

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Deutsches Herzzentrum München, Klinik an der Technischen Universität München  
und Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München

## **Etablierung und Optimierung therapeutischer RNA-Interferenz zur Behandlung der coxsackieviralen Herzerkrankung**

Sabine Schönhofer-Merl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzende:

Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher (i.R.)
2. Univ.-Prof. Dr. R. Wessely
3. Univ.-Prof. Dr. M. Groll

Die Dissertation wurde am 30.08.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 16.07.2012 angenommen.

Diese Arbeit wurde im Deutschen Herzzentrum München,  
Klinik an der Technischen Universität München,  
in der Abteilung Experimentelle Erwachsenenkardiologie  
unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Rainer Wessely  
und Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher konzipiert und angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 COXSACKIEVIRUS B3.....	1
1.1.1 AUFBAU UND GENOM DES COXSACKIEVIRUS B3.....	1
1.1.2 INFEKTIONSZYKLUS DES COXSACKIEVIRUS B3.....	3
1.1.3 PATHOGENITÄT DES COXSACKIEVIRUS B3.....	5
1.2 RNA-INTERFERENZ ALS THERAPIEOPTION.....	8
1.2.1 MECHANISMUS UND THERAPEUTISCHES POTENTIAL DER RNA-INTERFERENZ	9
1.2.2 ANTI-COXSACKIEVIRALES POTENTIAL DER RNA-INTERFERENZ.....	12
1.3 ZIELE DER DISSERTATION.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 MATERIAL.....	15
2.1.1 CHEMIKALIEN, BIOCHEMISCHE REAGENZIEN, <i>KITS</i> .....	15
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	16
2.1.3 GERÄTE.....	17
2.1.4 BAKTERIEN.....	17
2.1.5 VIREN.....	18
2.1.6 ZELLINIEN.....	18
2.1.7 ZELLKULTURMEDIEN, ZUSÄTZE, REAGENZIEN.....	18
2.1.8 ENZYME.....	18
2.1.9 ANTIKÖRPER.....	19
2.1.10 PLASMIDE.....	19
2.1.11 OLIGONUKLEOTIDE.....	20
2.1.11.1 siRNA.....	20
2.1.11.2 PRIMER.....	20
2.2 METHODEN.....	22
2.2.1 <i>IN VITRO</i> UNTERSUCHUNGEN.....	22
2.2.1.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	22
2.2.1.1.1 KULTIVIERUNG DER HELa- BZW. COS-7-ZELLEN.....	22
2.2.1.1.2 (KO-)TRANSFEKTION ADHÄRENTER HELa-ZELLEN MIT siRNA.....	23
2.2.1.1.3 BESTIMMUNG DER PROLIFERATION siRNA-TRANSFIZIERTER ZELLEN NACH CVB3-INFEKTION.....	23

