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

DISSERTATION

Inhibierung von Adenovirusinfektion mittels siRNA vermittelter Blockade adenoviraler Regulations- und Verpackungsgene

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Christine Bode

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

Inhaltsverzeichnis

A	bstral	kt	IV
A	bstra	ct	V
1	Einle	eitung	1
	1.1	Adenoviren	1
		1.1.1 Adenovirusfunktion und -klassifikation1.1.2 Struktur des Adenovirus und Organisation des Genoms1.1.3 Replikationszyklus	1 2 5
		1.1.3.1 Frühe Phase 1.1.3.2 Späte Phase	5 9
	1.2	RNA-Interferenz	10
		1.2.1 Mechanismus der RNA-Interferenz 1.2.2 siRNAs	10 13
		1.2.2.1 Struktur1.2.2.2 Chemische Modifikationen1.2.2.3 Unerwünschte Nebenwirkungen	13 14 15
		1.2.3 siRNA in der Anwendung	16
	1.2	Figure and allow a	1/
_	1.3	Fragesteinung	18
2	Mate	erial und Methoden	20
	2.1	Material	20
		2.1.1 Zelllinien	20
		2.1.2 SIRNAS	20
		2.1.5 Viteri und Vektoren	21
		2.1.5 Bakterienmedien	21
		2.1.6 Oligonukleotide	22
		2.1.7 Enzym	22
		2.1.8 Antikörper	23
		2.1.9 DNA Größenstandards	23 22
		2.1.10 Losungen und Futter	25
		2.1.12Reagenzsysteme	
		2.1.13 Sonstige Materialien	26
		2.1.14Geräte	27

Seite

	2.2	Methoden	28
		2.2.1 Zellkultur	28
		2.2.1.1 Kultivierung und Aussaat von Zellen	28
		2.2.1.2 Auftauen konservierter Kulturen	28
		2.2.2 Design von siRNAs	29
		2.2.5 Trasiniukonsulukuon	
		2.2.3.1 Restrictionsverdau	33
		2.2.3.3 Extraktion von DNA aus Agarosegel	34
		2.2.3.4 Ligation und Transformation in E.coli-XL-10 Gold Zellen	34
		2.2.3.5 Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab (Minipräparation)	35
		2.2.3.6 Plasmid-Präparation in großem Maßstab (Maxipräparation)	35
		2.2.4 Transfektion eukaryontischer adhärenter Zellen	36
		2.2.4.1 Transfektion mit HiPerFect Transfection Reagent	36
		2.2.4.2 Transfektion mit Lipofectamine TM 2000 Transfection Reagent	36
		2.2.5 Detektion und Quantifizierung von DNA	37
		2.2.5.1 Gewinnung von DNA aus eukaryontischen Zellen und DNA-	
		Quantifizierung	37
		2.2.5.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	37
		2.2.5.5 Southern Blot	38 //
		2.2.5.4 Herstending von 1-marktenen Sonden	4 0 41
		2.2.5.6 Detektion der Hybridisierungsprodukte	41
		2.2.5.7 Entfernen der Sonden von der Membran	41
		2.2.6 Sequenzierung	42
		2.2.7 Expressionsnachweismethoden	42
		2.2.7.1 Luciferase-Assay	42
		2.2.7.2 Immunfluoreszenz	43
		2.2.7.3 Transkomplementierungs-Assay	44
		2.2.8 Plaque Assay	45
		2.2.9 Cell Killing Assay	46
_	_	2.2.10Statistische Auswertung	4/
3	Erge	bnisse	48
	3.1	Evaluierung der siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon	48
		3.1.1 Untersuchung der anti-adenoviralen Wirkung von siRNAs gegen E1A-,	
		IVa2- und Hexon-mRNA mittels Immunfluoreszenz	48
		3.1.2 Evaluierung der siRNA vermittelten Inhibierung der adenoviralen Replikatio	n 50
		3.1.3 Bestimmung der adenoviralen genomischen DNA nach Applikation	52
		der anti-E1A siRNAs	55
		3.1.4 Abhängigkeit der Silencing-Effizienz von siE1A von der adenoviralen Dosis	56
		3.1.5 Nachweis der gen-spezifischen Wirkung der siRNAs mittles	
		eines Luciferase-Reporters	58
		3.1.6 Evaluierung des sequenzspezifischen Silencing-Effekts in Abhängigkeit	<u> </u>
		von der Zeit	60

3.2	Vergleichende Untersuchung zur Wirksamkeit von anti-adenoviralen siRNAs	61	
	3.2.1 Vergleich mittels Transkomplementierungs-Assay3.2.2 Vergleich mittels Plaque Assay	61 62	
3.3	Evaluierung der anti-adenoviralen Wirkung von Kombinationen der verschiedenen siRNAs im Vergleich mit den einzelnen siRNAs	64	
	3.3.1 Evaluierung additiver Effekte der siRNAs3.3.2 Evaluierung des inhibitorischen Effekts der Kombination siHexon/siIVa2	64	
	in Abhängigkeit von der adenoviralen Dosis 3.3.3 Transkomplementierungs-Assay zum Vergleich der anti-adenoviralen Aktivität kombinierter und einzelner siRNAs	67	
	bei gleicher Gesamtkonzentration3.3.4 Evaluierung und Vergleich des inhibitorischen Effekts auf die	68	
	Adenovirus-induzierte Zelllyse	70	
4 Disl	xussion	72	
4.1	Auswahl des Adenovirus Serotypen	73	
4.2	Selektion der Zielgene	74	
4.3	Evaluierung der anti-adenoviralen Wirkung der siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon und Selektion der effizientesten siRNA gegen jedes Zielgen	76	
	4.3.1 Abhängigkeit der siE1A Wirkung von der viralen Dosis und der Zeit	80	
4.4	Vergleich der anti-adenoviralen Wirkung der siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon.	81	
4.5	Additive Effekte der anti-adenoviralen siRNAs	84	
4.6	Synergistische Effekte der siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon in Bezug auf die Inhibierung der adenoviralen Replikation und in Bezug auf den zytopathischen Effekt.	86	
47	Aushlick	89	
1.7			
Literat	tur	90	
Abkür	zungsverzeichnis	108	
Abbild	ungsverzeichnis	.113	
Tabell	enverzeichnis	.114	
Erklär	ung an Eides statt	.115	
Lebens			
Publik	Publikationen		
Anteils	serklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	119	
Danks	agung	120	

Abstrakt

Adenoviren gelten allgemein als Verursacher milder gastrointestinaler und respiratorischer Infektionen sowie von Infektionen der Konjunktiven. In jüngerer Zeit haben sie jedoch zunehmend als Pathogene an Bedeutung gewonnen. So wurden Adenoviren beispielsweise als Verursacher der viralen Myokarditis isoliert. Des Weiteren ist eine Vielzahl von Fällen berichtet worden, in denen Infektionen mit Adenoviren bei immunsupprimierten Patienten, darunter häufig Kinder, zu fulminanten Verläufen mit nicht selten letalem Ausgang führten. Dennoch gibt es bisher keine suffiziente, allgemein anwendbare anti-adenovirale Therapie.

Das posttranskriptionelle Gen-Silencing mittels RNA-Interferenz (RNAi) konnte in den letzten Jahren als potenter und vielversprechender Ansatz zur antiviralen Therapie etabliert werden. Dabei vermitteln kurze doppelsträngige RNA-Moleküle, die small interfering RNAs (siRNAs), im Zytoplasma die Bindung ihrer sequenzhomologen Ziel-mRNA und die darauffolgende enzymatische Spaltung. An vielen Beispielen wurde bereits gezeigt, dass sich virale Infektionen durch den Einsatz von synthetisch hergestellten siRNAs oder den verwandten shRNAs (shorthairpin RNAs) effizient inhibieren lassen. Darunter auch bedeutende humanpathogene Viren wie das Hepatitis C Virus, das Hepatitis B Virus oder das HI-Virus.

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* untersucht inwieweit sich die Infektion mit Adenovirus Typ 5 durch siRNAs gegen die adenoviralen Gene E1A, Hexon und IVa2 inhibieren lässt. Initial wurde dazu unter vier verschiedenen gegen jedes Zielgen vorliegenden synthetischen siRNAs die effizienteste evaluiert und weiteren Analysen zugeführt. Die sequenzspezifische Wirkung der siRNAs konnte in einem nächsten Schritt nachgewiesen werden. In der vergleichenden Untersuchung der siRNAs zeigten die siRNAs gegen die späten adenoviralen Gene, siHexon und siIVa2, ein deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt auf die adenovirale Replikation als die siRNA gegen das frühe Gen E1A, vor allem da sie bereits in niedriger Dosierung effizient wirkten. Kombinationen von siHexon und siIVa2 zeigten zwar additive Effekt, führten jedoch bei dosisäquivalentem Einsatz nicht zu einer verstärkten Inhibierung der adenoviralen Replikation im Vergleich mit Einzelkomponenten. Überraschenderweise konnten bei Betrachtung des zytopathischen Effekts hingegen nur die Kombinationen aus siE1A und siHexon bzw. siIVa2 die Adenovirus vemittelte Zelllyse effizient inhibieren und einen zytoprotektiven Effekt demonstrieren. Eine Kombination aus den siRNAs gegen das frühe Gen E1A und den siRNAs gegen die späten Gene Hexon bzw. IVa2 ist folglich in Bezug auf den anti-adenoviralen Effekt insgesamt überlegen gegenüber der einzelnen Applikation der siRNAs.

Abstract

Adenoviruses are generally referred to as mild pathogens for they are commonly known as causative agents of mild respiratory infections of the upper airways, common gastrointestinal infections or conjunctivitis. Anyhow in younger times Adenoviruses gained a certain attention by having been determined as one of the main pathogens to cause viral myocarditis as well as having been reported to induce severe infections of liver and lung in the immunocompromised patient often taking a fulminant course and leading to subsequent death. Nevertheless there is currently no curative and specific pharmaceutical approach to treat Adenovirus infection.

Gene Silencing by RNA Interference (RNAi) however has been shown to be a potent tool in treatment of viral infections as has been proven in principle for example for HC-, HB- and HI-Virus.

The goal of the present thesis therefore was to examine the potential of RNAi-mediated inhibition of Adenovirus 5 infection by the use of small interfering RNAs (siRNAs) targeting both early (E1A) and late (IVa2 and Hexon) adenoviral genes. Several of the initially analyzed siR-NAs directed against E1A, IVa2 and Hexon showed a distinct antiviral activity. Further investigations were performed to select the most effective siRNAs against each target. In a next step comparative analysis was conducted. The siRNAs against late adenoviral genes proved to be more effective in inhibiting adenoviral replication than silencing of the E1A early gene. A combination strategy involving down-regulation of any two or all three of the targeted viral genes did not result in an enhanced inhibition of adenoviral replication compared to the single siRNA approaches targeting the late genes. However protection against adenovirus mediated cytotoxicity could only be achieved by combining siRNAs against either of the two late genes with the siR-NA against the E1A early gene. Thus, an enhanced anti-adenoviral efficiency of RNAi-based inhibition strategies can be achieved by co-silencing of early and late adenoviral genes with down regulation of E1A as a crucial factor.

1 Einleitung

1.1 Adenoviren

1.1.1 Adenovirusfunktion und -klassifikation

In den 1950er Jahren wurden Adenoviren erstmalig aus adenoidem Gewebe isoliert, von dem sich auch ihr Name ableitet (Rowe et al., 1953). Sie bilden die Familie der Adenoviridae, die in vier Genera unterteilt werden kann: Mastadenoviren, Aviadenoviren, Atadenoviren und Siadenoviren (Davison et al., 2003). Die humanpathogenen Adenoviren gehören zur Gruppe der Mastadenoviren. Es sind bis dato 52 verschiedene Serotypen der humanen Adenoviren bekannt, von denen jeder Serotyp resistent gegenüber den neutralisierenden Antiseren der anderen Serotypen ist (Shenk, 2001). Die 52 Serotypen werden einer von sieben Subgruppen (A-G) zugeordnet (Jones et al., 2007). Diese Einteilung erfolgt entsprechend der Eigenschaften der Adenoviren in Bezug auf Hämagglutinisierung (Shenk, 2001) und onkogenes Potential. Gleichzeitig ist die Übereinstimmung der Virus-DNA ein weiteres Kriterium für die Zuordnung zu einer bestimmten Subgruppe (Swenson et al., 2003). Die Spezies B wird darüber hinaus auf Grund der Affinität der ihr zugeordneten Serotypen zu unterschiedlichen Rezeptorsubtypen in die Gruppen B1 und B2 differenziert (Segerman et al., 2003).

Als Eintrittspforten in den menschlichen Organismus dienen den Adenoviren Mund, Nasopharynx oder die Konjunktiven, wobei die Übertragung durch Töpfcheninfektion, fäkal-oral oder auch durch Kontakt mit kontaminiertem Wasser (z.B. im Schwimmbad) oder kontaminierten (ophthalmologischen) Instrumenten erfolgt (Shenk, 2001).

Die Konjunktiven und der Gastrointestinaltrakt sind daher die am häufigsten von einer Adenovirusinfektion betroffenen Organe. Die Infektion ist in den meisten Fällen lokal begrenzt und verläuft mild, sie kann sich jedoch auch ausbreiten wie beispielsweise von den oberen Atemwegen in die Lunge oder gar in seltenen Fällen zu einer Virämie führen (Shenk, 2001). Adenoviren sind ubiquitär verbreitet, so dass bereits etwa 80 % der 1 - 5 - jährigen Kinder Antikörper gegen mindestens einen der vielen Serotypen besitzen (Hale et al., 1999). Es konnte zudem eine gewisse Korrelation von Gewebetropismus und klinischen Eigenschaften mit der Zugehörigkeit zu den einzelnen Subgruppen gefunden werden (Shenk, 2001; Russel, 1998).

Neben diesen in der Regel gutartig verlaufenden Adenovirusinfektionen stellt die Adenvoriusinfektion des immunsupprimierten Patienten ein zentrales Problem dar, da sie zu einer massiven Schwächung des angegriffenen Organismus führt und nicht selten letal endet (Janoff et al., 1988; Ljungmann et al., 1989; Hierzholzer, 1992). Bereits 1992 berichtete Hierholzer von mehr als 300 Fällen von Adenovirusinfektionen bei Patienten mit angeborener oder erworbener Immunschwäche (Hierzholzer, 1992). Auch Johnson et al. beschrieben den Fall eines Patienten, der im Rahmen der Therapie eines Non Hodgkin Lymphoms eine allogene Knochenmarksspende erhielt und in der Folge an fulminantem Leberversagen verstarb. Adenovirus Typ 5 konnte aus dem Urin des Patienten isoliert werden und in der Leber fanden sich die für eine adenovirale Infektion typischen Läsionen (Johnson et al., 1990). Aus der pädiatrischen Praxis gibt es ebenfalls eine Vielzahl an Fallstudien, die die opportunistische Adenovirusinfektion beim immunsupprimierten Kind beschreiben (Carter et al., 2002; Kaur et al., 2002; Flomenberg et al., 1994; Krilov et al., 1990). Beispielhaft sei auf drei Fälle verwiesen, in denen Kleinkinder, die an einer Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) erkrankt waren, unter Chemotherapie eine fulminant verlaufende Adenovirus-Hepatitis entwickelten, deren Ausgang in allen drei Fällen letal war (Hough et al., 2005).

Darüber hinaus konnten Adenoviren in jüngerer Zeit als ein wichtiger Verursacher der Myokarditis bestimmt werden (Kühl et al., 2005; Bowles et al., 2003; Tschöpe et al., 2005). In einigen Untersuchungen stellte zwar Parvovirus B 19 das dominante pathogenetische Agens dar (Kühl et al., 2005; Tschöpe et al., 2005), in anderen Studien jedoch konnte das Adenovirus als Hauptverursacher der Virusmyokarditis isoliert werden (Bowles et al., 2003; Martin et al., 1994). Dabei scheinen vor allem zwei Serotypen der Gruppe C, Ad2 und Ad5, eine entscheidende Rolle zu spielen (Pauschinger et al., 1999).

1.1.2 Struktur des Adenovirus und Organisation des Genoms

Adenoviren sind hüllenlose Viren von 70 - 100 nm Durchmesser (Horne et al., 1959). Die Virione bestehen aus einem linearen doppelsträngigen DNA-Genom, das von einer ikosaedrisch aufgebauten Proteinhülle (Kapsid) umschlossen wird (Abb. 1.1 und 1.2).

Das Adenovirusgenom ist ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom von 30 - 38 kb Länge. An den beiden Enden jedes DNA-Stranges befinden sich die inverted terminal repeats (ITRs), innerhalb deren Sequenzen sich der Ursprungsort der DNA-Replikation befindet (de Jong und van der Vliet, 1999). An den beiden 5' Enden des Genoms ist je ein terminales Protein (TP) kovalent gebunden, das die Zirkularisierung des Genoms erleichtert (Ruben et al., 1983).

Das Genom wird unterteilt in fünf frühe Transkriptionseinheiten (E1A, E1B, E2, E3 und E4), vier verzögerte Transkriptionseinheiten (IVa2, IX, VA1, VA2) und fünf späte Transkriptionseinheiten (L1 - L5) (Shenk, 2001; Majhen und Ambrioc-Ristov, 2006) (Abb. 1.2). Der Major Late

Promotor nimmt bei der Regulation der Transkription eine Schlüsselstellung ein. Während der Transkription der frühen Gene ist er bereits in abgeschwächter Form aktiv. Nach dem Beginn der viralen DNA Replikation ist er dann vollständig aktiviert und kontrolliert die Transkription der späten Gene (Russell, 2000). Die späten Proteine, von denen mindestens fünfzehn verschiedene bekannt sind, werden alle von der Major Late Transcription Unit (MLTU) kodiert. Von dieser wird eine einzige Precursor RNA (pre-mRNA) transkribiert, aus der durch alternatives Spleißen und Polyadenylierung die fünf mit L1 bis L5 bezeichneten mRNA Familien hervorgehen. Sie kodieren die adenoviralen Strukturproteine (Törmanen Persson et al., 2012). Das Adenovirus kodiert außerdem abhängig vom Serotyp ein oder zwei virus-assoziierte RNAs (VA RNA I und VA RNA II), die von der RNA-Polymerase III transkribiert werden und der Inhibierung der Proteinsynthese der Wirtszelle dienen (Shenk, 2001; Hall et al., 2010).

Das Kapsid ist aus 252 Untereinheiten, den Kapsomeren, aufgebaut, von denen 240 Hexone und 12 Pentone sind. Die Pentone, die je aus einer Petonbasis und einem Fiberprotein bestehen, befinden sich an den Ecken des Ikosaeders (Abb. 1.1). Das trimerische Fiberprotein ragt dabei antennenartig in die Peripherie und vermittelt die primäre Interaktion mit dem Rezeptor der Zielzelle (Russell, 2009; Shenk, 2001; Roelvink et al., 1998). Bis auf Ad40 und Ad41 kodieren alle Serotypen nur ein einziges Fiberprotein. Da diese beiden Serotypen jeweils zwei Fiberproteine kodieren, die gemeinsam strukturelle Bestandteile ihrer Virione sind, könnte dies ein Hinweis auf die Existenz multipler Rezeptoren sein (Kidd et al., 1993; Yeh et al., 1994). Die 20 Seitenflächen des Ikosaeders werden von je 12 Hexon-Proteinen gebildet. Ein jedes Hexon ist ein Trimer des viralen Hexonproteins (Polypeptid II) (Shenk, 2001).

Vier zusätzliche Strukturproteine, die sogenannten minor Proteins sind mit den drei Hauptbestandteilen der Kapsomere verbunden: IIIa, VI, VIII und IX (Vellinga, et al., 2005). Sie dienen der Stabilisierung des Kapsids (Wiethoff et al., 2005). Daneben sind fünf weitere Struktuproteine bekannt, die sich im Inneren des Virus befinden: V, VII, Mu, IVa2, das terminale Protein TP und die 23K virale Protease (Russell, 2009). Das Polypeptid VII ist das Hauptstrukturprotein des *Core*. Es fungiert als Histon-ähnliche Einheit, um die sich die DNA windet (Chatterjee et al., 1986). Die Funktion des Polypeptids V ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist relativ fest mit dem Polypeptid VI, das als Bestandteil der Hülle mit Hexon assoziiert ist, verbunden, was auf seine mögliche Brückenfunktion zwischen *Core* und Kapsid hinweist (Matthews and Russell, 1998). Gleichermaßen konnte auch die Funktion des Mu Proteins noch nicht vollständig aufgeschlüsselt werden. Einerseits akkumuliert Mu im Nukleolus andererseits scheint seine Vorstufe, das preMu, eine inhibitorische Wirkung auf die Expression der späten adenoviralen Gene zu haben (Lee et al., 2004). pTP, die Vorstufe des TP, ist essentiell an der Virusreplikation beteiligt. pTP bildet einen Komplex mit der viralen Polymerase, der als Initiator der Transkription fungiert (Webster et al., 1997, de Jong und van der Vliet). Die Spaltung von pTP zu TP und preMu zu Mu ist dabei durch die virale Protease katalysiert, die auch für die Entstehung der viralen Polypeptide IIIa, VII, VIII, IX und VI aus ihren Vorstufen verantwortlich ist (Mangel et al., 2003; Russell, 2009). Dem IVa2 Protein kommen mehrere wichtige Funktionen zu. Es fungiert als Transkriptionsaktivator des Major Late Promotors, der vor allem die Expression der späten a-denoviralen Gene reguliert (Tribouley et al., 1994; Lutz und Kedinger, 1996) und ist sowohl am Aufbau des Kapsids als auch an der Verpackung der Virus-DNA entscheidend beteiligt (Ostapchuk et al., 2005). So konnten Zhang und Imperiale zeigen, dass Adenovirus-Mutanten, die kein IVa2 exprimierten, nicht in der Lage waren infektiöse Partikel zu bilden (Zhang und Imperiale, 2003).



Abb. 1-1: Struktur des Adenovirus (modifiziert nach Russel, 2009)



Abb. 1-2: Organisation des adenoviralen Genoms (Hall et al., 2010)

Die kodierenden Gene für E1A, E1B, E3, IX, die späten Proteine (L1 - L5) sowie die Virus assoziierten RNAs werden rechtswärts abgelesen. Die Gene für E4, E2A, E2B und IVa2 in werden linkswärtiger Orientierung abgelesen.

1.1.3 Replikationszyklus

Der adenovirale Replikationszyklus lässt sich in eine frühe und eine späte Phase unterteilen. Dabei beinhaltet die frühe Phase den Eintritt des Virus in die Wirtszelle, den Transport zum Nukleus sowie die Transkription und Translation der frühen Gene und dauert in permissiven Zellen etwa 6 - 8 Stunden. Die späte Phase dauert weitere 4 - 6 Stunden und umfasst die Replikation der DNA, die Transkription und Translation der späten Gene sowie die abschließende Bildung der infektiösen Viruspartikel (Russell, 2000).

1.1.3.1 Frühe Phase

Die frühe Phase des Infektionszyklus beginnt mit der Bindung des Adenovirus an die Wirtszelle. Diese erfolgt für alle Serotypen über die Interaktion der C-terminalen Knöpfchendomäne des Fiberproteins mit dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Bergelson et al., 1997; Roelvink et al., 1998). Die einzigen Ausnahmen hiervon bilden einige Serotypen der Gruppe D (z.B. Ad37), die über N-Acetylneuraminsäure an die Zelle binden sowie die Gruppe B, für die CD46 als Rezeptor beschrieben wurde (Arnberg et al., 2000; Hall et al., 2010). Die Internalisierung des Virus erfolgt nach Interaktion des RGD (Arginin - Glycin - Asparaginsäure) Motifs der Pentonbase mit den zellulären Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ durch Endozytose (Wickham et al., 1993; Mathias et al., 1994). Die Bindung der RGD-Domäne bewirkt eine Konformationsänderung der Integrine. Die daraufhin induzierte Signalkaskade führt zu Veränderungen des Zytoskeletts, die die Endozytose des Adenovirus mittels *Clathrin-coated vesicles* ermöglichen (Li et al., 1998;

Wang et al., 1998; Clark und Brugge, 1995). Für die Serotypen Ad3 und Ad35 der Gruppe B konnte ein alternativer Mechanismus der Internalisierung nachgewiesen werden. Nach Bindung ihres Rezeptors CD46 und Interaktion mit den α_v-Integrinen werden sie mittels Makropinozytose in die Zelle aufgenommen (Amstutz et al., 2008; Kälin et al., 2010). Zeitgleich mit der Internalisierung beginnt bei den Adenoviren der Gruppe C die Dissoziation des Kapsids. Das Fiberprotein desintegriert bereits während des Vorgangs der Endozytose vom Virion und ist somit bereits im frühen Endosom nicht mehr nachweisbar (Greber et al., 1993). Durch die Aktivität der vakuolären Protonen-ATPase in der Membran sinkt in der Folge der pH-Wert im Inneren des Endosoms. Vermutlich ist die saure Umgebung der Reiz, der anschließend die schrittweise Dissoziation der Kapsidproteine initiiert (Hall, 2010). Zunächst lösen sich die verbliebenen Fiberproteine, dann die Pentonbase und das Polypeptid IIIa. Im Anschluss erfolgt die Dissoziation der Proteine VI, VIII und schließlich des Polypeptids IX (Greber et al., 1993). Das Protein VI vermittelt die Lyse der endosomalen Membran und die darauf folgende Freisetzung der Virus-DNA zusammen mit den restlichen Strukturproteinen ins Zytoplasma (Wiethoff et al., 2005). Der anschließende Transport des partiell dissoziierten Virions zum Nukleus erfolgt vermutlich entlang der Mikrotubuli mit Hilfe des Motorproteins Dynein, das an das Hexonprotein bindet (Bremner et al., 2009; Leopold et al., 2000). Im nächsten Schritt bindet das partiell dissoziierte Adenovirus durch Interaktion des Hexonproteins mit dem zytoplasmatischen Filamentprotein CAN/Nup214 an den nukleären Porenkomplex. Nach Assoziation des beweglichen nukleären Proteins Histon H1 mit dem Hexonprotein und Bindung der H1-Importfaktoren Impβ und Imp7 erfolgt die vollständige Dissoziation des Kapsids (Trotman et al., 2001). Ein weiteres Protein, das hsp70, scheint an diesem Prozess ebenfalls entscheidend beteiligt zu sein, indem es in seiner Funktion als molekulare Chaperone möglicherweise das Virion in seiner dissoziierten Funktion stabilisiert (Saphire et al., 2000). Der genaue Mechanismus des nukleären Imports der adenoviralen DNA ist noch nicht abschließend geklärt. Trotman et al. postulieren, dass der Transport durch die nukleären Porenkomplexe vornehmlich durch die Importfaktoren Impß und Imp7 vermittelt wird. Das Histon H1 als nukleäres Protein gelangt zu geringen Teil auch in das Zytoplasma. Die H1-Importfaktoren vermitteln seinen Rücktransport in den Nukleus, so dass ein Steady-State erreicht wird. Die virale DNA könnte also kotransportiert werden, vermittelt durch die Bindung DNAnaher Hexonproteine an das Histon H1 (Trotman et al., 2001). Hindley et al. sehen das adenovirale Protein VII als Hauptvermittler des Kernimports. In diesem Modell wird der Transport durch die nukleären Porenkomplexe durch die Bindung von Protein VII an den Importrezeptor Transportin vermittelt. Die Importfaktoren, hsp70 und das Histon H1 bewirken dabei zunächst die Dissoziation des Kapsids und anschließend die erforderlichen Konformationsänderungen, um die Bindung von Protein VII an das Transportin zu ermöglichen (Hindley et al., 2007). Das Hexonprotein des Serotypen Ad3 besitzt nicht die eforderliche Domäne, um das Histon H1 zu binden. Die Translokation der viralen DNA muss hier folglich durch einen anderen Mechanismus erfolgen (Trotman et al., 2001).

Im Nukleus beginnt die Transkription der frühen Gene. Als erstes werden die E1 Gene exprimiert, weswegen sie auch als *immediate early genes* bezeichnet werden. Für ihre Expression sind keine anderen in der Zelle neu synthetisierten viralen Faktoren erforderlich. Das E1 Gen kann in zwei Untereinheiten unterteilt werden: E1A und E1B. Vom E1A Gen werden durch alternatives Spleißen zwei mRNA Spezies gebildet, von denen die beiden Hauptprodukte der E1A-Region, 289R (13s) und 243R (12s), translatiert werden. Drei weitere Genprodukte, 9s, 10s und 11s, entstehen zu einem späteren Zeitpunkt aus derselben pre-mRNA (Shenk, 2001). Die Hauptfunktion der frühen E1A Proteine besteht darin, durch die Interaktion mit Zellzyklus regulierenden Elementen den Eintritt der Zelle in die S-Phase zu induzieren und dadurch die Voraussetzungen für die adenovirale Genomreplikation zu schaffen. Eine weitere Funktion besteht in der Aktivierung der Transkription der nachfolgenden frühen Gene E1B, E2, E3 und E4 und der späten Gene (L) (Russell 2000, Shenk, 2001). Die verschiedenen Funktionen der E1A-Produkte beruhen auf der Interaktion mit unterschiedlichen zellulären Proteinen (siehe Tab.1) und sind für die virale Replikation essentiell (Biederer et al., 2002).

Interaktionspartner	Wirkung
p21 und verwandte CDK- Inhibitoren	Stimulation von Zellteilung und -wachstum
Cyclin A-p33cdk2 Komplex und Cyclin E-p33cdk2 Kom- plex	Regulation der zellulären DNA-Synthese
p300/CBP Familie (Transak- tivatoren)	Regulation des Zellzyklus, Induktion von p53 unabhängiger Apoptose
Rb/p130 Proteinfamilie ("pocket proteine")	Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F und somit Induktion der S-Phase der Zellen und der Transkripiton der adenoviralen E2-Region
Multiproteinkomplex Sur-2	Stimulation der Transkription der viralen Gene
TATA-box-binding protein (TBP) und TBP-associated protein (TAF)	Regulation der Transkription

Tab. 1-1:Übersicht über die Hauptinteraktionspartner der E1A-Produkte (modifiziert nach Russell,
2000)

Interaktionspartner	Wirkung
Sug1	Stabilisierung von p53 und somit Promotion von Apoptose
UBC9	Modifikation und Stabilisierung zellulärer Proteine wie p53
STAT-1	Inhibierung der Interferonantwort

Das E1B-Gen codiert in überlappenden Leserahmen für zwei Proteine, E1B19kD und E1B55kD. Das kleinere Produkt, E1B19kD, ist ein Analogon des zellulären Proteins Bcl-2 und fungiert wie Bcl-2 als Apoptoseinhibitor (Russell 2000; Rao et al., 1992). Das E1B55kD Protein unterdrückt die Funktion des zellulären Tumorsuppressorgens p53, indem es seine Aktivität als Transkriptionsaktivator inhibiert (Kao et al., 1990; Yew et al., 1994). Des weiteren führt E1B55kD durch Interaktion mit dem adenoviralen Protein E4-ORF6 das p53 dem proteolytischen Abbau im Zytoplasma zu (Lomonosova et al., 2005; Harada et al., 2002). p53 kann auch als Wächter des Genoms bezeichnet werden, da es im Falle einer Schädigung der DNA entweder den Arrest des Zellzyklus herbeiführt, so dass die Reparatur der DNA erfolgen kann, oder es die Apoptose der geschädigten Zelle induziert (Kastan et al, 1992; Lowe et al., 1993; Shaw et al., 1992, Clark et al., 1993). Es wird somit deutlich, dass DNA-Viren, wie das Adenovirus, p53 inhibieren müssen, um ihre DNA im Nukleus der Wirtszelle zu replizieren ohne dass die Zelle in Apoptose geht und ohne dass die zellulären Reparaturmechanismen induziert werden und somit die S-Phase und folglich die eigene DNA-Replikation beendet wird (Lane, 1992).

