Darmstadt/D
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München/D
Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Serva, Heidelberg/D
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka, Buchs/CH
Neutralrot	Merck, Darmstadt/D
Nonidet-P40	Fluka, Buchs/CH
Norepinephrine	Sigma-Aldrich, München/D
Nystatin	Invitrogen, Karlsruhe/D
Paraformaldehyde	Riedel de Haen, Seelze/D
PBS Dulbecco's (1x) wo Ca & Mg	PAA, Pasching/A
Poly-ethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich, München/D
Penicillin	Biochrom AG, Berlin/D
Phenol	Sigma-Aldrich, München/D

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1)	Fluka, Buchs/CH
Polyethyleneglycol	Sigma-Aldrich, München/D
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, München/D
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, München/D
RNase inhibitor	Peqlab, Erlangen/D
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, München/D
SDS	Sigma-Aldrich, München/D
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich, München/D
Streptomycin sulfat	Biochrom AG, Berlin/D
Sucrose	Fluka, Buchs/CH
SYBR-Green	Invitrogen, Karlsruhe/D
Thiopental	Sigma-Aldrich, München/D
Trizma®-HCl	Sigma-Aldrich, München/D
Trypanblau	Gibco, Karlsruhe/D
Trypsin	Biochrom AG, Berlin/D
Trypsin/EDTA	Life Technologie, Grand Island/US
Trypsininhibitor	Life Technologie, Grand Island/US
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

Der Begriff *Aqua destillata* (A. dest.) beschreibt deionisiertes Wasser, dass weiterhin autoklaviert wurde (120°C, 2 bar, 20 min).

## 2.2 Enzyme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alkaline phosphatase, calf intestinal (CIP)	Roche, Mannheim/D
Benzonase	Merck, Darmstadt/D
DNase I peq GOLD	Peqlab, Erlangen/D

Proteinase K	Boehringer, Mannheim/D
<i>Pwo</i> -Polymerase	Roche, Mannheim/D
Restriktionsenzyme	New England Biolab/ Frankfurt a. M./D
SuperScriptII RTase	Invitrogen, Karlsruhe/D
T4-DNA-Ligasen	New England Biolab/ Frankfurt a. M./D
T4-DNA-Polymerase	New England Biolab/ Frankfurt a. M./D
T4 Polynucleotid Kinase	New England Biolab/ Frankfurt a. M./D
<i>Taq</i> -Polymerase	Applied Biosystem/US
Trypsin	Biochrom AG, Berlin/D

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

## 2.3 Reagenzsysteme

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford/US
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems/US
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche, Mannheim/D
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Piscataway/US
EndoFree <sup>®</sup> Plasmid Kit	Qiagen, Hilden/D
E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II	Peqlab, Erlangen/D
High Capacity <sup>®</sup> cDNA Archive Kit	Applied Biosystems/US
Human IgG ELISA	Bethyl Lab Inc., Montgomery/US
Kalzium-Phosphat Transfektion-Kit	Stratagene, La Jolla/US
Luciferase detection Kit	Boehring, Mannheim/D
Plasmid Minipräparation Kit	Peqlab, Erlangen/D
QIAEX <sup>®</sup> II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden/D
TaqMan Universal Master Mix UNG	Applied Biosystems/US
Zero Blunt <sup>®</sup> TOPO Kit	Invitrogen, Mannheim/D
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen, Mannheim/D

## 2.4 Lösungen und Puffer

**20 x SSC:** 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH-Wert 7,0

**50 x TAE:** 2 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0

**10 x TE Puffer:** 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, autoklaviert

**10 x MOPS Puffer:** 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, 200 mM MOPS, pH 7,0

**1 x TBS:** 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> 150 mM NaCl, pH 8,0

**2 x HBS:** 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 150 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,05

**10 x RNA-Ladepuffer:** 720 µl Formamid, 80 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung, 180 µl 37 %ige Formaldehyd-Lösung, 160 µl 10 x MOPS-Puffer, 1,5 µl Ethidiumbromid ad 1,5 ml A. bidest

### Waschlösung für Hybridisierung von Nukleinsäuren

Waschlösung I: 2 x SSC, 0,05 % SDS

Waschlösung II: 0,1 x SSC, 0,1 % SDS

Stripping-Puffer: 0,5 % SDS

### Lösungen für Immunfluoreszenz

Fixierlösung: PBS mit 4 % Formaldehyd, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Triton X 100

Blockierungslösung: TBS mit 5 % Serum, 0,1% Triton X 100

### Lösungen für Western-Blot

„General“-Lysepuffer: 20 mM Tris (pH 8), 10 mM NaCl, 0,5 Triton X-100, 5 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub> + Protease-Inhibitor 1:100

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

Laufpuffer: 20 x NuPAGE RunningBuffer (Invitrogen)

Transferpuffer: 50 ml NuPAGE TransferBuffer (Invitrogen), 200 ml Methanol ad 1 l Aqua dest.

Stripping-Puffer: 15 g Glycine, 100 ml 10 % SDS, 1 ml Tween 20, pH 3,2 ad 1 l Aqua dest.

## Lösungen für Rattenkardiomyocytenpräparation

ZIM/PS: 120 mM NaCl, 4,56 mM KCl, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,42 mM NaHPO<sub>4</sub>,  
25 mM, 5,55 mM Glucose, 383 U/ml Streptomycin, 5.000 U/ml Penicillin

ZIM-Trypsin: 120 mM NaCl, 4,56 mM KCl, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,42 mM NaHPO<sub>4</sub>,  
25 mM, 5,55 mM Glucose, 0,25 % Trypsin

## Lösungen für AAV-Präparation

24 % PEG/NaCl: 24% PEG, 1,86 M NaCl

NaCl-HEPES-Lösung: 50 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 25 mM EDTA

PBS/MK-Lösung: 1 x PBS, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>

## 2.5 Nukleinsäuren

dNTPs Rapidozym, Berlin/D

[<sup>32</sup>P]dCTP Amersham, München/D

### 2.5.1 DNA-Größenstandard

1 kb-DNA-Leiter, peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin/D

DNA-Leiter Mix, peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin/D

peq Gold orange, peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin/D

### 2.5.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Oligoservice, Berlin/D synthetisiert und in Aqua dest. gelöst (Konzentration 100 µM).

Bezeichnung	Sequenz in 5'- 3' Orientierung	Bemerkung
shCAR2 <sub>m</sub> P1	gat ccc cct act atc cgg atc tga aat tc	Klonierung der shRNA2 -
shCAR2 <sub>m</sub> P2	aag aga ttt cag atc cgg ata gta gtt ttt a	Expressionskassette gegen CAR <sub>m</sub>
shCAR2 <sub>m</sub> P3	agc tta aaa act act atc cgg atc tga aat	
shCAR2 <sub>m</sub> P4	ctc ttg aat ttc aga tcc gga tag tag ggg	
shCAR3 <sub>m</sub> P1	gat ccc cct ata aat gtg acc aac ctt tc	Klonierung der shRNA3

shCAR3 <sub>m</sub> P2	aag aga agg ttg gtc aca ttt ata gtt ttt a	Expressionskassette gegen CAR <sub>m</sub>
shCAR3 <sub>m</sub> P3	agc tta aaa act ata aat gtg acc aac ctt	
shCAR3 <sub>m</sub> P4	atc ttg aaa ggt tgg tca cat tta tag ggg	
shCAR4 <sub>m</sub> P1	gat ccc cgg atc gga aga gat tgg aaa ttt c	Klonierung der shRNA4 -
shCAR4 <sub>m</sub> P2	aag aga agg ttg gtc aca ttt ata gtt ttt a	Expressionskassette gegen CAR <sub>m</sub>
shCAR4 <sub>m</sub> P3	agc tta aaa act ata aat gtg acc aac ctt	
shCAR4 <sub>m</sub> P4	ctc ttg aaa ggt tgg tca cat tta tag ggg	
shCAR9 <sub>h</sub> P1	gat ccc cgg tgg atc aag tga tta ttt tc	Klonierung der shRNA9 -
shCAR9 <sub>h</sub> P2	aag aga aat aat cac ttg atc cac ctt ttt a	Expressionskassette gegen CAR <sub>h</sub>
shCAR9 <sub>h</sub> P3	agc tta aaa agg tgg atc aag tga tta ttt	
shCAR9 <sub>h</sub> P4	ctc ttg aaa ata atc act tga tcc acc ggg	
shCAR4 <sub>m</sub> RT	gtc gta tcc agt gca ggg tcc gag gta ttc gca	Quantifizierung der shCAR4 <sub>m</sub> -
shCAR4 <sub>m</sub> for	ctg gat acg act tcc aa	Expression (RT-stem-loop Primer)
shCAR4 <sub>m</sub> rev	gcg gcg gat cgg aag aga tt	
β-Aktin-sense	gtg cag ggt ccg agg t	
β-Aktin antisense	aag gat tcc tat gtg gtc g	β-Aktin-Sonde für Northern-blot
mCAR-105s	ctc ctt aat gtc acg cag ga	
mCAR-756a	cgg cag cta cca tgg cgc	mCAR-Amplifikation
mCAR-469s	acc gtg cag ctg tat gtc cca	
mCAR-704s	Ttc ttg tta agc ctt cag g	
mCAR2-1130a	aaa cag agt ggg ctc tga	
CAR1-1157a	Tta tac cac tgt aat gcc atc ggt ct	
HIFA53s	cta tac tat aga ccc atc ctt g	
Ad5 324s	tag ggt tta aac cca ggg ttt tcc cag tca	Sequenzierung shRNA-Kassette
Ad5 4600as	tct aga tct ttt gtg tta ctc ata gcg cg	Kontrolle v. AdV auf RR5
Ad5 3315s	gaa tgc atg gaa aat ctt gg	Kontrolle v. AdV auf RR5 u. RCA
CAR105- <i>NheI</i>	tga cat gac cat gaa gat ct	Kontrolle v. AdV auf RCA
B618- <i>NotIa</i>	cta gct agc tcg gca gcc agc atg gcg	sCAR-Amplifikation
pTREtight <i>Spels</i>	ggc ggc cgc ttt att tga agg agg g	
pTREtight <i>Xbalas</i>	cga cta gtc gag gcc ctt tcg tct tca cac	Konstruktion pAdR4
pTREtight <i>Xbals</i>	ccg ctc gag gca gtc tag agc gag gaa gct	
pTREtight <i>Spel600as</i>	aga ggc agt g	
sCAR-Fc_ <i>KpnI</i> s	cgc tcg agt cta gag gcc ctt tcg tct tca cac g	Konstruktion pAdG12
sCAR-Fc_ <i>MluI</i> as	cta gac tag tgc gag gaa gct aga ggc agt ga	
Fc-sCAR2794as	cgg ggt acc cag cat ggc gct cct gct g	Amplifikation sCAR-Fc
Fc-sCAR2747s	cga cgc gtc gcc att tag gtg acc act aat	
Fc-sCAR3198s	agc cac acg atg tcc agc ggt	Sequenzierung sCAR-Fc
Fc-sCAR3587s	ctg cct atc tgc cat gca aat	
Fc-sCAR3977s	Ttc atg gtt agc aga aat ga	
	gga ggt gca taa tgc caa ga	
	tgg aca aga gca agg tgg ca	

### 2.5.3 Taq-Man Sonden

#### MGB-Probes (Applied Biosystem/US)

mCAR (Maus)	Mm00438361_m1
mHPRT (Maus)	Mm00446968_m1
mGAPDH (Maus)	Mm99999915_g1
rCAR (Ratte)	Rn01477162_m1
rGAPDH (Ratte)	Rn99999916_s1

### 2.5.4 Plasmide

Plasmid	Selektionsmarker	Hersteller
pSilencer™ 2.1-U6 neo	AmpR, NeoR	Ambion, Darmstadt/D
pCR2.1-TOPO	AmpR, KanR	Invitrogen, Mannheim/D
pCR 4Blunt-TOPO	AmpR, KanR	Invitrogen, Mannheim/D
pZS2-rtTA-M2	AmpR	Fechner et al., 2003
pAdU6shGFP	AmpR	(Fechner et al., 2007a)
pAdU6shPLB <sub>r</sub>	AmpR	(Fechner et al., 2007c)
pCR3.1-mCAR2	AmpR, KanR, NeoR	A. Dörner, Charite - Berlin/D
pThorsten-Fc	AmpR, HygR	B Spiller, Cardiff/UK
pTRE-tight	AmpR	Clontech, Mountain View/US
pAAV-MCS	AmpR	Stratagene, La Jolla/US
pSiDEx	AmpR	Schubert et al., 2005
pDG	AmpR	Sipo et al., 2007
pDP6rs	AmpR	Sipo et al., 2007
P5E18-VD2/9	AmpR	Dr. Wilson, Pennsylvania/US
pHelper	AmpR	Stratagene, La Jolla/US

## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 primäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
H-300 (rabbit-anti-CAR)	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz/US
RP194 (rabbit-anti-mCAR2)	(Shaw et al., 2004)
RP291 (rabbit-anti-mCAR1)	(Shaw et al., 2004)
RmCB (mouse-anti-hCAR)	Upstate, Lake Placid/US
GAPDH (rabbit-anti-hGAPDH)	Chemicon, Temecula/US
GFP (rabbit-anti-GFP)	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz/US

### 2.6.2 sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
swine-anti-rabbit IgG-HRP	DAKO, Hamburg/D
donkey-anti-rabbit IgG-Biotin	Dianova, Hamburg/D
goat-anti-mouse IgG-HRP	Amersham, Piscataway/US
goat-anti-rabbit IgG-594	Molecular Probes/Invitrogen, Mannheim/D

## 2.7 Bakterienstämme und Medien

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

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

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

F {*lacIq* Tn10 (TetR)} *mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)* F80*lacZ*M15 *lacX74 recA1 deoR araD139 (araleu) 7697 galJ galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

### **Bakterien-Medien**

Medium	Hersteller
LB-Medium	Invitrogen, Mannheim/D
LB-Agar	Invitrogen, Mannheim/D

## 2.8 Zelllinien und Medien

Bezeichnung	Beschreibung	Kultivierungsmedium
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM (Gibco BRL) *
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM (Gibco BRL) *
HeLa	humanes zervikales Adenocarcinom	DMEM (Gibco BRL) *
HL-1	murine atriale Zelllinie	Claycomb-Medium <sup>#</sup>
PNCM	primäre neonatale Rattenkardiomyozyten	CMRL 1415-ATM (Biochrom AG, Berlin/D) <sup>+</sup>

\* Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Zellkulturmedien mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt.

<sup>#</sup> Claycomb-Medium wurde mit 10% FKS (JRH Bioscience, Lenexa/US), 1% Penicillin/Streptomycin 0,1 mM Norepinephrin und 2 mM L-Glutamin versetzt. Dabei wurde das Norepinephrin alle vier Wochen neu angesetzt.

<sup>+</sup> Komplettmedium: 10% FKS, 10% HS, 20 µg/ml Gentamycin, 5,4 mM KCl, 1,26 mM CaCl, 2,8 mM Glukose

Vollmedium: 10% FKS, 20 µg/ml Gentamycin, 5,4 mM KCl, 1,26 mM CaCl, 2,8 mM Glukose, 2 µM FUDR

Low-Medium: DMEM + GlituMax<sup>TM</sup> (Gibco BRL) 2%, FKS 1% Penicillin/Streptomycin

Eagle-Overlay: 9,61 g Eagle-Pulver, 0,5 ml Nystatin, Penicillin 1 Mio IE, Streptomycin 759 U/mg, 1,7 g Na-Hydrogencarbonat ad 750 ml

## 2.9 Viren und virale Vektoren

### 2.9.1 Viren

Virus	Hersteller
Adenovirus 5 (RCA)	Dr. Fecher, Charite - Berlin/D
Coxsackievirus B1 (VR-28)	ATCC, Manassas/US
Coxsackievirus B6 (VR-155)	ATCC, Manassas/US
Coxsackievirus B2-B5	Prof. Klingel, Tübingen/D
Coxsackievirus A21 (CVA21)	Prof. Klingel, Tübingen/D
Humanes Rhinovirus 14 (HRV14)	Prof. Zeichhardt, Berlin/D

## 2.9.2 virale Vektoren

AdVCMV-GFP

AdVCMV-Luc

scAAV2/2-GFP

scAAV2/6-GFP

scAAV2/9-GFP

## 2.10 sonstige Materialien

Whatman-Papier

Hybond™ N Nylon-Membran

Kodak Biomax MS Film

NuPage 4 - 12 % Bis-Tris Gel

PVDF Membran

DNA-Loading Buffer

Whatman International Ltd/GB

Amersham, Buckinghamshire/GB

Integra Biosciences, Fernwald/D

Invitrogen, Karlsruhe/D

Bio-Rad, Hercules/US

peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin/D

## 2.11 Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer

Agarosegel-Kammer Hoefer® HE 33

Anthos reader 2001

Axiovert 25 Mikroskop

Brutschrank Modell 5420

Centrifuge 5415D und Centrifuge 5415R

DNA Thermal Cycler

Elektrophoreseeinheit PP3000

FACS Calibur

Feinwaage BL 310

Fuji Film BAS-1500 imager

Gene Amp® PCR System 9700

Heizplatte IKAMAG® RH

(Perkin Elmer, Wellesley/US)

(Pharmacia Biotech, Uppsala/S)

(anthos labtec industries, Boston/US)

(Zeiss, Jena/D)

(Labotect Labortechnik, Göttingen/D)

(Eppendorf, Hamburg/D)

(Perkin Elmer Cetus, Wellesley/US)

(Biometra GmbH, Göttingen/D)

(Becton Dickinson, Franklin Lakes/US)

(Sartorius, Göttingen/D)

(Fuji Photo Film, Düsseldorf/D)

(Applied Biosystems, Foster City/US)

(Janke IKA-Labortechnik, Staufen/D)

Hybridisierungssofen Compact Line OV 4	(Biometra GmbH, Göttingen/D)
Immunfluoreszenzmikroskop Olympus IX 50	(Olympus, Hamburg/D)
Kamera Coolpix 990	(Nikon, Tokyo/Japan)
Liquid Szintillation Analyzer	(Packard GmbH, Dreieich/D)
Lumat LB 9501	(Berthold GmbH, Bad Wildbad/D)
Mastercycler ep Gradient S	(Eppendorf, Hamburg/D)
Mikrowelle	(Bosch, D)
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	(Peqlab, Erlangen/D)
NovexMini Cell	(Invitrogen, Carlsbad/US)
pH-Meter HI 8314 membrane pHmeter	(HANNA instruments, Woonsocket/US)
Pipetten	(Eppendorf, Hamburg/D)
Olympus BX60 Microscope	(Olympus, Hamburg/D)
QC 2000	(Bioscan, Washington/US)
SmartSpec 3000	(Bio-Rad, Hercules/US)
Thermomixer 5436	(Eppendorf, Hamburg/D)
Transilluminator BioDoc Analyze	(Biometra GmbH, Göttingen/D)
TRIO-Thermoblock	(Biometra GmbH, Göttingen/D)
UltraTurrax T25basic	(IKA Labortechnik, Berlin/D)
UV Stratalinker®1800	(Stratagene, LaJolla/US)
Vortex-Genie 2	(Scientific Industries, Bohemia/US)
Wasserbad	(Mettler GmbH, Schwabach/D)
Zentrifuge 5415D, 5415R und 5810R	(Eppendorf, Hamburg/D)
Zentrifuge Avanti™J-25	(Beckman Coulter, Fullerton/US)
Zentrifuge Varifuge RF	(Heraeus Sepatech, Osterode/D)

## **3 Methoden**

### **3.1 Arbeiten mit Bakterien**

#### **3.1.1 Herstellung chemischkompetenter Bakterien**

Für die Transformation von Bakterien wurden chemischkompetente Bakterien verwendet, die wie folgt hergestellt wurden. Die tiefgefrorenen *E.coli*-Bakterien wurden aus dem -80°C Tiefkühlschrank entnommen, und mit Hilfe einer Impföse auf eine Agar-Platte ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 5 ml LB-Medium bei 37°C schüttelnd eine weitere Nacht inkubiert. Mit 500 µl dieser Kultur wurden 50 ml LB-Medium im Erlenmeyerkolben beimpft, bei 37°C geschüttelt und bis zum Beginn der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  von 0,5) vermehrt. Die Bakterienkultur wurde anschließend in ein 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen überführt, für 10 min auf Eis inkubiert, bei 4°C zentrifugiert (4.000 rpm, 5 min) und das Zellpellet in 50 mM  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach erneuter Inkubation (15 min auf Eis) wurden die Zellen 5 min zentrifugiert (4°C, 5.000 rpm) und das Pellet in 2 ml kalter 50 mM  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h auf Eis gestellt, mit 20% Glycerin versetzt, in vorgekühlte 1,5 ml-Röhrchen á 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **3.1.2 Transformation chemischkompetenter Bakterien**

Zur Transformation chemischkompetenter Zellen wurde ein 50 µl Zell-Aliquot auf Eis lagernd aufgetaut, mit 10 bis 25 µl DNA des Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und für 10 (*E. coli* TOP 10) bis 30 min (*E. coli* XL-10 Gold) auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad wurde der Ansatz für eine weitere Minute auf Eis inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension in 250 µl (*E. coli* Top 10) bzw. 900 µl (*E.coli* XL-10 Gold) LB-Medium aufgenommen und für 30 bis 60 min bei 37°C (250 rpm) vorinkubiert. Die Zellsuspension wurde unverdünnt oder in geeigneter Verdünnung auf Agar-Platten mit Selektionsmedium (Ampicillin,

100 µg/ml) ausplattiert und anschließend für 18 bis 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **3.1.3 Konservierung von Bakterien**

Zur Konservierung von Bakterienzellen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurde 1 ml einer Übernacht-Kultur in ein steriles Cryo-Röhrchen überführt, mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 20 %) und bei -80°C eingefroren.

## **3.2 DNA- und RNA-Techniken**

### **3.2.1 DNA-Isolation aus Bakterien**

#### *3.2.1.1 Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab (Minipräparation)*

Diese Methode diente der schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien und wurde mit Hilfe des Plasmid Minipräparation Kit (Kapitel 2.3) durchgeführt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium in ein 15 ml-Röhrchen überführt, mit Antibiotikum versetzt (Ampicillin, 100 µg/ml) und anschließend mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte beimpft. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C schüttelnd (250 rpm) inkubiert. Aus 1,5 ml Zellsuspension wurde mittels Plasmid Minipräparation Kit die Plasmid-DNA entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

#### *3.2.1.2 Plasmid-Präparation in großem Maßstab (Maxipräparation)*

Die Maxipräparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe und nach dem Protokoll des EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Kit (Kapitel 2.3). Diese Methode diente der Isolierung nicht nur von größeren DNA-Mengen, sondern auch von hochreiner DNA, die für Klonierung sowie für die Transfektion von Säugetierzellen verwendet werden kann. Dabei wurden 250 ml LB-Medium im Erlenmeyerkolben (mit Ampicillin 100 µg/ml) mit 1 ml einer Übernacht-Kultur oder 100 µl Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (250 rpm). Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt

und 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-Isolierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.2.2 Isolierung eukaryotischer DNA aus Zellen und Geweben**

Die Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II (Kapitel 2.3). Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen auf Zellkulturplatten mit dem vom Hersteller mitgelieferten Lyse-Puffer lysiert. Danach wurde die DNA nach Angaben des Herstellers weiter präpariert.

Bei der Isolierung von DNA aus Gewebestücken wurde ein ca. 30 mg umfassendes Gewebestück in Lysepuffer aufgenommen und mit einem autoklavierten Plastikstößel zerkleinert. Die Inkubationszeit bei 55°C wurde je nach Beschaffenheit des Gewebes auf 3 h bis über Nacht verlängert. Danach wurde weiter nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

### **3.2.3 Isolierung viraler DNA**

Die Überprüfung der produzierten Adenoviren auf Kontamination mit Replikation kompetente Adenoviren (RCAs) und RR5-Viren wurde mittels PCR durchgeführt. Des Weiteren wurde dabei die Adenovektor-DNA auf Richtigkeit des Inserts überprüft.

Zur Lyse der adenoviralen Partikel wurden zur Virus-Suspension 50 µl 10 x TE-Puffer, 50 µl Proteinase K (5 mg/ml) und 50 µl einer 10 %igen DNase-freien SDS-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde 2-3 h bei 55°C inkubiert und die virale DNA im Anschluss durch Phenol-Chloroform extrahiert.

Für die Isolation von DNA aus rekombinanten adeno-assoziierten Virusvektoren (AAV) wurden die AAV-Fractionen aus der Jodixanolgradienten-Isolierung (Kapitel 3.10.3) verwendet. Die Inkubation mit Proteinase K fand bei 37°C für 1 h statt und anschließend wurde die virale DNA ebenfalls durch Phenol-Chloroform extrahiert. Dazu wurden die DNA-haltigen Lysate mit einem Volumenteil einer Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Lösung (24:25:1) versetzt, eine Minute geschüttelt und 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige DNA-haltige Phase wurde

in ein frisches steriles Gefäß überführt und mit einem Volumenteil Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Der Ansatz wurde 1 min geschüttelt und erneut zentrifugiert. Die obere wässrige DNA-haltige Phase wurde in ein frisches Röhrchen überführt und mit Ethanol gefällt (Kapitel 3.2.4).

### **3.2.4 DNA-Fällung**

Die Fällung diente der Konzentration von DNA-Proben. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Vol einer 1 M NaCl- oder 3 M Natriumacetat-Lösung und mit 2 Vol absolutem Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde gut durchmischt und für mindestens 15 min oder über Nacht bei -20°C gelagert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 12.000 rpm wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Nach Lufttrocknung, 10 min bei Raumtemperatur, wurde das DNA-Pellet in A. dest. oder TE-Puffer gelöst. Die Konzentration der DNA wurde anschließend mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer gemessen.

### **3.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

Durch Restriktionsverdau und PCR entstandene DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gelkonzentration wurde abhängig von den zu trennenden Fragmentgrößen gewählt. Als Längenmarker wurden je nach Größe der zu trennenden DNA verschiedene DNA-Leiter verwendet (*1 kb-DNA-Leiter* für Fragmente größer als 1 kb, *DNA-Leiter Mix* für Fragmente kleiner als 500 bp und *peq Gold orange* für Fragmente kleiner als 100 bp).

Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1 x TAE-Puffer gelöst und bis zum Schmelzen in der Mikrowelle erhitzt. Diese Lösung wurde auf ca. 60°C temperiert und Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,005% hinzugegeben. Nach vollständiger Verfestigung in der Gelkammer wurden die Kämme entnommen und das Gel in der Elektrophorese-Apparatur vollständig mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Loading-Puffer vermischt (10:1), aufgetragen und bei 140 V/200 mA aufgetrennt. Das Bandenmuster der aufgetrennten DNA wurde mit Hilfe eines Transilluminators dokumentiert.

### **3.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegel**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung durch ein Agarosegel wurden die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (Kapitel 2.3) nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

### **3.2.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben**

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte nach dem Prinzip der Einschrittmethode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 2006). Dafür wurde die monophasische Lösung TRIzol<sup>®</sup> verwendet, welche Phenol und Guanidinisothiocyanat (GTC) enthält. Durch das chaotrope GTC werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst und so die Gewebestandteile lysiert, Proteine denaturiert und dadurch RNAsen inaktiviert. Das enthaltene Phenol im sauren Milieu bewirkt, dass denaturierte Proteine und kleinere DNA-Fragmente aus dem Lysat entfernt werden.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen wurde das Medium aus der Kulturplatte abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml TRIzol-Lösung pro Well (für 6-Well-Platte) auf die Zellen gegeben, durch auf- und abpipettieren durchmischt und das Zellysate in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Die RNA wurde nach den weiteren Angaben des Herstellers isoliert und anschließend in 30 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) gelöst, 10 min bei 60°C inkubiert und bei -80°C gelagert.

Bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben wurde ein ca. 30 mg umfassendes Gewebestück in 1 ml Trizol-Lösung aufgenommen und mit einem autoklavierten Plastikstößel in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen zerkleinert. Die nachfolgende Präparation richtete sich nach den Herstellerangaben und das RNA-Pellet wurde je nach Größe in 50 - 100 µl DEPC-Wasser gelöst.

Die Konzentration der RNA wurde anschließend mit dem NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer gemessen.

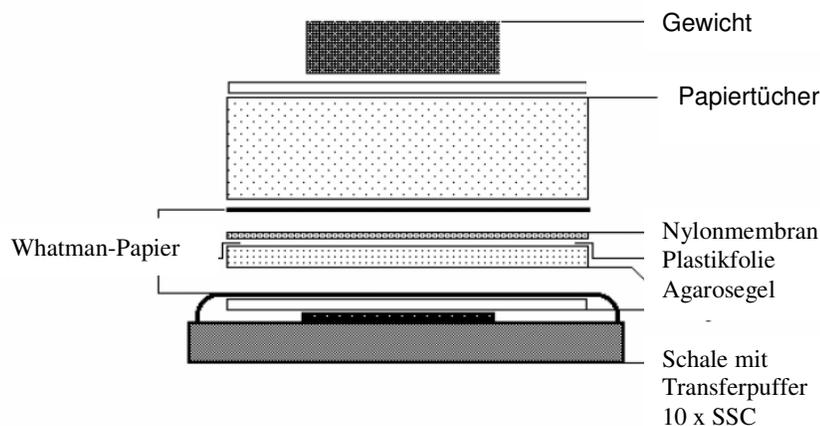
## 3.2.8 Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

### 3.2.8.1 RNA-Transfer mittels Northern-Blot

Die präparierte Gesamt-RNA (Kapitel 3.2.7) wurden in einem 1 %igen Formamid-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 10 µg RNA mit 5 µl RNA-Ladepuffer (Kapitel 2.4) gemischt, 5 min bei 65°C erhitzt und schnell auf Eis gelagert. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und die RNA-Trennung erfolgte mit 1 x MOPS-Puffer (Kapitel 2.4) für etwa 1 h bei 140 V. Anschließend wurde die RNA im Transilluminator sichtbar gemacht und überprüft, dass die 28S- und 18S-rRNA gut erkennbar sind, die RNA somit nicht degradiert ist.

Zur Herstellung des Formamid-Agarosegels wurden 1 % Agarose in 5/6 Vol 1x MOPS-Puffer aufgekocht und auf 60°C abgekühlt, bevor 1/6 Vol 38 % Formaldehyd (2,2 M Endkonzentration) zugegeben wurden.

Der Transfer der aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Bei dieser Methode wird der Nukleinsäuretransfer durch eine gerichtete Ionenwanderung mittels Kapillarkräfte vollzogen.



**Abb. 3.1:** Schematischer Aufbau eines Kapillar-Blots

Dazu wurde Whatman-Papier in 10 x SSC-Puffer eingelegt und über einen glatten Untergrund gelegt, wobei die Enden des Papiers in 10 x SSC-Puffer eintauchten. Anschließend wurde das Agarosegel mit der aufgetrennten RNA luftblasenfrei auf

das Whatman-Papier aufgelegt und auf allen vier Seiten mit Plastikfolie isoliert, um einen Flüssigkeitsstrom abseits der Membran zu verhindern. Auf das Gel wurden nun nacheinander ebenfalls luftblasenfrei eine angefeuchtete Nylonmembran, ein feuchtes und ein trockenes Whatman-Papier sowie ein Stapel trockener Papiertücher geschichtet (Abb. 3.1). Schließlich wurde der Blot mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert und über Nacht stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde der vollständige Transfer der Nukleinsäuren vom Gel auf die Nylonmembran mittels Transilluminator überprüft. Die Position der 18S- und 28S-rRNA-Bande (Northern-Blot) oder DNA-Marker (Southern-Blot) wurde auf der Nylonmembran markiert und diese für 30 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Nukleinsäuren durch zweimaliges Cross-linken unter UV-Licht (150 mJoule/cm<sup>2</sup>) im Strata Linker 1200 an den Filter kovalent gebunden und die Filter bis zur Hybridisierung bei 4 °C gelagert.

### 3.2.8.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mittels PCR durchgeführt (Tab. 3.1). Das Prinzip der DNA-Markierung beruht auf der Synthese eines komplementären DNA-Matrizenstranges mit Hilfe der *Taq*-Polymerase und unter Verwendung radioaktiv markierter Nukleotide. Als Sonde dienten mit <sup>32</sup>P-dCTP radioaktiv markierte Einzelstrang-DNA, die unter Verwendung des entsprechenden *antisense*-Primers (*Northern Blot*) mit Hilfe einer PCR hergestellt wurden. Dazu diente folgendes Protokoll:

**Tab. 3.1:** Reaktionsansatz für die Herstellung von Einzelstrang-DNA-Sonden

Reagenzien	Volumen
10 x <i>Taq</i> Polymerasepuffer	2,50 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,50 µl
dNTP ohne dCTP (1 mM)	0,50 µl
Primer (100 µM)	0,20 µl
DNA-Matrize (100 ng)	-- µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
A. dest.	ad 25,00 µl
Mineralöl zur Überschichtung	15,00 µl
<sup>32</sup> P-dCTP (10 µCi/µl)	2 – 5 µl
	<hr/> 25 µl

Die radioaktiv markierten PCR-Produkte wurden über Sephadex-Säulen gereinigt. Dazu wurde in A. dest. gelöstes Sephadex G-50 in eine Pasteurpipette ohne Einschluss von Luftblasen geschichtet. Unter Plexiglas-Schutz wurde die radioaktive Sonde auf die Säule pipettiert und anschließend ca. 1 ml A. dest zugegeben. Die erste Fraktion von ca. 500 µl Eluat wurde verworfen. Danach wurden 10 Fraktionen á 50 µl aufgefangen und die Radioaktivität in jeder Fraktion mit dem Bioscan QC 2000 gemessen. Die Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität wurden anschließend vereinigt und als Sonde verwendet. Bis zur Hybridisierung wurde diese bei 4°C oder -20°C gelagert.

#### 3.2.8.3 *Hybridisierung von Nukleinsäuren mit markierten DNA-Fragmenten*

Die Nylonmembran wurde in den gereinigten Hybridisierungsröhren mit 5 – 10 ml ExpressHyb Hybridization Solution im Hybridisierungsofen bei 68°C (*Northern Blot*) bzw. bei 60°C (*Southern Blot*) für 30 min prähybridisiert. Danach wurden 500 µl der entsprechenden gereinigten Sonde hinzugegeben und die Membran für 1 h bei 68°C (*Northern Blot*) bzw. bei 60°C (*Southern Blot*) hybridisiert. Nach Verwerfen der Hybridisierungslösung wurde der Filter einmal für 15 min mit 10 ml Waschlösung I (Kapitel 2.4) bei Raumtemperatur gewaschen. Die Waschlösung I wurde verworfen und die Membran zweimal für 20 min mit je 10 ml der Waschlösung II (Kapitel 2.4) bei 50°C gewaschen. Die Filter wurden entnommen und noch feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

#### 3.2.8.4 Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte

Für die Detektion radioaktiv markierter DNA-Fragmente wurde die in Klarsichtfolie eingeschlagene hybridisierte Membran in eine Filmkassette gelegt und nach Auflegen eines Röntgenfilms bei -80°C für 1 h bis hin zu mehreren Tagen inkubiert. Zur Quantifizierung des radioaktiven Signals wurde die hybridisierte Membran in eine Phosphoimager-Belichtungsplatte (Fuji Film-Platte BAS-1500) eingelegt und bei Raumtemperatur für eine Stunde bis hin zu mehreren Tagen inkubiert. Anschließend wurde die Phosphoimager-Belichtungsplatte mit dem Fuji Bas 2000 Phospho-Imager

und der Software BAS Reader 2.21 digital ausgewertet und die Intensität des Hybridisierungssignals unter Verwendung der Software Tina (Version 2.09g ©raytest Isotopenmessgeräte GmbH) bestimmt.

#### 3.2.8.5 Rehybridisierung radioaktiv markierter Membranen

Für eine Rehybridisierung von bereits markierten Membranen wurden die radioaktiven Sonden im Wasserbad bei 95 - 98°C durch 5-minütiges Schwenken in 0,5 %igem SDS vom Filter gelöst (Strippen). Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis kein radioaktives Signal mehr gemessen werden konnte. Danach konnte der Blot erneut hybridisiert werden (Kapitel 3.2.8.3).

### 3.3 Klonierung

#### 3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifisch palindromische Sequenzen und hydrolysieren die doppelsträngige DNA innerhalb dieser Erkennungssequenzen. Dabei entstehen entweder glatte („*blunt-ends*“) oder 5´- bzw. 3´-überhängende („*sticky-ends*“) Enden.

Je nach der Menge der zu schneidenden DNA wurden Restriktionsansätze mit unterschiedlichem Volumen angesetzt (20 µl für 0,5 - 1 µg DNA, 50 - 100 µl für 3 - 10 µg DNA und 500 - 1.000 µl für DNA-Mengen höher als 10 µg). Gemäß den Herstellerangaben wurden je 1 U Restriktionsenzym pro µg DNA mit dem jeweiligen Puffersystem eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden zwischen 1 und 24 h bei entsprechender Temperatur inkubiert.

#### 3.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Molekülen

Um bei der Ligation eine mögliche Religation der Vektor-DNA verhindern zu können, wurden diese DNA-Restriktionsprodukte an ihren 5´-Enden dephosphoryliert.

Dazu wurde zur Inaktivierung des Restriktionsenzym der Restriktionsansatz 20 min bei der für die jeweiligen Restriktionsenzyme angegeben Denaturierungstemperatur

inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur (10 min) wurden 0,1 U Calf Intestinal alkalische Phosphatase (CIP) pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA zugegeben und die Probe für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von EDTA-Lösung (Endkonzentration: 5 mM) und 20-minütigem Erhitzen bei 75°C wurde die Reaktion abgestoppt. Zur Entfernung der alkalischen Phosphatase wurden die Dephosphorylierungsprodukte anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und das entsprechende Fragment aus dem Gel extrahiert (Kapitel 3.2.6).

### **3.3.3 Herstellen von glatten Enden an DNA-Fragmenten**

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit nicht-kompatiblen Enden war es notwendig glatte Enden zu generieren. Dafür wurden die 3'-überhängenden Enden abgebaut und die 5'-überhängenden Enden aufgefüllt. Zu diesem Zweck wurde eine T4-DNA-Polymerase mit einer 3'-5'- Exonuklease- und mit 5'-3'-Polymeraseaktivität eingesetzt. Dem vorangegangenen Restriktionsansatz wurden Desoxyribonukleotide (dNTP's) (je 100  $\mu\text{M}$  dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zugegeben und die Reaktion mit 1 U T4-DNA-Polymerase bei 12°C für 20 min fortgeführt. Anschließend wurde die T4-Polymerase für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

### **3.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligrationsreaktionen wurden mit dem zur DNA-Ligase mitgelieferten Puffersystem nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden für Klonierungszwecke 50 bis 100 ng linearisierten Vektor-Plasmids mit ca. 50 ng DNA-Fragment (Insert) zusammen pipettiert (Verhältnis von 1:1 bis 1:3 je nach Insertgröße) und in einem Gesamtansatz von 20  $\mu\text{l}$  mit 1 U T4-DNA-Ligase und 2  $\mu\text{l}$  des entsprechenden 10 x Puffers für mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

### **3.4 cDNA-Synthese, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und quantitative PCR**

#### **3.4.1 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase**

Bei der reversen Transkriptase (RTase) handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die von einer einzelsträngigen RNA als Matrize ein RNA/DNA-Hybrid herstellt, das nachfolgend für die PCR eingesetzt werden kann. Für die Umschreibung der mRNA aus HL-1 Zellen zur Generierung der mCAR1- und mCAR2-cDNA wurde die SuperScriptII RTase benutzt. Die RT-Reaktion in Vorbereitung der real-time PCR wurde mit dem High Capacity cDNA Archive Kit durchgeführt. In beiden Fällen wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

#### **3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung und zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente eingesetzt. In Abhängigkeit von Primer-Länge, Basenzusammensetzung und der Länge und Struktur der zu amplifizierenden DNA wurde die PCR-Reaktion mit unterschiedlichen DNA-Polymerasen und unter verschiedenen PCR-Bedingungen durchgeführt. Für Klonierungszwecke wurde die DNA mit *Pwo*-Polymerase, einer DNA-Polymerase mit *Proof Reading* Eigenschaften amplifiziert. Bei besonders langen DNA-Stücken, die amplifiziert werden mussten, wurde ein Gemisch aus *Taq*-Polymerase und *Pwo*-Polymerase im Verhältnis von 10:1 eingesetzt. PCR-Reaktionen zum Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen erfolgten mit *Taq*-Polymerase. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen sind in den Tabellen 3.2 und 3.3 angegeben. Die PCR erfolgte im Gene Amp Thermocycler 9700. Die Elongationszeit beträgt abhängig von der Länge des Amplifikates 30 s bis 2 min.

**Tab. 3.2:** Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes

Reagenzien	25 µl Ansatz
10x Polymerasepuffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Forward-Primer (100 µM)	0,25 µl
Reverse-Primer (100 µM)	0,25 µl
DNA-Template (0,2 - 0,5 µg)	x µl
DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
A. dest.	ad. 25 µl

**Tab. 3.3:** Reaktionsbedingungen der PCR

Reaktionsschritt für 18 bis 40 Zyklen	Temperatur	Zeit
Initialer Denaturierungsschritt	94°C	4 min
Denaturierung	94°C	45 s
Annealing	55°C - 60°C	30 s
Elongation	72°C	30 s - 2 min
Finale Elongation	72°C	5 min
Kühlung	4°C	∞

### 3.4.3 Real-Time-PCR mittels TaqMan

#### 3.4.3.1 Quantifizierung der mRNA-Transkription

Die Bestimmung und Quantifizierung der mCAR-mRNA erfolgte mittels real-time PCR. Dabei wurden spezifische fluoreszenzmarkierte Sonden benutzt, die von Applied Biosystem mit den dazugehörigen Primern geliefert wurden (Kapitel 2.5.3).

Vier Microgramm der gesamt RNA (Kapitel 3.2.7) wurden vor der cDNA-Synthese mit DNase I inkubiert, um mögliche DNA Reste in der preparierten RNA vollständig zu eliminieren. Dazu wurde die RNA mit DNase I für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die DNase I durch Zugabe von 2,5 µl 25 nM EDTA und Erhitzen auf 65°C für 15 min inaktiviert. Nach der cDNA-Synthese (Kapitel 3.4.1) erfolgte die Real-Time PCR mit Hilfe des Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf). In einem Gesamtansatz von 20 µl wurden 50 ng umgeschriebene RNA als *template* eingesetzt. Der Mastermix setzte sich zusammen aus 10 µl TaqMan Universal Master Mix UNG, 4 µl RNase freiem Wasser und 1 µl der spezifischen Sonde. Die Real-Time PCR wurde nach dem Standardprotokoll der Firma Eppendorf

durchgeführt (10 min 95°C, 40 Zyklen mit Denaturierungstemperatur von 95°C für 15 s und Annealing/ Extinktionstemperatur von 60°C für 1 min).

Für die relative Quantifizierung der mCAR-Expression wurde ein Referenzgen, entweder HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) oder GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als interne Kontrolle gemessen, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen.

#### Auswertung der Taq-Man PCR und Quantifizierung der mRNA

Um die Taq-Man PCR auszuwerten, wurde der vom Gerät nach der PCR angegebene Ct-Wert (Zyklus, an dem die Fluoreszenz der Sonde erstmals über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt) des zu bestimmenden Gens (mCAR) mit dem Ct-Wert des Referenzgens (HPRT oder GAPDH - konstitutive Kontrolle) derselben Probe ins Verhältnis gesetzt. Der sich ergebene  $\Delta\text{Ct}_1$ -Wert konnte nun mit den  $\Delta\text{Ct}_2$ -Werten einer anderen Probe verglichen werden und man erhält den sogenannten  $\Delta\Delta\text{C}_t$ -Wert ( $= \Delta\text{Ct}_1 - \Delta\text{Ct}_2$ ). Der relative Expressionsunterschied zwischen Probe 1 und Probe 2 berechnete sich dann nach der Formel: RQ (relative quantity) =  $2^{-\Delta\text{Ct}_1 - \Delta\text{Ct}_2}$ .

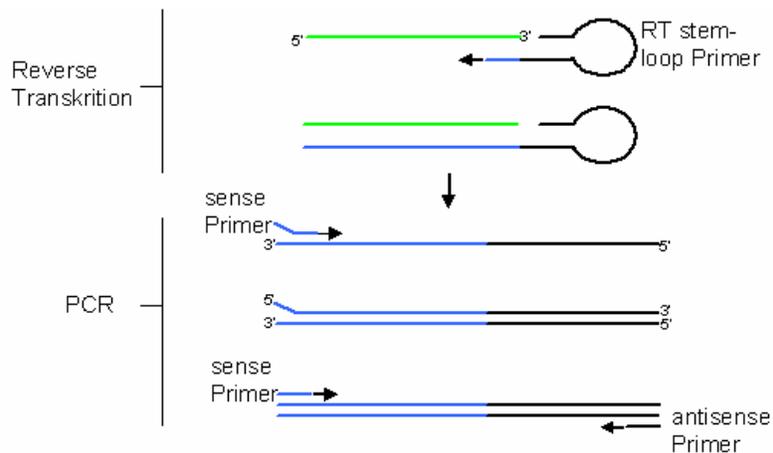
Es wurde jede Probe dreimal gemessen, aus den Ct-Werten ein Mittelwert errechnet und für die relative Quantifizierung benutzt.

#### *3.4.3.2 Quantifizierung der shRNA-Transkription*

Der Nachweis und die Quantifizierung der shRNAs setzt sich aus zwei Schritten zusammen, der reversen Transkription und einer sich anschließenden real-time PCR mit dem interkalierenden DNA-Farbstoff SYBR-Green. Insgesamt wurden für die Bestimmung und Quantifizierung der shRNAs drei Primer spezifisch für jede shRNA synthetisiert (Kapitel 2.5.2).

Für die reverse Transkription der prozessierten shRNA (siRNA) wurde ein RT stem-loop Primer eingesetzt, der am 3' Ende sechs spezifische Nukleotide besitzt, die komplementär zur siRNA-Sequenz sind. Im weiteren Verlauf besteht der stem-loop Primer aus einem doppelsträngigen Teil (stem) und einem loop. Mit den sechs komplementären Nukleotiden bindet der RT stem-loop Primer (Abb. 3.2 - schwarz) an die zur siRNA prozessierten shRNA (Abb. 3.2 - grün) und mit Hilfe der RTase

(High-Capacity cDNA Archive Kit) wird ein zu dieser Sequenz komplementärer cDNA-Strang synthetisiert (Abb. 3.2 - blau). In Tabelle 3.4 ist die Zusammensetzung des RT-Reaktionsansatzes aufgeführt.



**Abb. 3.2:** Schematische Darstellung der Quantifizierung der shRNAs mittels RT-PCR und real-time PCR (grüne = Einzelstrang der prozessierten shRNA (siRNA), blau = komplementärer Teil des RT stem-loop Primers bzw. komplementäre cDNA zur siRNA target-Sequenz nach RT).

Es folgt eine real-time PCR, wobei der sense-Primer spezifisch am 3'-Ende des umgeschriebenen siRNA-Strangs bindet und der antisense-Primer in der loop-Sequenz des RT-loop-Primers. Diese Reaktion führt zur Entstehung eines 69 bp großen PCR-Fragmentes. Die Quantifizierung der exprimierten shRNAs erfolgte unter Verwendung von SYBR-Green und dem TaqMan Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf) (Tab. 3.5).

**Tab. 3.4:** Zusammensetzung der RT-Reaktion zum Umschreiben von shRNA

Reagenzien	Menge
RNA	50 ng/μl
shRNA stem-loop RT primer	50 nM
5 x RT Puffer	1,5 μl
dNTP	jeweils 0,25 mM
Multi-Scribe RTase	3,33 U/μl
RNase Inhibitor	0,25 U/μl
H <sub>2</sub> O (DEPC)	-
Gesamtvolumen	7,5 μl

Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 16°C und weiterhin für 30 min bei 42°C, mit einer sich anschließenden Denaturierung der RTase für 5 min bei 85°C.

**Tab. 3.5:** Zusammensetzung der real-time-PCR zur Quantifizierung von shRNA

Reagenzien	Menge
Reaktionsprodukt aus RT-Reaktion	1 $\mu$ l
TaqMan Universal Master Mix	1 x
sense Primer	200 nM
antisense Primer	200 nM
Sybr Green 1:1.000	2 $\mu$ l
<u>ad x <math>\mu</math>l A. dest.</u>	<u>x <math>\mu</math>l</u>
Gesamtvolumen	20 $\mu$ l

Die real-time-PCR wurde nach dem Standardprotokoll der Firma Eppendorf durchgeführt (10 min 95°C, 40 Zyklen mit Denaturierungstemperatur von 95°C für 15 s und Annealing/Extinktionstemperatur von 60°C für 1 min).

Da es in diesem Fall keine zellulären Referenzgene gibt, konnte nicht wie in Kapitel 3.4.3.1 die relative Quantifizierung der gebildeten shRNA durchgeführt werden, sondern nur die relative Änderung der shRNA-Expression. Der Wert der relativen Änderung der Expression zu einem Vergleichswert wurde wie folgt berechnet:  $2^{(Ct_{moi5} - Ct_{moi x})}$  wobei Ct<sub>moi 5</sub> den Ct-Wert beinhaltet, der bei der kleinsten eingesetzten AdshRNA-Menge von moi = 5 erhalten wurde, während Ct<sub>moi x</sub> den Ct-Wert darstellt, der bei der Verwendung anderer mois erzielt wurde. Die berechneten Werte entsprechen damit der Veränderung der shRNA-Expression im Vergleich zur Menge gebildeter shRNA bei Transduktion mit AdshRNA moi 5. In der graphischen Darstellung wurde dabei Ct<sub>moi 5</sub> als Nullwert definiert (Abbildung 4.1.7\_B).

### 3.5 Sequenzierung von DNA

Alle im Rahmen dieser Arbeit klonierten und untersuchten Plasmid-Konstrukte wurden durch Sequenzierung der jeweiligen Expressionskassetten auf Mutationen überprüft. Für die Sequenzierung der Plasmide und Vektor-DNA wurden 0,4  $\mu$ g bis 1  $\mu$ g DNA verwendet, 1  $\mu$ l Sequenzierungspuffer und 1  $\mu$ l Sequenzierungsprimer (10  $\mu$ M) hinzugefügt und mit A. dest. auf 8  $\mu$ l aufgefüllt. Nachdem der Reaktionsansatz 4 min bei 98°C im Gene-Amp-Thermocycler 9700 erhitzt worden war, wurden 2  $\mu$ l *Big Dye Prämix* (PE Applied Biosystems, CA, USA) zugegeben und die PCR-Reaktion über 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 3.6:** Reaktionsbedingungen für Sequenzier-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96 °C	10 s
Annealing	50 °C	5 s
Elongation	60 °C	4 min
Kühlung	4 °C	∞

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde die DNA für die Sequenzierung aufgearbeitet. Dazu wurden 90 µl A. dest., 10 µl 3 M Natriumazetat-Lösung (pH 4,8) und 250 µl absoluter Ethanol zum PCR-Ansatz gegeben und für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das DNA-Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen, danach 5 min bei 56 °C getrocknet und in 30 µl A. dest. gelöst. Die Sequenzierung und Auswertung erfolgten mit Hilfe des Gene Analyzer ABI 310 Kapillar-Sequenzierautomaten unter Verwendung der ABI DNA Sequencing Analysis Software.

### **3.6 Plasmid-Konstruktion**

Alle Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

#### pAdmCAR1

Für die Konstruktion des Maus-CAR1 (mCAR1) Expressionsplasmides wurde Total-RNA von HL-1 Zellen isoliert, mit dem SuperScriptII RTase-Kit und Random Primern in cDNA umgeschrieben und mCAR1 mit den Primern mCAR105s und hCAR1157as unter Benutzung eines *Taq*-Polymerase/*Pwo*-Polymerase-Gemisch (10:1) amplifiziert und anschließend in pCR2.1-TOPO kloniert. Nach der Sequenzierung wurde mCAR mit *EcoRI* aus pCR2.1-TOPO herausgeschnitten und in das adenovirale Shuttleplasmid pZS2, welches ebenfalls mit *EcoRI* geschnitten wurde, kloniert.

### pAdmCAR2

Für die Konstruktion des mCAR2 Expressionsplasmides wurde die bereits vorhandene cDNA von mCAR2 aus dem Plasmid (pCR3.1-mCAR2) mittels *HindIII/PmeI* Verdau herausgeschnitten und via *SmaI/HindIII* in das adenovirale Shuttleplasmid pZS2 kloniert, woraus pAd5mCAR2 resultiert.

### pAdshCAR2<sub>m</sub>, pAdshCAR3<sub>m</sub>, pAdshCAR4<sub>m</sub>, pAdshCAR9<sub>n</sub>

Für die Klonierung der adenoviralen sh-RNA Expressionsplasmide wurden für jede CAR-shRNA, vier Oligonucleotide synthetisiert, die die Zielsequenz und die Loop-Struktur enthalten (Kapitel 2.5.2). Die shRNA Zielsequenz wurde über einen computergestützten Algorithmus ermittelt, wobei für shCAR2<sub>m</sub> und shCAR3<sub>m</sub> *Dharmacon siDESIGN* benutzt wurde und für shCAR4<sub>m</sub> der *BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen)*. Als Auswahlkriterien für die Zielsequenz galten dabei die Bestimmungen von Tuschl (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001c; Elbashir et al., 2002)

Die Oligonucleotide wurden mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert, wobei jeweils 5 µl Oligonucleotid (10 pmol/µl) mit 2 µl 10 x T4-Ligase Puffer, 11 µl A. dest. und 2 µl Kinase zusammen pipetiert und für 30 min bei 37°C inkubiert wurden. Die Kinase wurde anschließend bei 68°C für 10 min inaktiviert und die vier phosphorylierten Oligonucleotide miteinander verbunden. Dazu wurden sie zu gleichen Teilen gemischt, 2 min auf 65°C erhitzt und über 30 min auf RT abgekühlt (10 min 45°C, 10 min 37°C, 10 min 22°C).

Die Sequenz der Primer wurde so gewählt, dass sich am 3'-Ende der shRNA-Kassette ein überhängendes Ende, kompatibel zu einem *HindIII*-Schnittort und am 5'-Ende zum *BamHI*-Schnittort befindet und somit die shRNA-Kassette direkt in den *HindIII/BamHI*-verdauten pSilencer<sup>TM</sup> 2.1-U6 neo kloniert werden konnte. Anschließend wurde die gesamte shRNA-Expressionskassette, bestehend aus dem U6-Promotor und der shRNA-Kassette, über *EcoRI/HindIII* in das adenovirale Shuttleplasmid pAdshPLB<sub>r</sub> kloniert (Fechner et al., 2006).

#### pAAV2-shRdRP2.4, pAAV2-shGFP

Um dimerische (self-complementary sc) AAV-Vektoren herzustellen, wurde aus dem AAV-Genom die terminal resolution site und die D-Sequenz der 3'-ITR (Nucleotid 114 – 141) deletiert. Dazu wurde das Plasmid pAAV-MCS (Stratagene) mit *HincII* und *MscI* verdaut und beide entstehenden Fragmente (2.832 bp und 1.234 bp) voneinander getrennt. Das 2.832 bp große Fragment wurde dephosphoriliert und wieder mit dem 1.234 bp großen Fragment ligiert - pAAV.

Anschließend wurden zwei shRNA-Expressionskassetten, die jeweils eine effiziente shRNA gegen die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) des Coxsackievirus B3 exprimieren, in pAAV kloniert. Dafür wurde das Plasmid pSiDEx (Schubert et al., 2005) mit *EcoRI/HindIII* geschnitten und das 400 bp – Fragment (U6-Promotor und shRdRP2) in den ebenfalls mit *EcoRI/HindIII* geschnittenen Vektor pAAV-MCS ligiert (pAAV-shRdRP2). Über einen weiteren Klonierungsschritt wurde die zweite shRNA gegen RdRP (shRdRP4) und der U6 Promotor aus pSiDEx mit *EcoRI* herausgeschnitten und in pAAV-shRdRP2 kloniert, welches ebenfalls mit *EcoRI* verdaut und dephosphoriliert wurde. Das resultierende Plasmid pAAVRdRP2.4 wurde mit *Clal* und *BamHI* geschnitten und in den *Clal/BglII* verdauten Vektor pAAV kloniert, wo bei das Plasmid pAAV-shRdRP entstand.

Für das Plasmid pAAV-shGFP wurde aus dem adenoviralen Shuttleplasmid pAdshGFP ein 400 bp großes Fragment mit *EcoRI/HindIII* ausgeschnitten, welches den U6-Promotor und die GFP-shRNA enthält. Anschließend wurde das Fragment in das Plasmid pAAV, das ebenfalls mit *EcoRI/HindIII* geschnitten wurde, ligiert.

#### pThorsten-sCAR-Fc

Um das Fusionsprotein sCAR-Fc herzustellen, wurde in den Expressionsvektor pThorsten-Fc (B. Spiller, Cardiff/UK) die Sequenz des extrazellulären human (h) CAR (Nucleotid 1 - 709) in frame vor der bereits im Plasmid enthaltenden Sequenz des humanen IgG1-Fc kloniert. Dafür wurde mittels PCR und der Primer CAR105-*NheI* und B618-*NotI* (Kapitel 2.5.2) ein 735 bp großes Fragment amplifiziert, aufgereinigt und mit *NheI* und *NotI* verdaut. Anschließend wurde dieses Fragment in den ebenfalls mit *NheI/NotI* geschnittenen Vektor (pThorsten-Fc) kloniert.

#### pAdG12, pAdG12<sub>trunk</sub>, pAdR4

Um die Expression des sCAR-Fc pharmakologisch regulierbar zu machen, wurde die Expression des Fusionsproteins sCAR-Fc unter einen TREtight Promotor gestellt, einem minimalen CMV-Promotor mit *upstream* sich befindender Regulatorregion, bestehend aus sieben sich wiederholenden TetO-Sequenzen (Kapitel 1.5). Im selben Konstrukt befindet sich auch die Expressionskassette des Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators der zweiten Generation - rtTA2<sup>s</sup>-M2 (Srouf et al., 2003). Diese beiden Expressionskassetten wurden in unterschiedlicher Orientierung zueinander kloniert, um eine mögliche Beeinflussung des TREtight-Promotors durch andere Promotorregionen, wie dem CMV-Promotor der rtTA2<sup>s</sup>-M2 Expressions-kassette oder der ITRs des adenoviralen Vektors, zu minimieren. Dafür wurde der TREtight-Promotor mit multiply cloning site (MCS) und SV40 Polyadenylierungs-signal (polyA) mittels zwei unterschiedlichen Primerpaaren aus dem Plasmid pTREtight amplifiziert. Durch die Amplifikation mit den Primerpaar 1 (pTREtight*Spels* und pTREtight*Xbalas*) wurde die pTREtight-MCS-polyA Kassette so amplifiziert, dass sie über *SpeI/XhoI* in den mit *XbaI/XhoI* geschnittenden Vektor pZS2-CMV-rtTA2<sup>s</sup>-M2 in der selben Orientierung wie die rtTA2<sup>s</sup>-M2-Expressionskassette kloniert werden konnte – pZS2-R. Mit dem Primerpaar 2 (pTREtight*Xbals* und pTREtight*Spelas*) konnte die amplifizierte pTREtight-MCS-polyA Kassette über *XhoI/SpeI* ebenfalls in pZS2-CMV-rtTA2<sup>s</sup>-M2 kloniert werden, diesmal entgegengesetzt der Orientierung der rtTA2<sup>s</sup>-M2-Expressionskassette – pZS2-G. Anschließend wurde aus pThorsten-sCAR-Fc mittels PCR der komplette sCAR-Fc amplifiziert. Dabei wurden zwei Primer benutzt, die jeweils über eine Schnittstelle verfügten (sCAR-Fc\_*KpnI*s und sCAR-Fc\_*MluI*s) um sCAR-Fc gerichtet in die MCS downstream des pTREtight zu klonieren. Das Amplifikat wurde nach der PCR mit einem *Taq*-Polymerase/*Pfu*-Polymerase-Gemisch (10:1) direkt in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO kloniert. Anschließend wurde pCR<sup>®</sup>II-sCAR-Fc mit *KpnI* und *MluI* geschnitten und sCAR-Fc mit den ebenfalls *KpnI/MluI*-geschnittenen Plasmiden pZS2-G und pZS2-R ligiert. Es entstanden die beiden adenoviralen Plasmide pAdG12 und pAdR4.

Mit einem weiteren Primerpaar (sCAR-Fc<sub>trunk</sub>\_KpnI)s und sCAR-Fc\_MluI)s wurde mittels PCR sCAR-Fc<sub>trunk</sub> aus pThorsten-sCAR-Fc amplifiziert. Durch eine Deletion im sense-primer (Position 10 in sCAR-Fc-Sequenz) kam es zu einer Verschiebung des Leserahmens und dadurch zu einem Stop-Signal in AS 13. Der dadurch

entstehende Translationsabbruch führt zu einer trunkierten, nur 12 AS-langen Form des sCAR-Fc (pCR<sup>®</sup>II-sCAR-Fc<sub>trunk</sub>). Über *KpnI/MluI* wurde sCAR-Fc<sub>trunk</sub> ebenfalls in pZS2-G kloniert – pAdG12<sub>trunk</sub>.

## **3.7 Zellbiologische Methoden**

### **3.7.1 Ablösen adhärent wachsender Zellen und Passagierung**

Adhärenz wachsende Zellen wurden durch Trypsinierung vom Kulturboden abgelöst. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen (5 ml pro 25 cm<sup>2</sup>- bzw. 10 ml pro 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche), 2 ml Trypsin-Lösung in die Zellkulturflasche bzw. in die Vertiefung der Zellkulturplatte gegeben und 2 bis 3 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinierung wurde dann mit Medium inkl. 10 % FKS gestoppt, die abgelösten Zellen resuspendiert und in eine neue Kulturflasche entsprechend der gewünschten Konfluenz ausgesät.

HL-1 Zellen wurden mit 0,05 % Trypsin/EDTA (1,5 ml für 25 m<sup>2</sup> Kulturflasche) in einem ersten Schritt für 2 min inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin abgesaugt und noch einmal frisches hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 - 8 min, wurde die gleiche Menge Trypsininhibitor hinzu gegeben, die Zellen resuspendiert, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1.000 rpm 5 min bei RT zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abgesaugt, die HL-1 Zellen in frischem Medium resuspendiert und weiter verarbeitet. HL-1 Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und alle 3 bis 4 Tage umgesetzt.

### **3.7.2 Konservierung von Zellkulturen**

Die Zellen wurden in einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % kultiviert, trypsinisiert (Kapitel 3.7.1) und in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (95 % FKS, 5 % DMSO) resuspendiert (5x10<sup>6</sup> bis 1x10<sup>7</sup> Zellen/ml). Anschließend

wurden 1 ml Aliquots in Cryo-Röhrchen gefüllt und sofort in einer Einfrierbox bei kontrollierter Temperaturabnahme (1°C/min) für mindestens 16 h bei -80°C gelagert und danach in -196°C kaltem flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### **3.7.3 Reaktivierung konservierter Kulturen**

Um Zellen, die in flüssigem Stickstoff lagern anzuzüchten, wurde 10 ml kaltes Medium in ein 15 ml Röhrchen gegeben, die schnell aufgetauten Zellen (bei 37°C) direkt hinzu pipettiert und vorsichtig durchmischt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschließend das Zellpellet in 5 ml, auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium resuspendiert, in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz weiter inkubiert.

### **3.7.4 Präparation und Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten**

Neonatale Rattenkardiomyozyten (neonatal ratcardiumyocytes - NRCM) wurden aus dem ventrikulärem Gewebe von 1 - 3 Tage alten Wistar Ratten (Charles River, Berlin, Deutschland) isoliert (Vetter et al., 1998).