2.2.1.2 VIROLOGISCHE METHODEN.....	24
2.2.1.2.1 HERSTELLUNG UND PROPAGIERUNG DES WILDTYP- CVB3-VIRUSSTOCKS.....	24
2.2.1.2.2 HERSTELLUNG EINES REKOMBINANTEN CVB3- eGFP- VIRUSSTOCKS.....	24
2.2.1.2.3 <i>PLAQUE FORMING ASSAY</i> (PFA).....	28
2.2.1.2.4 PLAQUE-AUFREINIGUNG.....	29
2.2.1.2.5 COXSACKIEVIRUS-INFEKTION ADHÄRENTER ZELLEN.....	29
2.2.1.2.6 CHARAKTERISIERUNG EINER MÖGLICHEN VIRALEN RESISTENZ-ENTWICKLUNG UNTER siRNA-SELEKTIONSDRUCK.....	29
2.2.1.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	30
2.2.1.3.1 EXTRAKTION VON GESAMT-RNA AUS ADHÄRENTEN ZELLEN	30
2.2.1.3.2 SEMIQUANTITATIVE RT-PCR.....	30
2.2.1.3.3 BESTIMMUNG DER siRNA INTRINSISCHEN SERUMSTABILITÄT	32
2.2.1.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	32
2.2.1.4.1 <i>WESTERN-BLOT</i> .....	32
2.2.1.4.2 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE ANALYSEN.....	34
2.2.1.4.3 BESTIMMUNG DER LDH-FREISETZUNG (LACTAT- DEHYDROGENASE- <i>ASSAY</i> ).....	34
2.2.2 <i>IN VIVO</i> UNTERSUCHUNGEN.....	35
2.2.2.1 INFEKTION DER MÄUSE.....	36
2.2.2.2 HYDRODYNAMISCHE siRNA-TRANSFEKTION.....	36
2.2.2.3 TÖTUNG UND BLUT- BZW. ORGANENTNAHME.....	36
2.2.2.4 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER <i>IN VIVO</i> siRNA- TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ.....	37
2.2.2.5 ORGANAUFARBEITUNG FÜR <i>PLAQUE FORMING ASSAY</i> IM HOMOGENISATOR.....	38
2.2.2.6 ORGANAUFARBEITUNG FÜR <i>WESTERN-BLOT</i> IM <i>BEAD-BEATER</i> .....	38
2.2.2.7 HISTOLOGIE.....	38
2.2.2.8 BESTIMMUNG DES ALT-SERUM-LEVELS.....	39
2.2.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	39
3 ERGEBNISSE.....	40
3.1 THERAPEUTISCHES POTENTIAL DER ANTI-COXSACKIEVIRALEN RNA-INTERFERENZ.	40

3.1.1 ATTENUIERUNG DER COXSACKIEVIRALEN PATHOGENITÄT IN EINER FÜR CVB3 PERMISSIVEN ZELLINIE.....	40
3.1.1.1 ETABLIERUNG EINES EFFIZIENTEN siRNA-APPLIKATIONSSYSTEMS.....	40
3.1.1.2 siRNA-VERMITTELTE ANTI-VIRALE RNA-INTERFERENZ.....	41
3.1.1.2.1 SIGNIFIKANTE ATTENUIERUNG DER VIRALEN ZYTO-PATHOGENITÄT.....	41
3.1.1.2.2 SIGNIFIKANTE ATTENUIERUNG DER VIRALEN REPLIKATION.....	43
3.1.1.2.3 SIGNIFIKANTE ATTENUIERUNG DER VIRALEN PROTEIN-EXPRESSION.....	44
3.1.1.3 KORRELATION DER siRNA-VERMITTELTEN INHIBITION MIT DEM INTRAZELLULÄREN siRNA-LEVEL.....	44
3.1.2 ATTENUIERUNG DER COXSACKIEVIRALEN PATHOGENITÄT IM EXPERIMENTELLEN TIERMODELL.....	46
3.1.2.1 ETABLIERUNG EINES EFFIZIENTEN <i>IN VIVO</i> APPLIKATIONSSYSTEMS.....	47
3.1.2.2 SIGNIFIKANT VERLÄNGERTES ÜBERLEBEN CVB3-INFIZIERTER MÄUSE NACH HYDRODYNAMISCHER TRANSFEKTION VON siRNA-2A <sup>α</sup> .....	47
3.1.2.3 ATTENUIERUNG DER VIRALEN PROTEINEXPRESSION UND REPLIKATION	48
3.1.2.4 EINFLUSS AUF DIE VIRUSBEDINGTE GEWEBESCHÄDIGUNG.....	50
3.2 FAKTOREN, DIE DAS THERAPEUTISCHE POTENTIAL DER ANTI-COXSACKIEVIRALEN RNA-INTERFERENZ BEEINFLUSSEN.....	51
3.2.1 SELEKTION DER GENOMISCHEN ZIELSEQUENZEN.....	51
3.2.2 ENTSTEHUNG EINER RESISTENTEN VIRUSPOPULATION.....	55
3.2.3 siRNA INTRINSISCHE NUKLEASE-STABILITÄT.....	63
3.2.3.1 siRNA INTRINSISCHE SERUMSTABILITÄT.....	63
3.2.3.2 VERSTÄRKTER THERAPEUTISCHER EFFEKT DURCH VERWENDUNG CHEMISCH MODIFIZIERTER siRNA.....	64
4 DISKUSSION.....	66
4.1 THERAPEUTISCHES POTENTIAL DER ANTI-COXSACKIEVIRALEN RNA-INTERFERENZ	66
4.1.1 siRNA-2A <sup>α</sup> -VERMITTELTE ATTENUIERUNG DER VIRALEN PATHOGENITÄT <i>IN VITRO</i> .....	67
4.1.2 siRNA-2A <sup>α</sup> -VERMITTELTE ATTENUIERUNG DER VIRALEN PATHOGENITÄT <i>IN VIVO</i> .....	67
4.1.3 EINFLUSS EINER INTERFERON-ANTWORT AUF DAS ANTI-VIRALE POTENTIAL....	69
4.2 FAKTOREN, DIE DAS THERAPEUTISCHE POTENTIAL DER ANTI-COXSACKIEVIRALEN	