In der späten Phase des Replikationszyklus erfüllt das E1B-55kD eine weitere Funktion. Im Zusammenspiel mit E4-ORF6 vermittelt das große E1B Produkt den Transport der späten viralen mRNA in das Zytoplasma, wobei zugleich die Translokation der zellulären mRNA gehemmt wird (Blanchette et al., 2008).

Das E2 Gen kann unterteilt werden in E2A und E2B. Dabei kodiert E2A das *DNA binding protein* (DBP). Aus der E2B-Region leiten sich die virale Polymerase (Pol) und die Vorstufe des terminalen Proteins (pTP) ab. Alle drei Proteine spielen eine entscheidende Rolle während der viralen DNA-Replikation (deJong und van der Vliet, 1999).

Die Produkte der E3-Region sind für die virale Replikation nicht essentiell und auch nicht in allen Serotypen konserviert (Su et al., 2011). Es handelt sich um mehrere verhältnismäßig kleine Proteine, die vornehmlich dazu dienen die Immunantwort des Wirtsorganismus zu modulieren, um eine andauernde adenovirale Infektion zu etablieren. Das E3-gp19K inhibiert den Transport von MHC Klasse I Molekülen zur Plasmamembran und supprimiert gleichzeitig die Prozessie-

rung von adenoviralen Peptiden, so dass sie von den MHC I Molekülen auf der Plasmamembran nicht präsentiert werden können. Auf diese Weise wird die Erkennung der infizierten Zelle durch zytotoxische T - Zellen verhindert (Burgert et al., 1987; Bennett et al., 1999). E3-14.7K und der Proteinkomplex E3-10.4/14.5K fungieren als Apoptoseinhibitoren (Shisler et al., 1997; Wold et al., 1999). Das einzige proapoptotisch wirkende Protein ist das E3-11.6 K Protein, auch als *Adenovirus Death Protein* (ADP) bezeichnet. Seine Expression ist im Unterschied zu den anderen

E3 Produkten durch den MLP reguliert, so dass E3-11.6 erst in der späten Phase der adenoviralen Repliaktion synthetisiert wird. Seine Funktion besteht vermutlich darin nach Abschluss der DNA-Replikation und erfolgter Konstitution der Virione die Lyse und somit den Tod der Zelle zu propagieren und die Freisetzung der Virusnachkommen zu vermitteln (Tollefson et al., 1996).

In der E4-Region werden sieben verschiedene Polypeptide kodiert, die durch alternatives Spleißen aus einem großen Primärtranskript gebildet werden und entsprechend der Reihenfolge und Anordnung des zugehörigen offenen Leserahmens als E4-ORF1, E4-ORF2, E4-ORF3, E4-ORF3/4, E4-ORF4, E4-ORF6 und E4-ORF6/7 bezeichnet werden. Alle Proteine bis auf das E4-ORF3/4 konnten auch in Adenovirus infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die E4-Produkte interagieren auf komplexe Weise mit verschiedenen Schlüsselproteinen des viralen sowie des zellulären Stoffwechsels und erfüllen somit eine Vielzahl von Funktionen im Rahmen des viralen Replikationszyklus, wie beispielsweise die Regulation von Apoptose und viraler Transkription und Translation. Gleichzeitig sind sie indirekt an der viralen DNA-Replikation beteiligt und nehmen Einfluss auf verschiedene Signaltransduktionswege (Täuber und Dobner, 2001; Russell 2000).

1.1.3.2 Späte Phase

Durch die Expression der frühen Gene wurde in der Zelle die optimale Umgebung für die adenovirale DNA-Replikation geschaffen. Die DNA-Replikation beginnt nach Bindung des Initiationskomplexes, bestehend aus der viralen Polymerase (Pol) und der Vorstufe des terminalen Proteins (pTP), im Bereich der *Inverted Terminal Repeats*. Bei einigen Serotypen fungieren die zellulären Faktoren NFI und Oct-1 als Transkriptionsenhancer, indem sie den Initiationskomplex stabilisieren. Die Elongation der DNA wird hauptsächlich durch die Funktion des viralen *DNA Binding Proteins (DBP)* vermittelt (de Jong und van Vliet, 1999). Nach Beendigung der Replikation beginnt die Transkription der späte Gene L1 - L5, die überwiegend für Strukturproteine kodieren. Ihre Expression ist durch den MLP reguliert (Russell, 2000). Die abschließende Verpackung des Virus wird durch das Packaging-Signal vermittelt, eine AT-reiche Region am linken Ende des Genoms (Ostapchuk et al., 2005). Den viralen Proteinen L152/55kD, L4-22kD und IVa2 kommt dabei eine Schlüsselfunktion zu (Ewing et al., 2007; Perez-Romero et al., 2006). Nach der gängigen Theorie wird die virale DNA nach Bildung des Kapsids an einem spezifischen Vertex in das Kapsid eingebracht (Hall et al., 2010). Zhang und Imperiale auf der anderen Seite erörtern in ihrer Arbeit die These, dass die Kapsomere um einen bestehenden DNA-Kern herum zusammengefügt werden (Zhang und Imperiale, 2003). Abschließend erfolgt Spaltung der Vorläuferproteine pVI, pVII, pVIII, pMu und pTP in ihre maturierte Form durch die Protease 23k (Mangel et al., 2003; Hall et al., 2010). Vermittelt durch das Adenovirus Death Protein erfolgt die Lyse der Zelle und anschließende Freisetzung der fertigen Virione (Tollefson et al., 1996). Alternativ dazu wird die Freisetzung des Virus mittels Autophagozytose postuliert (Jiang et al., 2008). Die Gruppe B Adenoviren kodieren kein Adenovirus Death Protein (ADP), so dass sich die Adenoviren dieses Serotyps den Weg aus der Zelle über einen alternativen bisher noch nicht determinierten Mechanismus bahnen müssen (Hall et al., 2010).

1.2 RNA-Interferenz

1990 unternahmen Napoli et al. den Versuch eine besonders farbstarke violette Petunie zu generieren. Zu diesem Zweck sollte ein für die Pigmentsynthese verantwortliches Enzym durch Einbringen eines transgenen Enzyms überexprimiert werden. Als Resultat erhielten die Forscher weiße oder gemischt weiße/violette Petunien und fanden in der Folge heraus, dass in diesen Phänotypen sowohl die mRNA des Wildtyp Enzyms als auch die des transgenen Enzyms herunterreguliert war (Napoli et al., 1990). Die genaue Beschreibung dieses später als RNA Interferenz (RNAi) bezeichneten Mechanismus des posttranskriptionellen Gen-Silencings erfolgte einige Jahre später im Nematoden C. elegans durch Andrew Fire und Craig C. Mello, die 2006 für ihre Arbeit mit dem Nobelpreis geehrt wurden (Fire et al., 1998).

RNAi bezeichnet einen hoch konservierten Mechanismus, dem zu Folge durch enzymatische Spaltung im Zytoplasma kurze RNA-Doppelstränge entstehen, die die sequenzspezfische Bindung eines komplementären RNA-Einzelstranges vermitteln, der daraufhin degradiert oder dessen Translation in der Folge inhibiert wird. In fast allen Eukaryonten ist die RNAi ein zentraler Mechanismus zur Regulation von Genen und zur Abwehr viraler Infektionen.

1.2.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Durch lange doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) wird eine Kaskade initiiert, an deren Ende die Spaltung einer sequenzhomologen einzelsträngigen RNA steht. Alternativ kann zu Beginn des Signalweges auch eine precursor-microRNA (pre-miRNA) stehen, in diesem Fall erfolgt am Ende in der Regel die Hemmung der Translation des komplementären RNA-Einzelstranges. Beide Kaskaden besitzen eine gemeinsame Endstrecke und werden unter dem Begriff RNAi zusammengefasst.

Lange Moleküle doppelsträngiger RNA entstehen in der eukaryontischen Zelle nach Eindringen eines Virus oder nach Integration von Transposons oder Transgenen in das Wirtsgenom (Tuschl und Borkhardt, 2002). pri-miRNAs, die Vorstufen der miRNAs, werden durch Transkription genomischer DNA gebildet. Diese mehrere hundert bis mehrere tausend Basenpaare langen Transkripte werden dann noch im Zellkern durch das RNase-III-like-Enzym Drosha in ca. 70 Basenpaare große pre-miRNAs gespalten (Lee et al., 2003). Der nukleäre Exportfaktor Exportin 5 vermittelt den Transport in das Zytoplasma (Yi et al., 2003; Bohnsack et al., 2004). Lange dsRNA und pri-miRNA werden dort durch Dicer, ein weiteres RNase-III-like-Enzym, in kurze RNA-Dopplestränge von 21-28 Basenpaaren Länge gespalten, den small interfering RNAs (siRNAs) bzw. miRNAs (Bernstein et al., 2001). Anschließend werden die si- bzw. miRNAs in den RNA-induced-silencing-Complex (RISC) integriert, der die Degradierug bzw. translationale Hemmung der Ziel-RNA vermittelt (Hammond et al., 2000). RISC ist ein Ribonukleoproteinkomplex, der hauptsächlich von einem siRNA-Einzelstrang und Proteinen der Argonaute-Familie gebildet wird (Martinenz et al., 2002). Die Beladung des RISC wird vermutlich durch den RISC-loading complex (RLC) vermittelt, der in Säugetierzellen aus Dicer, Argonaute 2 (Ago 2) und dem trans-activating response RNA-binding Protein (TRBP) besteht (Maniataki and Mourelatos, 2005). Noch im RLC wird ein RNA-Strang gespalten und abgebaut. Aus dem anderen Strang, der komplementär zur Zielsequenz ist, und Ago2 geht der RISC Komplex hervor (Matranga et al., 2005). Argonaute Proteine besitzen zwei charakteristische Domänen: PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) und PIWI (Carmell et al., 2002). PAZ ist eine RNA-Bindungs-Domäne, die spezifisch die si/mi-RNA Helix mit ihren charakteristisch Nukleotidüberhängen an beiden 3'- Enden erkennt und bindet (Ma et al., Lingel et al., 2004). Auf diese Weise kann die akzidentelle Prozessierung anderer RNA-Moleküle verhindert werden. Die Endonuklease Dicer enthält ebenfalls eine PAZ-Domäne, was die spezifische Erkennung von dsRNA und pre-miRNA erklären könnte (Zhang et al., 2002; Baysuk et al., 2003; Meister und Tuschl, 2004). Die PIWI Domäne weist Ähnlichkeiten mit den Enzymen der RNase H Familie auf (Song et al., 2004), die für die Spaltung der RNA Komponente eines DNA/RNA-Duplex verantwortlich sind, so dass Ago 2 die Spaltung der Ziel-RNA zugeschrieben wird. Ago 2 katalysiert die Hydrolyse der Phosphodiesterase-Bindungen in einer genau definierten Region nahe der Mitte des Doppelstranges aus si- und Ziel-RNA 11 oder 12 Nukleotide stromab des ersten Nukleotids, das komplementär zur siRNA ist (Elbashir et al., 2001a).

Obwohl davon auszugehen ist, dass ca. 30% der codierenden Gene des Säugetierorganismus durch miRNAs reguliert sind und dass miRNAs an der Regulation nahezu aller derzeit bekannten Prozesse auf zellulärer Ebene beteiligt sind (Lewis et al., 2005; Filipowicz et al., 2008), ist die miRNA vermittelte RNAi weniger gut verstanden. miRNAs wirken vorwiegend indem sie einen Arrest der Translation herbeiführen (Olsen und Ambros, 1999). Nachdem die miRNA als Einzelstrang in den RISC-Komplex inkorporiert wurde, vermittelt sie die Bindung an die komplementäre mRNA im Bereich der 3'UTR der mRNA, dabei kommt es bei den Metabionta in der Regel nur zu einer vollständig übereinstimmenden Basenpaarung im Bereich der Basen 2 - 8 am 5'-Ende der miRNA, der sogenannten *seed region* (Lewis et al., 2003; Lai, 2002; Brennecke et al., 2005; Filipowicz et al., 2008) und folglich zu einer Hemmung der Translation (Olsen and Ambros, 1999). Die Degradierung der Ziel-mRNA erfolgt nur bei vollständiger oder nahezu vollständiger Komplementarität der Sequenzen von miRNA und Ziel-mRNA und ist vorrangig bei Pflanzen beschrieben worden (Rhoades et al., 2002; Llave et al., 2002; Du und Zamore, 2005). Im Tierreich sind bisher nur wenige miRNAs charakterisiert, die die Spaltung ihrer komplementären mRNA vermitteln (Yekta et al., 2004; Davis et al., 2005).



Abb. 1-3: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz (modifiziert nach van Rij und Andino, 2006)

Die pri-miRNAs entstehen als Transkripte genomischer DNA. Noch im Zellkern werden sie durch die Endoneuclease Drosha zur pre-miRNA prozessiert. Der Transport ins Zytoplasma erfolgt mittels Exportin 5. Viren oder Transposons stellen weitere Quellen für dsRNA dar. Im Zytoplasma wird die dsRNA zunächst durch das RNase III - like Enzym *Dicer* in kleinere RNA-Doppelstränge von etwa 21 - 28 Basenpaaren Länge gespalten, die siRNA bzw. miRNA. Als Einzelstrang werden die si/miRNAs dann durch den Multiproteinkomplex RISC gebunden und vermitteln in der Folge entweder die Degradierung der komplementären mRNA oder den Arrest der Translation.

1.2.2 siRNAs

1.2.2.1 Struktur

Nach der bahnbrechenden Entdeckung der RNAi im Nematoden *C. elegans* (Fire und Mello, 1998) musste noch einige Zeit vergehen, bis der Mechanismus für Gen-Silencing basierte Untersuchungen bei Eukaryonten nutzbar gemacht werden konnte. Erst mit der vollständigen molekularbiologischen Aufschlüsselung des Pathways wurden die siRNAs als Schlüsselstrukutren identifiziert und damit die Möglichkeit geschaffen die durch das Einbringen langer dsRNA-Moleküle hervorgerufene Interferonantwort (Katze et al., 2002; Stark et al., 1998; Dorsett und Tuschl, 2004) zu umgehen.

siRNAs sind kurze RNA-Doppelstränge von etwa 21 Basenpaaren Länge. An beiden 3[°] Enden der Helix befinden sich charakteristische Überhänge in Form von 2 freien Nukleotiden (Elbashir et al., 2001b). Nachdem der siRNA Duplex zunächst an den *RISC Loading Complex (RLC)* gebunden hat, wird ein Strang, der sogenannte *passenger* Strang degradiert. Der andere Strang, auch als *guided* Strang bezeichnet und das Ago 2 Protein bilden die Hauptkomponenten des RISC Komplex. Der *guided* Strang vermittelt dann die Bindung an die zu ihm komplementäre Ziel-mRNA (Matranga et al., 2005). Grundsätzlich ist nicht festgelegt, welcher Strang des RNA Duplexes zum *guided* Strang wird. Es gibt jedoch Faktoren, die die Aufnahme in den RISC-Komplex begünstigen. Auf diese Weise ist es möglich den Strang, der die maximale Homologie für die Zielstruktur aufweist, zu selektieren und somit den Silencing-Effekt zu optimieren. Längere Zeit galt die thermodynamische Instabilität am 5[°] Terminus als endscheidender begünstigen, dass sowohl die thermodynamische Instabilität als auch die Sequenz am 5[°] Ende entscheidend die Aufnahme eines Stranges in den RISC Komplex begünstigen (Walton et al., 2010).

siRNAs können entweder endogen durch Dicer vermittelte Spaltung langer dsRNA Moleküle entstehen oder sie können synthetisch hergestellt und anschließend in die Zelle eingebracht werden. Synthetisch hergestellte siRNAs tragen an ihrem 5^c Ende eine Hydroxylgruppe. Um in den RISC -Komplex integriert zu werden benötigen sie jedoch eine Phosphatgruppe in dieser Position (Nykänen et al., 2001). Die erforderliche Phosphorylierung der siRNAs findet nach ihrem Eintritt in die Zelle statt und wird durch die Kinase hClp1 vermittelt (Weitzer und Martinez, 2007). siRNAs bewirken eine signifikante Reduktion der Proteinexpression, dabei wird das Zielgen jedoch in den meisten Fällen nicht komplett ausgeschaltet wie es beispielsweise bei der homologen Rekombination der Fall ist. Es wird daher in Zusammenhang mit RNA Interferenz auch von *Knockdown* im Unterschied zu *Knockout* (z.B. transgene Tiere) gesprochen (Kurreck, 2009). Die Dauer der siRNA Wirkung liegt in der Regel zwischen 5 und 7 Tagen (Holen et al. 2002; Watanabe et al., 2004).

1.2.2.2 Chemische Modifikationen

Zusätzliche Stabilisierung gegenüber Ribonukleasen und somit eine verlängerte Lebendsdauer der siRNAs konnte beispielsweise durch Austausch der Hydroxylgruppe an der 2'-Position der Ribose mit einem Fluoropyrimidin-Rest oder einer O-Methylgruppe erreicht werden (Morrissey et al., 2005). Dies ist vor allem für die *in vivo* Applikation von Bedeutung.

Mittels chemischer Modifikation lässt sich auf verschiedene Weise die Funktion der synthetischen siRNAs durch kleinere Veränderungen der Molekülstruktur erweitern ohne dabei die Silencing-Aktivtiät zu beeinträchtigen. Hauptziele sind dabei die Erhöhung der Stabilität gegenüber Nukleasen (s.o.), die Verbesserung der Aufnahme in die Zielzelle und der Pharmakokinetik sowie die Minimierung von unerwünschten Nebenwirkungen im Sinne einer Aktivierung der Immunantwort oder der Interferenz mit dem endogenen miRNA-Pathway (Behlke, 2008). Ein weiteres Besipiel für eine solche Modifikation ist das Einbringen einer 2'-desoxy-2'-fluoro-β-darabinonukleinsäure-Gruppe (FANA) an der 2^c Position der Ribose-moleküle des *sense* Stranges, wodurch zum einen die Serumhalbwertszeit der siRNA auf bis zu 6 h angehoben werden (im Vergleich zu 15 min für unmodifizierte siRNA) und zum anderen die Silencing-Aktivität um ein Vierfaches gesteigert werden konnte (Dowler et al., 2006). Durch Austausch der Hydroxylgruppe des *passenger* Stranges durch eine Methoxy-Gruppe kann verhindert werden, dass er wie der *guided* Strang phosporyliert und in den RISC-Komplex inkorporiert wird, so dass *offtarget* Effekte reduziert werden können (Chen et al., 2008).

1.2.2.3 Unerwünschte Nebenwirkungen

Dennoch stellen unerwünschte Nebenwirkungen wie *off-target* Effekte, die Interferenz mit dem *miRNA Pathway* oder die Induktion einer Interferonantwort ein zentrales Problem bei der Anwendung von siRNAs dar. Die Entstehung von *off-target* Effekten, das heißt die siRNA vermittelte Degradierung von mRNA, die nicht als Zielstruktur definiert wurde, lässt sich vorwiegend damit erklären, dass die perfekte Übereinstimmung der Basen 2 - 8 (*seed region*) der siRNA mit der 3'UTR einer mRNA hinreichend ist, um den konsekutiven Abbau der mRNA herbeizuführen (Birmingham et al., 2006; Anderson et al., 2008). Gleichwohl konnte jedoch gezeigt werden, dass siRNAs, deren *seed* Komplement ein häufig wiederkehrendes Sequenzmotiv im 3'UTR Transkriptom darstellt, stärkere *off-target* Effekte bewirken als siRNAs, die im Bereich der Basen 2 - 8 ein seltenes Sequenzmotiv besitzen (Anderson et al., 2008). Daraus lässt sich die Möglichkeit ableiten *off-target* Effekte durch intelligentes siRNA-Design zu minimieren.

Ein weiteres Problem des siRNA vermittelten Gen-Silencing besteht in der Interferenz mit dem endogenen miRNA Pathway. Synthetische siRNAs und zelluläre miRNAs nutzen einen über weite Strecken identischen Pathway, so dass es nicht weiter verwunderlich ist, dass siRNAs wie miRNAs wirken können, indem sie die mRNA an der 3'UTR nur über partiell homologe Basenpaarung binden und in der Folge den Arrest der Translation herbeiführen. Wie weitreichend die Konsequenzen daraus sind, ist hingegen noch zu großen Teilen ungeklärt (Doench et al., 2003).

Wie die dsRNAs können auch siRNAs die Interferonantwort des Wirtsorganismus triggern. siR-NAs werden von einigen Toll-like-Rezeptoren (TLR 3, 7, 8), die spezifische Rezeptormoleküle auf der Oberfläche von Immunzellen darstellen, erkannt und aktivieren auf diese Weise eine Sig-

nalkaskade an deren Ende die Produktion von Interferonen steht (Doyle et al., 2002; Takeda und Akira., 2005). In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine siRNA gegen VEGF, die zur Behandlung der altersabhängigen Makuladegenration (AMD) bereits in einer Phase III Studie eingesetzt wurde, ihren Effekt, die Hemmung der Neovaskularisierung, nicht durch Silencing des Zielgens, sondern durch Aktivierung des Toll like Rezeptors und die darauffolgende Herunterregulation des VEGF durch Interferon gamma und Interleukin 12 ausübte (Kleinmann et al., 2008). Die Phase III Studie musste daraufhin eingestellt werden.

Des Weiteren können uridin- und uridin-/guanosinreiche Motive innerhalb der siRNA-Sequenz die Zytokin- und Interferonausschüttung triggern (Hornung et al., 2005; Judge et al., 2005) und auch über die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) können siRNAs immunstimulatorisch wirken (Sledz et al., 2003).

Die in Zusammenhang mit der Applikation von siRNAs beschriebenen Immunphänomene stellen schwerwiegende Risiken für die Anwendung der siRNAs *in vivo* dar. Aus diesem Grund wird intensiv und mit Erfolg daran gearbeitet beispielsweise durch chemische Modifikationen (Pkt. 1.2.2.2) das immunogene Potential der siRNAs zu eliminieren (Sioud et al., 2007).

1.2.3 siRNA in der Anwendung

Seit der Beschreibung der RNA-Interferenz durch Fire und Mello Ende der neunziger Jahre haben siRNAs in vielen Bereichen der Molekularbiologie erfolgreich Einzug gehalten. Mit der siRNA Technologie ist es grundsätzlich möglich jede beliebige Ziel-mRNA mit bekannter Sequenz herunterzuregulieren. Daraus ergibt sich eine große Verwendungsbreite in der Forschung sowie ein enormes therapeutisches Potential.

Nachdem das menschliche Genom entschlüsselt worden war, waren zwar die Sequenzen aller Gene bekannt, die Funktion der kodierten Proteine war jedoch vielfach unklar. Durch den Einsatz von siRNAs können vergleichsweise schnell *loss of function* Phänotypen zur Analyse der Genfunktion hergestellt werden (Cerone et al., 2011), so dass sich die RNA Interferenz rasch als Standardmethode in der molekularbiologischen Forschung etablieren konnte (Kurreck, 2009). 2003 wurden siRNAs erstmalig zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. Im Mausmodell konnten Song et al. zeigen, dass durch Applikation von siRNAs gegen *Fas*, einen Transmembranrezeptor, der an der Vermittlung der zellulären Apoptose beteiligt ist, die Entwicklung einer fulminanten Hepatitis effektiv verhindert werden kann (Song et al., 2003). Mittlerweile gibt es bereits mehrere klinische Studien mit verschiedenen siRNAs (DeVincenzo et al., 2010; Burnett et al., 2011), die sich zum Großteil noch aktuell in der Durchführung befinden. Eine bereits abgeschlossene Phase I Studie liegt beispielsweise für eine siRNA zur Therapie der altersabhängigen Makuladegeneration vor. Die siRNA hat den VEGF-Rezeptor als Zielstruktur und konnte erfolgreich zur Stabilisierung bzw. Verbesserung der Sehschärfe der Probanden eingesetzt werden, wobei nur minimale unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftraten (Kaiser et al., 2010).

Weitere Felder, in denen siRNAs bereits in vielversprechenden Ansätzen erprobt werden, sind die Therapie von Stoffwechselerkrankungen wie z.B. der Hypercholesterinämie. Zimmermann et al. konnten am Modell des Cynomolgus Affen zeigen, dass siRNAs gegen Apolipoprotein B eine messbare Verringerung des Serumcholesterins sowie der Low-density-Lipoprotein-Spiegel bewirken (Zimmermann et al., 2006). Die Tumortherapie (vgl. z. B. Pai et al., 2005) und die Behandlung genetischer Erkrankungen wie beispielsweise der Chorea Huntington (de Mezer et al., 2011) zählen ebenfalls zu den möglichen Anwendungsgebieten der RNA Interferenz.

1.2.4 Einsatz von siRNA bei viralen Infektionen

Die antivirale Therapie ist ein weiteres großes Feld, in dem siRNAs Gegenstand intensiver Forschung sind. Gegen eine Vielzahl akuter wie chronischer viraler Infektionen konnten siRNAs in Zellkulturstudien, am Tiermodell oder auch in klinischen Studien bereits erfolgreich eingesetzt werden. Dazu zählen neben vielen anderen einige der bedeutendsten humanpathogenen Viren wie das Hepatits C Virus (HCV) (Chevalier et al., 2007), das Hepatitis B Virus (McCaffrey et al., 2003), das Influenza A Virus (Ge et al., 2003) oder auch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) (Novina et al., 2002). Chevalier et al. war es gelungen die antivirale Wirkung von siRNAs gegen hoch konservierte Domänen der 5'NTR (non translated region) des HCV *in vitro* zu demonstrieren. Dazu wurden die siRNA zunächst mit einem subgenomischen Replikon des HCV kotransfiziert und auf diese Weise ihre Aktivität evaluiert. Die siRNAs mit der stärksten antiviralen Aktivität wurden daraufhin weiteren Analysen zugeführt. In einem letzten Schritt konnte dann die effiziente Inhibierung der HC-Virusproduktion in der Zellkultur demonstriert werden, wobei die selektierten siRNAs sich hierbei in Ihrer Aktivität deutlich unterschieden (Chevalier et al., 2007).

Um die Wirksamkeit von siRNAs gegen das Influenza A Virus *in vitro* zu evaluieren wurden von Ge et al. zunächst verschiedene siRNAs generiert, die sich gegen unterschiedliche Zielstrukturen des Virus richteten, denen allen gemein war, dass es sich um hochkonservierte Regionen innerhalb der einzelnen Subtypen und verschiedenen Stämme handelte. Zunächst wurde die antivirale Aktivität jeder einzelnen siRNA untersucht, indem die Zellen zunächst mit den siRNAs transfiziert, dann mit den Influenza Viren infiziert wurden und anschließend die Virustiter bestimmt wurden. Dabei zeigten sich deutlich Unterschiede in der Aktivität der siRNAs. Einige der untersuchten siRNAs hatten nahezu gar keinen Effekt, während die am stärksten aktiven siRNAs den Virustiter um fast 100 % im Vergleich zur Negativkontrolle verringerten. Die nachfolgende Untersuchung in Hühnereiern lieferte ein vergleichbares Bild (Ge et al., 2003).

Auch gegen Adenoviren konnten siRNAs bereits erfolgreich in vitro eingesetzt werden. Nach entsprechender Sequenzanalyse wurden von Chung et al. E1A spezifische siRNAs konstruiert und Adenovirus infizierte Zellen mit den siRNAs behandelt. Mittels real-time PCR konnte daraufhin zunächst die Herunterregulation der komplementären E1A mRNA nachgewiesen werden. In den anschließenden Plaque Assays und Fluoreszenz Assays konnte eine signifikante Inhibierung der adenoviralen Replikation durch die sequenzspezifischen siRNAs demonstriert werden. Auch der durch die Adenoviren hervorgerufene zytopathische Effekt war nach Applikation der siRNAs signifikant reduziert, wobei jedoch in keinem der durchgeführten Versuche eine vollständige Inhibierung der adenoviralen Replikation erreicht werden konnte (Chung et al., 2007).

Betrachtet man beispielhaft die Entwicklung von siRNAs gegen das HI-Virus so werden hierbei gleichsam die Schwierigkeiten und das große Potential der antiviralen siRNA Therapie deutlich. Die sorgfältige Auswahl der Zielstruktur ist von zentraler Bedeutung für den effizienten Einsatz der siRNAs. Zum einen muss eine Ziel-RNA gewählt werden, die für den RISC Komplex strukturell zugänglich ist. Die RNA für das TAR (Transactivation Responsive Element) des HI-Virus beispielsweise kann erst nach Aufbrechen der Sekundärstruktur durch den RISC Komplex angegriffen werden (Brown et al., 2005). Zum anderen hat es sich um dem Problem der Entstehung von Escape Mutanten zu begegnen als vorteilhaft erwiesen hoch konservierte Strukturproteine als Ziele auszuwählen, da diese ein geringeres Risiko für Mutationen tragen (Lee et al., 2007). In der gegenwärtig initial am häufigsten eingesetzten HIV-Pharmakotherapie werden zwei Nukleosid Analoga mit einem Proteasehemmer kombiniert (Stahlmann und Lode, 2009). Eine Kombination von siRNAs gegen verschiedene Zielstrukturen erscheint im Sinne eines therapeutischen Ansatzes ebenfalls sinnvoll, um einen optimalen inhibitorischen Effekt zu erzielen (Li et al., 2005). Im Rahmen einer solchen Kombinationstherapie könnten auch zelluläre Faktoren wie beispielsweise der CCR5-Rezeptor zum Ziel der RNA Interferenz werden. CCR5 ist entbehrlich für den Organismus, das HI-Virus benötigt diesen Co-Rezeptor jedoch um in seine Zielzellen einzudringen (Anderson und Akkina, 2007). In mehreren klinischen Studien wurden anti-HIV siRNAs bereits erfolgreich getestet (Amado et al., 2004.; Kohn et al., 1999).

1.3 Fragestellung

Lange Zeit galten Adenoviren ausschließlich als Verursacher milder Infektionen der Atemwege, der Konjunktiven und des Gastrointestinaltraktes (Shenk, 2001). In jüngerer Zeit haben sie als Pathogene zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zum einen konnten sie als ein Haupterreger der viralen Myokarditis isoliert werden (Bowles et al., 2003; Pauschinger et al., 1999). Zum anderen werden bei immunsupprimierten Patienten immer öfter fulminante Verläufe adenoviraler Infektionen mit letalem Ausgang beschrieben (Hierholzer, 1992; Johnson et al., 1990; Hough et al., 2005).

Dennoch gibt es derzeit keine kausale Therapie adenoviraler Infektionen. Verschiedene Nukleosidanaloga wie Ribavirin, Vidarabin und Cidofovir wurden zwar bereits eingesetzt, sind jedoch bisher nicht als Standardtherapeutika zur Behandlung von Adenovirusinfektionen zugelassen und stellen auch keinen spezifischen therapeutischen Ansatz dar (Arav-Boger et al., 2000; Bordigoni et al, 2001; Hoffmann et al., 2001; Dropulic und Cohen, 2010).

Die siRNA-Technologie ist ein aufstrebendes Feld der Molekularbiologie, deren Potential zur antiviralen Therapie bereits am Beispiel vieler Viren demonstriert werden konnte (Pkt. 1.2.4). Auch am Beispiel des Adenovirus Typ 11 konnte bereits durch Chung et al. gezeigt werden, dass durch Einsatz von siRNAs gegen das adenovirale E1A eine Inhibierung der Virusreplikation erreicht werden kann (Chung et al, 2007).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher *in vitro* am Modell des Adenovirus Typ 5 zunächst die inhibitorische Wirkung von siRNAs gegen E1A zu evaluieren sowie die Wirkung von siRNAs gegen zwei weitere Schlüsselproteine, IVa2 und Hexon, zu untersuchen, um schließlich die Wirkung einer kombinierten Anwendung der siRNAs, die gegen die unterschiedlichen adenoviralen Zielstrukturen gerichtet waren, zu evaluieren.