Die Tiere wurden vor Beginn der Präparation mit einem 70 % Ethanol haltigen Tupfer gereinigt. In Rückenlage wurden diese mit einer Pinzette fixiert und mit einer Schere dekaptiert. Es erfolgte ein Sternalschnitt bis zum Zwerchfell. Durch leichten Druck mit der Pinzette wurde das Herz, an der Schnittstelle sichtbar, entnommen und in eiskalte 1 x ZIM/PS-Lösung transferiert. Anschließend wurden von den Ventrikeln die Vorhöfe, Gefäße, Fett- und Bindegewebe entfernt. Die gereinigten Ventrikel wurden nochmals in 1 x ZIM/PS-Lösung überführt und gewaschen. Die Ventrikel wurden dann mit zwei Skalpellenspitzen in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten und zweimal in Antibiotika freier ZIM Lösung gereinigt. Nach Überführung der zerkleinerten Ventrikel in einen 50 ml Erlenmeyerkolben erfolgte der Gewebeaufschluss in 15 ml 1 x ZIM-Trypsin Lösung für 15 min bei 37°C unter Rühren in einem Wasserbad. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen mit 4 ml

eiskaltem FKS überführt und 10 min bei 400 g bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml CMRL 1415-Medium + FKS (1:1) resuspendiert und auf Eis gelagert. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis sich die Ventrikel fast vollständig aufgelöst hatten. Die gesammelten Überstände aus den resuspendierten Zellpellets wurden vereinigt und erneut für 10 min bei 400 x g zentrifugiert. In Abhängigkeit von der Anzahl der präparierten Herzen wurde das Zellpellet in Kompletmedium aufgenommen, (1 Herz = 1 ml Medium, 60 Herzen = 60 ml Medium) auf 1 - 3 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen übertragen und für 90 min bei 37°C im Inkubator (0 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. In dieser Zeit erfolgte ein selektives Anheften von Nicht-Herzmuskelzellen. Danach wurde der Überstand mit den angereicherten NRCM abgenommen, in eine neue Flasche überführt und die Zellzahl bestimmt. Je nach experimenteller Verwendung wurden die Zellen in entsprechenden Zellkulturplatten in Kompletmedium (Kapitel 2.8) ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gegen Vollmedium (Kapitel 2.8) ausgetauscht. 48 h bis 72 h nach Präparation haben sich die NRCM adaptiert und es wurde mit den Experimenten begonnen. Danach erfolgte alle 48 h ein Mediumwechsel mit Vollmedium.

### **3.7.5 Zellzahl-Bestimmung**

Um die Zellzahl und den Anteil der lebenden Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit einer Trypanblau-Lösung angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Trypanblau färbt lediglich tote Zellen aufgrund ihrer defekten Zellmembran an. Es wurden jeweils 4 Großquadrate (Q) ausgezählt und die Zellzahl dann nach folgender Formel berechnet:

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

### **3.7.6 Transfektion von eukaryotischen Zellen**

Das Einschleusen nackter DNA in adhärent wachsende Zellen erfolgte durch Kalziumphosphattransfektion, ein Verfahren mit dem man eine transiente Genexpression erzielen kann. Hierbei wird die DNA mit einer Kalziumchlorid-Lösung und Phosphatpuffer (HBS) gemischt. Die gebildeten DNA-Kalziumphosphat-

Copräzipitate treten mit der Zelloberfläche in Kontakt und werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen auf eine neue Zellkulturschale so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50 – 80 % konfluent sind.

Der benötigte pH-Wert von 7,1 des HBS-Puffers wurde direkt vor jeder Transfektion überprüft, gegebenenfalls neu eingestellt und der Puffer anschließend steril filtriert.

Für die Vertiefung einer 6-Well-Platte enthielt der Transfektionsansatz 1 µg DNA, 250 µl 250 mM CaCl<sub>2</sub> und 250 µl 2 x HBS-Puffer. DNA und CaCl<sub>2</sub> wurden miteinander vermischt und anschließend tropfenweise der 2 x HBS-Puffer hinzugegeben. Nach 1 min Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in das Zellkulturmedium pipetiert und nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> das Medium gewechselt.

### **3.7.7 Zellviabilitäts-Assay mittels XTT**

Die Bestimmung lebender Zellen wurde mit dem Cell Proliferations Kit – XTT (Roche) nach den Anleitungen des Herstellers durchgeführt. 24 h vor Transduktion wurden 5x10<sup>4</sup> Zellen/Well in eine 96 Well-Platte ausgesät, so dass am Folgetag ein konfluenter Zellrasen bestand. Anschließend wurden die Zellen mit den jeweiligen AAV-Vektoren mit unterschiedlicher Dosierung transduziert und weitere 24 h später erfolgte die Infektion mit CVB3 (Kapitel 3.8.2).

An den nachfolgenden Tagen wurde zu dem Zellkulturmedium das Nachweisreagenz hinzugegeben und 4 h später die Absorption bei 492 nm gemessen. Der gemessene Wert ist proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen.

## **3.8 Virologische Methoden**

### **3.8.1 Anzucht von Coxsackieviren**

Zur Anzucht der Coxsackieviren wurde entweder ein gelagerter Virusstock (CVB2 – CVB5) oder ein, von ATCC gelieferter Virusstock (CVB1 und CVB6) als Ausgangsmaterial benutzt. 24 h vorher wurden HeLa-Zellen in eine Zellkulturflasche

(150 m<sup>2</sup>) eingesät, so dass der Zellrasen am Tag darauf konfluent war. Der Virusstock (1 ml) wurde mit 19 ml Medium ohne FKS vermischt und auf den konfluenten Zellrasen gegeben, von dem vorher das Kultivierungsmedium abgenommen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde das Virus abgenommen und 35 - 40 ml Medium mit 2 % FKS auf die Zellen gegeben. Nachdem die Zellen komplett lysiert waren (nach ca. 6 - 8 h) wurde die Flasche samt Virus/Zelllysat bei -20°C eingefroren.

Am Folgetag wurde die Flasche bei RT aufgetaut und das Zelllysat mit einem Mörser durch 20xliges auf- und abziehen weiter zerkleinert. Nachdem die Zelltrümmer bei 3.000 rpm und 4°C, 20 min abzentrifugiert wurden, wurde das Virus aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **3.8.2 Infektion von Zellkulturen mit Coxsackieviren**

Die Infektion von Zellen mit Coxsackievirus erfolgte stets mit Serum freiem Medium. Das Virusaliquot wurde unmittelbar vor der Infektion aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen und schnell bei 37°C (HRV14 bei 33°C) aufgetaut. Je nach Konzentration des Virus (plaque forming units - pfu/ml) und der multiplicity of infection (moi) wurde das Virus mit Medium ohne FKS verdünnt, das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und das verdünnte Virus vorsichtig auf die Zellen pipetiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C (HRV14 bei 33°C) wurde der Virusüberstand abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium (5 % FKS) weiter kultiviert. Je nachdem wie permissiv die jeweilige Zelllinie für Coxsackieviren ist und wie schnell das Virus in dieser repliziert, wurden die Zellen 1 - 6 Tage bei 37°C weiter inkubiert (HRV14 bei 33°C).

Die moi berechnet sich aus der Zellzahl und der Konzentration des verwendeten Virus. Dabei bedeutet, dass bei einer moi 1, ein Viruspartikel pro Zelle auf die Zellkultur gegeben wird; moi von 0,1 bedeutet 1 infektiöses Virus auf 10 Zellen etc.

### 3.8.3 Bestimmung der Coxsackievirus-Konzentration durch Plaque-Assay

Um die Anzahl der infektiösen Viruspartikel in einer Probe zu ermitteln, wurde diese Probe auf HeLa Zellen mittels Plaque-Assay austitriert. Dafür wurden am Vortag HeLa-Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag einen konfluenten Monolayer gebildet haben (24 Well-Platte =  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Well; 6 Well-Platte =  $1 \times 10^6$  Zellen/Well).

Am nächsten Tag wurde von der zu bestimmenden Virusprobe eine logarithmische Verdünnungsreihe mit Serum freiem Medium hergestellt. Nachdem das Medium von den konfluenten HeLa-Zellen abgesaugt wurde, erfolgte die Inokulation von 300 µl (24-Well-Platte) bzw. 1 ml (6-Well-Platte) Virusverdünnung für 30 min bei 37°C im Brutschrank (HRV14 bei 33°C). Bereits vor der Inokulation des Virus wurde der Agar-Overlay, bestehend aus zwei Lösungen, vorbereitet. In Lösung A wurde 0,32 g Agar mit 10 ml A. dest. gemischt und anschließend in einem Topf mit Wasser über einen Bunsenbrenner für 15 min gekocht bis sich der gesamte Agar aufgelöst hat. Für Lösung B wurden 30 ml Eagle Overlay (Kapitel 2.8) mit 4 ml FKS vermischt und im Wasserbad auf 41,5°C erwärmt. Nach 15minütigem Kochen der Lösung A, wurde die Lösung B zur Lösung A hinzugegeben, gut durchmischt und im Wasserbad bei 41,5°C mindestens 30 min temperiert.

Nach 30minütiger Inokulation der Virusverdünnungen, wurde diese vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 500 µl (24 Well-Platte) bzw. 2 ml (6 Well-Platte) Agar-Overlay überschichtet. Nach Erkalten und Verfestigung des Overlay wurden die Zellen je nach Coxsackievirusserotyp für 1 – 3 Tage inkubiert (Brutschrank bei 37°C – HRV14 bei 33°C), anschließend die Plaques angefärbt und ausgezählt. Zum Anfärben wurde 0,02 g Neutralrot in 50 ml PBS gelöst, filtriert und jeweils 500 µl (24-Well-Platte) bzw. 2 ml (6-Well-Platte) auf den Agar-Overlay pipetiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C im Brutschrank für 2,5 bis 4 h wurde die Färbelösung abgesaugt, ohne den Agar zu beschädigen, und anschließend die Plaques ausgezählt.

Wenn ein Gewebestück als Ausgangsmaterial für ein Plaqueassay vorhanden war, wurde dieses in 2 ml serumfreien Medium aufgenommen, mit Hilfe eines Häckslers zerkleinert und dreimal eingefroren und aufgetaut. Anschließend wurden die zerkleinerten Gewebestückchen bei 5.000 rpm für 3 min abzentrifugiert und der Überstand für das Plaqueassay verdünnt.

Die Anzahl der infektiösen Viruspartikel wird in plaque forming units (pfu) angegeben und wie folgt bestimmt:

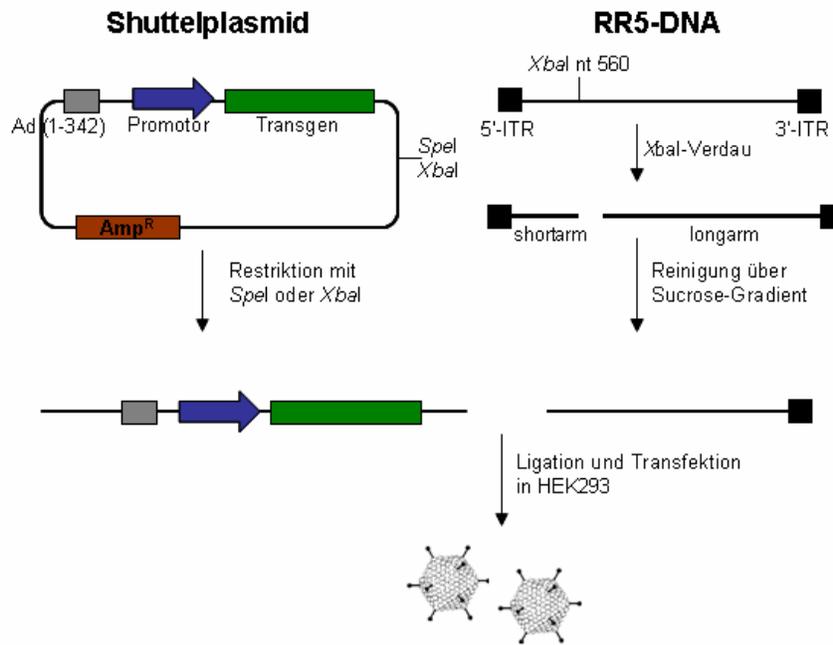
gezählte Plaques / Inokulationsvolumen [ml] x Virusverdünnung = pfu/ml

#### **3.8.4 Nachweis von CVB3-RNA mittels *in situ*-Hybridisierung**

Um die CVB3 infizierten Zellen im Herzen nachzuweisen, wurde das CVB3-RNA Genom mit radioaktiven einzelsträngigen RNA-Sonden hybridisiert. Die <sup>35</sup>S-markierten Sonden wurden mit Hilfe des Plasmides pCVB3-R1 hergestellt. Kontroll RNA-Proben wurden vom Vektor pSPT18 gewonnen (Klingel et al., 1992). Die *in situ*-Hybridisierung wurde im Labor von Prof. Klingel, Tübingen durchgeführt.

### **3.9 Konstruktion und Produktion adenoviraler Vektoren**

Die adenoviralen Vektoren wurden durch *in vitro* Ligation eines Shuttle-Plasmids mit dem langem *Xba*I-Fragment (RR5-long arm) der RR5-DNA generiert und in HEK 293 Zellen produziert (Abb. 3.3). RR5 ist ein Ad5 Mutant mit einer singulären *Xba*I-Schnittstelle, einer Deletion der E1-Region (Nukleotid 445 – 3.333) und E3-Region im Wildtyp vom Ad5-Genom. Nach *in vitro* Ligation, Transformation und Amplifizierung folgte die Reinigung durch Ultrazentrifugation mittels Cäsiumchlorid-Gradienten und anschließender Entfernung des Salzurückstandes. Der Titer der produzierten Viren wurde dann bestimmt.



**Abb. 3.3:** Schema zur Konstruktion von rekombinanten AdV.

### 3.9.1 Herstellung des RR5-*longarm*

Aus  $5 \times 10^{12}$  RR5-Viruspartikeln wurde die DNA isoliert (Kapitel 3.2.3). Die RR5-DNA (80 - 100  $\mu\text{g}$ ) wurde in einem 1 ml Restriktionsansatz mit 400 U *XbaI* über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden weitere 80 U *XbaI* zugegeben und nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C wurde zur Inaktivierung des Enzyms, der Ansatz 5 min bei 60°C erhitzt. Nachdem die Vollständigkeit des Verdauens durch elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots überprüft wurde (*longarm* 33,33 kb und *shortarm* 0,57 kb), erfolgte die Dephosphorylierung (Kapitel 3.3.2). Die Auftrennung beider Fragmente erfolgte durch Ultrazentrifugation mittels Sucrose-Gradienten. Danach wurde die 33,33 kb RR5-Bande gesammelt, gefällt, in TE-Puffer gelöst und 1  $\mu\text{g}$  Aliquots bei -20°C gelagert.

### 3.9.2 Generierung und Produktion adenoviraler Vektoren

#### 3.9.2.1 Ligation und Vorkultur

Für *in vitro* Ligation der Adenovirus-DNA wurden in einem 40  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz 1  $\mu\text{g}$  des adenoviralen *XbaI*-long arm, 500 ng des linearisierten Shuttle-Plasmids

(über *Xba*I- oder *Spe*I-Verdau), 1 U DNA-Ligase und 4 µl des mitgelieferten Puffersystems zusammen pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am Vortag wurden bereits auf einer Ø60 mm-Kulturplatte  $1 \times 10^6$  HEK 293-Zellen ausgesät und der Ligationsansatz nun mit dem Kalzium-Phosphat Transfektions-Kit nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Kulturmedium abgenommen, die transfizierten Zellen mit PBS vorsichtig gewaschen und mit Agarose (Kapitel 3.9.3) überschichtet. Nach 7 bis 14 Tagen wurden unter dem Mikroskop bis zu zehn gut isolierte virale Plaques auf der unteren Seite der Kulturplatte markiert, unter der Werkbank mit einer 1 ml Pipette ausgestochen und in 500 µl des mit 2% FKS versetzten DMEM Low Medium aufgenommen (**Plaquelösung**). Die Plaquelösung wurde dreimal in dem Medium eingefroren und wieder aufgetaut, damit die Zellen platzen und alle Viren in das Medium abgegeben werden. Zur Amplifikation der Plaques wurden 500 µl der Plaquelösung auf eine Ø60 mm-Kulturplatte HEK 293-Zellen gegeben, die bereits am Vortag ausgesät wurden. Nach einer Inkubation für 2 h folgte die Zugabe von 4 ml DMEM (High Medium) mit 10 % FKS und eine weitere Inkubation.

In der Regel waren nach 5 bis 7 Tagen die gesamten Zellen lysiert und lösten sich vom Boden der Zellkulturplatte ab. Das Zelllysate wurde dann geerntet, in 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut.

Das Zell-Virus-Lysat wurde 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert und wiederum 500 µl virushaltiger Überstand (**Primärlysate**) zur weiteren Amplifikation, wie oben beschrieben, auf neue Zellen gegeben. Nach 5 Tagen wurden erneut Medium und Zellen nach vollständiger Lyse geerntet (**Sekundärlysate**).

Vom **Sekundärlysate** wurden 1,5 ml in 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und 10 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Die gesamte DNA wurde aus dem Zellpellet isoliert (Kapitel 3.2.3) und mit Ethanol gefällt (Kapitel 3.2.4). Anschließend wurden die amplifizierten Plaques auf das Insert des Shuttleplasmids, auf RR5-Kontamination (Primer-Paar Ad5 324s / Ad5 4600as) und auf Rekombination zu replikations-kompetenten Adenoviren (RCA) (Primer-Paar Ad5 3315s / Ad5 4600as) mittels PCR überprüft, (Kapitel 3.4.2). Zur Überprüfung des Inserts wurden spezifische Primer verwendet. Das RCA-freie und auf Transgen positiv getestete **Sekundärlysate** wurde weiter vermehrt und zur Produktion von Adenoviren in größerer Menge verwendet (Kapitel 3.9.2.2).

### 3.9.2.2 Adenovirus-Präparation

Das RCA-freie **Sekundär-Lysat** (je 500 µl) wurde erneut auf drei 60 mm-Kulturplatten mit konfluentem HEK293 Zellenrasen gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit wurden 4,5 ml Low-Medium zugegeben und die Zellen weiter inkubiert. Nach kompletter Lyse des Zellrasens (nach 4 Tagen) wurden die Lysate der drei Platten gesammelt und in einer sterilen 250 ml-Flasche mit 180 ml Low-Medium gemischt. Zehn Ø14,5 cm-Kultur-Platten mit konfluenten HEK293-Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und 9 Platten mit jeweils 20 ml der Virus-Lösung/Low-Medium-Mischung infiziert. Eine Platte diente als Kontrolle und wurde nur mit Low-Medium kultiviert. Nach weiterer Inkubation bei 37°C für 4 Tage wurde das entstandene Virus-Lysat der 9 Platten in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit Nonidet-P40 (Endkonzentration: 0,5 %) zum Zellaufschluss vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde dann für 10 min bei 13.000 rpm (20.000 x g) bei 4°C zentrifugiert und der virushaltige Überstand in einen sterilen 250 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Dazu wurden 0,5 Vol steril filtrierter, gekühlter PEG/NaCl-Puffer (20% PEG, 2,5 mM NaCl) hinzugefügt und die Viruspartikel durch Inkubation der Lösung über Nacht bei 4°C präzipitiert. Am nächsten Tag wurden die Viren bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert, das Virus-Pellet in 4 ml TBS resuspendiert und nochmals bei 3.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

### 3.9.2.3 Aufreinigung durch Ultrazentrifugation

Zu 4 ml virushaltigem Überstand (Kapitel 3.9.2.2) wurden ca. 2 g CsCl gegeben (Dichte von 1,34 g/ml). Der Ansatz wurde 1 h bei 4°C inkubiert und die Zellbruchstücke bei 3.000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Mittels einer Pasteur-Pipette wurde der Überstand in zwei Beckman-Ultrazentrifugen-Röhrchen (2 ml/Tube) überführt, genau austariert und mittels eines Tube-Topper-Heaters (Beckman, USA) versiegelt. Nach der Zentrifugation bei 90.000 rpm für 3 h bei 20°C (Beckman Ultrazentrifuge, TLA-120 Rotor) sammelten sich die viralen Partikel als weißer Ring in der Mitte des Röhrchens an. Der Virus-Ring wurde mit einer sterilen Insulin-Spritze abgezogen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend das CsCl entfernt. Dies erfolgte über Gelfiltrations-Chromatographie

mittels NAP<sup>TM</sup>-Säulen. Nachdem die Säule mit 25 ml TBS äquilibriert wurde, erfolgte die Zugabe von 1 ml Virus-Probe direkt auf die Säule, die nach Durchlauf mit 2,5 ml TBS aufgefüllt wurde. Die Säule wurde mit weiteren 6 ml TBS gewaschen und das Eluat in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen in 14 Fraktionen á 0,5 ml aufgefangen. 10 µl jeder Fraktion wurden mit 90 µl TBS vermischt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm im Genesys 6 UV-Spektrometer (Thermo Electron Corporation, USA) gemessen. Drei bis vier Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen wurden gesammelt, vereinigt und die Konzentration erneut bestimmt. Die Partikelzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration in Partikel pro } \mu\text{l (pt}/\mu\text{l)} = \text{OD} \times 10 \times 10^9$$

Die Virus-Lösung wurde mit BSA (Endkonzentration von 1,0 mg/ml) zum Stabilisieren des Virus gegenüber dem Gefriervorgang versetzt und in 50 µl bis 200 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Aus einem 200 µl Virusaliquot wurde die DNA isoliert und mittels PCR nochmals auf das Transgen und auf RCA Kontamination hin überprüft. Zusätzlich wurde die Integrität des Virus-Genoms durch *HindIII*-Verdau analysiert.

### **3.9.3 Bestimmung der biologisch aktiven adenoviralen Partikelkonzentration**

Die Bestimmung der biologisch aktiven (infektiösen) adenoviralen Viruspartikel erfolgte über Plaqueassay. Dazu wurden 10 µl Virus-Probe in 990 µl DMEM Medium (mit 2% FKS) aufgenommen ( $10^{-2}$  Verdünnung). Ausgehend von dieser  $10^{-2}$ -Verdünnung wurde die Virusprobe weiter bis auf  $10^{-9}$  logarithmisch verdünnt. 900 µl der jeweiligen Verdünnungen wurden anschließend auf eine 6-Well Platte mit konfluentem HEK293-Zellrasen gegeben und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde autoklavierte 5 %ige Low-Melting-Agarose-Lösung (Kapitel 2.8) 5 min in der Mikrowelle bei 200 W zum Schmelzen gebracht und auf 42°C im Wasserbad temperiert. Die flüssige Agarose wurde mit temperierten Medium (37°C) 1:4 vermengt und das 1,25 %iges Agarose-Medium auf die HEK 293 Zellen, nach Absaugen der Virusverdünnung, gegeben (3 ml pro Well). Nach Verfestigung der Agarose bei Raumtemperatur wurden die Platten bei 37°C weiter inkubiert bis sich

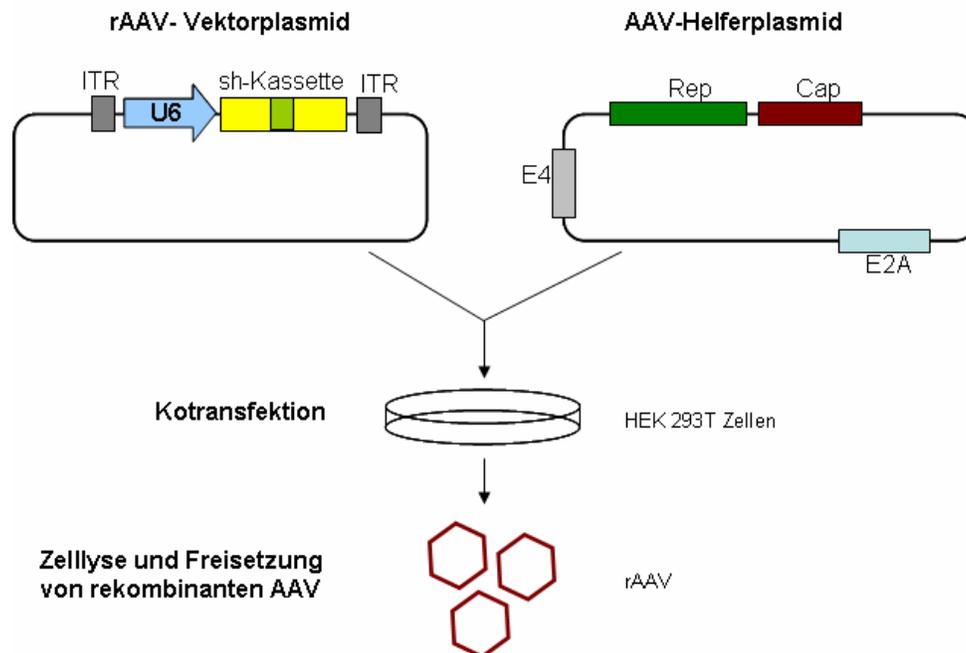
innerhalb von 10 Tagen virale Plaques bilden. Nach dem 14. Tag wurden die Plaques ausgezählt und der Virustiter wie folgt berechnet:

$$\text{Virustiter in (pfu/ml)} = \frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsstufe}}{\text{Volumen der Virusverdünnung}}$$

### **3.10 Konstruktion und Produktion adeno-assozierter Virusvektoren**

#### **3.10.1 Transfektion**

Für die Herstellung von adenoassoziierten Virusvektoren (AAV-Vektoren) wurden HEK 293T Zellen verwendet. Dafür wurden auf 20 Zellkulturplatten (Ø14,5 cm)  $1 \times 10^7$  Zellen pro Platte ausgesät, so dass sie am nächsten Tag ca. 80 % Konfluenz erreicht hatten. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Methode (Kapitel 3.7.6). Dabei wurden pro Platte 6 µg transgenes Plasmid und 18 µg Helfer Plasmid (pDP6) für scAAV2/6 (Abb. 3.4) bzw. 18 µg p5E18-VP 2/9, 18 µg P-Helfer und 10 µg transgenes Plasmid für scAAV2/9 verwendet. Es wurden 1 ml 250 mM  $\text{CaCl}_2$  dazu pipettiert, geschüttelt und anschließend 1 ml HBS tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde 1 min bei RT inkubiert, bevor er auf die Zellen gegeben wurde. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  erfolgte ein Mediumwechsel, danach wurden die Zellen für weitere 72 h inkubiert.



**Abb. 3.4:** Schema des 2-Plasmid-Protokolls für die Herstellung von AAV. HEK 293T Zellen werden mit 2 Plasmid kofransfiziert. Das AAV-Shuttelplasmid enthält das von 2 ITR's flankierte Transgen. Das AAV-Helferplasmid trägt die Genkassette für rep und cap sowie die adenoviralen Gene für E2A und E4.

### 3.10.2 Ernte der AAV-Vektor produzierenden Zellen

Die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion durch Abschaben abgelöst, zusammen mit dem Medium resuspendiert und 10 min bei 3.000 g in 50 ml Röhrcen zentrifugiert (2,5 Platten pro 50 ml). Der Überstand wurde für die Weiterverarbeitung in einen Erlenmeyerkolben überführt. Die Zellpellets wurden in je 10 ml PBS resuspendiert und in 2 x 40 ml vereinigt. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 3.000 g. Die Zellpellets wurden erneut in 25 ml PBS resuspendiert und anschließend bei 3.000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert und durch viermaliges Einfrieren im Ethanol-Trockeneisbad und Auftauen bei 37°C im Wasserbad aufgeschlossen. Der gelösten Zell-AAV-Suspension wurden 15 µl (3.750 U) Benzoylase zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min bei 6.000 g wurde der Überstand abgenommen, nochmals zentrifugiert (20 min bei 6.000 g) und anschließend über einem Iodixanolgradienten (Kapitel 3.10.3) weiter aufgereinigt.

### 3.10.3 Fällung und Aufreinigung der AAV-Vektoren

Der in Kapitel 3.10.2 gesammelte virushaltige Überstand (ca. 400 ml) wurde mit 8 ml 2,5 M CaCl<sub>2</sub> versetzt, gemischt, 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 4.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt, 130 ml PEG-Lösung zugegeben und für 48 h bei 4°C belassen. Je 50 ml der Virussuspension wurden auf 50 ml Röhrchen verteilt und 30 min bei 3.000 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden jeweils in 500 µl NaCl-HEPES-Lösung resuspendiert, vereinigt und nochmals zentrifugiert bei 10.000 g für 15 min. Zum virushaltigen Überstand wurden 8 µl (2.000 U) Benzonase zugegeben und für 1,5 h bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung der AAV-Fraktion erfolgte durch einen Iodixanolgradienten (Tab. 3.7) in einer Ultrazentrifuge. Der Virusüberstand wurde zuerst mit 6 ml 15 % Iodixanollösung, dann mit 4,5 ml 25 %, mit 3,5 ml 40 % und abschließend mit 3,5 ml 54 % Iodixanollösung unterschichtet. Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden mit 1 x PBS/MK-Lösung bis zum Rand aufgefüllt, austariert und für 2,5 h bei 54.000 g und 18°C zentrifugiert. Die dabei entstandene sichtbare Virusbande über der 54 %igen Iodixanol Phase wurde mit Hilfe einer Kanüle (18G) abgezogen. Die AAV-Vektoren wurden bei -80°C gelagert.

**Tabelle 3.7:** Herstellung eines Iodixanolgradienten

	<b>15% Iodixanol</b>	<b>25% Iodixanol</b>	<b>40% Iodixanol</b>	<b>54% Iodixanol</b>
1 x PBS/MK	37,5 ml	28 ml	16,5 ml	5 ml
Iodixanol Stock (60 %)	12,5 ml	20 ml	33 ml	45 ml
Phenolrot	/	100 µl	/	100 µl
Gesamtvolumen	50 ml	48 ml	49,5 ml	50 ml

### 3.10.4 Bestimmung des genomischen Titers durch Slot-Blot

Für die genomische Titerbestimmung erfolgte eine Isolation der AAV-DNA nach Kapitel 3.2.3. Der Titer gibt die Anzahl DNA enthaltener Partikel pro ml an. Für eine genaue Validierung der Virustiter wurde für jedes der zu bestimmenden Viren ein eigener Standard generiert. Dafür wurden die AAV-Plasmide mit *Sma*I geschnitten, welches sowohl in der 3'-ITR als auch in der 5'-ITR schneidet und dadurch ein DNA-

Fragment von einer Virusgenomlänge entstand. Von diesem AAV-Plasmid-Standard wurden, ausgehend von 1 ng/μl eine Verdünnungsreihe von 10<sup>-1</sup> - 10<sup>-4</sup> hergestellt und wie die AAV-DNA weiterverwendet.

Von der AAV-DNA wurden jeweils 10 μl und 20 μl mit der gleichen Menge an 1 N NaOH versetzt und für 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde 1 Vol 20xSSC zu den Proben gegeben und das gesamte Volumen mittels einer Slot-Blot-Apperatur auf eine Nylonmembran transferiert. Für die Hybridisierung wurde eine Sonde hergestellt, die sowohl im AAV-Genom, als auch im Standard bindet. Bei den scAAV-Pseudotypen, die eine shRNA expremieren, wurde eine Sonde benutzt, die spezifisch an den U6-Promotor bindet, bei den scAAV-GFP Pseudotypen eine gegen den CMV-Promotor. Die Stärke des Hybridisierungssignals von der Virus-DNA wurde in das Verhältnis des jeweiligen Standards gesetzt. Um die genaue Virusgenomzahl zu ermitteln, musste vorher das Molekulargewicht der Standards berechnet werden. Damit ließ sich die Anzahl der Viruskopien im Standard und das direkte Verhältnis zum Hybridisierungssignal wie folgt ermitteln:

### **Avo\*\* x Standardkonzentration / MW des Standards**

Formel zur Berechnung des Molekulargewichtes (MW) (g/mol):

$$[(313,2 \times A^*) + (329,2 \times G^*) + (289,2 \times C^*) + (304,2 \times T^*)] - (62 \times 2)$$

\*Entspricht der Anzahl der Nukleotidbasen im Standard

\*\*Avogadro Zahl definiert als Teilchenzahl N pro Stoffmenge  $n = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

## **3.11 Expressionsnachweis-Methoden**

### **3.11.1 Immunfluoreszenz-Färbung**

Die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung diente zum Nachweis des CAR-Proteins in verschiedenen Zelllinien. Dazu wurden die Zellen auf 40 mm-Zellkulturschalen ausgesät (2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Schale) und 24 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann entsprechend transfiziert und unterschiedlich lange im Brutschrank weiter

inkubiert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde 1 ml Fixierungslösung (Kapitel 2.4) zugegeben und die Schale 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit jeweils 3 ml TBS wurde der Puffer vollständig entfernt, jedoch ohne die Zellen austrocknen zu lassen. Mit einem Wattestäbchen wurde ein Kreis von ca. 20 mm Durchmesser in den Zellrasen eingezeichnet und mit einem Fettstift (Dako Cytomation, Dänemark) nachgezogen. In dem abgedichteten Kreis wurden nun die Zellen mit 100 µl Blockierungslösung (Kapitel 2.4) 20 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 100 µl TBS wurden 100 µl der jeweiligen, in Blockierungslösung verdünnten, primären Antikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Inkubationszeit betrug je nach Antikörper entweder 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C. Die Zellen wurden erneut dreimal gewaschen und mit 100 µl des jeweiligen in Blockierungslösung verdünnten sekundären Antikörpers für 45 min bei RT in einer abgedunkelten Kammer inkubiert und anschließend ebenfalls dreimal gewaschen.

Um den Zellkern anzufärben, schloss sich eine 10minütige Inkubation mit 100 µl 0,5 mg/ml DAPI-Lösung und anschließendes Waschen (3x) an. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Puffer vollständig entfernt, die Zellen mit einem Tropfen Fluoromount G eingebettet und mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Olympus BX60 Immunofluorescence Mikroskops unter Verwendung der Software AnalySIS (Olympus).

### **3.11.2 Western-Blot**

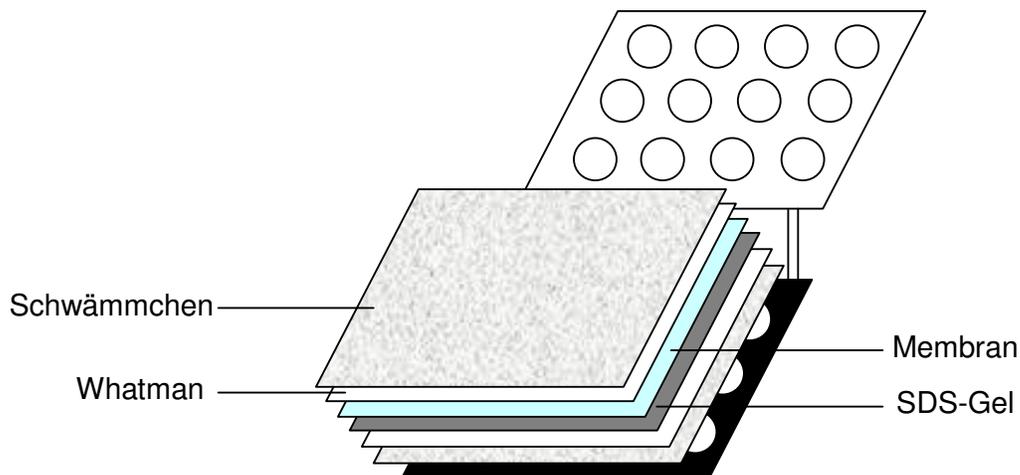
Des Weiteren wurde die Expression von Proteinen mittels Western-Blot nachgewiesen und quantifiziert. Dafür wurden die Zellen (6 Well-Platte) mit PBS gewaschen und mit 250 µl PBS unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Platte gelöst und in ein Eppendorf-tube überführt. Nach 3 min Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4°C, wurde der PBS-Überstand abgesaugt und das Pellet je nach Größe in 50 – 100 µl „General“-Lysispuffer (Kapitel 2.4) resuspendiert. Gewebestücke (ca. 20 - 30 mg) wurden ebenfalls in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und mit einem sterielen Plastikstößel zerkleinert. Das Lysat wurde für 15 min auf Eis

inkubiert und anschließend die Zelltrümmer bei 14.000 rpm für 5 min (4°C) abzentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA-Test unter Anleitung des Herstellerprotokolls.

20 µg Gesamtprotein wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurde die entsprechende Menge Zellysats mit 4 x Ladepuffer (Kapitel 2.4) vermengt, für 5 min in siedendem Wasser denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Trennung der Proben erfolgte durch ein 4 - 12% SDS-Gel in Laufpuffer für 1 - 1,5 h bei 90 - 140 V.

Der sich anschließende Western-Blot wurde wie in Abbildung 3.5 gezeigt aufgebaut, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen den Transfer der Proteine negativ beeinflussen. Die Nylonmembran wurde zuvor für 10 s in Methanol eingelegt und dann mit A. dest. gespült. Schwämmchen und Whatmanpapier wurden gut in Transferpuffer (Kapitel 2.4) eingeweicht, damit das Gel während des Blottens nicht austrocknet. Bei 200 mA wurden die Proteine für 1 - 2 h vom Gel auf die Nylonmembran transferiert. Danach wurde die Nylonmembran kurz in Ponceau-rot angefärbt, um sicher zu gehen, dass der Transfer funktioniert hat. Mit TBST wurde die Membran entfärbt und für die Antikörpermarkierung für 30 min bei RT in 5 % Magermilchpulver/TBST blockiert.

Der 1. Antikörper wurde in der jeweiligen Konzentration mit der Blockierungslösung verdünnt und die Membran damit für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3xligem Waschen mit TBST (je 10 – 20 min) folgte die Inkubation mit einem HRP-konjugiertem, sekundären Antikörper (in 5 % Magermilchpulver/TBST) für 1 h bei RT.



**Abb. 3.5:** Schematischer Aufbau eines Western-Blots

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran wiederum dreimal für 10 - 20 min in TBST gewaschen. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden mit dem ECL Plus - Reagenz nachgewiesen. Dabei wird das Substrat Luminogen, durch die am sekundären Antikörper gekoppelte HRP, unter Absenden von Licht (Chemilumineszenz) oxidiert. Mit diesem Licht wurde ein Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL belichtet und somit die Quantität der Proteine bestimmt.

### **3.11.3 Luciferase-Assay**

Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Abgabe eines Photons in Form einer messbaren Lumineszenz und wurde so als Reporter für verschiedene Expressionsanalysen verwendet.

Der Nachweis der Luciferase-Expression erfolgte mit dem Luciferase Detection Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Nach Abnehmen des Mediums und Waschen der Zellen mit 1 x PBS wurden die Zellen direkt mit 250 µl Lysispuffer (24 Well-Platte) lysiert. Gewebestücke (zwischen 20 - 30 mg) wurden in 500 µl Lysispuffer aufgenommen und unter Zuhilfenahme eines sterilen Plastikstößels zerkleinert. Danach erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend wurde das Zelllysat in Eppendorf-Tubes überführt und für 15 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden mit 50 µl Luciferin gemischt und die Luciferase-Aktivität innerhalb 20 s mit einem Luminometer bestimmt.

### **3.11.4 FACS-Messung**

Um zu überprüfen, wie effizient die Adenovektoren HL-1 Zellen transduzieren, wurden diese mit verschiedenen Mengen eines GFP exprimierenden Adenovektors inkubiert und 48 h später mittels FACS-Analyse die Expression des Markergens quantifiziert.

HL-1 Zellen wurden in eine 6-Well-Platte ausgesät und 24 h später mit unterschiedlichen Mengen AdCMVGFP inkubiert. 48 h später wurden die Zellen trypsiniert, mit 3 ml FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen für 5 min bei 1.200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das

Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messungen wurden an dem FACS Calibur vorgenommen und die Ergebnisse mittels CellQuest Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

### **3.11.5 ELISA**

Zur Quantifizierung des gebildeten sCAR-Fc *in vitro* und *in vivo*, wurde ein ELISA benutzt, der spezifisch das humane IgG-Fc detektiert und so mit Hilfe eines IgG-Fc Standards eine absolute Quantifizierung erlaubt. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Die einzelnen Proben wurden jeweils in mehreren Verdünnungsstufen eingesetzt. Um den *Background* zu ermitteln, wurde entweder Medium von untransfizierten Zellen oder Serum von unbehandelten Mäusen eingesetzt.

## **3.12 Tierversuche**

Die Mäuse wurden unter Beachtung der deutschen Tierschutzverordnung gehalten und gepflegt. Für die Tierversuche wurden C57BL/6-Mäuse (FEM, Charite bzw. Charles River, Sulzfeld/D) und Balb/c-Mäuse (Charles River, Sulzfeld/D) benutzt.

### **3.12.1 Transduktion von Mäusen mit AdV mittels Schwanzveneninjektion**

C57BL/6-Mäuse wurden mit  $1 \times 10^{11}$  pt/Maus AdV-Vektoren (AdCMVluc, AdshCAR4<sub>m</sub>, AdshPLB<sub>r</sub>) transduziert. Die Injektion erfolgte mit einem Gesamtvolumen von 250 µl (mit PBS verdünnt) über die Schwanzvene. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse euthanasiert, die Organe entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend wurden die Organe für Luciferase-Assay (Kapitel 3.11.3), Taq-Man (Kapitel 3.2.7) und Western-Blot (Kapitel 3.11.2) weiter verarbeitet.

### 3.12.2 Transduktionseffizienz von scAAV-Vektoren nach i.v. Applikation

Um die Transduktionseffizienz von unterschiedlichen pseudotypisierten scAAV-Vektoren zu bestimmen, wurden  $1 \times 10^{11}$  vg scAAV2-GFP, scAAV2.6-GFP und  $1 \times 10^{10}$  vg scAAV2.9-GFP i. v. in die Jugularisvene appliziert. Die 6 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäuse wurden dafür unter Ketanest-Inhalationsnarkose gehalten und die Vektoren mittels Katheter in die freipräparierte *Vena jugularis* mit einem Gesamtvolumen von 90  $\mu$ l injiziert. Anschließend wurde die Wunde vernäht und die Mäuse für weitere 10 Tage gehalten. Danach wurden sie euthanasiert, die Gewebe entnommen, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder in 4 %igem Formalin fixiert und anschließend in Parafin eingebettet.

### 3.12.3 CVB3-Myokarditismodell in scAAV2.9-transduzierten Mäusen

Die Mäuse wurden wie oben beschrieben mit scAAV2.9-shRdRP2.4 und scAAV2.9-shGFP transduziert und 9 Tage später, mit  $2 \times 10^5$  pfu CVB3 i.p. in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l infiziert. Nach weiteren 10 Tagen wurden die Mäuse narkotisiert, hämodynamisch charakterisiert und anschließend euthanasiert. Die Herzen wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren oder in 4 % Formalin fixiert. Die Gewebestücke im flüssigen Stickstoff wurden für die CVB3-Bestimmung mittels Plaque-Assay (Kapitel 3.8.3) benutzt, während die Formalin fixierten Herzstücke für die H&E-Färbung verwendet wurden (Kapitel 3.13).

Die hämodynamischen Messungen wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. Dirk Westermann, Charite – Universitätsklinikum Berlin durchgeführt. Die Mäuse wurden am Tag 9 p.i. mit Thiopental (125  $\mu\text{g/g}$  i.p.) narkotisiert und während der Messung beatmet. Die hämodynamischen Messungen wurden mit einem 1.2-F Milar Tipp Katheter im linken Ventrikel durchgeführt (Westermann et al., 2006).

### 3.12.4 Expression von sCAR-Fc durch AdG12 nach i.v. Applikation

Um die Effizienz und Regulierbarkeit der sCAR-Fc Expression des AdG12 *in vivo* zu untersuchen, wurde Balb/c-Mäuse mit  $3 \times 10^{10}$  pt AdG12 pro Maus i.v. über die *Vena*

*jugularis* (Gesamtvolumen 75 µl) injiziert (Kapitel 3.12.2).

Die 6 - 8 Wochen alten männlichen Mäuse wurden bereits 2 Tage vor Vektorapplikation, markiert, umgesetzt und entweder mit Dox im Trinkwasser (200 ng/ml in 5% Succrose) oder nur mit Succrose gehalten. Dabei wurde das Trinkwasser täglich erneuert.

Aller 2 - 3 Tage wurden Blutproben genommen, indem die V. jugularis kurz unterhalb des Unterkiefers mit einer Kanüle punktiert wurde. Das Serum wurde 8 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert und die sCAR-Fc Konzentration mittels Human-IgG-ELISA ermittelt (Kapitel 3.11.5). Dabei wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Nach einem Untersuchungszeitraum von 14 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert und Blut und Gewebe von Herz und Leber entnommen. Die Gewebstücke wurden entweder bei -80°C gelagert oder in 4%igem Formalin fixiert.

### **3.12.5 CVB3-Myokarditsmodell in AdG12-transduzierten Mäusen**

Zwei Tage vor der CVB3-Infektion wurden die Adenovektoren AdG12 über die V. *jugularis* appliziert (Kapitel 3.12.2).

Im protektiven Modell wurde die sCAR-Fc Expression zwei Tage vor CVB3-Infektion durch Zugabe von Dox in das Trinkwasser der Mäuse induziert (200 µg/µl Dox in 5 % Succrose). Im therapeutischen Ansatz wurde die sCAR-Fc Expression zeitgleich mit der CVB3-Infektion oder 24 h nach Infektion durch Dox-Zugabe ins Trinkwasser gestartet. Ausführliches Fließschema und Definition der Gruppen unter Kapitel 4.3.4.2 bzw. 4.3.4.3.

Die Tiere wurden zwei Tage nach Vektorapplikation mit  $5 \times 10^4$  pfu CVB3 i.p. in einem Gesamtvolumen von 250 µl infiziert. Als Negativkontrolle wurde 250 µl PBS i.p. appliziert. Während des Inkubationszeitraumes wurde in regelmäßigen Abständen das Aussehen, Gewicht und Verhalten der Mäuse beobachtet, um eine Aussage über den Krankheitsverlauf zu treffen. Am Endpunkt des Beobachtungszeitraums (Tag 7 p.i.) wurden die Mäuse narkotisiert und hämodynamisch charakterisiert (Kapitel 3.12.3). Anschließend wurden die Tiere euthanasiert und die Organe (Herz, Pankreas, Leber, Milz, Lunge, Darm, Niere) und Blut entnommen. Vom Herz wurden die Vorhöfe entfernt, der Ventrikel transversal geschnitten, der apikale Teil nochmals halbiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren (CVB3-Plaquesassay – Kapitel 3.8.3).

Der basale Teil wurde in 4 %igem Formalin fixiert und für H&E-Färbung (Kapitel 3.13) bzw. *in situ*-Hybridisierung (Kapitel 3.8.4) benutzt. Von den anderen Organen wurde ebenfalls eine Probe in Stickstoff eingefroren und ein Teil in Formalin fixiert.

### **3.13 HE-Färbung von Gewebeschnitten**

Um die Infiltration von Immunzellen in diversen Geweben zu bestimmen, wurden die Organe mit Haemotoxin-Eosin (HE) gefärbt, ein Farbstoff, der Zellen rot und Zellkerne blau anfärbt. Die verschiedenen Organe wurden nach Entnahme in 4 % Formalinlösung eingelegt und über mindestens 24 h fixiert. Anschließend wurden die Gewebe in Parafin eingebettet, mit einem Microtom in 4 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Glas-Objektträger übertragen. Die Entparafinierung der Schnitte und HE-Färbung wurde automatisiert durchgeführt und die gefärbten Gewebeschnitte anschließend mit Entellan<sup>®</sup> eingebettet und unter dem Mikroskop ausgewertet.

Für die Quantifizierung der Inflammation wurde eine Skala von 0 – 4 festgelegt: 0 = keine Infiltrate; 1 = kleine fokale Ansammlung von infiltrierenden Zellen zwischen Myozyten; 2 = größere Foki > 100 infiltrierende Zellen; 3 = < 10% des Gewebeschnittes von infiltrierender Zellen betroffen; 4 = 10 – 30% des Gewebeschnittes von Inflammation betroffen (Szalay et al., 2006).

### **3.14 Statistische Evaluierung**

Die Daten der Häodynamikmessungen wurden mit dem ungepaarten, zweiseitigen Mann-Whitney U Test verglichen. Die Berechnung statistischer Parameter für *in vitro* Versuche erfolgte unter Verwendung des Student-t-Test. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die *P*-Werte kleiner als 0,05 waren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Inhibierung der CVB3-Infektion durch Vektor-vermittelte Herunterregulation des zellulären Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR)

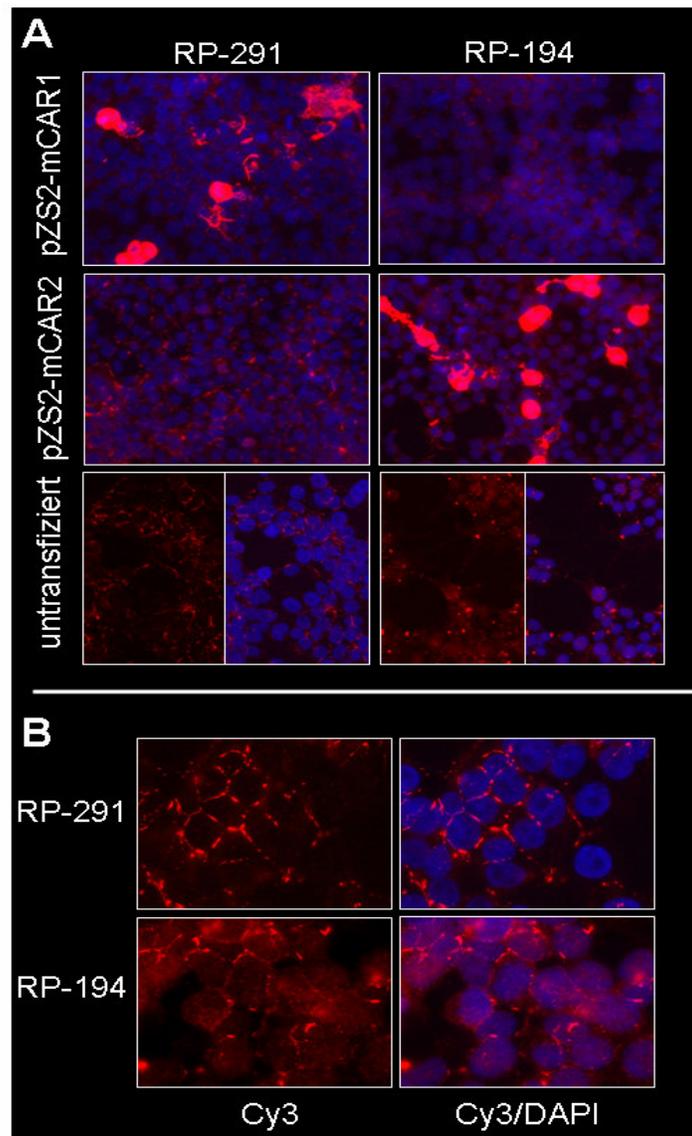
Essentiell für die Infektion von Zellen durch Viren sind spezifische zelluläre Rezeptoren, über die das Virus Kontakt mit der Zelle aufnimmt und in diese eindringt. Für Coxsackieviren der Subgruppe B ist CAR der Internalisierungsrezeptor und vermittelt die Aufnahme des Virus in die Zielzellen. Zellen, die dieses Protein nicht exprimieren, sind unter normalen Bedingungen nicht permissiv für CVB-Infektionen. Im ersten Teil der Promotion sollte die Expression von CAR in verschiedenen Zelltypen, unter anderen auch in kardialen Zellen untersucht werden. Anschließend sollte die Expression des CAR mittels RNAi in diesen Zielzellen herunterreguliert werden, um so kardiale Zellen vor einer CVB3-Infektion zu schützen.

#### 4.1.1 Expression von CAR1 und CAR2 auf unterschiedlichen Zelltypen

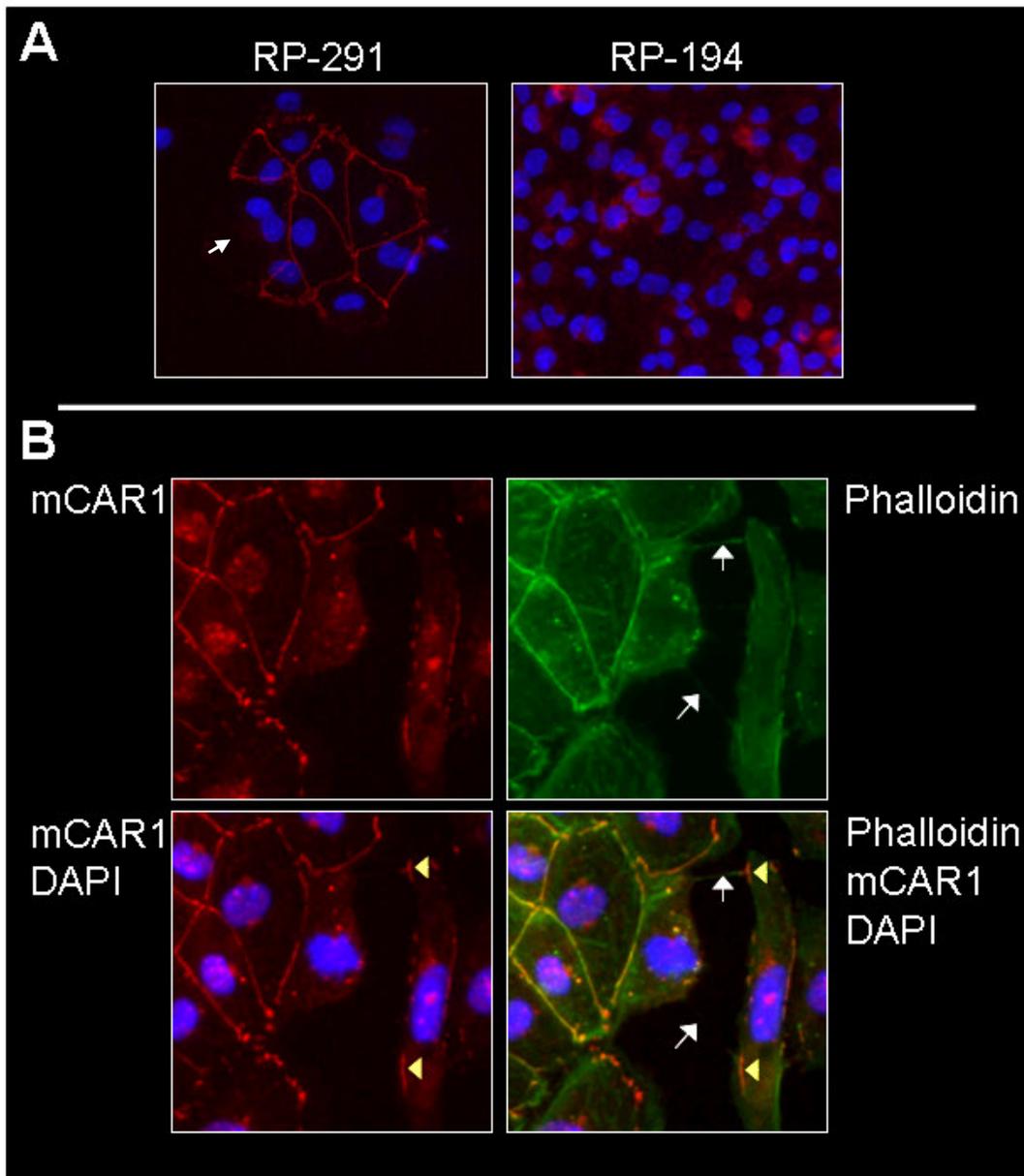
Um zu untersuchen, inwiefern die beiden CAR-Isoformen auf verschiedenen Zellkulturen vorhanden sind, wurden die humanen Zelllinien HEK 293T und HeLa, die kardiale Mauszelllinie HL-1 und neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) mit zwei verschiedenen Antikörpern untersucht, die spezifisch Maus-CAR1 (mCAR1) und mCAR2 erkennen (Shaw et al., 2004). Dabei bindet der Antikörper RP-291 spezifisch gegen das SIV-Motiv am intrazellulären C-terminalen Ende von mCAR1 (Accession-Nr. NM\_001025192), während RP-194 gegen das TVV-Motiv von mCAR2 (Accession-Nr. NM\_009988) gerichtet ist (Abb. 1.3). Beide Antikörper zeigen dabei Kreuzreaktionen mit den humanen CAR-Homologen, da die Peptidsequenz, gegen die der Antikörper gerichtet ist, zwischen beiden Spezies zu 100 % homolog ist (Shaw et al., 2004; Fechner et al., 1999).

Um die Spezifität der beiden Antikörper zu überprüfen, wurden dafür HEK 293T-Zellen in einem Vorexperiment mit den jeweiligen mCAR1 und mCAR2-Expressionsplasmiden (pZS2-mCAR1, pZS2-mCAR2) transduziert und mittels Immunfluoreszenz beide Isoformen nachgewiesen. Die spezifische Expression der beiden

CAR-Isoformen in den pZS2-mCAR1 und pZS2-mCAR2 transduzierten Zellen war deutlich nachweisbar, wenn sie mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern angefärbt wurden (Abb. 4.1.1\_A). Des Weiteren konnte in beiden humanen Zellkulturen, HEK 293T (Abb. 4.1.1\_A) und HeLa-Zellen (Abb. 4.1.1\_B), sowohl hCAR1 als auch hCAR2 detektiert werden. Dabei sind beide Isoformen an der Zellmembran an den Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass beide Antikörper, wie erwartet, sowohl die CAR-Isoformen der Maus erkannten, als auch die humanen.



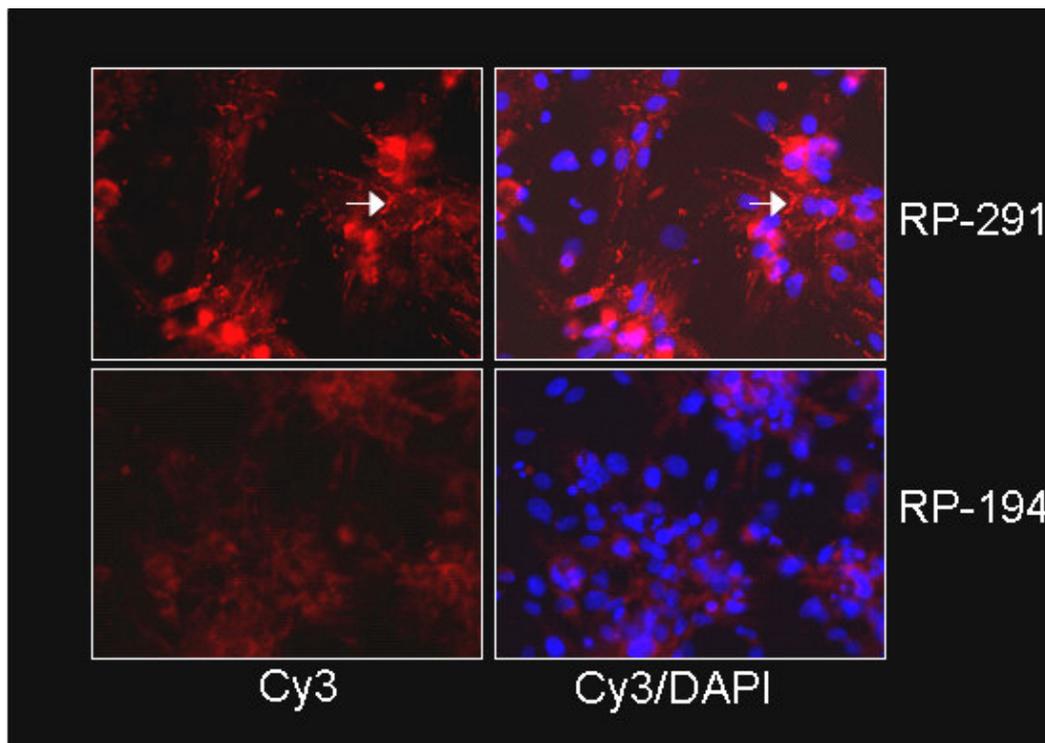
**Abb. 4.1.1:** Nachweis von CAR1 und CAR2 mittels Immunfluoreszenz. **(A)** 293T-Zellen wurden mit mCAR1- und mCAR2-Expressionsplasmiden transfiziert und 24 h später mittels spezifischer Antikörper mCAR1 (RP-291) bzw. mCAR2 (RP-194) nachgewiesen. Weiterhin wurden untransfizierte HEK 293T-Zellen auf die Expression von beiden CAR-Isoformen hin überprüft. **(B)** HeLa-Zellen wurden auf die Expression von hCAR1 und hCAR2 mittels spezifisch bindender Antikörper (siehe oben) untersucht. Färbung des Zellkerns mit DAPI.



**Abb. 4.1.2:** CAR-Immunfluoreszenz in der kardialen Mauszelllinie HL-1. **(A)** Nachweis von mCAR-Isoformen. HL-1 Zellen wurden ausgesät und mittels spezifischer Antikörper mCAR1 (RP-291) und mCAR2 (RP-194) nachgewiesen. **(B)** Nachweis von mCAR1 in HL-1-Zellen mittels Immunfluoreszenz mit dem Antikörper H-300 (rabbit-anti-mouse CAR) und Aktin mittels Phalloidin 488. Anfärbung des Zellkerns mit DAPI.

Untersuchungen in der kardialen Mauszelllinie HL-1 zeigten eine Expression von mCAR1 aber nicht von mCAR2 in diesen Zellen (Abb. 4.1.2\_A). Dabei ist auch eine zelluläre Funktion des CAR gut zu erkennen, die unter anderem darin besteht, den Kontakt zwischen Zellen zu vermitteln. CAR wird durch Bildung von Homodimeren an der Membran an den Zell-Zell-Kontaktstellen stabilisiert. Besteht zwischen zwei Zellen kein direkter Kontakt, konnte an der Zellmembran kein CAR mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 4.1.2\_A - weißer Pfeil). Durch die

Immunfluoreszenz konnte ebenfalls sehr gut beobachtet werden, wie der Kontakt zwischen zwei Zellen durch CAR vermittelt wird. Zellen erkunden ihre Umgebung durch Filopodien und treten über diese in Kontakt miteinander (Mattila and Lappalainen, 2008). In der Abbildung 4.1.2\_B ist gut zu erkennen, wie die linke Zelle an mehreren Stellen mit der rechten Zelle durch Filopodien (Aktinfasern grün markiert, weißer Pfeil) Kontakt aufnimmt und es kommt an der Kontaktstelle zu CAR-CAR-Interaktion und homophiler Bindung, was zur Stabilisierung von CAR an der Zellmembran führt (rot angefärbt, gelber Pfeil).



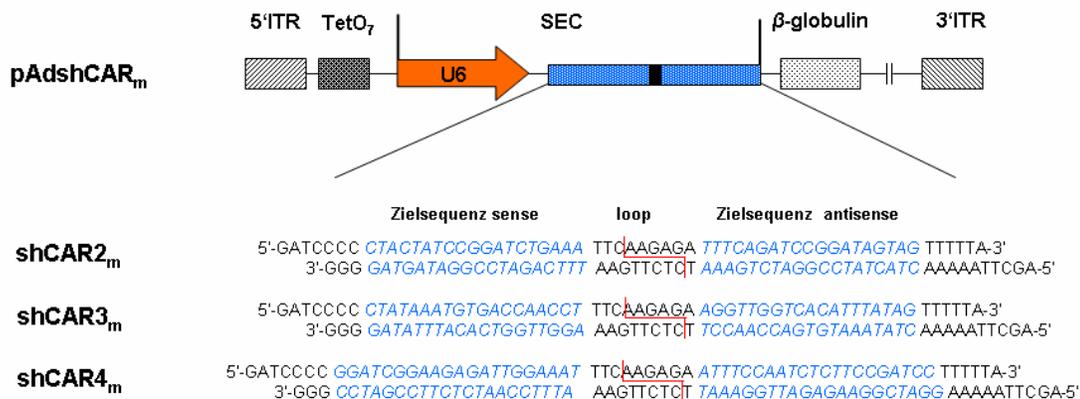
**Abb. 4.1.3:** CAR-Immunfluoreszenz in neonatalen Rattenkardiomyocyten (NRCM). Nachweis von rCAR-Isoformen in NRCM 4 Tage nach Präparation mittels spezifischer Antikörper CAR1 (RP-291) und CAR2 (RP-194). Anfärbung des Zellkerns mit DAPI.