RNA-INTERFERENZ BEEINFLUSSEN.....	70
4.2.1 DIE SELEKTION DER GENOMISCHEN REGION.....	70
4.2.2 DIE ENTSTEHUNG EINER RESISTENTEN VIRUSPOPULATION.....	72
4.2.2.1 VERHINDERUNG EINES <i>VIRAL ESCAPE</i> DURCH DIE WAHL HOCH- KONSERVIERTER GENOMISCHER BEREICHE.....	74
4.2.2.2 VERHINDERUNG EINES <i>VIRAL ESCAPE</i> DURCH DIE WAHL ZELLULÄRER ZIELSTRUKTUREN.....	74
4.2.2.3 VERHINDERUNG EINES <i>VIRAL ESCAPE</i> DURCH EINE KOMBINATORISCHE BEHANDLUNGSSTRATEGIE.....	75
4.2.3 DIE siRNA INTRINSISCHE NUKLEASE-STABILITÄT.....	76
4.2.3.1 ERHÖHUNG DER ANTI-VIRALEN EFFEKTIVITÄT DURCH CHEMISCHE MODIFIKATION DER EFFEKTOR-MOLEKÜLE.....	77
4.2.3.2 ERHÖHUNG DER ANTI-VIRALEN EFFEKTIVITÄT DURCH ENDOGENE AMPLIFIKATION DER EFFEKTOR-MOLEKÜLE.....	78
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	80
6 SUMMARY.....	83
 ANHANG	
A LITERATURVERZEICHNIS	
B TABELLENVERZEICHNIS	
C ABBILDUNGSVERZEICHNIS	
D ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	
E DANKSAGUNG	
F LEBENSLAUF	
G VORTRÄGE	
H PUBLIKATIONEN	

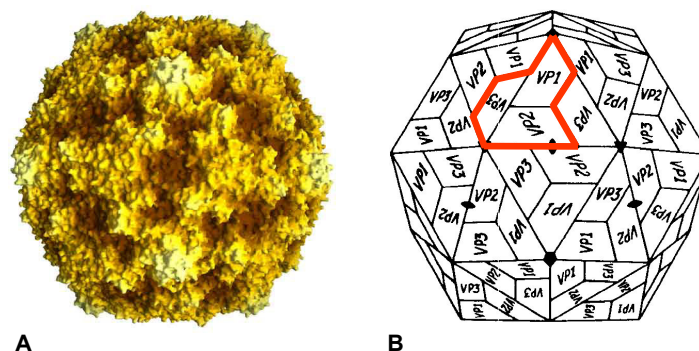
## 1 Einleitung

### 1.1 Coxsackievirus B3

Virusinfektionen sind eine häufige Ursache für die Pathogenese schwerer Herzerkrankungen. Das Spektrum der viralen Herzerkrankungen umfasst dabei sowohl akute als auch chronische Formen der Myokarditis, sowie einen Teil der dilatativen Kardiomyopathien, für die eine virale Ätiopathogenese gezeigt werden konnte. Spezifische Therapiemaßnahmen für diese teils lebensbedrohlichen Erkrankungen sind derzeit nicht verfügbar, Ultima Ratio ist nicht selten ein Herzunterstützungssystem (*Assist Device*) oder die Herztransplantation. Als einer der häufigsten Erreger viraler Herzerkrankungen insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen gilt das Coxsackievirus B3 (CVB3) [1].