Dazu wurden siRNAs synthetisch hergestellt, deren Zielstrukturen die kodierenden mRNAs der adenoviralen Schlüsselproteine E1A, IVa2 und Hexon waren. Zunächst wurde aus den vier verschiedenen siRNAs, die gegen jede Zielstruktur vorlagen, die effizienteste ausgewählt. Im Anschluss wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen die Effektivität der siRNAs in Bezug auf die Inhibierung der adenoviralen Infektion in der Zellkultur untersucht und schließlich miteinander verglichen. Abschließend wurden die drei siRNAs in einem kombinierten Ansatz appliziert, um das Vorhandensein additiver und synergistischer Effekte zu evaluieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Tab. 2-1: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Kultivierungsmedium
HeLa	humane Zervix-Karzinomzellen	DMEM (Gibco, D)
EA.hy926	Hybrid - Zelllinie aus HUVEC und A549	DMEM (Gibco, D), 1xHAT (Invitrogen, D)
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen	DMEM (Gibco, D)

2.1.2 siRNAs

Tab. 2-2: siRNAs

Name	Sequenz sense	Zielort im Ad5-	Zielgen
	antisene	Genom	
siE1A_1	CCU UUG GAC UUG AGC UGU AdTdT	1508-1528	E1A
	UAC AGC UCA AGU CCA AAG GdTdT		
siE1A_2	CUG UGU CUA GAG AAU GCA AdTdT	1331-1352	E1A
	UUG CAU UCU CUA GAC ACA GdGdT		
siE1A_3	GGA UUG ACU UAC UCA CUU UdTdT	787-807	E1A
	AAA GUG AGU AAG UCA AUC CdCdT		
siE1A_4	CGG AGG UGU UAU UAC CGA AdTdT	578-598	E1A
	UUC GGU AAU AAC ACC UCC GdTdG		
siHexon_1	AGU GGU AUU GUA CAG UGA AdTdT	19686-19708	Hexon
	UUC ACU GUA CAA UAC CAC UdTdT		
siHexon_2	CAC CUA AAU AUG CCG AUA AdTdT	19414-19434	Hexon
	UUA UCG GCA UAU UUA GGU GdTdT		
siHexon_3	CUA AUG GGC CAA CAA UCU AdTdT	19779-19799	Hexon
	UAG AUU GUU GGC CCA UUA GdTdT		
siHexon_4	GCU AGA AAG UCA AGU GGA AdTdT	19610-19630	Hexon
	UUC CAC UUG ACU UUC UAG CdTdT		
siIVa2_1	CGC UUU GUA AAC ACU UAC AdTdT	4360-4380	IVa2
	UGU AAG UGU UUA CAA AGC GdGdT		
siIVa2_2	GUU AGU GAU CCC AGA AAU AdTdT	4648-4668	IVa2
	UAU UUC UGG GAU CAC UAA CdGdT		
siIVa2_3	GGA UAU GGC UGG GAA CAU AdTdT	4441-4465	IVa2
	UAU GUU CCC AGC CAU AUC CdCdT		
siIVa2_4	CCA GCA GGA CCA GCC UCA AdTdT	5484-5404	IVa2
	UUG AGG CUG GUC CUG CUG GdTdG		
Non silencing	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT		
siRNA	ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT		

2.1.3 Viren und Vektoren

Tab. 2-3: Viren und Vektor

Bezeichnung	Bemerkung	Hersteller
RCA	ΔΕ3	Dr. Fechner, TU, Berlin
Ad5TRE-E1A	bedingt replikationskompetentes AdV., da $\Delta E1B + \Delta E3$, hat eine geringfügig reduzierte Replikationseffizienz gegen- über dem Wildtyp	Dr. Fechner, TU, Berlin; Fechner et al., 2003
Ad5CMVluc	Δ E1A, Δ E1B, Δ E3, replikationsdefizient, hat in der E1-Region eine Luciferase- Expressionskassette unter Kontrolle eines CMV-Promoters	Dr. Fechner, TU, Berlin; Fechner et al., 2000
AdshPLB _r	Δ E1A, Δ E1B, Δ E3, replikationsdefizient, hat in der E1-Region eine Phospholam- ban-shRNA unter Kontrolle eines muri- nen U6-Promotors	Dr. Fechner, TU, Berlin, Fechner et al., 2007

2.1.4 Bakterienstamm

Tab. 2-4: Bakterienstamm

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. col</i> i XL-10 Gold	TetR $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ endA1 su- pE44 thi-1 recA1 gyrA96 re- lA1 lac Hte [F proAB la- cIqZ $\Delta M15$ Tn10 (TetR) Amy CamR]	Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.5 Bakterienmedien

Tab. 2-5:Bakterienmedien

Medium	Hersteller
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.6 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
E1a-560 s	5'- ccg acg cgt aat gag aca tat tat ct - 3'	E1A-Sonde für Southern Blot
E1a-1545 as	5' - ccg acg cgt tta tgg cct ggg gcg tt - 3'	E1A-Sonde für Southern Blot
Luc-s	5' - gta ccg aaa ggt ctt acc gga a - 3'	Sequenzierung
siE1A 578 s	5' - cga cac gga ggt gtt att acc gaa t - 3'	Plasmid-Konstruktion
siE1A 598 as	5' - cta gat tcg gta ata aca cct ccg tgt cg - 3	Plasmid-Konstruktion
siIVa2 4648 s	5' - cga cag tta gtg atc cca gaa ata t - 3`	Plasmid-Konstruktion
siIVa2 4668 as	5' - cta gat att tct ggg atc act aac tgt cg - 3'	Plasmid-Konstruktion
siHexon 19610 s	5' - cga aag cta gaa agt caa gtg gaa t - 3'	Plasmid-Konstruktion
siHexon 19630 as	5' - cta gat tcc act tga ctt tct agc ttt cg - 3'	Plasmid-Konstruktion

2.1.7 Enzyme

Tab. 2-7: Enzyme

Enzym*	Hersteller
T4-Ligase	New England Biolab, Frankfurt a. M., D
Taq-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Trypsin	Biochrom AG, Berlin,D
Restriktionsenzyme	New England Biolab, Frankfurt a. M., D

* Alle Enzyme wurde mit den mitgelieferten Puffern entsprechend den Angaben der Hersteller eingesetzt

2.1.8 Antikörper

Tab. 2-8: Antikörper

Antikörper	Hersteller
mouse Ad hexon protein (8C4) monoklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
rabbit Ad-2/5 E1A (13S-5) polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Alexa Fluor 594 goat-anti-mouse IgG (H+L), polyklonaler Antikörper	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 594 goat-anti-rabbit IgG (H+L), polyklonaler Antikörper	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.9 DNA Größenstandards

Tab. 2-9:DNA Größenstandards

Name	Hersteller
1 kb-DNA-Leiter	peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin, D
DNA-Leiter Mix	peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin, D

2.1.10 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer

Tab. 2-10:

Name	Zusammensetzung
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
1 x TBS	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , 150 mM NaCl, pH 8,0

Lösungen für Southern Blot

Tab. 2-11:Lösungen für Southern Blot

Name	Zusammensetzung
Denaturierungslösung	0,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung	105 M NaCl, 1 M Tris-HCL, pH 8,0

Waschlösungen für Hybridisierung von Nukleinsäuren

Tab. 2-12: Waschlösungen für Hybridisierung von Nukleinsäuren

Name	Zusammensetzung
Waschpuffer I	2 x SSC, 0,05 % SDS
Waschpuffer II	0,1 x SSC, 0,1 % SDS
Stripping Puffer	0,5% SDS

Lösungen für Immunfluoreszenz

Tab. 2-13:	Lösungen f	für Immun	fluoreszenz
------------	------------	-----------	-------------

Name	Zusammensetzung
Fixierlösung	PBS mit 4 % Formaldehyd, 1 mM MgCl ₂ , 0,5 % Triton X 100
Blockierungslösung	TBS mit 5 % Serum, 0,1% Triton X 100

2.1.11 Chemikalien

Tab. 2-14: Chemikalien

Name	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, D
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München, D
4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, München, D
Dapi-Fluoromount-G TM	Souhtern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA
DNA-Loading Buffer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Ethanol absolut	J.T. Baker, Philipsburg, USA
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, USA
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, D
Formaldehyd [37% (w/v)]	Sigma-Aldrich, München, D

Name	Hersteller
НАТ	Invitrogen, Karlsruhe, D
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, D
Kristallviolett	Merck, Darmstadt, D
Lipofectamine TM 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, München, D
Mineralöl	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
GIBCO TM Opti-MEM [®]	Invitrogen, Karlsruhe, D
PBS Dulbecco's (1x) wo Ca & Mg	PAA, Pasching, A
Penicillin	Biochrom AG, Berlin, D
peqGOLD Low Melting Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
SDS	Sigma-Aldrich, München, D
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich, München, D
Streptomycin sulfat	Biochrom AG, Berlin, D
Trizma [®] -HCl	Sigma-Aldrich, München, D
Triton X 100	Sigma-Aldrich, München, D
Trypanblau	Gibco, Karlsruhe, D
Wasser RNase frei (DEPC behandelt)	USB Corporation, Cleveland, USA

2.1.12 Reagenzsysteme

Tab. 2-15:Reagenzsysteme

Kit Name	Hersteller
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
QIAquick GelExtraction Kit	Qiagen, Hilden, D
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
Luciferase Gene Assay	Roche, Mannheim, D
E.Z.N.A. Tissue DNA Mini Kit II	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D

2.1.13 Sonstige Materialen

Tab. 2-16:Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
[³² P]dCTP	Amersham, München, D
dNTPs	Rapidozym, Berlin, D
Hybond TM N Nylon-Membran	Amersham, München, D
Kodak Biomax MS Film	Integra Biosciences, Fernwald, D
Whatman-Papier	Whatman GmbH, Dassel, D

2.1.14 Geräte

Tab. 2-17: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarosegel-Kammer Hoefer® HE 33	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Jena, D
Brutschrank Modell 5420	Labotect, Göttingen, D
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Elektrophoreseeinheit PP3000	Biometra GmbH, Göttingen, D
Feinwaage BL 310	Sartorius, Göttingen, D
Fuji Film BAS 1500 Filmkassette (Phos- phoimagerkassette)	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, D
Gene Amp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Hybridisierungsofen Compact Line OV 4	Biometra GmbH, Göttingen, D
Lumat LB 9501	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, D
NanoDrop [®] ND-1000 Spectrophotometer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
Olympus BX60 Microscope	Olympus, Hamburg, D
pH-Meter HI 8314 membrane pH-Meter	HANNA intruments, Woonsocket, USA
Phosphoimager Fuji Film BAS-1500	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland und Gilson, Middleton, USA
QC 2000 (Strahlungsmesser)	Bioscan, Washington, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Transilluminator BioDoc Analyze	Biometra GmbH, Göttingen, D
TRIO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen, D
UV Stratalinker®1800	Stratagene, La Jolla, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, D
Zentrifuge 5415D, 5415R und Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, D

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung und Aussaat von Zellen

Zuerst wurde das Nährmedium abgesaugt. Die Zellen wurden dann mit PBS (PAA) gewaschen (10 ml pro 75 cm³-Kulturflasche). Anschließend wurde Trypsin (Sigma-Aldrich) zugegeben (2 ml pro 75 cm³-Kulturflasche) und für 2-3 min bei bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde dann mit 10 % FKS-haltigem Zellkulturmedium gestoppt und die abgelösten Zellen in dem Kulturmedium resuspendiert. 1 ml der Zellsuspension wurde entnommen und die Zellzahl durch Anfärben der Zellen mit einer Trypanblau-Lösung (Gibco) in einer Neubauer-Zählkammer (Carl Roth GmbH) unter dem Mikroskop bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension mit gleichen Teilen Trypanblau (Gibco) und PBS (PAA) im Verhältnis 1:3 verdünnt. Da Trypanblau ausschließlich tote Zellen aufgrund ihrer defekten Membranstruktur anfärbt, konnten unter dem Mikroskop so die lebenden Zellen differenziert und gezählt werden. Es wurden die 4 x 16 Kammern der Neubauer Zählkammer ausgezählt, die Zahlenwerte für die je 16 Kammern addiert und am Ende ein Mittelwert für die 4 großen Quadrate gebildet. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

Zellzahl (Zellen / ml) = $[(Q1+Q2+Q3+Q4)/4] \times VF \times 10^4$ VF: Verdünnungsfaktor, hier bei einer Verdünnung von 1:3 = 3

Im Anschluss wurden die Zellen in gewünschter Konzentration in einer Kulturflasche oder platte neu ausgesät und bis zur erneuten Verwendung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Eine Umsetzung der in Kultur gehaltenen Zellen fand alle 3 bis 4 Tage statt.

2.2.1.2 Auftauen konservierter Kulturen

Um die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen aufzutauen, wurden 10 ml kaltes Medium in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und die schnell aufgetauten Zellen (bei 37°C) direkt dazu pipettiert und vorsichtig durchmischt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1200 RPM bei 4°C in der Zentrifuge 5810R (Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschließend das Zellpellet in 5 ml eines auf 37 °C vorgewärmten Kulturmediums resuspendiert, in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium gewechselt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz weiter inkubiert.

2.2.2 Design von siRNAs

Die verwendeten siRNAs wurden nach Angabe der DNA Sequenz jedes adenoviralen Zielgens (E1A, IVa2, Hexon) mit Hilfe eines spezifischen Algorithmus (HP OnGuard) von der Firma Qiagen generiert. Ausgehend von den von Elbashir und Tuschl definierten Kriterien zur Selektion von maximal effizienten siRNAs wurde von Huesken et al. ein ANN (Artificial Neural Network) basierter Algorithmus, der BIOPREDsi-algorithm, entwickelt, der als Grundlage des HP OnGuard Algorithmus diente (Lader et al., 2006; Huesken et al, 2005). Bei den Artificial Neural Networks handelt es sich um Algorithmen, die komplexe Funktionen bei der Analyse von Datensätzen ausführen können (Schneider und Wrede, 1998; Huesken et al., 2005). Zu den von Elbashir und Tuschl vorgeschlagenen Richtlinien zählte die Empfehlung 21 Basenpaare lange, doppelsträngige RNA-Moleküle mit mit zwei überhängenden Thymidin-Nukleotiden an den Enden zu verwenden. Zudem sollte der G/C-Gehalt der Ziel-mRNA-Sequenz annähernd 50% betragen, jedoch nicht weniger als 32% und auch nicht mehr als 79%. G-reiche Sequenzen sollten vermieden werden, da sie die Tendenz haben G-Quartett Strukturen auszubilden (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al, 2001b; Elbashir et al., 2002). Um die Spezifität zu erhöhen und die unerwünschten Nebeneffekte gering zu halten, fanden weitere Faktoren beim Design der siRNAs Berücksichtigung. Mit Hilfe eines speziellen Homologieanalysetools für kurze Sequenzen sollte ausgeschlossen werden, dass die siRNAs eine zur Zielsequenz fast homologe Gensequenz erkennen und in der Folge den mRNA Abbau vermitteln. Des Weiteren sollten Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in der siRNA-Zielsequenz vermieden werden, damit die siRNAs keine variable Gen-Silencing-Aktivität zeigen (Lader et al., 2006). Zudem wurden Sequenzmotive herausgefiltert und verworfen, die immunstimulatorisch wirken (Judge et al., 2005; Lader et al., 2006) und 3'-UTR-/Seed-Region-Analysen durchgeführt. Letzteres diente dazu unerwünschte Nebeneffekte durch siRNA vermittelte Blockade der mRNA-Translation zu vermeiden (Lader et al., 2006, Jackson et al., 2006).

Die Negativkontroll-siRNA, auch als scrambled siRNA bezeichnet, wies keine Homologie zu jeglicher bekannten Gensequenz der Säugetierorganismen auf. Sie wurde unter Verwendung von Affymetrix Gene Chip arrays und einer Vielzahl von Zellkultur basierten Untersuchungen validiert und es konnte gezeigt werden, dass keine nennenswerten unerwünschten Nebeneffekte auftreten (www.qiagen.com). Die Sequenz der scrambled siRNA wurde darüber hinaus mit der Adenovirus-Sequenz abgeglichen und es fanden sich keine Übereinstimmungen.

Der Selektion der siRNAs wurde die Adenovirus-Sequenz mit der Gen Bank Nummer BK000408 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) zu Grunde gelegt.

2.2.3 Plasmidkonstruktion

Die verwendeten Luciferase-Expressionsplasmide (Abb. 2.2 - 2.4) wurden durch Insertion der siE1A-, siIVa2- und siHexon-Zielsequenzen in das Plasmid pLucmiR122(3x)/miR148(1x)TS (Geisler et al., 2011) (Abb. 2.1) hergestellt. Dazu wurden zunächst die folgenden Primerpaare annealed: siE1A 598 s (5' - cga cac gga ggt gtt att acc gaa t - 3') und siE1A 598 as (5' - cta gat tcg gta ata aca cct ccg tgt cg - 3'); siIVa2 4648 s (5' - cga cag tta gtg atc cca gaa ata t - 3`) und siIVa2 4668 as (5' - cta gat att tct ggg atc act aac tgt cg - 3') sowie siHexon 19610 s (5' - cga aag cta gaa agt caa gtg gaa t - 3') und siHexon 19630 as (5' - cta gat tcc act tga ctt tct agc ttt cg - 3'). Die Oligonukleotide wurden dazu mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert, wobei jeweils 5 µl Oligonukleotid (10 pmol/µl) mit 2 µl 10 x T4-Ligase Puffer, 11 µl A. dest. und 2 µl Kinase zusammengegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Die Kinase wurde anschließend bei 68°C für 10 min inaktiviert und die phosphorylierten Oligonukleotide miteinander verbunden (Annealing). 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 so entstandenen DNA-Fragmente enthielten die Zielsequenzen der siRNAs siE1A_4, siHexon_4 bzw. siIVa2_2 sowie NruI und XbaI Schnittstellen an den jeweiligen Enden und konnten dann am 3'UTR-Ende der Luciferase-Expressionskassette in das Plasmid inseriert werden. Für die Ligation (Pkt. 2.2.3.4) wurden aus obigem Gemisch 10µl der phosphorylierten Oligonukleotide entnommen und zusammen mit 100 ng NruI/XbaI-verdauten (Pkt. 2.2.3.1) Plasmid pUF- LucmiR122(3x)TS/miR148(1x)TS für 2h bei RT inkubiert. Dann folgte eine Transformation in E.coli-XL-10 Gold-Zellen (Pkt. 2.2.3.4.). Die entstandenen Plasmide wurden dann als pLuc-TS-siE1A (Abb. 2.2), pLuc-TSsiIVa2 (Abb. 2.3) bzw. Luc-TS-siHexon (Abb. 2.4) bezeichnet und mittels Restriktionsverdau (Pkt. 2.2.3.1) und Sequenzierung (Pkt. 2.2.6) unter Verwendung des Primers Luc-s (5 -gta ccg aaa ggt ctt acc gga a-3[']) auf ihre Richtigkeit hin überprüft.


Abb. 2-1: Ausgangsplasmid pUF- LucmiR122(3x)TS/miR148(1x)TS (Geisler et al., 2011)

Das Plasmid enthält einen kardialen, durch einen (*CMV*)-Enhancer gesteuerten, 0,26 kb MLC-Promotor aus der Ratte (MLC0.26). Der Promotor ist auch in nicht kardialem Gewebe aktiv und reguliert die Expression des Luci-ferase-Reportergens. In die mit *ts-site* markierte Region wurden die Zielsequenzen von siE1A_4, siIVa2_2 bzw. siHexon_4 eingebracht.



Abb. 2-3: pLuc-TS-siIVa2



Abb. 2-4: pLuc-TS-siHexon

2.2.3.1 Restriktionsverdau

Mittels Restriktionsverdau wird doppelsträngige DNA durch Restriktionsendonukleasen vom Typ II spezifisch gespalten. Die Restriktionsendonukleasen wurden dabei nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) unter Verwendung des jeweils mitgelieferten Puffersystems eingesetzt. Für einen Restriktionsansatz wurde ein Gesamtvolumen von 20 μ l für 0,5 – 1 μ g DNA, 50 -100 μ l für 3 – 10 μ g DNA und 500 - 1000 μ l für DNA-Mengen höher als 10 μ g verwendet. Die Restriktionsansätze wurden zwischen 2 und 24 h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert.

2.2.3.2 Gelelektrophorese

Durch Restriktionsverdau und PCR entstandene DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in Agarosegel aufgetrennt. Die Gelkonzentration wurde dabei abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente gewählt (Tab. 2.1). Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1xTAE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle zum Schmelzen gebracht. Die Lösung wurde dann auf 60 °C temperiert und eine Ethidumbromid-Lösung (10 mg/ml; Roth) hinzugegeben (Endkonzentration 0,005 %). Diese Lösung wurde dann in eine Gelkammer gegossen. Nach vollständiger Verfestigung wurden die Kämme entnommen und das fertige Gel in die ElektrophoreseApparatur gestellt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Loading-Puffer (peqlab Biotechnologie GmbH) im Verhältnis 10:1 versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein DNA-Leiter (peqlab Biotechnologie GmbH) aufgetragen, der als Längenmarker später zur Identifizierung der Fragmente diente. Die Trennung der Fragmente erfolgte bei 140 Volt und 200 mA in 1xTAE-Puffer. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA im Transilluminator Bio-Doc Analyze (Biometra GmbH), sichtbar gemacht.

DNA-Fragmentgröße	Agarose-Konzentration
≤ 0,5 kb	1,2 %
0,5 bis 10 kb	1 %
≥ 10 kb	0,8 %

 Tab. 2-18:
 Agarosegel-Konzentration in Abhängigkeit von den DNA-Fragmentgrößen

2.2.3.3 Extraktion von DNA aus Agarosegel

DNA-Fragmente wurde mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem QIAquick GelExtraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.2.3.4 Ligation und Transformation in E.coli-XL-10 Gold Zellen

Die Ligation erfolgte unter Verwendung der T4 DNA Ligase (New England Biolabs) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes ist in Tab. 2.2 dargestellt. Im Anschluss wurde das ligierte Plasmid durch Transformation in *E. coli* vermehrt. Hierzu wurden 50 μ l der chemokomepetenten *E. coli*-XL-10 Gold Zellen langsam auf Eis aufgetaut und durch leichtes Schütteln gemischt. Der Ligationansatz (20-25 μ l) wurde dann hinzugegeben und es wurde erneut vorsichtig geschüttelt. Nach Inkubation des Ansatzes für 30 min auf Eis wurden die Zellen bei 42 °C im Wasserbad für 60 s einem Hitzeschock ausgesetzt und danach erneut für 3 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 900 μ l LB-Medium (Invitrogen) ohne Antibiotikum (vorgewärmt auf 42°C) hinzugegeben und für 45 min schüttelnd bei 37°C im Thermomixer 5436 (Eppendorf) inkubiert. 200 μ l des Ansatzes wurden dann auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Medium auf den Platten enthielt Ampicillin (100 μ g/ml) als Selektionsmarker. Die Agar-Platten waren bereits am Vortag hergestellt worden. Der LB Agar (Invitrogen) wurde dazu zunächst in A. bidest gelöst, die Lösung autoklaviert und anschließend in Petrischalen (10 cm) gegossen.

Reagenzien	Volumen
Plasmid (100 ng)	2-4 µl
DNA-Fragment*	10 µl
10 x Ligationspuffer	1,6 µl
T4-Ligase (5 U/	0,5 µl

 Tab. 2-19:
 Zusammensetzung eines Ligatinosansatzes

*nach Annealing; einzusetzen in der gewünschten Verdünnung, hier: unverdünnt

2.2.3.5 Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab (Minipräparation)

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen in kleinem Maßstab wurden zunächst 2 ml LB-Medium (Invitrogen) mit Antibiotikum vesetzt (Ampicillin 100 μ g/ml) und mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C schüttelnd (225 RPM) inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde dann aus 1,5 ml der Zellsuspension unter Verwendung des peqGOLD Plasmid Miniprep Kits I (peqlab Biotechnologie GmbH) enstrpechend den Angaben des Herstellers isoliert und in A. bidest gelöst.

2.2.3.6 Plasmid-Präparation in großem Maßstab (Maxipräparation)

Die Plasmid-Maxi-Präparation ist nicht nur eine Methode zur Isolierung von größeren Mengen DNA, sondern auch zur Gewinnung von hochreiner DNA, die für die Klonierung sowie für die Transfektion von Säugetierzellen verwendet werden kann. 250 ml LB-Medium (mit Ampicillin 100 µg/ml versetzt) im Erlenmeyerkolben wurden mit 1 ml einer Übernachtkultur beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd (250 RPM) inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 5000 RPM zentrifugiert. Anschließend erfolgte die DNA-Isolation mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.2.4 Transfektion eukaryontischer adhärenter Zellen

2.2.4.1 Transfektion mit HiPerFect Transfection Reagent

Die Zellen wurden am Vortag in den Zellkulturplatten oder -schalen in der entsprechenden Menge DMEM (Gibco) mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG) (1 ml Medium pro Well einer 24-Well-Zellkulturplatte) so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion 60 - 80 % konfluent waren. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Am Tag der Transfektion wurde die gewünschte Menge der zu transfizierenden siRNA in dem entsprechendem Volumen DMEM (Gibco) ohne FKS und Penicillin/Streptomycin (100 µL für ein Well einer 24-Well-Zellkulturplatte) gelöst. Anschließend wurden abhängig von der Größe der Zellkulturschale bzw. -platte die Transfektionsreagenz (HiPerFect Transfection Reagent, Qiagen) zu der gelösten siRNA hinzugegeben (3 ml für ein Well einer 24-Well-Zellkulturplatte) und die Gesamtlösung durch vorsichtiges Vortexen gemischt. Danach wurde die Lösung für 5 - 10 Minuten bei RT inkubiert, so dass sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Die Lösung wurde dann tröpfchenweise unter Schwenken der Platte/Schale auf die Zellen gegeben, so dass sie sich möglichst gleichmäßig verteilen konnten. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach 3 Stunden wurde bei Verwendung von EA.hy.926 und HeLa Zellen das Zellkulturmedium abgenommen und durch DMEM (Gibco) mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG) ersetzt und dann weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.4.2 Transfektion mit Lipofectamine TM 2000 Transfection Reagent

24 h vor der Transfektion wurden die Zellen in den Zellkulturplatten bzw. -schalen in DMEM (Gibco) mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG) so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion abhängig von der Dauer des Experiments 30 - 50 % (\geq 4 d) oder 50 - 80 % (2-3 d) konfluent waren. Alle folgenden Angaben beziehen sich auf ein *Well* einer 24-Well-Zellkulturplatte (Volumen/Well = 500 µl): Das gewünschte siRNA-Volumen (1,5 µl des 2µM siRNA-Stocks entsprachen 37,5 ng der siRNA) respektive die gewünschte Menge des Plasmids wurde in 50 µl GIBCOTM Opti-MEM [®] (Invitrogen) ohne FKS und ohne Penicillin/Streptomycin gelöst. In einem zweiten Schritt wurde 1 µl LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) ebenfalls in 50 µl GIBCOTM Opti-MEM[®] (Invitrogen) ohne FKS und ohne FKS und ohne Penicillin/Streptomycin gelöst und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die siRNA-/plasmidhaltige Lösung mit dem gelösten *LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen) zusammengegeben und für weitere 20 Minuten bei Raumtem-

peratur inkubiert. Das Zellkulturmedium auf den Kulturplatten wurde gegen GIBCOTM Opti-MEM[®] ohne Zusätze ausgetauscht und die entstandenen Oligomer-LipofectamineTM 2000 Komplex unter Schwenken der Platte auf die Zellen gegeben. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Nach 3 Stunden wurde bei Verwendung von HeLa Zellen und EA.hy.926 das Zellkulturmedium abgenommen und durch DMEM (Gibco) mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG) bzw. DMEM (Gibco) mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1 x HAT (Invitrogen) ersetzt.

2.2.5 Detektion und Quantifizierung von DNA

2.2.5.1 Gewinnung von DNA aus eukaryontischen Zellen und DNA-Quantifizierung

Die Präparation der DNA erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini Kits (Peqlab) nach

Herstellerangaben. Im Anschluss wurden die Proben zunächst gefällt. Hierzu wurde die DNA-Probe mit 0,1 Volumenteilen einer 1 M NaCl- oder 3 M Natriumacetat-Lösung und mit 2 Volumenteilen absolutem Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde durchmischt und für mindestens 15 min bei -20°C gelagert. Nach Zentrifugation der Probe bei 12000 rpm und RT für 15 min wurde das DNA-Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 12000 rpm und RT zentrifugiert. Nach Lufttrocknung wurde das DNA-Pellet in 30 µl RNase-freiem Wasser (USB Corporation) gelöst.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem NanoDropTM ND-100 Spectrometer (peqlab Biotechnologie GmbH). Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm (A260) und 280 nm (A280) gemessen, wobei Wasser als Referenz zu Grunde gelegt wurde. Eine A260-Einheit entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA/ml bzw. 50 µg DNA/ml. Die Reinheit der DNA bzw. RNA konnte anhand des Quotienten A260/A280 ermittelt werden. Hochreine DNA bzw. RNA hat einen Quotienten von $\geq 1,8 \leq 2,1$.

2.2.5.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 2.3 und 2.4 dargestellt. Alle PCR-Reaktionen wurden im Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) unter Verwendung der Taq-Polymerase (Applied Biosystems) durchgeführt.

Reagenzien	25 μl -Reaktionsvolumen
10 x Taq Polymerasepuffer	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 *	x μl
Taq-Polymerase (5U/ µl)	0,25 μl
A. bidest.	Ad 25 μl

Tab. 2-20: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes

* 0,2- 0,5 µg DNA

Tab. 2-21:Reaktionsbedingungen der PCR

Reaktionsschritt (40 Zyklen)	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	45 s
Primer-Annealing	55 °C - 65 °C	30 s
DNA-Synthese	72 °C	30 s - 2 min
Finale Extension	72 °C	5 min
Kühlung	4 °C	∞

2.2.5.3 Southern Blot

Der Southern Blot ist eine Methode zum Transfer von DNA auf Nylonmembranen. Die zu untersuchende DNA wurde dazu zunächst mit *XbaI* resktriktionsenzymatisch gespalten und anschließend in einem Agarosegel (1 %) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Je Probe wurden 10 µg DNA mit DNA-Loading-Buffer (peqlab Biotechnologie GmbH) vermischt und anschließend auf dem Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurde der 1 kb-DNA-Leiter (peqlab Biotechnologie GmbH) aufgetragen.

In einer Gelmatrix wandern die Nukleinsäuren nach Anlegen von Gleichstrom (in einem elektrischen Feld) auf die Anode zu, wobei die kleineren Fragmente schneller als die größeren wandern. Auf diese Weise konnten die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und durch Visualisierung unter UV-Licht (Transilluminator BioDoc Analyze, Biometra) mit Hilfe des Längenmarkers identifiziert werden. Das DNA-Agarosegel wurde anschließend dreimal für je 20 min in Denaturierungslösung geschwenkt und danach für weitere 60 min. in Neutralisierungslösung.

Der Transfer der Nukleinsäuren vom Gel auf die Nylonmembranen erfolgte anschließend mittels Kapillar-Blot (Aufbau siehe Abb. 2.5). Bei dieser Methode wird der Nukleinsäuretransfer durch eine gerichtete Ionenwanderung erreicht. Dazu wurde Whatman-Papier (Whatman International Ltd.) in 10 x SSC getränkt und auf einen ebenen Untergrund gelegt, wobei die Konstruktion so gewählt wurde, dass die Enden der Membran ständig in 10 x SSC eingetaucht waren. Anschließend wurde das DNA-Agarosegel luftblasenfrei auf das feuchte Whatman Papier so aufgelegt, dass die Taschen nach unten zeigten. Auf die vier Seiten des Gels wurde jeweils Plastikfolie gelegt, um einen Flüssigkeitsstrom jenseits der Membran zu verhindern. Auf das Gel wurden nun nacheinander ebenfalls luftblasenfrei eine Nylonmembran (*Hybond_{TM} N-Hybridisation Membran, Amersham*), ein feuchtes (10 x SSC) und ein trockenes Stück Whatman Papier sowie ein Stapel trockener Papiertücher geschichtet. Schließlich wurde der Aufbau mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert und über Nacht belassen.