Die letzten 5 (CAR2) bzw. 6 AS (CAR1) am C-terminalen Ende des Ratten-CAR (rCAR) (Accession-Nr. AF\_109644) stimmen mit der entsprechenden Peptidsequenz von mCAR und hCAR überein, gegen die die beiden Antikörper RP-291 und RP-194 gerichtet sind. So bestand die Möglichkeit, dass beide Antikörper auch rCAR erkennen können. NRCM wurden deshalb auf die Expression von rCAR1 und rCAR2 hin untersucht. Dabei konnte, wie auch bei HL-1 Zellen, nur die Expression von rCAR1 nachgewiesen werden (Abb. 4.1.3). Die Lokalisation von rCAR in den NRCM ist auch in diesem Fall an den Zell-Zell-Kontakten in der Membran zu erkennen

(Pfeil). Zusammenfassend konnte in allen untersuchten Zelllinien CAR nachgewiesen werden, welcher ausschließlich an den Zell-Zell-Kontaktstellen in der Zellmembran lokalisiert war. Unterschiede traten jedoch bei der Verteilung der beiden CAR-Isoformen auf. Während bei den humanen Zelllinien HEK 293T und HeLa, CAR1 und CAR2 nachgewiesen wurden, konnte in den kardialen Zellen, HL-1 und NRCM, nur CAR1 detektiert werden.

#### 4.1.2 Evaluierung effizienter short hairpin (sh)RNAs gegen mCAR

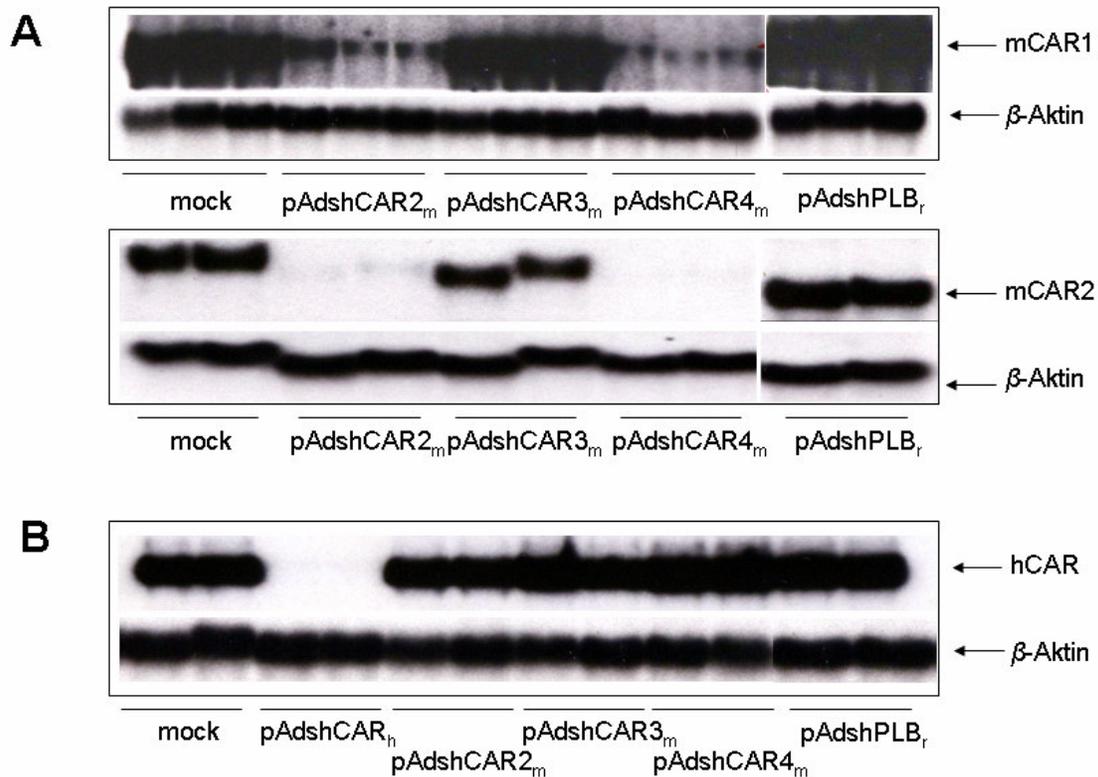
Um die effizienteste shRNA gegen mCAR zu ermitteln, wurden drei verschiedene adenovirale Shuttleplasmide mit shRNA-Expressionskassetten gegen den extrazellulären Teil des mCAR1 und mCAR2 (pAdshCAR2<sub>m</sub>, pAdshCAR3<sub>m</sub> und pAdshCAR4<sub>m</sub>) generiert, wobei die jeweiligen shRNA-Kassetten unter Kontrolle eines murinen U6-Promotors standen (Abb. 4.1.4).



**Abb. 4.1.4:** Schematische Darstellung des adenoviralen Vektorkonstruktes zur Expression von mCAR-shRNAs. Abkürzungen: 5'ITR, *inverted terminal repeat* von Adenovirus 5 und 5' adenovirale Sequenz (1-342 bp); TetO<sub>7</sub>, siebenfache Wiederholung der 42 bp *tet* Operatorsequenz; U6, RNA-Polymerase-III-Promotor U6; SEC, *short hairpin* (sh)RNA Expressionskassette; 3'ITR, *inverted terminal repeat* von Adenovirus 5. Die SEC beinhaltet die sense und antisense Sequenz der mCAR-Zielsequenz downstream vom U6-Promotor, getrennt durch eine 9 bp loop-Sequenz und ein Terminationssignal bestehend aus fünf Thyminen.

Die *Silencing*-Effizienz der shRNAs wurde durch Co-Transfektionsexperimente in 293T-Zellen ermittelt. Dabei wurden 293T-Zellen mit mCAR-Expressionsplasmiden (pZS2-mCAR1, pZS2-mCAR2) und den jeweiligen shRNA-exprimierenden Plasmiden co-transfiziert und 48 h später die Menge der mCAR-mRNA mittels

Northern-Blot analysiert. Als Kontrolle diente ein Plasmid, das eine nicht relevante shRNA exprimiert (pAdshPLB<sub>r</sub>), die keine Sequenzhomologie mit Maus-mRNAs aufweist.



**Abb. 4.1.5:** Effizienz und Spezifität der mCAR-shRNAs. **(A)** 293T-Zellen wurden mit mCAR1- und mCAR2-Expressionsplasmiden (mock) und den shCAR-Expressionsplasmiden co-transfiziert und RNA nach 48 h mittels Northern-Blot mit einer einzelsträngigen CAR-Antisense Hybridisierungssonde analysiert. Es wurden jeweils dreifach bzw. zweifach Bestimmungen durchgeführt. **(B)** 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für hCAR und für mCAR-shRNAs und hCAR-shRNA (pAdshCAR<sub>n</sub>) cotransfiziert und nach 48 h mittels Northern-Blot die hCAR-mRNA Expression bestimmt. In allen Northern-Blots diente β-Aktin mRNA als Ladekontrolle.

Wie die Northern-Blot Untersuchung zeigt, waren zwei shRNAs, shCAR2<sub>m</sub> (pAdshCAR2<sub>m</sub>) und shCAR4<sub>m</sub> (pAdshCAR4<sub>m</sub>) hocheffizient und regulierten die Menge der mCAR1- und mCAR2-mRNA über 90 % herunter – shCAR2<sub>m</sub> (93 %), shCAR4<sub>m</sub> (97 %) (Abb. 4.1.5\_A). Die shCAR3<sub>m</sub> zeigte dagegen keinerlei Wirksamkeit und auch die Kontroll-shRNA (pAdshPLB<sub>r</sub>) hatte keinen Effekt auf die mRNA-Menge von mCAR1 und mCAR2.

Anschließend wurde die Spezies-Spezifität der shRNAs getestet, indem untersucht wurde, inwiefern die mRNA von humanem CAR (hCAR) durch die Expression der

gegen mCAR gerichteten shRNAs beeinträchtigt wird. Northern-Blot Analysen nach Co-Transfektion mit einem hCAR-Expressionsplasmid zeigt keine Beeinflussung der hCAR-mRNA durch die mCAR-shRNAs (Abb. 4.1.5\_B). Eine shRNA, spezifisch gegen die Sequenz des hCAR, regulierte dabei jedoch hocheffizient die hCAR-mRNA herunter. Auch hier diente pAdshPLB<sub>r</sub> als Negativkontrolle und hatte keinen Effekt auf die Menge der hCAR-mRNA. Die Tatsache, dass shCAR4<sub>m</sub> drei und shCAR2<sub>m</sub> nur einen *missmatch* in der Zielsequenz zur Sequenz von hCAR aufwies zeigt, dass die hier ausgesuchten shRNAs eine hohe Speziespezifität bezüglich ihrer Zielsequenz besitzen. Als Ladekontrolle wurde bei allen Untersuchungen  $\beta$ -Aktin mitgeführt, dessen Expression durch die shRNAs nicht beeinträchtigt wurde.

#### **4.1.3 Inhibierung der CVB3-Replikation in der kardialen Mauszelllinie HL-1 durch Herunterregulation von mCAR mittels Vektor-vermittelter RNAi**

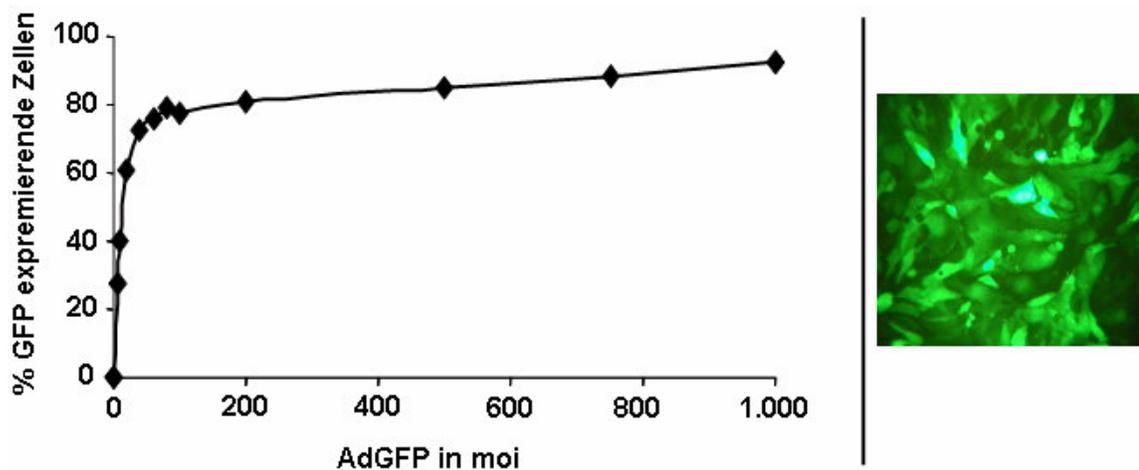
Sowohl Adenoviren als auch Coxsackie-B-Viren benutzen CAR als zellulären Rezeptor. Dabei vermittelt er bei Adenoviren die Anheftung an die Zelle und bei Coxsackieviren die Virusaufnahme. Durch die Inhibierung der CAR-Expression mittels RNAi sollte die Infektion der Zielzellen und dadurch die virale Replikation inhibiert werden.

##### *4.1.3.1 Herunterregulation der mCAR-mRNA in der kardialen Mauszelllinie HL-1 durch vektorexprimierte shRNA*

Kardiale Zellen, wie HL-1 Zellen und NRCM, lassen sich schwer und nur mit geringer Effizienz transfizieren, was eine Behandlung mit siRNAs oder Plasmid generierter shRNAs nicht praktikabel macht (Yuan et al., 2004). Deshalb sollten die evaluierten CAR-shRNAs (shCAR2<sub>m</sub>, shCAR4<sub>m</sub>) von adenoviralen Vektoren exprimiert werden, welche ihrerseits effizient kardiale Zellen *in vitro* transduzieren.

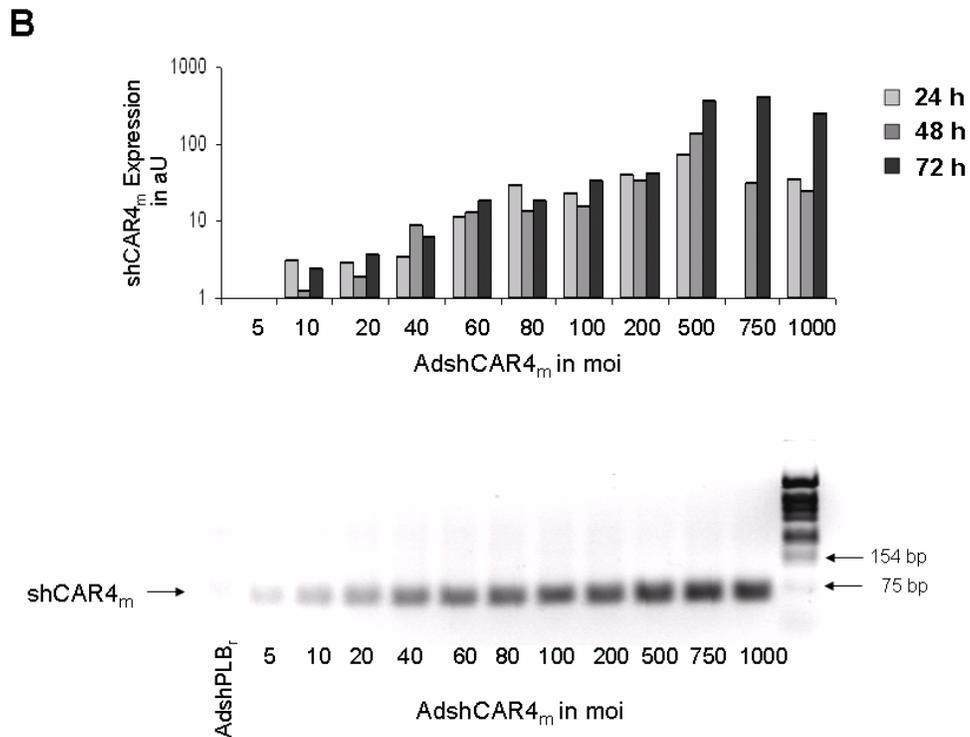
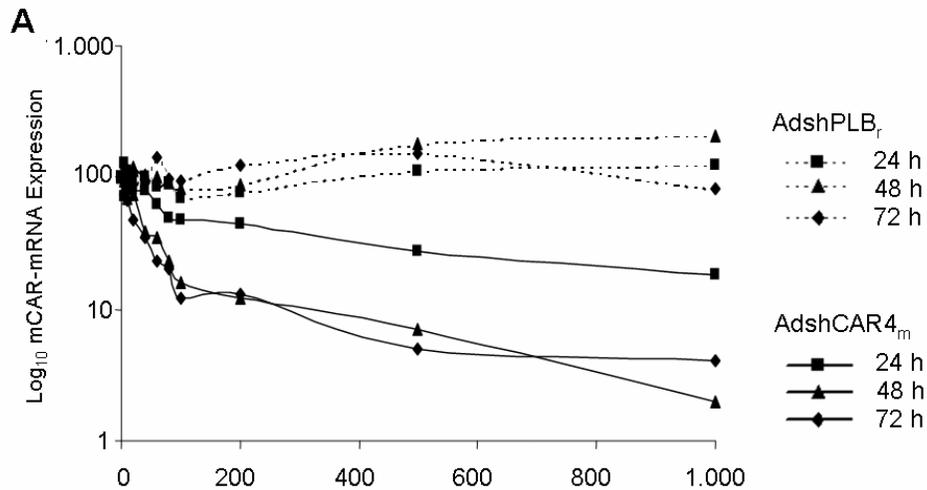
Um für die Transduktion der HL-1 Zellen die optimale Vektordosis zu ermitteln, bei der möglichst viele Zellen transduziert werden, ohne dass zytotoxische Effekte auftreten, wurden HL-1 Zellen mit unterschiedlichen Mengen (moi 5 - 1.000) eines

GFP-exprimierenden Adenovektors (AdGFP) transduziert. Nach 48 h wurde die Transduktionseffizienz, über die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Dabei wurde beobachtet, dass die Anzahl GFP-exprimierender Zellen mit zunehmender AdGFP Menge stetig ansteigt, bis sie bei moi 100 mit 80 % GFP-exprimierender Zellen eine Plateauphase erreicht (Abb. 4.1.6). Eine weitere Erhöhung der Vektordosis um das 10-fache (moi 1.000) zeigte weiterhin nur einen minimalen Zuwachs an GFP-positiven Zellen. Zytotoxische Effekte wurden ab einer moi von 500 beobachtet und nahmen mit steigender moi zu, gekennzeichnet durch eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen und vermindertem Zellwachstum.



**Abb. 4.1.6:** Transduktionseffizienz adenoviraler Vektoren in HL-1 Zellen. HL-1 Zellen wurden mit AdGFP transduziert (moi von 5 bis 1.000) und die GFP-exprimierenden Zellen mittels FACS-Analyse 48 h später quantifiziert. Foto rechts: HL-1 Zellen transduziert mit AdGFP (moi 100).

Anschließend wurde die Effizienz der adenoviral exprimierten ( $\text{AdshCAR4}_m$ )  $\text{shCAR4}_m$  bestimmt; die shRNA gegen mCAR, die in dem Co-Expressions-experimenten auf Plasmidebene die effizienteste Herunterregulation (um 97 %) zeigte (4.1.5\_A). HL-1 Zellen wurden mit ansteigenden Dosen  $\text{AdshCAR4}_m$  (moi von 5 bis 1.000) transduziert und die mCAR-mRNA jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h mittels quantitativer PCR ermittelt (Abb. 4.1.7\_A).



**Abb. 4.1.7:** Herunterregulation der mCAR-mRNA in HL-1 Zellen durch AdshCAR4<sub>m</sub>. **(A)** HL-1 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen AdshCAR4<sub>m</sub> oder AdshPLB<sub>r</sub> transduziert und die Expression von mCAR-mRNA mittels real-time RT-PCR zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. **(B)** Adenoviral vermittelte shCAR4<sub>m</sub>-Expression. HL-1 Zellen wurden transduziert mit AdshCAR4<sub>m</sub> (moi 5 - 1.000) und die Menge der exprimierten shCAR4<sub>m</sub> wurde durch real time RT-PCR (obere Grafik) und Agarosegelelektrophorese (unteres Bild) bestimmt.

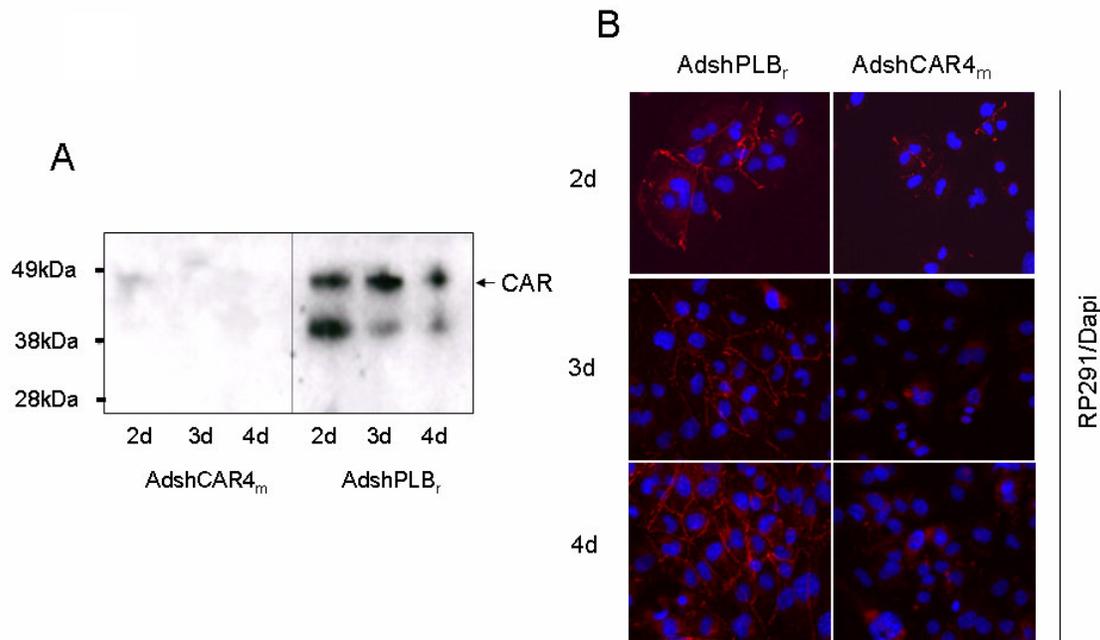
Gleichzeitig wurde erstmals die Menge der exprimierten shCAR4<sub>m</sub> ermittelt und ermöglichte so einen direkten Vergleich zwischen shRNA-Menge und Effizienz der Herunterregulation (Abb. 4.1.7\_B). Dabei waren die Menge der gebildeten shCAR4<sub>m</sub>

und die damit verbundene Herunterregulation der mCAR-mRNA, sowohl von der Zeit, als auch von der Dosis der eingesetzten shRNA-Vektoren abhängig. Mit zunehmender Vektordosis nahm die Menge der detektierten shCAR4<sub>m</sub> zu und damit einhergehend verringerte sich die mCAR-mRNA.

Eine starke Verringerung der mCAR-mRNA wurde 48 h und 72 h nach der Transduktion mit AdshCAR4<sub>m</sub> festgestellt. Dabei betrug die Menge der mCAR-mRNA nur noch 10 % (AdshCAR4<sub>m</sub> = 100 moi) im Vergleich zur mCAR-mRNA untransduzierter HL-1 Zellen und HL-1 Zellen, die mit dem Kontrollvektor (AdshPLB<sub>r</sub>) behandelt wurden. Auch hier ist anfänglich ein schneller Abfall der mCAR-mRNA zu erkennen, während ab einer moi von 100 nur noch eine geringe Abnahme der mCAR-mRNA festgestellt werden kann. Selbst eine sehr viel höhere Dosis (moi 1.000) führte nur zu einer minimal erhöhten Inhibierung, im Vergleich zu 100 moi. Somit wurde mit Hinblick auf die Zytotoxizität höherer Dosen eine Vektordosis von moi 100 für die nachfolgenden Experimente festgelegt.

#### *4.1.3.2 Herunterregulation des mCAR-Proteins durch Vektor-exprimierte shRNA in der kardialen Mauszelllinie HL-1*

Die nachfolgenden Untersuchungen sollten zeigen, wie effizient und wie schnell das mCAR-Protein in den mit AdshCAR4<sub>m</sub> transduzierten HL-1 Zellen herunterreguliert bzw. wie effizient die Neubildung des mCAR verhindert werden kann. Dafür wurden HL-1 Zellen mit AdshCAR4<sub>m</sub> bzw. AdshPLB<sub>r</sub> als Negativkontrolle transduziert (moi 100). Um bereits in der Zellmembran befindliches mCAR-Protein zu beseitigen, wurden die Zellen 24 h nach der Transduktion mit Trypsin abgelöst und dann auf eine neue Zellkulturschale ausgesät. Nach weiteren 24 h, 48 h und 72 h wurde aus den Zellen Protein isoliert und mittels Western-Blot die Expression von mCAR bestimmt. Bereits zwei Tage nach der Transduktion mit AdshCAR4<sub>m</sub> (24 h nach Trypsinbehandlung) konnte im Western-Blot kein mCAR-Protein mehr nachgewiesen werden, ein Effekt der bis zum Tag vier anhielt (Abb. 4.1.8\_A). In HL-1 Zellen, die mit der Kontroll- shRNA (AdshPLB<sub>r</sub>) behandelt wurden, war hingegen an allen Tagen deutlich mCAR nachweisbar. Dies zeigt, dass die Neubildung des mCAR-Proteins durch die AdshCAR4<sub>m</sub> effizient verhindert werden kann und dies über einen Untersuchungszeitraum von mehreren Tagen.

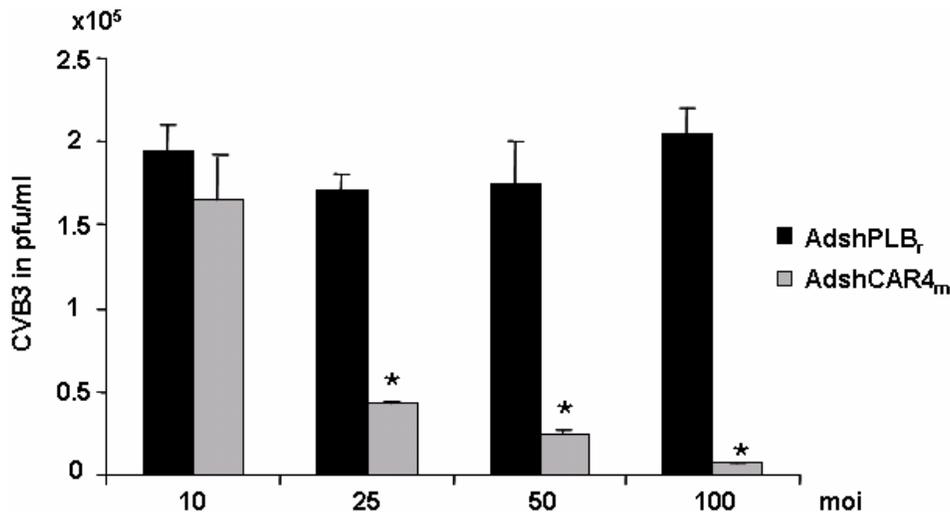


**Abb. 4.1.8:** Herunterregulation des mCAR Protein in HL-1 Zellen durch AdshCAR4<sub>m</sub>. HL-1 wurden mit AdshCAR4<sub>m</sub> und AdshPLB<sub>r</sub> transduziert (moi 100). Nach 24 h wurden die Zellen trypsinisiert, neu ausgesät und 2, 3 und 4 Tag p.t. die Expression von mCAR analysiert. **(A)** Western-Blot Analyse: polyklonaler rabbit-anti-CAR Antikörper H-300 gegen die extrazelluläre Domäne von mCAR. Sekundärer Antikörper swine-anti-rabbit HRP **(B)** Immunfluoreszenz: polyklonaler rabbit-anti-CAR1 Antikörper RP-291 gegen die intrazelluläre SIV-Domäne von mCAR. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Auch der Nachweis mittels Immunfluoreszenz zeigt, dass die Expression des mCAR durch die vektorexprimierte shRNA nahezu vollständig inhibiert werden konnte (Abb. 4.1.8\_B). Zwar waren 24 h nach der Trypsinierung im Gegensatz zum Western-Blot noch geringe Mengen mCAR detektierbar, was jedoch daran liegen könnte, dass der AK, der für die Immunfluoreszenz benutzt wurde, an den C-terminalen also intrazellulären Teil bindet, welcher durch die Trypsinbehandlung nicht abgespalten wurde. Bereits am Tag 2 nach der Trypsinbehandlung war jedoch kein mCAR mehr auf der Zellmembran detektierbar. Im Gegensatz dazu konnte per Immunfluoreszenz in den HL-1 Zellen, die mit der Kontroll-shRNA transduziert wurden, permanent mCAR in der Zellmembran nachgewiesen werden.

#### 4.1.3.3 Inhibierung der CVB3-Replikation in HL-1 Zellen durch mCAR-shRNA

In den anschließenden Untersuchungen wurde die Effizienz der Virusinhibierung durch die Inhibierung der CAR-Expression in kardialen Zellen bewertet. Als erstes wurde untersucht, wie sich eine protektive Behandlung der Zellen mit shRNA gegen mCAR auf die CVB3-Infektion auswirkt. Um dabei zu untersuchen, wie der antivirale Effekt von der Dosis des shCAR<sub>4m</sub> exprimierende Vektor abhängig ist, wurden HL-1 Zellen mit unterschiedlichen Dosen von AdshCAR<sub>4m</sub> bzw. AdshPLB<sub>r</sub> transduziert (moi von 10 bis 100), die Zellen 24 h später mit Trypsin behandelt und weitere 24 h später mit CVB3 (moi 1) infiziert. Da CVB3-infizierte HL-1 Zellen im Gegensatz zu anderen permissiven Zellen, wie HeLa oder Vero, nicht schon nach kurzer Zeit lysierten, wurden die CVB3-infizierten Zellen sechs Tage weiter kultiviert und danach mittels Plaque-Assay die Virusreplikation quantifiziert. Es zeigte sich, dass in Abhängigkeit von der Dosis des shCAR<sub>4m</sub> exprimierenden Adenovektors (AdshCAR<sub>4m</sub>) die Anzahl neugebildeter CVB3-Viren deutlich abnahm (Abb. 4.1.9).

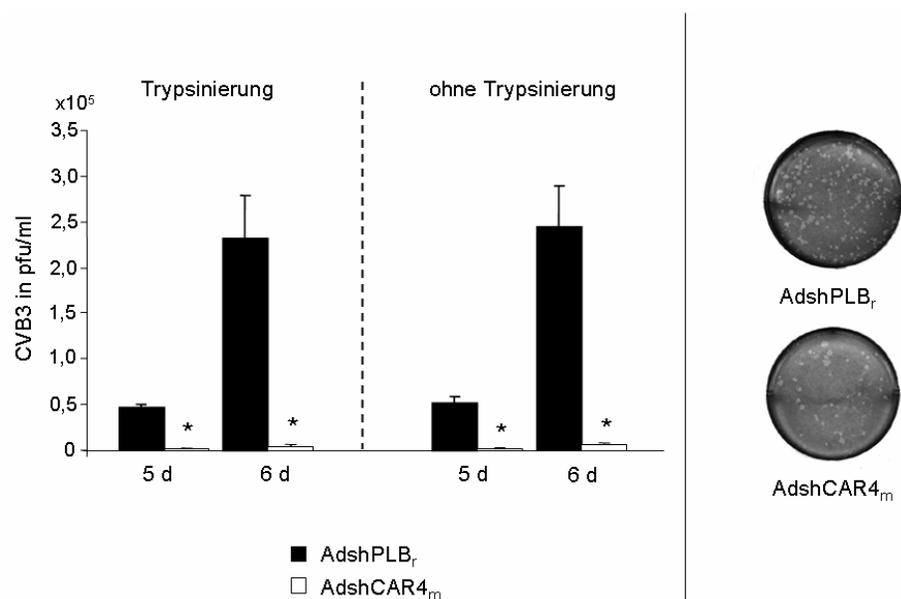


**Abb. 4.1.9:** Inhibierung der CVB3-Infektion in HL-1 Zellen durch mCAR-Herunterregulation in Abhängigkeit von der Vektordosis. HL-1 Zellen wurden mit AdshCAR<sub>4m</sub> und AdshPLB<sub>r</sub> in unterschiedlichen Dosen transduziert, 24 h danach trypsiniert und neu ausgesät. Weitere 24 h später wurden die Zellen mit CVB3 infiziert (moi 1) und nach 6 Tagen die CVB3-Menge mittels Plaque-Assay bestimmt (\* = p<0,05).

Bereits mit einer moi von 25 und 50 konnte eine starke Reduktion der Virusreplikation zwischen 75 % und 85 % erzielt werden, wohingegen mit einer moi von 10 keine signifikante CVB3-Inhibierung auftrat. Diese Daten korrelieren mit den mRNA Daten

von 4.1.7\_A, wo bei einer AdshCAR4<sub>m</sub>-Dosis von moi 10 die mCAR-mRNA nur um ca. 30 % reduziert wurde, was nachfolgend auf eine ineffiziente Reduktion des Proteins schließen lässt. Die geringe Reduktion der mCAR-mRNA lässt sich dabei vor allem auf eine niedrige Transduktionseffizienz zurückführen, die bei dieser Dosis nur ca. 40 % beträgt (siehe Abb. 4.1.6). Die effizienteste Reduktion der neu gebildeten Viren wurde bei einer moi von 100 erzielt und betrug 97 % in Vergleich zu AdshPLB<sub>r</sub> behandelten Zellen.

Proteine besitzen unterschiedliche Halbwertszeiten in der Zelle. Eine hohe Stabilität kann somit zur Verzögerung des RNAi-Effektes auf Proteinebene führen, da das bereits existierende Protein langsamer abgebaut wird. Um nachfolgend zu testen, ob bereits existierender membranständiger CAR die Virusinhibierung durch shCAR4<sub>m</sub> beeinflusst, wurden HL-1 Zellen mit AdshCAR4<sub>m</sub> bzw. AdshPLB<sub>r</sub> transduziert (moi 100) und 24 h nach Transduktion ein Trypsinierungsschritt eingeführt, der den membranständigen CAR proteolytisch abbauen sollte. Weitere 24 h später wurden die Zellen mit CVB3 infiziert (moi 1) und nach 5 bzw. 6 Tagen die virale Replikation quantifiziert. Es zeigte sich, dass unabhängig davon, ob die Zellen mit Trypsin behandelt wurden oder nicht, die Bildung neuer Viren stark reduziert werden konnte (97 %) (Abb. 4.1.10).



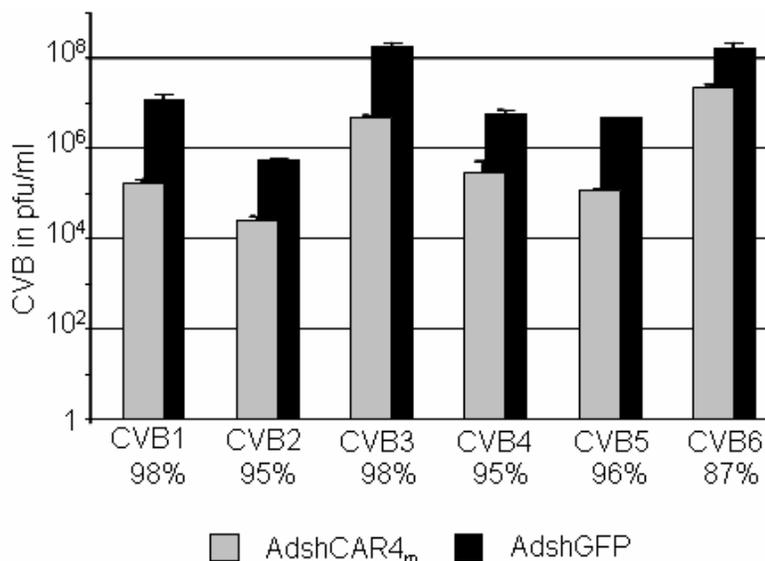
**Abb. 4.1.10:** Einfluss der Trypsinbehandlung auf die Inhibierung der CVB3-Infektion in HL-1 Zellen durch mCAR-Herunterregulation. HL-1 Zellen wurden mit AdshCAR4<sub>m</sub> und AdshPLB<sub>r</sub> transduziert. 24 Stunden später wurde entweder eine Trypsinierungsschritt eingefügt (siehe oben) oder dieser ausgelassen. Weitere 24 h später wurden die Zellen mit CVB3 infiziert (moi 1) und nach 5 und 6 Tagen die CVB3-Menge mittels Plaque-Assay bestimmt (\*= p < 0,05). Rechts: Beispiel für ein Plaque-Assay auf HeLa-Zellen mit HL-1 Lysat; Verdünnung von 1:500.

Obwohl am Tag 6 eine erhöhte Virusreplikation nachgewiesen werden konnte, hatte dies jedoch keinen Einfluss auf den antiviralen Effekt von shCAR4<sub>m</sub>.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass AdshCAR4<sub>m</sub> die Replikation von CVB3 in HL-1 Zellen effizient inhibieren kann. Die Proteolyse von bereits vorhandenem membranständigem mCAR hatte dahingegen keinen Einfluss auf die Effizienz der inhibitorischen Wirksamkeit der mCAR-shRNA. Weiterhin deuten diese Daten darauf hin, dass mCAR eine geringere Halbwertszeit an der Zelloberfläche hat als anfangs angenommen und eine schnelle Rezyklierung des Proteins stattfindet.

#### 4.1.3.4 Inhibierung anderer Coxsackievirus-Serotypen in HL-1 durch CAR-shRNA

Nicht nur CVB3 sondern alle Coxsackievirus-B-Serotypen benutzen CAR als Internalisierungsrezeptor. Um zu untersuchen, inwieweit sich auch die anderen Coxsackieviren durch shCAR4<sub>m</sub> inhibieren lassen, wurden HL-1 Zellen mit AdshCAR4<sub>m</sub> und dem Kontrollvektor (AdshGFP) transduziert (moi 100) und nach 48 h mit den verschiedenen CVB-Serotypen (moi 0,5) infiziert. Als Kontrollvirus diente Coxsackievirus A 21, der CAR-unabhängig die Zelle infiziert.



**Abb. 4.1.11:** Inhibierung der Infektion unterschiedlicher CVB-Serotypen in HL-1 Zellen durch mCAR-Herunterregulation. HL-1 Zellen wurden mit AdshCAR4<sub>m</sub> und AdshPLB<sub>r</sub> transduziert. 24 h später wurden die Zellen mit CVB1 - CVB6 infiziert (moi 0,5) und 5 und 6 Tage später die CVB-Menge mittels Plaque-Assay bestimmt. Das Experiment wurde zweimal mit jeweils Doppelansätzen wiederholt ( $p < 0,05$ ).

Bei allen Coxsackievirus-Serotypen der Gruppe B konnte durch die Herunterregulation des mCAR eine Inhibierung der Replikation in HL-1 Zellen festgestellt werden (Abb. 4.1.11). Dabei war die Effizienz ähnlich hoch und betrug außer bei CVB6 (87 %) über 95 %. Dies zeigt, dass durch die Verminderung des CAR-Rezeptors auf der Zelloberfläche die Virusaufnahme und damit verbunden die virale Replikation in der Zelle inhibiert wird. Dies ist unabhängig davon, um was für einen Serotyp der Coxsackievirus-B-Gruppe es sich handelt. Als Kontrolle wurde ein Coxsackievirus der Gruppe A (CoxA21) benutzt, das als zellulären Rezeptor ICAM-1 benutzt, um die Zelle zu infizieren (Shafren et al., 1997). Durch Inhibierung der mCAR-Expression durch shCAR4<sub>m</sub> war bei der Infektion mit CoxA21 keine Reduktion der Virusreplikation zu erkennen. Dies zeigt auch, dass die Inhibierung der CVB-Serotypen kein unspezifischer Effekt der shRNA oder des Adenovektors ist, sondern direkt aus der Downregulation des zellulären Rezeptors mCAR resultiert.

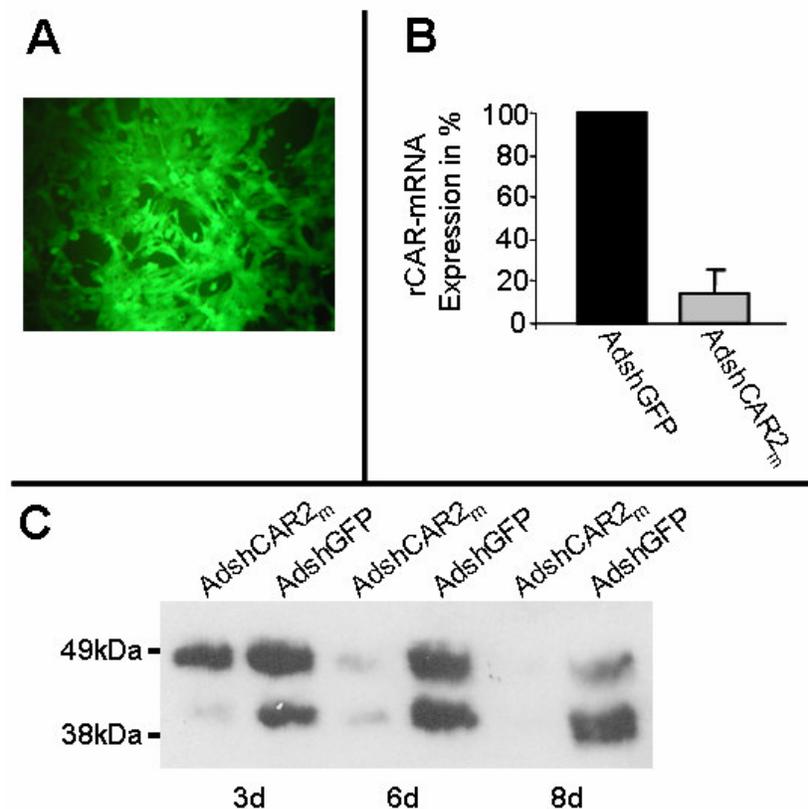
#### **4.1.4 Inhibierung der CVB3-Replikation in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) durch Herunterregulation des rCAR mittels Vektor-vermittelte RNAi**

##### *4.1.4.1 Herunterregulation des rCAR durch Vektor-exprimierte shRNA in NRCM*

Neben der permanenten Zelllinie kardialen Ursprungs (HL-1) wurde der RNAi-Effekt durch shCAR auch bei primären kardialen Zellen (NRCM) untersucht. Die Zielsequenz der ebenfalls hocheffizienten shCAR2 ist identisch mit der CAR-Sequenz der Ratte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass mit dieser shRNA ebenfalls in Ratten-Zellen die CAR-Expression inhibiert werden kann.

In einem Vorexperiment zeigten adenovirale Vektoren eine gleich hohe Effizienz bei der Transduktion von NRCM wie bei den HL-1 Zellen. Bei einer AdGFP-Vektordosis von 100 moi konnte in nahezu allen Zellen die Expression von GFP detektiert werden, ohne dass auffällige Beeinträchtigungen der Zellkultur beobachtet wurden (Abb. 4.1.12\_A). Wie auch HL-1 Zellen wurden NRCM mit dieser Dosis (moi 100) AdshCAR2<sub>m</sub> bzw. AdshGFP transduziert und nach 48 h die Menge der rCAR-mRNA mittels Taq-Man bestimmt. Es zeigte sich, dass die rCAR-mRNA in den NRCM mit

annähernd gleich hoher Effizienz (85 %) durch AdshCAR2<sub>m</sub> herunter reguliert wird, wie in HL-1 Zellen.



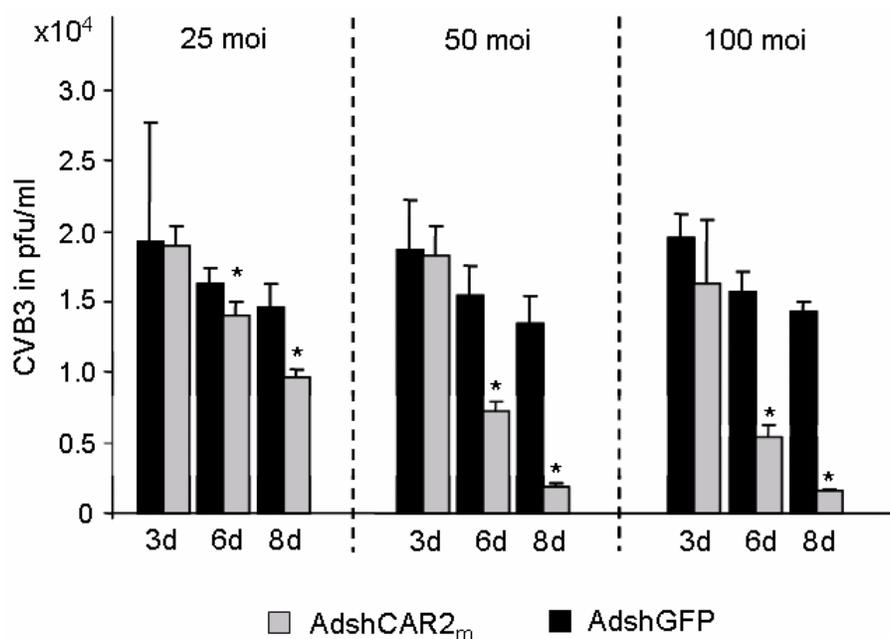
**Abb. 4.1.12:** Herunterregulation von rCAR in NRCM durch AdshCAR2<sub>m</sub>. **(A)** Transduktionseffizienz von AdV in NRCM. GFP-Fluoreszenz 48 h nach Transduktion mit AdGFP (moi 100). **(B)** Herunterregulation der rCAR-mRNA. NRCM wurden mit AdshCAR2<sub>m</sub> und AdshGFP (moi 100) transduziert und die rCAR-mRNA 48 h später mittels real time RT-PCR bestimmt. **(C)** Herunterregulation des rCAR-Protein. NRCM wurden wie unter (B) transduziert und die rCAR Expression 3, 6 und 8 Tage nach Transduktion mittels Western-Blot-Analyse untersucht (polyklonaler rabbit-anti-CAR Antikörper H-300 gegen die extrazelluläre Domäne von CAR, sekundärer Antikörper swine-anti-rabbit-HRP).

Weiterhin wurde die Inhibierung der rCAR-Expression auf Protein-Ebene untersucht. Wie bereits beschrieben, wurden die NRCM transduziert und nach 3, 6 und 8 Tagen rCAR mittels Western-Blot quantifiziert. Drei Tage nach der Transduktion war noch kein signifikanter Unterschied in der Expression des rCAR detektierbar (Abb. 4.1.12\_C), obwohl die Menge der mRNA bereits stark reduziert war (Abb. 4.1.12\_B). Erst 6 Tage nach der Transduktion war das Proteinlevel von rCAR in NRCM, die mit AdshCAR2<sub>m</sub> transduziert wurden, erheblich niedriger als in den Kontrollzellen und am Tag 8 war in den shCAR2<sub>m</sub> exprimierenden NRCM kein rCAR mehr detektierbar.

Dies deutet im Gegensatz zu den HL-1 Zellen auf eine höhere Stabilität des rCAR-Proteins in den NRCM hin.

#### 4.1.4.2 Inhibierung der CVB3-Replikation in NRCM durch rCAR-shRNA

Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die Herunterregulation von rCAR auf die CVB3-Replikation in den NRCM hat. Die Zellen wurden mit AdshCAR2<sub>m</sub> und dem Kontrollvektor AdshGFP in unterschiedlichen Konzentrationen (moi 25, 50 und 100) transduziert und nach 3, 6 und 8 Tagen mit CVB3 infiziert. 72 h nach der Infektion wurde die virale Replikation mittels Plaque-Assay quantifiziert.



**Abb. 4.1.13:** Inhibierung der CVB3-Infektion in NRCM durch rCAR-Herunterregulation in Abhängigkeit der Vektordosis und Inkubationszeit. NRCM wurden mit AdshCAR2<sub>m</sub> oder dem Kontrollvektor AdshGFP mit unterschiedlicher Vektordosis transduziert und nach 3, 6 bzw. 8 Tagen mit CVB3 infiziert (moi 1). Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen lysiert und die CVB3-Menge mittels Plaque-Assay bestimmt (\*= $p < 0,05$ ).

Wurden die NRCM 3 Tage nach der AdshCAR2<sub>m</sub> Transduktion mit CVB3 infiziert, konnte keine Reduktion der CVB3-Replikation nachgewiesen werden (Abb. 4.1.13). Bei einer AdshCAR2<sub>m</sub> Dosis von moi 100 wurde dabei ein geringer, jedoch nicht signifikanter Effekt beobachtet. Dies korreliert mit den Daten des Western-Blots, bei denen ebenfalls nach 3 Tagen noch keine Reduktion des rCAR in den NRCM

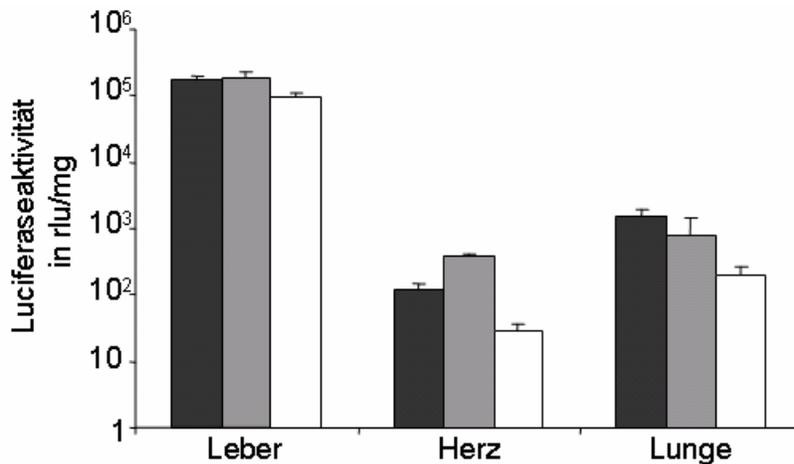
beobachtet werden konnte. Wurden die NRCM 6 und 8 Tage nach ihrer Behandlung mit shCAR2<sub>m</sub> mit CVB3 infiziert, konnte man eine dosisabhängige Reduktion der Virusreplikation erkennen. Eine Inhibierung von 66 % und 90 % wurde bei einer moi von 100 nach einer Zeit von 6 bzw. 8 Tagen gemessen, wohingegen bei einer moi von 25 die Reduktion nur 16 % bzw. 34 % betrug. Auch diese Daten korrelieren mit dem Western-Blot, der eine signifikante Reduktion des CAR 6 bzw. 8 Tage nach der Transduktion mit AdshCAR2<sub>m</sub> im Vergleich zur Kontrolle (AdshGFP) zeigte (Abb. 4.1.12\_C).

#### **4.1.5 Herunterregulation der mCAR-Expression *in vivo* durch RNAi**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass AdV-exprimierte shCAR *in vitro* die Expression von CAR herunterregulieren kann und dadurch die Replikation von Coxsackieviren in kardialen Zellen inhibiert wird, sollte nun die Effizienz dieses Ansatzes *in vivo* getestet werden.

##### *4.1.5.1 Transduktionseffizienz von Adenovektoren in Mäusen*

Adenovektoren eignen sich gut für die Applikation *in vivo*, da sie eine hohe Transduktionseffizienz aufweisen. In einem initialen Experiment wurde getestet, wie hoch die *in vivo*-Transduktionseffizienz von Adenovektoren ist. C57BL/6-Mäusen wurde jeweils  $1 \times 10^{11}$  pt des Luziferase exprimierenden Vektors AdCMVluc via Schwanzveneninjektion verabreicht und die Luciferaseexpression in Leber, Herz und Lunge 5 Tage später gemessen.



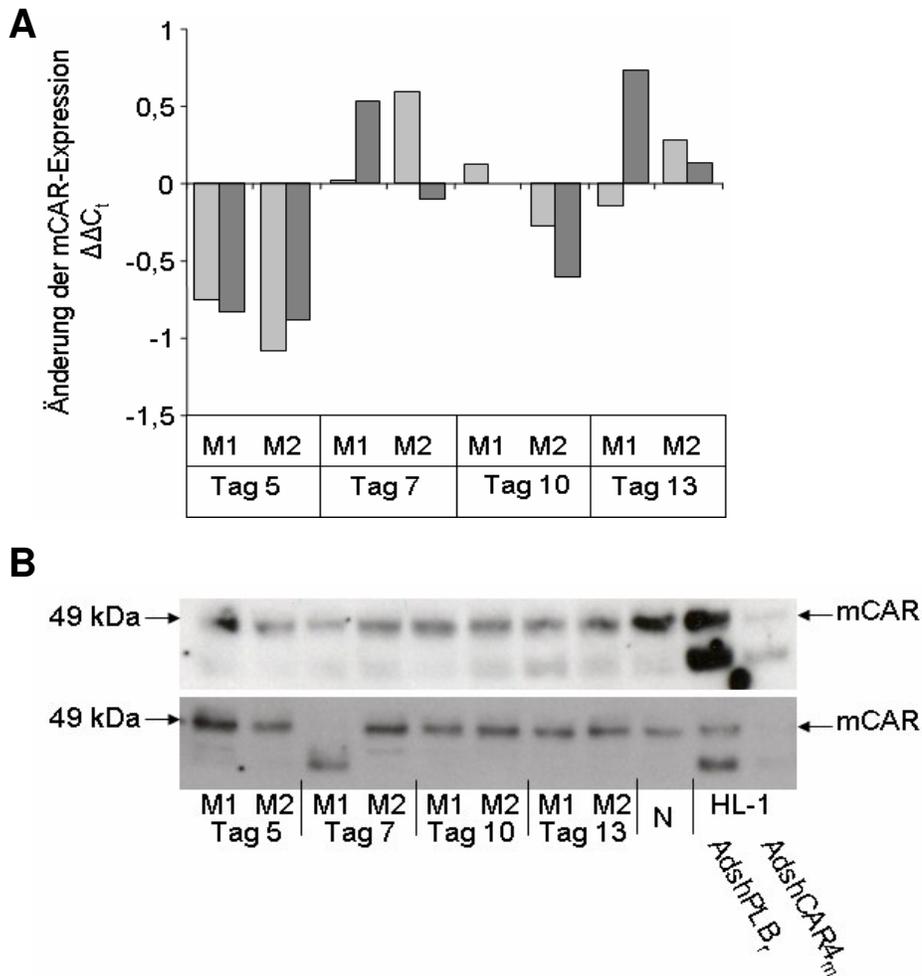
**Abb. 4.1.14:** Transduktionseffizienz von adenoviralen Vektoren *in vivo*. C57BL/6-Mäuse wurden über Schwanzvenenapplikation AdCMVluc ( $1 \times 10^{11}$  pt/Maus) verabreicht und die Luciferaseexpression in Herz, Leber und Lunge wurde nach 5 Tagen, mittels Luciferase-Assay gemessen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Leber das Hauptzielorgan der AdV darstellt, wenn diese i.v. mittels Schwanzinjektion appliziert wurden (Abb. 4.1.14). Zwar konnte auch in Herz und Lunge eine Luciferaseexpression nachgewiesen werden, diese betrug jedoch weniger als 1 % der Expression in der Leber.

#### 4.1.5.2 Herunterregulation der mCAR-Expression durch AdshCAR<sub>4m</sub> *in vivo*

Im nachfolgenden Experiment sollte getestet werden, ob es prinzipiell möglich ist, durch Vektor-exprimierte mCAR-shRNAs die Expression von mCAR *in vivo* zu inhibieren. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf die Leber gerichtet, das Hauptzielorgan für Adenovektoren. Mäuse wurden mit AdshCAR<sub>4m</sub> und dem Kontrollvektor (AdshPLB<sub>r</sub>) wie oben beschrieben transduziert und am Tag 5, 7, 10 und 13 die mCAR-Expression untersucht.

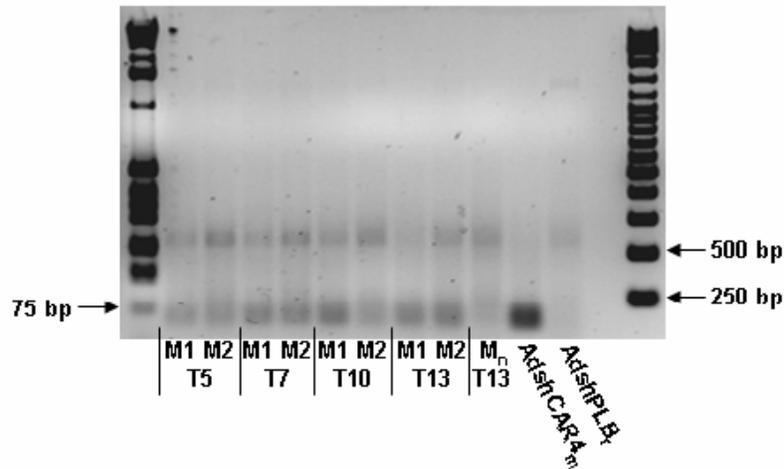
Dazu wurde in jeweils zwei Leberstücken pro Maus die mCAR-mRNA mittels Taqman-PCR und CAR-Protein mittels Western-Blot quantifiziert und mit Daten von AdshPLB<sub>r</sub>-transduzierten Mäusen verglichen.



**Abb. 4.1.15:** Herunterregulation von mCAR *in vivo* durch AdshCAR4<sub>m</sub>. C57BL/6-Mäusen wurde  $1 \times 10^{11}$  pt/Maus AdshCAR4<sub>m</sub> bzw. Kontrollvektor (AdshPLB<sub>r</sub>) via Schwanzveneninjektion appliziert und nach 5, 7, 10 und 13 Tagen die mCAR-Expression in der Leber überprüft. **(A)** Änderung im mCAR-mRNA Expressionslevel in AdshCAR4<sub>m</sub> transduzierten Mäusen im Verhältnis zu Kontrollmäusen (AdshPLB<sub>r</sub>). Pro Maus (M) wurden zwei Stück Leber untersucht (hellgrauer und dunkelgrauer Balken). **(B)** Änderung im mCAR-Proteinlevel. Gesamtprotein wurde aus jeweils zwei Leberstücken (oberer und unterer Blot) pro Maus (M) isoliert und mittels Western-Blot und dem rabbit-anti-CAR Antikörper (H-300) die Expression von mCAR bestimmt. Als Negativkontrolle (N) diente eine Maus mit AdshPLB<sub>r</sub> transduziert. Als Vergleich dienten HL-1 Zellen mit AdshCAR4<sub>m</sub> bzw. AdshPLB<sub>r</sub> (moi 100) transduziert.

Sowohl das mRNA-Level (Abb. 4.1.15\_A) als auch der Proteingehalt (Abb. 4.1.15\_B) zeigten keine signifikante Herunterregulation der mCAR-Expression in AdshCAR4<sub>m</sub> transduzierten Mäusen. Zwar zeigte die Quantifizierung der mCAR-mRNA am Tag 5 nach der Transduktion eine ca. 40 %ige Herunterregulation, Western-Blot-Daten konnten dies aber nicht bestätigen. Auch setzte sich der Trend auf mRNA-Ebene am Tag 7 nicht weiter fort.

Um die Funktionalität des AdshCAR4<sub>m</sub>-Vektors *in vivo* zu überprüfen, wurde in den Leberproben die Expression der shCAR4<sub>m</sub> untersucht.



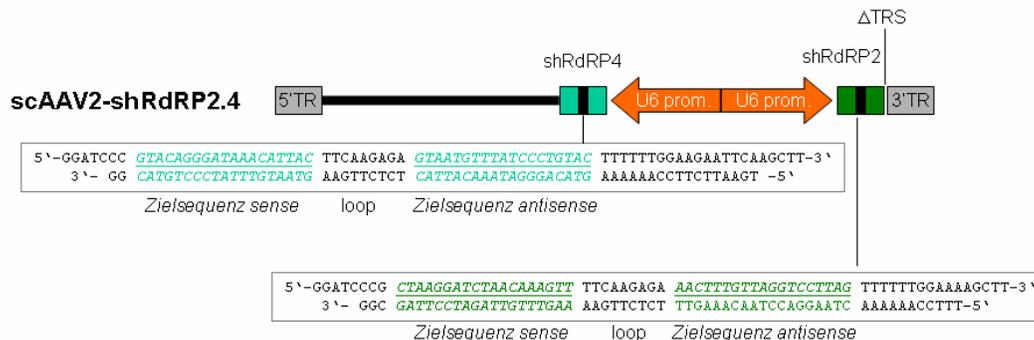
**Abb. 4.1.16:** Expression von shCAR4<sub>m</sub> im Lebergewebe von Mäusen (M) nach Transduktion mit AdshCAR4<sub>m</sub>. Gesamt-RNA wurde aus Lebergewebe der mit AdshCAR4<sub>m</sub> und AdshPLB<sub>r</sub> (M<sub>n</sub>) transduzierten Mäusen gewonnen und die shCAR4<sub>m</sub> Expression mittels RT-PCR nachgewiesen. Als Kontrolle dienten HL-1 Zellen, die ebenfalls mit beiden AdVs transduziert wurden.

In allen Leberproben, der AdshCAR4<sub>m</sub>-transduzierten Tiere konnte eine Expression der shCAR4<sub>m</sub> mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 4.1.16). Als Positivkontrolle dienten dabei HL-1 Zellen, die ebenfalls mit AdshCAR4<sub>m</sub> transduziert wurden. Als Negativkontrolle diente die Leberprobe einer Kontrollmaus und HL-1 Zellen, die mit dem Kontrollvektor (AdshPLB<sub>r</sub>) transduziert wurden.

Obwohl die Vektoren *in vivo* funktionell aktiv waren und im Zielorgan shCAR4<sub>m</sub> exprimiert wurden, war die Expression von mCAR in der Leber nicht signifikant verringert. Durch die ineffiziente Herunterregulation des mCAR durch AdshCAR4<sub>m</sub> *in vivo* wurde auf weitere Experimente, mit dem Hintergrund der *in vivo* CVB3-Inhibierung verzichtet.

## 4.2 Inhibierung der CVB3-Replikation durch Vektor-vermittelte Herunterregulation der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP)

Durch die virale RdRP wird das (+)-Strang-RNA-Genom des Virus über ein (-)-strängiges RNA-Intermediat während der Replikation vermehrt (Kapitel 1.2.1). In Vorarbeiten wurden bereits synthetische siRNAs evaluiert, die an unterschiedlichen Stellen der Sequenz für die RdRP binden (Werk et al., 2005). Zwei der effizientesten siRNAs wurden als shRNAs in ein AAV2-Shuttleplasmid kloniert (pAAV2-shRdRP2.4), aus dem anschließend dimerische *self complementary* (sc) AAV2-Vektoren generiert wurden (scAAV2-shRdRP2.4). Dimerische AAV ermöglichen im Vergleich zu monomerischen *single strand* (ss) AAV eine wesentlich schnellere und stärkere Expression ihres Transgens, eine Eigenschaft, die bei einem antiviralen Einsatz essentiell ist. Vor allem bei schnell replizierenden Viren wie CVB ist es notwendig, die therapeutisch wirksame shRNA schnell und hoch zu exprimieren. Durch die Expression von zwei unterschiedlichen shRNAs gegen die virale RdRP verringert sich die Möglichkeit zur Entstehung von Escape-Mutanten, ein Problem, dass bei RNAi-basierten antiviralen Strategien häufig vorkommt (Gitlin et al., 2005; Boden et al., 2003).



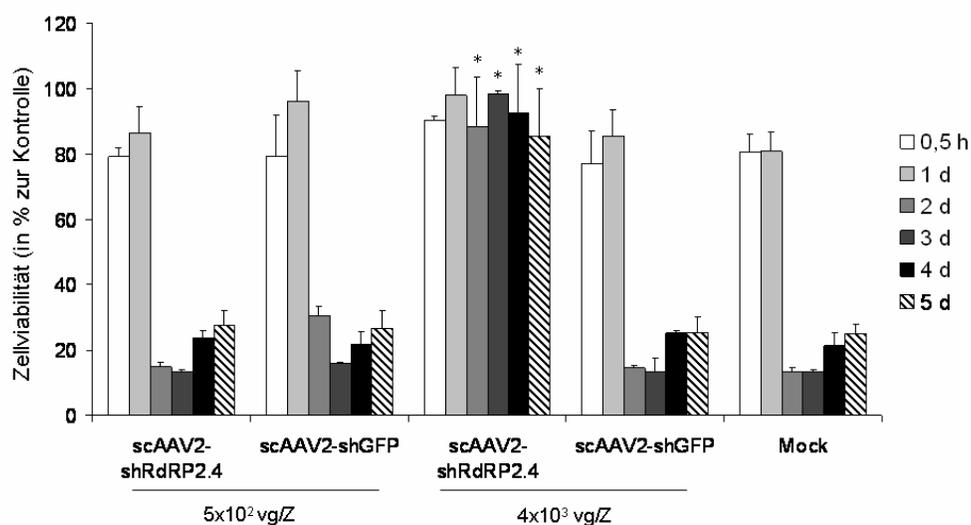
**Abb. 4.2.1:** Schematische Darstellung von scAAV2-shRdRP2.4 mit zwei Expressionskassetten, deren shRNAs (shRdRP2 und shRdRP4) gegen die RdRP von CVB3 gerichtet sind. Beide Expressionskassetten beinhalten einen Maus RNA-Polymerase-III-Promoter U6 und sind entgegengesetzt gerichtet, zwischen den *terminal repeats* (TR) vom AAV2 inseriert. Die 3' TR beinhaltet eine Deletion der *terminal resolution site* (trs) und der D-Sequenz (Nukleotid 118-141), was zur Verpackung von dimerischen, *self complementary* (sc) AAV-Genomen führt.