Die Vollständigkeit des Nukleinsäuretransfers wurde unter dem Transilluminator BioDoc Analyze (Biometra) geprüft. Auf dem Filter wurden die Positionen des DNA-Markers markiert und der Filter anschließend für 30 min an der Luft getrocknet. Zum Abschluss wurden die Nukleinsäuren durch zweimaliges Cross-linken unter UV-Licht (150 mJoule/cm²) im UV Stratalinker[®] 1800 (Statagene) kovalent an den Filter gebunden. Die Lagerung erfolgte in einer Klarsichthülle bei 4 °C.



Abb. 2-5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Kapillarblots

2.2.5.4 Herstellung von ³²P-markierten Sonden

Basierend auf dem Prinzip der Synthese eines komplementären DNA-Stranges, in den radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut werden, wurde in einem ersten Schritt die Sonde mittels Einzelstrangamplifizierung hergestellt. Dazu wurde ein DNA-Fragment, das komplementär zu der zu detektierenden DNA war amplifiziert, wobei in dem Ansatz dCTP durch ein ³²P-markiertes dCTP ersetzt worden war. Der sense- und antinsense-Strang wurden dabei in separaten Ansätzen markiert. Die Durchführung erfolgte nach folgendem Protokoll:

 Tab. 2-22:
 Reaktionsansatz zur Herstellung einer ³²P-markierten Sonde

Reagenzien	Volumen
10x Taq Polymerase-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix ohne dCTP (1 mM)	0,5 µl
Primer (100 µM) (a)	0,25 μl
DNA-Matrize (100 ng) (b)	µl
Taq-Polymerase (5 Units/µl)	0,25 μl
A. bidest	ad 25 µl
Mineralöl zur Überschichtung	12 µl
³² P dCTP (10 µCi/µl)	5 µl

^(a)je ein Ansatz Sense-Primer (E1a-560 s) und ein Ansatz Antisense-Primer (E1a-1545 as)

^(b)abhängig von der Konzentration der DNA

Im nächsten Schritt wurden die vorher markierten Einzelstrangsonden über Sephadex-Säulen aufgereinigt. Dazu wurde in A.bidest gelöstes Sephadex G-50 (Sigma) in eine Pasteurpipette geschichtet. Anschließend wurde die Sonde auf die Säule pipettiert und durch weitere Zugabe von A. bidest die Sonde dann über die Polymer-Säule gespült. Eine erste Fraktion von ca. 500 µl Eluat wurde verworfen. Bis zu 8 weitere Fraktionen zu je ca. 50 µl wurden aufgefangen und ihre Radioaktivität mit Bioscan QC 2000 (Bioscan) bestimmt. Die Fraktionen mit der stärksten Aktivität wurden vereinigt und im Folgenden als Sonde eingesetzt.

2.2.5.5 Vorhybridisierung und Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde zunächst prähybridisiert. Dazu wurde die Membran in einer Hybridisierungsröhre (Biometra) mit auf 60 °C erwärmter ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech) für 30 min bei 60 °C im Hybridisierungsofen (Biometra) inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte im Anschluss nach Zugabe der Einzelstrang-Antisense- und Einzelstrang-Sense-Sonde im Hybridisierungsofen für 1 h bei 60 °C. Die Hybridisierungslösung wurde dann verworfen und die Membran zweimal für 15 min in 20 ml Waschpuffer | bei Raumtemperatur gewaschen. Der Waschpuffer | wurde daraufhin ebenfalls verworfen und die Membran mit 20 ml Waschpuffer || zweimal für je 20 min bei 50 °C behandelt. Der Filter wurde entnommen und noch feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

2.2.5.6 Detektion der Hybridisierungsprodukte

Um die gebundenen radioaktiv markierten DNA-Fragmente zu detektieren, wurden die Membranen nach der Hybridisierung entweder nach Auflage eines Röntgenfilms (Kodak Biomax MS films, Integra Bioscience) bei - 80 °C für mehrere Tage inkubiert oder in eine Phosphimager-Kassette (Fuji BAS 1500 Film Kassette, Fuji Photo Film GmbH) eingelegt und bei RT oder bei 4 °C ebenfalls für mehrere Tage inkubiert. Der Röntgenfilm wurde dann entwickelt und die Belichtungsplatte aus der Phosphoimager-Kassette wurde mit Hilfe des Fuji Film BAS-1500 imagers (Fuji Photo Film GmbH) digitalisiert und unter Verwendung der Software Tina (Version 2.09g ©raytest Isotopenmessgeräte GmbH) die Intensität des Signals densiometrisch bestimmt. Alternativ konnte auch der Röntgenfilm digitalisiert und mit dem Programm Tina densitometrisch ausgewertet werden.

2.2.5.7 Entfernen der Sonden von der Membran

Um die Sonden von der Membran wieder zu lösen, wurde die Membran für 5 Minuten in 0,5 %igem SDS (Stripping-Puffer) bei 95 - 98 °C in einem Wasserbad inkubiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis kein radioaktives Signal mehr auf dem Filter messbar war. Abschließend wurde der Filter erneut in Klarsichtfolie eingeschlagen und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

2.2.6 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der Plasmide wurden $0,2 - 0,4 \mu g$ der Plasmide eingesetzt, 1 μ L Verdünnungspuffer (Applied Biosystems) und 1 μ L Sequenzierungsprimer (10 μ M) hinzugegeben und mit A. bidest auf 8 μ L aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde dann zunächst 4 Minuten bei 98 °C im Gene-Amp-Thermocycler 9700 (Applied Biosystems) erhitzt. Anschließend wurden 2 μ L Big Dye Prämix (Applied Biosystems) hinzugegeben und eine Sequenzreaktion über 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen im DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) durchgeführt:

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

 Tab. 2-23:
 Reaktionsschritte zur Sequenzierung

Im Anschluss wurde die Sequenzreaktion aufgearbeit. Dazu wurden 90 µl A. bidest, 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 250 µl absolutes Ethanol hinzugefügt. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen und 70 %iges Ethanol hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand wieder verworfen, das entstandene Pellet bei 56 °C für 10 min getrocknet und anschließend in 30 µl A. bidest resuspendiert. Die Detektion und Auswertung erfolgten mit Hilfe des Gene Analyzer ABI 310 Kapillar-Sequenzerautomaten (Applied Biosystems) unter Verwendung der ABI DNA Sequencing Analysis Software.

2.2.7 Expressionsnachweismethoden

2.2.7.1 Luciferase-Assay

Mittels Luciferase-Assay kann durch Messung einer Lumineszenz die Akitivität des Enzyms Luciferase quantitativ bestimmt werden. Die Luciferase katalysiert die Umsetzung ihres Substrates Luciferin unter Abgabe eines Photons. Die gemessene Lichtintensität ist somit proportional zur Aktivität der Luciferase. Basierend auf diesem Prinzip wurde die Luciferase für verschiedene Expressionsanalysen als Reporter eingesetzt. Die Durchführung des Assays erfolgte unter Verwendung des Luciferase Gene Assay Kits (Roche) nach Angaben des Herstellers wie folgt: In einem ersten Schritt wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden mit 1 x PBS (PAA) gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen durch Zugabe von Lysepuffer (250 µl bezogen auf ein Well einer 24-Well-Zellkulturplatte) lysiert, in Eppendorf-Gefäße überführt und anschließend für 15 sec bei 14000 rpm in der Zentrifuge 5415D (Eppendorf) zentrifugiert. 10 µl des Zelllysats wurden dann in ein Messröhrchen überführt und nach Zugabe von 50 µl Luciferin die Luciferase-Aktitvität im Luminometer Lumat LB 9501 (Berthold Technologies GmbH) bestimmt.

2.2.7.2 Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung ist eine Methode zum Nachweis der Proteinexpression und wurde in 35 mm- Kulturschalen durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 2 ml PBS (PAA) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dazu wurden 10 ml Fixierlösung zu den Zellen gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Fixierlösung wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen dreimal mit TBS gewaschen. Nach Entfernen des TBS-Puffers wurde mit einem Fettstift (DakoCytomation Pen) eine ca. 20 mm durchmessende Fläche in der Mitte der Schale markiert, um die Fläche der zu färbenden Zellen zu verkleinern und der Größe der Deckgläschen anzupassen. In den abgedichteten Kreis wurden 100 µl der Blockierungslösung pipettiert und für 20 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Blockierungslösung wurden die Zellen erneut dreimal mit TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem in Blockierungslösung im gewünschten Verhältnis verdünnten primären Antikörper. 100 µl der Verdünnung wurden auf je eine Schale gegeben und für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend 100 µl des sekundären Antikörpers hinzugegeben. Dieser war zuvor ebenfalls in Blockierungslösung im gewünschten Verhältnis verdünnt worden. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Danach wurden die Zellen nochmals dreimal mit TBS-Puffer gewaschen. Als nächstes erfolgte die Färbung mit DAPI. DAPI färbt den Zellkern blau, so dass unter dem Mikroskop die beobachteten Phänomene zur Anzahl der Zellen ins Verhältnis gesetzt werden können. Dazu wurde DAPI (0,5 µg/ml) im Verhältnis 1:200 mit Blockierungslösung verdünnt und anschließend 100 µl der Verdünnung auf die Zellen pipettiert. Nach Inkubation für 10 min bei RT im Dunkeln wurden die Zellen dreimal mit TBS gewaschen. Zuletzt wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Dapi-Fluoromount GTM (Southern Biotechnology Associates, Inc.) auf die eingekreiste Fläche der Kulturschale aufgebracht und für 15 min bei RT getrocknet. Die Auswertung erfolgte anschließend mit Hilfe des Olympus BX60 Immunofluorescence Mikroskops (Olympus) unter Verwendung der Software AnalySIS (Olympus).

2.2.7.3 Transkomplementierungs-Assay

Das Transkomplementierungs-Assay (TKA) ist eine Methode, welche es ermöglicht indirekt durch Messung eines Luciferase-Reporters die Replikationsrate eines Adenovirus zu bestimmen. Das Prinzip basiert darauf, dass ein replikationsdefizienter Adenovektor, welcher ein Luciferase-Reportergen trägt, durch ein replikationskompetentes Adenovirus transkomplementiert wird. Die Erhöhung der Luciferase-Expression des replikationsdefizienten Adenovektors ist dabei proportional zur Replikation des Vollvirus.

Die entsprechenden Zellen wurden dazu mit einem Luciferase-exprimierenden Vektor transduziert sowie mit einem replikationskompetenten Virus infiziert und entsprechend der Zielstellung ggf. zusätzlich behandelt. Nach 36 h wurde in einem ersten Schritt das Zellkulturmedium in Eppendorf-Gefäße überführt. Im Anschluss wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin 0,25% (Sigma-Aldrich) geerntet und dem Medium hinzugefügt. Es folgte die Zelllyse durch vier Einfrier- /Auftau- Zyklen, wobei abwechselnd die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut wurden. Danach erfolgte die Zentrifugation in der Zentrifuge 5415R (Eppendorf) für 5 min bei 10000 rpm. Mit den Zelllysaten aus den Überständen (400 µl für ein Well einer 24-Well-Platte) wurden erneut Zellen infiziert, die bereits am Vortag in der gewünschten Dichte ausgesät worden waren. Abschließend wurde das entsprechende Volumen (600 µl für ein Well einer 24-Well-Platte) des entsprechenden Zellkulturmediums hinzugefügt und der Ansatz für 24 h bei 37 °C und 5% CO2 inkubiert. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte mittels Luciferase-Assay (Pkt. 2.2.7.1).



Bestimmung der Luciferase-Expression



2.2.8 Plaque Assay

Das Plaque Assay ist eine Methode zum Nachweis biologisch aktiver (infektiöser) Viruspartikel. Die Plaques, welche die Zonen mit zytopathischem Effekt (CPE) repräsentieren, enthalten genetisch identische Viren und repräsentieren je ein infektiöses Partikel im Untersuchungsmaterial. Die Bildung sekundärer Plaques durch Translokation von Virusnachkommen wird durch Überschichtung mit Agar verhindert. HEK293-Zellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät (10⁶ Zellen/Well) und über Nacht inkubiert. Am Versuchstag wurde dann zunächst eine dekadische Verdünnungsreihe der virushaltigen Lösung in DMEM (Gibco) mit 2 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG) hergestellt. Nach Abnehmen des Mediums wurden 900 µl der gewünschten Verdünnungsstufe auf je ein Well der 6-Well-Platte gegeben und die Suspension durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig über den Zellrasen verteilt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂. 6 ml *Low Melting Agarose* (5 %) (peqlab Biotechnologie GmbH) wurden in der Mikrowelle bei 200 W zum Schmelzen gebracht und anschließend im Wasserbad auf 42 °C temperiert. DMEM (Gibco) mit 5 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG) wurde auf 37 °C erwärmt und dann im Verhältnis 1 : 3 zur Low Melting Agarose hinzugegeben. Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit 3 ml je Well der 1,25 % igen Agarose-Lösung überschichtet und anschließend für 15 min bei RT inkubiert, so dass sich das Agarosegel verfestigen konnte. Nach Inkubation für 7 bis 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ bildeten sich Virus-Plaques, die unter dem Lichtmikroskop als weiße Flecken erschienen. Sie wurden gezählt und anschließend der Virustiter nach folgender Formel bestimmt:

Virus-Titer (PFU/ml) = (N x F) / V	PFU:	plaque forming units
	V:	Volumen der zur Infektion verwendeten Virus-Suspension
	N:	Anzahl der gebildeten Plaques
	F:	Verdünnungsfaktor (entspricht der Verdünnungsstufe)

Zur Herstellung der 5 %igen Low Melting Agarose wurden 5 g der peqGOLD Low Melting Agarose (peqlab Biotechnologie GmbH) in 100 ml PBS (PAA) gelöst und autoklaviert. Die fertige Agarose-Lösung wurde dann in Fraktionen von je 6 ml auf 50 ml-Röhrchen verteilt und bei 4 °C gelagert.

2.2.9 Cell Killing Assay

Das Cell Killing Assay ist eine Methode zur Evaluierung zytopathischer Effekte. HeLa Zellen wurden dazu am Vortag in einer 24-Well-Platte so ausgesät, dass sie am Versuchstag 60 - 80 % konfluent waren. Es erfolgte die Infektion mit den Adenoviren, wobei ein replikationsdefizienter Adenovektor als Negativkontrolle fungierte. Nach Inkubation für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Opti-MEM[®] (Invitrogen) durch DMEM (Gibco) mit 10 % FKS, 1 % Penicil-lin/Streptomycin (Biochrom AG) ersetzt. Vier Tage später erfolgte die Färbung der Zellen mit Kristallviolett. Die Zellen wurden dazu nach Abnehmen des Mediums mit PBS (PAA) gewaschen und durch Zugabe von 400 µl Formalin 4 % je Well und Inkubation für 30 min bei RT fixiert. Das Formalin wurde dann abgenommen und die Zellen wurden erneut mit PBS (PAA) gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit 400 µl Kristallviolett (Merck) je Well. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Kristallviolett (Merck) entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (PAA) gewaschen. Kristallviolett färbt ausschließlich lebende Zellen, so dass auf dies Weise der zytopathische Effekt sichtbar gemacht werden konnte.

2.2.10 Statistische Auswertung

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert \pm die Schwankung um den Mittelwert (S.E.M.). Zur Evaluierung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse wurde der studentische t-Test verwendet, wobei p < 0,05 als statistisch signifikant betrachtet wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Evaluierung der siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon

3.1.1 Untersuchung der anti-adenoviralen Wirkung von siRNAs gegen E1A-, IVa2und Hexon-mRNA mittels Immunfluoreszenz

In diesem initialen Experiment wurde die anti-adenovirale Wirkung von siRNAs, die gegen die kodierenden mRNAs der adenoviralen Schlüsselproteine E1A, Hexon und IVa2 gerichtet waren, orientierend evaluiert. Es wurden je vier verschiedene siRNAs verwendet, die eine homologe Sequenz innerhalb der mRNA von E1A, IVa2 bzw. Hexon aufwiesen.

HeLa Zellen wurden in einer 24-Well-Platte ausgesät, mit den siRNAs in einer Endkonzentration von 100 nM pro Well transfiziert und anschließend mit 5 MOI des replikationskompetenten Adenovirus Ad5TRE-E1A für vier Stunden inkubiert. Die antiviralen Effekte der einzelnen siRN-As wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung des adenoviralen E1A- bzw. Hexon- Proteins 48 h post infectionem direkt bestimmt. Ein gegen das IVa2 Protein gerichteter synthetischer Antikörper ist kommerziell nicht verfügbar. Der Nachweis der Hexon-Protein-Expression wurde daher auch als Marker für die Wirkung der anti-IVa2 - sowie auch der anti-E1A- siRNA verwendet. Die Hauptaufgabe der E1A Produkte ist es die Zelle in die S-Phase zu überführen und somit in der Wirtszelle die Bedingungen für die adenovirale DNA-Replikation zu schaffen. IVa2 ist ein wichtiger Transkriptionsaktivator des MLP, der die Transkription der späten Gene, zu denen auch das Hexon gehört, reguliert (Russell, 2000; Shenk, 2001). Im Umkehrschluss lässt sich daraus ableiten, dass es nur eine messbare Hexonexpression geben kann, wenn auch E1A und IVa2 vom Adenovirus in relevanten Mengen exprimiert werden. Es kann also von der Aktivität des Hexons auf die Höhe der Expression von E1A und IVa2 rückgeschlossen werden. Die Aktivität der siRNAs gegen E1A wurde darüber hinaus durch Färbung des E1A Proteins evaluiert.

Die siRNAs gegen die E1A-mRNA wurden in zwei separaten Ansätzen evaluiert. Im ersten Ansatz wurde die Silencing-Effektivität nach immunhistochemischer Färbung des Hexon-Proteins bewertet und im zweiten Ansatz nach Anfärbung des E1A-13s-Proteins. Die aktivsten siRNAs waren in beiden Ansätzen siE1A_3 und siE1A_4. In der E1A-Färbung zeigte auch siE1A_2 eine starke Silencing-Aktivität in der Hexon-Färbung jedoch nicht.

Die Aktivität der gegen die IVa2-mRNA gerichteten siRNAs wurden nach immunhistochemischer Darstellung des Hexon-Proteins unter dem Lichtmikroskop evaluiert. Dabei zeigten siIVa2_1, siIVa2_2 und siIVa2_4 die größte Silencing Effizienz. Die gegen die Hexon-mRNA gerichteten siRNAs wurden ebenfalls nach immunhistochemischer Färbung des Hexon-Proteins evaluiert. siHexon_4 zeigte hier die stärkste Aktivität.

Um die Aussage der fluoreszenzoptischen Auswertung zu verifizieren, wurde zusätzlich in jedem Ansatz, in dem das Hexon-Protein angefärbt worden war, die Anzahl der Hexon-positiven Zellen unter dem Mikroskop quantifiziert (Abb. 3.2).





Anti-Hexon-antibody/DAPI





Abb. 3-1: Reduktion der Proteinexpression durch anti-adenovirale siRNAs

HeLa Zellen wurden mit den einzelnen siRNAs in einer Endkonzentration von 100 nM pro Well transfiziert und anschließend mit 5 MOI Ad5TRE-E1A infiziert und für 4 Stunden inkubiert. Nach 48 h erfolgte die Färbung des E1A (A)- bzw. Hexon (**B-D**)-Proteins (jeweils rot). Zur Darstellung der Zellnuclei wurden die Zellen zusätzlich mit DAPI (blau) gefärbt. Die siRNAs siE1A_3 und _4 (A+B), sowie siIVa2_1, siIVa2_2 und _4 (C) zeigten die größte Effizienz. Im Vergleich der anti-Hexon siRNAs war siHexon_4 (**D**) am effizientesten.



Abb. 3-2: Quantitative Erfassung der Hexon-positiven Zellen

Im Anschluss an die unter 3.1 dargestellte Immunfluoreszenzfärbung erfolgte die Quantifizierung der Zellen, die in der Färbung positiv für das Hexonprotein (rot) waren, unter dem Mikroskop. Jede vorliegende siRNA wurde in einem doppelten Ansatz gefärbt. Die Auszählung erfolgte für jeden Ansatz, indem die Fläche der Zellkulturschale räumlich in vier Quadranten aufgeteilt wurde. Die Zellzahl für jeden Quadranten wurde separat bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Doppelansätze in Prozent von der Negativkontrolle scrambled \pm S.E.M. (A) siE1A_3 und siE1A_4 bewirkten eine Reduktion der Hexonproteinexpression um ca. 90%., siE1A_2 zeigte keine antivirale Aktivität. (B) siIVa2_2 und siIVa2_4 waren die effizientesten siRNAs in der Gruppe der siRNAs gegen IVa2 und führten zu einer Reduktion der Hexon positiven Zellen um ca. 70%. (C) Im Vergleich der siRNAs gegen Hexon war siHexon_4 die effizienteste siRNA mit einer effektiven Herunterregulation der Hexonproteinexpression um ca. 97%.

Ergebnisse

3.1.2 Evaluierung der siRNA vermittelten Inhibierung der adenoviralen Replikation mittels Transkomplementierungs-Assay

Da die indirekte Immunfluoreszenz nur eine orientierende Evaluierung der Silencing-Effektivität der einzelnen siRNAs ermöglichte, wurden in einem nächsten Schritt Transkomplementierungs-Assays durchgeführt, um die effizienteste siRNA gegen jedes Gen auszuwählen. Bei dieser Methode wird die Wirkung der siRNAs auf indirektem Weg nachgewiesen. Die Zellen wurden dazu mit einem replikationskompetenten Virus, hier RCA, das dem Wildtyp-Adenovirus gleicht, jedoch keine E3-Region besitzt, und einem replikationsdefizienten Luciferase exprimierenden Vektor, hier Ad5CMVluc infiziert bzw. transduziert. Dieser Vektor, der eine Mutante des Wildtyvirus ist, der sowohl die E1- als auch die E3-Region fehlen, der also folglich replikationsdefizient ist, und der die Luciferase-Sequenz in seinem Genom trägt, kann nur replizieren, indem er die dafür notwendigen Proteine eines replikationskompetenten Helfervirus, hier des RCA, verwendet. Je stärker folglich das Adenovirus repliziert, desto stärker kann auch der Ad5CMVluc Vektor replizieren und desto mehr Luciferase wird exprimiert. Die Luciferase-Expression wurde im Luminometer bestimmt. Umgekehrt lässt sich festhalten, je stärker die siRNAs die adenovirale Replikation inhibieren, desto weniger kann auch der Ad5CMVluc replizieren und desto geringer fällt die detektierte Luciferase-Aktivität aus. Die Höhe der gemessenen Luciferase-Expression ist also auf Grund der beschriebenen Abhängigkeit Korrelat der inhibitorischen Aktivität der siRNAs.

HeLa Zellen wurden mit den entsprechenden siRNAs oder der Negativkontrolle scrambled in einer Konzentration von 6,67 nM pro Well transfiziert und 24 h später mit 0,1 MOI RCA infiziert und mit 2 MOI des Reportervirus Ad5CMVluc transduziert. Weitere 24 h später wurden die Zellen geerntet und lysiert. Anschließend wurden am Vortag ausgesäte HeLa Zellen mit dem Viruslysat behandelt. Nach 24 h erfolgte die Messung der Luciferase-Expression. Nahezu alle siRNAs bewirkten eine signifikante oder eine tendenzielle Reduktion Luciferase-Aktivität und somit der adenoviralen Replikation. In Übereinstimmung mit dem vorhergehenden Experiment konnten siE1A_4, siIVa2_2 bzw. siHexon_4 die adenovirale Replikation am effizientesten inhibieren. In Bezug auf andere siRNAs zeigten sich jedoch Unterschiede beim Vergleich der Ergebnisse beider Experimente. siE1A_2 war in der Immunfluoreszenz die am wenigsten aktive siRNA gegen E1A, im Transkomplementierungs-Assay jedoch zeigte siE1A_2 eine hohe Silencing-Aktivität. Ebenso verhielt es sich mit siHexon_2. Auch siHexon_1 und siHexon_3 zeigten in der Immunfluoreszenz eine geringere Silencing-Effektivität als im anschließenden Transkomplementierungs-Assay. Für siIVa2_4 konnte in der Immunfluoreszenz eine deutlich stärkere Aktivität bestimmt werden als im TKA. Anders herum verhielt es sich mit siIVa2_1, die in der Immunfluoreszenz wenig aktiv war aber im TKA eine hohe Silencing-Effizienz aufwies.



Abb. 3-3: Schematische Darstellung des Prinzips der Transkomplementierung

In der oberen Bildhälfte ist dargestellt wie der Vektor mit Hilfe des Adenovirus repliziert, so dass die Vermehrung von Virus und Vektor folglich proportional zueinander ist. Der untere Teil der Abbildung demonstriert die Wirkung der siRNAs. Diese hemmen die Replikation des Adenovirus und somit kann auch Ad5CMVluc nicht mehr replizieren. Die gemessene Luciferase-Expression ist niedrig.



Abb. 3-4: siRNA vermittelte Reduktion der Luciferase Expression

HeLa Zellen wurden mit 6,67 nM der entsprechenden siRNA transfiziert und 24 h später mit 0,1 MOI RCA infiziert und mit 2 MOI Ad5CMVluc transduziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und in vier Einfrier-/Auftau- Zyklen lysiert. Mit den Lysaten wurden erneut HeLa Zellen infiziert. 24 h später erfolgte die Messung der Luciferase-Expression. Dargestellt sind die gemittelten Werte einer Vierfachbestimmung der gemessenen Luciferase-Expression pro Zelle \pm S.E.M. Alle anti-Hexon siRNAs (C), siE1A_1, siE1A_3 und siE1A_4 (A) sowie siIVa2_1, und siIVa2_2 (B) bewirkten im Vergleich mit der non-silencing siRNA scrambled (scr) eine signifikante Reduktion der adenoviralen Replikation ermittelt über die relative Reduktion der Luciferase-Expression. In Übereinstimmung mit der im Vorfeld durchgeführten Immunfluoreszenz waren auch hier siE1A_4, siIVa2_2 und siHexon_4 die effizientesten siRNAs. Signifikanz: *p<0,05; **p<0,01. Ergebnisse

3.1.3 Bestimmung der adenoviralen genomischen DNA nach Applikation der anti-E1A siRNAs

Um zu evaluieren, inwieweit die Ergebnisse der Immunfluoreszenz oder des Transkomplementierungs-Assays Gültigkeit haben und gleichzeitig eine mehr direkte Wirkung auf die DNA-Replikation zu betrachten, wurde als nächstes ein Southern Blot durchgeführt. Mit dieser Methode wurden nach Anwendung der siRNAs adenovirale DNA-Mengen bestimmt und somit ein mehr direkter Nachweis der DNA-Replikation geführt. Dazu wurden HeLa Zellen mit 6,67 nM siE1A_2 und siE1A_4 transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit 1 MOI RCA infiziert und für 4 h inkubiert. Nach weiteren 48 h wurde die Gesamt-DNA isoliert und der DNA-Gehalt bestimmt. Nach Transfer von 10 µg der XbaI-verdauten DNA auf eine Nylonmembran wurde die Hybridisierung mit einer E1A-Hybridisierungs-Sonde vorgenommen. Anschließend erfolgte die Entwicklung in einer Photoimager-Kassette. Die Bewertung erfolgte zunächst qualititativ anhand der Intensität der Banden. Im Anschluss wurde die hybridisierte Nylonmembran in eine Phosphorimager-Kassette eingelegt und die Stärke der DNA-Banden quantitativ erfasst. Die exemplarisch untersuchten siRNAs siE1A_2 und siE1A_4 zeigten beide in der qualitativen Bewertung etwa gleich starke Verringerung des adenoviralen Genomgehalts. In der Quantifizierung konnte dann für beide siRNAs eine relative Reduktion der adenoviralen DNA Menge um etwa 80% nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Resultate des TKA, in dem siE1A_4 die größte Silencing-Effektivität aufwies aber auch siE1A_2 eine starke Aktivität zeigte.



Abb. 3-5: Reduktion der adenoviralen E1A DNA durch Applikation von anti-E1A siRNAs

HeLa Zellen wurden mit 6,67 nM siE1A_2 und siE1A_4 transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit 1 MOI RCA infiziert. 48 h post infectionem wurden die Gesamt-DNA isoliert und der DNA-Gehalt bestimmt. Nach erfolgtem Xba1-Verdau wurde anschließend der Southern Blot durchgeführt und danach die Hybridisierung mit einer E1A-Hybridisierungs-Sonde vorgenommen. (A) zeigt die qualitative Analyse. (B) zeigt die Auswertung nach Exposition in einer Phosphoimager Kassette. Die Werte sind angeben in Prozent der Negativkontrolle (scr). siE1A_2 und siE1A_4 zeigten beide eine starke Silencing-Aktivität, was mit den Ergebnissen des TKA übereinstimmt.

Die effizientesten siRNAs gegen jedes Zielgen, welche in Zusammenschau der vorangegangenen Ergebnisse sind: siE1A_4, siIVa2_2 und siHexon_4 (im Folgenden nur noch als siE1A, siIVa2 und siHexon bezeichnet), wurden ausgewählt und in weiterführenden Experimenten in Hinblick auf die Spezifität und Effizienz ihrer anti-adenoviralen Aktivität evaluiert.

3.1.4 Abhängigkeit der Silencing-Effizienz von siE1A von der adenoviralen Dosis

In einem weiteren, modifizierten TKA, wurde die Wirkung der anti-E1A siRNA in Abhängigkeit von der eingesetzten Virusdosis und der Zeit untersucht. Die Luciferase-Expression wurde sowohl nach 24 h als auch nach 48 h gemessen. HeLa Zellen wurden dazu mit RCA bzw. einem replikationsdefizienten Kontrollvektor Ad5shPLBr in den Dosierungen 0,1; 1 und 5 MOI infiziert bzw. transduziert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen und Wechsel des Kulturmediums erfolgte die Transfektion mit siE1A und der non-silencing siRNA in einer Konzentration von 5 nM. 24 h später wurden die Zellen mit 2 MOI Ad5CMVluc transduziert. Nach weiteren 24 h bzw. 48 h wurde die Luciferase-Expression bestimmt. Sowohl nach Inkubation über 24 h als auch über 48 h konnte in den Dosisbereichen 1 MOI und 5 MOI eine signifikante Reduktion der Luciferase-Expression für die mit siE1A behandelten Proben gemessen werden. Bei einer Dosierung von 0,1 MOI RCA war siE1A nicht in der Lage die adenovirale Replikation signifikant zu inhibieren. Ursache hierfür scheint die hohe Standardabweichung, die in diesem niedrigen Dosisbereich gemessen wurde, zu sein. In Bezug auf die Abhängigkeit der siE1A Wirkung von der Zeit konnte gezeigt werden, dass zu beiden Messzeitpunkten bei einer Dosis von 1 MOI RCA die virale Replikation durch siE1A um etwa 90 % inhibiert wurde. Bei einer Virusdosis von 5 MOI konnte die Luciferase-Expression nach 24 h ebenfalls um 90 % reduziert werden. Nach 48 h hingegen lag die Inhibierungsrate nur noch bei knapp 60 %.

Der Vektor AdshPLB_r ist nicht in der Lage zu replizieren und somit kann auch durch ihn die Replikation des Ad5CMVluc nicht unterstützt werden. Es kann folglich nur die Grundexpression der transduzierten AdCMVluc Partikel gemessen werden. In Übereinstimmung damit ergeben sich für die Proben, die mit siE1A und scrambled behandelt wurden annähernd gleiche Expressionswerte. Durch den Vergleich von RCA-infizierten Proben mit den Proben, in denen statt des RCA der replikations-defiziente Kontrollvektor AdshPLB_r eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass die notwendige Bedingung für die Replikation des Ad5CMVluc und die dadurch bedingte Erhöhung der Luciferase-Expression die Koinfektion mit einem replikationskompetenten Virus ist.



Abb. 3-6: Inhibierung der adenoviralen Replikation durch siE1A in Abhängigkeit von der viralen Dosis und der Zeit

HeLa Zellen wurden mit RCA bzw. AdshPLB_r in den Konzentrationen 0,1; 1 und 5 MOI infiziert. Im Anschluss erfolgte nach einstündiger Inkubation die Transfektion mit siE1A und der non-silencing siRNA scrambled (scr). 24 h später wurden die Zellen mit Ad5CMVluc transduziert. Nach weiteren 24 h (A) bzw. 48 h (B) wurde die Luciferase-Expression bestimmt. Die adenovirale Replikation konnte bei einer Dosierung von 1 MOI zu beiden Messzeitpunkten um etwa 90 % inhibiert werden. Um ebenfalls 90 % wurde die adenvirale Replikation bei einer Virusdosis von 5 MOI zum Messzeitpunkt 24 h reduziert. Bei der Messung nach 48 h lag die Rate der Inhibierung bei einer Dosis des Adenovirus von 5 MOI nur noch bei etwa 60 %. Der Kontrollvektor AdshPLB_r ist nicht replikationskompetent. Aus diesem Grund ergeben sich für alle entsprechenden Proben in etwa die gleichen niedrigen Expressionswerte. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm S.E.M. Signifikanz: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

3.1.5 Nachweis der gen-spezifischen Wirkung der siRNAs mittles eines Luciferase-Reporters

Die bisherigen Analysen konnten zeigen, dass anti-adenovirale siRNAs die Genexpression des Adenovirus inhibieren, da diese aber von der Replikation des Virus bestimmt wird, war bisher nicht klar, ob tatsächlich die spezifische Bindung an die jeweilige komplementäre mRNA- Sequenz für den Silencing-Effekt verantwortlich ist. Um die Spezifität der beobachteten siRNA-Effekte zu belegen, wurden daher im Folgenden die Zielsequenzen der drei ausgewählten siRN-As in die 3'UTR eines Firefly-Luciferase-Reporter-Plasmids eingebracht. HeLa Zellen wurden dann mit 10 nM, 5nM bzw. 1nM der siRNAs und dem Reporter-Gen-Konstrukt kotransfiziert. Zudem wurde ein Renilla-Luciferase tragendes Plasmid transfiziert, das als interner Standard diente. Binden die siRNAs auf die postulierte Weise an ihre Zielsequenz innerhalb des Plasmids wird das Konstrukt in der Folge im RISC-Komplex zerschnitten und eine Luciferase-Expression ist nicht mehr möglich. Die Bestimmung der Firefly-Luciferase-Aktivität im Vergleich zum internen Standard liefert folglich eine indirekte Aussage über das spezifische Wirken der siRNAs. Zu diesem Zweck wurde die Zellen 48 h post transfectionem lysiert und die Luciferase Aktivität bestimmt. Es zeigte sich in den mit den siRNAs behandelten Proben eine starke, sequenzspezifische Inhibierung der Luciferase-Aktivität um ca. 90 % im Vergleich zur Negativkontrolle (3.7). Des Weiteren ließ sich eine vergleichbare Silencing-Aktivität für alle drei siRNAs aus den Ergebnissen ableiten. Auch die Applikation der siRNAs in einer Konzentration von 5 nM bei sonst gleichen Versuchsbedingungen führte zu einer Reduktion der Luciferase Expression um 90 - 95 % (3.8 A). Die Inhbierungsrate der siRNAs bei einer Konzentration von 1 nM lag ebenfalls für alle drei Proben bei ca. 90 % (3.8 B).



10 nM

Abb. 3-7: Sequenzspezifische Inhibierung der Reportergen-Aktivität

HeLa Zellen wurden mit 10 nM siE1A, siIVa2 oder siHexon und einem Firefly-Luciferase-Reporterplasmid, das die entsprechende Sequenz enthielt kotransfiziert. Zudem wurde ein Renilla-Luciferase Plasmid als interner Standard transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die relative Luciferase Aktivität in Prozent von scrambled. Die Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Signifikanz: *p<0,05; **p<0,01.



Abb. 3-8: Sequenzspezifsiche Inhibierung der Luciferase-Expression bei niedriger siRNA Konzentration

HeLa Zellen wurden mit 5 nM (A) oder 1 nM (B) der siRNAs sowie dem Firelfly-Luciferase-Reporterplasmid und dem Renilla-Luciferase-Plasmid cotransfiziert. Der übrige Versuchsaufbau entspricht dem unter Abb. 3.7 beschriebenen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils einem Experiment, das in Vierfachbestimmung durchgeführt wurde \pm S.E.M. Signifikanz: ****p<0,0001.

3.1.6 Evaluierung des sequenzspezifischen Silencing-Effekts in Abhängigkeit von der Zeit

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass der Silencing-Effekt durch die sequenzspezifische Interaktion der siRNAs mit ihrer homologen mRNA hervorgerufen wird, sollte nun die Dauer des Silencing Effekts unabhängig von der viralen Replikation evaluiert werden. Dazu wurde eine Versuchsanordnung wie unter Pkt. 3.1.5 gewählt. Die Zielsequenzen der drei ausgewählten siRNAs wurden in die 3'UTR eines Firefly-Luciferase-Reporter-Plasmids eingebracht. HeLa Zellen wurden dann mit 10 nM der siRNAs und dem Reporter-Gen-Konstrukt kotransfiziert. Zudem wurde ein Renilla-Luciferase tragendes Plasmid als interner Standard transfiziert. Die Zellen wurden dann 2d, 4d bzw. 6d post transfectionem lysiert und die Luciferase Aktivität bestimmt. Zu allen drei Messzeitpunkten zeigten alle drei siRNAs eine hohe Aktivität, das heißt, dass auch nach einer Zeitspanne von 6 d noch ein effizientes Silencing erfolgte.





Abb. 3-9: Langzeitwirkung der siRNAs

3.2 Vergleichende Untersuchung zur Wirksamkeit von anti-adenoviralen siRNAs

3.2.1 Vergleich mittels Transkomplementierungs-Assay

Im vorangegangenen Abschnitt wurde zunächst die Silencing-Aktivität für die anti-adenoviralen siRNAs nachgewiesen, um dann die jeweils effizienteste siRNA gegen E1A, IVa2 bzw. Hexon auszuwählen. Im nächsten Schritt konnte dann mit Hilfe der Reporter-Plasmid-Konstrukte die sequenzspezifische Wirkung der siRNAs demonstriert werden. In dem nun folgenden Teil sollte die Silencing-Effektivität der siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon miteinander verglichen werden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Transkomplementierungs-Assays durchgeführt. Bei dieser indirekten Methode (vgl. 3.1.2) zur quantitativen Bestimmung der antiadenoviralen Aktivität der siRNAs wurden HeLa Zellen mit den jeweiligen siRNAs in Konzentrationen von 1,33 nM bis 100 nM transfiziert und anschließend mit 1 MOI des Ad5TRE-E1A und 2 MOI des Luciferase exprimierenden Vektors Ad5CMVluc coinfiziert. 36 h später wurden die Zellen geerntet und lysiert. Mit dem Viruslysat wurden erneut Hela Zellen infiziert und 24 h später die Luciferase-Expression bestimmt. Während durch Applikation von siE1A in der niedrigsten Konzentration von 1,33 nM nur eine nicht signifikante Reduktion der Virusreplikation erreicht werden konnte, zeigte sich für siIVa2 und siHexon bereits in diesem niedrigen Dosisbereich eine Inhibierung der Adenovirusproduktion um mehr als 90 %. In der maximalen Konzentration von 100 nM bewirk-

Der Versuchsaufbau entspricht dem unter Abb. 3.7 genannten. Die siRNA Wirkung wurde jeweils nach 2, 4 und 6 Tagen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Vierfachbestimmung in % von scrambled \pm S.E.M. Signifikanz: **p<0,01; ****p<0,001; ****p<0,0001.

ten siIVa2 und siHexon eine Reduktion der Virusreplikation um ca. 99 % wohingegen siE1A nur eine maximale Inhibierung um 75 % bei einer Konzentration von 75 nM erreichte.





HeLa Zellen wurden mit den jeweiligen siRNAs in verschiedenen Konzentrationen von 1,33 nM bis 100 nM transfiziert und anschließend mit 1 MOI Ad5TRE-E1A und 2 MOI Ad5CMVluc coinfiziert. 36 h später wurde die Inhibierung der Virusreplikation mittels Transkomplementierungs-Assay bestimmt. siIVa2 und siHexon zeigten dabei eine deutlich stärkere Inhibierung der Adenovirusproduktion als siE1A. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm S.E.M. Durch Applikation von siE1A in einer Konzentration von 1,33 nM konnte im Vergleich zur scrambled siRNA (= scr) keine signifikante Reduzierung der Virusreplikation erreicht werden. Alle anderen siRNA Proben bewirkten eine signifikante Inhibierung der Adenovirusproduktion im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.2.2 Vergleich mittels Plaque Assay

Im vorangegangenen TKA zeigten siIVa2 und siHexon eine deutlich stärkere Silencing-Aktivität als siE1A. Um dieses Ergebnis zu überprüfen wurden im Folgenden Plaque Assays zur direkten Bestimmung der Virusproduktion durchgeführt. HeLa Zellen wurden dazu mit 1 MOI Ad5TRE-E1A infiziert und für 2 h inkubiert. Ein Ansatz wurde zusätzlich mit 2 MOI Ad5CMVluc transduziert. In einem nächsten Schritt erfolgte die Transfektion der siRNAs je in einer Konzentration von 5 nM. Nach 48 h wurden die Virusüberstände durch Lyse der Zellen in vier aufeinanderfolgenden Einfrier/Auftau-Zyklen gewonnen und die Plaque Assays durchgeführt. Gleichzeitig wurde der entsprechend behandelte Ansatz einer Luciferase-Expressions Messung zugeführt. Nach 14 Tagen wurden die Plaques gezählt und die Plaque forming units errechnet. Dabei hatte, wie zuvor im TKA, siE1A einen deutlich geringerer inhibitorischer Effekt auf die Virusreplikation als siIVa2 und siHexon. siE1A reduzierte die Bildung der infektiösen Viruspartikel um 58 % wohingegen die Applikation von siIVa2 und siHexon zu einer Inhibierung der Plaque Bildung um 93 % führte (Abb. 3.11.A). Der Versuch wurde gemäß der oben beschriebenen Anordnung dreimal durchgeführt. Alle drei Ausführungen bestätigten das Ergebnis. Die Auswertung der Luciferase-Expressions-Messung des mit Ad5CMVluc transduzierten Ansatzes lieferte ebenfalls ein vergleichbares Ergebnis. Auch hier bewirkten alle siRNAS eine signifikante Reduktion der Virusreplikation, wobei die siIVa2 und die siHexon effizienter waren als die siE1A (Abb. 3.11.B).



Abb. 3-11: Vergleich der anti-adenoviralen Aktivität von siE1A, siIVa2 und siHexon nach direkter und indirekter Bestimmung der Virusproduktion

Hela Zellen wurden mit 1 MOI Ad5TRE-E1A infiziert. Ein Ansatz wurde zusätzlich mit 2 MOI Ad5CMVluc cotransduziert. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Zellen anschließend mit den jeweiligen siRNAs in einer Konzentration von 5 nM transfiziert. Nach 48 h wurden die Virusüberstände durch Zelllyse gewonnen und die Plaque Assays sowie die Luciferase-Expression-Messung durchgeführt. (A) Die Zählung der Plaques und Kalkulation der Plaque forming units erfolgte nach 2 Wochen. Die Applikation von siE1A führte zu einer Reduktion der Plaque Bildung um ca. 60 % wohingegen siIVa2 und siHexon die Plaque Bildung um mehr als 90 % inhibierten. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± S.E.M. *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,001; ****p<0,0001. (B) Messung der Luciferase Expression. siE1A inhibierte die Luciferase Expression um ca 90%. Die Inhibierungsrate von siIVa2 und siHexon betrug annähernd 100%. siIVa2 und siHexon bewirkten insgesamt eine stärkere Inhibierung der adenoviralen Replikation als siE1A. Die Ergebisse der Luciferase-Messung zeigten mit den Ergebnissen des Plaque Assays vergleichbare Unterschiede in der antiviralen Aktivität der drei siRNAs.

3.3 Evaluierung der anti-adenoviralen Wirkung von Kombinationen der verschiedenen siRNAs im Vergleich mit den einzelnen siRNAs

Nachdem initial die Aktivität der anti-adenoviralen siRNAs demonstriert worden war, wurden nach Auswahl der effizientesten siRNAs, die siRNAs gegen E1A, Hexon und IVa2 in Hinblick auf ihre Silencing-Aktivität miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die siIVa2 und siHexon einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die adenovirale Replikation hatten als die siE1A. Der nun folgende Teil sollte dazu dienen die Silencing-Aktivität von Kombinationen der verschiedenen siRNAs zu evaluieren.

3.3.1 Evaluierung additiver Effekte der siRNAs

Zunächst wurde dabei untersucht inwieweit sich die Effekte der einzelnen siRNAs bei kombinierter Anwendung addieren. Dazu wurden in HeLa Zellen Transkomplementierungs-Assays durchgeführt. Um zu evaluieren, ob die siRNAs auch in anderen Zelllinien anti-adenoviral wirksam sind, wurden parallel EA.hy.926 Zellen untersucht. Zur Durchführung der Transkomplementierungs-Assays wurden die Zellen zunächst mit 10 nM siRNA pro Ansatz transfiziert. Die sequenzspezifischen siRNAs wurden dabei jeweils in einer Konzentration von 3,33 nM eingesetzt und gegebenenfalls mit non-silencing siRNA auf eine Gesamtkonzentration von 10 nM aufkonzentriert. Die verwendeten Kombinationen finden sind in Tab. 1 dargestellt. Im Anschluss erfolgte die Infektion mit 1 MOI Ad5TRE-E1A und 2 MOI Ad5CMVluc. Nach vierstündiger Inkubation wurde das Kulturmedium gewechselt. 36 h später wurden die Zellen lysiert. Mit dem Viruslysat wurden erneut Zellen infiziert und wiederum 24 h später die Luciferase-Expression bestimmt.

Probe	Konzentration siRNA	Adv. spez. siRNA total
siE1A/scr/scr	3,33 nM/3,33 nM/3,33 nM	3,33 nM
siIVa2/scr/scr	3,33 nM/3,33 nM/3,33 nM	3,33 nM
siHexon/scr/scr	3,33 nM/3,33 nM/3,33 nM	3,33 nM
siE1A/siIVa2/scr	3,33 nM/3,33 nM/3,33 nM	6,66 nM
siE1A/siHexon/scr	3,33 nM/3,33 nM/3,33 nM	6,66 nM
siHexon/siIVa2/scr	3,33 nM/3,33 nM/3,33 nM	6,66 nM
siE1A/siHexon/siIVa2	3,33 nM/3,33 nM/3,33 nM	9,99 nM
scr/scr/scr	3,33 nM/3,33 nM/3,33 nM	0

Tab. 3-1: Kombinationen und Dosierungen der verwendeten siRNAs

Die Kombinationen von siE1A mit siHexon bzw. siIVa2 hatten eine annähernd identische Silencing-Aktivität wie die siIVa2 bzw. die siHexon alleine, sie führten alle zu einer messbaren relativen Reduktion der Luciferase-Expression um ca. 80% gegenüber der Negativkontrolle.

Zu einem deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt führten die Kombinationen aus siHexon und siIVa2 sowie aus siHexon, siIVa2 und siE1A, die eine Reduktion der adenoviralen Replikation um über 90 % bewirkten. Der Unterschied der Silencing-Aktivität der Kombination von siHexon und siIVa2 und der Kombination von siE1A, siHexon und siIVa2 war dabei nicht signifikant.

siE1A alleine hatte die geringste Silencing-Aktivität mit einer Inhibierungsrate von ca. 30 %. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass siHexon und siIVa2 einen deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt auf die adenovirale Replikation zeigten als siE1A und dass sich die Effekte von siHexon und siIVa2 bzw. von allen drei siRNAs zusammen zu einem noch stärkeren inhibitorischen Effekt addierten. Die Ergebnisse in HeLa und EA.hy926 Zellen waren dabei vergleichbar. Auch in dieser Zelllinie bewirkte die Kombination aus siHexon und siIVa2 bzw. die Dreifachkombination den stärksten inhibitorischen Effekt mit einer Herunterregulation der Luciferase-Expression von über 90 % während siE1A alleine den schwächsten Effekt hatte mit einer Herunterregulation von annähernd 40 %.



Abb. 3-12: Stärkere Inhibierung der adenoviralen Replikation durch additive siRNA-Wirkung

(A) HeLa Zellen wurden mit den siRNAs in einer Gesamtkonzentration von 10 nM pro Probe transfiziert und anschließend mit 1 MOI Ad5TRE-E1A infiziert und mit 2 MOI Ad5CMVluc transduziert. 36 h später wurden die Zellen geerntet und lysiert. Mit dem Viruslysat wurden erneut HeLa Zellen infiziert. Weitere 24 h später erfolgte die Messung der Luciferase-Expression. Alle siRNAs einzeln und im Kombination ausgenommen die Probe siE1A/scr/scr bewirkten eine signifikante Reduktion der adenoviralen Replikation. Die Wirkung von siHexon und siIVa2 bzw. siE1A, siIVa2 und siHexon addierte sich. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, in Prozent \pm S.E.M. (B) Der Versuchsaufbau entspricht dem unter (A) genannten. Es wurden EA.hy926 Zellen verwendet. Die Ergebnisse waren vergleichbar. Auch hier waren alle Proben bis auf siE1A/scr/scr in der Lage die adenovirale Replikation zu inhibieren. siHexon und siIVa2 sowie siE1A, siIVa2 und siHexon hatten den stärksten inhibitorischen Effekt. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in Prozent \pm S.E.M. Signifikanz.
3.3.2 Evaluierung des inhibitorischen Effekts der Kombination siHexon/siIVa2 in Abhängigkeit von der adenoviralen Dosis

In einem weiteren Experiment wurde die Wirkung der unter 3.3.1 effizientesten Probe, siHexon/siIVa2 in Abhängigkeit von der viralen Dosis untersucht und danach anhand der Ergebnisse die geeignete Virusdosis für die folgenden Experimente festgelegt. HeLa Zellen wurden mit der Kombination aus siHexon/siIVa2 je in einer anteiligen Dosierung von 5 nM und mit nonsilencing siRNA in einer Dosis von 10 nM transfiziert und mit Ad5TRE-E1A in den Dosierungen 0,001 MOI; 0,01 MOI; 0,1 MOI; 1 MOI; 5 MOI und 10 MOI infiziert sowie mit 2 MOI Ad5CMVluc cotransduziert. 36 h später wurden die Zellen lysiert und mit den Lysaten HeLa Zellen reinfiziert. 24 h später erfolgte die Messung der Luciferase-Expression. Ab einem Dosisbereich von 0,1 MOI zeigen die siRNAs eine signifikante Reduktion der adenoviralen Replikation. Im Niedrigdosisbereich (0,001 bzw. 0,01 MOI) war durch die geringe Zahl an Viruskopien die Replikationsrate so gering, dass die Luciferase-Expression nur knapp über der Hintergrund-Aktivität lag und somit auch kein siRNA Effekt demonstriert werden konnte. Die stärkste Herunterregulation bewirkte die siRNA Kombination bei einer Virusdosis von 1 MOI, sie lag bei 99 %. Ebenfalls über 90 % lag die Herunterregulation der adenoviralen Replikation bei einer Virusdosis von 5 MOI. Bei 10 MOI lag die Rate der Inhibierung bei ca. 66 %. Die siRNAs hatten folglich auch in diesem Dosisbereich eine hohe Aktivität, aber nicht mehr so hoch, dass fast die gesamte virale Replikation inhibiert werden konnte.



Abb. 3-13: Inhibierung der adenoviralen Replikation durch die siRNA Kombination siHexon/siIVa2 in Abhängigkeit von der Virusdosis

HeLa Zellen wurden mit einer Kombination aus je 5 nM siIVa2 und siHexon transfiziert bzw. mit 10 nM scrambled siRNA, so dass die Gesamtkonzentration an siRNA in jedem Ansatz 10 nM betrug. Anschließend wurden die Zellen mit Ad5TRE-E1A in den Konzentrationen 0,001 MOI; 0,01 MOI; 0,1 MOI; 1 MOI; 5 MOI und 10 MOI infiziert und mit 2 MOI Ad5CMVluc cotransduziert. 36 h später wurden die Zellen geerntet und lysiert. Mit dem Lysat wurden erneut HeLa Zellen infiziert. Weitere 24 h später wurde die Luciferase-Expression bestimmt. Erst ab einer Virusdosis von 0,1 MOI gab es überhaupt einen messbaren Effekt. Im darunterliegenden Dosisbereich war die Rate der Virusreplikation so gering, dass die gemessene Luciferase-Aktivität dem Hintergrund entsprach. Bei einer Virusdosis von 0,1 MOI; 1 MOI und 5 MOI lag die Rate der Inhibierung bei über 90 %. Bei einer Dosis von 10 MOI lag sie immer noch bei 66 %. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm S.E.M. Signifikanz: *p<0,05; ***p<0,001; p****<0,0001.

Ergebnisse

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob sich die siRNA Effekte nur über eine Steigerung der Dosis addieren (wie unter 3.3.1 dargestellt) oder ob die verschiedenen siRNAs in der Tat synergistisch wirken. Dazu wurden zunächst Transkomplementierungs-Assays durchgeführt. HeLa Zellen wurden mit den verschiedenen möglichen Kombinationen aus siE1A, siIVa2 und siHexon sowie mit den einzelnen siRNAs (Tab. 3.2) transfiziert. Die Gesamtkonzentration der siRNAs pro Ansatz betrug dabei 75 nM, 1 nM oder 0,5 nM. Wurde dabei mehr als eine siRNA appliziert, setzte sich die Gesamtmenge der siRNAs aus gleichen Teilen jeder verwendeten siRNA zusammen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10 MOI Ad5TRE-E1A und 2 MOI des Reportervirus Ad5CMVluc infiziert und für 4 h inkubiert. Nach 36 h wurde die Luciferasereporter-Aktivität mittels Transkomplementierungs-Assay bestimmt und so die Inhibierung der adenoviralen Replikation ermittelt. Die stärkste anti-adenovirale Wirkung zeigten die siRNAs bei einer Konzentration von 75 nM. Alle siRNAs und deren Kombinationen führten in diesem Dosisbereich zu einer Reduktion der Luciferase-Expression um ca. 90 %. Die einzige Ausnahme bildete siE1A, die die adenovirale Replikation nur um ca. 35 % inhibierte. Aber auch in einer Dosierung von 1 nM bewirkten alle Proben bis auf siE1A eine deutliche Reduktion der Luciferase Expression um 80 - 90 %. Im Niedrigdosisbereich von 0,5 nM zeigten die siRNAs nur noch Inhibierungsraten von 50 - 70 %. Darüber hinaus zeigte sich in allen Dosisbereichen, dass keine der Kombinationen aus den siRNAs eine stärkere Inhibierung der adenoviralen Applikation bewirken konnte als die einzelnen siRNAs. Vielmehr wurde in allen kombinierten Ansätzen eine ebenso starke Reduktion der Luciferase-Reporter-Aktivität gemessen wie sie siIVa2 bzw. siHexon alleine bewirkten. Die antivirale Aktivität von siE1A war auch in diesem Experiment deutlich geringer sowohl im Vergleich mit siIVa2 und siHexon als auch mit den Kombinationen, was die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen bestätigte. Es ließ sich aus den Messdaten keine synergistische Aktivität der siRNAs ableiten. Bei gleicher Gesamtkonzentration der sequnezspezifischen siRNAs erhielt man annähernd gleiche Luciferase-Expressionswerte für die einzeln applizierten siRNAs siHexon und siIVa2 und die Kombinationen aus ihnen.

siRNA	siRNA-Konzentration		
	75 nM	1 nM	0,5 nM
siE1A	75 nM	1 nM	0,5 nM
siIVa2	75 nM	1 nM	0,5 nM
siHexon	75 nM	1 nM	0,5 nM
siE1A+siIVa2	37,5 nM +37,5 nM	0,5 nM + 0,5 nM	0,25 nM + 0,25 nM
siE1A+siHexon	37,5 nM +37,5 nM	0,5 nM + 0,5 nM	0,25 nM + 0,25 nM
siHexon+siIVa2	37,5 nM +37,5 nM	0,5 nM + 0,5 nM	0,25 nM + 0,25 nM
siE1A+siHexon+siIVa2	25 nM+25 nM+25 nM	0,33 nM+0,33 nM+0,33 nM	0,16 nM+0,16 nM+0,16 nM
scrambled	75 nM	1 nM	0,5 nM

Tab. 3-2: Übersicht über Kombinationen und Dosierungen der untersuchten siRNAs





Abb. 3-14: Inhibierung der adenoviralen Replikation durch Kombinationen von siE1A, siIVa2 und siHexon

HeLa Zellen wurden mit Kombinationen der drei siRNAs in Dosierungen von 75 nM (A), 1 nM (B) und 0,5 nM (C) transfiziert. Bei Applikation mehrerer siRNAs in einem Ansatz wurden diese zu gleichen Anteilen an der Endkonzentration eingesetzt (Tab.3.2). Im Anschluss erfolgte die Infektion mit 10 MOI Ad5TRE-E1A und 2 MOI Ad5CMVluc. Nach 36 h wurden Transkomplementierungs-Assays durchgeführt, um die Reduktion der adenoviralen Replikation durch die siRNAs zu bestimmen. (A) Bei einer Konzentration von 75 nM führten alle siRNAs, mit Ausnahme von siE1A sowie deren Kombinationen, zu einer Reduktion der Luciferase Expression um ca. 90 %. (B) Außer bei den Proben siHexon und siHexon/siE1A, die nur eine Inhibierung von ca. 80 % bewirkten und siE1A, die in diesem Ansatz gar keine inhibitorische Wirkung zeigte, führte die Applikation der siRNAs und Kombinationen in einer Gesamtkonzentration von 1 nM immer noch zu einer Inhibierung der adenoviralen Replikation um ca. 90%. (C) Bei einer Konzentration von 0,5 nM war der inhibitorische Effekt der siRNAs deutlich verringert. Auch hier zeigte die siE1A nahezu keine Wirkung. Die übrigen Proben bewirkten eine Inhibierung der Luciferase Expression zwischen 50 % und 70 %. In keinem der untersuchten Dosisbereiche zeigten die Kombinationen verschiedener siR-NAs einen stärkeren inhibitorischen Effekt als die einzeln applizierten siRNAs. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je zwei unabhängigen Experimenten, die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, in Prozent± S.E.M.

3.3.4 Evaluierung und Vergleich des inhibitorischen Effekts auf die Adenovirusinduzierte Zelllyse

In Bezug auf eine mögliche zukünftige Verwendbarkeit von anti-adenoviralen siRNAs in der Praxis, interessiert es vorrangig in wieweit die siRNAs, einzeln oder in Kombination, in der Lage sind die durch Adenoviren verursachten zytopathischen Effekte zu inhibieren. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde abschließend ein Experiment in Zellkultur durchgeführt, das die Zytolyse in Adenovirus infizierten und mit siE1A, siIVa2 oder siHexon bzw. Kombinationen dergleichen behandelten Zellen untersuchte. Dazu wurden HeLa Zellen mit 75 nM der siRNAs transfiziert. Bei Applikation von mehreren siRNAs in einem Ansatz wurden die Einzeldosen so gewählt, dass sie zu gleichen Anteilen in die Gesamtkonzentration eingingen. Die Proben entsprachen den in Tab. 3.2 Spalte 1 und 2 beschriebenen. Direkt im Anschluss wurden die Zellen mit 10 MOI Ad5TRE-E1A oder mit 10 MOI Ad5CMVluc infiziert. Nach vierstündiger Inkubation wurde das Medium gewechselt. Vier Tage post infectionem wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Kristallviolett färbt ausschließlich lebende Zellen, so dass auf diese Weise ein zytopathischer Effekt sichtbar gemacht werden konnte. Der Zellrasen in den Negativkontrollen: unbehandelte Zellen, siE1A/siIVa2/siHexon und siE1A/siIVa2/siHexon plus Ad5CMVluc, war zu diesem Zeitpunkt vollständig intakt. Der Zellrasen in der ausschließlich mit Ad5TRE-E1A behandelten Probe hingegen war vollständig lysiert, ebenso der Zellrasen in den mit einer einzigen siRNA oder der Negativkontrolle scrambeld behandelten Ansätzen. Ein entsprechendes Bild zeigte auch die Probe mit der Kombination aus siIVa2 und siHexon. Einzig die Kombinationen von siRNAs, die zu einem Teil siE1A enthielten, waren in der Lage die Zellen vor der Adenovirus vermittelten Lyse zu schützen. In Bezug auf die Inhibierung der Virus vermittelten Zelllyse haben folglich Kombinationen aus siRNAs gegen das frühe adenovirale Gen E1A und gegen die späten Gene IVa2 und Hexon einen deutlich stärkeren Effekt als die einzelnen siRNAs oder Kombinationen von siRNAs gegen IVa2 und Hexon.



Abb. 3-15: Inhibierung der Adenvirus vermittelten Zelllyse durch Applikation verschiedener Kombinationen von siE1A, siIVa2 und siHexon

HeLa Zellen wurden mit den siRNAs in einer Gesamtkonzentration von 75 nM transfiziert. Bei Kombination mehrerer siRNAs wurden die einzelnen siRNAs zu gleichen Teilen so eingesetzt, dass die Endkonzentration ebenfalls 75 nM betrug. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10 MOI Ad5TRE-E1A bzw. Ad5CMVluc infiziert. Nach vierstündiger Inkubation wurde das Medium gewechselt. Um den zytopathischen Effekt zu beurteilen, wurden vier Tage später die lebenden Zellen mit Kristallviolett gefärbt. scr = scrambeld siRNA. Einzig die Kombinationen siE1A/siHexon; siE1A/siIVa2 und siE1A/siIVa2/siHexon hatten einen zytoprotektiven Effekt.