Die AAV-exprimierten shRNAs gegen die RdRP greifen an verschiedenen Punkten die virale Replikation an. Erstens wird die Translation viraler RdRP verhindert und somit die Generierung neuer viraler RNA durch die RdRP. Zweitens wird direkt das

virale (+)-RNA-Genom degradiert. Auf diese Weise wird sowohl die Vermehrung des Virusgenoms durch die fehlende Matritze, als auch die virale Proteinexpression durch die fehlende mRNA verhindert.

#### 4.2.1 Langzeitinhibierung der CVB3-Infektion in HeLa-Zellen durch scAAV2-shRdRP2.4

HeLa-Zellen sind eine permissive Zelllinie für CVB3, was sich in einer schnellen und effizienten viralen Replikation mit anschließender Zelllyse zeigt. Als erstes wurde deshalb untersucht, inwiefern durch scAAV2-shRdRP2.4 HeLa-Zellen vor einer replikationsbedingten Zelllyse des CVB3 geschützt werden können. Dazu wurden HeLa-Zellen mit scAAV2-shRdRP2.4 oder dem Kontrollvektor scAAV2-shGFP in unterschiedlichen Dosen transduziert ( $5 \times 10^2$  bzw.  $4 \times 10^3$  vg/Z). Nach 24 h wurden die Zellen mit CVB3 (moi 0,1) infiziert und die Zellviabilität täglich bis Tag 5 nach der Infektion bestimmt.

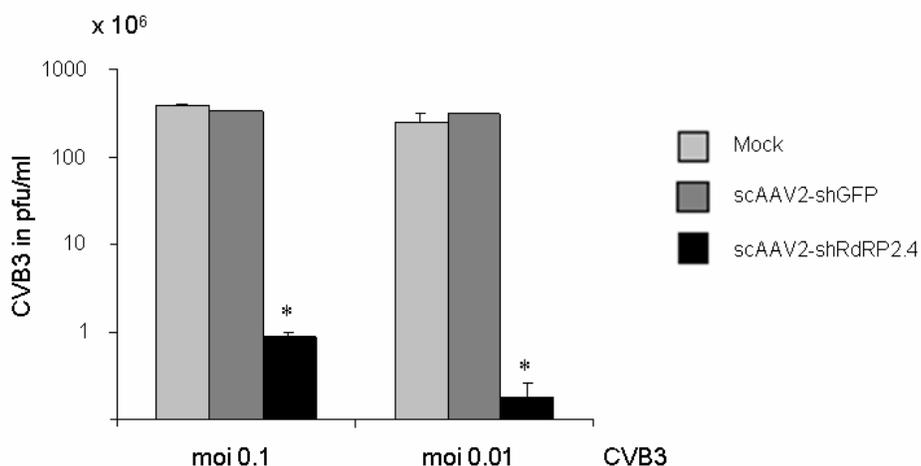


**Abb. 4.2.2:** Verringerung der durch CVB3-Replikation verursachten Zelllyse durch shRdRP2.4. HeLa Zellen wurden mit  $5 \times 10^2$  vg/Z und  $4 \times 10^3$  vg/Z scAAV2-shRdRP2.4 und scAAV2-shGFP transduziert und nach 24 h mit CVB3 (moi 0,1) infiziert. Der Bestandteil lebender Zellen wurde an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mittels Zellviabilitäts-Assay gemessen. Dabei dienten nicht infizierte Zellen als Referenz = 100 % Zellviabilität (\*= $p < 0,001$ ).

HeLa-Zellen, die mit der höheren Dosis scAAV2-shRdRP2.4 ( $4 \times 10^3$  vg/Z) transduziert wurden, zeigten einen Langzeitschutz vor viral-bedingter Zelllyse über

einen Untersuchungszeitraum von 5 Tagen nach der CVB3-Infektion. Sowohl untransduzierte Zellen (Mock) als auch Zellen, die mit dem Kontrollvektor (scAAV2-shGFP) transduziert wurden, wiesen ab Tag 2 nach der CVB3-Infektion einen Verlust der Zellviabilität von ca. 80 % im Vergleich zu uninfizierten Zellen (100 %) auf. Wurden die Zellen mit der geringeren Dosis scAAV2-shRdRP2.4 ( $5 \times 10^2$  vg/Z) behandelt, konnte jedoch keine schützende Wirkung gegen die viralbedingte Zelllyse beobachtet werden (Abb. 4.2.2).

Mittels Plaque-Assay wurde anschließend die Inhibierung der Virusreplikation quantitativ bestimmt. Dazu wurden HeLa-Zellen, wie im vorhergehenden Versuch, mit scAAV2-shRdRP2.4 und scAAV2-shGFP ( $4 \times 10^3$  vg/Z) transduziert und 24 h später mit CVB3 infiziert (moi 0,1 und 0,01). Plaqueassay-Analysen 72 h nach der CVB3-Infektion zeigen eine effiziente Reduktion der viralen Replikation in den scAAV2-shRdRP transduzierten HeLa-Zellen im Vergleich zum Kontrollvektor scAAV2-shGFP (Abb. 4.2.3). Die Effizienz der Virusinhibierung war dabei abhängig von der Dosis der eingesetzten initialen CVB3-Dosis. Bei einer moi von 0,1 betrug die Inhibierung der Virusreplikation durch shRdRP2.4 mehr als  $2 \log_{10}$  (99,75 %) und mehr als  $3 \log_{10}$  (99,94 %) bei einer niedrigeren CVB3-Dosis von 0,01 moi.



**Abb. 4.2.3:** Inhibierung der CVB3-Replikation durch scAAV2-shRdRP2.4. HeLa-Zellen wurden mit  $4 \times 10^3$  vg/Z scAAV2-shRdRP2.4 oder scAAV2-shGFP transduziert und 24 h später mit CVB3 (moi 0,1 oder 0,01) infiziert. Bestimmung von CVB3 mittels Plaque-Assay 72 h nach Infektion.

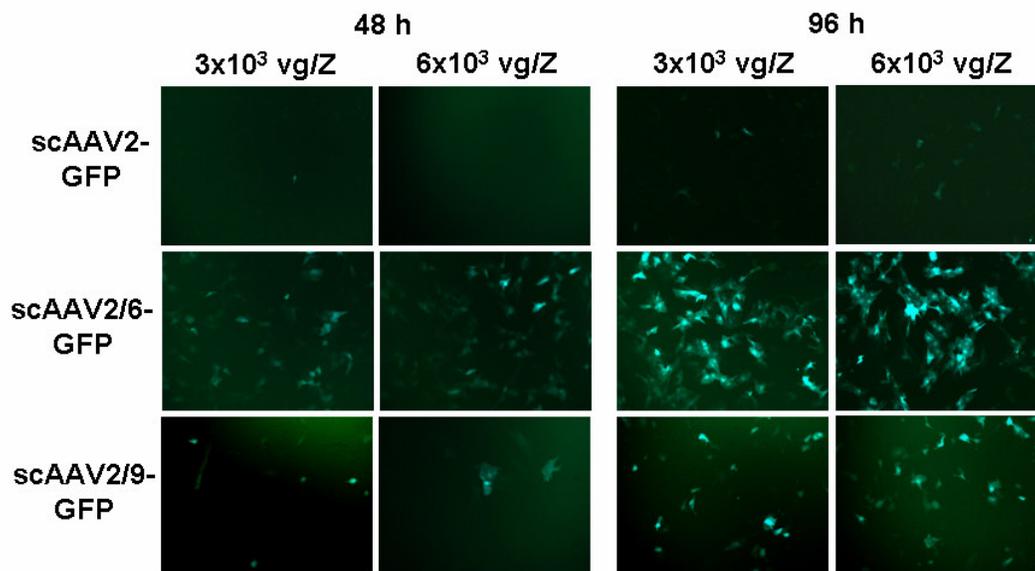
Dieses Experiment zeigt weiterhin, dass die Verringerung der Zytotoxizität aus einer verminderten CVB3-Replikation resultiert, die durch die inhibierende Wirkung der shRNAs gegen die virale RdRP hervorgerufen wird.

## 4.2.2 Inhibierung der CVB3-Infektion in NRCM

### 4.2.2.1 Effiziente Transduktion von NRCM durch scAAV-Pseudotypen

Die Zielzellen des Coxsackievirus im Herzen sind die Kardiomyozyten. Demzufolge müssen in einem potentiellen therapeutischen antiviralen Ansatz, basierend auf RNAi, ebenfalls die Kardiomyozyten als Zielzellen gewählt werden. Deshalb wurde in den nachfolgenden Experimenten die AAV-Vektor-vermittelte antivirale Effizienz der shRNAs gegen die RdRP in NRCM getestet.

Da AAV-Vektoren je nach Serotypen unterschiedliche Zell- und Gewebetropismen aufweisen, wurde als erstes untersucht, wie hoch die Transduktionseffizienz von verschiedenen AAV-Pseudotypen in diesen primären kardialen Zellen ist. Dafür wurden NRCM mit  $3 \times 10^3$  bzw.  $6 \times 10^3$  vg/Z scAAV2-GFP (AAV2-Kapsid) oder den Pseudotypen scAAV2/6-GFP und scAAV2/9-GFP, die das Kapsid von AAV6 bzw. AAV9 besitzen, transduziert und die GFP-Expression 48 h und 96 h nach Transduktion dokumentiert.



**Abb. 4.2.4:** Transduktionseffizienz von scAAV2-Vektoren und pseudotypisierten scAAV2/6- und scAAV2/9-Vektoren in NRCM. Zellen wurden mit  $3 \times 10^3$  vg/Z bzw.  $6 \times 10^3$  vg/Z scAAV2-GFP, scAAV2/6-GFP bzw. scAAV2/9-GFP transduziert und die GFP-Expression 48 h und 96 h später dokumentiert.

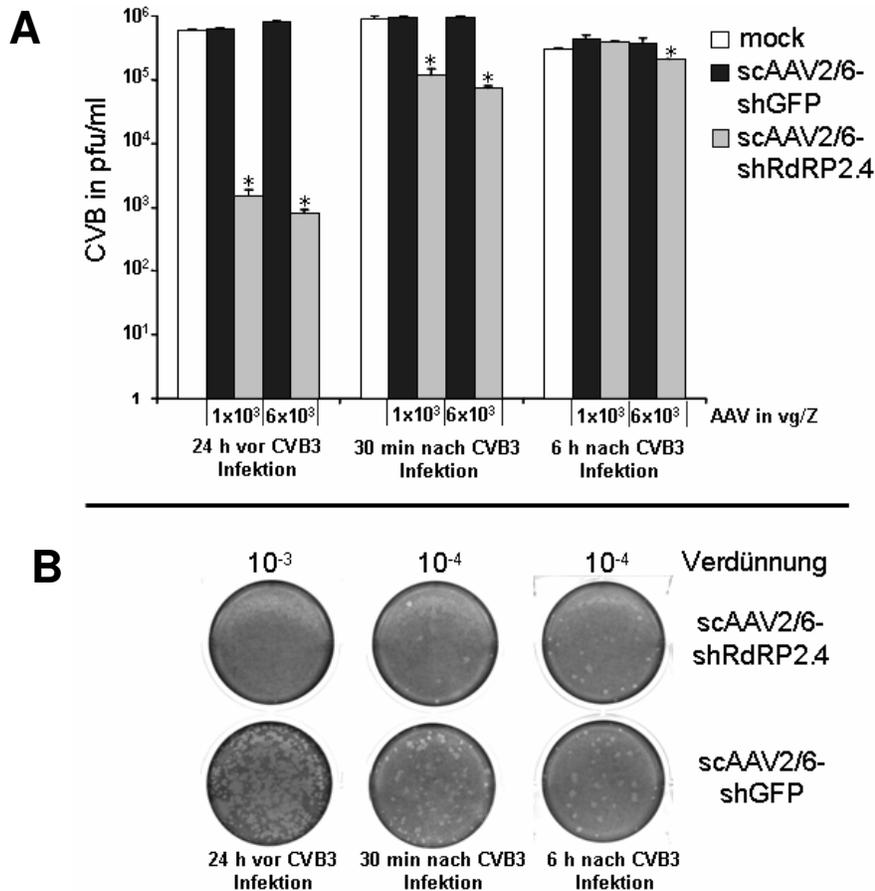
Die höchste Transduktionsrate zeigte der scAAV2/6-GFP Pseudotyp, bei dem bereits nach 48 h eine Vielzahl von GFP-exprimierenden NRCM zu sehen waren, deren GFP-Expression an den nachfolgenden Tagen noch zunahm (Abb. 4.2.4). scAAV2-GFP und scAAV2/9-GFP zeigten dagegen eine ähnliche, aber im Vergleich zu scAAV2/6-GFP, deutlich reduzierte Transduktionseffizienz.

#### *4.2.2.2 Inhibierung von CVB3 durch AAV-Vektor-exprimierte shRdRP2.4 in NRCM*

Resultierend aus den vorhergehenden Ergebnissen wurde ein scAAV2/6 Pseudotyp generiert, der die shRdRP2 und shRdRP4 exprimiert. NRCM wurden mit diesem Vektor (scAAV2/6-shRdRP2.4) in unterschiedlichen Dosierungen transduziert und die Effizienz der CVB3-Inhibierung getestet. Dabei wurden die Zellen 24 h nach der Transduktion infiziert. Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern die AAV exprimierten therapeutischen shRNAs in der Lage sind, nach einer bereits stattgefundenen CVB3-Infektion die virale Replikation zu inhibieren. Dafür wurden die NRCM 30 min bzw. 6 h vor der Transduktion mit CVB3 infiziert (moi 1). Als Kontrollvektor diente scAAV2/6-shGFP.

Bei der Transduktion von scAAV2/6-shRdRP2.4 24 h vor der CVB3-Infektion konnte eine sehr effiziente Inhibierung der CVB3-Replikation in den NRCM festgestellt werden. Diese betrug in Abhängigkeit von der verwendeten Vektordosis 99,7 % ( $1 \times 10^3$  vg/Z) bzw. 99,9 % ( $6 \times 10^3$  vg/Z) und damit nahezu 3log<sub>10</sub>-Stufen im Vergleich zum Kontrollvektor und zu untransfizierten Zellen (Abb. 4.2.5\_A).

Wurden die Zellen erst nach der CVB3-Infektion mit scAAV2/6-shRdRP2.4 transduziert, konnte zwar noch immer eine signifikante Inhibierung der CVB3-Replikation festgestellt werden, jedoch mit geringerer Effizienz. So konnte eine Verringerung der viralen Nachkommen um etwa 1log<sub>10</sub>-Stufe [85 % ( $1 \times 10^3$  vg/Z) bzw. 92,3 % ( $6 \times 10^3$  vg/Z)] nachgewiesen werden, wenn die NRCM 30 min nach der CVB3-Infektion transduziert wurden. Bei einer Behandlung mit shRdRP2.4 6 h nach der Virusinfektion konnte allerdings nur noch bei der höheren Vektordosis ( $6 \times 10^3$  vg/Z) ein inhibitorischer Effekt von ca. 50 % festgestellt werden (Abb. 4.2.5\_A).



**Abb. 4.2.5:** Inhibierung der CVB3-Replikation in NRCM durch scAAV2/6-shRdRP2.4 in Abhängigkeit von der Vektordosis und dem Zeitpunkt der Transduktion. NRCM wurden mit  $1 \times 10^3$  oder  $6 \times 10^3$  vg/Z, 30 min vor bzw. 30 min oder 6 h nach CVB3-Infektion transduziert. **(A)** 72 h nach Infektion wurde mittels Plaque-Assay die Menge an CVB3-Viren bestimmt (\*= $p < 0,05$ ). **(B)** Darstellung eines repräsentativen Plaque-Assays.

Abbildung 4.2.5\_B zeigt exemplarisch die Inhibierung der CVB3-Replikation durch scAAV2/6-shRdRP2.4 in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Transduktion vor oder nach der CVB3-Infektion. Die Menge der neugebildeten infektiösen CVB3-Viren wurde mittels Plaque-Assay ermittelt.

#### 4.2.3 Therapeutischer Effekt von AAV-Vektor-exprimierter shRdRP2.4 im CVB3-Myokarditis-Mausmodell

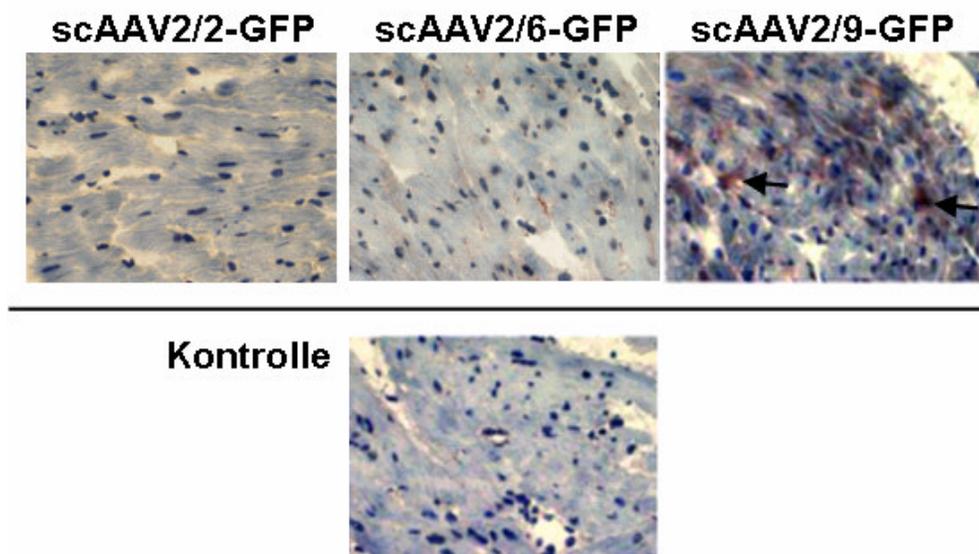
Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass scAAV-shRdRP2.4 sowohl in HeLa-Zellen als auch in NRCM die Replikation von CVB3 effizient inhibieren kann, sollte

nachfolgend untersucht werden, inwiefern dieser therapeutische Ansatz auch im *in vivo* Modell der CVB3-Mausmyokarditis eine antivirale Wirksamkeit aufweist.

#### 4.2.3.1 Transduktion von kardialen Zellen durch scAAV-Pseudotypen *in vivo*

In einem initialen Experiment wurde die Transduktionseffizienz im Herzen von unterschiedlichen AAV-Pseudotypen untersucht.

C57BL/6-Mäusen wurde via Jugularisvenen-Injektion  $10^{11}$  vg scAAV2-GFP oder scAAV2.6-GFP bzw.  $1 \times 10^{10}$  vg scAAV2.9-GFP appliziert und nach 10 Tagen die Organe entnommen.



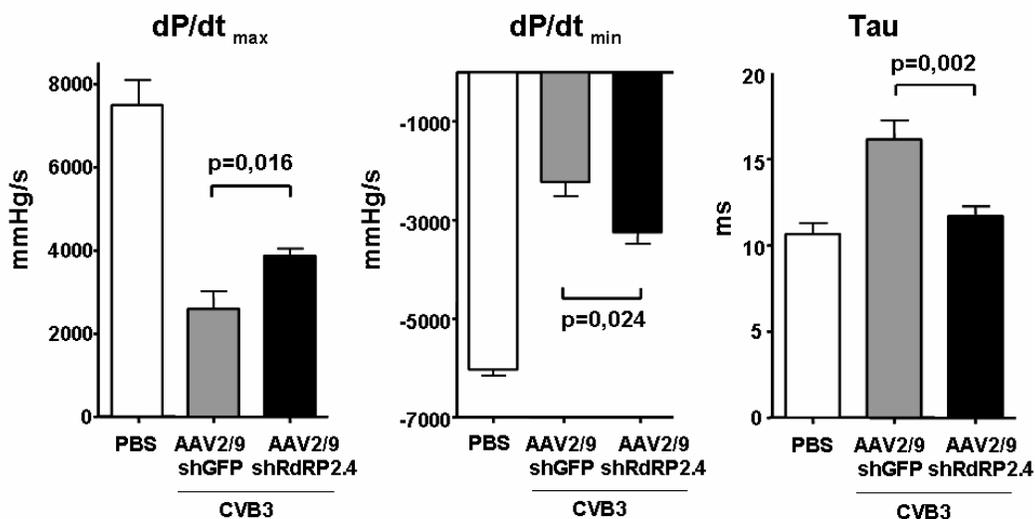
**Abb. 4.2.6:** Kardiale Transduktionseffizienz von scAAV2 und den AAV-Pseudotypen scAAV2/6 und scAAV2/9 *in vivo*. C57BL/6-Mäusen wurde via Jugularisvenen-Injektion scAAV2-GFP ( $1 \times 10^{11}$  vg/Z), scAAV2/6-GFP ( $1 \times 10^{11}$  vg/Z) und scAAV2/9-GFP ( $1 \times 10^{10}$  vg/Z) appliziert und 10 Tage nach Applikation die Herzen entnommen und mittels Immunfärbung GFP exprimierende Zellen (rot/violett angefärbt) detektiert.

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass der Pseudotyp scAAV2.9-GFP, der die Kapsidproteine vom AAV-Serotyp 9 besitzt, die höchste kardiale Transduktionseffizienz *in vivo* aufwies (Abb. 4.2.6). Obwohl scAAV2/6 kardiale Zellen *in vitro* sehr effizient transduziert (Abb. 4.2.4), waren in den scAAV2.6-GFP behandelten Mäusen keine GFP-exprimierenden Zellen nachweisbar, ebenso wie bei scAAV2-GFP.

Dieses Experiment zeigte, dass AAV2/9-Pseudotypen die höchste kardiale Transduktionseffizienz aufweisen und damit für die *in vivo* Anwendung mit kardialem Hintergrund am besten geeignet sind.

#### 4.2.3.2 Inhibierung der CVB3-induzierten Myokarditis durch scAAV2/9-shRdRP2.4

Nachfolgend wurde untersucht, wie sich die Behandlung mit shRdRP2.4 auf eine CVB3-Myokarditis auswirkt. Dafür wurden jeweils acht Mäuse mit  $2 \times 10^{11}$  vg/Maus scAAV2/9-shRdRP2.4 oder dem Kontrollvektor (scAAV2/9-shGFP) transduziert und 10 Tage später mit CVB3 infiziert (i.p.  $2 \times 10^5$  pfu). Nach weiteren 9 Tagen wurden hämodynamische Parameter gemessen und die Organe der Tiere entnommen.

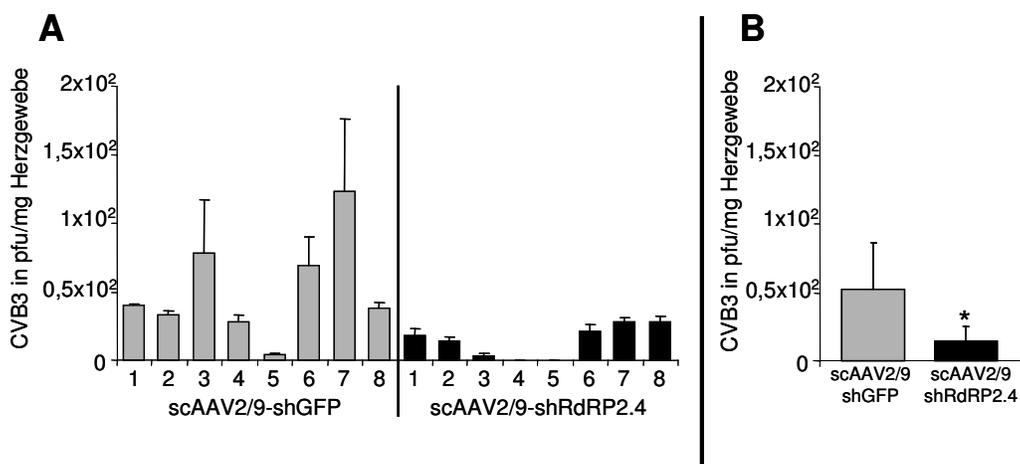


**Abb. 4.2.7:** Hämodynamische Parameter in CVB3 infizierten Mäusen, transduziert mit scAAV2/9-shRdRP2.4 und scAAV2/9-shGFP. C57BL/6-Mäusen wurde via Jugularisvenen-Injektion scAAV2/9-shRdRP2.4 oder scAAV2/9-shGFP ( $2 \times 10^{11}$ vg/Z) appliziert. 10 Tage nach Applikation wurden die Mäuse i.p. mit CVB3 ( $2 \times 10^5$  pfu) infiziert. 9 Tage nach Infektion erfolgte mittels Katheter die Bestimmung der linksventrikulären Funktionsparameter, wie Kontraktilität ( $dP/dt_{max}$ ) und Relaxation ( $dP/dt_{min}$ , Tau). Als Kontrollgruppe wurden nicht infizierte Mäuse (PBS) mitgeführt.

Die hämodynamischen Messungen 9 Tage nach Infektion der Mäuse mit CVB3 zeigten, dass sich sowohl die systolische Kontraktilität ( $dP/dt_{max}$   $3.006 \pm 287$  vs.  $7.482 \pm 487$  mmHg/s,  $p < 0,01$ ) als auch die diastolischen Parameter der Herzfunktion ( $dP/dt_{min}$   $-2.224 \pm 195$  vs.  $-6.456 \pm 356$  mmHg/s,  $p < 0,01$ ; Tau  $16,2 \pm 1,1$  vs.

10,7±0,6 ms,  $p < 0,01$ ) als Maß der Relaxation des Herzmuskels im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen (PBS) erheblich verschlechterten (Abb 4.2.7). Bei scAAV2/9-shRdRP2.4 behandelten Mäusen wurde im Gegensatz zu den Mäusen, die mit dem Kontrollvektor scAAV2/9-shGFP behandelt wurden, eine signifikante Verbesserung der kardialen Dysfunktionen beobachtet;  $dP/dt_{max}$ :  $3.865 \pm 354$  vs.  $3.006 \pm 287$  mmHg/s,  $p < 0,05$ ;  $dP/dt_{min}$ :  $-3.245 \pm 231$  vs.  $-2.224 \pm 195$  mmHg/s,  $p < 0,05$ ; Tau:  $11,9 \pm 0,5$  vs.  $16,2 \pm 1,1$  ms,  $p < 0,01$ .

Die Bestimmung der CVB3-Replikation im Herzen erfolgte mittels Plaque-Assay von homogenisiertem ventrikulärem Herzgewebe. Trotz großer Differenzen in der Viruslast zwischen den einzelnen Mäusen einer Gruppe (Abb. 4.2.8\_A), ist deutlich erkennbar, dass die mit scAAV2/9-shRdRP2.4 behandelten Mäuse im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Kontrollvektor scAAV2/9-shGFP) eine signifikant geringere Viruslast im Herzen aufwiesen. Dabei zeigte der Mittelwert der CVB3-Titer im Herzen der behandelten Tiere (scAAV2/9-shRdRP2.4) eine signifikante Verringerung der Viruslast um 73 % (Abb. 4.2.8\_B).



**Abb. 4.2.8:** Inhibierung der CVB3-Replikation in Mäusen nach Transduktion mit scAAV2/9-shRdRP2.4. **(A)** C57BL/6-Mäusen wurde via Jugularisveneninjektion scAAV2/9-shRdRP2.4 oder scAAV2/9-shGFP ( $2 \times 10^{11}$  vg/Z) appliziert. 10 Tage nach Applikation wurden die Mäuse i.p. mit CVB3 ( $2 \times 10^5$  pfu) infiziert. 9 Tage nach Infektion wurden die Herzen entnommen und mittels Plaque-Assay die CVB3-Titer bestimmt. Das Plaque-Assay wurde zweimal mit jeweils dreifacher Bestimmung des Titors wiederholt. **(B)** Mittelwert der CVB3-Titer im Herzgewebe der Mäuse (\*= $p < 0,05$ ).

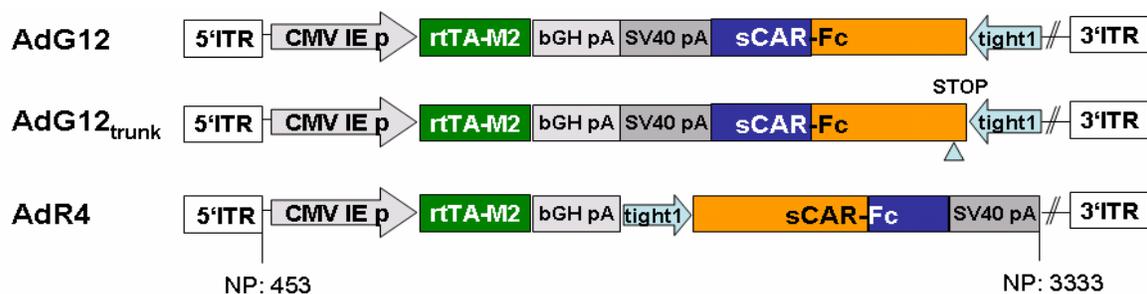
Trotz verbesserter Hämodynamikdaten und Inhibierung der CVB3-Replikation in infizierten scAAV2/9-shRdRP2.4 behandelten Mäusen, konnte keine signifikante Verringerung der Inflammation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

## 4.3 Inhibierung der CVB3-Infektion durch Vektor-vermittelte Dox-regulierbare Expression des löslichen CAR (sCAR-Fc)

### 4.3.1 Dox-regulierbare Expression von sCAR-Fc durch adenovirale Vektoren

#### 4.3.1.1 Entwurf und Konstruktion von adenoviralen Vektoren zur Dox-regulierbaren Expression von sCAR-Fc

Um eine möglichst gute Regulierbarkeit der sCAR-Fc Expression in Abhängigkeit von Dox zu erreichen, wurden zwei verschiedene adenovirale Shuttleplasmide (pAdG12-sCARFc und pAdR4-sCARFc) konstruiert und hinsichtlich ihrer Regulierbarkeit und Quantität der sCAR-Fc Expression bewertet. Bei dem sCAR-Fc handelt es sich um ein Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären Domäne D1 und D2 des humanen CAR und dem konstanten Teil des humanen IgG1 (Abb. 1.5). Die Expression von sCAR-Fc wurde unter den TREtight1-Promoter gestellt, einem minimalen CMV-Promoter mit *upstream* sich befindender Regulatorregion, bestehend aus sieben sich wiederholenden TetO-Sequenzen (Kapitel 1.5). Im selben Plasmid wurde zusätzlich die Expressionskassette des reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators (rtTA2<sup>s</sup>-M2) unter Kontrolle eines CMV-Promoters inseriert. Diese beiden Expressionskassetten wurden in unterschiedlicher Orientierung zueinander kloniert, um mögliche Beeinflussungen des TREtight1-Promoters durch andere Promoterregionen (z.B.: CMV-Promoter der rtTA2<sup>s</sup>-M2 Expressionskassette, ITRs des adenoviralen Vektors, andere im adenoviralen Genom befindliche Promotoren) zu minimieren.



**Abb. 4.3.1:** Schematische Abbildung der Dox-regulierbaren sCAR-Fc Expressionsvektoren AdG12, AdG12<sub>trunk</sub> und AdR4 mit zwei Expressionskassetten. Die erste Kassette kodiert für die kontinuierliche Expression des Dox-abhängigen Transaktivators rtTA2<sup>s</sup>-M2 und die zweite Kassette für die regulierbare Expression von sCAR-Fc durch einen Dox-abhängigen TREtight1-Promoter. Beide Expressionskassetten wurden in die E1-Region zwischen Position 453 und 3.333 des Adenovirus 5 inseriert.

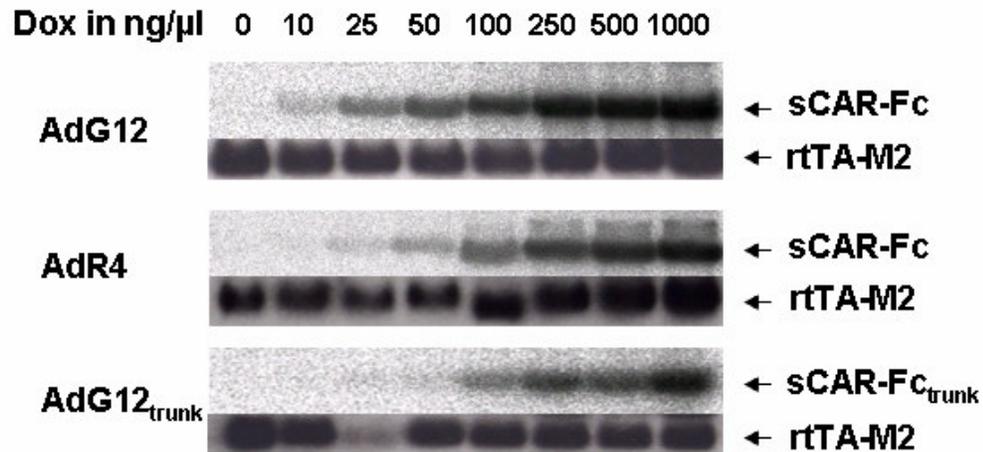
Nachdem in einem initialen Experiment gezeigt werden konnte, dass alle Konstrukte auf Plasmidebene Dox-regulierbar sind (Daten nicht gezeigt), wurden aus diesen Plasmiden die adenoviralen Vektoren AdG12 und AdR4 generiert (Abb. 4.3.1).

Des Weiteren wurde ein AdV mit dem gleichen Hintergrund wie AdG12 konstruiert, in dem sich jedoch in der Sequenz des sCAR-Fc an Nukleotidposition 10 eine Deletion befindet. Der daraus resultierende *frameshift* führt bei AS 13 zu einem Translationsstop, so dass dieser Vektor als Kontrolle genutzt werden kann (AdG12<sub>trunk</sub>).

#### 4.3.1.2 Charakterisierung der Dox-regulierbaren Expression von sCAR-Fc

Um die adenoviralen Vektoren hinsichtlich ihrer Regulierbarkeit und Expressionsstärke zu charakterisieren, wurden HeLa-Zellen mit jedem dieser Vektoren transduziert (moi 5) und mit unterschiedlichen Dosen Doxyzyklin (Dox) (0 – 1.000 ng/μl) kultiviert. 48 Stunden nach Transduktion wurde sowohl die gebildete sCAR-Fc-mRNA mittels Northern-Blot, als auch das Proteinlevel mittels Western-Blot untersucht. Bei allen drei Konstrukten wurde beobachtet, dass die Transkription des sCAR-Fc strikt von der hinzu gegebenen Dox-Menge abhängig ist (Abb. 4.3.2). Dabei ist die Transaktivierung nach Zugabe von Dox bei AdG12 am stärksten, wobei die quantitative Analyse mittels PhosphorImager eine 2.700fach höhere sCAR-Fc-Transkription mit Dox (1.000 ng/μl) im Medium zeigte, als ohne Dox. AdR4 zeigte eine ähnlich gute Regulierbarkeit aber eine 6fach niedrigere Expression von sCAR-Fc nach Zugabe von Dox (1.000 ng/μl). Auch AdG12<sub>trunk</sub> zeigte im Northern-Blot eine sehr gute Dox-Regulierbarkeit der Transkription. Die Transaktivierung der Expression nach Dox-Zugabe war von den drei AdV am geringsten.

Bei allen drei Konstrukten konnte dagegen eine gleichbleibend hohe, kontinuierliche Expression des rtTA2<sup>S</sup>-M2 Transaktivators gemessen werden.



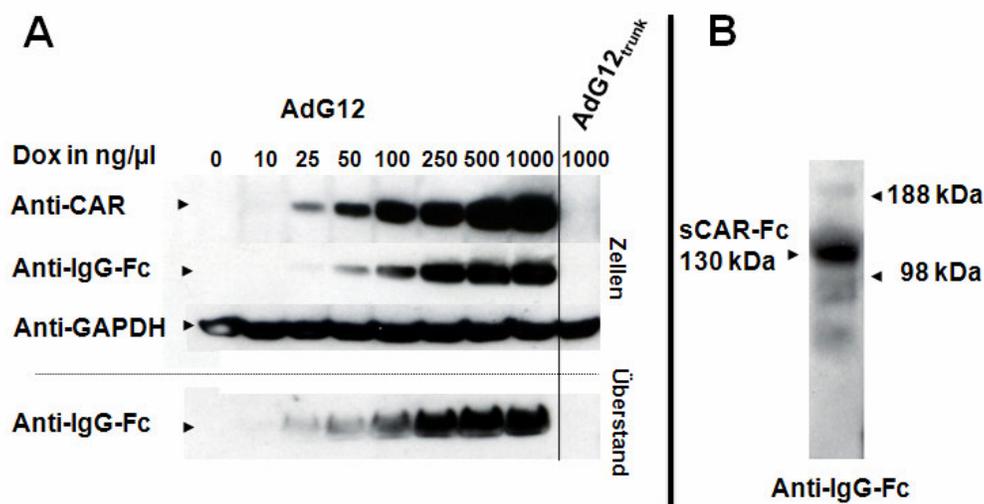
**Abb. 4.3.2:** Dox-abhängige Transkription von sCAR-Fc. HeLa-Zellen wurden mit AdG12, AdG12<sub>trunk</sub> und AdR4 (moi 5) transduziert und mit unterschiedlichen Mengen Dox kultiviert. Nachweis der sCAR-Fc und rtTA<sup>2S</sup>-M2 mRNA 48 h später mittels Northern-Blot und spezifischen Sonden.

Da AdG12 eine sehr gute Regulierbarkeit und die höchste Transkription von sCAR-Fc mit Dox zeigte, wurden die nachfolgenden Untersuchungen mit diesem Vektor durchgeführt.

Western-Blot Analysen (Abb. 4.3.3\_A) zeigten ebenfalls eine sehr gute Dox-Regulation der Expression und eine effiziente Sekretion von sCAR-Fc in das Kulturmedium. Dabei wurde das Protein aus Zelllysaten analysiert und der sCAR-Teil mit einem Antikörper spezifisch gegen hCAR (RmcB) und der Fc-Teil mit einem spezifischen Antikörper gegen humanes IgG1-Fc nachgewiesen. Des Weiteren konnte sCAR-Fc mit dem Antikörper gegen IgG1-Fc im Zellkulturmedium nachgewiesen werden (Abb. 4.3.3\_A - untere Zeile). In allen Untersuchungen mittels Western-Blot wurde eine stetige Zunahme von sCAR-Fc, sowohl in den Zellen als auch im Zellüberstand, in Abhängigkeit von der Dox-Menge gemessen. Zellen, die ohne Dox kultiviert wurden, zeigten dagegen keine sCAR-Fc Expression. Im Gegensatz zum Northern-Blot, wo AdG12<sub>trunk</sub> eine gute Dox-regulierbare Transkription von sCAR-Fc-mRNA zeigte, konnte im Western-Blot, durch den Translationsstopp bei AS 13, kein Protein detektiert werden (Abb. 4.3.3\_A).

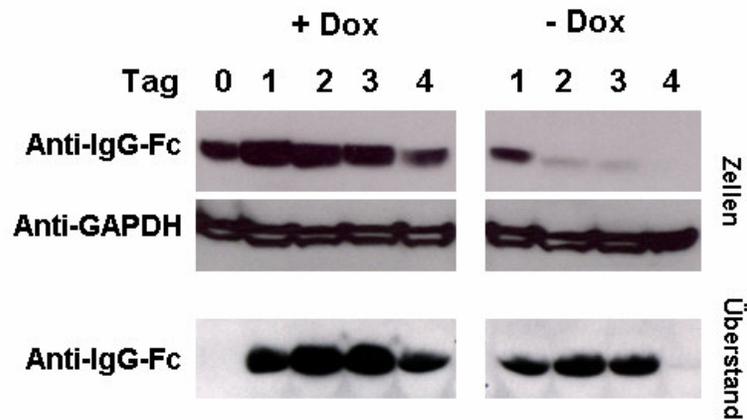
Das Fusionsprotein sCAR-Fc dimerisiert über die IgG-Fc-Domäne durch Disulfidbrückenbindungen, welche bei den reduzierenden Bedingungen des Western-Blots wieder gespalten werden, so dass sCAR-Fc in diesem Fall als Monomer vorliegt und eine Größe von ca. 64 kDa besitzt. Unter nicht reduzierenden

Bedingungen konnte der sCAR-Fc auch in seiner physiologisch vorkommenden Form, als Dimer mit einer Größe von 130 kDa, nachgewiesen werden (Abb. 4.3.3\_B)



**Abb. 4.3.3:** Dox-abhängige Expression von sCAR-Fc durch AdG12. **(A)** HeLa-Zellen wurden mit AdG12 und AdG12<sub>trunk</sub> (moi 5) transduziert und mit unterschiedlichen Dosen Dox kultiviert. Expression von sCAR-Fc in den Zellen und Sekretion ins Medium wurden über Western-Blot nachgewiesen. Detektion der sCAR-Domäne (obere Zeile) erfolgte mit dem mouse-anti-hCAR Antikörper (RmcB) und dem sekundären Antikörper (swine-anti-mouse-HRP). Nachweis der IgG1-Fc-Domäne erfolgte mittels sheep-anti-human IgG-HRP (zweite Zeile), GAPDH (dritte Zeile) als Ladekontrolle (anti-GAPDH). Nachweis der Abgabe von sCAR-Fc ins Medium durch sheep-anti-human IgG-HRP Antikörper (untere Zeile). **(B)** Der dimerische sCAR-Fc (IgG-Fc-Teil, wie A) im Zellkulturüberstand wurde durch Western-Blot unter nicht reduzierenden Bedingungen nachgewiesen.

Neben guter Regulierbarkeit, niedriger Basalaktivität und effizienter Transgenexpression nach Induktion, ist es bei der Anwendung von regulierbaren Genexpressionssystemem weiterhin von Bedeutung, wie schnell nach anfänglicher Induktion die Expression des Transgens durch Weglassen des Induzers beendet werden kann. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression von sCAR-Fc streng von der Dox-Zugabe abhängig ist, sollte im nachfolgenden Experiment das „Abschalten“ getestet werden. Dafür wurden HeLa-Zellen mit AdG12 (moi 5) transduziert und für 24 h mit Dox im Medium (1 µg/µl) kultiviert, um die Expression von sCAR-Fc zu starten. Über einen Zeitraum von 4 Tagen wurden die Zellen anschließend weiter mit (Abb. 4.3.4 linke Seite) oder ohne Dox (Abb. 4.3.4 rechte Seite) kultiviert und jeden Tag der Zellkulturüberstand durch frisches Medium ersetzt. Nach initialer Aktivierung durch Dox-Zugabe, konnte an den nachfolgenden Tagen bei den Zellen, die kontinuierlich mit Dox weiterkultiviert wurden eine stetige Expression von sCAR-Fc in den Zellen und Abgabe in das Zellkulturmedium beobachtet werden.



**Abb. 4.3.4:** ON/OFF-Regulation der sCAR-Fc Expression. HeLa-Zellen wurden mit AdG12 (moi 5) transduziert und für 24 h mit Dox (1 µg/ml) kultiviert. Nach 24 h (Tag 0) wurde das Medium gewechselt und die Zellen weitere 4 Tage mit (links) oder ohne Dox (rechts) kultiviert bei täglichem Mediumwechsel. Die Expression von sCAR-Fc wurde mittels Western-Blot (sheep-anti-human IgG-HRP) in Zellen und im Zellkulturüberstand gemessen.

Wurde die Dox-Zugabe jedoch nach der initialen Gabe 24 Stunden später abgesetzt, konnte bereits am ersten Tag nach der Kultivierung ohne Dox eine Reduktion der zellulären sCAR-Fc Konzentration im Vergleich zu den Zellen unter stetiger Dox-Gabe beobachtet werden (Abb. 4.3.4). Am zweiten und dritten Tag der Kultivierung ohne Dox verminderte sich die Expression von sCAR-Fc in den Zellen weiter und am Tag 4 konnte kein sCAR-Fc mehr detektiert werden. Ein ähnlicher, jedoch zeitlich verzögerter, Effekt konnte ebenfalls bei der sCAR-Fc Menge im Zellkulturüberstand festgestellt werden.

Dies zeigt, dass nach einer initialen Aktivierung der sCAR-Fc Expression mittels Dox durch Weglassen des Pharmakons die Expression von sCAR-Fc zeitnah abgeschaltet werden kann.

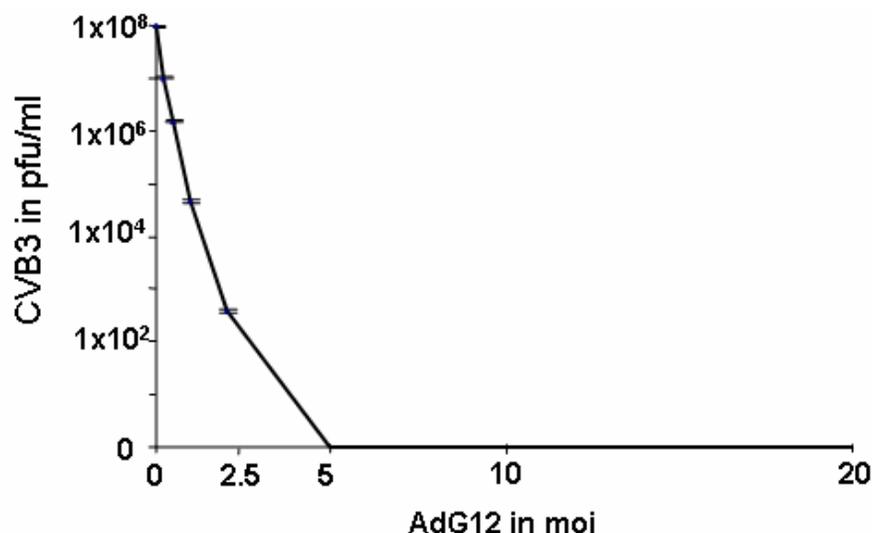
#### 4.3.2 Inhibierung der CVB3-Infektion durch sCAR-Fc

Durch die Rezeptoreigenschaft der extrazellulären Domäne von CAR, bindet sCAR-Fc an das Kapsid der Coxsackie-B-Viren und verhindert so die Infektion der Zielzelle. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, inwieweit CVB-permissive Zellen, die sCAR-Fc exprimieren, vor einer CVB3-Infektion und damit verbundener Zelllyse

geschützt sind, und wie effizient die Virusreplikation in diesen Zellen inhibiert werden kann.

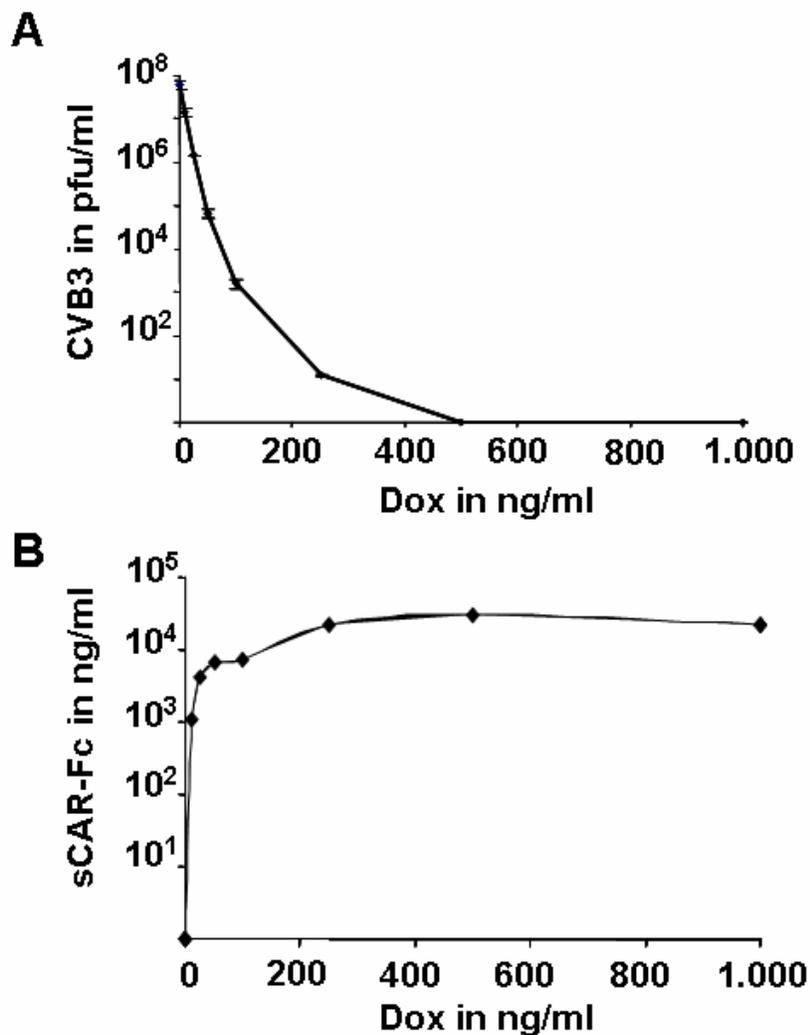
#### 4.3.2.1 Inhibierung der CVB3-Infektion in Abhängigkeit von der Vektordosis, der Dox-Konzentration und CVB3-Menge

Zunächst wurde die Effizienz der CVB3-Inhibierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Vektordosis untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlich hohen Dosen AdG12 transduziert und mit Dox (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) kultiviert. 48 h später wurde das Kulturmedium abgenommen und die CVB3-Viren (moi 0,1) für 30 min bei 4°C in diesem Medium inkubiert. Danach wurde das Medium/Virus-Gemisch für weitere 30 min (37°C) auf die Zellen gegeben und nach einem Mediumwechsel diese für weitere 24 h kultiviert. Die sich anschließende Virusbestimmung mittels Plaque-Assay zeigte, dass mit zunehmender Vektordosis die Anzahl der neu gebildeten CVB3-Viren stark abnimmt (Abb. 4.3.5). Ab einer AdG12-Vektordosis von 5 moi konnte dabei die Virusreplikation komplett inhibiert und somit keine Virusnachkommen detektiert werden.



**Abb. 4.3.5:** Inhibierung der CVB3-Replikation durch sCAR-Fc in Abhängigkeit von der verwendeten Vektordosis. HeLa-Zellen wurden mit AdG12 in unterschiedlicher Dosis (moi 0 - 20) transduziert und mit Dox (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) kultiviert. 48 h später wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und CVB3 (moi 0,1) mit diesem für 30 min preinkubiert. Anschließend wurde der CVB3/Zellkulturüberstand wieder auf die HeLa-Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Über Plaque-Assay wurde die CVB3-Replikation in den Zellen 24 h später quantifiziert.

In einem ähnlich angelegten Experiment wurde die Abhängigkeit der CVB3-Inhibierung von der Menge des zugegebenen Dox ermittelt. HeLa-Zellen wurden mit AdG12 (moi 5) transduziert und mit unterschiedlichen Dosen Dox im Medium kultiviert. Nach 48 h wurden sie mit CVB3 (moi 0,1) infiziert, wie vorstehend beschrieben. Auch hier zeigt sich eine rasche Abnahme der gemessenen CVB3-Viren mit Zunahme der Dox-Konzentration im Kulturmedium, wobei ab 500 ng/μl keine CVB3-Viren mehr nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.3.6\_A).

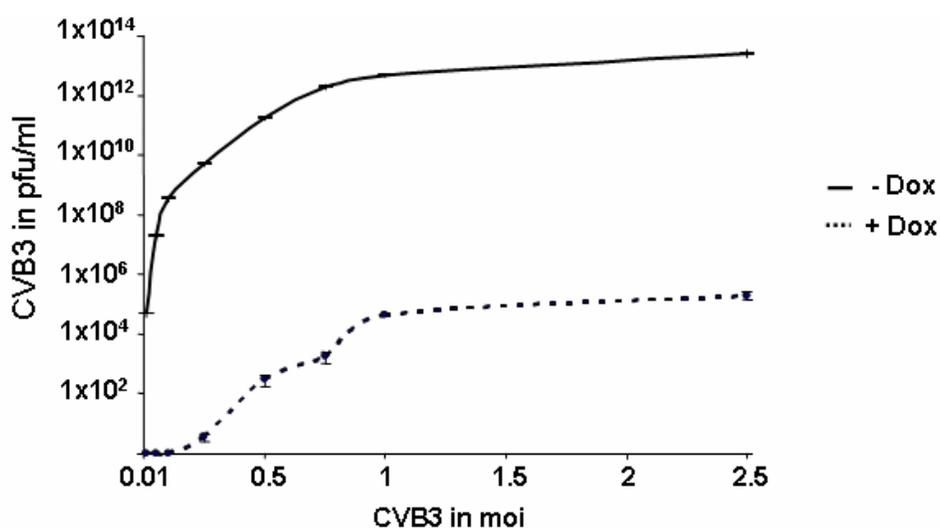


**Abb. 4.3.6:** Inhibierung der CVB3-Replikation durch sCAR-Fc und Konzentration von sCAR-Fc im Zellkulturüberstand in Abhängigkeit der Dox-Konzentration. **(A)** HeLa-Zellen wurden mit AdG12 (moi 5) transduziert und mit Dox in unterschiedlichen Konzentrationen (0 - 1 μg/ml) kultiviert. 48 h später wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und CVB3 (moi 0,1) mit diesem für 30 min bei 4°C preinkubiert. Anschließend wurde der CVB3/Zellkulturüberstand wieder auf die HeLa-Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Über Plaque-Assay wurde die CVB3-Replikation in den Zellen 24 h später quantifiziert. **(B)** HeLa-Zellen wurden unter (A) behandelt und 48 h nach Transduktion die sCAR-Fc-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen.

Dies lässt darauf schließen, dass die Konzentration des exprimierten sCAR-Fc im Zellkulturüberstand so hoch war, dass alle eingesetzten CVB3-Viren neutralisiert wurden und es zu keiner initialen Infektion der Zielzellen kam.

Zusätzlich wurde die gebildete Menge an sCAR-Fc im Zellkulturüberstand mittels ELISA ermittelt. Dafür wurden HeLa-Zellen wie zuvor beschrieben mit AdG12 transduziert und nach 48 h die sCAR-Fc Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Bereits ab einer geringen Dosis von Dox (10 ng/ml) im Zellkulturüberstand konnte eine quantitativ hohe Expression von sCAR-Fc und Abgabe in das Medium (1 µg/ml) gemessen werden (Abb. 4.3.6\_B). Durch Erhöhung der Dox-Konzentration stieg auch die Menge sCAR-Fc im Medium stetig an, bis zu einem Maximum von ca. 20 µg/ml bei 250 ng/ml Dox.

In einem dritten Ansatz sollte über ein Dosis-Eskalationsexperiment herausgefunden werden, bis zu welcher Dosis initial eingesetzter CVB3-Viren der adenoviral exprimierte sCAR-Fc die Infektion der Zielzellen effizient inhibieren kann. HeLa-Zellen wurden mit AdG12 (moi 5) transduziert und mit oder ohne Dox für 48 h kultiviert. Wie in den beiden vorhergehenden Experimenten beschrieben, wurden die Zellüberstände anschließend mit unterschiedlichen CVB3-Mengen inkubiert und die HeLa-Zellen infiziert.



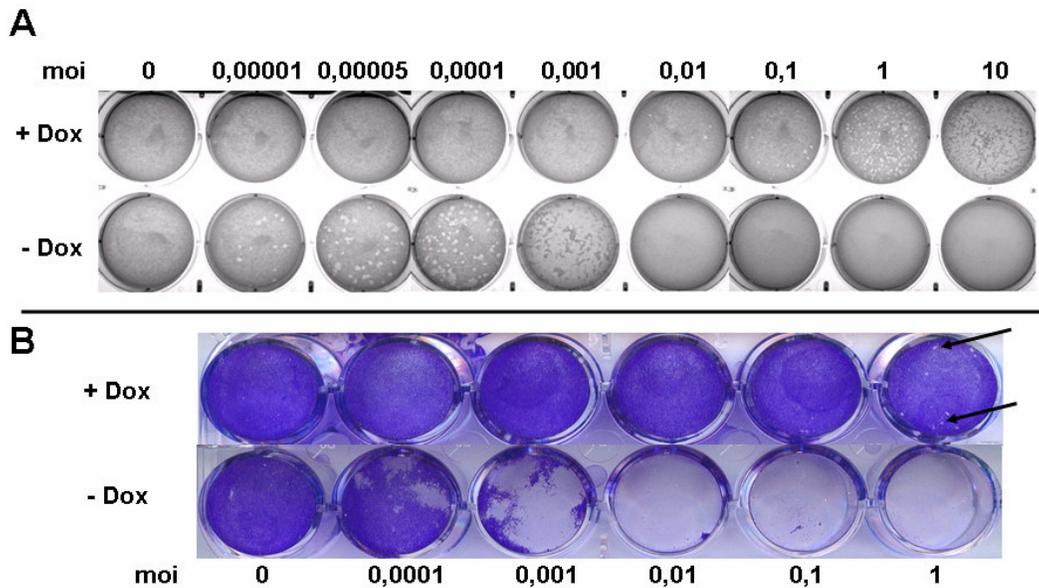
**Abb. 4.3.7:** Inhibierung der CVB3-Replikation durch sCAR-Fc in Abhängigkeit der CVB3-Menge. HeLa-Zellen wurden mit AdG12 (moi 5) transduziert und mit oder ohne Dox (1 µg/ml) kultiviert. 48 h später wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und unterschiedliche Mengen CVB3 (moi 0,01 – 2,5) mit diesem für 30 min bei 4°C preinkubiert. Anschließend wurde der CVB3/Zellkulturüberstand wieder auf die HeLa-Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Über Plaque-Assay wurde die CVB3-Replikation in den Zellen 24 h später quantifiziert.

In Zellen ohne Dox im Kulturmedium stieg die Menge der nachweisbaren Viren stetig an. Bereits bei einer Virusdosis von  $10^3$  (=  $2,5 \times 10^2$  pfu) betrug die Menge an CVB3 nach 24 h Inkubationszeit  $10^5$  pfu. Bis zu einer initialen Virusdosis von  $10^5$  stieg die Anzahl neu gebildeter Viren weiter an und erreichte danach eine Plateauphase, in der eine weitere Erhöhung der Virusdosis nur zu einer minimalen Erhöhung der Virusproduktion führte (Abb. 4.3.7).

Bei den Zellen, die sCAR-Fc exprimierten, trat bis zu einer initial eingesetzten Virusdosis von  $10^3$  nahezu keine Virusreplikation auf und es kam zu einer kompletten Inhibierung der CVB3-Viren durch sCAR-Fc. Ab einer Dosis von  $10^5$  kam es zu einer geringen Virusreplikation, wobei die Anzahl der entstandenen CVB3-Viren jeweils ca. 8  $\log_{10}$ -Stufen unter der CVB3-Menge in HeLa-Zellen ohne sCAR-Fc Induktion mittels Dox lag. So konnte die Replikation von CVB3 zwar nicht mehr komplett verhindert, aber bis zu einer Virusdosis von  $10^7$  effizient inhibiert werden.

#### 4.3.2.2 Inhibierung der CVB3-Infektion von Zielzellen durch sCAR-Fc und Schutz vor Replikations-bedingter Zellyse

Der von AdG12 exprimierte sCAR-Fc bindet, wie auch membranständiger CAR, an das Kapsid der Coxsackieviren und verhindert dadurch die Infektion der Zielzellen. Während in den vorhergehenden Experimenten die Effizienz der Virusinhibierung über die Replikation, speziell über die neu gebildeten Viren, bewertet wurde, sollte in den nachfolgenden Experimenten gezeigt werden, wie das initial eingesetzte Virus durch sCAR-Fc neutralisiert wird und dadurch nicht mehr in der Lage ist, die Zielzellen zu infizieren. Dafür wurden HeLa-Zellen wie oben beschrieben mit AdG12 transduziert und weitere 48 h mit bzw. ohne Dox kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und mit unterschiedlichen Dosen CVB3 wie beschrieben vorinkubiert. Danach wurde damit ein *monolayer* un behandelter HeLa-Zellen für 30 Minuten inkubiert (37°C) und anschließend der *monolayer* mit Agar-Overlay überschichtet.



**Abb. 4.3.8:** Inhibierung der zellulären CVB3-Aufnahme durch sCAR-Fc und Protektion vor Replikations-bedingter Zellyse. **(A)** HeLa-Zellen wurden mit AdG12 transduziert (moi 5) und mit oder ohne Dox (1 µg/ml) kultiviert. 48 h später wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, CVB3 (moi 0 - 10) damit preinkubiert (30 min bei 4°C) und anschließend neue HeLa-Zellen (6-Well) damit inkubiert (30 min bei 37°C). Anschließend wurden die Zellen mit Agar-Overlay überschichtet und 72 h später mit Neutralrot angefärbt. **(B)** Zellkilling-Assay; HeLa-Zellen wurden mit AdG12 transduziert (moi 5) und mit oder ohne Dox (1 µg/ml) kultiviert. 48 h später wurde die Zellen mit CVB3 (moi 0,0001 - 1) nach Preinkubation mit dem Zellkulturüberstand (30 min bei 4°C) infiziert. Die Zytotoxizität wurde durch Anfärben noch lebender Zellen mit Kristallviolett drei Tage nach der Infektion gemessen.

Die Auswertung des Zellrasens 72 h später zeigte deutlich, dass die Reduktion der viralen Replikation, wie sie unter 4.3.2.1 beobachtet wurde, auf eine effiziente Verhinderung der CVB3-Infektion der Zielzellen durch sCAR-Fc zurückzuführen war (Abb. 4.3.8\_A).

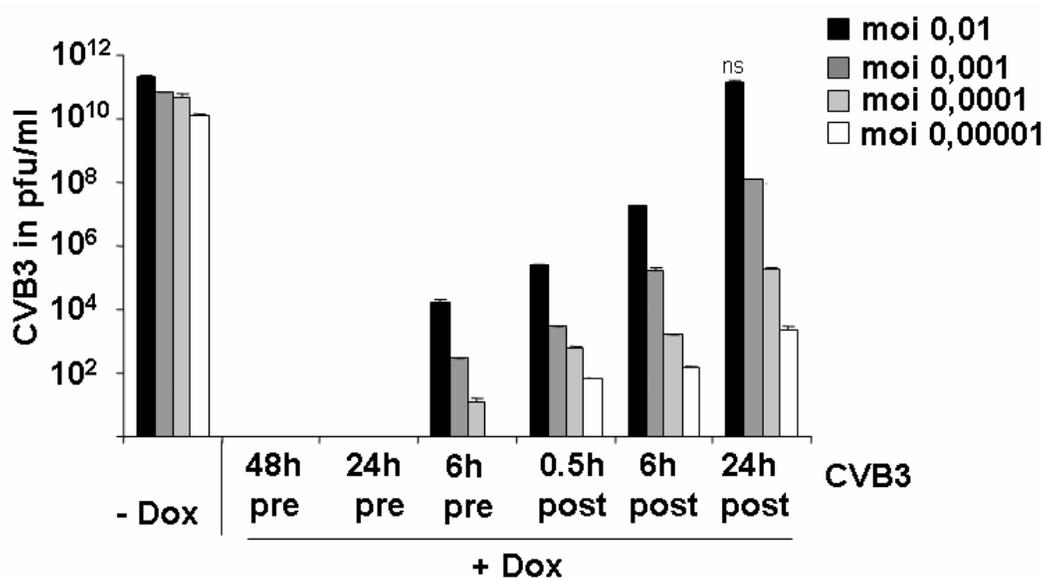
Die CVB3-Viren, die mit sCAR-Fc freiem Zellkulturüberstand (AdG12 -Dox) preinkubiert wurden, konnten ungehindert die Zielzellen infizieren und durch Replikations-bedingte Zellyse Plaques bilden. So konnten zum Beispiel bei einer moi von 0,00001, was rechnerisch 10 pfu entspricht, im Plaque-Assay 14 Plaques gezählt werden. Dagegen inhibierte der sCAR-Fc im Medium der AdG12 transduzierten Zellen +Dox, effizient die Anheftung der CVB3 Viren an die Zielzellen und verhinderte dadurch die Replikation und Bildung neuer Viruspartikel. So konnten, wie in Abbildung 4.3.8\_A gezeigt, von anfänglich 10.000 eingesetzten CVB3-Viren (moi 0,01) lediglich 4 Viren Zielzellen infizieren und Plaques bilden. Auch im Zellkilling-Assay war zu sehen, dass die Virus-induzierte Zellyse durch sCAR-Fc entweder komplett verhindert werden kann oder deutlich schwächer ist. Dafür wurden HeLa-

Zellen wie in Kapitel 4.3.2.1 behandelt und 24 h nach der CVB3-Infektion der Zellrasen mit Formalin fixiert und mittels Kristallviolett angefärbt.

Bis zu einer Dosis von moi 0,1 konnte die viral bedingte Zellyse der HeLa-Zellen durch sCAR-Fc komplett verhindert werden, während unbehandelte Zellen bereits bei einer moi von 0,0001 nach drei Tagen deutliche lytische Areale im Zellrasen aufwiesen (Abb. 4.3.8\_B). Dies korreliert mit den Daten von Kapitel 4.3.2.1, wo bis zu einer moi von 0,5 die Replikation von CVB3 durch Vektor-exprimierten sCAR-Fc effizient inhibiert werden konnte (Abb. 4.3.7).

#### 4.3.2.3 Inhibierung einer bestehenden CVB3-Infektion

Im nachfolgenden Experiment sollte untersucht werden, inwieweit eine Behandlung mit Vektor-exprimiertem sCAR-Fc eine bereits existierende CVB3-Infektion inhibieren bzw. die Ausbreitung der Infektion eindämmen kann. Dazu wurden HeLa-Zellen mit AdG12 (moi 5) transduziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten, vor und nach der CVB3-Infektion, mit Dox (1 µg/µl) inkubiert.



**Abb. 4.3.9:** Inhibierung der CVB3-Replikation durch Expression von sCAR-Fc vor und nach einer CVB3-Infektion (moi 0,00001 - 0,01). HeLa-Zellen wurden mit AdG12 (moi 5) transduziert und die Expression von sCAR-Fc durch Dox-Zugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten induziert. Die Virusreplikation wurde 48 h später mittels Plaque-Assay quantifiziert. Alle Werte im Vergleich zu unbehandelten infizierten Zellen wiesen einen p-Wert von  $p < 0,05$  auf (außer ns - nicht signifikant).

Wurde Dox 48 h bzw. 24 h vor der Infektion mit CVB3 zum Kulturmedium hinzugegeben, konnte eine komplette Inhibierung der Virusreplikation, unabhängig der eingesetzten Virusdosen festgestellt werden (Abb. 4.3.9).

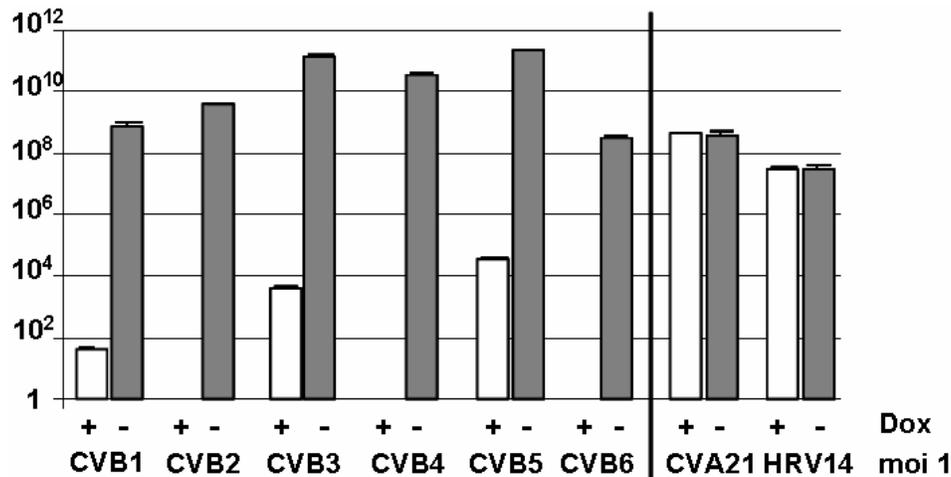
Wurde Dox 6 h vor CVB3-Infektion in das Kulturmedium der Zellen gegeben, konnte nur bei der niedrigsten CVB3-Dosis (moi 0,00001 entspricht ca. 3 pfu) eine komplette Inhibierung der Virusreplikation erreicht werden. In Abhängigkeit von der für die Infektion eingesetzten Virusdosis und des Zeitpunktes der Dox-Gabe nahm die sCAR-Fc bedingte CVB-Inhibierung ab. So konnte bei einer Dox-Gabe 6 h nach CVB3-Infektion, durch die Expression von sCAR-Fc die virale Replikation bei allen initial eingesetzten Virusdosen signifikant, im Vergleich zur Kontrolle (AdG12 -Dox) inhibiert werden, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz. Wurde das Dox erst 24 h nach der CVB3-Infektion ins Zellkulturmedium gegeben, war bei einer moi von 0,01 kein inhibitorischer Effekt mehr zu sehen, betrug allerdings bei moi 0,0001 und 0,00001 immer noch ca.  $6\log_{10}$  und bei moi 0,001  $2\log_{10}$ -Stufen.

Aus diesem Experiment lässt sich schlussfolgern, dass die Effizienz von sCAR-Fc, CVB3 zu inhibieren, einerseits von der CVB3-Konzentration abhängig ist, andererseits vom Zeitpunkt der Applikation des sCAR-Fc, im Experiment simuliert durch die zeitlich unterschiedliche Dox-Gabe. Da das CVB3-Virus in permissiven Zellen, wie z. B. HeLa-Zellen eine schnelle und hoch effektive Replikation aufweist, ist das Zeitfenster, in dem man wirkungsvoll das Vorschreiten der Infektion aufhalten kann, offensichtlich sehr klein (Pallausch and Ross R, 2007).

#### **4.3.3 Inhibierung von anderen Coxsackievirus-B-Serotypen durch sCAR-Fc**

Alle sechs Serotypen der Gruppe-B-Coxsackieviren benutzen CAR als Internalisierungsrezeptor für die Infektion von Zellen. Deshalb sollte getestet werden, wie effizient sCAR-Fc Zielzellen vor der Infektion mit anderen CVB-Serotypen schützen kann. HeLa-Zellen, die permissiv für alle CVB-Subtypen sind, wurden mit AdG12 (moi 5) transduziert, mit und ohne Dox kultiviert und 48 h später die CVB-Serotypen 1 bis 6 wie oben beschrieben mit den Zellkulturüberständen inkubiert. Nach 30 min wurde das Medium/Virus-Gemisch auf HeLa-Zellen gegeben und nach weiteren 30 min durch frisches Medium ersetzt. Die Bestimmung der Virus-Nachkommen 24 h später durch Plaque-Assay zeigte, dass alle CVB-Serotypen

durch sCAR-Fc in ihrer Replikation inhibiert werden können (Abb. 4.3.10). Dabei zeigte sich bei allen Serotypen eine ähnlich hohe Effizienz der Inhibierung von  $7\log_{10}$ - bis  $9\log_{10}$ -Stufen.



**Abb. 4.3.10:** Inhibierung der Coxsackievirusreplikation durch sCAR-Fc bei diversen CVB-Serotypen. HeLa-Zellen wurden mit AdG12 (moi 5) transduziert und mit oder ohne Dox kultiviert. 48 h später wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die CVB-Serotypen (moi 1) mit diesem für 30 min bei 4°C preinkubiert. Als Kontroll-Viren wurden CVA21 und HRV14 mitgeführt. Anschließend wurde der Virus/Zellkulturüberstand auf die HeLa-Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C (HRV14 33°C) inkubiert. Über Plaque-Assay wurde die virale Replikation in den Zellen 24 h später quantifiziert.

Wurden eine Initialdosis von 0,1 und 0,5 moi eingesetzt, konnten alle Serotypen komplett inhibiert werden (nicht gezeigt). Bei einer Dosis von moi 1 konnte weiterhin bei CVB2, CVB4 und CVB6 die Infektion und damit verbunden die Replikation vollständig inhibiert werden, während bei CVB1, CVB3 und CVB5 geringe Mengen an Virusnachkommen gemessen wurden.

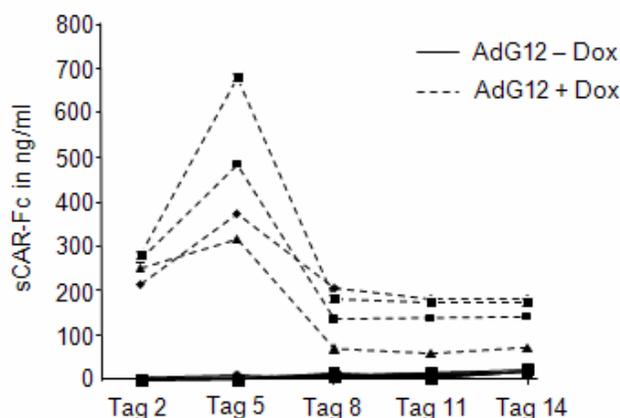
CVA21 und HRV14, die CAR-unabhängig Zellen infizieren, wurde durch sCAR-Fc nicht inhibiert. Dies zeigt, dass sCAR-Fc hocheffektiv und spezifisch die Replikation von allen Coxsackieviren der Gruppe B inhibieren kann.

### 4.3.4 Inhibierung der CVB3-Infektion durch Vektor-exprimierten sCAR-Fc im CVB3-Myokardits-Mausmodell

#### 4.3.4.1 Expressionskinetik von sCAR-Fc *in vivo*

Bevor der antivirale Effekt von sCAR-Fc gegen CVB3-Infektionen im Myokarditis-Mausmodell untersucht wurde, sollte als erstes die sCAR-Fc Expressions-kinetik *in vivo* getestet werden.

Dafür wurden 6 Wochen alte Balb/c-Mäuse mit  $3 \times 10^{10}$  pt AdG12 via Jugularis-veneninjektion transduziert und während eines 14-tägigen Untersuchungszeitraumes die sCAR-Fc Konzentration im Blut gemessen.



**Abb. 4.3.11:** Serumlevel von sCAR-Fc in Mäusen, transduziert mit AdG12. Balb/c-Mäusen (n=8) wurde AdG12 ( $3 \times 10^{10}$  pt) intravenös (V. jugularis) appliziert. Die Expression von sCAR-Fc wurde bei vier Mäusen mit Dox (200 µg/ml) über das Trinkwasser induziert. Das Expressionslevel von sCAR-Fc im Serum wurde mittels ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen.

Bereits zwei Tage nach AdG12 Transduktion konnte in dem Serum der Mäuse, denen Dox in das Trinkwasser gegeben wurde, eine hohe Expression von sCAR-Fc ( $254 \pm 29$  ng/ml) gemessen werden, die bis zu Tag 5 noch weiter anstieg ( $464 \pm 159$  ng/ml). Danach nahm die Konzentration bis zum Tag 8 ab ( $147 \pm 60$  ng/ml), blieb dann aber bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes stabil (Tag 14:  $141 \pm 51$  ng/ml). Im Serum der Tiere, die kein Dox über das Trinkwasser bekamen, konnte während der gesamten Untersuchungszeit kein sCAR-Fc gemessen werden. Dies bestätigte auch *in vivo*, die sehr gute Regulierbarkeit der sCAR-Fc Expression durch AdG12 ohne messbare Basalaktivität.

#### 4.3.4.2 Inhibierung der CVB3-Infektion durch Vektor-exprimierten sCAR-Fc im CVB3-Myokarditis-Mausmodell - protektiver Ansatz

Basierend auf den sCAR-Fc Expressionsdaten *in vivo* wurde ein experimentelles Modell entwickelt, um die Effizienz von AdG12 exprimiertem sCAR-Fc bei der Behandlung von CVB3-Myokarditis in der Maus zu untersuchen.



Gruppe	i.v. Applikation	H <sub>2</sub> O, 5% Succrose	CVB3
sham; n=6	PBS	- Dox	-
AdG12 +Dox; n=6	AdG12 1x10 <sup>10</sup> pt	+ Dox	5x10 <sup>4</sup> pfu
AdG12 -Dox; n=6	AdG12 1x10 <sup>10</sup> pt	- Dox	5x10 <sup>4</sup> pfu
sham +Dox; n=6	PBS	+ Dox	5x10 <sup>4</sup> pfu

**Abbildung 4.3.12:** Inhibierung der CVB3-Replikation durch protektive Expression von sCAR-Fc *in vivo*. Balb/c-Mäuse wurden mit AdG12 (1x10<sup>10</sup> pt) via Jugularisvenen-Injektion transduziert und mit bzw. ohne Dox im Trinkwasser (200 µg/ml) gehalten. CVB3-Infektion (5x10<sup>4</sup> pfu) i.p. erfolgte 48 Stunden nach AdG12 Transduktion. Sieben Tage später wurden die hämodynamischen Messungen vorgenommen, die Tiere getötet und anschließend histologisch und virologisch ausgewertet (n entspricht der Anzahl der Versuchstiere).

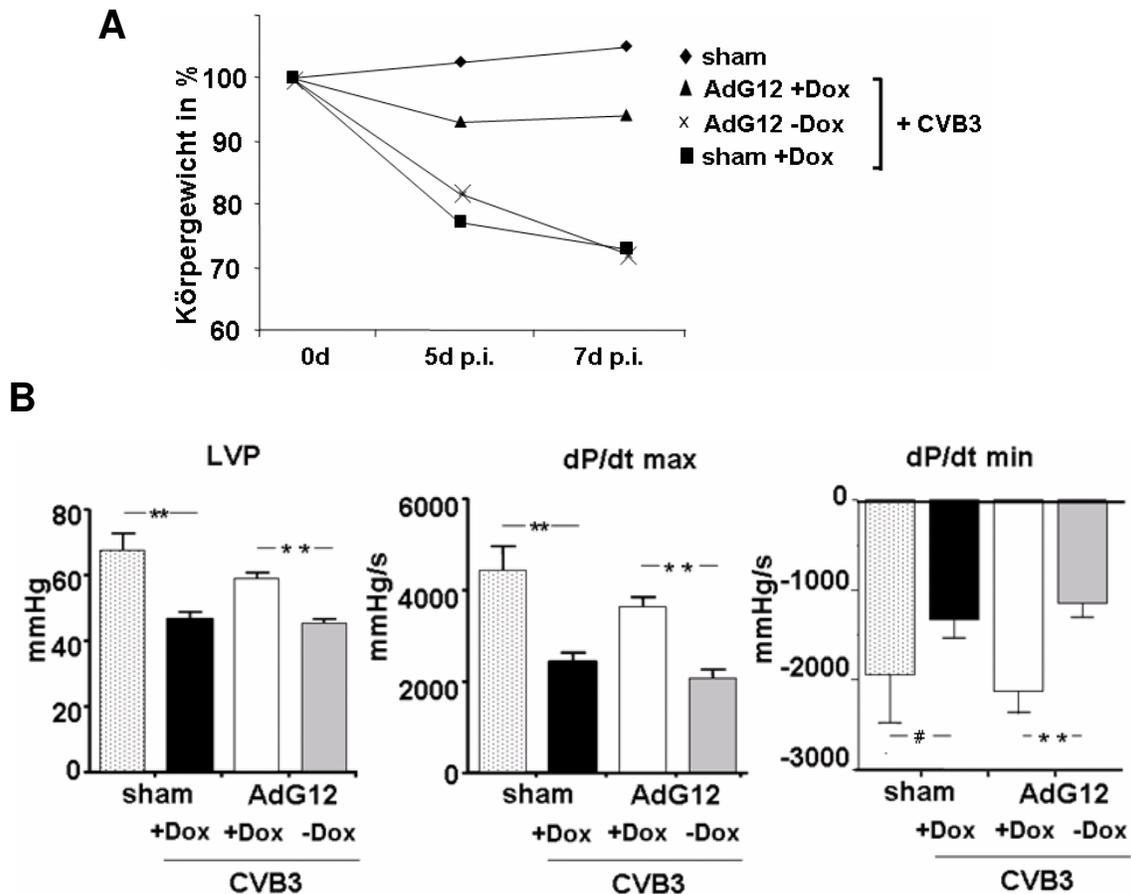
Sechs Wochen alte Balb/c-Mäuse wurden 2 Tage vor der CVB3-Infektion mit AdG12 (1x10<sup>10</sup> pt) transduziert und entweder ohne Dox oder mit Dox (200 µg/ml) im Trinkwasser gehalten. Sieben Tage nach der CVB3-Infektion wurde der Grad der Myokarditis untersucht (Abb. 4.3.12).

In Unterschied zu den sCAR-Fc Expressionsanalysen (Kapitel 4.3.4.1) wurde in diesem Experiment die Menge des AdG12 auf 1x10<sup>10</sup> pt/Maus reduziert. Dies

entspricht einer Vektordosis, die gewichtsbezogen auch bei einem therapeutischen Ansatz im Menschen einsetzbar ist. Zum Zeitpunkt der CVB3-Infektion, zwei Tage nach der Applikation von AdG12, wurde zur Kontrolle das sCAR-Fc-Level im Serum gemessen. Trotz erniedrigter Vektordosis konnte eine hohe Expression ( $\bar{\emptyset}$  228 ng/ $\mu$ l) von sCAR-Fc in den Mäusen detektiert werden, denen Dox oral zugegeben worden war. Somit konnte auch bei der erniedrigten Vektordosis eine Menge von sCAR-Fc im Serum der Mäuse gemessen werden (100 ng/ml), bei der bereits eine therapeutische Wirkung *in vivo* beschrieben wurde (Lim et al., 2006). Am Tag 7 nach der CVB3-Infektion, an dem das Experiment beendet wurde, betrug die Konzentration von sCAR-Fc im Blut der Mäuse immer noch  $\bar{\emptyset}$  100 ng/ml. Wie bereits bei dem vorhergehenden Experiment konnte bei den Mäusen, die ohne Dox gehalten wurden, kein sCAR-Fc im Serum nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Während des siebentägigen Untersuchungszeitraumes nach der CVB3-Infektion wurde das Gewicht der Mäuse kontrolliert. Dabei konnte sowohl bei unbehandelten, infizierten Tieren (sham +Dox), als auch bei den Tieren, die mit AdG12 transduziert wurden, aber keine Dox bekamen (AdG12 -Dox), eine starke Reduktion des Körpergewichtes bis zu 30 % festgestellt werden, als Konsequenz der systemischen Infektion durch CVB3 (Abb. 4.3.13\_A). Dagegen nahmen die sCAR-Fc exprimierenden Mäuse (AdG12 +Dox) nur minimal ab (5 %). Das Gewicht nicht infizierter, unbehandelter Tiere nahm geringfügig zu.

Die Hämodynamikmessung am Tag 7 nach der CVB3-Infektion zeigten eine starke Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion (LV) bei unbehandelten, infizierten Tieren (sham +Dox) im Vergleich zu nicht infizierten Tieren (sham). Dies äußerte sich in einer Abschwächung der systolischen Kontraktilität ( $dP/dt_{max}$  2.428  $\pm$  490 vs. 4.429  $\pm$  1.287 mmHg/s,  $p < 0,01$ ; LVP 47  $\pm$  6 vs. 68  $\pm$  13 mmHg/s,  $p < 0,01$ ), aber auch in einer Verschlechterung der diastolischen Relaxation des Herzmuskels ( $dP/dt_{min}$  - 1.331  $\pm$  437 vs. -2.117  $\pm$  713 mmHg/s,  $p > 0,05$ ).

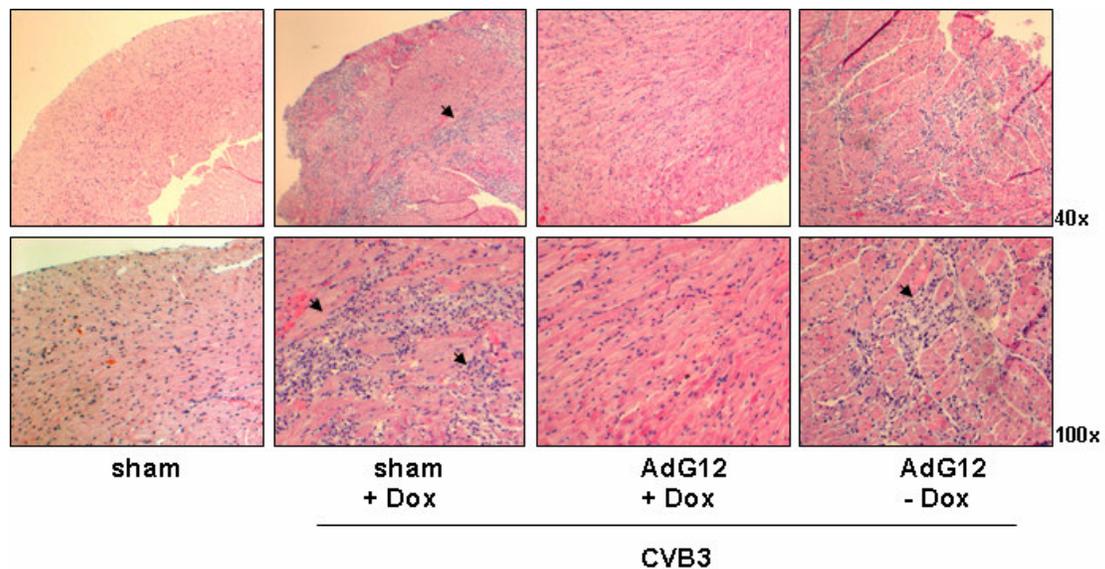


**Abb. 4.3.13:** Effekt von sCAR-Fc auf CVB3-Infektion der Maus. Balb/c-Mäusen wurde via Jugularisvenen-Injektion AdG12 ( $1 \times 10^{10}$  pt) appliziert, diese mit oder ohne Dox gehalten und 2 Tage nach Applikation i.p. mit CVB3 ( $5 \times 10^4$  pfu) infiziert. Während der 7-tägigen Untersuchungsperiode nach der CVB3-Infektion wurde das Gewicht der Mäuse überprüft (**A**). Als Kontrolle dienten untransduzierte, CVB3 infizierte Mäuse (sham +Dox) und unbehandelte, uninfizierte Mäuse (sham). (**B**) 7 Tage nach Infektion wurden mittels Katheter die Parameter der linksventrikulären Funktion, wie Kontraktilität (LVP,  $dP/dt_{max}$ ) und Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) bestimmt und mit den Kontrollgruppen verglichen (# $p > 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Bei den behandelten Mäusen (AdG12 +Dox) wurde dagegen eine signifikante Verbesserung der kardialen Dysfunktionen im Vergleich zu AdG12 -Dox behandelten Tieren ( $dP/dt_{max}$ :  $3.645 \pm 443$  vs.  $2.057 \pm 490$  mmHg/s,  $p < 0,01$ ; LVP:  $59 \pm 4$  vs.  $45 \pm 3$  mmHg/s,  $p < 0,01$ ;  $dP/dt_{min}$ :  $-2.125 \pm 330$  vs.  $-1.310 \pm 330$  mmHg/s,  $p < 0,01$ ) und CVB3 infizierten Kontrollmäusen ( $dP/dt_{max}$ :  $3.645 \pm 443$  vs.  $2.428 \pm 490$  mmHg/s,  $p < 0,01$ ; LVP:  $59 \pm 4$  vs.  $46 \pm 6$  mmHg/s,  $p < 0,01$ ;  $dP/dt_{min}$ :  $-2.125 \pm 330$  vs.  $-1.330 \pm 437$  mmHg/s,  $p < 0,01$ ) gemessen. Dabei wurden die systolischen und diastolischen Parameter bis auf das Level nicht infizierter Mäuse (sham) verbessert (Abb. 4.3.13\_B).

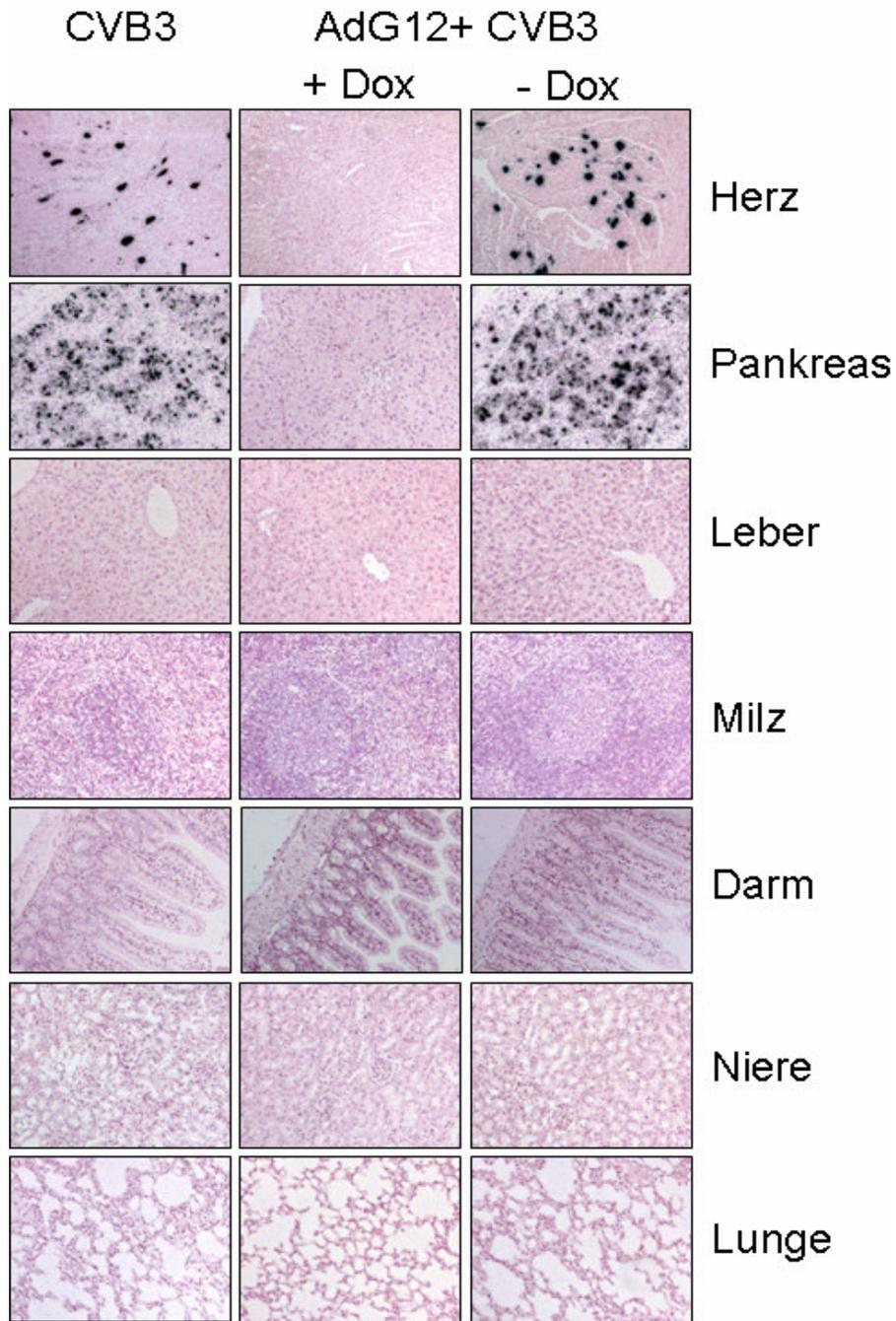
Immunhistochemische Analysen bestätigten die hohe Effizienz des sCAR-Fc bei der Inhibierung der CVB3 induzierten Inflammation im Herzen (Abb. 4.3.14).

Sowohl die untransduzierten, infizierten Mäuse (sham +Dox) als auch die Mäuse der Kontrollgruppe (AdG12 -Dox) zeigten eine hohe Infiltration immunologischer Zellen im Myokardgewebe (Abb. 4.3.14). Dies war begleitet von einer ausgeprägten Nekrose von Kardiomyozyten. In den infizierten Mäusen, die sCAR-Fc exprimierten (AdG12 +Dox) konnte hingegen keine Inflammation beobachtet werden, womit das Herzgewebe dem von nicht infizierten Mäusen (sham) ähnelte. Es konnte ebenfalls keine viral verursachte Gewebeschädigung in den sCAR-Fc exprimierenden Tieren (AdG12 +Dox) festgestellt werden.



**Abb. 4.3.14:** Effekt von sCAR-Fc auf CVB3-induzierte kardiale Inflammation *in vivo*. Experimentelles Design siehe Abb. 4.3.12. Die histologischen Untersuchungen der Herzen erfolgten am Tag 7 nach CVB3 Infektion. Ventrikuläres Herzgewebe wurde in 4%igem Formalin fixiert, in Parafin eingebettet und 4 µm große Schnitte angefertigt, die mit Haemotoxin/Eosin angefärbt wurden. Die Pfeile markieren Infiltrate von Immunzellen (lila) und nekrotisches Gewebe bzw. lysierte Kardiomyozyten (normale Kardiomyozyten = rosa) Vergr.: obere Bilder 40x, untere Bilder 100x.

In Übereinstimmung mit den histologischen Daten konnte in Mäusen, welche mit AdG12 und Dox behandelt und mit CVB3 infiziert wurden (AdG12 +Dox), keine CVB3-RNA im Herzgewebe detektiert werden. In den untransduzierten Mäusen (sham) bzw. den Mäusen der Kontrollgruppe (AdG12 -Dox) konnte dagegen mittels *in situ*-Hybridisierung in einer Vielzahl von Zellen CVB3-RNA nachgewiesen werden, was nicht nur auf eine Infektion, sondern auch auf aktive Virusreplikation hinweist (Abb. 4.3.15).



**Abb. 4.3.15:** Inhibierung der CVB3-Infektion im Herzen durch sCAR-Fc. Experimentelles Design siehe oben. Detektion von CVB3-RNA in Maus-Herzen am Tag 7 p.i. Ventrikuläres Herzgewebe wurde in 4%igem Formalin fixiert, in Parafin eingebettet und 4 µm große Schnitte angefertigt. Die Detektion des CVB3-Genoms erfolgte mittels *in situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden, spezifisch gegen das (+)-Strang-RNA-Genom. Vergrößerung: 100x.

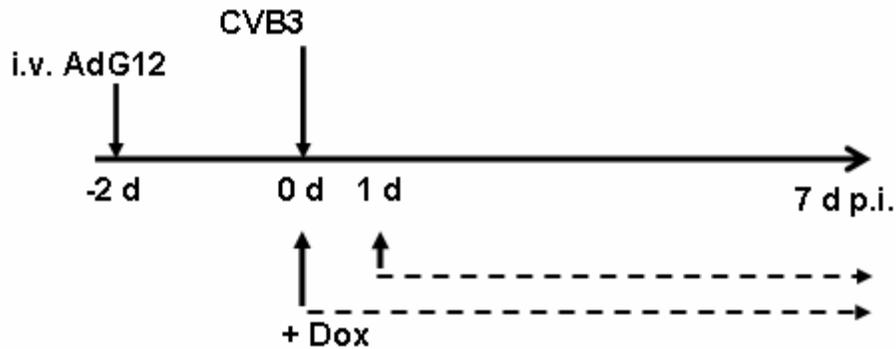
Nicht nur das Herz wurde durch AdG12 exprimierten sCAR-Fc, vor der Infektion durch CVB3 geschützt, sondern auch der Pankreas. So hat sCAR-Fc nicht nur einen protektiven Effekt auf die CVB3-induzierte Entzündung des Herzens, sondern auch

auf viral verursachte Pankreatitis. In anderen untersuchten Geweben konnte weder in unbehandelten noch in sCAR-Fc exprimierenden Mäusen CVB3-RNA mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in AdG12 transduzierten Mäusen durch Zugabe von Dox sCAR-Fc in hohen Dosen exprimiert werden. Dieses sCAR-Fc inhibierte effizient die systemische Ausbreitung von CVB3 und dadurch die Infektion des Herzens. Weiterhin wurde die viral induzierte Inflammation im Myokard komplett inhibiert. Sowohl der Allgemeinzustand (Verhalten, Gewicht) als auch die hämodynamischen Parameter glichen denen nicht-infizierter Tiere. Die Kontrollgruppen zeigten dagegen alle Merkmale einer schweren akuten Myokarditis mit hoher Viruspräsenz im Herzen, starker Inflammation und dadurch verursachter Verschlechterung der kardialen Pumpleistung.

#### 4.3.4.3 *Inhibierung der CVB3-Infektion durch Vektor-exprimierten sCAR-Fc im CVB3-Myokarditis-Mausmodell - therapeutischer Ansatz*

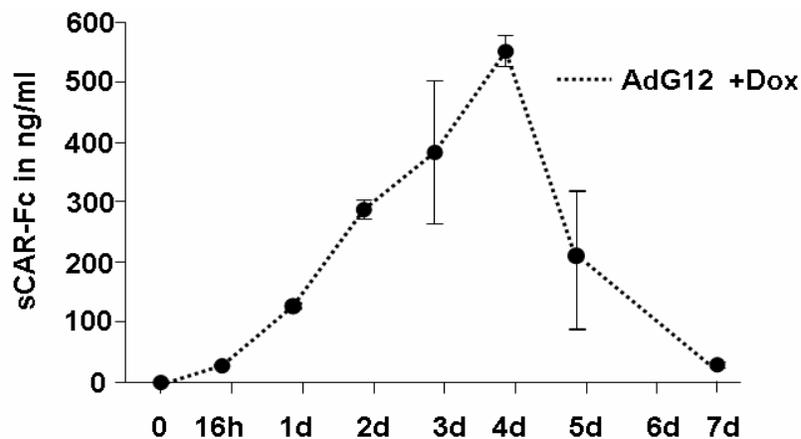
Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine protektive Behandlung mit AdG12 exprimierten sCAR-Fc eine CVB3-Infektion im Herzen effizient verhindert und dadurch die Mäuse vor kardialer Inflammation und hämodynamischer Dysfunktion schützt, sollte in einem nachfolgenden Versuchsansatz die antivirale Wirksamkeit bei therapeutischer Anwendung untersucht werden. Dafür wurden Balb/c-Mäuse, wie bei dem protektiven Ansatz mit AdG12 ( $1 \times 10^{10}$  pt), zwei Tage vor CVB3-Infektion transduziert. Die Induzierung der sCAR-Fc-Expression durch Dox erfolgte jedoch erst zwei Tage später, zeitgleich mit der CVB3-Infektion (AdG12 +Dox 0d) bzw. 24 h nach der CVB3-Infektion (AdG12 +Dox 1d) (Abb. 4.3.16). Die Auswertung erfolgte, wie in dem vorhergehenden Experiment 7 Tage nach der CVB3-Infektion.



Gruppe	i.v. Applikation	H <sub>2</sub> O, 5% Succrose	CVB3
sham; n=7	PBS	- Dox	-
AdG12 +Dox 0d; n=5	AdG12 $1 \times 10^{10}$ pt	+ Dox zeitgleich mit CVB3-Infektion	$5 \times 10^4$ pfu
AdG12 +Dox 1d; n=7	AdG12 $1 \times 10^{10}$ pt	+ Dox 24 h nach CVB3-Infektion	$5 \times 10^4$ pfu
AdG12 <sub>trunk</sub> -Dox; n=7	AdG12 <sub>trunk</sub> $1 \times 10^{10}$ pt	- Dox	$5 \times 10^4$ pfu
sham +Dox; n=4	PBS	+ Dox	$5 \times 10^4$ pfu

**Abb. 4.3.16:** Inhibierung der CVB3-Replikation durch sCAR-Fc *in vivo*. Balb/c-Mäuse wurden mit AdG12 ( $1 \times 10^{10}$  pt) via i.v. Applikation, 2 Tage vor CVB3-Infektion transduziert. Die Expression von sCAR-Fc wurde zeitgleich mit der CVB3-Infektion (0d) oder 24 h später (1d) durch Dox im Trinkwasser (200 ng/ml) induziert. CVB3-Infektion ( $5 \times 10^4$  pfu) i.p. 48 h nach AdG12-Transduktion. Die Tiere wurden 7 Tage nach CVB3-Infektion analysiert (n entspricht der Anzahl der Mäuse).

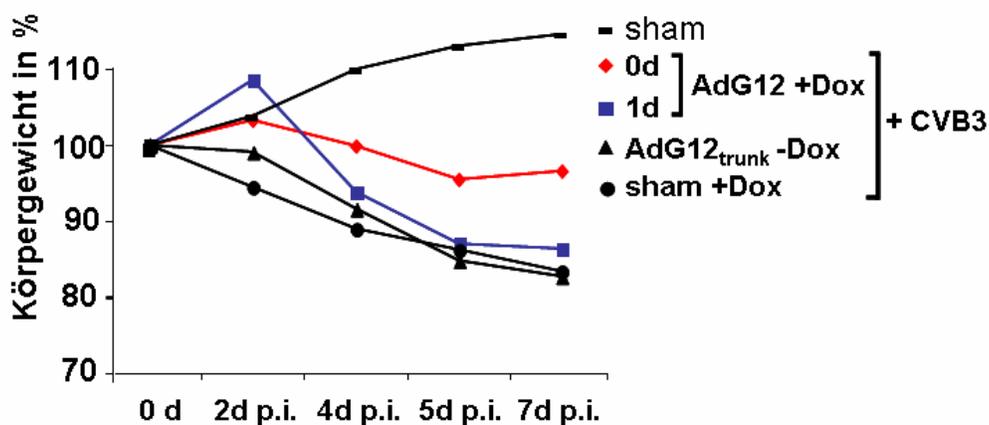
Des Weiteren wurde parallel die Expression von sCAR-Fc und Abgabe ins Serum im Rahmen des therapeutischen Versuchsansatzes mittels ELISA gemessen. Bis zum Zeitpunkt der Dox-Gabe konnte keine sCAR-Fc im Serum der Tiere gemessen werden.



**Abb. 4.3.17:** Serumlevel von sCAR-Fc in AdG12 transduzierten Mäusen. BALB/c Mäuse wurde AdG12 ( $1 \times 10^{10}$  pt) intravenös injiziert. Die sCAR-Fc-Expression erfolgte durch Dox-Gabe über das Trinkwasser (200 ng/ml) 48 h nach AdG12-Transduktion. Die sCAR-Fc-Menge im Serum wurde mittels ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Anzahl der Mäuse, n=3.

Nach Dox-Gabe über das Trinkwasser wurde 16 h später das erste Mal Blut abgenommen und ein durchschnittlicher sCAR-Fc Wert von 28,4 ng/ml gemessen. Dieser stieg rasch an, so dass bereits 24 h nach Induktion, ein Level von über 100 ng/ml (128,6 ng/ml) gemessen wurde (Abb. 4.3.17). Im weiteren Verlauf verhielt sich die sCAR-Fc Konzentration im Blut der transduzierten Mäuse wie in den vorhergehenden Experimenten, sank am Tag 7 jedoch unter 100 ng/ml.

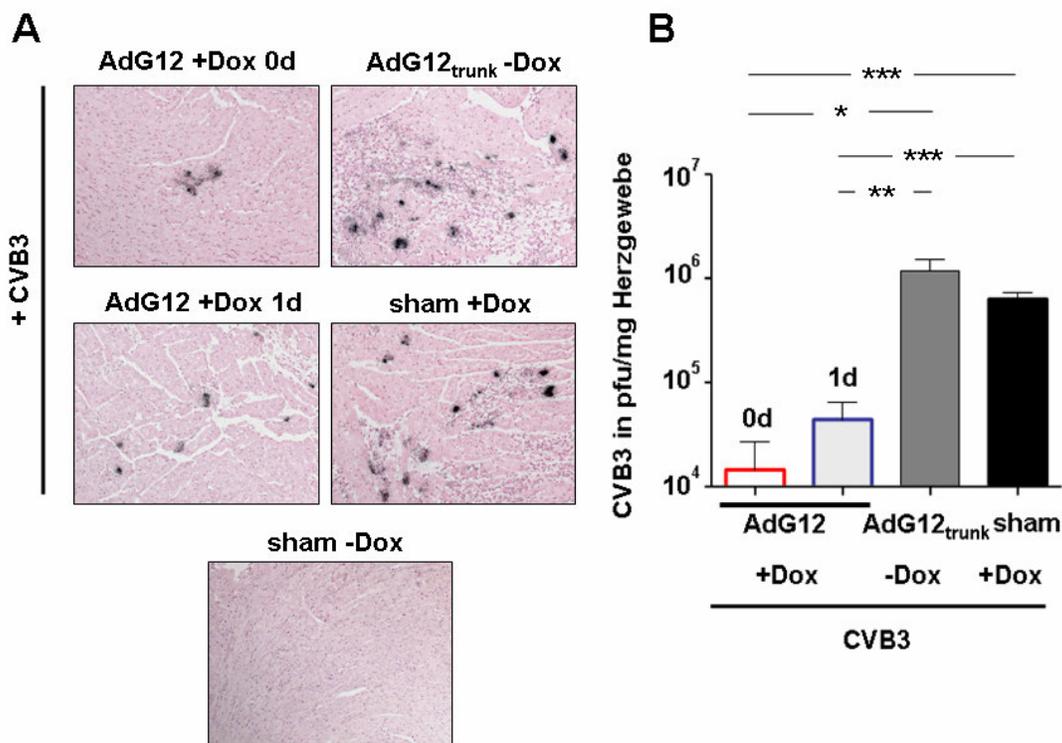
Während des 7-tägigen Untersuchungszeitraumes nach der CVB3-Infektion sank, wie auch im protektiven Ansatz, das Körpergewicht der infizierten Mäuse, während die nicht infizierten Kontrollmäuse (sham) zunahmen (Abb. 4.3.18). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Mäuse, die Dox zeitgleich mit der CVB3-Infektion bekommen haben, im Verlauf des Beobachtungszeitraumes weniger stark Gewicht verloren, als untransduzierte, infizierte Kontrolltiere (sham +Dox) und Tiere, denen der Kontrollvektor AdG12<sub>trunk</sub> appliziert wurde, der eine trunkierte sCAR-Fc-Variante exprimiert (Abb. 4.3.18).



**Abb. 4.3.18:** Effekt von sCAR-Fc auf CVB3-Myokarditis in der Maus. Balb/c-Mäusen wurde via Jugularisvenen-Injektion AdG12 ( $1 \times 10^{10}$  pt) appliziert. Die Expression von sCAR-Fc wurde zeitgleich oder 24 h nach der CVB3-Infektion ( $5 \times 10^4$  pfu) mittels Dox-Gabe induziert. Während der 7-tägigen Untersuchungsperiode nach der CVB3-Infektion wurde das Gewicht der Mäuse überprüft. Als Kontrolle dienten untransduzierte, CVB3-infizierte Mäuse (sham +Dox), mit Kontrollvektor transduzierte, infizierte Tiere (AdG12<sub>trunk</sub> -Dox) und unbehandelte, uninfizierte Mäuse (sham).

Auch die Mäuse, bei denen erst 24 h nach CVB3-Infektion die Expression von sCAR-Fc über Dox induziert wurde (AG12 +Dox 1d), zeigten eine Reduktion des Gewichtes, ähnlich den unbehandelten Kontrolltieren.

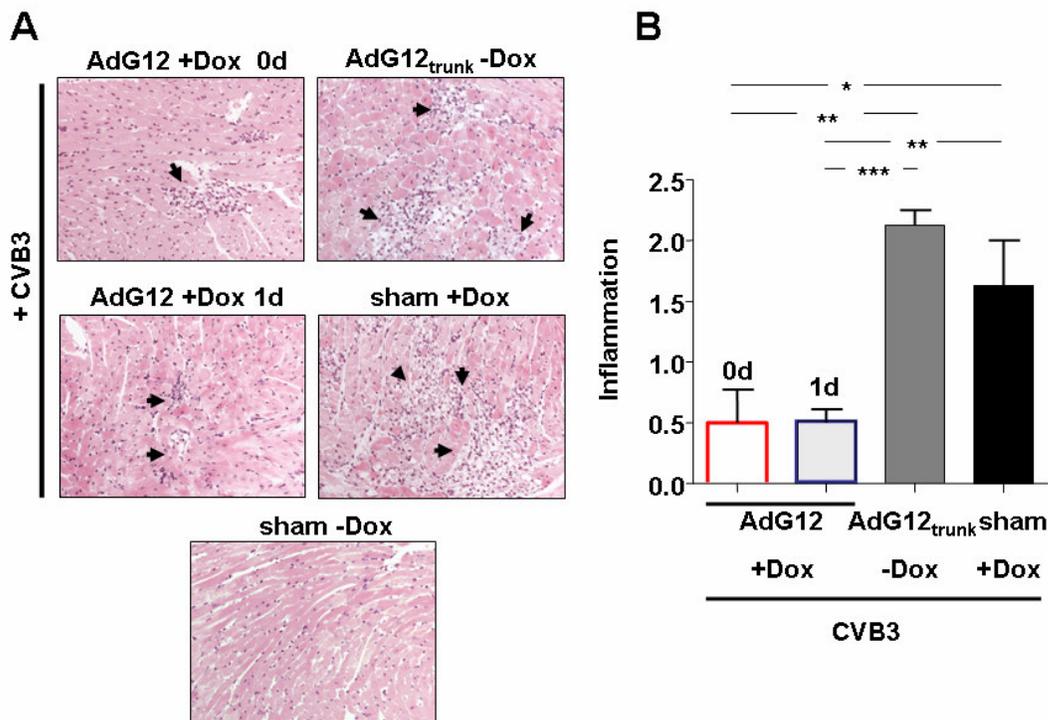
*In situ*-Hybridisierung und Analysen mittels Plaque-Assay zeigten, dass sCAR-Fc in einer therapeutischen Anwendung in der Lage ist eine kardiale Infektion durch CVB3 effizient zu inhibieren (Abb. 4.3.19). Sowohl, die untransduzierten, infizierten Mäuse (sham -Dox), als auch die Mäuse der Kontrollgruppe (AdG12<sub>trunk</sub> -Dox) zeigten eine große Präsenz von CVB3-RNA im Herzen. In den Gewebeschnitten der behandelten Gruppen wurde zwar auch virales (+)-RNA-Genom detektiert, aber in wesentlich geringerem Ausmaß. Weiterhin zeigte die *in situ*-Hybridisierung, dass in den Mäusen, in denen die sCAR-Fc Expression zeitgleich mit der CVB3-Infektion induziert wurde, die geringsten Mengen an CVB3-RNA gefunden wurde (Abb. 4.3.19\_A).



**Abb. 4.3.19:** Inhibierung der CVB3-Infektion im Herzen durch sCAR-Fc. Experimentelles Design siehe oben. Detektion von CVB3-RNA in Maus-Hezen am Tag 7 p.i. **(A)** Ventrikuläres Herzgewebe wurde in 4%igem Formalin fixiert, in Parafin eingebettet und 4 µm große Schnitte angefertigt. Die Detektion des CVB3-Genom erfolgte mittels *in situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden, spezifisch gegen das (+)-Strang-RNA-Genom. Vergrößerung: 100x. **(B)** Bestimmung der CVB3-Menge im Herz. Herzgewebe wurde homogenisiert und die Menge infektiöser Viruspartikel mittels Plaque-Assay bestimmt (\*=p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Dies korrelierte mit den Plaque-Assays, mit denen infektiöses CVB3 im Herzgewebe nachgewiesen wurde. Die effizienteste Inhibierung der viralen Replikation konnte auch dabei in der AdG12 +Dox 1d-Gruppe beobachtet werden und betrug im Vergleich zur Vektorkontrollgruppe (AdG12<sub>trunk</sub> -Dox) 2log<sub>10</sub>-Stufen (Abb. 4.3.19\_B).

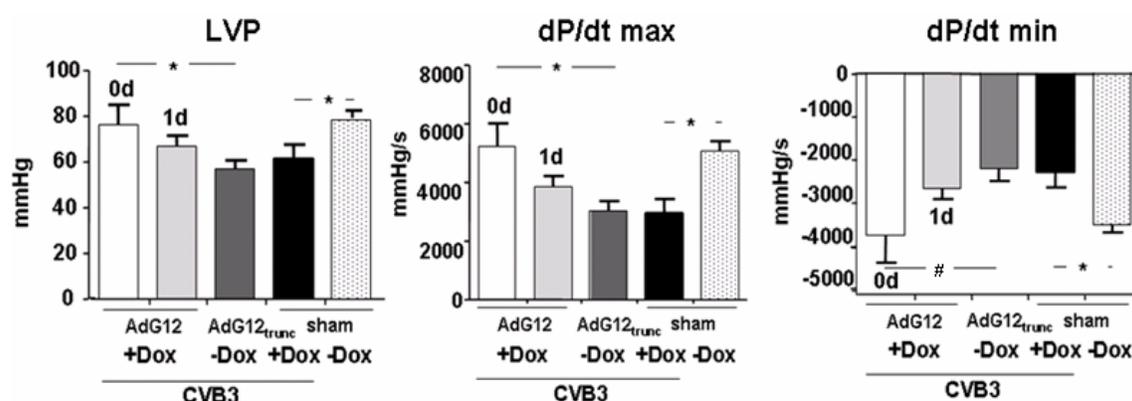
In Korrelation mit der Inhibierung der Virusinfektion und viralen Replikation im Herzen durch sCAR-Fc wurde eine Verringerung der Inflammation beobachtet. Quantitative Auswertungen von H&E-Färbungen der Herzschnitte zeigten eine Inflamationsstärke bei unbehandelten, infizierten Tieren von 2 (Abb. 4.3.20\_B). Dabei konnten, ebenso wie in der Vektorkontrollgruppe (AdG12<sub>trunk</sub> -Dox), große Areale von infiltrierenden Immunzellen im Herzgewebe der unbehandelten Tiere beobachtet werden (Abb. 4.3.20\_A).



**Abb. 4.3.20:** Effekt von sCAR-Fc auf CVB3-verursachte kardiale Inflammation *in vivo*. Experimentelles Design siehe oben. Histologische Untersuchung der Maus-Hezen am Tag 7 nach CVB3-Infektion. Ventrikuläres Herzgewebe wurde in 4 % Formalin fixiert, in Parafin eingebettet und 4 µm große Schnitte angefertigt, die anschließend H&E gefärbt wurden. Für die Quantifizierung der Inflammation wurde eine Skala von 0 - 4 festgelegt: 0 = keine Infiltrate; 1 = kleine fokale Ansammlung von infiltrierenden Zellen zwischen Myozyten; 2 = größere Foki > 100 infiltrierende Zellen; 3 = < 10% des Gewebeschnittes von Inflammation betroffen; 4 = 10 - 30% des Gewebeschnittes von Inflammation betroffen (Szalay et al., 2006) \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$

In den Tieren, die sCAR-Fc exprimierten, betrug die Inflammationstärke 0,5 und die Gewebeschnitte zeigten einzelne Areale mit wenigen infiltrierenden Zellen (Abb. 4.3.20). Dabei schien es keinen Unterschied zu machen, ob die Induktion der sCAR-Fc durch Dox-Gabe zeitgleich mit der CVB3-Infektion (AdG12 +Dox 0d) oder 24 h (AdG12 +Dox 1d) später erfolgte.

Wie auch im protektiven Ansatz zeigte die Hämodynamikmessung am Tag 7 nach der CVB3-Infektion eine Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion als Symptom der Kardiomyopathie bei infizierten Tieren mit dem Kontrollvektor (AdG12<sub>trunc</sub> -Dox) im Vergleich zu nicht infizierten Tieren (sham) (Abb. 4.3.21). Dies äußerte sich in einer Abschwächung der systolischen Kontraktilität ( $dP/dt_{max}$ :  $3.012 \pm 918$  vs.  $5.076 \pm 854$  mmHg/s,  $p < 0,01$ ; LVP:  $57 \pm 10$  vs.  $79 \pm 8$  mmHg,  $p < 0,01$ ), aber auch in einer Verschlechterung der diastolischen Relaxation des Herzmuskels ( $dP/dt_{min}$ :  $-2.212 \pm 745$  vs.  $-3.506 \pm 472$  mmHg/s,  $p < 0,05$ ).



**Abb. 4.3.21:** Inhibition der CVB3-Infektion im Herzen durch sCAR-Fc. Experimentelles Design siehe oben. 7 Tage nach Infektion wurden mittels Katheter die Parameter der linksventrikulären Funktion, wie Kontraktilität (LVP,  $dP/dt_{max}$ ) und Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) bestimmt und mit den Kontrollgruppen verglichen (\*= $p < 0,05$ ; #= $p > 0,05$ ).

Wurde die Expression von sCAR-Fc zeitgleich mit der CVB3-Infektion gestartet (AdG12 +Dox 0d), konnte im Vergleich zur Vektorkontrollgruppe (AdG12<sub>trunc</sub> -Dox) eine signifikante Verbesserung der ventrikulären Kontraktilität ( $dP/dt_{max}$ :  $5.214 \pm 1786$  vs.  $3.012 \pm 918$  mmHg/s  $p < 0,05$ ; LVP:  $76,4 \pm 19$  vs.  $57 \pm 10$  mmHg,  $p < 0,05$ ) und diastolischen Relaxation ( $dP/dt_{min}$ :  $-3.757 \pm 1.418$  vs.  $-2.212 \pm 746$  mmHg/s  $p = 0,07$ ) gemessen werden. Wurde die Expression des sCAR-Fc erst 24 h nach CVB3-Infektion gestartet, konnte jedoch keine signifikante Verbesserung der kardialen Pumpfunktion gemessen werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass auch in einem therapeutischen Modell durch Dox-induzierte Expression von sCAR-Fc nach einer CVB3-Infektion, die systemische Ausbreitung von CVB3 und dadurch resultierend die Infektion des

Herzens wirksam inhibiert werden konnte. Allerdings zeigte sich, dass die Effizienz der CVB3-Inhibierung geringer ist als im protektiven Modell und an Effektivität verliert, je später die sCAR-Fc Expression durch Dox induziert wird. Sowohl der Allgemeinzustand (Verhalten, Gewicht) als auch die hämodynamischen Parameter zeigten eine signifikante Verbesserung, wenn die sCAR-Fc Expression zeitgleich mit der CVB3-Infektion induziert wurde. Die infizierten Kontrollgruppen zeigten dagegen eine starke Viruspräsenz im Herzen, zahlreiche Inflammationsherde im Herzgewebe und eine Verschlechterung der kardialen Pumpleistung.

## 5 Diskussion

Die Myokarditis ist eine häufig vorkommende entzündliche Erkrankung des Myokards mit unterschiedlicher klinischer Ausprägung. Sie kann durch idiopathische, autoimmune und vor allem infektiöse Agenzien ausgelöst werden (D'Ambrosio et al., 2001). Besonders Enteroviren und speziell Coxsackieviren der Gruppe B (CVB) können eine akute Myokarditis hervorrufen und stehen ebenfalls im Verdacht ein auslösendes Pathogen bei Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) zu sein (Knowlton and Badorff, 1999). Diese ist gekennzeichnet durch auffällige Strukturveränderungen des Herzmuskels (Dilatation) und fortschreitender Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion bis hin zur Herzinsuffizienz (Pauschinger et al., 1999c; Felker et al., 2000).

Bei viral verursachter Myokarditis infiziert das Virus vor allem Kardiomyozyten und führt so replikationsbedingt zu deren Lyse (Kandolf et al., 1985; Yajima et al., 2006). Reaktiv kommt es zur Infiltration von leuko- bzw. lymphozytären Entzündungszellen (Kawai, 1999). Während im akuten Verlauf das Virus aus dem Herzen eliminiert wird und die Inflammation abklingt, kommt es im chronischen Verlauf zu einer fortlaufenden Inflammation und Strukturveränderungen des Herzens, bedingt durch Fibrose und interstitielles Remodeling (Kawai, 1999; Pauschinger et al., 2002). Klinisch manifestiert sich die DCM in der Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion bis hin zur Herzinsuffizienz, dem Unvermögen des Herzens, die vom Körper benötigte Leistung zu erbringen (Kuhl et al., 2005c).

Neben der klassischen Herzinsuffizienztherapie, die vor allem die Herzaktivität unterstützen soll (körperliche Schonung, ACE-Inhibitoren, ggf. Diuretika und Betablocker), und einer immunsuppressiven Therapie (Azathioprin und Prednisolon) bei fortlaufender Immunreaktion trotz Viruselimination (autoreaktive inflammatorische Kardiomyopathie) gibt es bis zum heutigen Tag keine die Ursache bekämpfende klinisch angewandte Therapieform (Pauschinger et al., 2004).

Infolge der großen klinischen Relevanz ist das Finden neuer kausaler Therapiestrategien deshalb von eminenter Bedeutung (Pauschinger et al., 2004; Richardson et al., 1996). Molekulare und gentherapeutische Verfahren besitzen dahingehend ein großes Potenzial, da sie gezielt gegen definierte molekulare Strukturen vorgehen und somit die Spezifität und Effizienz bedeutend erhöhen können.

Im Hinblick darauf wurden in dieser Arbeit drei verschiedene gentherapeutische Strategien hinsichtlich ihrer Effizienz und Sicherheit *in vitro* und *in vivo* untersucht und miteinander verglichen. Ziel war es, die Infektion kardialer Zellen durch CVB3, dessen Replikation und die damit verbundene Schädigung der Wirtszelle sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu verhindern.

Die ersten zwei Strategien basierten auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi), wobei im ersten Ansatz die Expression des viralen Rezeptors als zelluläre Zielstruktur inhibiert werden sollte, um eine Infektion der Zielzellen durch CVB3 zu verhindern. Adenovirale Vektoren (AdV) dienten dabei zur effizienten Einschleusung und Expression der therapeutisch relevanten *short hairpin* (sh)RNAs in die kardialen Zielzellen.

In der zweiten RNAi-basierten antiviralen Strategie wurden zwei shRNAs spezifisch gegen die CVB3-RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) als virale Zielstruktur von einem Adeno-assoziierten Virus (AAV)-Vektor des Serotyps 6, in kardiale Zielzellen eingebracht, um somit die virale Replikation zu unterdrücken bzw. das virale RNA-Genom komplett aus der Zelle zu eliminieren. Durch Verwendung von AAV2.9-Pseudotypen wurde anschließend mittels kardiospezifischen Gentransfers die Wirkung dieses gentherapeutischen Ansatzes auf die CVB3-Infektion des Herzens in einem Myokarditis-Mausmodell untersucht.

Im Gegensatz zu den RNAi-basierenden antiviralen Strategien wurde im dritten Teil der Arbeit mittels Adenovektoren ein lösliches rekombinantes Rezeptorprotein (sCAR-Fc) exprimiert und dessen inhibitorische Wirkung auf die CVB3-Infektion untersucht. Hierzu wurden neben *in vitro*-Studien, die Effizienz und Sicherheit der gentherapeutischen Applikation von sCAR-Fc im Rahmen einer prophylaktischen und therapeutischen Anwendung in einem CVB3-Myokarditis-Mausmodell untersucht. Um dabei die Sicherheit bei einer Anwendung *in vivo* zu erhöhen, wurde die Expression des sCAR-Fc mittels Tet-On-Genexpressionssystems pharmakologisch regulierbar gemacht.

## **5.1 Inhibierung der CVB-Infektion durch Vektor-vermittelte Herunterregulation des zellulären Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR)**

Die RNAi stellt hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials eine neue, vielversprechende Methode auf dem Gebiet der antiviralen Therapie dar. In zahlreichen Untersuchungen *in vitro* und auch *in vivo* konnten unterschiedliche virale Infektionen mit dieser Methode inhibiert bzw. assoziierte pathologische Mechanismen verringert werden (Bitko et al., 2005; McCaffrey et al., 2003; Carmona et al., 2006; Merl et al., 2005).

Die RNAi setzt dabei eine homologe Basenpaarung zwischen siRNA bzw. shRNA und der Ziel-mRNA voraus. Bereits einzelne Punktmutationen in der Ziel-mRNA können die inhibitorische Wirkung komplett aufheben. Dies stellt insbesondere im Hinblick auf die hohe Mutationsrate bei Viren, im speziellen bei RNA-Viren wie CVB, und die daraus resultierende Möglichkeit der Entstehung von Escape-Mutanten ein großes Problem dar (Gitlin et al., 2005; Das et al., 2004; Merl and Wessely, 2007).

Eine Methode dies zu umgehen, ist das *Silencing* von zellulären Proteinen, die für das Virus essentiell sind. Dazu gehören Virusrezeptoren (Anderson and Akkina, 2005) und verschiedene zelluläre Proteine, die das Virus für seine Replikation benötigt (Gao et al., 2004; Ping et al., 2004).

### **5.1.1 Inhibierung der CVB3-Infektion durch *Silencing* der CAR-Expression in kardialen Zellen**

Eine wichtige Determinante bei der viralen Infektion sind spezifische zelluläre Rezeptoren, über die das Virus Kontakt mit der Zelle aufnimmt und in diese eindringt. Für CVB ist CAR der Internalisierungsrezeptor und vermittelt die Aufnahme des Virus in die Zielzellen (Bergelson et al., 1997). CAR ist weiterhin ein Zelladhäsionsprotein das homophile und heterophile Interaktionen mit anderen Proteinen eingeht. Es ist ein Bestandteil der Tight-Junction, der neuromuskulären Verbindungen und der myokardialen Disci intercalares (Shaw et al., 2004; Sinnreich et al., 2005; Coyne and Bergelson, 2005). Dabei ist die Expression von CAR auf der Zelloberfläche abhängig vom Zell- bzw. Gewebetyp und verändert sich während der Entwicklung. Besonders stark ist die CAR-Expression während der Embryogenese und im postnatalen

Zeitraum, während sie im Adulten bis auf einige wenige Gewebe reduziert ist (Honda et al., 2000; Fechner et al., 2003b; Tomko et al., 2000; Carson, 2001).

Im Hinblick auf die Etablierung eines RNAi-basierten anti-Rezeptoransatzes wurde die Expression von CAR in unterschiedlichen Zelltypen untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf kardiale Zellen gelegt, da diese bei der akuten CVB3-induzierten Myokarditis und DCM die Hauptzielzellen des Virus darstellen (Kandolf et al., 1985; Yajima et al., 2006).

Durch Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern konnte sowohl in epithelialen Tumorzelllinien (HeLa, HEK 293) als auch in der kardialen Mauszelllinie HL-1 und in primären neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) die Expression von CAR nachgewiesen werden. Bei den kardialen Zelllinien wurde jedoch nur die Expression der CAR1-Isoform festgestellt, während die CAR2-Isoform in beiden Zelltypen nicht detektierbar war. In der Arbeit von Shaw et al. konnte jedoch mit den gleichen Antikörpern in kardialem Muskelgewebe auch die CAR2-Isoform nachgewiesen werden (Shaw et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte der Ursprung der HL-1 Zellen sein, die aus atrialem Tumorgewebe etabliert wurden (Claycomb et al., 1998), während die Untersuchungen von Shaw *et al.* an primärem, ventrikulärem Herzgewebe durchgeführt wurden.

Charakteristisch war die CAR-Verteilung in der Membran an den Zellkontaktstellen. CAR bildet Homodimere, vermittelt durch die Interaktion der D1-Domäne des extrazellulären Teils (Coyne and Bergelson, 2005). Interessanterweise konnte an den Zellmembranen ohne Kontakt zu anderen Zellen kein CAR nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass CAR, wenn er keinen Interaktionspartner an der Zelloberfläche vorfindet, instabil ist. Ebenfalls bestätigten die Untersuchungen, dass CAR als ein Zellkontaktprotein agiert. So konnte mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, dass an den Kontaktstellen von Zellausläufern (Filopodien), über die die Zelle mit Nachbarzellen in Wechselwirkung tritt, CAR lokalisiert ist (Abb. 4.2). Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass bei der Migration und Kontaktausbildungen von Neuronen zu Herz- bzw. Muskelzellen, die ebenfalls über Filopodien stattfinden, eine Beteiligung von CAR nachgewiesen werden konnte (Sinnreich et al., 2005; Shaw et al., 2004). Nicht geklärt ist jedoch ob CAR nach Zellkontakt an der Kontaktstelle stabilisiert wird oder ob es aktiv bei der Ausbildung erster Zell-Zell-Kontakte als eine Art *Pathfinder*-Protein agiert.