4 Diskussion

Der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) wurde 1998 im Nematoden C. elegans durch Fire und Mello erstmalig beschrieben (Fire et al., 1998). Es handelt sich um einen in Eukaryonten hoch konservierten Signalweg des posttranskriptionellen Gen-Silencings. Lange doppelsträngige RNA Moleküle (dsRNA) bzw. genomische Transkripte, die als Haarnadelstrukturen vorliegen (pre-miRNA), initiieren im Zytoplasma eine Kaskade, an deren Ende die Spaltung bzw. translationale Hemmung einer sequenzhomologen mRNA steht (Elbashir 2001 a/b/c; Meister und Tuschl, 2004; van Rij und Andino, 2006). Es dauerte jedoch einige Zeit bis die Existenz der RNA-Interferenz im Säugetierorganismus einwandfrei nachgewiesen werden konnte. Gelangt dsRNA von mehr als 30 Basenpaaren Länge in das Zytoplasma einer Säugetierzelle, wird dadurch eine unspezifische Interferonantwort ausgelöst und über Interaktion mit der Proteinkinase PKR und der 2', 5' - Oligoadenylat-Synthetase die Proteinsynthese der Wirtszelle inhibiert (Clemens, 1997; Stark et al., 1998; Manche et al., 1992). Erst die Gruppe um Tuschl und Elbashir konnte zeigen, dass in der Säugetierzelle die sequenzspezifische Degradierung einer homologen mRNA im Rahmen der RNAi durch kurze doppelsträngige RNA-Moleküle von 21 - 22 Nukleotiden Länge, den small interfering RNAs (siRNAs), induziert werden kann (Elbashir et al., 2001c). Seitdem hat das Feld der siRNA-Technologie eine rasante Entwicklung genommen, so dass siRNAs mittlerweile in vielen Gebieten der Molekularbiologie erfolgreich Einsatz finden und auch bereits in klinischen Studien erprobt werden. Dazu zählt auch die Therapie akuter wie chronischer viraler Infektionen. Nach wie vor gibt es jedoch gegen viele virale Pathogene keine kausale Therapie. Durch Adenoviren verursachte Infektionen haben in jüngerer Zeit zunehmend an Bedeutung gewonnen. Vor allem bei immunsupprimierten Patienten verlaufen Adenovirusinfektionen häufig fulminant und nehmen nicht selten einen letalen Ausgang (Johnson et al., 1990; Hough et al., 2004). Die Therapie ist bislang jedoch vorwiegend symptomatisch orientiert. In mehreren klinischen Studien wurden zwar verschiedene Nukleosidanaloga im Sinne eines sogenannten off-label-use eingesetzt, zugelassene Medikamente gibt es jedoch nicht (Dropulic und Cohen, 2010).

Ziel der Dissertation war es daher die Inhibierung adenoviraler Infektionen durch den Einsatz von sequenzspezifischen siRNAs am Beispiel des Adenovirus Typ 5 zu evaluieren. Als Zielstrukturen des post-transkriptionellen Silencing wurden drei adenovirale Schlüsselproteine ausgewählt: E1A, IVa2 und Hexon. Chung et al. konnten bereits zeigen, dass die siRNA vermittelte Herunterregulation von E1A die adenovirale Replikation signifikant inhibiert (Chung et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig demonstriert, dass die Herunterregulation der adenoviralen Strukturproteine Hexon und IVa2 die adenovirale Replikation effizienter hemmt als der *Knockdown* von E1A. Chung et al. konnten zwar eine Herunterregulation der E1A mRNA durch den Einsatz der E1A spezifischen siRNA bewirken, eine vollständige Inhibierung der adenoviralen Replikation konnte jedoch nicht erreicht werden. Es sollte daher evaluiert werden, ob ein kombinierter Einsatz von siRNAs gegen das frühe Produkt E1A und gegen die späten Produkte IVa2 und Hexon die adenovirale Replikation effizienter inhibiert. Es wurde gezeigt, dass bei gleicher Gesamtdosis der siRNAs, jegliche Kombination von siRNAs eine vergleichbar starke Inhibierung der adenoviralen Replikation bewirkt wie siHexon oder siIVa2 alleine. Es konnten folglich keine synergistischen Effekte nachgewiesen werden. Ein anderes Bild jedoch ergab sich in Bezug auf den zytopathischen Effekt. Die Adenovirus vermittelte Zelllyse konnte nur in den Proben inhibiert werden, die aus einer Kombination von siE1A mit siHexon oder siIVa2 bestanden.

4.1 Auswahl des Adenovirus Serotypen

Die Adenoviren der Serogruppen B und D gehören zu den bedeutendsten humanpathogenen Adenoviren. Die Adenoviren der Gruppe B, zu denen auch das Ad11 gehört, verursachen vorrangig Infektionen der Konjunktiven und des Urogenitaltraktes (Russell, 2009) und können besonders bei immunsupprimierten Patienten sehr schwere Krankheitsverläufe bedingen (Umekawa und Kurita, 1996). Am Beispiel des Ad11 konnten Chung et al. bereits zeigen, dass die Herunterregulation des adenoviralen E1A-Gens mittels RNAi die adenovirale Replikation signifikant inhibiert (Chung et al., 2007).

Die Vertreter der Serogruppe C wirken hauptsächlich als Pathogene an den Konjunktiven sowie im Respirationstrakt (Russell, 2009; Shenk, 2001). In jüngerer Zeit konnten Ad2 und Ad5, die zur Gruppe C gehören, jedoch als Verursacher der viralen Myokarditis isoliert werden (Pauschinger et al., 1999). Zudem ist das Ad5 einer der am häufigsten isolierten Serotypen in Zusammenhang mit der fulminanten adenoviralen Hepatitits (Hough et al., 2005). Ein Krankheitsbild, das vor allem bei immunsupprimierten Patienten gehäuft auftritt. In den Experimenten wurden daher zwei verschiedene Adenovirus-Mutanten des Ad5 eingesetzt, RCA und Ad5TRE-E1A, in beiden Fällen handelt es sich um replikationskompetente Adenoviren, welche im Vergleich zum Wildtyp Adenovirus eine etwas geringere Replikationsrate aufweisen.

4.2 Selektion der Zielgene

Als Zielstrukturen der RNAi wurden drei Proteine ausgewählt, deren Funktionen von zentraler Bedeutung für den adenoviralen Infektionszyklus sind: E1A, Hexon und IVa2.

E1A gehört zu den immediate early Genen. Nachdem das Adenovirus in den Nukleus der Wirtszelle vorgedrungen ist, ist es das erste virale Gen, das exprimiert wird. Durch alternatives Spleißen entstehen mehrere Proteine, deren Hauptvertreter als 12S und 13S bezeichnet werden. Diese beiden Spleißvarianten unterscheiden sich in der Länge ihrer Aminosäuresequenzen. Beide Proteine besitzen identische N- und C-terminale Sequenzen, die 13S Variante besitzt jedoch eine zusätzliche, als conserved region 3 (CR3) bezeichnete Region, die 49 Aminosäuren umfasst (Russell, 2000; Flint und Shenk, 1989). Die Funktionen der E1A-Produkte sind essentiell für die virale Replikation. Das E1A 13s-Protein ist Transaktivator aller nachgeschalteten Transkriptionseinheiten. Gleichzeitig modifizieren die E1A-Proteine den zellulären Metabolismus so, dass eine geeignete Umgebung für die virale Replikation geschaffen wird (Russell, 2000; Shenk, 2001). Da die adenovirale Replikation so entscheidend von der Aktivität des E1A-Gens abhängt, stellt E1A in dieser Hinsicht eine optimale Zielstruktur für die RNAi im Rahmen einer antiviralen Strategie dar. So konnten Chung et al. bereits zeigen, dass die siRNA vermittelte Herunterregulation von E1A die adenovirale Replikation signifikant inhibiert (Chung et al., 2007). Ein Nachteil jedoch ist, dass bereits minimale Mengen an E1A ausreichen, um die Virusreplikation zu unterhalten (Hitt und Graham, 1990; Fechner et al, 2003). So konnten auch Chung et al. durch Applikation der gegen E1A gerichteten siRNA keine vollständige Inhibierung der adenoviralen Replikation erreichen. Aus diesem Grund könnte E1A wiederum eine nicht ganz optimale Zielstruktur darstellen, da durch RNAi möglicherweise nur ein Knockdown erzielt werden kann.

Das Hexon-Protein ist das Hauptstrukturprotein des Kapsids. 240 der 252 Kapsomere sind Hexone (Russell, 2009). Darüber hinaus kommen dem Hexon-Protein weitere wichtige Funktionen im Rahmen des adenoviralen Replikationszyklus zu. Nach erfolgter Internalisierung und Freisetzung aus den *Clathrin coated vesicles* wird über das Hexon das zelluläre Dynein gebunden, das den Transport zum Zellkern entlang der Mikrotubuli vermittelt (Bremner et al., 2009; Leopold et al., 2000). Die Aufnahme des Adenovirus in den Nukleus erfolgt nach der vorherrschenden Meinung im Cotransport mit dem zellulären Histon H1, das sich im kontinuierlichen Fluss zwischen Zellkern und Zytoplasma befindet und ebenfalls an das Hexon-Protein bindet (Trotman et al., 2001). Durch Ausschalten des Hexon-Proteins kann somit der virale Replikationszyklus an verschieden kritischen Punkten inhibiert werden. IVa2 gehört zu den intermediären adenoviralen Proteinen und wurde als Trankriptionsaktivator des MLP charakterisiert (Tribouley et al., 1994; Lutz und Kedinger, 1996). Des Weiteren spielt IVa2 eine essentielle Rolle im adenoviralen Verpackungsprozess (Gustin et al., 1996; Gustin und Imperiale, 1998) und besitzt darüber hinaus entscheidende Funktionen für den Aufbau des Kapsids. Dies kommt vor allem darin zum Ausdruck, dass Adenovirus-Mutanten, die IVa2 nicht exprimieren keine infektiösen Partikel bilden können (Zhang und Imperiale, 2003).

Weitere mögliche Zielgene für den siRNA vermittelten Knockdown wären beispielsweise die Pentonbase, das Fiber-Protein, E1B oder E3 sowie E2A (DBP) und E2B (pTP und Pol).

Das Fiber-Protein und die Pentonbase sind als Bestandteile des Kapsids für die primäre Bindung an die Zielzelle bzw. die Internalisierung des Adenovirus verantwortlich. Die meisten Serotypen interagieren über das Fiber-Protein mit dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (Bergelson et al., 1997; Roelvink et al., 1998). Die Serogruppe F jedoch bindet an N-Acetylneuraminsäure, die Serogruppe B an CD46 (Arnberg et al., 2000; Hall et al., 2010). Einen weiteren Bindungspartner des Fiber-Proteins stellt das Heparansulfatglykosaminoglykan (HSG) dar, das von den Adenoviren (Ad2 und Ad5) vor allem in Abwesenheit von CAR als Rezeptor verwendet wird (Dechecci et al., 2001; Bayo-Puxan, 2006). Die Pentonbase vemittelt die Bindung an die zellulären Integrine und somit die Internalisierung des Virus (Wickham et al., 1993; Mathias et al., 1994). Es wird bereits an dieser Stelle deutlich, dass die Internalisierung des Adenovirus ein Prozess ist, der verschiedene Schlüsselstellen involviert und der gleichwohl auf mehreren Wegen stattfinden kann. Somit schien der Versuch durch das Silencing nur eines der eben genannten Gene eine effiziente Inhibierung der Adenovirusinfektion zu erreichen wenig aussichtsreich. Hinzu kommt, dass die Expression der Rezeptoren, die für die Internalisierung des Adenovirus entscheidend sind, hoch variabel zwischen den einzelnen Zelllinien und Geweben ist (Fechner et al., 1999), so dass der Versuch die zelluläre Aufnahme der Adenoviren durch shRNA vermittelten Knockdown von CAR zu inhibieren zwar erfolgreich war aber eine variable Effizienz in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie zeigte (Fechner et. al., 2007).

Die Produkte der E1B Region unterdrücken zum einen die Funktion des zellulären Tumorsuppressorgens p53, so dass ein verfrühtes Absterben der Zelle während der viralen Replikation verhindert wird (Kao et al., 1990; Yew et al., 1994; Lomonosova et al., 2005; Harada et al., 2002) und zum anderen begünstigen sie die Translation der späten adenoviralen Proteine (Blanchette et al., 2008). Adenovirus-Mutanten deren E1B Region deletiert wurde, sind jedoch immer noch in der Lage zu replizieren (Fechner et al., 2003). Auch die Produkte der E3 Region, deren Hauptfunktion darin besteht, die Immunantwort der Wirtszelle dahingehend zu modulieren, dass eine andauernde adenovirale Infektion etabliert werden kann, sind für die virale Replikation nicht essentiell (Su et al., 2011; Burgert et al., 1987; Bennett et al., 1999). Daher sind E1B und E3 wahrscheinlich keine geeigneten Zielgene.

In der E2-Region sind das DNA Binding Protein, die virale Polymerase sowie die Vorstufe des terminalen Proteins kodiert, die an der viralen DNA-Replikation entscheidend beteiligt sind (de-Jong und van der Vliet, 1999). E2 stellt somit eine mögliche Zielstruktur für die RNAi dar, die wir jedoch nicht ausgewählt haben, da E1A, Hexon und IVa2 jeweils den Replikationszyklus an mehreren Schlüsselstellen beeinflussen und aus diesem Grund durch das Silencing dieser Gene ein stärkerer anti-adenoviraler Effekt zu erwarten war.

Ziele der Dissertation waren: Die Wirksamkeit der RNAi gegen das Adenovirus zu evaluieren, vergleichend zu untersuchen inwieweit das Silencing von frühen (E1A), intermediären (IVa2) bzw. späten (Hexon) adenoviralen Genen einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Virusreplikation hat und zuletzt die Effizienz der kombinierten Anwendung von siRNAs zu evaluieren. Wie im vorangegangen Absatz dargestellt gibt es bei Adenoviren eine Vielzahl von möglichen Angriffspunkten für die RNAi. Im Rahmen eines *Proof of Principle* erschien es jedoch sinnvoll zusätzlich zu E1A, das die zentrale Stellung im Replikationszyklus des Adenovirus einnimmt und das bereits erfolgreich herunterreguliert werden konnte (Chung et al., 2007), nur zwei weitere Proteine als Ziele der RNAi auszuwählen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Replikationszyklus exprimiert werden und von deren Herunterregulation ein starker inhibitorischer Effekt auf die Bildung infektiöser Partikel zu erwarten war: IVa2 und Hexon.

4.3 Evaluierung der anti-adenoviralen Wirkung der siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon und Selektion der effizientesten siRNA gegen jedes Zielgen

Gegen jedes der ausgewählten Zielgene, E1A, IVa2 und Hexon, lagen zu Beginn je vier verschiedene synthetisch hergestellte siRNAs vor, die zu unterschiedlichen Sequenzen der jeweiligen kodierenden mRNA komplementär waren. Dabei waren alle siRNAs gegen E1A sowohl gegen die 13S als auch gegen die 12S Spleißvariante gerichtet.

Neben anderen wie z. B. Elbashir und Tuschl (Elbashir et al., 2001 a/b; Elbashir et al., 2002) entwickelten Reynolds et al. Richtlinien, um das Design einer effizienten siRNA zu erleichtern. Anhand von acht definierten Kriterien erfolgt die Vergabe von Punkten, wobei ein Punktwert von sechs in Hinblick auf die zu erwartende Silencing-Aktivität der siRNA als optimal betrachtet wird. Zu den Kriterien in Bezug auf den 19 Basenpaare umfassenden doppelsträngigen Bereich

Diskussion

(ohne Berücksichtigung der überhängenden 3' Termini) gehören: der GC-Gehalt, er sollte zwischen 30 und 52 Prozent betragen; das Vorhandensein der Basen A oder U an den Positionen 15-19; das Vorhandensein der Base A in Position 19 und in Position 3 sowie der Base U in Position 10. Für jedes einzelne Kriterium wird ein Punktwert von 1 vergeben. Beim Vorhandensein von G oder C in Position 19 oder G in Position 13 wird je ein Punkt abgezogen (Reynolds et al., 2004). Eine wichtige Rolle beim Design einer effizienten siRNA spielen darüber hinaus die thermodynamischen Eigenschaften der siRNA (Khvorova et al., 2003) aber auch Sequenz und Sekundärstruktur der Ziel-mRNA, da von ihr der räumliche Zugang zur Ziel-Sequenz abhängt (Gredell et al., 2008). Eine geringe Gesamtstabilität der siRNA scheint ebenfalls ihre Funktionalität zu erhöhen (Muhonen et al., 2008). Die in den Experimenten verwendeten siRNAs wurden nach dem *HP OnGuard* Algorithmus designed, dieser basiert im Wesentlichen auf den von Elbashir und Tuschl definierten Richtlinien und einem von Huesken et al. entwickelten *Artificial Neural Network* (BIOPREDsi-algorithm) (siehe auch Pkt. 2.2.2) (Elbashir et al., 2001 a/b; Elbashir et al., 2002; Huesken et al, 2005).

Trotz allem gibt es bisher keinen Algorithmus, der eine exakte Prognose der siRNA Aktivität ermöglicht. siRNAs, bei deren Design alle gängigen Kriterien berücksichtigt wurden, können sich als inaktiv erweisen und siRNAs, die nicht den Kriterien entsprechen, können ein sehr effizientes Silencing bewirken (Kurreck, 2006). Daher war es erforderlich im Vorfeld zu untersuchen, ob die siRNAs überhaupt anti-adenovirale Aktivität besitzen, ob diese auf der spezifischen Interaktion der siRNA mit ihrer Ziel-mRNA basiert und welche der je vier vorliegenden siRNAs aktiv bzw. inaktiv sind.

Zunächst wurde die Wirkung aller vorhandenen siRNAs durch Nachweis der adenoviralen Proteine mittels Immunfluoreszenz untersucht. HeLa Zellen wurden zu diesem Zweck mit den siRN-As transfiziert und anschließend mit Adenoviren infiziert. In allen Proben wurde bei der Fluoreszenzfärbung ein primärer Antikörper gegen das adenovirale Hexon-Protein verwendet. Die Ansätze, die mit den siRNAs gegen E1A behandelt worden waren, wurden zusätzlich unter Verwendung eines primären Antikörpers gegen E1A gefärbt. In der Hexonfärbung wurde die Wirkung der siRNAs gegen E1A und IVa2 somit indirekt beurteilt. E1A fungiert als transkriptioneller Aktivator aller nachfolgenden Gene, darunter auch dem IVa2, das wiederum als Aktivator des Major Late Promotors wirkt, der für die Expression der späten Gene und somit auch des Hexon-Proteins verantwortlich ist. Folglich ist die Expression des Hexon-Proteins zum einen von der adenoviralen Replikation per se abhängig und zum anderen von der Expression von E1A und IVa2. Die siRNAs mit dem stärksten inhibitorischen Effekt auf die Expression des HexonProteins waren: siE1A_3 und siE1A_4, siIVa2_2 und siIVa2_4 sowie siHexon_4. Die in der E1A-Färbung für die ant-siE1A siRNAs erhaltenen Ergebnisse sind damit weitgehend konkordant (siehe unten). Aus den Ergebnissen lässt sich zunächst ableiten, dass die siRNAs grundsätzlich in der Lage sind die Expression des adenoviralen Hexon-Proteins zu hemmen. Die Ergebnisse für E1A stimmen mit denen der Gruppe um Chung et al. überein. Auch hier wurde der inhibitorische Effekt der anti-E1A siRNAs mittels Färbung des adenoviralen Hexon-Proteins nachgewiesen. Chung et al., fanden eine Inhibierung der Hexon-Proteinexpression durch die anti-E1A siRNAs um etwa 95 % im Vergleich zur Negativkontrolle scrambled (Chung et al., 2007). Die effizientesten siRNAs in unserem Ansatz: siE1A_3 und siE1A_4 bewirkten ebenfalls eine Reduktion der Hexon-Proteinexpression um ca. 90% sowie eine vergleichbare Reduktion der E1A-Expression. Die siRNAs siE1A_1 und siE1A_2 waren weniger effizient, ebenso siHexon_1 - _3 und siIVa2_1, _3 und _4. Die siRNAs gegen IVa2 wirkten alle insgesamt schwächer im Vergleich mit den anti-Hexon und anti-E1A siRNAs. Die Ursache dafür könnte sein, dass IVa2 nicht essentiell ist für ein optimales Niveau der späten Genexpression (Zhang und Imperiale, 2003) und somit der Effekt von IVa2 auf die Hexon-Proteinexpression als gering einzustufen ist. Dies wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass, wie von uns gezeigt, die IVa2 siRNA die prinzipiell gleiche Silencing Effizienz gegenüber ihrer speziellen Zielsequenz hat wie siHexon und siE1A (Pkt. 3.1.5).

Dass nicht alle vier verschiedenen siRNAs gegen ihr jeweiliges Target gleichsam effizient wirkten, kann zum einen durch die Lage ihrer homologen Sequenz innerhalb der Sequenz ZielmRNA bedingt sein, so dass durch sterische Hinderung der Zugang erschwert sein kann (Gredell et al., 2008). Zum anderen könnte die höhergradige thermische Instabilität und die dadurch bevorzugte Inkorporation einiger siRNAs in den RISC Komplex ein weiterer Grund für deren stärkeren inhibitorischen Effekt dieser siRNAs sein (Walton et al., 2010).

Vergleicht man die Ergebnisse aus der E1A-Färbung mit den Ansätzen, in denen das Hexon-Protein gefärbt wurde, fällt auf, dass siE1A_2 in der Hexon-Färbung keine inhibitorische Aktivität zeigte, in der E1A-Färbung jedoch eine gute anti-adenovirale Wirkung demonstrierte. Um eine exaktere Auswertung zu erhalten, wurden die Hexon-positiven Zellen zusätzlich quantitativ erfasst. Im Vergleich mit den Ergebnissen der fluoreszenzoptischen Auswertung ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung mit geringgradigen Abweichungen. siIVa2_1 zeigte in der Antikörper-Färbung eine gut antivirale Aktivität, in der anschließenden Zählung der gefärbten Zellen ergab sich dann eine Inhibierung der Virusexpression von nur annähernd 30 %. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die Immunfluoreszenzfärbung nur eine grobe Bewertung der siRNA Aktivität zulässt. Die im Folgenden durchgeführten Transkomplementierungs-Assays sollten daher weiter Aufschluss geben.

Das Transkomplementierungs-Assay ist eine Methode zur indirekten Beurteilung und Quantifizierung der siRNA Aktivität. Entscheidend ist, dass mittels TKA der Endpunkt des viralen Replikationszyklus betrachtet werden kann. Die Zellen wurden dazu mit den siRNAs transfiziert und anschließend mit RCA und dem replikationsdefizienten, E1-deletierten Reportervirus Ad5CMVluc coinfiziert, der ebenfalls eine Mutante des Adenovirus Serotyp 5 ist. Gemäß dem Prinzip der Transkomplementierung fungiert das RCA als Helfervirus, indem die von ihm exprimierten E1A-Produkte auch die Replikation und Proteinexpression des Vektors regulieren, dessen E1-Region deletiert ist. Der adenovirale Vektor exprimiert Luciferase und da er allein nicht replizieren kann, ist die Höhe der gemessenen Luciferase-Expression abhängig von der Wirkung der Proteine des Helfervirus, v. a. des E1A, und somit von auch der Silencing - Aktivität der anit-E1A siRNA. Folglich konnte, wie bereits in der Vergangenheit demonstriert (Fechner et al., 2000), die Lucifarese-Expression verwendet werden, um die adenovirale Replikation quantitativ zu erfassen. Damit auch die Wirkung der siRNAs gegen die späten adenoviralen Gene Hexon und IVa2 suffizient beurteilt werden konnte, wurde das Transkomplementierungs-Assay so durchgeführt, dass die Zellen mit den siRNAs behandelt wurden, mit Adenoviren infiziert und mit dem Vektor transduziert wurden und dann 24h post infectionem die Zellen geerntet und lysiert wurden und anschließend wiederum Zellen mit dem Lysat infiziert wurden. In diesen zweiten Ansätzen war die Menge der exprimierten Luciferase dann abhängig von der Fähigkeit des Adenovirus und des Vektors in dem ursprünglichen Ansatz infektiöse Partikel zu bilden, was wiederum abhängig von der Wirkung der siRNAs war, auch der siIVa2 und der siHexon. Inwieweit sich infektiöse Partikel bilden konnten, konnte dann wieder basierend auf dem Prinzip der Transkomplementierung nach Infektion der Zellen mit dem Lysat durch Bestimmung der Luciferase-Expression evaluiert werden.

Alle untersuchten siRNAs bewirkten entweder eine signifikante oder nahezu signifikante Reduktion der gemessenen Luciferase-Expression. In Übereinstimmung mit der zuvor durchgeführten Immunfluoreszenz waren auch hier die siRNAs gegen siE1A_4, siIVa2_2 und siHexon_4 am effizientesten. siE1A_2 zeigte im TKA eine hohe Silencing-Aktivität, was das Ergebnis aus der E1A-Färbung bestätigte, so dass das Resultat der Hexon-Färbung und anschließenden Zählung als Artefakt erscheint. Um dieses Ergebnis weiter zu belegen wurde ein Southern Blot durchgeführt. Dazu wurden zunächst HeLa Zellen mit siE1A_2 und siE1A_4, die als Positivkontrolle fungierte, sowie mit scrambled siRNA transfiziert und anschließend mit RCA infiziert. Der Southern Blot wurde durchgeführt und durch Einsatz einer radioaktiv markierten E1A-Hybridisierungs-Sonde die virale DNA nachgewiesen. siE1A_2 zeigte hierbei eine hohe Silencing Aktivität, was die Ergebnisse aus der E1A-Färbung und dem TKA weiter bestätigte.

Im Transkomplementierungs-Assay und in der Immunfluoreszenz wurden unterschiedliche Dosierungen von Virus und siRNAs verwendet. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die siR-NAs in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt bei einer MOI des Virus von 5. Die Konzentration wurde initial gewählt, um eine möglichst große Aussagekraft der Färbung zu erzielen. Für die Transkomplememtierungs-Assays wurde eine Viruskonzentration von 0,1 MOI bei einer siRNA Konzentration von 6,67 nM gewählt. Eine siRNA Konzentration von 6,67 nM liegt im Bereich der vom Hersteller empfohlenen Standarddosierung. Die Virusdosis von 0,1 MOI wurde gewählt auf Basis der in der Arbeitsgruppe vorliegenden Daten zur Luciferase-Expressions-Bestimmung.

Immunfluoreszenz, Transkomplementierungs-Assay und Southern Blot konnten alle prinzipiell die anti-adenovirale Wirkung der siRNAs belegen. Die Immunfluoreszenz lieferte dabei nur sehr grob orientierende Aussagen. Das TKA ist auf Grund der Betrachtung des kompletten Replikationszyklus genauer. Die im TKA gewonnenen Ergebnisse bezüglich siE1A_2 und siE1A_4 konnten darüber hinaus mittels Southern Blot bestätigt werden. Im TKA und in der Immunfluoreszenz waren siE1A_4, siIVa2_2 und siHexon_4 die effizientesten siRNAs. Im Southern Blot hatten siE1A_2 und siE1A_4 eine nahezu identischen Silencing-Aktivität, so dass letztlich siE1A_4, siIVa2_2 und siHexon_4 für die weiteren Analysen ausgewählt wurden.

Im Folgenden sollen sie nur noch als siE1A, siIVa2 und siHexon bezeichnet werden.

4.3.1 Abhängigkeit der siE1A Wirkung von der viralen Dosis und der Zeit

Um die Effektivität der siRNA vermittelten RNAi weiter zu untersuchen, wurde in einem Transkomplementierungs-Assay die Wirkung von siE1A in Abhängigkeit von der Virusdosis und der Zeit untersucht. Dabei konnte bei einer Adenoviruskonzentration von 0,1 MOI keine signifikante Reduktion der Luciferase-Expression beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht zunächst im Widerspruch zu dem vorangegangenen Transkomplementierungs-Assay, aus dem eine signifikante Inhibierung der adenoviralen Replikation bei einer viralen Dosis von 0,1 MOI durch siE1A abgeleitet werden konnte. Ursächlich für diese fehlende Signifikanz waren große Schwankungen der gemessenen Luciferase-Expression, so dass sich rechnerisch keine signifikante Reduktion der gemessenen Luciferase-Expression ergab. Bei einer Virusdosis von 1 MOI lag sowohl bei einer Messung nach 24 h als auch nach 48 h die Inhibierungsrate bei ca. 90 %. Anders stellte es sich bei einer adenoviralen Konzentration von 5 MOI dar. Nach 24 h konnte die Luciferase-Expression ebenfalls um 90 % inhibiert werden. Nach 48 h jedoch lag die Rate der Inhibierung nur noch bei 60 %. Folglich ist die Wirkung der anti-E1A siRNA sowohl von der Zeit als auch von der Virusdosis abhängig.

Die Abhängigkeit von der Zeit ergibt sich daraus, dass der adenovirale Replikationszyklus in permissiven Zellen in etwa 14 h dauert (Russell, 2000) und somit in einem längeren Betrachtungsintervall öfter ablaufen kann. Dabei lagen sowohl der Messzeitpunkt 24 h (48 h post transfektionem) als auch der Messzeitpunkt 48 h (72 h post transfetkionem) innerhalb des von Chung et al. für die stabile Wirkung der anti-E1A siRNA beschriebenen Intervalls von 5 Tagen (Chung et al., 2007). Dies wiederum ist kohärent mit dem für die effiziente siRNA Wirkung bereits zuvor beschriebenen Zeitraum von 5 bis 7 Tagen (Watanabe et al., 2004) bzw. 4 bis 5 Tagen (Holen et al. 2002) und stimmt auch mit den eigenen Daten überein, die ein effizientes Gen-Silencing, unabhängig von der viralen Replikation betrachtet, durch die siRNAs von bis zu 6 Tagen belegen (Pkt. 3.1.6).

Die gefundene Abhängigkeit der siRNA-Effektivität von der Virusdosis lässt sich erklären, wenn man eine exponentiell verlaufende Vermehrung des Adenovirus zu Grunde legt. In diesem Fall scheint die Virusmehrung 72 h post infectionem bzw. post transfektionem bei einer Ausgangskonzentration von 5 MOI so stark zu sein, dass siE1A in einer Konzentration von 5 nM nicht mehr ausreichend effizient wirken konnte, um die virale Replikation um 90 % zu inhibieren.

4.4 Vergleich der anti-adenoviralen Wirkung der siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon

In den vorangegangenen Experimenten konnte zunächst die anti-adenovirale Wirkung der siR-NAs gegen E1A, IVa2 und Hexon nachgewiesen werden und aus den vier siRNAs, die gegen jedes der drei Zielgene vorlagen, jeweils die effizienteste siRNA ausgewählt werden. Chung et al. hatten bereits zuvor gezeigt, dass durch das siRNA vermittelte Silencing von E1A die adenovirale Replikation inhibiert werden kann (Chung et al., 2007). Auch aus verschiedenen Arbeiten im Bereich der adenoviralen Vektoren ist bekannt, dass durch Deletion der E1A-Region die Replikation des Adenovirus gehemmt wird (Doronin et al., 2001; Heise et al., 2000; Ylösmäki, 2008). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, zu evaluieren, ob durch das Silencing der späten Gene Hexon und IVa2 die virale Replikation ebenfalls effizient inhibiert wird und ob das Silencing der späten Gene effizienter ist als der Knockdown von E1A. Der erste Teil der Fragestellung konnte bereits in den vorangegangenen Abschnitten positiv beantwortet werden. Die adenovirale Replikation wurde durch den Einsatz von siRNAs gegen Hexon und IVa2 effizient inhibiert. Auf Grund der gewählten Versuchsanordnungen war es jedoch nicht möglich anhand der Ergebnisse die Silencing-Aktivität der drei siRNAs direkt miteinander zu vergleichen. Dazu wurden in der Folge weitere Transkomplementierungs-Assays durchgeführt sowie Plaque-Assays, in denen die Virusproduktion direkt bestimmt wurde. Gleichzeitig wurde in den Transkomplementierungs-Assays der anti-adenovirale Effekt in Abhängigkeit von der Dosis der siRNAs untersucht. Die siRNAs wurden in verschiedenen Konzentrationen zwischen 1,33 nM und 100 nM eingesetzt bei einer konstanten viralen Dosis von 1 MOI. Dabei hatten siHexon und siIVa2 insgesamt einen deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Luciferase-Expression als siE1A, da die siRNAs gegen die späten Gene auch in den niedrigen Konzentrationen sehr gut wirksam waren. Bereits bei einer Dosierung von 1,33 nM lag die Inhibierungsrate bei über 90 %. Der Effekt von siE1A in der niedrigsten Konzentration von 1,33 nM musste hingegen sogar als nicht signifikant bewertet werden. siHexon und siIVa2 zeigten ein Wirkungsmaximum bei einer Konzentration von 100 nM mit einer Herunterregulation der Luciferase-Expression um 99% im Vergleich zur Negativkontrolle scrambled. Für siE1A konnte die maximale Wirkung von 90% Herunterregulation bei einer Konzentration von 75 nM gemessen werden. Insgesamt konnte im Hochdosisbereich (50 nM - 100 nM siRNA) keine nennenswerte Steigerung der siRNA Wirkung beobachtet werden. Da bereits gezeigt wurde, dass der RNAi-Pathway gesättigt werden kann und dass dieses Phänomen mitunter entscheidend von der siRN-A-Dosis abhängt (Grimm et al., 2010), ist es naheliegend zu vermuten, dass die Proteine, die die RNA-Interferenz vermitteln ab einer siRNA Konzentration von 50 nM voll ausgelastet sind, so dass durch eine Erhöhung der Dosis kein relevanter zusätzlicher inhibitorischer Effekt erzielt werden kann. Demgemäß könnte das Wirkungsmaximum von siE1A, das bei 75 nM liegt und nicht bei der eingesetzten maximalen Konzentration von 100 nM, auch als Artefakt gewertet werten. Ebenso ist vermutlich der auffallend niedrige Luciferase-Expressionswert bei einer Konzentration von 3,33 nM siE1A als Artefakt zu bewerten.