Um eine Zellkultur effizient vor einer viralen Infektion mittels RNAi zu schützen, ist es von eminenter Bedeutung, dass alle Zellen mit den therapeutisch relevanten Oligonukleotiden (siRNAs, Oligodeoxynukleotide, Peptid-konjugierte Oligomere usw.) behandelt werden, da schon einige nicht behandelte Zellen ausreichen können, um die Virusreplikation aufrecht zu erhalten.

Kardiale Zellen wie HL-1 Zellen und NRCM lassen sich mit den momentan zur Verfügung stehenden Methoden jedoch nur unzureichend transfizieren, gekennzeichnet durch eine niedrige Transfektionseffizienz (30 %) bei hoher Mortalitätsrate (Yuan et al., 2004).

Adenovirale Vektoren (AdV) dagegen transduzieren eine Vielzahl von sich teilenden und ruhenden Zellen und ermöglichen zusätzlich durch die kontinuierliche Expression von shRNAs ein langzeitliches Vorhandensein therapeutisch wirksamer Oligonukleotide in der Zelle (Fechner et al., 2006). Somit wird ein wesentlicher limitierender Faktor bei der Anwendung von siRNAs, ein begrenztes Reservoir therapeutisch wirksamer Moleküle, ebenfalls umgangen. In Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich sowohl HL-1 Zellen (Abb. 4.5) als auch NRCM (Abb. 4.8) sehr gut von AdV transduzieren lassen, ohne dabei sichtbare Nebenwirkungen, wie z. B. Apoptose zu induzieren.

Um ein effizientes *Silencing* von Maus (m)CAR zu erreichen wurde anfangs durch Co-Expressionsanalysen mit mCAR-Expressionsplasmiden die wirksamste shRNA gegen mCAR1 und mCAR2 evaluiert. Anschließend wurde diese in ein adenovirales Shuttelplasmid unter Kontrolle des U6-Polymerase-III-Promotors kloniert und AdV (AdshCAR4<sub>m</sub>) generiert. Untersuchungen in HL-1 Zellen mittels quantitativer PCR, konnten eine dosis- und zeitabhängige Verringerung der mCAR-mRNA durch AdshCAR4<sub>m</sub> von über 90 % zeigen.

Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang das erste Mal eine direkte Korrelation zwischen verwendetem shRNA-exprimierendem Vektor, in der Zelle vorhandener shRNA-Menge und shRNA-vermitteltem *Silencing*-Effekt aufgezeigt. Mit steigender AdshCAR4<sub>m</sub>-Dosis konnte in den transduzierten Zellen eine stetige Anreicherung von shCAR4<sub>m</sub> nachgewiesen werden (Abb. 4.6). Übereinstimmend damit korrelierte auch die Effizienz der mCAR-Inhibierung, wobei mit zunehmender Adenovektordosis und daraus resultierender steigender shRNA-Expression das Level der mCAR-mRNA kontinuierlich abnahm.

Anschließend wurde die Reduktion des mCAR-Proteins sowohl mit Immunfluoreszenz als auch mit Western-Blot untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine völlige Reduktion des mCAR in den HL-1 Zellen innerhalb kurzer Zeit (48 Stunden) nach Transduktion mit AdshCAR4<sub>m</sub> möglich war. Die anfängliche Annahme, dass mCAR ein sehr stabiles Protein ist und dadurch der RNAi-Effekt auf Proteinebene erst spät beobachtet werden kann, bestätigte sich dabei nicht. So zeigten Western-Blot Daten, dass ein 24 Stunden nach AdV-Transduktion eingeführter Trypsinierungsschritt, der noch vorhandenen endogenen mCAR an der Oberfläche abspalten sollte, die Wirksamkeit der RNAi auf Proteinlevel nicht steigert.

Neben HL-1 Zellen sollte auch in NRCM mittels AdV-vermittelter RNAi die Ratten-(r)CAR-Expression inhibiert werden. Dies gelang mit einer weiteren CAR-shRNA (shCAR2<sub>m</sub>), die in einem konservierten Bereich des CAR-Gens bindet und mit ähnlich hoher Effizienz die CAR-mRNA von Maus und Ratte inhibiert. Im Gegensatz zu der permanenten Zelllinie (HL-1) konnte bei den primären NRCM eine Verringerung des rCAR-Protein allerdings erst nach 6 bzw. ein kompletter Rückgang nach 8 Tagen beobachtet werden.

Als mögliche Ursache für die zeitliche Verzögerung des *CAR-Silencing* auf Proteinebene kann der unterschiedliche Ursprung der beiden Zelltypen genannt werden. Sich permanent teilende Tumorzellen, wie HL-1 Zellen besitzen im Allgemeinen eine höhere Stoffwechselaktivität. Dies kann dazu führen, dass Proteine schneller abgebaut bzw. ersetzt werden. In post-mitotischen, ruhenden Zellen ist dieser Prozess langsamer, womit die Möglichkeit besteht, dass Membran gebundener CAR in NRCM eine höhere Halbwertszeit aufweist, langsamer abgebaut wird und der RNAi-Effekt zeitverzögert auftritt. Dies konnte zum Beispiel bei einem anderen Protein in NRCM festgestellt werden. Dabei handelt es sich um Phospholamban, ein Protein, das eine regulatorische Rolle im Kalziumstoffwechsel spielt (Koss et al., 1997). Obwohl die mRNA in NRCM mittels RNAi innerhalb 24 Stunden vollständig abgebaut werden konnte, wurde die Verringerung des Proteins erst nach 5 bis 7 Tagen beobachtet (Fechner et al., 2006). Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass rCAR in den NRCM Verbindungen mit Interaktionspartnern eingeht, die eine höhere Stabilität des Proteins bewirken.

Sowohl in HL-1 Zellen, als auch in NRCM konnte durch die Verringerung des CAR auf der Zelloberfläche die Infektion bzw. Replikation von CVB3 effizient inhibiert werden. Bei einer AdshCAR<sub>m</sub>-Vektordosis von moi 100 betrug dieser antivirale Effekt

bei HL-1 Zellen 97 %. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt über einen Zeitraum von 6 Tagen anhielt (Abb 4.10 und 4.11).

So konnte in den HL-1 Zellen, die 6 Tage *post infectio* untersucht wurden, zwar eine höhere CVB3-Menge als 24 Stunden p. i. nachgewiesen werden, aber im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-shRNA behandelt wurden, betrug die Inhibierung der CVB3 ebenfalls über 90 %. Dies verdeutlicht noch einmal den Langzeit-RNAi-Effekt, der durch die kontinuierliche Expression der shRNAs bewirkt wird.

In den NRCM bestand eine direkte Korrelation zwischen CVB3-Inhibierungseffekt und Zeitpunkt nach Transduktion mit AdshCAR2<sub>m</sub>. Dies ist vor allem auf die zeitlich verzögerte Verringerung des rCAR-Proteins auf der Zelloberfläche zurückzuführen. So konnte auch bei NRCM eine 90%ige Inhibierung der CVB3-Replikation durch AdshCAR2<sub>m</sub> nachgewiesen werden, wenn die Virusinfektion erst am Tag 8 nach Transduktion erfolgte.

In den Untersuchungen erwies sich der anti-Rezeptor-Ansatz mit AdV-exprimierten shRNAs als effizienter gegenüber der Inhibierung mittels synthetischer siRNAs (Werk et al., 2005). Trotz wirksamer siRNA wurde dabei die CVB3-Infektion nur bis zu 60 % inhibiert. Wesentliche Ursachen hierfür können vor allem in der hohen Transduktionseffizienz der Adenovektoren und der gleich bleibend hohen Expression der shRNAs liegen. In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass der *Silencing*-Effekt von eingebrachten siRNAs in kardialen Zellen nach etwa 3 Tagen abnimmt (Watanabe et al., 2004). Im Gegensatz dazu werden AdV-exprimierte shRNAs über einen langen Zeitraum (>14 Tage) gebildet, womit sie sich bei *in vitro*-Untersuchungen, gerade bei Proteinen mit längeren Halbwertszeiten, wesentlich besser eignen (Fechner et al., 2007b).

Auch der Vergleich mit RNAi-basierten antiviralen Ansätzen gegen virale Zielstrukturen zeigte, dass der in dieser Arbeit untersuchte anti-Rezeptoransatz am effizientesten CVB3-Infektionen in kardialen Zellen (HL-1) inhibieren konnte. SiRNAs gegen VP1 oder die virale Protease 2A zeigten dabei eine Inhibierung der viralen Replikation von 90 %. Auch hier ist eine unzureichende Transfektionseffizienz der HL-1 Zellen, als limitierender Faktor wahrscheinlich, da in HeLa-Zellen, die wesentlich effizienter transfiziert werden können, die gleichen siRNAs eine Reduktion der viralen Replikation bis zu 3log<sub>10</sub>-Stufen induzierten (Yuan et al., 2004; Yuan et al., 2005).

Der RNAi-vermittelte anti-Rezeptoransatz zur Inhibierung von viralen Infektionen wurde auch bei anderen Viren untersucht (Hu et al., 2005; Henry et al., 2006). Vor allem bei Viren, die eine hohe Mutationsrate aufweisen und so durch Bildung von Escape-Mutanten einer RNAi basierten antiviralen Therapie ausweichen, wie z.B. HIV (Das et al., 2004), konnte dieser anti-Rezeptor-Ansatz eine wirkungsvolle Alternative darstellen. So zeigten siRNAs gegen die zellulären HIV-Rezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die HIV-Infektion von Monozyten (Anderson and Akkina, 2005; Anderson et al., 2003).

Die Inhibierung oder Verstärkung der Expression eines zellulären Gens kann aber auch unerwünschte Nebenwirkungen aufzeigen. Auffällige Veränderungen in der Morphologie, dem Aktingerüst oder der Wachstumskinetik von HL-1 Zellen, die mit AdshCAR4<sub>m</sub> transduziert wurden, konnte nicht beobachtet werden. Es ist jedoch bekannt, dass in epithelialen Zellen (CoCa) in denen CAR zur Ausbildung von Tight-Junctions (TJ) benutzt wird, die Inhibierung von CAR zur Delokalisation von MUPP1, einem weiteren wichtigen TJ-Protein führt. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass es in Abwesenheit von CAR zur Destabilisierung oder Funktionsbeeinträchtigung der TJ kommen könnte (Coyne et al., 2004).

### **5.1.2 Inhibierung anderer CVB-Serotypen durch *Silencing* von CAR**

Neben CVB3 werden auch andere CVB-Serotypen mit akuter Myokarditis und anderen fulminanten Erkrankungen assoziiert, wie Pankreatitis (CVB4), Bronchitis, Pneumonie (CVB1, 2 und 3) und vor allem bei Neugeborenen und Kleinkindern Meningitis bzw. Meningoenzephalitis (Kapitel 1.2.3.3). Da alle CVB-Varianten CAR als Internalisierungsrezeptor benutzen (Bergelson et al., 1997) stellt die Behandlung mit AdshCAR4<sub>m</sub> auch bei anderen CVB-Serotypen eine Möglichkeit dar, die Infektion und virale Replikation zu inhibieren. Eigene Untersuchungen in HL-1 Zellen zeigten, dass alle CVB-Serotypen annähernd gleich produktiv HL-1 Zellen infizieren und in diesen replizieren. Dies bestätigt, dass kardiale Zellen auch für andere CVB-Serotypen mögliche Zielzellen darstellen (Chapman et al., 2008).

Zusätzlich konnte das erste Mal gezeigt werden, dass es durch die effiziente Ausschaltung der CAR-Expression in den Zielzellen mittels AdshCAR4<sub>m</sub> möglich war, die Infektion der Zellen mit allen sechs CVB-Serotypen zu inhibieren. Dabei war die

Inhibierung vergleichbar mit der von CVB3 und betrug ca. 90 % bis 95 %. Ahn *et al.* untersuchten ebenfalls den antiviralen Effekt einer siRNA gegen mehrere CVB-Serotypen. Dabei richtet sich die RNAi jedoch gegen die CVB-Polymerase als virale Zielstruktur. Zellviabilitäts-Assays zeigten, dass HeLa-Zellen mit dieser siRNA zwar erfolgreich gegen CVB2, 3 und 4 aber nicht gegen CVB1, 5 und 6 geschützt werden konnten. Ursache dafür war eine Basensubstitution in der Sequenz der viralen Polymerase zwischen diesen verschiedenen CVB-Serotypen, wodurch die siRNA keine 100 %ige Sequenzspezifität aufwies und ihre Effizienz verlor (Ahn *et al.*, 2005). Dies verdeutlicht noch einmal, dass eine 100 % übereinstimmende Sequenzhomologie zwischen siRNA bzw. shRNA und Zielsequenz der mRNA von Nöten ist, um einen effizienten RNAi-Effekt zu erzeugen. Bereits die Abweichung von einem Nukleotid, z. B. durch Mutation oder Genomvariabilität kann den *Silencing*-Effekt völlig aufheben (Merl and Wessely, 2007); Ahn *et al.*, 2005).

Die in dieser Arbeit untersuchte antivirale Strategie, basierend auf der Eliminierung des Rezeptors, bildet damit eine Möglichkeit, nicht nur spezifisch ein Virus zu inhibieren, sondern eine ganze Gruppe von Viren, die ein gemeinsames, für die Infektion notwendiges zelluläres Protein benutzen.

Eine ähnliche Vorgehensweise wurde bei HIV, Filoviren (Marburgvirus und Ebolavirus) und dem Masernvirus angewandt, wo durch RNAi-basierte Inhibierung der Rab9 GTPase, einem zellulären Enzym mit Proteintransportfunktion im Golgi-Apparat, eine Möglichkeit gefunden wurde, die virale Replikation in den Zielzellen zu verringern. Alle drei Virustypen benötigen die Rab9 GTPase an unterschiedlichen Stellen ihres Replikationszykluses. Das shRNA-basierende *Silencing* konnte dabei sowohl die Ausschleusung neuer HIV-Partikel inhibieren als auch den Virustiter von Masernvirus und die Antigenmenge von Ebola- und Marburgvirus verringern (Murray *et al.*, 2005).

### **5.1.3 Inhibierung der mCAR-Expression durch AdshCAR4<sub>m</sub> – *in vivo***

Adenovektoren stellen ein wirksames Werkzeug dar, um Fremd-DNA im Zuge von gentherapeutischen Ansätzen *in vivo* zu exprimieren (Harvey *et al.*, 1999; Raper *et al.*, 2002; High, 2003). Sie transfizieren ein breites Spektrum von sich teilenden, aber

auch ruhenden Zellen und zeigen bei i. v. Applikation *in vivo* einen ausgeprägten Lebertropismus (Jazwa et al., 2007; Fechner et al., 1999; Smith et al., 2002).

In dieser Arbeit durchgeführte Vorexperimente zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur eine überwiegend leberspezifische Expression des Markergens Luciferase nach i. v. Applikation eines Luciferase-exprimierenden AdV via Schwanzveneninjektion. In Herz und Lunge konnte dagegen nur etwa 1 % der Luciferaseexpression der Leber gemessen werden. Diese selektive Transduktionseffizienz könnte durch die starke Expression der Adenovirus-spezifischen Rezeptoren in diesem Gewebe begründet werden. AdV auf der Basis von Ad5 benutzen CAR als Rezeptor für die Anheftung an die Zelle und  $\alpha_V$ -Integrine für die Internalisierung (Bergelson et al., 1997; Wickham et al., 1993).

Fechner *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von CAR in adulten Mäusen und Ratten in der Leber höher ist als in anderen Geweben wie z. B. Lunge, Muskeln und Milz. Überraschenderweise konnte jedoch in Organen wie Herz und Nieren ebenfalls eine deutliche Expression von CAR und auch von  $\alpha_V$ -Integrinen nachgewiesen werden. Diese Organe weisen jedoch eine verschwindend geringe Transduktionsrate durch AdV nach i. v. Applikation auf (Fechner et al., 1999).

Dies lässt darauf schließen, dass weitere Faktoren bei der Transduktion von AdV *in vivo* eine Rolle spielen wie z. B. anatomische Barrieren. Die Leber besitzt im Gegensatz zu Muskeln, Lunge und Herz eine Basalmembran mit relativ großen Poren (ca. 100 nm). Adenovektoren können durch diese Poren problemlos in die Leber gelangen und diese transduzieren (Fechner et al., 1999). Vor allem im Herzen stellt die Epithelbarriere eine große Herausforderung bei der Anwendung von Adenovektoren in der Gentherapie dar. Die Applikation mittels Katheters direkt im Ventrikel und gleichzeitiger Erhöhung des isovolumetrischen Drucks durch kurzzeitigen Verschluss der Aorta und Lungenarterie stellt dabei eine mögliche vielversprechende Alternative zur systemischen Applikation dar (Hajjar et al., 1998).

Um in einem *proof-of-principle*-Experiment die Möglichkeit zu untersuchen, mittels AdV-vermittelter RNAi mCAR auszuschalten bzw. in seiner Expression herunterzufahren, reichte in diesem Fall die Leber als Untersuchungsorgan aus.

Obwohl festgestellt werden konnte, dass die Applikation erfolgreich war, der Vektor die Leber transduzierte und die shRNA gegen mCAR exprimiert wurde, konnte keine

signifikante Abnahme der Expression von mCAR weder auf mRNA-Ebene noch auf Protein-Ebene festgestellt werden.

Ursache dafür kann unter anderem sein, dass trotz einer relativ hohen Dosis von  $1 \times 10^{11}$  pt/Maus nicht genügend Leberzellen transduziert wurden, um eine Herunterregulation von mCAR zu messen. Des Weiteren stellten große Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren einer Gruppe und verschiedenen, untersuchten Leberstücken eines Tieres ein Problem in der Bewertung der Ergebnisse dar.

Retrospektiv lässt sich jedoch sagen, dass die Herunterregulation der Expression eines zellulären Gens immer das Risiko mit sich bringt, Nebenwirkungen zu induzieren. So hat der *knock-out* von CAR vor allem auf die Embryonalentwicklung verheerende Auswirkungen, mit Letalität während der Embryogenese oder starken Fehlentwicklungen des kardialen Systems (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006). Im adulten Tier führt der *knock out* von CAR zum AV-Block, einer gestörten kardialen Reizweiterleitung zwischen Atrium und Ventrikel. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf die fehlende CAR-Lokalisation in den Tight-Junctions und Disci intercalares zurückzuführen ist, die u. a. für die Reizweiterleitung im Herzen notwendig ist (Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008).

Zusammenfassend war es möglich mittels AdV-exprimierten shRNAs, in schwer zu transfizierenden kardialen Zellen die CAR-Expression auf ein undetektierbares Maß zu reduzieren. Daraus resultierend gelang es, die Infektion und Replikation von CVB3 über einen Zeitraum von 6 Tagen über 90 % zu inhibieren. Zusätzlich war es erstmals möglich, NRCM *in vitro* mittels RNAi vor einer CVB3-Infektion zu schützen und somit die Möglichkeit aufzuzeigen, RNAi als eine potentielle neue kausale Therapie gegen CVB3-Infektionen im Herzen zu nutzen.

## 5.2 Inhibierung der CVB3-Infektion durch Vektor-vermittelte Herunterregulation der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP)

In den letzten Jahren wurden mehrere Studien durchgeführt, in denen RNAi-induzierende Moleküle wie siRNAs, shRNAs oder modifizierte Oligomere gegen CVB3-Infektionen eingesetzt und hinsichtlich ihrer Effizienz *in vitro* und *in vivo* getestet wurden. Als Zielsequenzen dienten dabei unterschiedliche Bereiche auf dem CVB3-Genom.

Dabei zeigte sich in einem Großteil der Arbeiten, dass die Effizienz der Inhibierung der viralen Replikation je nach gewählter viraler Zielstruktur und in Abhängigkeit der eingesetzten Menge der therapeutischen Nukleotide zwischen zwei und drei logarithmischen Stufen *in vitro* lag. Als wirksame virale Zielstrukturen stellten sich dabei das VP1-Protein (Ahn et al., 2005), die RdRP (Ahn et al., 2005; Werk et al., 2005) und die virale Protease 2A (Merl et al., 2005) heraus, aber auch nicht translatierende Bereiche wie die IRES-Sequenz (Yuan et al., 2006) und die 3'UTR (Yuan et al., 2004).

Merl *et al.* und Kim *et al.* zeigten die therapeutische Effizienz von chemisch synthetisierten siRNAs und Plasmid-exprimierten shRNAs bei CVB3-Infektionen *in vivo*. So konnte mit Plasmid-exprimierten shRNAs gegen das VP1-Protein und die RdRP in Herz und Pankreas von CVB3-infizierten Mäusen die virale RNA um ca. 3log<sub>10</sub>-Stufen verringert werden (Kim et al., 2007). Des Weiteren konnte durch die systemische Verabreichung von siRNAs gegen die virale Protease 2A die Überlebensrate infizierter Tiere verbessert und die Viruslast im Herzen verringert werden (Merl et al., 2005).

Für die Behandlung einer CVB3-verursachten Myokarditis beim Menschen können diese Ansätze jedoch nicht genutzt werden, da nach einer normalen systemischen Applikation (i. v.) weder siRNAs noch Plasmide ins Herz gelangen. Die hydrodynamische Injektionsprozedur, durch die in den o. g. Arbeiten die siRNAs bzw. shRNA-Plasmide in die Maus eingebracht wurden, beinhalten die Verabreichung eines großen Flüssigkeitsvolumens in sehr kurzer Zeit (Liu et al., 1999). Der so erzeugte Überdruck in den Gefäßen führt dazu, dass sich die Epithelien weiten und somit die therapeutischen Nukleotide in die Organe gelangen. Dies stellt eine erhebliche Beanspruchung des ganzen Organismus dar und ist somit eine Methode die beim Menschen nicht durchführbar ist. Das verabreichte Volumen entspricht,

gemessen am Gewicht der Mäuse, einem Flüssigkeitsvolumen von über 4 Litern bei einem 60 kg schweren Menschen (Liu et al., 1999).

Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass die eingebrachten therapeutischen Moleküle sich in nahezu allen Organen verteilen, der herzspezifische Transfer jedoch gering ist. So stellt die Leber bei dieser Applikationsmethode eines der Hauptzielorgane dar (Liu et al., 1999; Merl et al., 2005; Kim et al., 2007). Jüngste Arbeiten zeigten, dass eine übermäßige Expression von shRNAs in der Leber toxische Effekte, durch Inhibierung des *microRNA-Pathway*, verursachen kann (Grimm et al., 2006), weshalb eine unnötige Transduktion mit shRNA-exprimierender Vektoren vermieden werden sollte.

Mit dem Hintergrund einer gerichteten kardialen Therapie gegen CVB3-induzierte Myokarditis wurde im zweiten Teil dieser Arbeit mittels RNAi direkt gegen virale Strukturen vorgegangen. Dabei konnte durch die Anwendung von pseudotypisierten AAV-Vektoren (AAV2/6 bzw. AAV2/9) eine effiziente Transduktion von NRCM *in vitro* und eine organspezifische Transduktion *in vivo* im Herzen nach einer intravenösen Applikation erreicht werden. Außerdem kann durch die Langzeitstabilität der AAV-Vektoren eine shRNA-Expression über einen langen Zeitraum erreicht werden (Xiao et al., 1996b; Kaplitt et al., 1994b).

### **5.2.1 Etablierung eines gerichteten kardialen Gentransfers zur Expression von antiviral wirksamer shRNAs**

AAV-Vektoren stellen zurzeit eine der Erfolg versprechendsten viralen Gentransfervektoren dar. Sie transduzieren eine Vielzahl von teilenden und nicht teilenden Zellen, zeigen episomale Langzeitstabilität und geringe Nebenwirkungen bei *in vivo*-Anwendungen (Van Vliet et al., 2008; Conrad et al., 1996; Kaplitt et al., 1994a).

Nach Transduktion der Zielzelle und dem *Uncoating* muss aus dem einzelsträngigen Genom (*singel strand* - ss) durch die zelluläre DNA-Polymerase ein doppelsträngiges Genom synthetisiert werden, bevor das eingebrachte Transgen abgelesen werden kann. Dies geht einher mit einer zeitlichen Verzögerung, sodass eine hohe Transgenexpression erst Tage bis Wochen nach Transduktion erreicht wird (Ferrari et al., 1996; Fisher et al., 1996b).

Durch die schnelle Replikation von CVB3 ist es von großer Bedeutung, dass die therapeutisch wirksamen shRNAs schnell und effizient exprimiert werden. Herkömmliche ssAAV-Vektoren sind daher durch ihre zeitlich verzögerte Expression nicht einsetzbar. Deshalb wurden in dieser Arbeit *self complementary* (sc)AAV-Vektoren eingesetzt, die eine Deletion in der terminal resolution site (TRS) und der D-Sequenz im Bereich der 3'-ITR aufweisen. Das führt zur Verpackung eines bereits doppelsträngigen AAV-Genoms, weshalb es zu einer schnellen und effizienten Expression des Transgens nach Transduktion der Zielzellen kommt (McCarty et al., 2003).

In Vorexperimenten *in vitro* wiesen scAAV-Vektoren eine effiziente Expression des Transgens bereits 24 Stunden nach Transduktion auf, während die Transgenexpression bei ssAAV-Vektoren selbst 72 Stunden nach Transduktion deutlich niedriger ausfiel (Fechner et al., 2008).

Durch die Entwicklung von pseudotypisierten AAV-Vektoren war es möglich, den Tropismus *in vitro* und *in vivo* zu spezifizieren. AAV2-Vektoren, die das Kapsidprotein des AAV2-Serotyps besitzen, können *in vitro* eine Vielzahl von Zelltypen transduzieren. Die Transduktionseffizienz bei kardialen Zellen ist jedoch sehr gering (Sipo et al., 2007; Du et al., 2004).

Durch die Entwicklung von AAV2/6- und AAV2/9-Pseudotypen, die jeweils das Shuttleplasmid von AAV2, jedoch das Kapsid von AAV6 bzw. AAV9 besitzen, gelang es sowohl *in vitro* durch AAV2/6 als auch *in vivo* durch AAV2/9 kardiale Zellen effizient zu transduzieren. Im Rahmen dieser Arbeit entwickelte scAAV2/6-Vektoren erwiesen sich bei der *in vitro*-Transduktion von NRCM am effizientesten. Bereits 2 Tage nach Transduktion konnten zahlreiche GFP-exprimierende Zellen detektiert werden, wobei bis zum Tag 4 sowohl die Stärke der Expression als auch die Anzahl GFP-exprimierender Zellen zunahm.

scAAV2/9-Vektoren zeigten zwar *in vitro* auch eine, im Vergleich zu scAAV2 erhöhte Transduktionsrate von NRCM, *in vivo* erwiesen sie sich jedoch von allen Serotypen die kardiale Transduktion betreffend am effizientesten. Dies bestätigten auch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die eine bis zu 100%ige Transduktionseffizienz im Herzen beschreiben (Pacak et al., 2006; Inagaki et al., 2006; Lyon et al., 2008). Dabei übertrafen AAV2/9-Vektoren sogar die Transduktionseffizienz des Herzens von AAV2/6 und AAV2/8 nach systemischer Applikation in Mäusen (Muller et al., 2006); (Palomeque et al., 2007; Pacak et al., 2006).

So ermöglichen AAV2/9-Vektoren durch ihren Kardiotropismus erstmals ein effiziente Transduktion des Herzens, bei relativ einfacher i. v. Applikation, und eröffnen damit die Möglichkeit, des kadiospezifischen Gentransfers.

Überraschend war jedoch, dass AAV2/9-Vektoren *in vitro* eine schlechtere Transduktionseffizienz in NRCM zeigten als AAV2/6. Mögliche Ursachen könnten in den unterschiedlichen Spezies liegen, da die NRCM aus neonatalen Ratten gewonnen und die *in vivo*-Daten in Mäusen generiert wurden. Eine zweite Ursache kann in einer altersbedingten (neonatal vs. 6 Wochen alte Tiere) unterschiedlichen Expression von Membranproteinen liegen, die als AAV-Rezeptoren dienen. Auch eine unterschiedliche Stabilität im Serum, ungleiche Fähigkeiten die Epitelbarriere zu überwinden oder ein Serotyp-spezifisches, differentielles, nukleäres *Uncoating* könnten weitere Ursachen für die unterschiedliche kardiale Transduktionseffizienz von scAAV2/6- und scAAV2/9-Vektoren darstellen (Sipo et al., 2007).

### **5.2.2 Inhibierung der CVB3-Replikation durch Vektor-vermittelte RNAi gegen die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase**

Eine effiziente Langzeitinhibierung von CVB3 über mehrere Tage kann durch die Bildung von Escape-Mutanten erheblich verschlechtert werden. Bereits Einzelmutationen in der Zielsequenz können den RNAi-Effekt durch siRNAs oder shRNAs stark minimieren oder sogar komplett aufheben.

Besonders RNA-Viren wie z. B. Picornaviren weisen eine starke Fehlerrate in ihrer Replikation auf und begünstigen dadurch die Bildung von Escape-Mutanten. So zeigten Merl und Wessely, dass bereits nach einem Replikationszyklus von CVB3 in siRNA-behandelten Zellen die Nachkommenviren nicht mehr durch die vormals eingesetzte siRNAs inhibierbar waren. Dabei befanden sich die Mutation im Genom der resistenten Nachkommenviren genau in der Zielsequenz der siRNA bzw. shRNAs (Merl and Wessely, 2007).

Um der Entstehung und Anreicherung von Viren mit Basensubstitutionen vorzubeugen, wurden deshalb in der hier präsentierten Arbeit zwei verschiedene effiziente shRNAs gegen die virale RdRP (shRdRP2 und shRdRP4) simultan eingesetzt. Beide shRNAs wurden bereits erfolgreich *in vitro* getestet (Schubert et al., 2005).

HeLa-Zellen, eine permissive Zelllinie für CVB3, die mit einem shRdRP2 und shRdRP4 exprimierenden AAV2-Vektor (scAAV2-shRdRP2.4) transduziert wurden, konnten so erfolgreich vor einer CVB3-vermittelten Zytolyse über einen Zeitraum von 5 Tagen geschützt werden. Dabei wurde die virale Replikation um mehr als  $3\log_{10}$ -Stufen (99,94 %) inhibiert.

Andere Studien zeigen eine ähnlich hohe aber auch niedrigere Inhibierung der CVB3-Replikation, jedoch meist über einen kürzeren Beobachtungszeitraum:  $3\log_{10}$ -Stufen nach 8 Stunden (Yuan et al., 2006),  $2\log_{10}$ -Stufen nach 48 Stunden (Yuan et al., 2004),  $2,5\log_{10}$ -Stufen nach 24 Stunden (Merl et al., 2005) und  $1\log_{10}$ -Stufe nach 3 Tagen (Werk et al., 2005).

Im Hinblick auf den relativ kurzen Replikationszyklus von Picornaviren (zw. 6 und 8 Stunden), stellt die Inkubationszeit eine wichtige Determinante bei der Bewertung der Inhibierungseffizienz dar. Somit lässt die anhaltende Inhibierung der viralen Replikation über 5 Tage vermuten, dass durch die Verwendung von zwei verschiedenen shRNAs die Entstehung von Escape-Mutanten verhindert werden konnte. Auch Merl *et al.* zeigten, dass die Verwendung von mehreren unterschiedlichen siRNAs die Langzeitinhibierung deutlich erhöht und der Bildung von Escape-Mutanten vorbeugt (Merl and Wessely, 2007).

Ein weiterer Grund für den antiviralen Langzeiteffekt über 5 Tage könnte in der Fähigkeit von AAV-Vektoren liegen, eine shRNA-Expression über einen langen Zeitraum zu gewährleisten (Kaplitt et al., 1994c; Xiao et al., 1996a). Dies ist vor allem ein Vorteil gegenüber siRNA-vermittelten antiviralen Strategien. So konnten Merl *et al.* mit fluoreszenzmarkierten siRNAs gegen CVB3 eindeutig zeigen, dass mit Abnahme der siRNAs in der Zellkultur die antivirale Effizienz nachließ und das Virus zunehmend stärker replizierte (Merl et al., 2005). Vektor-basierte shRNAs werden dagegen kontinuierlich gebildet und können somit langfristig gegen virale Zielstrukturen vorgehen.

Durch Verwendung von AAV2/6-Pseudotypen war es weiterhin möglich, schwer zu transfizierende primäre kardiale Zellen durch RNAi effizient vor einer CVB3-Infektion zu schützen. In einem protektiven Ansatz konnte die virale Replikation durch Transduktion mit scAAV2/6-shRdRP2.4 dabei dosisabhängig um  $>3\log_{10}$ -Stufen inhibiert werden.

Des Weiteren konnte eine weniger effiziente, aber dennoch signifikante Verminderung viraler Nachkommen gemessen werden, wenn die Zellen

therapeutisch, d. h. 30 Minuten und 6 Stunden nach CVB3-Infektion mit scAAV2/6-shRdRP2.4 behandelt wurden. Dies spielt vor allem im Hinblick auf die klinische Relevanz eine wichtige Rolle, da eine bereits vorherrschende CVB3-Infektion der typischen klinischen Situation entspricht.

Die verminderte Effizienz der shRNAs bei einer bestehenden CVB3-Infektion kann einerseits durch die schnelle Replikation des Virus erklärt werden. So ist es möglich, dass die verspätet exprimierten shRNAs nicht ausreichen, um sämtliche bereits gebildete viralen RNAs zu eliminieren und so eine Virusreplikation effizient zu unterdrücken. Andererseits ist gezeigt worden, dass Picornaviren unmittelbar nach Infektion ihrer Wirtszelle den gesamten zellulären Syntheseapparat inhibieren (Flores-Otero et al., 1982). Unter anderem wird dabei die RNA-Polymerase III durch Inaktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIIC inhibiert (Fradkin et al., 1987), wodurch die Expression von shRNAs durch den U6-RNA-Polymerase-III-Promotor gestoppt oder verzögert werden kann. Dies sollte vor allem bei der therapeutischen Anwendung von RNAi gegen virale Infektionen bedacht werden.

### **5.2.3 Verbesserung der kardialen Funktion durch AAV9-exprimierte antivirale shRNAs (scAAV2/9-shRdRP2.4) im CVB3-Myokarditis-Mausmodell**

Die virale Ausbreitung und Replikation *in vivo* ist um einiges komplexer als *in vitro* und wird von vielen Prozessen beeinflusst, wie z. B. Immunsystem, genetischem Hintergrund und Alter. Des Weiteren ist das klinische Bild der Myokarditis ein kompliziertes Zusammenspiel zwischen Virus, Immunsystem des Wirts und der Wirtszellen bzw. der betroffenen Organe. Um den Effekt des RNAi-basierten antiviralen Therapieansatzes auf die CVB3-Myokarditis zu analysieren, wurden Mäuse intravenös mit den *in vitro* hocheffizienten RdRP-shRNAs durch AAV-Vektorapplikation behandelt und 9 Tage nach CVB3-Infektion die funktionellen Parameter gemessen.

Durch Verwendung von AAV2/9-Pseudotypen (scAAV2/9-shRdRP2.4) konnte das Herz effizient transduziert und die Expression der therapeutisch wirksamen shRNAs gegen CVB3 in den kardialen Zielzellen ermöglicht werden. Tiere, die mit einem Kontrollvektor (scAAV2/9-shGFP) behandelt wurden, zeigten am Ende des

Untersuchungszeitraums typische Symptome der Kardiomyopathie, einer Myokarditis mit deutlicher Verschlechterung der hämodynamischen Parameter.

Im Gegensatz dazu konnte in den behandelten Tieren (scAAV2/9-shRdRP2.4) eine signifikante Verbesserung der systolischen und diastolischen Funktionen, wie Kontraktilität ( $dP/dt_{max}$ ) und Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) des Ventrikels, ermittelt werden.

Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch RNAi-vermittelte antivirale Therapie gegen CVB3-induzierte Myokarditis eine Verbesserung der funktionellen Parameter des Herzens erreicht werden kann.

Zusätzlich konnte, wie auch im *in vitro*-Ansatz die virale Replikation im Herzen der scAAV2/9-shRdRP2.4 behandelten Tieren deutlich vermindert werden. Zwar wies die Bestimmung der Virustiter große Schwankungen zwischen den einzelnen Mäusen einer Gruppe auf, andererseits zeigte der Mittelwert eine signifikant reduzierte CVB3-Menge um 70 % in den Herzen der behandelten Mäuse auf. Dies korreliert mit *in vivo*-Experimenten, basierend auf der Verwendung von shRNAs (Kim et al., 2007) und antisense Oligonukleotiden gegen CVB3-Infektionen (Yuan et al., 2006; Yuan et al., 2004; Kim et al., 2007).

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch eine minimal invasive, systemische i. v. Applikation therapeutische shRNAs mittels scAAV2/9-Vektoren effizient in das Herz eingebracht und dort exprimiert werden und dadurch eine CVB3-Infektion wirkungsvoll inhibiert werden kann. Dabei konnte jedoch trotz Reduktion der viralen Replikation in den behandelten Mäusen (scAAV2/9-shRdRP2.4) keine signifikante Verbesserung der Inflammation des Herzens beobachtet werden. So liegt die Wahrscheinlichkeit nahe, dass die Reduktion der kardialen Virustiter nicht ausreichend war, um eine signifikante Inhibition inflammatorischer Prozesse im Herzen zu erzielen.

Durch den überwiegenden Kardiotropismus von scAAV2/9 werden die antiviral wirksamen RdRP-shRNAs überwiegend in den kardialen Zellen exprimiert. Erst wenn das Virus diese Zellen infiziert, kann es, durch die dort gebildeten shRNAs inhibiert werden. Es ist möglich, dass die bloße Präsenz von Viruspartikeln im Herzen auch vor Infektion der Kardiomyozyten ausreicht, um eine zelluläre Immunantwort auszulösen, z. B. durch Aufnahme des Virus durch Makrophagen und Präsentation von viralen Antigenen auf deren Zelloberfläche.

Dies wiederum lässt darauf schließen, dass die Verbesserung der hämodynamischen Parameter aus der direkten Reduktion der intrazellulären CVB3-RNA resultieren

könnte. Es ist bekannt, dass durch virale Replikation und auch durch die bloße Expression von CVB3-Proteinen Kardiomyozyten direkt geschädigt werden, u. a. durch Apoptoseinduktion, viral induzierten Abbau von funktionellen kardialen Proteinen wie z. B. Dystrophin durch die CVB3-kodierte Protease 2A, Schädigung des Zellgerüsts und dadurch Verlust der zellulären Integrität (Badorff et al., 1999; Henke et al., 2000; Chau et al., 2007). Möglicherweise konnte so die Verminderung oder Eliminierung der viralen RNA aus diesen Zellen bereits eine Verbesserung der funktionalen Parameter bewirkt und dadurch die Pumpleistung des Ventrikels verbessert haben.

Die zweite RNAi-basierte antivirale Strategie zeigte die Möglichkeit auf, durch kardiale Expression von shRNAs gegen die virale RdRP mittels scAAV2/9-Vektoren die CVB3-Infektion im Herzen signifikant zu inhibieren und dadurch funktionelle kardiale Parameter zu verbessern.

Dabei wurden die shRNAs in einem protektiven Modell durch scAAV2/9 10 Tage vor der CVB3-Infektion appliziert. Es wurde jedoch nicht geklärt, wie sich diese RNAi-basierte Therapie auf eine bereits existierende CVB3-Infektion auswirkt, was dem klinischen Alltag eher entsprechen würde. Akute Infektionen verlaufen sehr schnell und nach 2 bis 3 Wochen heilt die CVB3-Infektion im Herzen meist völlig aus. Auch im Tiermodell einer akuten CVB3-Infektion kann nach Tag 14 p.i. kein CVB3 und ab Tag 21 keine myokardiale Inflammation beobachtet werden (Leipner 2004). Die schnelle Replikation und Ausbreitung des CVB3 im Körper könnte somit eine therapeutische Anwendung dieser Therapieform negativ beeinflussen.

Vielversprechender könnte dagegen ein Einsatz bei der chronischen Myokarditis bzw. DCM sein. Im Mausmodell einer chronischen Myokarditis persistiert das virale CVB3-Genom über mehrere Wochen im Myokard mit reduzierter RNA-Replikation und Proteinexpression (Klingel et al., 1992) sowie geringer oder fehlender Bildung neuer infektiöser Viruspartikel (Kim et al., 2008; Chapman and Kim, 2008; Kim et al., 2005).

Dabei wurde beobachtet, dass die virale RNA ausreicht um eine fortlaufende Inflammation zu induzieren, mit anhaltender Schädigung der kardialen Zellen (Klingel et al., 1992) und Veränderung der Herzgeometrie (Dilatation) durch Fibrose und Remodeling der extrazellulären Matrix (Kishimoto et al., 1997).

So könnte eine antivirale Strategie mittels RNAi gegen das virale Genom bei einer chronischen CVB3-Infektion im Herzen einen therapeutischen Effekt bewirken, indem sie die virale RNA aus der Zelle eliminiert und so die fortlaufende Gewebeeinfiltration von Immunzellen beendet bzw. abschwächt.

Limitierend könnte sich dabei die Tatsache auswirken, dass detaillierte Untersuchungen gezeigt haben, dass die Inhibierung des Virus ausschließlich auf die RNAi-Wirkung gegen den genomischen (+)-Strang des Virus beruhen, während der intermediäre (-)-Strang gar nicht oder mit wesentlich schlechterer Effizienz abgebaut wird (Schubert et al., 2006). So wäre es möglich, dass die virale (-)-Strang-RNA weiterhin in der Zelle persistiert und immunogenes Potential besitzen könnte oder auch als Matritze für die Bildung neuer (+)-Strang-RNAs dient.

### 5.3 Inhibierung der CVB-Infektion durch rekombinantes Vektor-exprimiertes lösliches Rezeptorprotein (sCAR-Fc)

Bei der dritten, in dieser Arbeit entwickelten, antiviralen Strategie mittels viraler Vektoren handelt es sich um die Inhibierung der CVB-Infektion im Herzen mittels löslicher Rezeptorproteine.

Die Möglichkeit, virale Infektionen durch den Einsatz von löslichen Rezeptoren zu inhibieren, wurde bereits bei einigen Viren, wie z.B. HIV, Adenoviren, Masernviren und HHV6 erfolgreich getestet (Christiansen et al., 2000; Deen et al., 1988; Seya et al., 1995; Lim et al., 2006; Santoro et al., 1999).

Die prinzipielle Wirkungsweise beruht dabei auf einer sterischen Inhibierung der Rezeptorbindungsstellen auf dem Virion durch das lösliche Virusrezeptorprotein. Da diese kompetitive Form der Hemmung jedoch reversibel ist, kann durch zerfallsbedingtes Ablösen des löslichen (solublen, s) Rezeptors oder durch nicht hundertprozentige Abdeckung aller Interaktionsstellen auf dem Virion, über die das Virus mit dem zellulären Rezeptor interagiert, die Zielzelle dennoch infiziert werden.

Eine Besonderheit bei Picornaviren macht den löslichen Rezeptor-Ansatz in dieser Virusfamilie wesentlich effektiver. Durch die Interaktion des Viruskapsides mit den jeweiligen Rezeptorproteinen kommt es zu einer irreversiblen Konformationsänderung des Kapsides, die einen Verlust des VP4-Proteins nach sich zieht. Die dabei entstehenden, veränderten (*altered*, A)-Partikel sind nicht mehr infektiös (Crowell and Philipson, 1971; Goodfellow et al., 2005).

Sowohl Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Coyne and Bergelson, 2006) als auch lösliche Formen der Rezeptorproteine bewirken diese Strukturveränderung. Die Bildung von A-Partikeln konnte sowohl bei Polioviren durch sPVR (Kaplan et al., 1990), bei Rhinoviren durch sICAM (Greve et al., 1991) und auch bei CVB3 durch natürlich vorkommende (Dorner et al., 2004) oder rekombinant exprimierte sCAR- bzw. sCAR-Fc-Varianten beobachtet werden (Dorner et al., 2006; Dorner et al., 2004; Yanagawa et al., 2004; Lim et al., 2006). So resultiert bei diesen Viren die Inhibierungseffizienz der löslichen Rezeptorproteine einerseits auf einer kompetitiven Blockierung, wie auch bei Masern- oder Adenovirus; andererseits auf der Bildung von A-Partikeln mit Verlust der Infektiosität (Greve et al., 1991).

Bei dem in dieser Arbeit verwandten löslichen Rezeptorprotein sCAR-Fc handelt es sich um ein Fusionsprotein, bestehend aus dem extrazellulären Teil (D1- und D2-

Domäne) des humanen CAR und dem konstanten Teil (Fc) des humanen IgG1. Die Anbindung des sCAR an den Fc-Teil des humanen IgG1 führte dabei zu einer verbesserten Ausschleusung aus der Zelle und stabilisierte das Protein, womit sich die Halbwertszeit im Serum erhöhte (Harris et al., 2002).

Dieses Protein wurde bereits erfolgreich in anderen Arbeitsgruppen hinsichtlich der Inhibierung von CVB3 getestet (Yanagawa et al., 2004; Lim et al., 2006). Die dabei verwendeten sCAR-Proteine wurden entweder rekombinant hergestellt und aufgereinigt (Yanagawa et al., 2004) oder von Plasmidvektoren exprimiert (Lim et al., 2006). Das Einbringen der Plasmidvektoren in die Mäuse erfolgte dabei über Elektroporation eine invasive Technik, die so beim Menschen nicht anwendbar ist (Lim et al., 2006).

Auch die Applikation von rekombinant hergestellten, aufgereinigten sCAR-Fc zeigte sich im Tiermodell vielversprechend, ist aber nur begrenzt anwendbar, da die Produktion sehr aufwendig und kostenintensiv ist und der sCAR-Fc regelmäßig re-appliziert werden müsste, um ein therapeutisches Level im Serum aufrecht zu erhalten (Yanagawa et al., 2004).

Im Hinblick auf Etablierung eines gentherapeutischen Ansatzes zur Inhibierung der CVB3-Infektion im Herzen wurde ein adenoviraler Vektor benutzt, um sCAR-Fc zu exprimieren. Dabei ermöglicht dieser Vektortyp eine schnelle, quantitativ hohe und andauernde Expression des Transgens *in vivo* (Majhen and mbriovic-Ristov, 2006). Um die Sicherheit dieses Ansatzes zu erhöhen, wurde die Expression des sCAR-Fc unter Kontrolle eines pharmakologisch regulierbaren Genexpressionssystems gestellt.

### **5.3.1 Doxzyklin-regulierte Expression von sCAR-Fc durch adenovirale Vektoren**

Adenovirale Vektoren können *in vitro* effizient viele verschiedene Zelltypen transduzieren und ermöglichen eine schnelle und hohe Expression der eingebrachten Transgene. Ebenfalls weisen sie, wie bereits unter Kapitel 5.1.4 ausführlich erläutert, nach systemischer Applikation *in vivo*, einen ausgesprochenen Lebertropismus auf.

Da bei gentherapeutischen Ansätzen die Sicherheit ein wichtiger Faktor ist, wurde die Expression von sCAR-Fc unter einen Dox-regulierbaren Promotor gestellt, der es ermöglicht die Expression des Transgens durch Zugabe oder Weglassen von Dox an- und abzuschalten.

Wichtige Kriterien für die Bewertung solcher regulatorischer Genexpressionssysteme sind eine niedrige Basalaktivität, eine hohe Expression nach der Induzierung und die Möglichkeit der einfachen und nebenwirkungsfreien Anwendung *in vivo*. In den letzten Jahren gab es zahlreiche Arbeiten, die über eine hohe Basalaktivität berichteten, wenn das Tet-On-System in AdV der ersten Generation angewandt wurde (Mizuguchi and Hayakawa, 2002; Rubinchik et al., 2005).

In der hier vorliegenden Arbeit war es möglich diese Basalexpression auf ein undetektierbares Minimum zu reduzieren. So konnte weder *in vitro* mittels Western-Blot (Abb. 4.3.3) noch *in vivo* mit ELISA (Abb. 4.3.11) eine Expression des sCAR-Fc Proteins ohne Dox gemessen werden. Dies könnte einerseits auf die Verwendung des verbesserten Transaktivators der zweiten Generation  $rtTA2^S$ -M2, andererseits aber auch auf den neuen regulierbaren Promotor TREtight1 zurückgeführt werden. In beiden Fällen konnte eine Reduktion der Basalaktivität des Tet-On-Systems nachgewiesen werden, ebenso wie eine erhöhte Induzierbarkeit nach Zugabe von Dox gegenüber dem originären Tet-On-System.

So zeigte der  $rtTA2^S$ -M2 eine erhöhte Sensitivität gegenüber Dox bei niedriger Basalaktivität ohne Dox im Vergleich zu  $rtTA$  (Urlinger et al., 2000; Sipo et al., 2006; Lamartina et al., 2002). Wurde der  $rtTA2^S$ -M2 jedoch mit dem originalen TRE-Promotor in einem adenoviralen Vektor der ersten Generation eingesetzt, konnte auch dort Basalaktivität gemessen werden (Mizuguchi et al., 2003; Rubinchik et al., 2005; Fechner et al., 2003a). Fechner et al. zeigten weiterhin, dass durch Kombination des TREtight1-Promoters und des  $rtTA2^S$ -M2 die Basalaktivität und Transaktivierbarkeit des Tet-On-Systems in AdV zusätzlich verbessert werden konnte. TREtight und  $rtTA2^S$ -M2 wurden dabei von zwei verschiedenen Adenovektoren kodiert (Sipo et al., 2006).

In dieser Arbeit gelang es nun zum ersten Mal durch Kombination beider verbesserter Komponenten ( $rtTA^S$ -M2 und TREtight1) in einem AdV der ersten Generation die Basalaktivität auf ein undetektierbares Level zu minimieren, ohne dabei die Transaktivierbarkeit negativ zu beeinflussen. Diese betrug auf Transkriptionsebene nach Zugabe von Dox (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 2.700-fach und zählt damit zu

den effizientesten, die mit dem Tetrazyklin-regulierbaren Expressionssystem in AdV der ersten Generation erzielt werden konnte (Mizuguchi et al., 2003; Mizuguchi and Hayakawa, 2002; Sipo et al., 2006; Agha-Mohammadi et al., 2004).

Der in dieser Arbeit verwendete AdV, AdG12 zeigte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine effiziente Expression des Transgens sCAR-Fc nach Induktion der Transkription mittels Doxyzyklin (Dox). So konnte nach Transduktion von HeLa-Zellen (AdG12 moi 5) in Abhängigkeit der zugegebenen Dox-Menge eine sCAR-Fc Konzentration von über 20 µg/ml im Zellkulturüberstand 2 Tage nach Transduktion gemessen werden. Bereits kleine Mengen Dox (10 ng) reichten aus, um eine wirkungsvolle Expression von sCAR-Fc zu induzieren (1 µg/ml).

Ebenfalls wurde gezeigt, dass nach Beendigung der Dox-Gabe, die Expression von sCAR-Fc in HeLa-Zellen innerhalb von 24 Stunden stark reduziert und innerhalb von 3 Tagen komplett abgeschaltet werden konnte (Abb. 4.3.4). Des Weiteren war es möglich, über die Dox-Dosis die Stärke der sCAR-Fc Expression *in vitro* zu steuern (Abb. 4.3.3). Beide Tatsachen erhöhen maßgeblich die Sicherheit beim Einsatz des AdG12 *in vivo*. So ist es möglich bei unerwünschten Nebenwirkungen, wie z. B. allergischen Reaktionen auf sCAR-Fc, die Expression zeitnah zu beenden.

Ein weiterer Vorteil des AdG12 ist, dass Transaktivator und reguliertes Transgen von einem AdV kodiert werden. Dies ermöglicht den Einsatz eines einzelnen Vektors und verringert dadurch die Gesamtmenge an AdV, die für eine effiziente Transduktion appliziert werden muss. Zusätzlich wird durch die Verwendung von einem AdV sichergestellt, dass der Transaktivator und das zu regulierende Transgen in ein und derselben Zelle exprimiert werden und somit eine effektive Regulation der Transgenexpression gewährleistet wird.

Durch systemische Applikation (i. v.) von AdG12 *in vivo* konnte nach Induktion mittels Dox bereits 16 Stunden später eine mittels ELISA messbare Konzentration von sCAR-Fc im Serum festgestellt werden. Im weiteren Verlauf nahm diese stetig zu, mit einem Maximum von durchschnittlich  $464 \pm 159$  ng/ml sCAR-Fc 5 Tage nach Induktion, und betrug nach einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen immer noch über 100 ng/ml ( $141 \pm 51$  ng/ml).

Dies entspricht einer Dosis, bei der bereits ein wirkungsvoller Schutz gegen CVB3-induzierte Myokarditis zu bestehen scheint. So konnte Lim et al. zeigen, dass Mäuse die ca. 80 ng/ml sCAR-Fc im Serum aufwiesen, wirksam gegen eine CVB3-Infektion geschützt waren. Damit übertraf die AdV-vermittelte Expression von sCAR-Fc bei

Weitem die Effizienz des Plasmid-basierten Gentransfers in Mäusen (Lim et al., 2006).

Bei einer Dosis von  $1 \times 10^{10}$  pt AdG12, deren Höhe im Bereich einer human einsetzbaren Dosis in klinischen Anwendungen liegt, konnte eine Konzentration über 100 ng/ml 24 Stunden nach Induktion gemessen werden, während nach Applikation eines sCAR-Fc-exprimierenden Plasmids ein langsamer Anstieg von sCAR-Fc im Serum der Mäuse bis zu einem Maximum an Tag 9, von unter 100 ng/ml gemessen wurde (Lim et al., 2006). Diese zeitlich verzögerte Expression von sCAR-Fc kann sich nachteilig auf eine therapeutische Anwendung, nach Infektion, auswirken, da bei schnell replizierenden Viren wie CVB3 das therapeutische Fenster, in dem eine systemische Ausbreitung wirkungsvoll inhibiert werden kann, sehr klein ist. Des Weiteren ist die Plasmidtransfektion mittels Elektroporation als Anwendung beim Menschen nicht realisierbar und der Einsatz von viralen Vektoren eine attraktive Alternative.

Die Tatsache, dass AdV nach systemischer Applikation überwiegend die Leber transduzieren, stellt in diesem Ansatz keinen limitierenden Faktor dar, da es sich bei dem eingebrachten Transgen um ein lösliches Protein handelt, welches nach Expression aus der Zelle ausgeschleust wird, sich über die Blutbahn im gesamten Körper verteilt und so ubiquitär wirksam sein kann. Es ist daher nicht notwendig, dass sCAR-Fc explizit im Herz exprimiert wird wie z. B. bei den vorstehenden RNAi-basierten antiviralen Ansätzen.

### **5.3.2 Inhibierung der CVB-Infektion durch sCAR-Fc in permissiven HeLa-Zellen**

Eine Schlüsselrolle in der Entwicklung antiviraler Strategien nimmt neben der Sicherheit die Effizienz ein. Vor einem Einsatz *in vivo* wurde deshalb zuerst die Effektivität bestimmt, mit der sCAR-Fc CVB3 *in vitro* inhibiert. Dafür wurden unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Virus-inhibierende Effizienz des sCAR-Fc direkt proportional von dessen Menge abhängig ist. Dies konnte in unterschiedlichen Experimenten durch Änderung der eingesetzten AdG12-Dosis oder durch unterschiedliche Dox-Konzentrationen gezeigt werden.

Unabhängig von der Dosis konnte jedoch bei allen Experimenten beobachtet werden, dass die antivirale Wirksamkeit des sCAR-Fc sehr effizient ist. So betrug die Inhibierung der CVB3-Replikation bis zu  $11\log_{10}$ -Stufen. Selbst in geringen Mengen überstieg sie dabei den Effekt einer RNAi-basierten oder medikamentösen Therapie gegen CVB3 *in vitro* (Werk et al., 2005; Schubert et al., 2005; Yuan et al., 2005; Merl et al., 2005; Pevear et al., 1999; Pevear et al., 1999). So konnte z.B. durch WIN, einen Wirkstoff, der sich an das Picornaviruskapsid anheftet und dadurch das *uncoating* des Virus in der Zelle blockiert, die CVB3-Replikation *in vitro* um 3 -  $4\log_{10}$ -Stufen inhibiert werden (Huang et al., 2004; Fohlman et al., 1996b).

Auch andere Arbeiten zeigten eine starke Inhibierung von CVB3 durch rekombinant hergestelltes oder Plasmid-exprimiertes sCAR-Fc bis zu  $6\log_{10}$ -Stufen (Yanagawa et al., 2004; Lim et al., 2006). Dabei liegt die Fähigkeit CVB3 so effektiv zu neutralisieren, offensichtlich in der Art der Rezeptor-Virus-Interaktion begründet, die bei CVB die Bildung von A-Partikeln auslöst (Goodfellow et al., 2005). Stellt dieser Mechanismus normalerweise einen essentiellen Schritt bei der Infektion von Zielzellen während des *uncoating* dar, so verursacht er, ausgelöst durch ein solubles Rezeptorprotein, bei Picornaviren den irreversiblen Verlust der viralen Infektiosität (Coyne and Bergelson, 2006; Hogle, 2002; Goodfellow et al., 2005). Eine ähnlich hohe Effizienz wurde bei der Inhibierung von Poliovirus durch sPVR mit  $4\log_{10}$ -Stufen (Colston and Racaniello, 1994) und bei HRV14 durch sICAM beschrieben (Greve et al., 1991; Kaplan et al., 1990).

Wesentlich ineffizienter ist dagegen die Inhibierung von Virusinfektionen, die nicht auf der Bildung von A-Partikeln beruhen. So konnte z. B. bei der Inhibierung von Masernvirus durch lösliche Rezeptorproteine (sCD46) lediglich eine 90 %ige Reduktion der viral verursachten Syncytienbildung und neu gebildeten Viruspartikel erzielt werden (Seya et al., 1995; Christiansen et al., 2000). Auch HIV konnte durch lösliche Formen seines Rezeptoren CD4 inhibiert werden, jedoch ebenfalls mit geringerer Effizienz als Picornaviren (Fisher et al., 1988).

Bei Adenoviren, denen CAR ebenfalls als Rezeptor dient, besaß sCAR-Fc zwar auch einen inhibierenden Effekt auf die Infektion der Zellen, jedoch mit wesentlich geringerer Effizienz um ca.  $1\log_{10}$ -Stufe ((Lim et al., 2006) - und eigene Untersuchungen, nicht gezeigt). Dies impliziert, dass die Bildung von A-Partikeln durch Virus-Rezeptor-Interaktion vorrangig bei Vertretern der Picornavirusfamilie auftritt. Jedoch nicht in jedem Fall bewirkt die Interaktion zwischen einem

Picornavirus und seinem Rezeptor die Bildung von A-Partikeln. Der Decay-Accelerating-Faktor (DAF) ein Co-Rezeptor von CVB1, 3 und 5, der die Anheftung des Virus an die Zelle vermittelt (Shafren et al., 1995) war als lösliches Protein (sDAF-Fc) zwar auch in der Lage die Infektion dieser CVB-Serotypen zu inhibieren, jedoch wesentlich ineffizienter als sCAR-Fc (Yanagawa et al., 2004; Yanagawa et al., 2003).

Die Inhibierung von sDAF-Fc basiert auf einer kompetitiven Hemmung ohne Alteration des Viruskapsides (Goodfellow et al., 2005), die erstens reversibel ist und zweitens eine große Menge von Rezeptormolekülen benötigt, da möglicherweise bereits eine freie Rezeptorbindungsstelle auf dem Virion ausreichen könnte, um die Infektion der Zielzelle zu ermöglichen.

Zusätzlich besitzen sCAR und sCAR-Fc eine 5.000- bzw. 10.000-fach höhere Bindungsaffinität zu CVB3 als sDAF bzw. sDAF-Fc (Goodfellow et al., 2005). Dies lässt die Vermutung zu, dass CVB3 auch zu membranständigem CAR eine höhere Affinität besitzt als zu sDAF bzw. sDAF-Fc. Damit besteht die Möglichkeit, dass eine Interaktion mit zellulärem CAR die Bindung mit sDAF-Fc aufbricht, das Virus mit CAR interagiert und so die Zelle infiziert. Es überrascht deshalb nicht, dass die Fähigkeit eine CVB3-Infektion zu inhibieren von sDAF-Fc (1 -  $2\log_{10}$ -Stufen) (Yanagawa et al., 2003) wesentlich geringer ist, als die von sCAR-Fc ( $6\log_{10}$ ) (Yanagawa et al., 2003). Untersuchungen, inwieweit sich die Bindungsaffinität von CVB3 zwischen membranständigen CAR und sCAR-Varianten unterscheiden, wurden noch nicht durchgeführt.

Goodfellow *et al.*, haben ebenfalls gezeigt, dass sCAR-Fc mit 638-fach höherer Affinität zu CVB3 bindet als monomerischer sCAR (Goodfellow et al., 2005). So bewirkt die Fusion mit der humanen IgG-Fc-Domäne nicht nur eine Erhöhung der Stabilität des Proteins, sondern auch eine Verbesserung der CVB3-bindenden Eigenschaft von sCAR.

Alle sechs CVB-Serotypen konnten durch AdG12-exprimierten sCAR-Fc effizient inhibiert werden. Dass dieser Effekt spezifisch ist, wurde durch eigene Kontrollexperimenten mit CVA21 und HRV14 gezeigt. Dies sind ebenfalls Vertreter der Picornaviren, infizieren jedoch CAR-unabhängig über ICAM die Zellen (Shafren et al., 1997; Greve et al., 1991) und wurden durch sCAR-Fc in ihrer Replikation nicht beeinträchtigt.

Interessanterweise wurde jedoch beobachtet, dass die Serotypen, deren Co-Rezeptor DAF ist (CVB1, 3 und 5) (Shafren et al., 1995) eine etwas weniger effiziente Inhibierung durch sCAR-Fc im Vergleich zu den anderen CVB-Serotypen (CVB2, 4 und 6) aufwiesen (Abb. 4.3.10).

Dies könnte einerseits mit einer weniger effizienten viralen Replikation von CVB 2, 4 und 6 in den HeLa-Zellen begründet werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass nicht alle Viruspartikel von den CVB-Serotypen 1, 3, 5 durch Kontakt mit sCAR-Fc zu A-Partikeln wurden und ihre Infektiosität verloren. Eine mögliche Interaktion mit DAF könnte dann eine Infektion ermöglichen.

Auch in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass trotz Behandlung mit sCAR-Fc bestimmte CVB3-Subtypen in der Lage waren, über DAF die Zellen zu infizieren und in diesen auch einen kompletten lytischen Replikationszyklus zu durchlaufen (Goodfellow et al., 2005). In einigen Zelltypen (RD-Zellen, HuFi), die kein CAR auf der Oberfläche exprimieren, reichte DAF für eine Infektion durch CVB aus (Goodfellow et al., 2005; Schmidtke et al., 2000). Dies wäre auch eine weitere Erklärung dafür, dass ein sCAR-DAF-Fc Hybrid bei Lim *et al. in vitro* in der Lage war einige CVB-Serotypen u. a. auch CVB1 und 5 besser zu inhibieren als sCAR-Fc (Lim et al., 2006).

Auffällig war, wie gut sCAR-Fc eine bereits bestehende Infektion inhibieren konnte, wie in dieser Arbeit das erste Mal *in vitro* gezeigt wurde. Je nach Virusdosis und Induktion der sCAR-Fc-Expression nach Infektion konnte in HeLa-Zellen die virale Replikation teilweise komplett inhibiert werden. Auch die Induktion der Expression 24 Stunden nach CVB3-Infektion zeigte abhängig von der initial eingesetzten CVB3-Dosis eine Inhibierung der Replikation um bis zu  $6\log_{10}$ -Stufen. Die Tatsachen, dass ein kompletter Replikationszyklus von CVB3 ca. 6 bis 8 Stunden dauert und dabei  $10^4$  bis  $10^5$  neue Viruspartikel pro Zelle gebildet werden, verdeutlichen dabei die herausragende antivirale Wirksamkeit von AdG12-exprimierten sCAR-Fc.