Interessanterweise zeigten die siRNAs gegen Hexon und IVa2 im TKA eine deutlich stärkere Silencing-Aktivität als die siRNA gegen E1A. Dieses Ergebnis konnte auch in den Plaque-Assays, durch die eine direkte Evaluierung der Bildung infektiöser Partikel vorgenommen werden konnte, bestätigt werden. Die siRNAs, siHexon und siIVa2, konnten die Bildung der infektiösen Adenoviruspartikel um 93 % inhibieren und zeigten damit eine stärkere Silencing-Aktivität als die siE1A, durch deren Applikation die Bildung der Viruspartikel nur um 58% inhibiert wer-

den konnte. Ein Ansatz der Plaque-Assays war mit Ad5CMVluc cotransduziert worden, so dass anschließend die Luciferase-Expression bestimmt werden konnte. Die dabei ermittelten Werte konnten das Ergebnis aus dem zugehörigen Plaque-Assay bestätigen. Auch hier war siE1A weniger effizient als siHexon und siIVa2.

Diese Ergebnisse sind umso überraschender in Hinblick auf die Resultate des folgenden Versuchs: Es wurden Luciferase-Reporter-Plasmide konstruiert, in die stromab der Luciferase Sequenz die Zielsequenz der jeweiligen siRNA eingebracht wurde. Nach Applikation der siRNAs wurde dann die Luciferase-Expression bestimmt. Die Inhibierung der Luciferase-Expression kommt dabei durch Bindung der siRNA im Bereich ihrer Zielsequenz und den konsekutiven Abbau des Plasmids im RISC-Komplex zustande. Sowohl bei einer siRNA-Konzentration von 1 nM und 5 nM als auch bei einer Konzentration von 10 nM wurde die Luciferase-Expression durch alle drei siRNAs signifikant, um \geq 90 % inhibiert. Dabei konnten siE1A, siHexon und siIVa2 im Vergleich mit der Negativkontrolle die Luciferase Expression auf ein etwa vergleichbar niedriges Niveau bringen. Die Wirkung der siRNAs konnte folglich als sequenzspezifisch bewertet werden und der inhibitorische Effekt der drei siRNAs auf die komplementäre mRNA als gleich stark.

Es ist jedoch bekannt, dass bereits eine minimale Expression von E1A-13S ausreichend ist, um durch Autoaktivierung eine unkontrollierbare E1A-13s-Expression und somit letzlich auch die virale Replikation zu induzieren (Fechner et al., 2003). Nach Hitt und Graham hat eine Variation des E1A-Expressionniveaus nur einen marginalen Effekt auf die adenovirale Replikation. So führt beispielsweise eine 40-fache Reduktion der E1A Expression nicht zu einer nennenswerten Inhibierung der Virusreplikation (Hitt und Graham, 1990). Vor diesem Hintergrund ist es naheliegend zu vermuten, dass höhere Dosierungen der anti-E1A siRNA erforderlich sind, um die Expression von E1A auf ein Niveau zu senken, dass eine vergleichbare Inhibierung der viralen Replikation bedingt wie sie in unseren Versuchen durch siHexon und siIVa2 bewirkt wurde. Es bleibt dabei zu bedenken, dass für eine mögliche Anwendung in vivo das effektive Silencing bei geringer siRNA-Konzentration von entscheidendem Vorteil ist, da durch den Einsatz niedriger siRNA Dosierungen das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen durch Blockade des RNAi-Signaltransduktionsweges im Rahmen einer therapeutischen Intervention reduziert werden kann. Die RNA-Interferenz Maschinerie wird im Säugetierorganismus ebenso von den endogenen miRNAs benutzt, die der Genregulation dienen, folglich sind vielfache verheerende Auswirkungen einer Sättigung des Pathways denkbar (Grimm et al., 2006; Grimm et al., 2010).

4.5 Additive Effekte der anti-adenoviralen siRNAs

In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kombination von siRNAs, die gegen verschiedene Gene oder gegen verschiedene Angriffspunkte auf einem Gen gerichtet sind, zu einer Potenzierung der antiviralen Effekte führt (Sun et al., 2007; Xin et al., 2008; Fulton et al., 2009). Vor allem um dem Problem der Entstehung viraler Escape Mutanten zu begegnen, hat sich der Einsatz von Kombinationen von siRNAs bzw. shRNAs (siRNAs mit kurzer Haarnadelstruktur) als effizient erwiesen (Schubert et al., 2005; Li et al., 2005; ter Brake et al., 2006). Da die Mutationsrate der Adenoviren relativ gering ist, verfolgt eine Kombinationsstrategie hier viel mehr das Ziel die durch die RNAi vermittelte antivirale Wirkung durch den gleichzeitigen Angriff multipler Ziele innerhalb des adenoviralen Replikationszyklus zu potenzieren.

In einem Transkomplementierungs-Assay wurde die Wirksamkeit einer kombinierten Anwendung der siRNAs vergleichend mit der Applikation der siRNAs als Einzelkomponenten untersucht. Dabei wurden die siRNAs immer in einer Gesamtkonzentration von 10 nM eingesetzt. Das heißt bei Kombination aller drei siRNAs hatte jede eine Konzentration von 3,33 nM. Wurden zwei siRNAs miteinander kombiniert, wurde jede ebenfalls in einer Konzentration von 3,33 nM eingesetzt und die restlichen 3,33 nM mit scrambled siRNA aufgefüllt. Die einzelnen siRN-As wurden auch in einer Konzentration von 3,33 nM eingesetzt und der Ansatz mit 6,66 nM scrambled siRNA auf 10 nM aufgefüllt (siehe auch Tab. 3.1). Bei einer Virusdosis von 1 MOI wurde die Luciferase-Expression bestimmt.

Wie in den vorangegangenen TKAs und den Plaque-Assays hatten im Vergleich der einzelnen siRNAs auch hier siHexon und siIVa2 eine deutlich höhere Silencing-Aktivität als siE1A. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich der anti-adenovirale Effekt durch Kombination von siIVa2 und siHexon verstärkt. Ebenso führte auch die Kombination aller drei siRNAs zu einer Verstärkung der inhibitorischen Aktivität im Vergleich mit den einzeln applizierten siRNAs siIVA2 und siHexon. Die Kombinationen von siE1A mit siHexon oder siIVa2 zeigten jedoch keine erhöhte Silencing-Aktivität gegenüber der Anwendung von siHexon oder siIVa2 alleine.

In einigen Untersuchungen (Koller et al., 2006, Castanotto et al., 2007, McManus et al., 2002) konnte gezeigt werden, dass bei bei Kombination einer aktiven siRNA mit einer weniger aktiven siRNA die aktivere siRNA bevorzugt in den RISC-Komplex inkorporieret wird und in der Folge der Effekt der inaktiveren siRNA supprimiert wird. Eine mögliche These ist daher, dass die Kombinationen aus der weniger effizienten siE1A und den sehr effizienten siRNAs siHexon und

siIVa2 keine potenzierte Silencing-Aktivität aufwiesen, da die inaktivere siE1A aus dem RISC-Komplex verdrängt wurde und somit ihre Wirkung nicht entfalten konnte. Diese Kombinationen zeigten dann die gleiche Effizienz wie siIVa2 oder siHexon als Einzelkomponenten. Einzig die Kombination von siHexon und siIVa2 bzw. von allen drei siRNA demonstrierte einen verstärkten inhibitorischen Effekt, wobei möglicherweise die siE1A bei dem Dreifachansatz nach dem beschriebenen Mechanismus keine Wirkung entfalten konnte und der Effekt auf die Aktivität von siIVa2 und siHexon zurückzuführen war. Dies wäre in Einklang mit unseren Daten, die für beide Ansätze eine vergleichbar hohe Silencing-Aktivität zeigten. Zudem waren in beiden Kombination, siHexon/siIVa2 und siE1A/siIVa2/siHexon, siIVa2 und siHexon in der gleichen Dosis vorhanden. Demgegenüber steht, dass die drei siRNAs in unseren Untersuchungen unabhängig von der viralen Replikation eine vergleichbar gute Silencing-Aktivität zeigten (Pkt. 3.1.5), so dass die geringere Effektivität der siE1A und ihrer Kombinationen möglicherweise entsprechend der Hypothese von Hitt und Graham auf die marginalen Auswirkungen eines veränderten E1A-Expressionsniveaus auf die adenovirale Replikation zurückzuführen ist.

Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es allein durch die Kombination von zwei siRNAs möglich zu sein scheint eine Verstärkung der Silencing-Aktivität zu erreichen.

Jedoch war das durchgeführte TKA so aufgebaut, dass in den Ansätzen mit den kombinierten siRNAs die Dosis spezifischer siRNA insgesamt höher war und somit die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die beobachtete verstärkte Silencing-Aktivität der Ansätze, die eine Kombination aus siHexon und siIVa2 enthielten, auf einer Erhöhung der Gesamtdosis der sequenzspezifischen siRNAs beruhte. Dass eine Dosissteigerung der siRNAs eine Wirkungssteigerung bedingen kann, wurde bereits an mehreren Beispielen gezeigt (Kang et al., 2010; Aquino et al., 2009,). Auch in Bezug auf das Adenovirus wurde bereits von Chung et al. mittels Plaque-Assays gezeigt, dass eine höhere Dosis der eingesetzten siRNAs eine signifikant stärkere Reduktion der Plaquebildung bewirkt (Chung et al., 2007). Auf der anderen Seite gibt es jedoch auch Untersuchungen, in denen die Erhöhung der siRNA Dosis nicht zu einer Erhöhung der Silencing-Aktivität führte, sondern diese gleichblieb oder sich sogar verschlechterte (Kneidinger et al, 2012; Fulton et al., 2009). Tatsächlich scheint es so zu sein, dass die optimale Dosierung der siRNAs und die Effektivität von kombinierten Ansätzen stark von den Eigenschaften der verwendeten siRNAs und von Sequenz und Struktur der Zielsequenz abhängen. Welche Faktoren auf welche Weise Einfluss nehmen scheint dabei noch weitgehend unbekannt zu sein.

Um die Wirkung der siRNAs außerhalb der bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich verwendeten HeLa Zellen zu evaluieren, wurde das Transkomplementierungs-Assay unter gleichen Bedingungen zusätzlich in EA.hy926 Zellen durchgeführt. Es zeigten sich weitgehend konkordante Ergebnisse, so dass eine antivirale Aktivität der siRNAs, die unabhängig von bestimmten für die HeLa Zellen spezifischen Eigenschaften besteht, angenommen werden kann.

Die sehr effizient wirksame Kombination aus siHexon und siIVa2 wurde in einem weiteren Transkomplementierungs-Assay auf ihre Wirkung in Abhängigkeit von der adenoviralen Dosis untersucht. Bei einer viralen Dosis von 0,1 und 1 MOI zeigte die siRNA Kombination die stärkste inhibitorische Wirkung mit einer Herunterregulation der Luciferase-Expression um 99%. Bei einer Virusdosis von 5 MOI lag die Inhibierungsrate ebenfalls bei über 90% und bei einer MOI von 10 bei 66%. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, dass eine gesteigerte Viruslast die Wirkung der siRNAs abschwächt. Bei der Betrachtung der Daten fällt weiterhin auf, dass sich die gemessenen Expressionswerte für die non-silencing siRNA bei einer Dosis von 5 MOI und 10 MOI nicht signifikant unterscheiden. Es wurden für diese Probe sehr hohe Expressionswerte gemessen. In diesem Bereich ist es möglich, dass sich die gemessenen Luciferase-Expressionswerte nicht mehr proportional verhalten und die Kurve einen asymptotischen Verlauf nimmt.

Auf Grund der gewonnenen Ergebnisse wurde die folgenden Experimente bei einer Viruskonzentration von 10 MOI durchgeführt, da die siRNAs die virale Replikation in diesem Bereich weniger effizient inhibierten und somit eine differenziertere Aussage über die Unterschiede in Bezug auf den anti-adenoviralen Effekt erwartet werden konnte.

4.6 Synergistische Effekte der siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon in Bezug auf die Inhibierung der adenoviralen Replikation und in Bezug auf den zytopathischen Effekt

Die Produkte der E1A-Region schaffen in der zellulären Umgebung die optimalen Bedingungen für die adenovirale Replikation, gleichzeitig aktivieren sie die Transkription aller nachfolgenden Transkriptionseinheiten (Russell, 2000; Shenk, 2001). Damit besitzen die E1A-Proteine direkten Einfluss auf die Expression der nachgeschalteten Proteine IVa2 und Hexon. IVa2 wiederum fungiert als Aktivator des MLP, der die Transkription der späten Gene, zu denen auch das Hexon zählt, reguliert (Tribouley et al., 1994; Lutz und Kedinger, 1996; Shenk, 2001). Vor diesem Hintergrund ist es naheliegend anzunehmen, dass die kombinierte Anwendung von siE1A, siIVa2 und siHexon, die Wirkung der jeweils einzelnen siRNA potenziert, da die Funktionen ihrer Zielstrukturen auf die eingangs dargestellte Weise voneinander abhängen. Additive Effekte konnten jedoch nicht generell, sondern nur bei Kombination bestimmter siRNAs nachgewiesen werden.

Um zu evaluieren inwieweit die siRNAs gegen E1A, IVa2 und Hexon synergistisch wirken und um eine Dosisabhängigkeit der Effekte auszuschließen, wurden daher im Folgenden die Versuchsbedingungen des vorangegangenen TKAs entsprechend modifiziert und erneut TKAs durchgeführt. Im Gegensatz zu der vorangegangenen Untersuchung wurden die Konzentrationen der siRNAs in den Proben daher so gewählt, dass stets eine konstante Gesamtmenge spezifischer siRNA in jeder Probe vorlag (s. Tab. 3.2). Drei verschiedene Gesamtkonzentrationen wurden dabei evaluiert: 0,5 nM; 1 nM; 75 nM. Eine Konzentration von 75 nM wurde gewählt, weil in vorangegangenen Versuchen alle siRNAs, auch siE1A, in diesem Dosisbereich eine optimale Wirkung zeigen konnten. Zwei niedrige Dosierungen von 0,5 nM und 1 nM wurden verwendet, da bereits zuvor Fulton et al. zeigen konnten, dass die von ihnen untersuchten siRNAs den stärksten synergistischen Effekt im Niedrigdosisbereich aufwiesen (Fulton et al., 2009). Um ein möglichst differenziertes Ergebnis zu erhalten, wurde eine virale Dosis von 10 MOI eingesetzt.

Aus den Ergebnissen der Transkomplementierungs-Assays ließ sich bei keiner der verwendeten siRNA-Konzentrationen ein gesteigerter inhibitorischer Effekt im Vergleich mit den einzeln applizierten siRNAs ableiten. Bei gleicher Gesamtkonzentration an sequenzspezifischen siRNAs bewirkte auch eine Kombination von siHexon und siIVa2 keine stärkere Reduktion der Luciferase-Expression als die jeweilige siRNA alleine. In Bezug auf die unter Pkt. 3.3.2 untersuchte Abhängigkeit der siRNA Wirkung von der viralen Dosis konnte gezeigt werden, dass mit einer hohen siRNAs Dosis von 75 nM auch bei einer adenoviralen Konzentration von 10 MOI die virale Replikation effizient inhibitert werden kann. Wie in den vorangegangenen Experimenten zeigte siE1A die schwächste inhibitorische Wirkung unter allen Proben.

In verschiedenen Untersuchungen konnten Kombinationen von siRNAs bzw. shRNAs bereits erfolgreich beispielsweise gegen Enteroviren, Hepatitis B Viren und auch HIV eingesetzt werden (ter Brake et al., 2006; Merl und Wessely, 2007; Sun et al., 2007). Auf der anderen Seite gibt es jedoch Studien, in denen durch Kombination verschiedener siRNAs keine Verstärkung des antiviralen Effekts erreicht werden konnte (Ahn et al., 2005; Rothe et al., 2010). Dies scheint vor allem dadurch bedingt zu sein, dass wie unter Pkt. 4.5 bereits dargestellt die Kapazität der Enzyme des RNAi-Pathways, darunter vor allem des RISC-Komplex limitiert zu sein scheint und es somit zwischen den synthetisch eingebrachten siRNAs zur kompetitiven Hemmung kommt (Castanotto et al., 2007; Koller et al., 2006). Dabei scheint die Fähigkeit einer siRNA mit einer anderen siRNA in Konkurrenz zu treten in Zusammenhang mit ihrer Silencing-Effektivität zu stehen. Wobei die Korrelation auch nicht absolut zu sein scheint, da Abweichungen bereits beschrieben wurden (Koller et al., 2006). Inwieweit die kompetitive Hemmung jedoch beispiels-

weise durch Faktoren wie die siRNA Dosis beeinflussbar oder gar überwindbar ist, ist hingegen ungeklärt. Möglicherweise könnte also durch Optimierung der Bedingungen für die meisten Viren ein verstärktes Silencing durch Kombination von verschiedenen siRNAs erreicht werden. Für siHexon, siIVa2 und siE1A konnten zunächst keine synergistischen Effekte in Bezug auf die Inhibierung der adenoviralen Replikation gefunden werden. Dass eine Kombination verschiedener anti-adenoviraler siRNAs im Vergleich mit den Einzelkomponenten nicht zu einer verstärkten Silencing-Aktivität führt, konnte auch von Kneidinger et al. in ähnlicher Weise bestätigt werden (Kneidinger et al., 2012). In Bezug auf die von uns zunächst gefundene Verstärkung des inhibitorischen Effekts durch Kombination von siHexon und siIVa2 (Pkt. 4.5 bzw. 3.3.1), muss davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei wie vermutet um ein dosisabhängiges Phänomen handelte.

In starkem Gegensatz dazu steht der durch Kombinationen aus siRNAs gegen E1A und gegen mindestens eines der späten Gene, Hexon oder IVa2, hervorgerufene deutlich überlegene inhibitorische Effekt auf die durch Adenoviren induzierte Zelllyse.

Die Produkte der E1A Region können durch Interaktion mit den zellulären Faktoren der p300/CBP Familie die Apoptose der Wirtszelle induzieren (Russell, 2000). Die Herrunterregulation des E1A durch die siE1A unterdrückt den proapoptotischen Effekt und führt dadurch zu einem verbesserten Überleben der inifizierten Zellen. Die Applikation von siE1A alleine führte jedoch nicht zu einer Inhibierung der Adenovirus vermittelten Zelllyse. Dies könnte unter anderem damit zusammenhängen, dass die für unsere Untersuchungen verwendete Adenovirus-Mutante nicht die anti-apoptotisch wirkenden E1B-Gene trägt, was den durch siE1A hervorgerufen anti-apoptotischen Effekt möglicherweise abschwächte (Kneidinger et al., 2012). Des Weiteren könnte die Hemmung der viralen Replikation durch E1A alleine nicht ausreichend sein, um die Vermehrung der Adenoviren dahingehend zu inhibieren, dass die apoptosehemmende Wirkung der siE1A zu einem sichtbaren Effekt führte.

Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass siHexon und siIVa2 die adenovirale Replikation effizienter inhibieren als siE1A. Dennoch war die Inhibierung der adenoviralen Replikation nicht ausreichend, um einen zytoprotektiven Effekt zu bewirken, so dass auch die mit siHexon bzw. siIVa2 behandelten Proben vollständig lysiert wurden. Erst die Kombination der apoptosehemmenden Wirkung von siE1A und der Hemmung der viralen Replikation durch siIVa2 bzw. siHexon führte zur Inhibierung der Adenovirus vermittelten Zelllyse und dem sichtbaren zytoprotektiven Effekt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die siRNAs nicht synergistisch wirkten in Bezug auf die Inhibierung der adenoviralen Replikation. Bei der Betrachtung des zytopathischen Effekts hingegen zeigten sich synergistische Effekte der siRNA gegen siE1A und der siRNAs gegen die späten Gene siHexon bzw. siIVa2. Aus den Daten lässt sich des Weiteren ableiten, dass das Ausmaß mit dem die adenovirale Replikation inhibiert werden kann, nicht zwingend mit dem durch die Adenoviren verursachten zytopathischen Effekt korreliert. Insgesamt kann durch Ko-Inhibierung der frühen und späten Gene ein verstärkter anti-adenoviraler Effekt erreicht werden. Für eine mögliche therapeutische Anwendung der siRNAs könnte eine Kombination von siE1A mit siHexon bzw. siIVa2 oder auch eine Kombination aus allen drei siRNAs vorteilhaft sein, da auf diese Weise die Adenovirus vermittelte Zelllyse, die das Korrelat der Gewebeschädigung darstellt, erfolgreich inhibiert werden könnte.

4.7 Ausblick

In einem nächsten Schritt muss der anti-adenovirale Effekt der siRNAs in vivo überprüft werden. Um den Transport in das Zielorgan sowie die kontinuierliche Expression der siRNAs zu ermöglichen, wäre die Verwendung eines viralen Vektorsystems von Vorteil, durch das die siRNAs in der Zelle stabil exprimiert werden könnten. Eine Hauptschwierigkeit besteht dabei in der Suche nach effizienten, nicht toxischen Transportsystemen, die einen spezifischen Gewebetropismus aufweisen. Eine weitere entscheidende Frage, die es zu beantworten gilt, ist die nach unerwünschten Nebenwirkungen. Es ist beispielsweise bekannt, dass durch bestimmte Leitmotive innerhalb der siRNA Sequenz eine Interferonantwort und gleichermaßen die Produktion proinflammatorischer Zytokine induziert werden kann (Doyle et al., 2004; Takeda und Akira, 2005; Hornung et al., 2005; Judge et al., 2006). Darüber hinaus wurden off-target Effekte durch siRN-As beschrieben (Brimingham et al., 2006; Anderson et al., 2008) sowie die Störung der endogenen miRNA vermittelten Gen-Regulation durch Blockierung des zellulären RNAi Signalweges (Doench et al., 2003). Das unvollständige Ausschalten des Zielgens, der Knockdown, könnte durch Kombination mit alternativen antiviralen Strategien wie beispielsweise der Applikation löslicher Rezeptoren und pharmakologisch aktiver Substanzen überwunden werden. Um alle diese Hürden zu nehmen, gibt es bereits vielversprechende Ansätze, die sich in der kontinuierlichen Weiterentwicklung befinden. Dazu gehören beispielsweise die mannigfaltigen Möglichkeiten der chemischen Modifikation sowie die Herbeiführung einer möglichst exakten Basenpaarung mit der Ziel-mRNA durch optimales Design der siRNAs.

Literatur

- **Ahn J**, Jun ES, Lee HS, et al. A small interfering RNA targeting coxsackieviurs B3 protects permissive HeLa cells from viral challenge. J Virol 2005;79:8620-8624.
- Amado RG, Mitsuyasu RT, Rosenblatt JD, et al. Anti-Human Immunodeficiency Virus Hematopoietic Progenitor Cell-Delivered Ribozyme in a Phase I Study: Myeloid and Lymphoid Reconstitution in Human Immunodeficiency Virus Type-1-Infected Patients. Human Gene Therapy 2004; 15:251-262.
- **Amstutz B**, Gastaldelli M, Kälin S. Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. EMBO J 2008;27:956-969.
- Anderson EM, Birmingham A, Baskerville S, et al. Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. RNA 2008;14:853-861.
- Anderson J, Akkina R. Complete knockdown of CCR5 by lentiviral vector-expressed siRNAs and protection of transgenic macrophages against HIV-1 infection. Gene Ther 2007;14:1287-1297.
- Aquino JB, Lallemend F, Marmigère F, Adameyko II, Golemis EA, Ernforns. The retinoic acid inducible Cas-family signaling protein Nedd9 regulates neural crest cell migration by modulating adhesion and actin dynamics. Neuroscience 2009;162:1106-1119.
- Arav-Boger R, Echavarria M, Forman M, Charache P, Persaud D. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. Pediatr Infect Dis J 2000,19:1097-1100.
- Arnberg N, Edlund K, Kidd AH, Wadell G. Adenovirus Type 37 Uses Sialic Acid as a Cellular Receptor. J Virol 2000;74:42-48.
- Bayo-Puxan N, Cascallo M, Gros A, Huch M, Fillat C, Alemany R. Role of the putative heparan sulfate glycosaminoglycan-binding site of the adenovirus type 5 fiber shaft on liver detargeting and knob-meidated retargeting. J Gen Virol 2006;87:2487-2495.
- **Baysuk E**, Suavet F, Doglio A, Bordonné R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. Nucleic Aci Res 2003;31:6593-6597.
- **Behlke MA**. Chemical Modification of siRNA for *In Vivo* Use. Oligonucleotides 2008;18:305-320.

- **Bennett EM**, Bennink JR, Yewdell JW, Brodsky FM. Cutting Edge: Adenovirus E19 Has Two Mechanisms for Affecting Class I MHC Expression. J Immunol 1999;162:5049-5052.
- **Bergelson JM**, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. Science 1997;275:1320-1323.
- **Bernstein E**, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 2001;409:363-366.
- **Biederer C**, Ries S, Brandts CH, McCormick F. Replication-selective viruses for cancer therapy. Journal of Molecular Medicine 2002;80:163-175.
- **Birmingham A**, Anderson EM, Reynolds A, et al. 3^c UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. Nature Methods 2006;3:199-204.
- Blanchette P, Kindsmüller K, Groitl P, et al. Control of mRNA Export by Adenovirus E4orf6 and E1B55K Proteins during Productive Infection Requires E4orf6 Ubiquitin Ligase Acitivity. J Virol 2008;82:2642-2651.
- **Bohnsack MT**, Czaplinski K, Görlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA 2004;10:185-191.
- **Bordigoni P**, Carret A-S, Venard V, Witz F, Le Faou A. Treatment of Adenovirus Infections in Patients Undergoing Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Clinical Infectious Diseases 2001;32:1290-1297.
- **Bowles NE**, Ni J, Kearney DL, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction: evidence of adenoviruses as a common cause of myocarditis in children and adults. Journal of the American College of Cardiology 2003;42:466-472.
- **Bremner KH**, Scherer J, Yi J, Vershinin M, Gross SP, Vallee RB. Adenovirus Transport via Direct Interaction of Cytoplasmic Dynein with the Viral Capsid Hexon Subunit. Cell Host & Microbe 2009;6:523-535.
- **Brennecke J**, Stark A, Russell RB, Cohe SM. Principles of MicroRNA-Target Recognition. PLoS Biol 2005;3:e85.
- **Brown KM**, Chu C-Y, Rana TM. Target accessibility dictates the potency of human RISC. Nat Struct Mol Biol 2005;12:469-470.

- **Burgert HG**, Maryanski JL, Kvist S. "E3/19K" protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:1356-1360.
- **Burnett JC**, Rossi JJ, Tiemann K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. Biotechnol J 2011;6:1130-1146.
- **Carmell MA**, Xuan Z, Zhang MQ, et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. Genes Dev 2002;16:2733-2742.
- **Carter BA**, Karpen SJ, Quiros-Tejeira RE, et al. Intravenous Cidofovir therapy for disseminated adenovirus in a pediatric liver transplant recipient. Transplantation 2002;74:1050-1052.
- **Castanotto D**, Sakurai K, Lingemann R, et al. Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. Nucleic Acids Res 2007;35:5154-5164.
- **Cerone MA**, Burgess DJ, Naceur-Lombardelli C, Lord CJ, Ashworth A. High-Throughput RNAi Screening Reveals Novel Regulators of Telomerase. Cancer Research 2011;71:3328-3340.
- **Chatterjee PK**, Vayda ME, Flint SJ. Identification of proteins and protein domains that contact DNA within adenovirus nucleoprotein cores by ultraviolet light crosslinking of oligonucleotides ³²P-labelled *in vivo*. Journal of Molecular Biology 1986;188:23-37.
- **Chen PY**, Weinmann L, Gaidatzis D, et al. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. RNA 2008;14:263-274.
- **Chevalier C**, Saulnier A, Benureau Y, et al. Inhibition of Hepatitis C Virus Infection in Cell Culture by Small Interfering RNAs. Mol Ther 2007;15:1452-1462.
- **Chung Y-S**, Kim M-K, Lee W-J, Kang C. Silencing E1A mRNA by RNA interference inhibits adenovirus replication. Arch Virol 2007;152:1305-1314.
- **Clark EA**, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science 1995;268:233-239.
- **Clarke AR**, Purdie CA, Harrison DJ, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. Nature1993;362:849-852.

- Clemens MJ. PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. Int J Biochem Cell Biol 1997;29:945-949.
- **Davis E**, Caiment F, Tordoir X, et al. RNAi-Mediated Allelic *trans*-Interaction at the Imprinted *Rtl1/Peg11* Locus. Current Biology 2005;15:743-749.
- **Davison AJ**, Benko M, Harrach B. Genetic Content and Evolution of Adenoviruses. J Gen Virol 2003;84:2895-2908.
- **de Jong RN**, van der Vliet PC. Mechanisms of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. Gene 1999;236:1-12.
- **de Mezer M**, Wojciechowska M, Napierala M, Sobczak K, Krzyzosiak J. Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference. Nucleic Acids Research 2011:1-12.
- **Dechecchi MC**, Melotti P, Bonizzato A, Santacatterina M, Chilosi M, Cabrini G. Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. J Virol 2001;75:8772-8780.
- **DeVincenzo J**, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, et al. A randomized, double-blind, placebocontrolled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107:8800-8805.
- **Doench JG**, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. Genes Dev 2003;17:438-442.
- **Doronin K**, Kuppuswamy M, Toth K, et al. Tissue-Specific, Tumor-Selective, Replication-Competent Adenovirus Vector for Cancer Gene Therapy. J Virol 2001;75:3314-3324.
- **Dorsett Y**, Tuschl T. siRNAs: Applications in Functional Genomics and Potential as Therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery 2004;3:318-329.
- **Dowler T**, Bergeron D, Tedeschi A-L, Paquet L, Ferrari N, Damha MJ. Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinonucleic acid (FANA). Nucleic Ac-ids Research 2006;34:1669-1675.
- **Doyle SE**, Vaidya SA, O'Connell R, et al. IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Porgram. Immunity 2002;17:251-263.
- **Dropulic LK**, Cohen JI. Update on New Antivirals Under Development for the Treatment of Double-Stranded DNA Virus Infections. Clin Pharmacol Ther 2010;88:610-619.

- **Du T**, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Development 2005;132:4645-4652.
- **Elbashir SM**, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001c; 411:494-498.
- **Elbashir SM**, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. Methods 2002;26:199-213.
- **Elbashir SM**, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev 2001a;15:188-200.
- **Elbashir SM**, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* emryo lysate. EMBO J 2001b;20:6877-6888.
- **Ewing SG**, Byrd SA, Christensen JB, Tyler RE, Imperiale MJ. Ternary Complex Formation on the Adenovirus Packaging Sequence by the IVa2 and L4 22-Kilodalton Proteins. J Virol 2007;81:12450-12457.
- **Fechner H**, Haack A, Wang H, et al. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphavintegrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. Gene Ther 1999;6:1520-1535.
- **Fechner H**, Pinkert S, Wang X, et al. Coxsackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited by vector-mediated RNA interfernce targeting their common receptor. Gene Ther 2007;14:960-971.
- **Fechner H**, Suckau L, Kurreck J, et al. Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban. Gene Ther 2007;14:211-218.
- **Fechner H**, Wang X, Srour M, et al. A novel tetracycline-controlled transactivatortransrepressor system enables external control of oncolytic adenovirus replication. Gene Ther 2003;10:1680-1690.
- **Fechner H**, Wang X, Wang H. Trans-complementation of vector replication versus Coxsackieadenovirus-receptor overexpression to improve transgene expression in poorly permissive cancer cells. Gene Ther 2000;7:1954-1968.

- **Filipowicz W**, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs:are the answers in sight?. Nature Rewiews Genetics 2008;9:102-114.
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998;391:806-811.
- **Firma Life Technologies Invitrogen** on Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent. Darmstadt, Germany: Life Technologies GmbH, 2012. (Accessed April 11, 2012, at <u>http://products.invitrogen.com/ivgn/product/11668019</u>).
- Firma Qiagen on AllStars Negative Control siRNA. Hilden, Germany: Qiagen, 2012a. (Accessed April 24, 2012, at http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Assay-Technologies/RNAi/AllStars-Negative-Control-siRNA#orderinginformation).
- Firma Qiagen on HiPerFect Transfection Reagent. Hilden, Germany: Qiagen, 2012b. (Accessed April 12, 2012, at http://www.qiagen.com/Products/Catalolg/Assay-Technologies/ Transfection-Reagents/HiPerFect-Transfection-Reagent#orderinginformation)
- Flint J, Shenk T. Adenovirus E1A protein paradigm viral transactivator. Annu Rev Genet 1989; 23:141-161.
- **Flomenberg P**, Babbitt J, Drobyski WR, et al. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. J Infect Dis 1994;169:775-781.
- **Fulton A**, Peters ST, Perkins GA, et al. Effective treatment of respiratory alphaherpersvirus infection using RNA interference. PLoS One 2009;4:e4118.
- **Ge Q**, McManus MT, Nguyen T, et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. Proc Natl Acad Sic USA 2003;100:2718-2723.
- **Geisler A**, Jungmann A, Kurreck J, et al. microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. Gene Ther 2011;18:199-209.
- **Greber UF**, Willetts M, Webster P, Helenius A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. Cell 1993;75:477-486.
- **Gredell JA**, Berger AK, Walton SP. Impact of target mRNA structure on siRNA silencing efficiency: A large-scale study. Biotechnol Bioeng 2008:100:744-755.

- **Grimm D**, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. Nature 2006;441:537-541.
- **Grimm D**, Wang L, Lee JS, et al. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. J Clin Invest 2010;120:3106-3119.
- **Gustin KE**, Imperiale MJ. Encapsidation of viral DNA requires the adenovirus L1 52/55kilodalton protein. J Virol 1998;72:7860-7870.
- **Gustin KE**, Lutz P, Imperiale MJ. Interaction of the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein with the IVa2 gene product during infection. J Virol 1996;70:6463-6467.
- Hale GA, Heslop HE, Krance RA. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. Bone Marroy Transplantation 1999;23:277-282.
- Hall K, Blair Zajdel ME, Blair GE. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. Biochem. J 2010;431:321-336.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature 2000;404:293-296.
- Harada JN, Shevchenko A, Schevchenko A, Pallas DC, Berk AJ. Analysis of the Adenovirus E1B-55K-Anchored Proteome Reveals Its Link to Ubiquitination Machinery. J Virol 2002;76:9194-9206.
- **Heise C**, Hermiston T, Johnson L, et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. Nat Med 2000;6:1134-1139.
- Hierholzer JC. Adenoviruses in the Immunocompromised Host. Clin Microbiol Rev 1992; 5:262-274.
- **Hindley CE**, Lawrence FJ, Matthews DA. A Role for Transportin in the Nuclear Import of Adenovirus Core Proteins and DNA. Traffic 2007;8:1313-1322.
- Hitt MM, Graham FL. Adenovirus E1A under the control of heterologous promoters: wide variation in E1A expression levels has little effect on virus replication. Virology 1990;179:667-678.
- Hoffman JA, Shah AJ, Ross LA, Kapoor N. Adenoviral Infections and a Prospective Trial of Cidofovir in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biology of Blood an Marrow Transplantation 2001;7:388-394.

- Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. Nucleic Acids Research 2002;30:1757-1766.
- Horne RW, Bonner S, Waterson AP, Wildly P. The icosahedral form of an adenovirus. J Mol Biol 1959;1:84-86.
- Hornung V, Guenthner-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. Nat Med 2005;11:263-270.
- **Hough R**, Chetwood A, Sinfield R, Welch J, Vora A. Fatal Adenovirus Hepatitis During Standard Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Journal of Pediatric Hematology/Oncology 2005;27:67-72.
- **Huesken D**, Lange J, Mickanin C, et al. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. Nature Biotechnology 2005;23:995-1001.
- Jackson AL, Burchard J, Schelter J, et al. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. RNA 2006;12:1179-1187.
- Janoff EN, Smith PD. Perspectives on gastrointestinal infections in AIDS. Gastroenerol Clin North Am 1988;17:451-463.
- Jiang H, White EJ, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Adenovirus's last: You say lysis, we say autophagy. Autophagy 2008;4:118-120.
- Johnson PR, Yin JA, Morris DJ, Desai M, Cinkotai KI, McKeogh MM. Fulminant hepatic necrosis caused by adenovirus type 5 following bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1990;5:345-347.
- Jones MS, Harrach B, Ganac RD et al. New Adenovirus Species Found in a Patient Presentin with Gastroenteritis. J Virol 2007;81:5978-5984.
- **Judge AD**, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. Nature Biotechnology 2005;23:457-462.
- Kaiser PK, Symons A, Shah SM, et al. RNAi-Based Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration by Sirna-027. American Journal of Ophthalmology 2010;150:33-39.e2.

- Kälin S, Amstutz B, Gastaldelli M. Macropinocytotic Uptake and Infection of Human Epithelial Cells with Species B2 Adenovirus Type 35. J Virol 2010;84:5336-5350.
- Kang SG, Roh YM, Kang ML, Kim YS, Yoo HS. Mouse neuronal cells expressing exogenous bovine PRNP and simultaneous downregulation of endogenous mouse PRNP using siR-NAs. Prion 2010;4:32-37.
- **Kao CC**, Yew PR, Berk AJ. Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. Virology 1990;179:806-814.
- **Kastan MB**, Zhan Q, El-Deiry WS, et al. A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and *GADD45* Is Defective in Ataxia-Telangiectasia. Cell 1992;71:587-597.
- Katze MG, He Y, Gale Jr M. Viruses and Interferon: A Fight for Supremacy. Nature Reviews Immunology 2002;2:675-687.
- Kaur B, Gottardo NG, Keil AD, Hallam LA, Baker DL. A Rare Case of Adenoviral Fulminant Hepatic Necrosis After Chemotherapy. Pediatric Hematology-Oncology 2002;19:361-371.
- **Khvorova A**, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell 2003;115:209-216.
- **Kidd AH**, Chroboczek J, Cusack S, Rugirok RWH. Adenovirus Type 40 Virions Contain Two Distinct Fibers. Virology 1993;192:73-84.
- **Kleinman ME**, Yamada K, Takeda A, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. Nature 2008;452:591-597.
- Kneidinger D, Ibrisimovic M, Lion T, Klein R. Inhibition of adenovirus multiplication by short interfering RNAs directly or indirectly targeting the viral DNA replication machinery. Antiviral Res 2012;94:195-207.
- Kohn DB, Bauer G, Rice CR, et al. A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a revresponsive element decoy gene into CD34(+) cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children. Blood 1999;94:368-371.
- **Koller E**, Propp S, Murray H, et al. Competition for RISC binding predicts in vitro potency of siRNA. Nucleic Acids Res 2006;34:4467-4476.

- Krilov LR, Rubin LG, Frogel M, et al. Disseminated adenovirus infection with hepatic necrosis in patients with human immunodeficiency virus infection and other immunodeficiency. Rev Infect Dis 1990;12:303-307.
- Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. High Prevalence of Viral Genomes and Multiple Viral Infections in the Myocardium of Adults With "Idiopathic" Left Ventricular Dysfunction. Circulation 2005;111:887-893.
- **Kurreck J.** RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications. Angewandte Chemie Internationale Edition 2009;48:1378-1398.
- **Kurreck J.** siRNA efficiency: structure or sequence-that is the question. J Biomed Biotechnol 2006;2006:1-7.
- Lader E, Scanlan E, Hädrich B. siRNA-Design: Voraussetzung für effiziente Gen-Inaktivierung. Laborwelt 2006;7:22-23.
- Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative posttranscriptional regulation. Nature Genetics 2002;30:363-364.
- Lane DP. p53, guardian of the genome. Nature 1992;358:15-16.
- Lee HS, Ahn J, Jee Y, et al. Universal and mutation-resistant anti-enteroviral activity: potency of small interfering RNA complementary to the conserved *cis*-acting replication element within the enterovirus coding region. J Gen Virol 2007;88:2003-2012.
- Lee TWR, Lawrence FJ, Dauksaite V, Akusjärvi G, Blair GE, Matthews DA. Precursor of human adenovirus core polypeptide Mu targets the nucleolus and modulates the expression of E2 proteins. J Gen Virol 2004;85:185-196.
- Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 2003;425:415-419.
- Leopold PL, Kreitzer G, Miyazawa N. Dynein- and Microtubule-Mediated Translocation of Adenovirus Serotype 5 Occurs after Endosomal Lysis. Human Gene Therapy 2000;11:151-165.
- **Lewis BP**, Burge CB, Bartel DP. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. Cell 2005;120:15-20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. Cell 2003;115:787-798.

- Li E, Stupack D, Bokock GM, Nemerow GR. Adenovirus Endocytosis Requires Action Cytoskeleton Reorganization Mediated by Rho Family GTPases. J Virol 1998;72:8806-8812.
- Li M-J, Kim J, Li S, et al. Long-Term Inhibition of HIV-1 Infection in Primary Hematopoietic Cells by Lentiviral Vector Delivery of a Triple Combination of Anti-HIV shRNA, Anti-CCR5 Ribozyme, and a Nucleolar-Localizing TAR Decoy. Mol Ther 2005;12:900-909.
- **Lingel A**, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. Nat Struct Mol Biol 2004;11:576-577.
- **Ljungman P**, Gleaves CA, Meyers JD. Respiratory virus infection in immunocompromised patients. Bone Marrow Transplant 1989;4:35-40.
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of *Scarecrow-like* mRNA Targets Directed by a Class of *Arabidopsis* miRNA. Science 2002;297:2053-2056.
- Lomonosova E, Subramanian T, Chinnadurai G. Mitochondrial localization of p53 during adenovirus infection and regulation of its activity by E1B-19K. Oncogene 2005;24:6796-6808.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 1993;362:847-849.
- Lutz P, Kedinger C. Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phasedependent activation of the major late promoter. J Virol 1996;70:1396-1405.
- **Ma JB**, Ye K, Patel DJ. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. Nature 2004;429:318-322.
- Majhen D, Ambriovic-Ristov A. Adenoviral vectors-How to use them in cancer gene therapy?. Virus Research 2006;119:121-133.
- Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. Mol Cell Biol 1992;12:5238-5248.
- **Mangel WF**, Baniecki ML, McGrath WJ. Specific interactions of the adenovirus proteinase with the viral DNA, an 11-amino-acid viral peptide, and the cellular protein actin. Cell Mol Life Sci 2003;60:2347-2355.
- Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-indenpendent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. Genes Dev 2005;19:2979-2990.

- Martin Ab, Webber S, Fricker FJ, et al. Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. Circulation 1994;90:330-339.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. Cell 2002;110:563-574.
- Mathias T, Wickham T, Moore M, Nemerow G. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. J Virol 1994;68:6811-6814.
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. Cell 2005;123:607-620.
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passsenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. Cell 2005;123:607-620.
- Matthews DA, Russell WC. Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli. J Gen Virol 1998;79:1671-1675.
- **McCaffrey AP**, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. Nat Biotech 2003;21:639-644.
- McManus MT, Haines BB, Dillon CP, et al. Small intefering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. J Immunol 2002;169:5754-5760.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature 2004;431:343-349.
- Merl S, Wessely P. Anti-coxsackieviral efficacy of RNA interference is highly dependent on genomic target selection and emergence of escape mutants. Oligonucleotides 2007;17:44-53.
- **Morrissey DV**, Lockridge JA, Shaw L, et al. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. Nature Biotechnology 2005;23:1002-1007.
- **Muhonen P**, Parthasarathy RN, Janckila AJ, Büki KG, Väänänen HK. Analysis by siR-NA_profile program displays novel thermodynamic characteristics of highly functional siRNA molecules. Source Code Biol Med 2008;3:8.

- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*. The Plant Cell 1990;2:279-289.
- Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. Nat Med 2002;8:681-686.
- Nykänen A, Haley B, Zamore PD. ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Inteference Pathway. Cell 2001;107:309-321.
- **Olsen PH**, Ambros V. The *lin-4* Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caeno-rhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. Developmental Biology 1999;216:671-680.
- **Ostapchuk P**, Yang J, Auffarth E, Hearing P. Functional Interaction of the Adenovirus IVa2 Protein with Adenovirus Type 5 Packaging Sequences. J Virol 2005;79:2831-2838.
- Pai SI, Lin Y-Y, Macaes B, Meneshian A, Hung C-F, Wu T-C. Prospects of RNA interference therapy for cancer. Gene Ther 2005;13:464-477.
- Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia J, et al. Detection of Adenoviral Genome in the Myocardium of Adult Patients With Idiopathic Left Ventricular Dysfunction. Ciruclation 1999;99:1348-1354.
- Perez-Romero P, Gustin KE, Imperiale MJ. Dependence of the Encapsidation Function of the Adenovirus L1 52/55-Kilodalton Protein on Its Ability To Bind the Packaging Sequence. J Virol 2006;80:1965-1971.
- Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which ist inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:7742-7746.
- **Reynolds A**, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. Nat Biotechnol 2004;22:326-330.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of Plant MicroRNA Targets. Cell 2002;110:513-520.
- Roelvink PW, Lizonova A, Lee JGM. The Coxsackievirus-Adenovirus Receptor Protein Can Function as a Cellular Attachment Protein for Adenovirus Serotypes from Subgroups A, C, D, E and F. J Virol 1998;72:7909-7915.
- Rothe D, Wajant G, Grunert HP, Zeichhardt H, Fechner H, Kurreck J. Rapid construction of adeno-associated virus vectors expressing multiple short hairpin RNAs with high antiviral activity against echovirus 30. Oligonucleotides 2010;20:191-198.
- **Rowe WP**, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 1953;84:570-573.
- Ruben M, Bacchetti S, Graham F. Covalently closed circles of adenovirus 5 DNA. Nature 1983;301:172-174.
- Russell WC. Adenoviruses. In: Collier L, Balows A, Sussman M, Mahy BWJ. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Volume 1. Virology. 9th ed. London, England: Arnold, 1998:281-290.
- Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. J Gen Virol 2009;90:1-20.
- Russell WC. Update of adenovirus and its vectors. J Gen Virol 2000;81:2573-2604.
- Saphire ACS, Guan T, Schirmer EC, Nemerow GR, Gerace L. Nuclear Import of Adenovirus DNA *in Vitro* Involves the Nuclear Protein Import Pathway and hsc70. The Journal of Biological Chemistry 2000;275:4298-4304.
- Schneider G, Wrede P. Artificial neural networks for computed-based molecular design. Progress in Biophysics and Molecular Biology 1998;70:175-222.
- Schubert S, Grunert HP, Zeichhardt H, Werk D, Erdmann VA, Kurreck J. Maintaining inhibition: siRNA double expression vectors against coxsackieviral RNAs. J Mol Biol 2005;346:457-465.
- Segerman A, Arnberg N, Erikson A, Lindman K, Wadell G. There Are Two Different Species B Adenovirus Receptors: sBAR, Common to Species B1 and B2 Adenoviruses, and sB2AR, Exclusively Used by Species B2 Adenoviruses. J Virol 2003; 77:1157-1162.
- Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. Proc Natl Acad Sci 1992;89:4495-4499.
- Shenk TE. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds.in-chief. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2265-2300.

- Shisler J, Yang C, Walter B, Ware CF, Gooding LR. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. J Virol 1997;71:8299-8306.
- Sioud M, Furset G, Cekaite L. Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs. Biochemical and Biophysical Research Communications 2007;361:122-126.
- **Sledz CA**, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BRG. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat Cell Biol 2003;5:834-849.
- **Song E**, Lee S-K, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med 2003;9:347-351.
- **Song JJ**, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 2004;305:1434-1437.
- Stahlmann R, Lode H. Antibiotika und Chemotherapeutika antiinfektiöse Therapie (36.1-36.22). In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage. München, Deutschland: Elsevier GmbH, 2009:790-916.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silvermann RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem 1998;67:227-264.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. How Cells Respond to Interferons. Annu Rev Biochem 1998;67:227-264.
- Su X, Tian X, Zhang Q, et al. Complete genome analysis of a novel E3-partial-deleted human adenovirus type 7 strain isolated in Southern China. Virol J 2011;8:91.
- Sun Y, Li Z, Li L, Li J, Liu X, Li W. Effective inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs expressed from human foamy virus vectors. Int J Mol Med 2007;19:705-711.
- Swenson PD, Wadell G, Allard A, Hierholzer JC. Adenoviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH and Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. 2nd vol. Washington D.C., USA: ASM Press, 2003:14304-1417.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol 2005;17:1-14.

- **Täuber B**, Dobner T. Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. Gene 2001;278:1-23.
- ter Brake O, Konstantinova P, Ceylan M, Berkhout B. Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. Mol Ther 2006;14:883-892.
- **Tollefson AE**, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WS. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. J Virol 1996;70:2296-2306.
- **Törmänen Persson H**, Aksaas AK, Kvissel AK, et al. Two Cellular Protein Kinases, DNA-PK and PKA, Phosphorylate the Adenoviral L4-33K Protein and Have Opposite Effects on L1 Alternative RNA Splicing. PLoS one 2012;7:e31871.
- **Tribouley C**, Lutz P, Staub A, Kedinger C. The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter. J Virol 1994;68:4450-4457.
- Trotman LC, Mosberger N, Fornerod M, Stidwill RP, Greber UF. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. Nature Cell Biology 2001;3:1092-1100.
- Tschöpe C, Bock C-T, Kasner M, et al. High Prevalence of Cardiac Parvovirus B19 Infection in Patients With Isolated Left Ventricular Diastolic Dysfunction. Circulation 2005;111:879-886.
- **Tuschl T**, Borkhardt A. Small Interfering RNAs: A Revolutionary Tool for the Analysis of Gene Function and Gene Therapy. Molecular Interventions 2002;2:158-167.
- **Umekawa T**, Kurita T. Acute hemorrhagic cystitis by adenovirus type 11 with and without type 37 after kidney transplantation. Urol Int 1996;56:114-116.
- van Rij RP, Andino R. The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. Trends Biotechnol 2006;24:186-193.
- Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoeben RC. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. J Gen Virol 2005;86:1581-1588.
- Walton SP, Wu M, Gredell JA, Chan C. Designing highly active siRNAs for therapeutic applications. FEBS Journal 2010;277:4806-4813.
- Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G. Adenovirus Internalization and Infection Require Dynamin. J Virol 1998;72:3455-3458.

- Watanabe A, Arai M, Yamazaki M, Koitabashi N, Wuytack F, Kurabayashi M. Phospholamban ablation by RNA interference increases Ca²⁺ uptake into rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2004;37:691-698.
- Webster A, Leith IR, Nicholson J, Hounsell J, Hay RT. Role of preterminal protein processing in adenovirus replication. J Virol 1997;71:6381-6389.
- Weitzer S, Martinez J. The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. Nature 2007;447:222-226.
- **Wickham TJ**, Mathias P, Cheresh DA, Nemerow GR. Integrins $a_v\beta_3$ and $a_v\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. Cell 1993;73:309-319.
- Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR. Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. J Virol 2005;79:1992-2000.
- Wold WSM, Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Lichtenstein DL, Tollefson AE. Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. Current Opinion in Immunology1999;11:380-386.
- Xin XM, Li GQ, Guan XR, et al. Combination therapy of siRNAs mediates greater suppression on hepatitis B virus cccDNA in HepG2.2.15 cell. Hepatogastroenterology 2008;55:2178-2183.
- **Yeh HY**, Pieniazek N, Pieniazek D, Gelderblom H, Luftig RB. Human adenovirus type 41 contains two fibers. Virus Res 1994;33:179-198.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. Science 2004;304:594-596.
- **Yew PR**, Liu X, Berk AJ. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. Genes Dev 1994;8:190-202.
- **Yi R**, Qin Y, Macara IG, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev 2003;17:3011-3016.
- **Ylösmäki E**, Hakkarainen T, Hemminki A, Visakorpi T, Andino R, Saksela K. Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA. J Virol 2008;82:11009-11015.
- **Zhang H**, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. EMBO J 2002;21.5875-5885.

- **Zhang W**, Imperiale MJ. Requirement of the Adenovirus IVa2 Protein for Virus Assembly. J Virol 2003;77:3586-3594.
- **Zimmermann TS**, Lee ACH, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. Nature 2006;441:111-114.

Abkürzungsverzeichnis

A.bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb	Abbildung
Ad	Adenovirus
ADP	Adenovirus Death Protein
Ago	Argonaute
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
ANN	Artificial Neural Network
ATP	Adenosintriphosphat
°C	°Celsius
CaCl	Calciumchlorid
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
СВР	cAMP-response-element-binding protein
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CD46	Cluster of Differentiation 46
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	cytopathic effect
CR	Conserved Region
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBP	DNA Binding Protein
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dsRNA	dopplesträngige RNA
FANA	2'desoxy-2'fluoro-β-d-arabinonukleinsäure
FKS	Fötales Kälberserum
gp	glycoprotein
h	hour (Stunde)
НАТ	hypoxanthine-aminopterin-thymidine
HCV	Hepaitis C Virus
HEK	human epithelial kidney
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSG	Heparansulfatglykosaminoglykan
hsp	heat shock protein
IgG	Immunglobulin G
ITR	inverted terminal repeat
kb/kB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth
Luc	Luciferase
М	Molar
mA	Milliampere
MgCl	Magnesiumchlorid
МНС	major histocompatibility complex
MLC	myosin light chain
MLP	major late promoter
MLTU	major late transcription unit
mm	Millimeter

min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
MOI	Mulitplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
n.s.	nicht signifikant
0	Sauerstoff
ORF	open reading frame
PAZ	Piwi-Argonaute-Zwille
Piwi	P-element induced wimpy testis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pfu	plaque forming unit
PKR	Proteinkinase R
Pkt	Punkt
Pol	Polymerase
pre-mRNA	precursor mRNA
RB	Retinoblastom
RCA	Replication competent Adenovirus
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RISC	RNA-induced silencing complex
RLC	RISC loading complex
RLU	Relative Light Units

rpm	rounds per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interference (RNA-Inteferenz)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
scr	scrambled siRNA (= non silencing siRNA)
siRNA	small interfering RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.E.M.	standard error of the mean
shRNA	short hairpin RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SSC	saline buffered sodium citrate
STAT1	signal transducer and acitivator of transcription 1
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Ethylendiamintetraacetat)
TAR	transactivation respnsive element
TBS	tris buffered saline
ТКА	Transkomplementierungs-Assay
TLR	toll like receptor
tp	terminales protein
TRBP	trans-activating response RNA-binding protein
Tris HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Chlorwasserstoff
ts	target sequence
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett

VA RNA	Virus assoziierte RNA
VEGF	vascular endothelial growth factor
μΜ	Mikromolar
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Struktur des Adenovirus (modifiziert nach Russel, 2009)	4
Abb. 1-2:	Organisation des adenoviralen Genoms (Hall et al., 2010)	5
Abb. 1-3:	Schematische Darstellung der RNA-Interferenz (modifiziert nach van Rij und Andino, 2006)	.12
Abb. 2-1:	Ausgangsplasmid pUF- LucmiR122(3x)TS/miR148(1x)TS (Geisler et al, 2011)	.31
Abb. 2-2:	pLuc-TS-siE1A	.32
Abb. 2-3:	pLuc-TS-siIVa2	.32
Abb. 2-4:	pLuc-TS-siHexon	.33
Abb. 2-5:	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Kapillarblots	. 39
Abb. 2-6:	Schematische Darstellung der Durchführung eines Transkomplementierungs-Assays	.45
Abb. 3-1:	Redutkion der Proteinexpression durch anti-adenovirale siRNAs	.50
Abb. 3-2:	Quantitative Erfassung der Hexon-positiven Zellen	.51
Abb. 3-3:	Schematische Darstellung des Prinzips der Transkomplementierung	.53
Abb. 3-4:	siRNA vermittelte Reduktion der Luciferase Expression	.54
Abb. 3-5:	Reduktion der adenoviralen E1A DNA durch Applikation von anti-E1A siRNAs	.55
Abb. 3-6:	Inhibierung der adenoviralen Replikation durch siE1A in Abhängigkeit von der viralen Dosis und der Zeit	.57
Abb. 3-7:	Sequenzspezifische Inhibierung der Rportergen-Aktivität	. 59
Abb. 3-8:	Sequenzspezifsiche Inhibierung der Luciferase-Expression bei niedriger siRNA Konzentration	.59
Abb. 3-9:	Langzeitwirkung der siRNAs	.61
Abb. 3-10:	Dosisabhängige Inhibierung der adenoviralen Replikation durch siE1A, siIVa2 und siHexon	.62
Abb. 3-11:	Vergleich der anti-adenoviralen Aktivität von siE1A, siIVa2 und siHexon nach direkter und indirekter Bestimmung der Virusproduktion	.63
Abb. 3-12:	Stärkere Inhibierung der adenoviralen Replikation durch additive siRNA-Wirkung	.66
Abb. 3-13:	Inhibierung der adenoviralen Replikation durch die siRNA Kombination siHexon/siIVa2 in Abhängigkeit von der Virusdosis	.67
Abb. 3-14:	Inhibierung der adenoviralen Replikation durch Kombinationen von siE1A, siIVa2 und siHexon	.70
Abb. 3-15:	Inhibierung der Adenvirus vermittelten Zelllyse durch Applikation verschiedener Kombinationen von siE1A, siIVa2 und siHexon	.71

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1:	Übersicht über die Hauptinteraktionspartner der E1A-Produkte (modifiziert nach Russell, 2000)	7
Tab. 2-1:	Zelllinien	20
Tab. 2-2:	siRNAs	20
Tab. 2-3:	Viren und Vektoren	21
Tab. 2-4:	Bakterienstamm	21
Tab. 2-5:	Bakterienmedien	21
Tab. 2-6:	Oligonukleotide	22
Tab. 2-7:	Enzyme	22
Tab. 2-8:	Antikörper	23
Tab. 2-9:	DNA Größenstandards	23
Tab. 2-10:	Lösungen und Puffer	23
Tab. 2-11:	Lösungen für Southern Blot	23
Tab. 2-12:	Waschlösungen für Hybridisierung von Nukleinsäuren	24
Tab. 2-13:	Lösungen für Immunfluoreszenz	24
Tab. 2-14:	Chemikalien	24
Tab. 2-15:	Reagenzsysteme	26
Tab. 2-16:	Sonstige Materialien	26
Tab. 2-17:	Geräte	27
Tab. 2-18:	Agarosegel-Konzentration in Abhängigkeit von den DNA-Fragmentgrößen	34
Tab. 2-19:	Zusammensetzung eines Ligatinosansatzes	35
Tab. 2-20:	Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes	38
Tab. 2-21:	Reaktionsbedingungen der PCR	38
Tab. 2-22:	Reaktionsansatz zur Herstellung einer ³² P-markierten Sonde	40
Tab. 2-23:	Reaktionsschritte zur Sequenzierung	42
Tab. 3-1:	Kombinationen und Dosierungen der verwendeten siRNAs	64
Tab. 3-2:	Übersicht über Kombinationen und Dosierungen der untersuchten siRNAs	69

Erklärung an Eides statt

"Ich, Anne Christine Bode, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Inhibierung von Adenovirusinfektion mittels siRNA vermittelter Blockade adenoviraler Regulations- und Verpackungsgene selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationen

Publikation:

Eckstein A, Größl T, Geisler A, Wang X, Pinkert S, Pozzuto T, Schwer C, Kurreck J, Weger S, Vetter R, Poller W, Fechner H. Inhibition of adenovirus infection by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions. Antiviral Research 2010;88:86-94.

Vortrag:

Eckstein A, Wang X, Pinkert S, Pozzuto T, Größl T, Geisler A, Schwer C, Schultheiß H-P, Kurreck J, Weger S, Vetter R, Poller W, Fechner H. Improved Inhibition of Adenovirus Infection by Multiple RNA-Interference Mediated Adenoviral Gene Silencing. 20th European Students' Conference vom 04.10.-07.10.2009 in Berlin, Deutschland.

Poster:

Eckstein A, Wang X, Poller W, Fechner H. Inhibition of Adenovirurs Infection by RNA Interference (RNAi) - a Potent New Approach for Treatment of Adenoviral Infections of the Heart. 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie vom 27.03.-29.03.2008 in Mannheim, Deutschland.

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Anne Christine Bode hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Eckstein A, Größl T, Geisler A, Wang X, Pinkert S, Pozzuto T, Schwer C, Kurreck J, Weger S, Vetter R, Poller W, Fechner H, Inhibition of adenovirus infection by siRNAmediated silencing of early and late adenoviral gene functions, Antiviral Research, 2010

Beitrag im Einzelnen: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Poller für die Zurverfügungstellung des Themas und die Möglichkeit die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe in der Abteilung für Kardiologie und Pulmologie am Campus Benjamin Franklin der Charité anzufertigen.

Ich danke Herrn Dr. Henry Fechner für die zuverlässige und fachkompetente Betreuung. Ohne sein Engagement und seine fortwährende Unterstützung wäre diese Arbeit in ihrem Umfang nicht möglich geworden. Außerdem möchte ich ganz besonders Xiaomin Wang und Tanja Pozzuto danken, von denen ich alle Methoden erlernt habe. Ebenfalls danken möchte ich Tobias Größl sowie Anja Geisler und Christina Schwer für die Unterstützung bei der Durchführung der Indikator-Assays. Tobias Größl möchte ich dabei besonders für den Bau der Plasmide pLuc-TS-siE1A, pLuc-TS-siIVa2, pLuc-TS-siHexon für das Labor Poller danken. Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, auch den ehemaligen, möchte ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit danken.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern Christiane und Armin Eckstein sowie meinem Bruder Julian. Ihr habt mich an manchen kritischen Punkten motiviert und mich auch in der schwierigen Abschlussphase gestützt.

Auch danken möchte ich meinen Schwiegereltern Erika und Werner Bode sowie Angelika, Christian und Lillian für die tatkräftige Unterstützung vor allem im Rahmen von "Babysitter-Diensten" bei der Verfassung der Monographie.

Der größte Dank gebührt meinem Ehemann Michael, der mich durch seine fortwährende Unterstützung beständig und mit viel Geduld durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat und mir die Kraft gegeben hat alles zu schaffen.

Und ich möchte meinen Söhnen Ian und Matthis danken: Ihr seid mein Sonnenschein!