### **5.3.3 AdG12-exprimierter sCAR-Fc als protektives Agens gegen CVB3-induzierte Myokarditis**

Vorhergehende Studien zeigten, dass mittels gereinigten rekombinanten sCAR-Fc oder durch Plasmid-exprimiertes sCAR-Fc in Mäusen eine CVB3-verursachte

Myokarditis verhindert bzw. abgeschwächt werden konnte. Dies war gekennzeichnet durch eine Verringerung der kardialen CVB3-Menge und der viral-induzierten Inflammation und Schädigung des Myokards (Lim et al., 2006; Yanagawa et al., 2004).

Die protektive Anwendung von AdG12 im CVB3-Myokarditis-Mausmodell zeigte übereinstimmend mit diesen Arbeiten ebenfalls einen wirksamen Schutz gegen die virale Infektion und Replikation im Herzen der Mäuse. *In situ*-Hybridisierungen von Gewebeschnitten zeigten dabei keinerlei Präsenz von CVB3-RNA im Herzen oder in anderen Organen, im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollgruppen, bei denen am Tag 7 nach der CVB3-Infektion große Mengen von Virus-RNA in Herz und Pankreas nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.3.15).

Lim *et al.* fanden unter ähnlichen experimentellen Bedingungen übereinstimmende Daten bei der Anwendung von sCAR-Fc *in vivo* mit einer kompletten Eliminierung von CVB3 aus dem Herzen in sCAR-Fc behandelten Tieren am Tag 7 nach Infektion. Die Anwendung von sCAR-sDAF-Fc, einem Hybrid aus sCAR-Fc und sDAF-Fc zeigte dabei keine verbesserte Virus-inhibierende Wirkung (Lim et al., 2006). Ebenfalls konnten bei Yanagawa *et al.* durch *in situ*-Hybridisierung nur minimale CVB-RNA detektiert werden, wenn rekombinant hergestelltes sCAR-Fc 3 Tage vor Infektion i.v. appliziert wurde (Yanagawa et al., 2004).

Neben der primären Schädigung des Myokards direkt durch das Virus kommt es im Maus-Myokarditismodell ab dem Tag 7 p. i. zur massiven Infiltration von Immunzellen in das Herz (Leipner et al., 2004). Im Fall der akuten Myokarditis eliminieren die Immunzellen, vor allem natürliche Killerzellen (NK-Zellen), infizierte Kardiomyozyten und verhindern so eine Ausbreitung der viralen Infektion (Lodge et al., 1987; Godeny and Gauntt, 1986). Eine starke Inflammation ist jedoch auch assoziiert mit einer fortschreitenden Schädigung des Herzmuskels und einer Verschlechterung der Pumpfunktion. Übereinstimmend mit der Literatur (Yanagawa et al., 2004) konnte durch den protektiven Einsatz von sCAR-Fc die Inflammation im Myokard vollständig verhindert werden.

Histologische Untersuchungen zeigten keinerlei Infiltrate mononuklärer Zellen in das Herzgewebe der Tiere, die mit AdG12 +Dox behandelt wurden. Die Kontrolltiere wiesen dagegen eine zahlreiche Infiltration immunologischer Zellen und nekrotische Areale auf. Das völlige Fehlen von Inflammation im Herzen der Tiere, die sCAR-Fc

expremieren, kann vor allem auf die komplette Inhibierung der CVB3-Infektion im Herzen zurückgeführt werden.

Vermutlich kam es durch die hohe sCAR-Fc-Konzentration im Serum der Mäuse zu einer kompletten Neutralisierung des CVB3 in der Blutbahn während der virämischen Phase, bevor die Viren das Herz infizieren konnten. Vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass nach i. p. Applikation von CVB3 in BALB/c-Mäuse am Tag 2 nach Infektion erstmals Virus im Herzen nachgewiesen werden konnte (Leipner et al., 2004).

Nach dem Experimentierschema des protektiven Ansatzes würde dies dem Tag 4 nach AdG12-Applikation entsprechen, wobei das sCAR-Fc-Level im Serum der Mäuse bei über 500ng/ml liegt (Abb. 4.3.17). Dies entspricht einer Konzentration, bei der offensichtlich das komplette Virus in der Blutbahn durch sCAR-Fc neutralisiert werden konnte.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte Yanagawa et al., die rekombinant hergestellten, aufgereinigten sCAR-Fc in Mäuse applizieren, einen kompletten Schutz des Herzens vor viral induzierter Inflammation und daraus resultierende Herzgewebsschädigung zeigen, wenn sCAR-Fc 3 Tage vor der CVB3-Infektion verabreicht wurde (Yanagawa et al., 2004). Im Unterschied dazu konnte bei Lim *et al.* durch Plasmid-exprimierten sCAR-Fc zwar eine verminderte Schädigung des Herzgewebes durch Inflammation gezeigt werden (Albanell et al., 1997; Lim et al., 2006), jedoch nicht den gleichen erfolgreichen Effekt wie durch, den hier verwendeten AdG12-exprimierten sCAR-Fc.

Es ist bekannt, dass CVB3-Infektionen während einer akuten Infektion im Herzen sowohl beim Menschen als auch im tierexperimentellen Ansatz eine Verschlechterung der Pumpleistung, besonders der linksventrikulären systolischen und diastolischen Parameter verursachen (Martino et al., 1994; Tschope et al., 2004).

Um einen umfassenden Überblick über die kardioprotektiven Eigenschaften des sCAR-Fc bei einer CVB3-Infektion zu geben, wurde die Pumpfunktion des Herzmuskels durch Messung hämodynamischer Parameter untersucht. So verschlechterte sich z. B. in dem untersuchten CVB3-Myokarditis-Mausmodell, 7 Tage nach der CVB3-Infektion der Druck im linken Ventrikel (LVP) während der Systole von  $67 \pm 13$  in uninfizierten Tieren auf  $46 \pm 6$  mmHg in infizierten Kontrolltieren.

Weiterhin zeigten die Messungen, dass durch die Anwendung des sCAR-Fc eine CVB3-induzierte Verschlechterung der Herzfunktion verhindert werden konnte. Nach protektivem Einsatz von sCAR-Fc zeigten CVB3-infizierte Mäuse eine signifikant verbesserte Herzpumpfunktion im Vergleich zu unbehandelten CVB3-infizierten Tieren. Sowohl systolische als auch diastolische Parameter der behandelten Tiere glichen dabei denen nicht infizierter Tiere.

Es ist wahrscheinlich, dass die Verbesserung der Pumpfunktion einerseits auf die Verhinderung der direkten CVB3-induzierten Zerstörung von Herzmuskelzellen zurückzuführen ist. Andererseits verhindert sCAR-Fc durch die Inhibierung der Virusinfektion die reaktive Infiltration immunologischer Zellen in das Myokard, was eine fortschreitende Myozytenlyse nach sich ziehen würde.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass in einem CVB3-Myokarditis-Mausmodell durch den protektiven Einsatz von AdG12-exprimierten sCAR-Fc das Herz vor einer CVB3-Infektion komplett geschützt und dadurch eine reaktive Inflammation verhindert werden konnte. Dadurch war es möglich, die Tiere vor einer CVB3-induzierten Myokarditis mit hämodynamischer Dysfunktion zu schützen.

Nachfolgend sollte nun die Wirksamkeit von AdG12 in einem therapeutischen Ansatz, nach einer CVB3-Infektion untersucht werden, da dieses Modell eher den klinischen Alltag beschreibt.

#### **5.3.4 AdG12-exprimierter sCAR-Fc als therapeutisches Agens gegen CVB3-induzierte Myokarditis**

Eine effektive therapeutische Anwendung von sCAR-Fc spielt für den klinischen Einsatz eine wichtige Rolle. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen im Mausmodell zeigten, dass sowohl bei gleichzeitiger als auch bei 24 Stunden verzögerter Induktion der sCAR-Fc-Expression durch Dox-Gabe das Herz effektiv vor einer kardialen CVB3-Infektion geschützt werden kann.

Allerdings wurde dabei ebenfalls beobachtet, dass das therapeutisch wirksame Fenster sehr klein ist. Wurde zeitgleich mit der CVB3-Infektion die sCAR-Fc Expression gestartet, konnte mittels Plaque-Assay eine Inhibierung der CVB3-Replikation um  $2\log_{10}$ -Stufen gemessen werden. Bei 24 Stunden verspäteter

Induktion konnte zwar immer noch eine signifikante Reduktion des CVB3 im Herzen nachgewiesen werden, aber mit geringerer Effizienz ( $>1\log_{10}$ -Stufe). Die Detektion der viralen RNA im Myokard mittels *in situ*-Hybridisierung bestätigte diese Daten (Abb. 4.3.19).

Leipner *et al.* konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass 24 Stunden nach CVB3-Infektion bereits die erste Virämie stattgefunden hat und CVB3 im Serum, Pankreas, Milz und den Lymphknoten nachweisbar ist (Leipner et al., 2004). Die Expressionskinetik von AdG12 zeigte weiterhin, dass 16 Stunden (zeitgleiche Dox-Gabe mit CVB3) bzw. 40 Stunden (Dox-Gabe 24 Stunden nach Infektion) nach CVB3-Infektion detektierbare Mengen sCAR-Fc im Blut vorhanden waren. Diese geringen Mengen sCAR-Fc scheinen bereits auszureichen, um CVB3, vermutlich während der Virämie, im Blut wirkungsvoll zu inhibieren wie die Plaque-Assay- und *in situ*-Hybridisierungsdaten zeigen. Dies erklärt auch die geringer werdende Effizienz von sCAR-Fc, je später die Expression gestartet wird, da sCAR-Fc nur eine neutralisierende Wirkung auf extrazelluläre Virus hat, bevor es die Zelle infiziert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, ob sCAR-Fc auf die intrazelluläre virale Replikation Einfluss nehmen kann.

Wie auch im protektiven Ansatz, konnte im therapeutischen Modell durch Einsatz von AdG12 die kardiale Inflammation im Vergleich zu unbehandelten, infizierten Tieren und Mäusen, die mit einem Kontrollvektor behandelt wurden, deutlich verringert werden. Zwar zeigten histologische Untersuchungen auch in den behandelten Tieren einige Inflammationsherde, aber unabhängig durchgeführte Bewertungen zeigten eine signifikante Reduktion der Inflammation im Herzen bei sCAR-Fc exprimierenden Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dabei schien der Beginn der sCAR-Fc-Expression nach CVB3-Infektion keinen Einfluss auf die Verringerung der Inflammation zu haben.

Die Effektivität von sCAR-Fc, die Infiltration immunologischer Zellen in das Herz zu minimieren, resultiert in diesem Ansatz vermutlich aus zwei unterschiedlichen Mechanismen. Einerseits wird durch die Neutralisation des Virus und die dadurch vermittelte Inhibierung der Infektion von Kardiomyozyten die reaktive Infiltration immunologischer Zellen verringert. Andererseits gibt es Anhaltspunkte, dass sich sCAR-Fc ebenfalls antiinflammatorisch auswirkt. So wurde beschrieben, dass CAR an humanes IgG und IgM bindet, so dass eine mögliche Interaktion mit dem Immunsystem vermutet werden kann (Yanagawa et al., 2003).

Weiterhin zeigte die Behandlung von autoimmunen und inflammatorischen Krankheiten mit humanen Immunglobulinen einen anti-inflammatorischen Effekt (Takada et al., 1995). Dies lässt die Vermutung zu, dass sCAR-Fc unabhängig von seiner Virus-neutralisierenden Eigenschaft durch Interaktion mit dem Immunsystem ebenfalls einen positiven Effekt auf die Inflammation hat.

Dörner *et al.* zeigten in ihren Untersuchungen, dass eine im Menschen natürlich vorkommende sCAR-Variante, CAR4/7, ebenfalls in der Lage ist, CVB3 in der Maus zu inhibieren. Jedoch ergaben die Untersuchungen auch, dass neben der antiviralen Wirksamkeit CAR4/7 autoimmunologische Reaktionen induziert, so dass es zu einer dramatischen Verstärkung von inflammatorischen Prozessen im Herzen kam (Dörner et al., 2006).

Der diesem Phänomen zugrunde liegende Mechanismus konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Sowohl die spezifische Struktur von CAR4/7 als auch mögliche fehlende Proteinmodifikationen, wie Glykosylierung oder Verunreinigungen welche als Folge der Herstellung von CAR4/7 in Bakterien auftreten können, könnten eine Rolle spielen. Durch den Einsatz von viralen Vektoren, die eine Produktion des therapeutisch wirksamen Proteins *in vivo* ermöglichen, konnte die Problematik der Glykosylierung und Verunreinigung umgangen werden. So waren weder im Herzen noch in anderen parenchymalen Organen nach sCAR-Fc Expression *in vivo*, Inflammation nachweisbar. Außerdem gab es keine Hinweise auf Vektor-induzierte Inflammation in der Leber, dem Hauptzielorgan der AdV, ein Ergebnis, das die gute Verträglichkeit des AdG12 noch einmal unterstreicht.

Auch im therapeutischen Model konnte nach Anwendung von sCAR-Fc eine Verbesserung der Pumpfunktion des Herzens in CVB3-infizierten Tieren nachgewiesen werden. Mäuse, die Dox zeitgleich mit CVB3 bekommen haben, zeigten dabei eine signifikante Verbesserung der systolischen und diastolischen Parameter, während bei Mäusen, bei denen die sCAR-Fc Expression erst 24 Stunden nach der CVB3-Infektion induziert wurde, keine signifikante Verbesserung der Pumpfunktion auftrat.

Untersuchungen über die Stärke der CVB3-Infektion im Herzen mittels *in situ*-Hybridisierung und Plaque-Assay lassen vermuten, dass die Verbesserung der funktionellen Parameter auf eine effiziente Inhibierung der Virusinfektion im Herzen zurückzuführen ist. Dies zieht eine Verminderung der direkt viral-induzierten

Schädigung der Kardiomyozyten nach sich. Durch die geringere CVB3-Infektion im Herzen wird auch die reaktive Infiltration mit immunologischen Zellen verringert., was sich ebenfalls positiv auf die kardiale Pumpfunktion auswirkt (Pauschinger et al., 1999b).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl durch zeitgleiche als auch durch 24 Stunden verzögerte Induktion der sCAR-Fc-Expression nach CVB3-Infektion eine viral verursachte Myokarditis vermindert werden konnte. Ein kritischer Faktor für die Effizienz dieser Therapie ist dabei das Zeitintervall zwischen Infektion und Vorhandensein von sCAR-Fc im Serum. Weiterhin konnte in diesen Untersuchungen das erste Mal gezeigt werden, dass durch den therapeutischen Einsatz von sCAR-Fc im CVB3-Maus-Myokarditismodel eine Verbesserung der hämodynamischen Dysfunktion erreicht werden kann.

#### **5.4 Vergleich der drei gentherapeutischen Strategien zur Inhibierung der CVB3-Infektion im kardialen System**

Alle drei gentherapeutischen Strategien zur Inhibierung einer kardialen CVB3-Infektion zeigten eine antivirale Wirksamkeit *in vitro*. Dabei dienten in den RNAi-basierten Strategien kardiale Zellen als Untersuchungsobjekte, da diese bei einer CVB3-induzierten Myokarditis die Zielzellen des Virus darstellen. Bei beiden Ansätzen war es von oberster Priorität, dass die therapeutisch relevanten shRNAs direkt in den kardialen Zellen exprimiert wurden, um eine Inhibierung der Virusreplikation zu erlangen. Virale Vektoren dienten dabei zur effizienten Einbringung und Expression der therapeutischen shRNAs in die Zielzellen.

Werden die beiden RNAi-basierten Strategien miteinander verglichen, so erwies sich der Ansatz gegen die virale Zielstruktur als effizienter. So betrug die CVB3-Inhibierung der shRNA gegen den zellulären Rezeptor (shCAR) in NRCM ca.  $1\log_{10}$ -Stufe, dagegen bei der Verwendung von shRNAs gegen die virale Zielstruktur (shRdRP2.4)  $3\log_{10}$ -Stufen.

Des Weiteren zeigte die Verwendung der shRNAs gegen die virale Zielstruktur ebenfalls einen antiviralen Effekt bei bestehender CVB3-Infektion. Dabei nahm die

Effizienz der Inhibierung mit Vergrößerung des Zeitintervalls zwischen Virusinfektion und scAAV-shRdRP2.4-Transduktion kontinuierlich ab.

Untersuchungen zeigten weiterhin dass durch den langsamen Abbau des membranständigen CAR-Proteins in NRCM ein protektiver Schutz gegen eine CVB3-Infektion 3 Tage nach Transduktion mit AdshCAR2<sub>m</sub> nicht besteht. Dies lässt darauf schließen, dass der Einsatz der shRNAs gegen den zellulären Virusrezeptor nach einer Infektion keine Virus-inhibierende Wirkung zeigt. Bei einem *in vivo*-Einsatz stellte sich außerdem der anti-Rezeptoransatz als nicht praktikabel heraus, da CAR *knock out*-Analysen an Mäusen zeigten, dass eine Inhibierung der CAR-Expression auch im adulten Tier negative Effekte, z. B. auf die kardiale Reizweiterleitung, hat (Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008).

Der RNAi-Ansatz gegen die virale Zielstruktur zeigte in einem CVB3-Myokarditis-Mausmodell eine Inhibierung der viralen Infektion im Herzen um 70 %. Damit war er jedoch wesentlich ineffizienter als der Einsatz löslicher Rezeptoren. Bei einer protektiven Expression des sCAR-Fc durch AdG12 vor einer CVB3-Infektion konnte im Herzgewebe keine virale RNA gefunden werden. Das lässt auf einen kompletten Schutz gegen die kardiale CVB3-Infektion schließen. Auch der positive Effekt auf die Pumpfunktion des Herzens erwies sich bei sCAR-Fc wesentlich stärker als bei shRdRP2.4. Wurde sCAR-Fc vor der CVB3-Infektion exprimiert, glichen die hämodynamischen Daten von behandelten Mäusen denen nicht infizierter Mäuse.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der sCAR-Fc-Ansatz der effizienteste der drei Strategien war. Eine Hauptursache dafür ist sicherlich die Art der CVB3-Inhibierung durch Bildung von A-Partikeln nach Interaktion mit sCAR-Fc.

Dieser Effekt wirkt jedoch nur auf extrazelluläres Virus im Blut oder Interstitium. Die RNAi-Therapie gegen die CVB3-RdRP inhibiert intrazelluläres Virus und bedingt durch den Kardiotropismus von AAV2/9-Pseudotypen kann dies auch nach der Virämie und Infektion des Myokards erfolgen. Damit bietet dieser Ansatz eine mögliche therapeutische Alternative im chronischen Verlauf der Myokarditis, bei der die virale Replikation minimiert ist, freies infektiöses Virus nicht nachweisbar ist, die RNA und Transkriptionsprodukte jedoch weiterhin immunogen wirken und eine vorlaufende Inflammation induzieren (Klingel et al., 1992).

Ein interessanter und vielversprechender Ansatz wäre die Kombination beider Strategien. Dabei könnte die hocheffiziente CVB3-neutralisierende Eigenschaft des

sCAR-Fc mit der intrazellulären Inhibierung durch die RNAi-basierte Strategie kombiniert werden. Mit dieser Methode könnte eine Neuinfektion von kardialen Zellen verhindert und ebenfalls die virale RNA minimiert bzw. ganz aus der Zelle eliminiert werden.

## 6 Zusammenfassung

Entzündungen des Myokards können zu schwerwiegenden akuten und chronischen Beeinträchtigungen der Herzfunktion bis hin zur Herzinsuffizienz und dem Tod der Patienten führen. Enteroviren und vor allem Coxsackie-B-Viren gelten neben Adenoviren, Herpesviren und Parvovirus B19 zu den häufigsten Viren, die eine virale Myokarditis verursachen können. Die Therapie virusbedingter Kardio-myopathien basiert zurzeit hauptsächlich auf symptomatischer Behandlung, und neue kausale Therapieoptionen werden dringend gesucht. Molekulare und gentherapeutische Verfahren nehmen dabei einen breiten Raum ein, da sie gezielt gegen definierte Strukturen vorgehen können und somit das Potential besitzen, die Spezifität und damit verbunden die Effizienz der Therapie bedeutend zu erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene gentherapeutische Strategien hinsichtlich ihrer Effizienz und Sicherheit *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei ging es in erster Linie darum, die Infektion kardialer Zellen durch CVB3, dessen Replikation und die damit verbundene Schädigung der Wirtszelle zu verhindern.

Die ersten beiden Strategien basierten auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz, wobei der ersten Ansatz das Ziel hatte, die Anheftung des Virus an die Wirtszelle durch Herunterregulierung seines zellulären Rezeptors zu inhibieren. Dabei gelang es, die Expression des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR) als zelluläre Zielstruktur mittels Adenovektor-exprimierter *short hairpin* (sh)RNAs über 90 % zu inhibieren. Daraus resultierend, konnte eine Verringerung der viralen Replikation um 97 % in der kardialen Mauszelllinie HL-1 und 90 % in neonatalen Ratten-kardiomyozyten (NRCM) erzielt werden.

In der zweiten RNAi-basierten Strategie wurden zwei shRNAs, spezifisch gegen die CVB3-RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) als virale Zielstruktur von einem Adeno-assoziierten Virus (AAV)-Vektor (scAAV2/6-shRdRP2.4) in kardiale Zielzellen eingebracht und somit die virale Replikation in NRCM, in einem protektiven Ansatz um  $3\log_{10}$ -Stufen inhibiert. Erfolgte die Behandlung mit scAAV2/6-shRdRP2.4 nach CVB3-Infektion wurde ebenfalls eine signifikante Inhibierung der viralen Replikation, jedoch mit sinkender Effizienz [ $1\log_{10}$  (scAAV2/6-shRdRP2.4 30 Minuten nach CVB3-Infektion) bzw. 50 % (6 Stunden nach CVB3-Infektion)] beobachtet. Durch Verwendung von AAV2/9-Vektoren konnte anschließend mittels kardiospezifischen Gentransfers, die virale Replikation in einem CVB3-Myokarditis-Mausmodell um 70 %

verringert werden. Zusätzlich wurde erstmals mit RNAi-Technologie ein therapeutischer Effekt auf die Virus-induzierte kardiale Pumpfunktionsstörung erzielt. Dabei wurde eine Verbesserung der systolischen und diastolischen Parameter in den scAAV2/9-shRdRP2.4 behandelten Mäusen, im Vergleich zu Kontrolltieren (scAAV2/9-shGFP) festgestellt.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Blockade der Virus-Rezeptor-Interaktion durch lösliche Rezeptorproteine. Dabei wurde mittels Adenovektoren ein lösliches, rekombinantes Rezeptorprotein (sCAR-Fc) expremiert und dessen inhibitorische Wirkung auf die CVB3-Infektion untersucht. Um die Sicherheit bei einer *in vivo*-Anwendung zu erhöhen, wurde die Expression des sCAR-Fc mittels Tet-On-Genexpressionssysteme pharmakologisch regulierbar gemacht. Dabei war es möglich die Basalaktivität des Tet-On-Systems auf ein undetektierbares Level zu minimieren, ohne die Transaktivierbarkeit negativ zu beeinflussen. Diese betrug nach Zugabe des Tetrazyklin-Derivates Dox 2.700-fach und zählt damit zu den effizientesten, die mit dem Tetrazyklin regulierbarem Expressionssystem in AdV der ersten Generation erzielt wurden. Durch die Expression von sCAR-Fc konnte *in vitro* eine Inhibierung von CVB3 bis zu 11log<sub>10</sub>-Stufen erreicht werden, wenn die sCAR-Fc-Expression vor der CVB3-Infektion induziert wurde. Erfolgte die Expression 24 Stunden nach CVB3-Infektion, konnte abhängig von der eingesetzten Virusmenge eine Inhibierung der Virusreplikation bis zu 6log<sub>10</sub>-Stufen bestimmt werden. Anschließend wurde in einem CVB3-Myokarditis-Mausmodell durch prophylaktische Anwendung des Vektor-expremierten sCAR-Fc (vor CVB3-Infektion) eine komplette Inhibierung der kardialen Virusinfektion und Virus-induzierten Inflammation erreicht. Außerdem blieb die kardiale Pumpfunktion bei den behandelten Tieren unbeeinträchtigt. Wurde die sCAR-Fc Expression zeitgleich mit einer CVB3-Infektion bzw. 24 Stunden später induziert, konnte ebenfalls eine Inhibierung der kardialen Virusinfektion und Inflammation beobachtet werden. Auch in diesem therapeutischen Modell war es möglich, eine Virus-bedingte Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion durch sCAR-Fc signifikant abzumildern (Dox-Gabe zeitgleich mit CVB3-Infektion).

Somit konnte gezeigt werden, dass durch eine gerichtete antivirale Therapie mittels shRNAs gegen den zellulären Rezeptor bzw. das virale RNA-Genom sowie durch Verwendung eines löslichen Rezeptorproteins die Möglichkeit besteht, eine CVB3-induzierte Myokarditis in einem gentherapeutischen Ansatz zu verhindern bzw. ihren Verlauf abzumildern.

## 7 Summary

Inflammation of the myocardium can lead to severe acute and chronic impairment of heart function and even to cardiac insufficiency and death of the patient. Enteroviruses and especially coxsackieviruses are besides adenoviruses, herpesviruses, and parvovirus B19 the most common causes of viral myocarditis. The therapy of viral myocarditis is based mainly on symptomatic treatment, so there is urgent need for new options of causal therapy. Among these options molecular and gene therapeutic trials are the most promising as they can be directed against definite structures. They offer the potential to considerably increase specificity and thus efficiency of therapy.

In this thesis different gene therapeutic methods were tested for their *in vitro* and *in vivo* efficiency in preventing infection of cardiac cells with coxsackievirus B3 (CVB3) and thus viral replication and damage of the host cell.

The first and second strategy was based on RNA interference with the first strategy being directed against virus attachment to the host cell through down-regulation of the cellular coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR). CAR was down-regulated by over 90% by adenoviral vectors encoding short hairpin (sh)RNAs directed against CAR. This leads to reduction of viral replication by 97% in the cardiac cell line HL-1 and by 90% in neonatal rat cardiomyocytes (NRCM).

The second RNAi based strategy employed two shRNAs directed against a viral target, namely the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRP) of CVB3. The corresponding shRNAs were encoded by an adenovirus-associated virus (AAV) vector (scAAV2/6-shRdRP2.4). NRCM transduced by this vector before CVB3 infection reduced viral replication by  $3\log_{10}$ . An ongoing CVB3 infection was also inhibited by these vectors, but with lower efficiency [ $1\log_{10}$  (scAAV2/6-shRdRP2.4 30 min after CVB3 infection) and 50 % (6 h after CVB3 infection)]. Furthermore AAV2/9 vectors were used for cardiac-specific gene transfer and scAAV2/9-shRdRP2.4 reduced viral replication in a CVB3-myocarditis mouse model by 70 %. For the first time it was possible to achieve a therapeutic effect on virus-induced deficiency of the cardiac function by an RNAi-based antiviral therapy. Thereby, systolic and diastolic parameters in scAAV2/9-shRdRP2.4-treated mice were significantly improved in comparison to the control animals, treated with scAAV2/9-shGFP.

The third part of this thesis was based on a block of virus-receptor interaction by soluble receptor proteins. Therefore a recombinant soluble receptor protein (sCAR-Fc) was expressed by adenoviral vectors to evaluate the inhibitory effect on CVB3-infection. To improve the safety of this approach by *in vivo* application, the sCAR-Fc was expressed with a regulatable tet-on gene expression system. The tet-on system in this thesis shows no leakiness by strong trans-activation of sCAR-Fc expression 2.700fold, after addition of Dox. Thus it is one of the most efficient tetracyclin-regulatable expression systems, based on an adenovirus vector of the first generation. Expression of sCAR-Fc inhibited an *in vitro* infection of CVB3 up to  $11\log_{10}$  when sCAR-Fc expression was induced 24 h before CVB3 infection. However, depending on virus concentration, expression of sCAR-Fc 24 h after infection with CVB3, reduced viral replication by up to  $6\log_{10}$ .

In a myocarditis mouse model cardiac virus infection and virus-induced inflammation was completely inhibited through application of vector-expressed sCAR-Fc before CVB3 infection. Additionally, sCAR-Fc was able to protect mice for CVB3-induced cardiac dysfunction. Concomitant induction of sCAR-Fc led to strong reduction of cardiac CVB3 infection, myocardial injury and inflammation. Furthermore, sCAR-Fc expression concomitant with CVB3 infection shows significant improvement of cardiac contractility and diastolic relaxation, compared to CVB3 infected control mice. This work shows that antiviral RNAi-based therapy with shRNAs directed against CAR as a cellular target and RdRP as a viral target and the soluble receptor protein, sCAR-Fc are able to prevent or reduce CVB3-induced myocarditis.

## 8 Literaturverzeichnis

- Agha-Mohammadi,S. and Lotze,M.T. (2000). *Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. J Clin Invest* 105, 1177-1183.
- Agha-Mohammadi,S., O'Malley,M., Etemad,A., Wang,Z., Xiao,X., and Lotze,M.T. (2004). *Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. J Gene Med.* 6, 817-828.
- Ahn,J., Jun,E.S., Lee,H.S., Yoon,S.Y., Kim,D., Joo,C.H., Kim,Y.K., and Lee,H. (2005). *A small interfering RNA targeting coxsackievirus B3 protects permissive HeLa cells from viral challenge. J Virol.* 79, 8620-8624.
- Albanell,J., Lonardo,F., Rusch,V., Engelhardt,M., Langenfeld,J., Han,W., Klimstra,D., Venkatraman,E., Moore,M.A., and Dmitrovsky,E. (1997). *High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. J Natl. Cancer Inst.* 89, 1609-1615.
- Amalfitano,A., Hauser,M.A., Hu,H., Serra,D., Begy,C.R., and Chamberlain,J.S. (1998). *Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. J. Virol.* 72, 926-933.
- Anderson,J. and Akkina,R. (2005). *HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector. AIDS Res Ther.* 2, 1.
- Anderson,J., Banerjee,A., and Akkina,R. (2003). *Bispecific short hairpin siRNA constructs targeted to CD4, CXCR4, and CCR5 confer HIV-1 resistance. Oligonucleotides.* 13, 303-312.
- Arnold,E., Luo,M., Vriend,G., Rossmann,M.G., Palmenberg,A.C., Parks,G.D., Nicklin,M.J., and Wimmer,E. (1987). *Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 21-25.
- Arrighi,J.F., Pion,M., Wiznerowicz,M., Geijtenbeek,T.B., Garcia,E., Abraham,S., Leuba,F., Dutoit,V., Ducrey-Rundquist,O., van Kooyk,Y., Trono,D., and Pignatelli,B. (2004). *Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. J Virol.* 78, 10848-10855.
- Asher,D.R., Cerny,A.M., Weiler,S.R., Horner,J.W., Keeler,M.L., Neptune,M.A., Jones,S.N., Bronson,R.T., Depinho,R.A., and Finberg,R.W. (2005). *Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. Genesis.* 42, 77-85.
- Baboonian,C. and Treasure,T. (1997). *Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. Heart* 78, 539-543.
- Badorff,C., Lee,G.H., Lamphear,B.J., Martone,M.E., Campbell,K.P., Rhoads,R.E., and Knowlton,K.U. (1999). *Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. Nat. Med.* 5, 320-326.
- Baron,U. and Bujard,H. (2000). *Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. Methods Enzymol.* 327, 401-421.
- Bartel,D.P. (2004). *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell* 116, 281-297.

- Barton,G.M. and Medzhitov,R. (2002). *Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 14943-14945.
- Bergelson,J.M. (1999). *Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. Biochem. Pharmacol.* 57, 975-979.
- Bergelson,J.M., Cunningham,J.A., Droguett,G., Kurt-Jones,E.A., Krithivas,A., Hong,J.S., Horwitz,M.S., Crowell,R.L., and Finberg,R.W. (1997). *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science* 275, 1320-1323.
- Bergelson,J.M., Krithivas,A., Celi,L., Droguett,G., Horwitz,M.S., Wickham,T., Crowell,R.L., and Finberg,R.W. (1998). *The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. J Virol.* 72, 415-419.
- Bergelson,J.M., Mohanty,J.G., Crowell,R.L., St John,N.F., Lublin,D.M., and Finberg,R.W. (1995). *Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). J. Virol.* 69, 1903-1906.
- Berk,A.J. (2006). *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. D.M.Knipe, P.M.Howley, and D.E.Griffin, eds. Lippincott Williams & Wilkins).*
- Berns,K.I. (1990). *Parvovirus replication. Microbiol. Rev.* 54, 316-329.
- Berns,K.I. and Giraud,C. (1996). *Biology of adeno-associated virus. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 218, 1-23.
- Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., and Hannon,G.J. (2001a). *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature* 409, 363-366.
- Bernstein,E., Denli,A.M., and Hannon,G.J. (2001b). *The rest is silence. RNA.* 7, 1509-1521.
- Bitko,V., Musiyenko,A., Shulyayeva,O., and Barik,S. (2005). *Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. Nat. Med.* 11, 50-55.
- Blaese,R.M. (1995a). *Steps toward gene therapy: 1. The initial trials. Hosp. Pract. (Minneap. )* 30, 33-40.
- Blaese,R.M. (1995b). *Steps toward gene therapy: 2. Cancer and AIDS. Hosp. Pract. (Minneap. )* 30, 37-45.
- Blaese,R.M., Culver,K.W., Miller,A.D., Carter,C.S., Fleisher,T., Clerici,M., Shearer,G., Chang,L., Chiang,Y., Tolstoshev,P., Greenblatt,J.J., Rosenberg,S.A., Klein,H., Berger,M., Mullen,C.A., Ramsey,W.J., Muul,L., Morgan,R.A., and Anderson,W.F. (1995). *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. Science* 270, 475-480.
- Boden,D., Pusch,O., Lee,F., Tucker,L., and Ramratnam,B. (2003). *Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. J Virol.* 77, 11531-11535.
- Bowles,K.R., Gibson,J., Wu,J., Shaffer,L.G., Towbin,J.A., and Bowles,N.E. (1999). *Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene. Hum. Genet.* 105, 354-359.
- Bowles,N.E., Ni,J., Kearney,D.L., Pauschinger,M., Schultheiss,H.P., McCarthy,R., Hare,J., Bricker,J.T., Bowles,K.R., and Towbin,J.A. (2003). *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.* 42, 466-472.

- Bowles,N.E., Richardson,P.J., Olsen,E.G., and Archard,L.C. (1986). *Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. Lancet. 1, 1120-1123.*
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R., and Agami,R. (2002). *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science 296, 550-553.*
- Carmona,S., Ely,A., Crowther,C., Moolla,N., Salazar,F.H., Marion,P.L., Ferry,N., Weinberg,M.S., and Arbuthnot,P. (2006). *Effective inhibition of HBV replication in vivo by anti-HBx short hairpin RNAs. Mol Ther. 13, 411-421.*
- Carson,S.D. (2001). *Receptor for the group B coxsackieviruses and adenoviruses: CAR. Rev. Med. Virol. 11, 219-226.*
- Carson,S.D., Chapman,N.N., and Tracy,S.M. (1997). *Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 233, 325-328.*
- Catanzaro,A.T., Koup,R.A., Roederer,M., Bailer,R.T., Enama,M.E., Moodie,Z., Gu,L., Martin,J.E., Novik,L., Chakrabarti,B.K., Butman,B.T., Gall,J.G., King,C.R., Andrews,C.A., Sheets,R., Gomez,P.L., Mascola,J.R., Nabel,G.J., and Graham,B.S. (2006). *Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. J. Infect. Dis. 194, 1638-1649.*
- Chapman,N.M. and Kim,K.S. (2008). *Persistent coxsackievirus infection: enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 323, 275-292.*
- Chapman,N.M., Kim,K.S., Drescher,K.M., Oka,K., and Tracy,S. (2008). *5' terminal deletions in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. Virology 375, 480-491.*
- Chatterjee,N.K. and Nejman,C. (1985). *Membrane-bound virions of coxsackievirus B4: cellular localization, analysis of the genomic RNA, genome-linked protein, and effect on host macromolecular synthesis. Arch. Virol. 84, 105-118.*
- Chau,D.H., Yuan,J., Zhang,H., Cheung,P., Lim,T., Liu,Z., Sall,A., and Yang,D. (2007). *Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. Apoptosis. 12, 513-524.*
- Chen,J.W., Zhou,B., Yu,Q.C., Shin,S.J., Jiao,K., Schneider,M.D., Baldwin,H.S., and Bergelson,J.M. (2006). *Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves. Circ. Res. 98, 923-930.*
- Cherry,J.D., LERNER,A.M., KLEIN,J.O., and FINLAND,M. (1963). *Coxsackie B5 infections with exanthems. Pediatrics 31, 455-462.*
- Chiba,K., Yanagawa,Y., Masubuchi,Y., Kataoka,H., Kawaguchi,T., Ohtsuki,M., and Hoshino,Y. (1998). *FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. J. Immunol. 160, 5037-5044.*
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (2006). *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat. Protoc. 1, 581-585.*
- Christiansen,D., Devaux,P., Reveil,B., Evlashev,A., Horvat,B., Lamy,J., Rabourdin-Combe,C., Cohen,J.H., and Gerlier,D. (2000). *Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus in vitro and in vivo. J. Virol. 74, 4672-4678.*

- Chroboczek, J., Bieber, F., and Jacrot, B. (1992). The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 186, 280-285.
- Chung, S.K., Kim, J.Y., Kim, I.B., Park, S.I., Paek, K.H., and Nam, J.H. (2005). Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology* 333, 31-40.
- Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Jr., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., and Izzo, N.J., Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 2979-2984.
- Cohen, C.J., Shieh, J.T.C., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T., and Bergelson, J.M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *PNAS* 98, 15191-15196.
- Colston, E. and Racaniello, V.R. (1994). Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.* 13, 5855-5862.
- Conrad, C.K., Allen, S.S., Afione, S.A., Reynolds, T.C., Beck, S.E., Fee-Maki, M., Barraza-Ortiz, X., Adams, R., Askin, F.B., Carter, B.J., Guggino, W.B., and Flotte, T.R. (1996). Safety of single-dose administration of an adeno-associated virus (AAV)-CFTR vector in the primate lung. *Gene Ther.* 3, 658-668.
- Corti, O., Sabate, O., Horellou, P., Colin, P., Dumas, S., Buchet, D., Buc-Caron, M.H., and Mallet, J. (1999a). A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nat. Biotechnol.* 17, 349-354.
- Corti, O., Sanchez-Capelo, A., Colin, P., Hanoun, N., Hamon, M., and Mallet, J. (1999b). Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 12120-12125.
- Coyne, C.B. and Bergelson, J.M. (2005). CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 869-882.
- Coyne, C.B. and Bergelson, J.M. (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell.* 124, 119-131.
- Coyne, C.B., Voelker, T., Pichla, S.L., and Bergelson, J.M. (2004). The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J. Biol. Chem.* M409061200.
- Crowell, R.L. and Philipson, L. (1971). Specific alterations of coxsackievirus B3 eluted from HeLa cells. *J. Virol.* 8, 509-515.
- D'Ambrosio, A., Patti, G., Manzoli, A., Sinagra, G., Di, L.A., Silvestri, F., and Di, S.G. (2001). The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* 85, 499-504.
- Daliento, L., Calabrese, F., Tona, F., Caforio, A.L., Tarsia, G., Angelini, A., and Thiene, G. (2003). Successful treatment of enterovirus-induced myocarditis with interferon-alpha. *J. Heart Lung Transplant.* 22, 214-217.
- Dalldorf, G. and Sickles, G.M. (1948). An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis. *Science* 108, 61-62.
- Danthinne, X. and Imperiale, M.J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* 7, 1707-1714.

- Das,A.T., Brummelkamp,T.R., Westerhout,E.M., Vink,M., Madiredjo,M., Bernards,R., and Berkhout,B. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol.* 78, 2601-2605.
- Davison,E., Diaz,R.M., Hart,I.R., Santis,G., and Marshall,J.F. (1997). Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16. *J. Virol.* 71, 6204-6207.
- Dec,G.W. and Fuster,V. (1994). Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 331, 1564-1575.
- Deen,K.C., McDougal,J.S., Inacker,R., Folena-Wasserman,G., Arthos,J., Rosenberg,J., Maddon,P.J., Axel,R., and Sweet,R.W. (1988). A soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature* 331, 82-84.
- Deuschle,U., Meyer,W.K., and Thiesen,H.J. (1995). Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell Biol.* 15, 1907-1914.
- Dorner,A., Grunert,H.P., Lindig,V., Chandrasekharan,K., Fechner,H., Knowlton,K.U., Isik,A., Pauschinger,M., Zeichhardt,H., and Schultheiss,H.P. (2006). Treatment of coxsackievirus-B3-infected BALB/c mice with the soluble coxsackie adenovirus receptor CAR4/7 aggravates cardiac injury. *J. Mol. Med.* 84, 842-851.
- Dorner,A., Xiong,D., Couch,K., Yajima,T., and Knowlton,K.U. (2004). Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection. *J. Biol. Chem.* 279, 18497-18503.
- Dorner,A.A., Wegmann,F., Butz,S., Wolburg-Buchholz,K., Wolburg,H., Mack,A., Nasdala,I., August,B., Westermann,J., Rathjen,F.G., and Vestweber,D. (2005). Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J Cell Sci.* 118, 3509-3521.
- Drittanti,L., Rivet,C., Manceau,P., Danos,O., and Vega,M. (2000). High throughput production, screening and analysis of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther.* 7, 924-929.
- Du,L., Kido,M., Lee,D.V., Rabinowitz,J.E., Samulski,R.J., Jamieson,S.W., Weitzman,M.D., and Thistlethwaite,P.A. (2004). Differential myocardial gene delivery by recombinant serotype-specific adeno-associated viral vectors. *Mol. Ther.* 10, 604-608.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., and Tuschl,T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Weber,K., and Tuschl,T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.
- Elbashir,S.M., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Elbashir,S.M., Martinez,J., Patkaniowska,A., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.
- Excoffon,K.J., Traver,G.L., and Zabner,J. (2005). The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32, 498-503.
- Fairweather,D., Frisancho-Kiss,S., and Rose,N.R. (2005). Viruses as adjuvants for autoimmunity: evidence from Coxsackievirus-induced myocarditis. *Rev. Med. Virol.* 15, 17-27.
- Fairweather,D., Kaya,Z., Shellam,G.R., Lawson,C.M., and Rose,N.R. (2001). From infection to autoimmunity. *J. Autoimmun.* 16, 175-186.

- Fechner,H., Haack,A., Wang,H., Wang,X., Eizema,K., Pauschinger,M., Schoemaker,R., Veghel,R., Houtsmuller,A., Schultheiss,H.P., Lamers,J., and Poller,W. (1999). Expression of Coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther.* 6, 1520-1535.
- Fechner,H., Sipo,I., Westermann,D., Pinkert,S., Wang,X., Suckau,L., Kurreck,J., Zeichhardt,H., Muller,O., Vetter,R., Erdmann,V., Tschöpe,C., and Poller,W. (2008). Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. *J. Mol. Med.* 86, 987-997.
- Fechner,H., Suckau,L., Kurreck,J., Sipo,I., Wang,X., Pinkert,S., Loschen,S., Rekitke,J., Weger,S., Dekkers,D., Vetter,R., Erdmann,V.A., Schultheiss,H.P., Paul,M., Lamers,J., and Poller,W. (2006). Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban. *Gene Ther.* ..
- Fechner,H., Suckau,L., Kurreck,J., Sipo,I., Wang,X., Pinkert,S., Loschen,S., Rekitke,J., Weger,S., Dekkers,D., Vetter,R., Erdmann,V.A., Schultheiss,H.P., Paul,M., Lamers,J., and Poller,W. (2007a). Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban. *Gene Ther.* 14, 211-218.
- Fechner,H., Suckau,L., Kurreck,J., Sipo,I., Wang,X., Pinkert,S., Loschen,S., Rekitke,J., Weger,S., Dekkers,D., Vetter,R., Erdmann,V.A., Schultheiss,H.P., Paul,M., Lamers,J., and Poller,W. (2007c). Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban. *Gene Ther.* 14, 211-218.
- Fechner,H., Suckau,L., Kurreck,J., Sipo,I., Wang,X., Pinkert,S., Loschen,S., Rekitke,J., Weger,S., Dekkers,D., Vetter,R., Erdmann,V.A., Schultheiss,H.P., Paul,M., Lamers,J., and Poller,W. (2007b). Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban. *Gene Ther.* 14, 211-218.
- Fechner,H., Wang,X., Srour,M., Siemietzki,U., Seltmann,H., Sutter,A.P., Scherubl,H., Zouboulis,C.C., Schwaab,R., Hillen,W., Schultheiss,H.P., and Poller,W. (2003a). A novel tetracycline-controlled transactivator-transrepressor system enables external control of oncolytic adenovirus replication. *Gene Ther.* 10, 1680-1690.
- Fechner,H., Noutsias,M., Tschöpe,C., Hinze,K., Wang,X., Escher,F., Pauschinger,M., Dekkers,D., Vetter,R., Paul,M., Lamers,J., Schultheiss,H.P., and Poller,W. (2003b). Induction of Coxsackievirus-Adenovirus-Receptor Expression During Myocardial Tissue Formation and Remodeling: Identification of a Cell-to-Cell Contact-Dependent Regulatory Mechanism. *Circulation* 107, 876-882.
- Felker,G.M., Jaeger,C.J., Klodas,E., Thiemann,D.R., Hare,J.M., Hruban,R.H., Kasper,E.K., and Baughman,K.L. (2000). Myocarditis and long-term survival in peripartum cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 140, 785-791.
- Ferrari,F.K., Samulski,T., Shenk,T., and Samulski,R.J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 70, 3227-3234.
- Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., and Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fisher,K.J., Choi,H., Burda,J., Chen,S.J., and Wilson,J.M. (1996a). Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* 217, 11-22.
- Fisher,K.J., Gao,G.P., Weitzman,M.D., DeMatteo,R., Burda,J.F., and Wilson,J.M. (1996b). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J. Virol.* 70, 520-532.

Fisher,R.A., Bertonis,J.M., Meier,W., Johnson,V.A., Costopoulos,D.S., Liu,T., Tizard,R., Walker,B.D., Hirsch,M.S., Schooley,R.T., and . (1988). HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* 331, 76-78.

Flores-Otero,G., Fernandez-Tomas,C., and Gariglio-Vidal,P. (1982). DNA-bound RNA polymerases during poliovirus infection: reduction in the number of form II enzyme molecules. *Virology* 116, 619-628.

Fohlman,J., Pauksen,K., Hyypia,T., Eggertsen,G., Ehrnst,A., Ilback,N.G., and Friman,G. (1996a). Antiviral treatment with WIN 54 954 reduces mortality in murine coxsackievirus B3 myocarditis. *Circulation* 94, 2254-2259.

Fohlman,J., Pauksen,K., Hyypia,T., Eggertsen,G., Ehrnst,A., Ilback,N.G., and Friman,G. (1996b). Antiviral treatment with WIN 54 954 reduces mortality in murine coxsackievirus B3 myocarditis. *Circulation* 94, 2254-2259.

Fradkin,L.G., Yoshinaga,S.K., Berk,A.J., and Dasgupta,A. (1987). Inhibition of host cell RNA polymerase III-mediated transcription by poliovirus: inactivation of specific transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 7, 3880-3887.

Freundlieb,S., Schirra-Muller,C., and Bujard,H. (1999). A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J. Gene Med.* 1, 4-12.

Fricks,C.E. and Hogle,J.M. (1990a). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 64, 1934-1945.

Fricks,C.E. and Hogle,J.M. (1990b). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 64, 1934-1945.

Gao,G.P., Alvira,M.R., Wang,L., Calcedo,R., Johnston,J., and Wilson,J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 11854-11859.

Gao,G.P., Yang,Y., and Wilson,J.M. (1996). Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J. Virol.* 70, 8934-8943.

Gao,W., Soloff,A.C., Lu,X., Montecalvo,A., Nguyen,D.C., Matsuoka,Y., Robbins,P.D., Swayne,D.E., Donis,R.O., Katz,J.M., Barratt-Boyes,S.M., and Gambotto,A. (2006). Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J. Virol.* 80, 1959-1964.

Gao,X., Wang,H., and Sairenji,T. (2004). Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation by short interfering RNAs targeting p38 mitogen-activated protein kinase or c-myc in EBV-positive epithelial cells. *J Virol.* 78, 11798-11806.

Gauntt,C. and Huber,S. (2003). Coxsackievirus experimental heart diseases. *Front Biosci.* 8, e23-e35.

Gilgenkrantz,H., Duboc,D., Juillard,V., Couton,D., Pavirani,A., Guillet,J.G., Briand,P., and Kahn,A. (1995). Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first-generation adenoviral vectors: role of the immune response. *Hum. Gene Ther.* 6, 1265-1274.

Gitlin,L., Stone,J.K., and Andino,R. (2005). Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *J Virol.* 79, 1027-1035.

- Godeny, E.K. and Gauntt, C.J. (1986). Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *J. Immunol.* 137, 1695-1702.
- Goodfellow, I.G., Evans, D.J., Blom, A.M., Kerrigan, D., Miners, J.S., Morgan, B.P., and Spiller, O.B. (2005). Inhibition of coxsackie B virus infection by soluble forms of its receptors: binding affinities, altered particle formation, and competition with cellular receptors. *J Virol.* 79, 12016-12024.
- Gorziglia, M.I., Kadan, M.J., Yei, S., Lim, J., Lee, G.M., Luthra, R., and Trapnell, B.C. (1996). Elimination of both E1 and E2 from adenovirus vectors further improves prospects for in vivo human gene therapy. *J. Virol.* 70, 4173-4178.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- Grable, M. and Hearing, P. (1990). Adenovirus type 5 packaging domain is composed of a repeated element that is functionally redundant. *J. Virol.* 64, 2047-2056.
- Greve, J.M., Forte, C.P., Marlor, C.W., Meyer, A.M., Hoover-Litty, H., Wunderlich, D., and McClelland, A. (1991). Mechanisms of receptor-mediated rhinovirus neutralization defined by two soluble forms of ICAM-1. *J. Virol.* 65, 6015-6023.
- Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M.A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537-541.
- Hajjar, R.J., Schmidt, U., Matsui, T., Guerrero, J.L., Lee, K.H., Gwathmey, J.K., Dec, G.W., Semigran, M.J., and Rosenzweig, A. (1998). Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5251-5256.
- Halbert, C.L., Allen, J.M., and Miller, A.D. (2001). Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J. Virol.* 75, 6615-6624.
- Hall, C.B. and Miller, D.G. (1969). The detection of a silent coxsackie B-5 virus perinatal infection. *J. Pediatr.* 75, 124-127.
- Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y., and Phipps, M.L. (1997). Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J. Virol.* 71, 1842-1849.
- Harris, C.L., Williams, A.S., Linton, S.M., and Morgan, B.P. (2002). Coupling complement regulators to immunoglobulin domains generates effective anti-complement reagents with extended half-life in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 198-207.
- Harui, A., Suzuki, S., Kochanek, S., and Mitani, K. (1999). Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J. Virol.* 73, 6141-6146.
- Harvey, B.G., Leopold, P.L., Hackett, N.R., Grasso, T.M., Williams, P.M., Tucker, A.L., Kaner, R.J., Ferris, B., Gonda, I., Sweeney, T.D., Ramalingam, R., Kovesdi, I., Shak, S., and Crystal, R.G. (1999). Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J. Clin. Invest* 104, 1245-1255.
- He, Y., Chipman, P.R., Howitt, J., Bator, C.M., Whitt, M.A., Baker, T.S., Kuhn, R.J., Anderson, C.W., Freimuth, P., and Rossmann, M.G. (2001). Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nat. Struct. Biol.* 8, 874-878.

- Henke,A., Launhardt,H., Klement,K., Stelzner,A., Zell,R., and Munder,T. (2000). Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J. Virol.* 74, 4284-4290.
- Henke,A., Zell,R., Martin,U., and Stelzner,A. (2003). Direct interferon-gamma-mediated protection caused by a recombinant coxsackievirus B3. *Virology* 315, 335-344.
- Henry,S.D., van der,W.P., Metselaar,H.J., Tilanus,H.W., Scholte,B.J., and van der Laan,L.J. (2006). Simultaneous targeting of HCV replication and viral binding with a single lentiviral vector containing multiple RNA interference expression cassettes. *Mol. Ther.* 14, 485-493.
- Hermonat,P.L., Labow,M.A., Wright,R., Berns,K.I., and Muzyczka,N. (1984). Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J. Virol.* 51, 329-339.
- High,K.A. (2003). Gene transfer as an approach to treating hemophilia. *Semin. Thromb. Hemost.* 29, 107-120.
- Ho,D.Y., McLaughlin,J.R., and Sapolsky,R.M. (1996). Inducible gene expression from defective herpes simplex virus vectors using the tetracycline-responsive promoter system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 41, 200-209.
- Hoffmann,D., Heim,A., Nettelbeck,D.M., Steinstraesser,L., and Wildner,O. (2007). Evaluation of twenty human adenoviral types and one infectivity-enhanced adenovirus for the therapy of soft tissue sarcoma. *Hum. Gene Ther.* 18, 51-62.
- Hogle,J.M. (2002). Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 677-702.
- Honda,T., Saitoh,H., Masuko,M., Katagiri-Abe,T., Tominaga,K., Kozakai,I., Kobayashi,K., Kumanishi,T., Watanabe,Y.G., Odani,S., and Kuwano,R. (2000). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 77, 19-28.
- Hu,L., Wang,Z., Hu,C., Liu,X., Yao,L., Li,W., and Qi,Y. (2005). Inhibition of Measles virus multiplication in cell culture by RNA interference. *Acta Virol.* 49, 227-234.
- Hu,S.X., Ji,W., Zhou,Y., Logothetis,C., and Xu,H.J. (1997). Development of an adenovirus vector with tetracycline-regulatable human tumor necrosis factor alpha gene expression. *Cancer Res.* 57, 3339-3343.
- Huang,K.C., Altinoz,M., Wosik,K., Larochelle,N., Koty,Z., Zhu,L., Holland,P.C., and Nalbantoglu,J. (2005). Impact of the coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on glioma cell growth and invasion: requirement for the C-terminal domain. *Int. J. Cancer* 113, 738-745.
- Huang,Q., Zhang,X., Wang,H., Yan,B., Kirkpatrick,J., Dewhrist,M.W., and Li,C.Y. (2004). A Novel Conditionally Replicative Adenovirus Vector Targeting Telomerase-Positive Tumor Cells. *Clin Cancer Res* 10, 1439-1445.
- Huber,S.A. (1997). Autoimmunity in myocarditis: relevance of animal models. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83, 93-102.
- Huber,S.A., Gauntt,C.J., and Sakkinen,P. (1998). Enteroviruses and myocarditis: viral pathogenesis through replication, cytokine induction, and immunopathogenicity. *Adv. Virus Res.* 51, 35-80.

- Inagaki,K., Fuess,S., Storm,T.A., Gibson,G.A., McTiernan,C.F., Kay,M.A., and Nakai,H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther.* 14, 45-53.
- Jazwa,A., Jozkowicz,A., and Dulak,J. (2007). New vectors and strategies for cardiovascular gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 7, 7-23.
- Jenista,J.A., Powell,K.R., and Menegus,M.A. (1984). Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J. Pediatr.* 104, 685-690.
- Jin,O., Sole,M.J., Butany,J.W., Chia,W.K., McLaughlin,P.R., Liu,P., and Liew,C.C. (1990). Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation* 82, 8-16.
- Kandolf,R. (2004). [Virus etiology of inflammatory cardiomyopathy]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 129, 2187-2192.
- Kandolf,R., Canu,A., and Hofschneider,P.H. (1985). Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon. *J. Mol. Cell Cardiol.* 17, 167-181.
- Kandolf,R., Klingel,K., Zell,R., Canu,A., Fortmuller,U., Hohenadl,C., Albrecht,M., Reimann,B.Y., Franz,W.M., Heim,A., and . (1993). Molecular mechanisms in the pathogenesis of enteroviral heart disease: acute and persistent infections. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 68, 153-158.
- Kaplan,G., Freistadt,M.S., and Racaniello,V.R. (1990). Neutralization of poliovirus by cell receptors expressed in insect cells. *J. Virol.* 64, 4697-4702.
- Kaplitt,M.G., Leone,P., Samulski,R.J., Xiao,X., Pfaff,D.W., O'Malley,K.L., and During,M.J. (1994b). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat. Genet.* 8, 148-154.
- Kaplitt,M.G., Leone,P., Samulski,R.J., Xiao,X., Pfaff,D.W., O'Malley,K.L., and During,M.J. (1994c). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat. Genet.* 8, 148-154.
- Kaplitt,M.G., Leone,P., Samulski,R.J., Xiao,X., Pfaff,D.W., O'Malley,K.L., and During,M.J. (1994a). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat. Genet.* 8, 148-154.
- Kawabata,K., Tashiro,K., Sakurai,F., Osada,N., Kusuda,J., Hayakawa,T., Yamanishi,K., and Mizuguchi,H. (2007). Positive and negative regulation of adenovirus infection by CAR-like soluble protein, CLSP. *Gene Ther.* 14, 1199-1207.
- Kawai,C. (1999). From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 99, 1091-1100.
- Kay,M.A. and Nakai,H. (2003). Looking into the safety of AAV vectors. *Nature* 424, 251.
- Ketting,R.F., Fischer,S.E., Bernstein,E., Sijen,T., Hannon,G.J., and Plasterk,R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654-2659.
- Khetsuriani,N., Lamonte,A., Oberste,M.S., and Pallansch,M. (2006). Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983-2003. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25, 889-893.

- Kim, J.Y., Chung, S.K., Hwang, H.Y., Kim, H., Kim, J.H., Nam, J.H., and Park, S.I. (2007). Expression of short hairpin RNAs against the coxsackievirus B3 exerts potential antiviral effects in Cos-7 cells and in mice. *Virus Res.* ..
- Kim, K.S., Chapman, N.M., and Tracy, S. (2008). Replication of coxsackievirus B3 in primary cell cultures generates novel viral genome deletions. *J. Virol.* 82, 2033-2037.
- Kim, K.S., Hufnagel, G., Chapman, N.M., and Tracy, S. (2001). The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev. Med. Virol.* 11, 355-368.
- Kim, K.S., Tracy, S., Tappich, W., Bailey, J., Lee, C.K., Kim, K., Barry, W.H., and Chapman, N.M. (2005). 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J. Virol.* 79, 7024-7041.
- Kim, M., Sumerel, L.A., Belousova, N., Lyons, G.R., Carey, D.E., Krasnykh, V., and Douglas, J.T. (2003). The coxsackievirus and adenovirus receptor acts as a tumour suppressor in malignant glioma cells. *Br. J. Cancer* 88, 1411-1416.
- Kingsnorth, A. and O'Reilly, D. (2006). Acute pancreatitis. *BMJ* 332, 1072-1076.
- Kishimoto, C., Kitazawa, M., Hiraoka, Y., and Takada, H. (1997). Extracellular matrix remodeling in coxsackievirus B3 myocarditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 85, 47-55.
- Klingel, K., Hohenadl, C., Canu, A., Albrecht, M., Seemann, M., Mall, G., and Kandolf, R. (1992). Ongoing Enterovirus-Induced Myocarditis is Associated with Persistent Heart Muscle Infection: Quantitative Analysis of Virus Replication, Tissue Damage, and Inflammation. *PNAS* 89, 314-318.
- Klump, W.M., Bergmann, I., Muller, B.C., Ameis, D., and Kandolf, R. (1990). Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 64, 1573-1583.
- Knowlton, K.U. (2008). CVB infection and mechanisms of viral cardiomyopathy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 323, 315-335.
- Knowlton, K.U. and Badorff, C. (1999). The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance. *Circ. Res.* 85, 559-561.
- Kochanek, S., Clemens, P.R., Mitani, K., Chen, H.H., Chan, S., and Caskey, C.T. (1996). A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5731-5736.
- Koss, K.L., Grupp, I.L., and Kranias, E.G. (1997). The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardiol.* 92 Suppl 1:17-24., 17-24.
- Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Lee, C.K., and Wimmer, E. (1988). Polyprotein processing in picornavirus replication. *Biochimie* 70, 119-130.
- Kuhl, U., Pauschinger, M., Bock, T., Klingel, K., Schwimbeck, C.P., Seeberg, B., Krautwurm, L., Poller, W., Schultheiss, H.P., and Kandolf, R. (2003a). Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 108, 945-950.
- Kuhl, U., Pauschinger, M., Noutsias, M., Seeberg, B., Bock, T., Lassner, D., Poller, W., Kandolf, R., and Schultheiss, H.P. (2005a). High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 111, 887-893.

- Kuhl,U., Pauschinger,M., Noutsias,M., Seeberg,B., Bock,T., Lassner,D., Poller,W., Kandolf,R., and Schultheiss,H.P. (2005b). High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 111, 887-893.
- Kuhl,U., Pauschinger,M., Schwimmbeck,P.L., Seeberg,B., Lober,C., Noutsias,M., Poller,W., and Schultheiss,H.P. (2003b). Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 107, 2793-2798.
- Kuhl,U., Pauschinger,M., Seeberg,B., Lassner,D., Noutsias,M., Poller,W., and Schultheiss,H.P. (2005c). Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 112, 1965-1970.
- Kumar-Singh,R. and Chamberlain,J.S. (1996). Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* 5, 913-921.
- Lai,C.M., Lai,Y.K., and Rakoczy,P.E. (2002). Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol.* 21, 895-913.
- Lamartina,S., Roscilli,G., Rinaudo,C.D., Sporeno,E., Silvi,L., Hillen,W., Bujard,H., Cortese,R., Ciliberto,G., and Toniatti,C. (2002). Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum. Gene Ther.* 13, 199-210.
- Lamphear,B.J., Yan,R., Yang,F., Waters,D., Liebig,H.D., Klump,H., Kuechler,E., Skern,T., and Rhoads,R.E. (1993). Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *J. Biol. Chem.* 268, 19200-19203.
- Lee,W.M., Monroe,S.S., and Rueckert,R.R. (1993). Role of maturation cleavage in infectivity of picornaviruses: activation of an infectosome. *J. Virol.* 67, 2110-2122.
- Leipner,C., Grun,K., Schneider,I., Gluck,B., Sigusch,H.H., and Stelzner,A. (2004). Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice. *Med. Microbiol. Immunol.* 193, 141-147.
- Li,B.J., Tang,Q., Cheng,D., Qin,C., Xie,F.Y., Wei,Q., Xu,J., Liu,Y., Zheng,B.J., Woodle,M.C., Zhong,N., and Lu,P.Y. (2005). Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat. Med.* 11, 944-951.
- Liebig,H.D., Ziegler,E., Yan,R., Hartmuth,K., Klump,H., Kowalski,H., Blaas,D., Sommergruber,W., Frasel,L., Lamphear,B., and . (1993). Purification of two picornaviral 2A proteinases: interaction with eIF-4 gamma and influence on in vitro translation. *Biochemistry* 32, 7581-7588.
- Lim,B.K., Choi,J.H., Nam,J.H., Gil,C.O., Shin,J.O., Yun,S.H., Kim,D.K., and Jeon,E.S. (2006). Virus receptor trap neutralizes coxsackievirus in experimental murine viral myocarditis. *Cardiovasc. Res.* ..
- Lim,B.K., Xiong,D., Dorner,A., Youn,T.J., Yung,A., Liu,T.I., Gu,Y., Dalton,N.D., Wright,A.T., Evans,S.M., Chen,J., Peterson,K.L., McCulloch,A.D., Yajima,T., and Knowlton,K.U. (2008). Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart. *J. Clin. Invest.*
- Lisewski,U., Shi,Y., Wrackmeyer,U., Fischer,R., Chen,C., Schirdewan,A., Juttner,R., Rathjen,F., Poller,W., Radke,M.H., and Gotthardt,M. (2008). The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *J. Exp. Med.* 205, 2369-2379.
- Liu,F., Song,Y., and Liu,D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 6, 1258-1266.

- Liu,Z., Yuan,J., Yanagawa,B., Qiu,D., McManus,B.M., and Yang,D. (2005). *Coxsackievirus-induced myocarditis: new trends in treatment. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 3, 641-650.
- Lodge,P.A., Herzum,M., Olszewski,J., and Huber,S.A. (1987). *Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. Am. J. Pathol.* 128, 455-463.
- Lund,E., Guttinger,S., Calado,A., Dahlberg,J.E., and Kutay,U. (2004). *Nuclear export of microRNA precursors. Science* 303, 95-98.
- Lusky,M., Christ,M., Rittner,K., Dieterle,A., Dreyer,D., Mourot,B., Schultz,H., Stoeckel,F., Pavirani,A., and Mehtali,M. (1998). *In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. J. Virol.* 72, 2022-2032.
- Lyon,A.R., Sato,M., Hajjar,R.J., Samulski,R.J., and Harding,S.E. (2008). *Gene therapy: targeting the myocardium. Heart* 94, 89-99.
- Magari,S.R., Rivera,V.M., Iuliucci,J.D., Gilman,M., and Cerasoli,F., Jr. (1997). *Pharmacologic control of a humanized gene therapy system implanted into nude mice. J. Clin. Invest* 100, 2865-2872.
- Maione,D., Wiznerowicz,M., Delmastro,P., Cortese,R., Ciliberto,G., La,M.N., and Savino,R. (2000). *Prolonged expression and effective readministration of erythropoietin delivered with a fully deleted adenoviral vector. Hum. Gene Ther.* 11, 859-868.
- Maisch,B., Alter,P., Karatolius,K., Ruppert,V., and Pankuweit,S. (2007). *[The heart in cases of viral, bacterial and parasitic infections]. Internist (Berl)* 48, 255-267.
- Majhen,D. and mbriovic-Ristov,A. (2006). *Adenoviral vectors--how to use them in cancer gene therapy? Virus Res.* 119, 121-133.
- Mapoles,J.E., Krah,D.L., and Crowell,R.L. (1985). *Purification of a HeLa cell receptor protein for group B coxsackieviruses. J. Virol.* 55, 560-566.
- Marchant,D., Si,X., Luo,H., McManus,B., and Yang,D. (2008). *The impact of CVB3 infection on host cell biology. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 323, 177-198.
- Martinez,J., Patkaniowska,A., Urlaub,H., Luhrmann,R., and Tuschl,T. (2002). *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. Cell* 110, 563-574.
- Martino,T.A., Liu,P., and Sole,M.J. (1994). *Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. Circ. Res.* 74, 182-188.
- Mathias,P., Galleno,M., and Nemerow,G.R. (1998). *Interactions of soluble recombinant integrin alphav beta5 with human adenoviruses. J. Virol.* 72, 8669-8675.
- Matsumori,A. (1997). *Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy--role of viruses, cytokines, and nitric oxide. Jpn. Circ. J.* 61, 275-291.
- Matsumori,A. (2000). *Hepatitis C virus and cardiomyopathy. Herz* 25, 249-254.
- Matsumoto,K., Shariat,S.F., Ayala,G.E., Rauwen,K.A., and Lerner,S.P. (2005). *Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression is associated with features of aggressive bladder cancer. Urology* 66, 441-446.
- Mattila,P.K. and Lappalainen,P. (2008). *Filopodia: molecular architecture and cellular functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 446-454.

- McCaffrey,A.P., Nakai,H., Pandey,K., Huang,Z., Salazar,F.H., Xu,H., Wieland,S.F., Marion,P.L., and Kay,M.A. (2003). *Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. Nat. Biotechnol.* 21, 639-644.
- McCarthy,R.E., III, Boehmer,J.P., Hruban,R.H., Hutchins,G.M., Kasper,E.K., Hare,J.M., and Baughman,K.L. (2000). *Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. N. Engl. J Med.* 342, 690-695.
- McCarty,D.M., Fu,H., Monahan,P.E., Toulson,C.E., Naik,P., and Samulski,R.J. (2003). *Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. Gene Ther.* 10, 2112-2118.
- McCarty,D.M., Monahan,P.E., and Samulski,R.J. (2001). *Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. Gene Ther.* 8, 1248-1254.
- McManus,B.M., Chow,L.H., Wilson,J.E., Anderson,D.R., Gulizia,J.M., Gauntt,C.J., Klingel,K.E., Beisel,K.W., and Kandolf,R. (1993). *Direct Myocardial Injury by Enterovirus: A Central Role in the Evolution of Murine Myocarditis. Clinical Immunology and Immunopathology* 68, 159-169.
- Meerovitch,K., Pelletier,J., and Sonenberg,N. (1989). *A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. Genes Dev.* 3, 1026-1034.
- Melnick J.L. (1996). *Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and newer Enteroviruses. In Fields Virology, Fields B.N., Knipe D.M., and Howley P.M., eds. (Philadelphia: Lippincott-Raven), pp. 655-712.*
- Melnick,J.L. (1996). *My role in the discovery and classification of the enteroviruses. Annu. Rev. Microbiol.* 50, 1-24.
- Merl,S., Michaelis,C., Jaschke,B., Vorpahl,M., Seidl,S., and Wessely,R. (2005). *Targeting 2A protease by RNA interference attenuates coxsackieviral cytopathogenicity and promotes survival in highly susceptible mice. Circulation* 111, 1583-1592.
- Merl,S. and Wessely,R. (2007). *Anti-coxsackieviral efficacy of RNA interference is highly dependent on genomic target selection and emergence of escape mutants. Oligonucleotides.* 17, 44-53.
- Milstone,A.M., Petrella,J., Sanchez,M.D., Mahmud,M., Whitbeck,J.C., and Bergelson,J.M. (2005). *Interaction with coxsackievirus and adenovirus receptor, but not with decay-accelerating factor (DAF), induces A-particle formation in a DAF-binding coxsackievirus B3 isolate. J. Virol.* 79, 655-660.
- Mirand,A., Henquell,C., Archimbaud,C., Chambon,M., Charbonne,F., Peigue-Lafeuille,H., and Bailly,J.L. (2008). *Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol.* 46, 87-96.
- Miric,M., Vasiljevic,J., Bojic,M., Popovic,Z., Keserovic,N., and Pesic,M. (1996). *Long-term follow up of patients with dilated heart muscle disease treated with human leucocytic interferon alpha or thymic hormones initial results. Heart* 75, 596-601.
- Miyamoto,T., Matsumori,A., Hwang,M.W., Nishio,R., Ito,H., and Sasayama,S. (2001). *Therapeutic effects of FTY720, a new immunosuppressive agent, in a murine model of acute viral myocarditis. J. Am. Coll. Cardiol.* 37, 1713-1718.
- Mizuguchi,H. and Hayakawa,T. (2002). *The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. J. Gene Med.* 4, 240-247.

- Mizuguchi,H., Xu,Z.L., Sakurai,F., Mayumi,T., and Hayakawa,T. (2003). Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions. *Hum. Gene Ther.* 14, 1265-1277.
- Muckelbauer,J.K., Kremer,M., Minor,I., Diana,G., Dutko,F.J., Groarke,J., Pevear,D.C., and Rossmann,M.G. (1995). The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure.* 3, 653-667.
- Muller,O.J., Leuchs,B., Pleger,S.T., Grimm,D., Franz,W.M., Katus,H.A., and Kleinschmidt,J.A. (2006). Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc. Res.* 70, 70-78.
- Murray,J.L., Mavrikis,M., McDonald,N.J., Yilla,M., Sheng,J., Bellini,W.J., Zhao,L., Le Doux,J.M., Shaw,M.W., Luo,C.C., Lippincott-Schwartz,J., Sanchez,A., Rubin,D.H., and Hodge,T.W. (2005). Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses, and measles virus. *J Virol.* 79, 11742-11751.
- Nakagawa,S., Massie,B., and Hawley,R.G. (2001). Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: pharmacologic properties and clinical potential. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 53-60.
- Nakai,H., Yant,S.R., Storm,T.A., Fuess,S., Meuse,L., and Kay,M.A. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J. Virol.* 75, 6969-6976.
- No,D., Yao,T.P., and Evans,R.M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3346-3351.
- Noutsias,M., Fechner,H., de Jonge,H., Wang,X., Dekkers,D., Houtsmuller,A.B., Pauschinger,M., Bergelson,J., Warraich,R., Yacoub,M., Hetzer,R., Lamers,J., Schultheiss,H.P., and Poller,W. (2001). 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* 104, 275-280.
- Olsen,P.H. and Ambros,V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* 216, 671-680.
- Pacak,C.A., Mah,C.S., Thattaliyath,B.D., Conlon,T.J., Lewis,M.A., Cloutier,D.E., Zolotukhin,I., Tarantal,A.F., and Byrne,B.J. (2006). Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo. *Circ Res* 99, e3-e9.
- Pallausch,M. and Ross R (2007). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. In *Fields Virology*, Knipe D.M., Howley P.M., and Griffin D.E., eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
- Palliser,D., Chowdhury,D., Wang,Q.Y., Lee,S.J., Bronson,R.T., Knipe,D.M., and Lieberman,J. (2006). An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 439, 89-94.
- Palomeque,J., Chemaly,E.R., Colosi,P., Wellman,J.A., Zhou,S., Del,M.F., and Hajjar,R.J. (2007). Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo. *Gene Ther.* 14, 989-997.
- Park,W.S., Hayafune,M., Miyano-Kurosaki,N., and Takaku,H. (2003). Specific HIV-1 env gene silencing by small interfering RNAs in human peripheral blood mononuclear cells. *Gene Ther.* 10, 2046-2050.

- Pauschinger, M., Bowles, N.E., Fuentes-Garcia, F.J., Pham, V., Kuhl, U., Schwimmbeck, P.L., Schultheiss, H.P., and Towbin, J.A. (1999a). Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 99, 1348-1354.
- Pauschinger, M., Chandrasekharan, K., Li, J., Schwimmbeck, P.L., Noutsias, M., and Schultheiss, H.P. (2002). [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz* 27, 677-682.
- Pauschinger, M., Chandrasekharan, K., Noutsias, M., Kuhl, U., Schwimmbeck, L.P., and Schultheiss, H.P. (2004). Viral heart disease: molecular diagnosis, clinical prognosis, and treatment strategies. *Med. Microbiol. Immunol.* 193, 65-69.
- Pauschinger, M., Doerner, A., Kuehl, U., Schwimmbeck, P.L., Poller, W., Kandolf, R., and Schultheiss, H.P. (1999b). Enteroviral RNA Replication in the Myocardium of Patients With Left Ventricular Dysfunction and Clinically Suspected Myocarditis. *Circulation* 99, 889-895.
- Pauschinger, M., Knopf, D., Petschauer, S., Doerner, A., Poller, W., Schwimmbeck, P.L., Kuhl, U., and Schultheiss, H.P. (1999c). Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 99, 2750-2756.
- Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.
- Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1989). Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *J. Virol.* 63, 441-444.
- Petrella, J., Cohen, C.J., Gaetz, J., and Bergelson, J.M. (2002). A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus. *J. Virol.* 76, 10503-10506.
- Pevear, D.C., Tull, T.M., Seipel, M.E., and Groarke, J.M. (1999). Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2109-2115.
- Philpison, L. and Pettersson, R.F. (2004). The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 273, 87-111.
- Ping, Y.H., Chu, C.Y., Cao, H., Jacque, J.M., Stevenson, M., and Rana, T.M. (2004). Modulating HIV-1 replication by RNA interference directed against human transcription elongation factor SPT5. *Retrovirology.* 1, 46.
- Pluta, K., Luce, M.J., Bao, L., Agha-Mohammadi, S., and Reiser, J. (2005). Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *J Gene Med.* 7, 803-817.
- Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* 76, 791-801.
- Raper, S.E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G.P., Nunes, F., Haskal, Z.J., Furth, E.E., Probert, K.J., Robinson, M.B., Magosin, S., Simoes, H., Speicher, L., Hughes, J., Tazelaar, J., Wivel, N.A., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum. Gene Ther.* 13, 163-175.
- Raschperger, E., Engstrom, U., Pettersson, R.F., and Fuxe, J. (2004). CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J. Biol. Chem.* 279, 796-804.

- Reetoo, K.N., Osman, S.A., Illavia, S.J., Cameron-Wilson, C.L., Banatvala, J.E., and Muir, P. (2000). Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis: biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease. *J. Gen. Virol.* 81, 2755-2762.
- Rendahl, K.G., Quiroz, D., Ladner, M., Coyne, M., Seltzer, J., Manning, W.C., and Escobedo, J.A. (2002). Tightly regulated long-term erythropoietin expression in vivo using tet-inducible recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum. Gene Ther.* 13, 335-342.
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarsfas, I., Martin, I., and Nordet, P. (1996). Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93, 841-842.
- Romero, J.R. (2008). Pediatric group B coxsackievirus infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 323, 223-239.
- Rubinichik, S., Woraratanadharm, J., Yu, H., and Dong, J.Y. (2005). New complex Ad vectors incorporating both rtTA and tTS deliver tightly regulated transgene expression both in vitro and in vivo. *Gene Ther* 12, 504-511.
- Russell, W.C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* 81 Pt 11:2573-604, 2573-2604.
- Santoro, F., Kennedy, P.E., Locatelli, G., Malnati, M.S., Berger, E.A., and Lusso, P. (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99, 817-827.
- Scherr, M., Morgan, M.A., and Eder, M. (2003). Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr. Med. Chem.* 10, 245-256.
- Schiedner, G., Bloch, W., Hertel, S., Johnston, M., Molojavyi, A., Dries, V., Varga, G., Van, R.N., and Kochanek, S. (2003). A hemodynamic response to intravenous adenovirus vector particles is caused by systemic Kupffer cell-mediated activation of endothelial cells. *Hum. Gene Ther.* 14, 1631-1641.
- Schmidtke, M., Selinka, H.C., Heim, A., Jahn, B., Tonew, M., Kandolf, R., Stelzner, A., and Zell, R. (2000). Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. *Virology* 275, 77-88.
- Schubert, S., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Werk, D., Erdmann, V.A., and Kurreck, J. (2005). Maintaining inhibition: siRNA double expression vectors against coxsackieviral RNAs. *J. Mol. Biol.* 346, 457-465.
- Schubert, S., Rothe, D., Werk, D., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Erdmann, V.A., and Kurreck, J. (2006). Strand-specific silencing of a picornavirus by RNA interference: Evidence for the superiority of plus-strand specific siRNAs. *Antiviral Res.* ..
- Schultheiss, H.P., Noutsias, M., Kuhl, U., Gross, U., Lassner, D., Poller, W., and Pauschinger, M. (2005). [Cardiomyopathies.]. *Internist (Berl)* %20;..
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B., and Zamore, P.D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* 10, 537-548.
- Schwimmbeck, P.L., Badorff, C., Schultheiss, H.P., and Strauer, B.E. (1994). Transfer of human myocarditis into severe combined immunodeficiency mice. *Circ. Res.* 75, 156-164.

- Selinka,H.C., Wolde,A., Sauter,M., Kandolf,R., and Klingel,K. (2004). Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Med. Microbiol. Immunol.* 193, 127-131.
- Seya,T., Kurita,M., Hara,T., Iwata,K., Semba,T., Hatanaka,M., Matsumoto,M., Yanagi,Y., Ueda,S., and Nagasawa,S. (1995). Blocking measles virus infection with a recombinant soluble form of, or monoclonal antibodies against, membrane cofactor protein of complement (CD46). *Immunology* 84, 619-625.
- Shafren,D.R., Bates,R.C., Agrez,M.V., Herd,R.L., Burns,G.F., and Barry,R.D. (1995). Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J. Virol.* 69, 3873-3877.
- Shafren,D.R., Dorahy,D.J., Ingham,R.A., Burns,G.F., and Barry,R.D. (1997). Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.* 71, 4736-4743.
- Shaw,C.A., Holland,P.C., Sinnreich,M., Allen,C., Sollerbrant,K., Karpati,G., and Nalbantoglu,J. (2004). Isoform-specific expression of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in neuromuscular junction and cardiac intercalated discs. *BMC. Cell Biol.* 5, 42.
- Shioi,T., Matsumori,A., and Sasayama,S. (1996). Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* 94, 2930-2937.
- Sinnreich,M., Shaw,C.A., Pari,G., Nalbantoglu,J., Holland,P.C., and Karpati,G. (2005). Localization of coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR) in normal and regenerating human muscle. *Neuromuscul. Disord.* 15, 541-548.
- Sipo,I., Fechner,H., Pinkert,S., Suckau,L., Wang,X., Weger,S., and Poller,W. (2007). Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction. *Gene Ther.* 14, 1319-1329.
- Sipo,I., Hurtado,P.A., Wang,X., Eberle,J., Petersen,I., Weger,S., Poller,W., and Fechner,H. (2006). An improved Tet-On regulatable FasL-adenovirus vector system for lung cancer therapy. *J Mol Med.* 84, 215-225.
- Smith,T., Idamakanti,N., Kylefjord,H., Rollence,M., King,L., Kaloss,M., Kaleko,M., and Stevenson,S.C. (2002). In vivo hepatic adenoviral gene delivery occurs independently of the coxsackievirus-adenovirus receptor. *Mol. Ther.* 5, 770-779.
- Srouf,M.A., Fechner,H., Wang,X., Siemetzki,U., Albert,T., Oldenburg,J., Hanfland,P., Poller,W., Brackmann,H.H., and Schwaab,R. (2003). Regulation of human factor IX expression using doxycycline-inducible gene expression system. *Thromb. Haemost.* 90, 398-405.
- Stark,G.R., Kerr,I.M., Williams,B.R., Silverman,R.H., and Schreiber,R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.
- Stilwell,J.L., McCarty,D.M., Negishi,A., Superfine,R., and Samulski,R.J. (2003). Development and characterization of novel empty adenovirus capsids and their impact on cellular gene expression. *J. Virol.* 77, 12881-12885.
- Strauer,B.E., Kandolf,R., Mall,G., Maisch,B., Mertens,T., Figulla,H.R., Schwartzkopff,B., Brehm,M., and Schultheiss,H.P. (2001). [ Update 2001. Myocarditis--cardiomyopathy]. *Med. Klin. (Munich)* 96, 608-625.
- Sullivan,N.J., Geisbert,T.W., Geisbert,J.B., Shedlock,D.J., Xu,L., Lamoreaux,L., Custers,J.H., Popernack,P.M., Yang,Z.Y., Pau,M.G., Roederer,M., Koup,R.A., Goudsmit,J., Jahrling,P.B., and

- Nabel, G.J. (2006). Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS. Med.* 3, e177.
- Szalay, G., Sauter, M., Hald, J., Weinzierl, A., Kandolf, R., and Klingel, K. (2006). Sustained nitric oxide synthesis contributes to immunopathology in ongoing myocarditis attributable to interleukin-10 disorders. *Am. J. Pathol.* 169, 2085-2093.
- Szopa, T.M., Titchener, P.A., Portwood, N.D., and Taylor, K.W. (1993). Diabetes mellitus due to viruses—some recent developments. *Diabetologia* 36, 687-695.
- Takada, H., Kishimoto, C., and Hiraoka, Y. (1995). Therapy with immunoglobulin suppresses myocarditis in a murine coxsackievirus B3 model. Antiviral and anti-inflammatory effects. *Circulation* 92, 1604-1611.
- Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Hidajat, R., Tanaka, M., Mizuta, H., and Hotta, H. (2004). Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol. Immunol.* 48, 591-598.
- Ter, B.O., Konstantinova, P., Ceylan, M., and Berkhout, B. (2006). Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Mol. Ther.* 14, 883-892.
- Thoelen, I., Magnusson, C., Tagerud, S., Polacek, C., Lindberg, M., and Van Ranst, M. (2001). Identification of alternative splice products encoded by the human coxsackie-adenovirus receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 216-222.
- Tomar, R.S., Matta, H., and Chaudhary, P.M. (2003). Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene* 22, 5712-5715.
- Tomari, Y. and Zamore, P.D. (2005). MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr. Biol.* 15, R61-R64.
- Tomko, R.P., Johansson, C.B., Totrov, M., Abagyan, R., Frisen, J., and Philipson, L. (2000). Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp. Cell Res.* 255, 47-55.
- Tomko, R.P., Xu, R., and Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3352-3356.
- Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., DeMayo, F.J., Wang, Y., and Chua, S.S. (1998). A novel RU486 inducible system for the activation and repression of genes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 30, 23-31.
- Tschope, C., Bock, C.T., Kasner, M., Noutsias, M., Westermann, D., Schwimmbeck, P.L., Pauschinger, M., Poller, W.C., Kuhl, U., Kandolf, R., and Schultheiss, H.P. (2005). High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* 111, 879-886.
- Tschope, C., Westermann, D., Steendijk, P., Noutsias, M., Rutschow, S., Weitz, A., Schwimmbeck, P.L., Schultheiss, H.P., and Pauschinger, M. (2004). Hemodynamic characterization of left ventricular function in experimental coxsackieviral myocarditis: effects of carvedilol and metoprolol. *Eur. J. Pharmacol.* 491, 173-179.
- Tsimanis, A., Kalinkovich, A., and Bentwich, Z. (2005). Soluble chemokine CCR5 receptor is present in human plasma. *Immunol. Lett.* 96, 55-61.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H., and Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7963-7968.

- van Raaij, M.J., Chouin, E., van der Zandt, H., Bergelson, J.M., and Cusack, S. (2000). Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure. Fold. Des.* 8, 1147-1155.
- van Rij, R.P. and Andino, R. (2006). The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. *Trends Biotechnol.* 24, 186-193.
- Van Vliet, K.M., Blouin, V., Brument, N., gbandje-McKenna, M., and Snyder, R.O. (2008). The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer. *Methods Mol. Biol.* 437, 51-91.
- van't, H.W. and Crystal, R.G. (2002). Fatty acid modification of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *J. Virol.* 76, 6382-6386.
- Vetter, R., Kott, M., Schulze, W., and Rupp, H. (1998). Influence of different culture conditions on sarcoplasmic reticular calcium transport in isolated neonatal rat cardiomyocytes. *Mol. Cell Biochem.* 188, 177-185.
- Wang, Q., Jia, X.C., and Finer, M.H. (1995). A packaging cell line for propagation of recombinant adenovirus vectors containing two lethal gene-region deletions. *Gene Ther.* 2, 775-783.
- Wang, Y.X., da, C., V, Vincelette, J., White, K., Velichko, S., Xu, Y., Gross, C., Fitch, R.M., Halks-Miller, M., Larsen, B.R., Yajima, T., Knowlton, K.U., Vergona, R., Sullivan, M.E., and Croze, E. (2007). 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 Heart Circ. Physiol* 293, H69-H76.
- Watanabe, A., Arai, M., Yamazaki, M., Koitabashi, N., Wuytack, F., and Kurabayashi, M. (2004). Phospholamban ablation by RNA interference increases Ca<sup>2+</sup> uptake into rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol.* 37, 691-698.
- Wee, L., Liu, P., Penn, L., Butany, J.W., McLaughlin, P.R., Sole, M.J., and Liew, C.C. (1992). Persistence of viral genome into late stages of murine myocarditis detected by polymerase chain reaction. *Circulation* 86, 1605-1614.
- Werk, D., Schubert, S., Lindig, V., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Erdmann, V.A., and Kurreck, J. (2005). Developing an effective RNA interference strategy against a plus-strand RNA virus: silencing of coxsackievirus B3 and its cognate coxsackievirus-adenovirus receptor. *Biol. Chem.* 386, 857-863.
- Westermann, D., Knollmann, B.C., Steendijk, P., Rutschow, S., Riad, A., Pauschinger, M., Potter, J.D., Schultheiss, H.P., and Tschope, C. (2006). Diltiazem treatment prevents diastolic heart failure in mice with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* 8, 115-121.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A., and Nemerow, G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73, 309-319.
- Wiebusch, L., Truss, M., and Hagemeyer, C. (2004). Inhibition of human cytomegalovirus replication by small interfering RNAs. *J Gen Virol.* 85, 179-184.
- Williams, B.R. (1997). Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 509-513.
- Wilson, J.A. and Richardson, C.D. (2005). Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol.* 79, 7050-7058.
- Wilson, J.M. (1996). Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N. Engl. J. Med.* 334, 1185-1187.

- Woods, M.G., Diana, G.D., Rogge, M.C., Otto, M.J., Dutko, F.J., and McKinlay, M.A. (1989). *In vitro and in vivo activities of WIN 54954, a new broad-spectrum antipicornavirus drug. Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 2069-2074.
- Xia, H., Mao, Q., Paulson, H.L., and Davidson, B.L. (2002). *siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. Nat. Biotechnol.* 20, 1006-1010.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1996b). *Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. J. Virol.* 70, 8098-8108.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1996a). *Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. J. Virol.* 70, 8098-8108.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1996c). *Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. J. Virol.* 70, 8098-8108.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1998). *Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J. Virol.* 72, 2224-2232.
- Xu, R. and Crowell, R.L. (1996). *Expression and distribution of the receptors for coxsackievirus B3 during fetal development of the Balb/c mouse and of their brain cells in culture. Virus Res.* 46, 157-170.
- Yajima, T., Yasukawa, H., Jeon, E.S., Xiong, D., Dorner, A., Iwatate, M., Nara, M., Zhou, H., Summers-Torres, D., Hoshijima, M., Chien, K.R., Yoshimura, A., and Knowlton, K.U. (2006). *Innate defense mechanism against virus infection within the cardiac myocyte requiring gp130-STAT3 signaling. Circulation* 114, 2364-2373.
- Yanagawa, B., Spiller, O.B., Choy, J., Luo, H., Cheung, P., Zhang, H.M., Goodfellow, I.G., Evans, D.J., Suarez, A., Yang, D., and McManus, B.M. (2003). *Coxsackievirus B3-associated myocardial pathology and viral load reduced by recombinant soluble human decay-accelerating factor in mice. Lab Invest* 83, 75-85.
- Yanagawa, B., Spiller, O.B., Proctor, D.G., Choy, J., Luo, H., Zhang, H.M., Suarez, A., Yang, D., and McManus, B.M. (2004). *Soluble recombinant coxsackievirus and adenovirus receptor abrogates coxsackievirus b3-mediated pancreatitis and myocarditis in mice. J Infect. Dis.* 189, 1431-1439.
- Yang, Y., Su, Q., and Wilson, J.M. (1996). *Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. J. Virol.* 70, 7209-7212.
- Yoon, J.S., Kim, S.H., Shin, M.C., Hong, S.K., Jung, Y.T., Khang, I.G., Shin, W.S., Kim, C.C., and Paik, S.Y. (2004). *Inhibition of herpesvirus-6B RNA replication by short interference RNAs. J Biochem. Mol Biol.* 37, 383-385.
- Yu, J.Y., DeRuiter, S.L., and Turner, D.L. (2002). *RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 6047-6052.
- Yuan, J., Cheung, P.K., Zhang, H.M., Chau, D., and Yang, D. (2005). *Inhibition of coxsackievirus B3 replication by small interfering RNAs requires perfect sequence match in the central region of the viral positive strand. J Virol.* 79, 2151-2159.
- Yuan, J., Stein, D.A., Lim, T., Qiu, D., Coughlin, S., Liu, Z., Wang, Y., Blouch, R., Moulton, H.M., Iversen, P.L., and Yang, D. (2006). *Inhibition of coxsackievirus B3 in cell cultures and in mice by peptide-conjugated morpholino oligomers targeting the internal ribosome entry site. J. Virol.* 80, 11510-11519.

Yuan,J., Cheung,P.K.M., Zhang,H., Chau,D., Yanagawa,B., Cheung,C., Luo,H., Wang,Y., Suarez,A., McManus,B.M., and Yang,D. (2004). A phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide specifically inhibits coxsackievirus B3 replication in cardiomyocytes and mouse hearts. *Lab Invest* 84, 703-714.

Zaoutis,T. and Klein,J.D. (1998). Enterovirus infections. *Pediatr. Rev.* 19, 183-191.

Zaragoza,C., Ocampo,C., Saura,M., Leppo,M., Wei,X.Q., Quick,R., Moncada,S., Liew,F.Y., and Lowenstein,C.J. (1998). The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 2469-2474.

Zeichhardt,H., Grunert,H.P., and Gerlich,H. (2002). Picornaviren. In *Medizinische Virologie - Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder*, Doerr, H.W.; Gerlich, W.H.), pp. 251-277.

Zhou,H., O'Neal,W., Morral,N., and Beaudet,A.L. (1996). Development of a complementing cell line and a system for construction of adenovirus vectors with E1 and E2a deleted. *J. Virol.* 70, 7030-7038.

## 9 Publikationsverzeichnis

### Publikationen:

Fechner H, **Pinkert S** #, Wang X, Sipo I, Suckau L, Kurreck J, Dörner A, Sollerbrant K, Zeichhardt H, Grunert HP, Vetter R, Schultheiss HP, Poller W.  
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.

# gleichberechtigt mit Erstautor

Fechner H, Sipo I, Westermann D, **Pinkert S**, Wang X, Suckau L, Kurreck J, Zeichhardt H, Müller O, Vetter R, Erdmann V, Tschöpe C, Poller W.  
Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy.  
*J Mol Med* 2008;86:987-97.

Sipo I, Fechner H, **Pinkert S**, Suckau L, Wang X, Weger S, Poller W.  
Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction.  
*Gene Ther* 2007;14:1319-29.

Fechner H, Suckau L, Kurreck J, Sipo I, Wang X, **Pinkert S**, Loschen S, Rekittke J, Weger S, Dekkers D, Vetter R, Erdmann VA, Schultheiss HP, Paul M, Lamers J, Poller W.  
Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban.  
*Gene Ther* 2007;14:211-8.

Fechner H, Wang X, Pico AH, Wildner J, Suckau L, **Pinkert S**, Sipo I, Weger S, Poller W.  
A bidirectional Tet-dependent promoter construct regulating the expression of E1A for tight control of oncolytic adenovirus replication.  
*J Biotechnol* 2007;127:560-74.

### Manuskript eingereicht:

**Pinkert, S**, Westermann, D, Wang, X, Klingel, K, Dörner, A, Savvatis, K, Tschöpe, C, Zeichhardt, H, Schultheiss, H-P, Spiller, OB, Poller, W, H Fechner  
Prevention of the Development of Cardiac Dysfunction in Coxsackievirus B3 Cardiomyopathy by Inducible Expression of a Soluble Coxsackievirus-Adenovirus-Receptor. *Circulation*

Werk, D, **Pinkert, S**, Heim, A, Zeichhardt, H, Grunert, H-P, Poller, W, Erdmann, VA, Fechner, H, J Kurreck  
Combination of soluble coxsackievirus-adenovirus receptor and anti-coxsackievirus siRNAs exerts synergistic antiviral activity against coxsackievirus B3. *Antivir. Res.*

# **Lebenslauf**

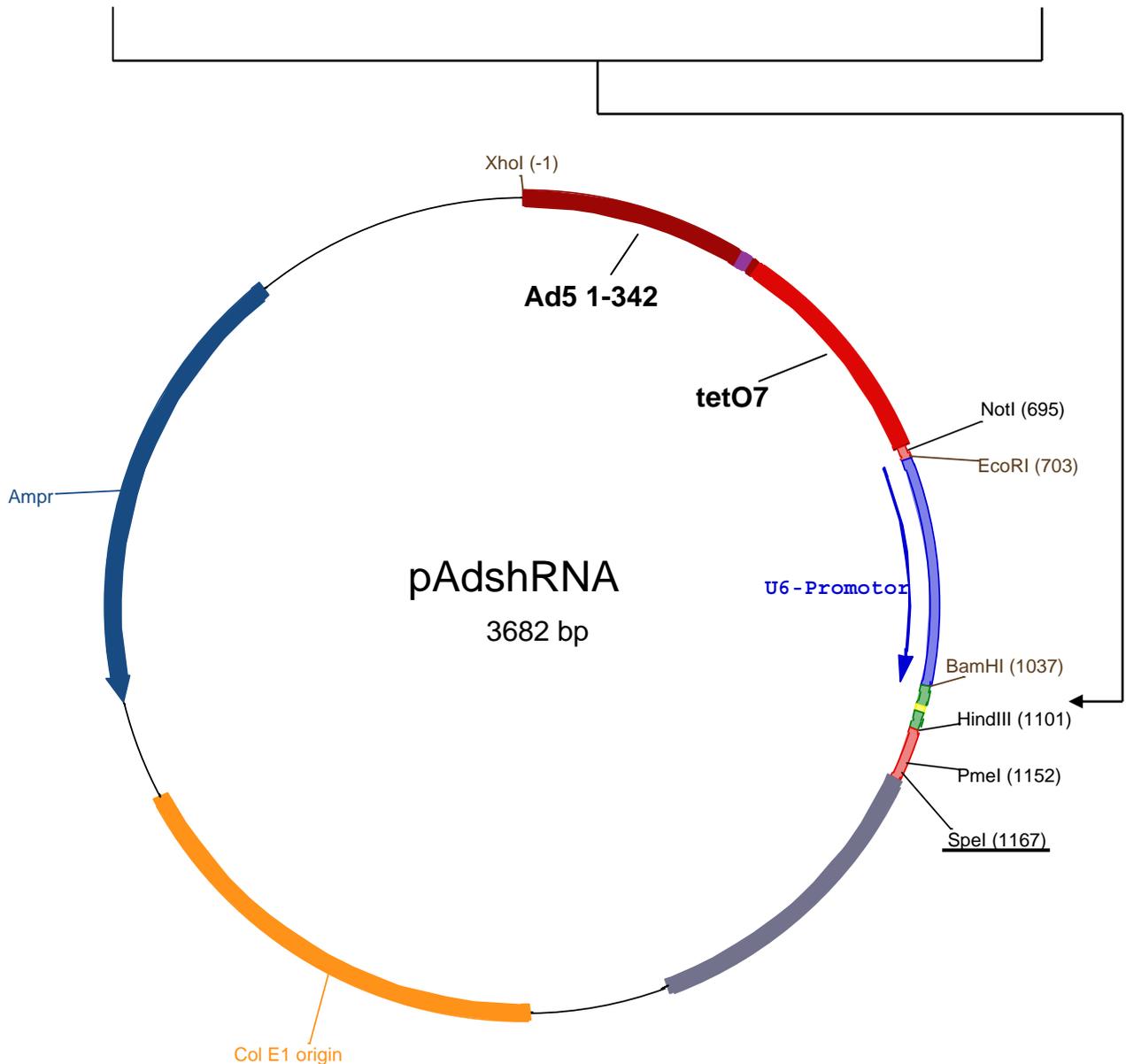
Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

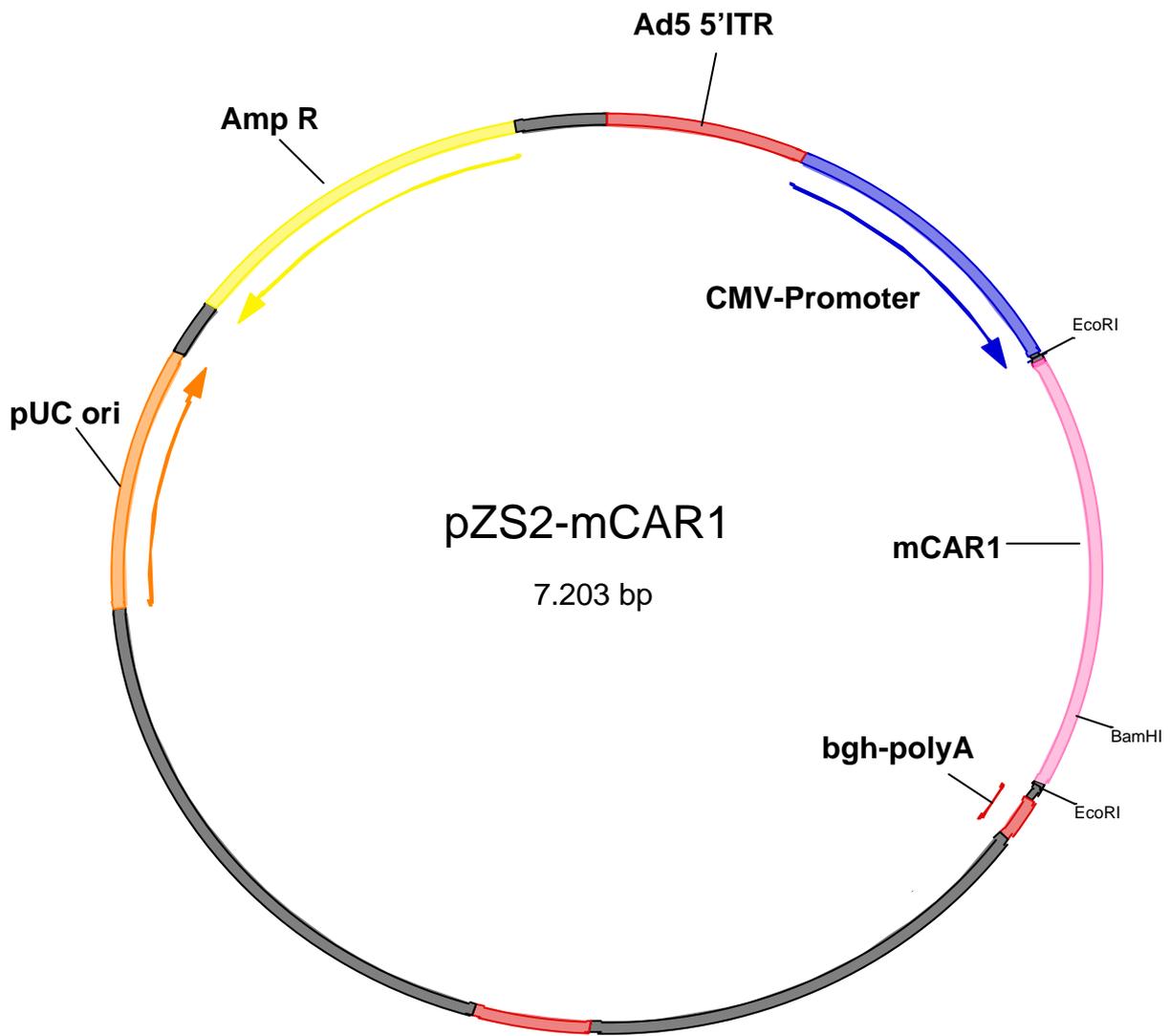


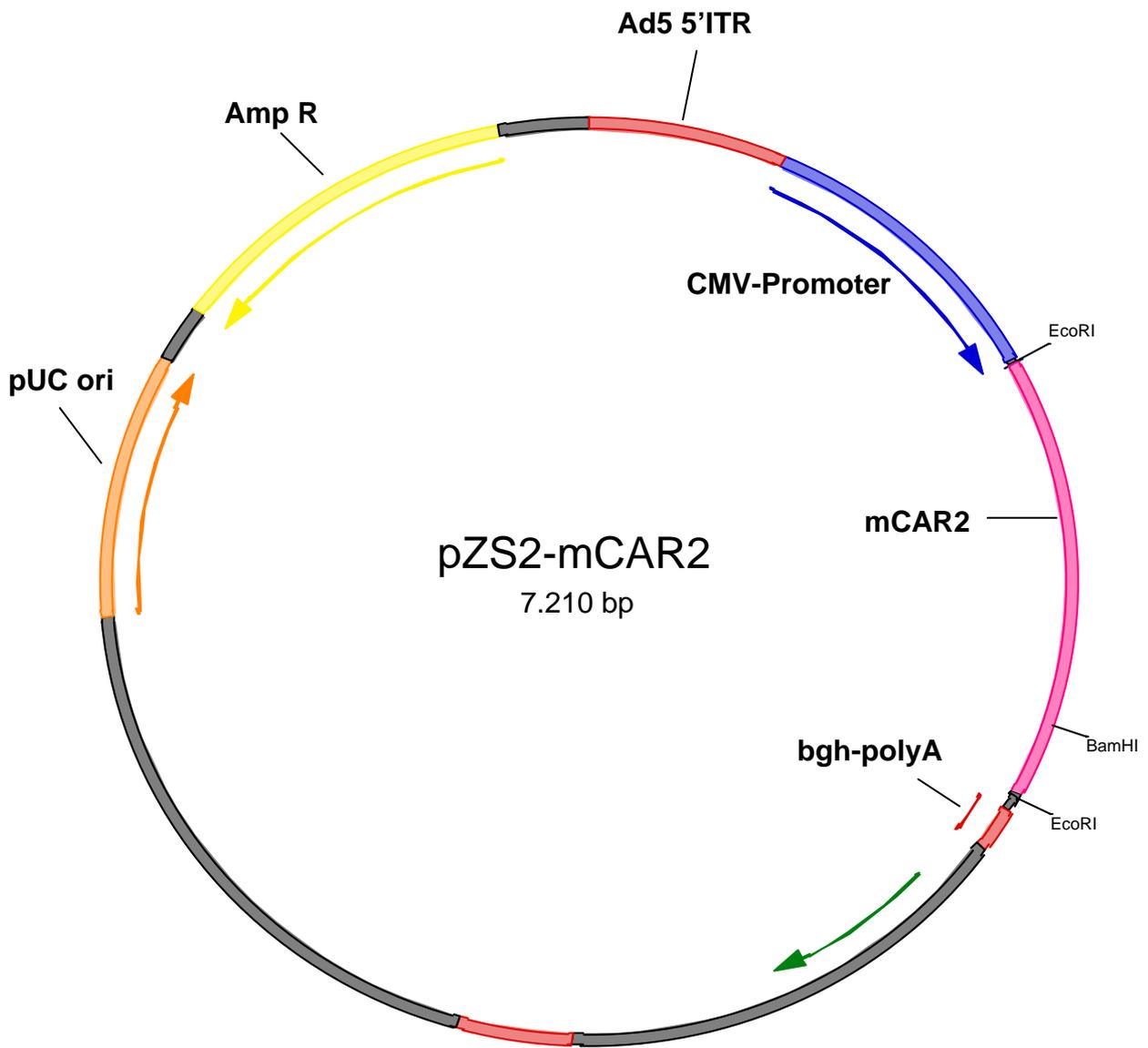
# Anhang

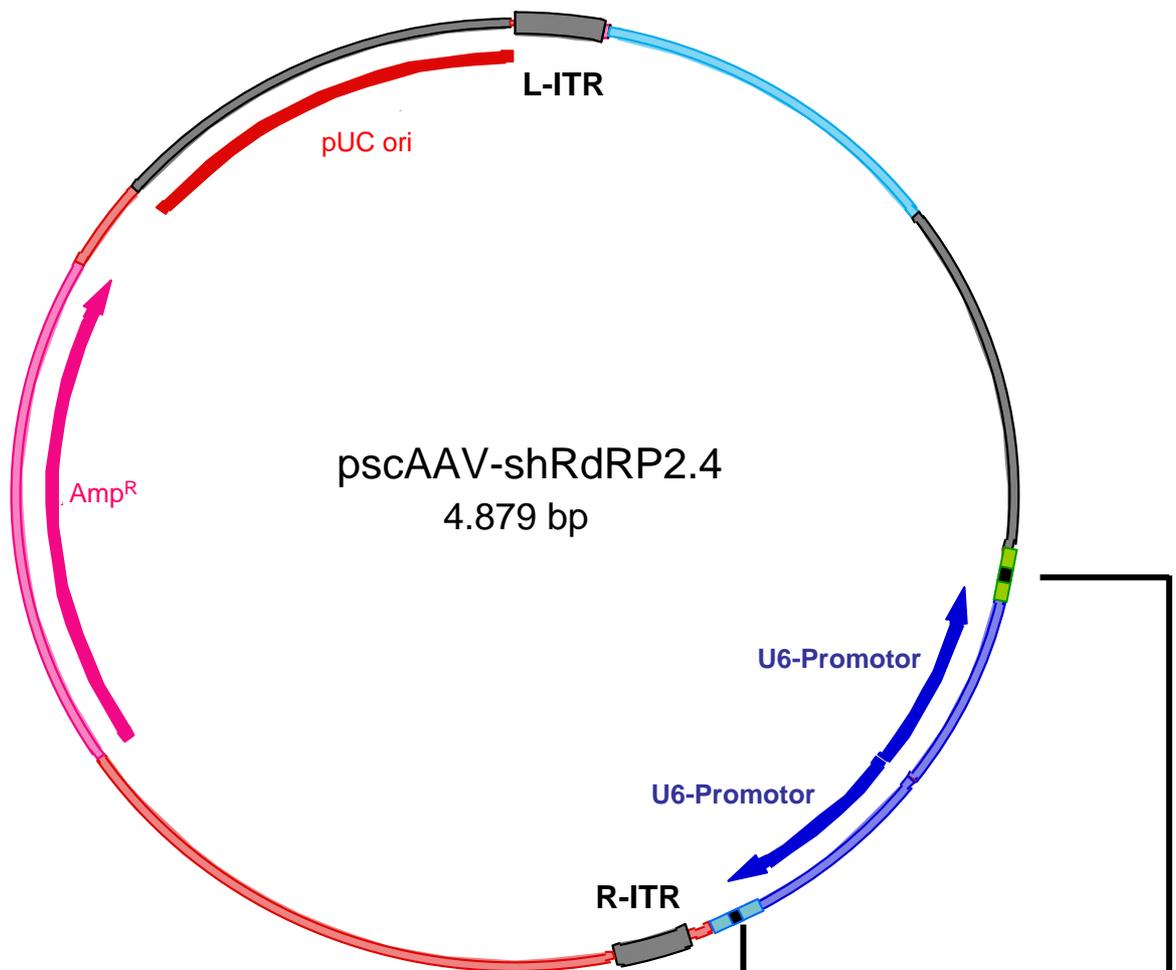
# Adenovirale shRNA-Expressionsplasmide

	<i>Bam</i> HI	Zielsequenz sense	hairpin	Zielsequenz antisense	<i>Hind</i> III
shGFP	5'-GATCCCC 3'-GGG	GGTTATGTACAGGAACGCA CCAATACATGTCCTTGCGT	TTCAAGAGA AAGTTCTCT	TGCGTTCCTGTACATAACC ACGCAAGGACATGTATTGG	TTTTTA-3' AAAAATTCTGA-5'
shPLB <sub>r</sub>	5'-GATCCCC 3'-GGG	TACCTTACTCGCTCGGCTA ATGGAATGAGCGAGCCGAT	TTCAAGAGA AAGTTCTCT	TAGCCGAGCGAGTAAGGTA ATCGGCTCGTCAATCCAT	TTTTTA-3' AAAAATTCTGA-5'
shCAR2 <sub>m</sub>	5'-GATCCCC 3'-GGG	CTACTATCCGGATCTGAAA GATGATAGGCCCTAGACTTT	TTCAAGAGA AAGTTCTCT	TTTCAGATCCGGATAGTAG AAAGCTAGGCCCTATCATC	TTTTTA-3' AAAAATTCTGA-5'
shCAR3 <sub>m</sub>	5'-GATCCCC 3'-GGG	CTATAAATGTGACCAACCT GATATTTACTACTGTTGGA	TTCAAGAGA AAGTTCTCT	AGGTTGGTCACATTTATAG TCCAACCAGTGTAATATC	TTTTTA-3' AAAAATTCTGA-5'
shCAR4 <sub>m</sub>	5'-GATCCCC 3'-GGG	GGATCGGAAGAGATTGAAAT CTAGCCTTCTTAACCTTTA	TTCAAGAGA AAGTTCTCT	ATTTCCAATCTCTTCCGATCC TAAAGGTTAGAGAAGGCTAGG	TTTTTA-3' AAAAATTCTGA-5'









### shRdRP2

5'-GGATCCC *GTACAGGGATAAACATTAC* TTCAAGAGA *GTAATGTTTATCCCTGTAC* TTTTTTGAAGAATTCAAGCTT-3'  
 3'- GG *CATGTCCCTATTTGTAATG* AAGTTCTCT *CATTACAAATAGGGACATG* AAAAAACCTTCTTAAGT - 5'

Zielsequenz sense

hairpin

Zielsequenz antisense

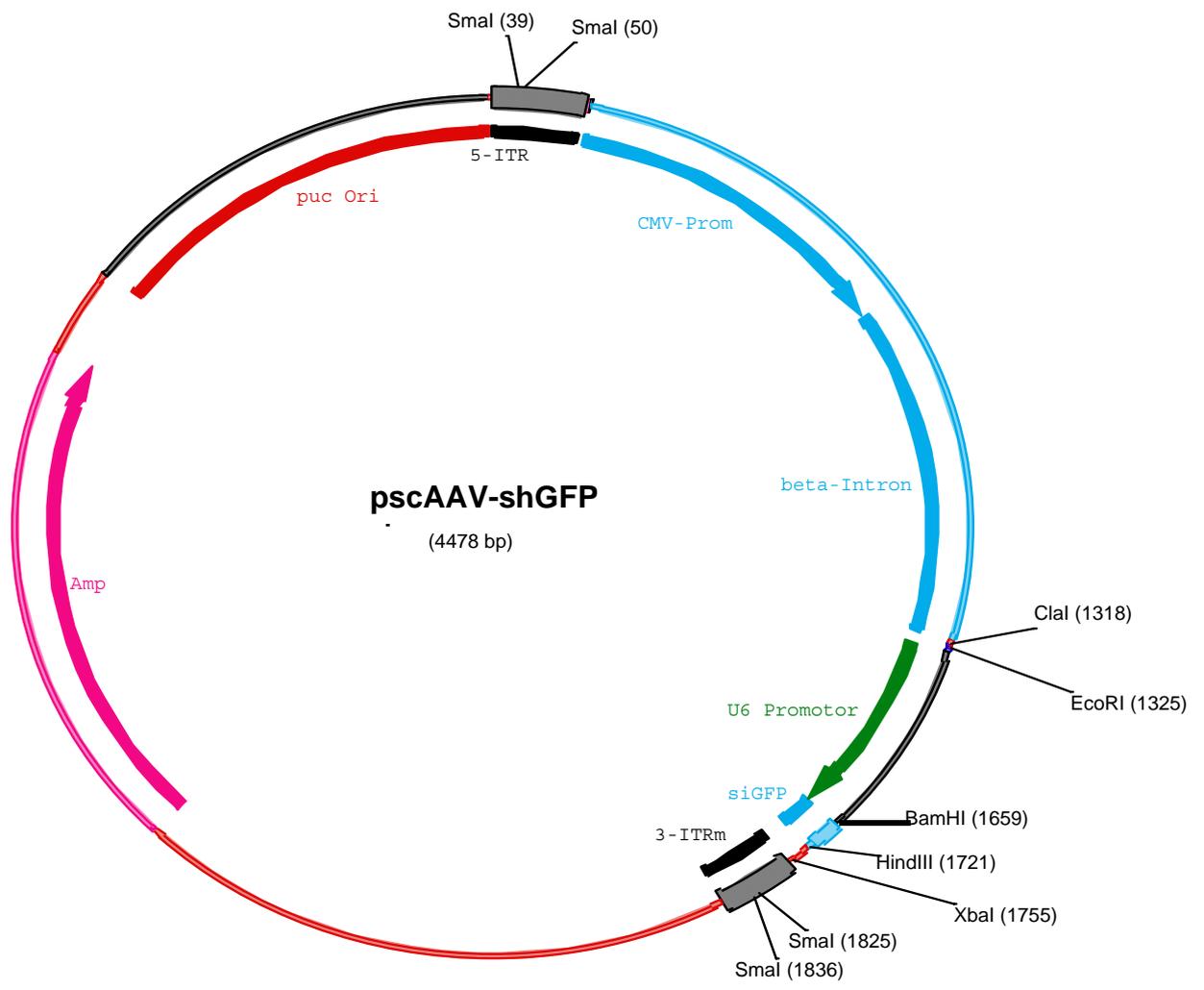
### shRdRP4

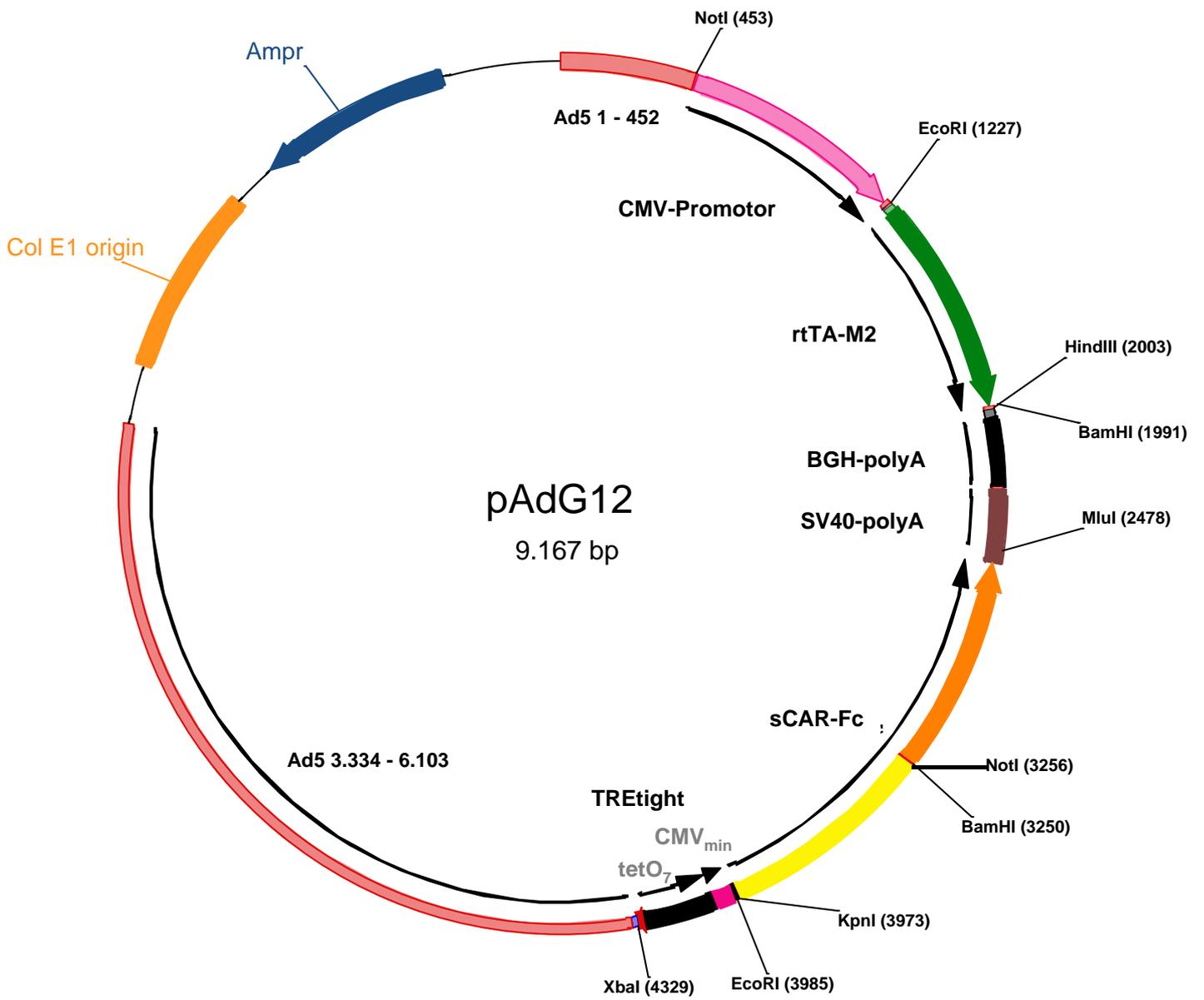
5'-GGATCCC *GTACAGGGATAAACATTAC* TTCAAGAGA *GTAATGTTTATCCCTGTAC* TTTTTTGAAGAATTCAAGCTT-3'  
 3'- GG *CATGTCCCTATTTGTAATG* AAGTTCTCT *CATTACAAATAGGGACATG* AAAAAACCTTCTTAAGT - 5'

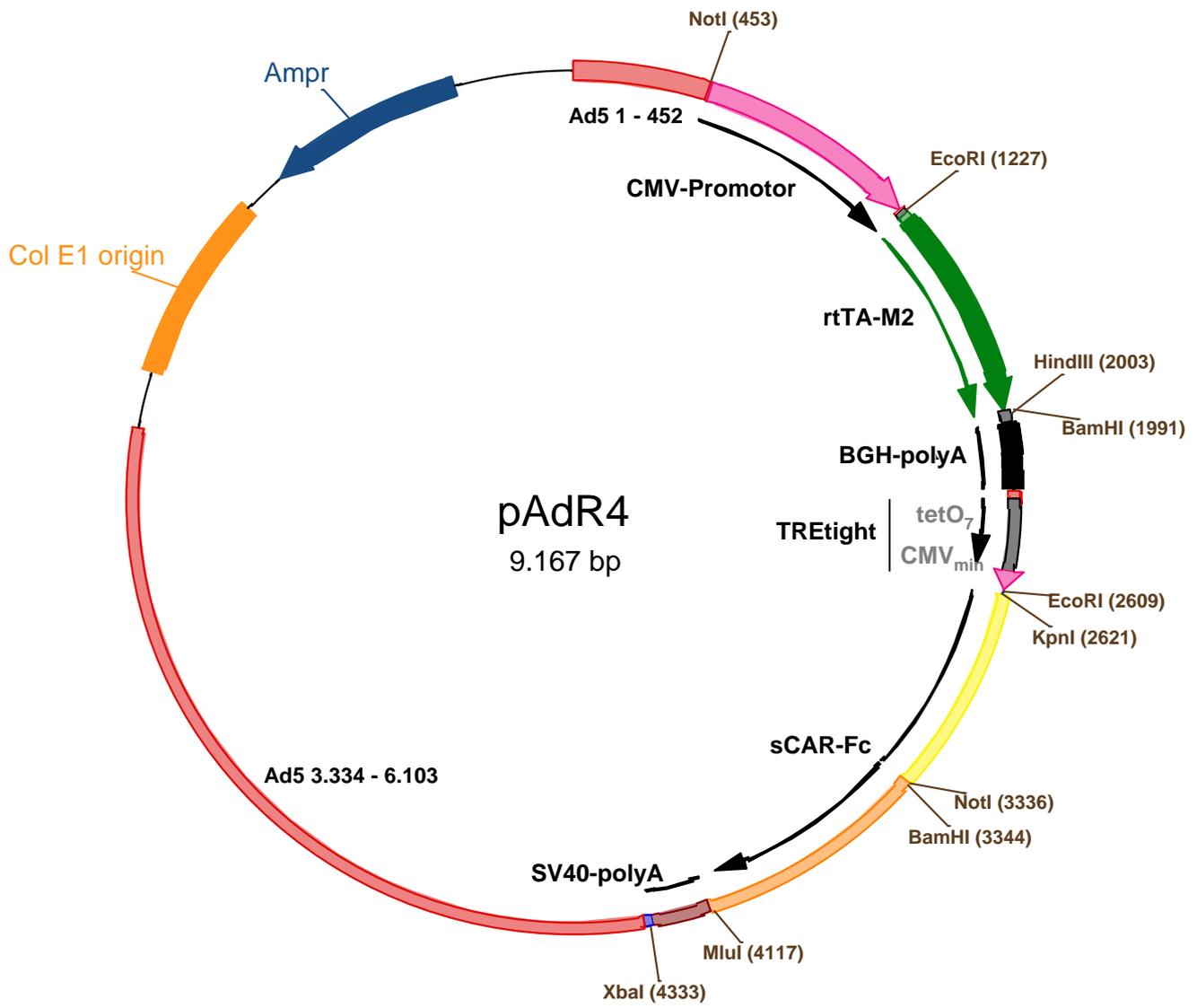
Zielsequenz sense

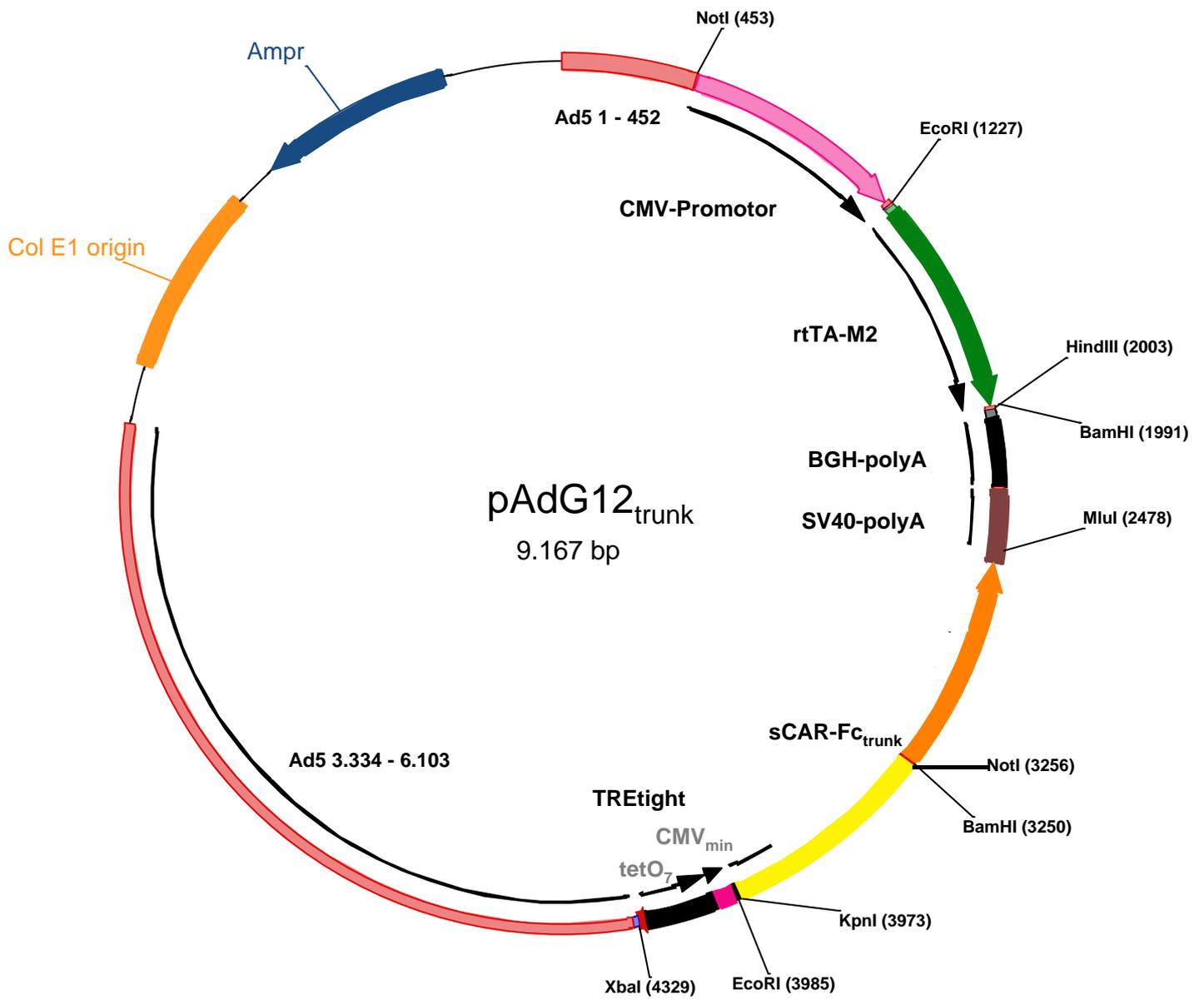
hairpin

Zielsequenz antisense









## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Poller danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die hilfreiche Unterstützung.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Volker Erdmann.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Henry Fechner für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, die vielen konstruktiven Diskussionen, seine fortwährende Hilfsbereitschaft und für seine große Motivationsfähigkeit.

Des Weiteren danke ich den Kollegen der AG Poller / Fechner für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit, insbesondere Xiaomin Wang und Lennart Suckau.

Weiterhin danke ich der AG von Dr. Dirk Westermann, Institut für Kardiologie, CBF für die Messung der hämodynamischen Parameter und Prof. Dr. Karin Klingel, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen für die Durchführung der *in situ*-Hybridisierung.

Frau Zankl danke ich dafür, dass sie mein Interesse für die Naturwissenschaft nachhaltig geweckt und mir den Einstieg in dieses Fachgebiet erleichtert hat.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, deren unermüdliche Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Meinen Freunden danke ich für ihre Hilfe und ihr Verständnis, insbesondere Kathleen Weise, die sich hartnäckig und geduldig auf die Jagd nach Kommas gemacht hat.

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel erstellt wurde.

Berlin, .....

.....

(Sandra Pinkert)