#### 1.1.1 Aufbau und Genom des Coxsackievirus B3

Das Coxsackievirus B3 gehört neben den Polio- und Echo-Viren zum Genus der Enteroviren innerhalb der Familie der Picornaviridae [2]. Diese Virusfamilie umfasst Viren, die ein einzelsträngiges RNA-Genom besitzen und mit einem Durchmesser von 22-30nm zu den kleinsten Virus-Vertretern gehören.

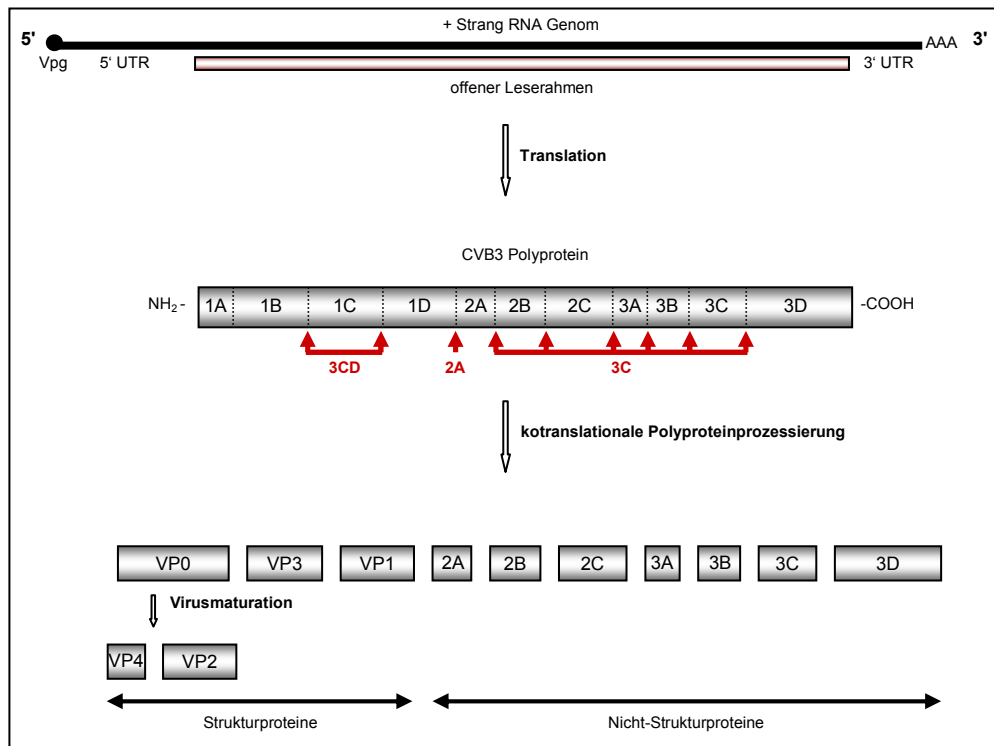


**Abb. 1: Struktur der Picornaviridae.** Die Oberflächenstruktur eines Picornaviruspartikels dargestellt in (A) als Röntgenkristallstruktur (nach Dr. Jean-Yves Sgro in *Virusworld*: <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/images/cb3-2fold-yellow.jpg>) und in (B) schematisch nach Rossmann und Johnson [3]. Die Lage des Protomers ist rot markiert (nähere Einzelheiten siehe Text).

Das Coxsackievirus B3 besitzt ein hüllenloses, ikosaedrisches Kapsid (Abb. 1), das sich aus je 60 Untereinheiten (Protomere) der vier Kapsidproteine VP1, VP2, VP3 und VP4 zusammensetzt [4-6]. Die Oberfläche des Virions wird dabei von den drei Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 gebildet (Abb. 1B). An den Ecken des Ikosaeders, wo die jeweiligen VP1-Proteine aufeinandertreffen, bilden sich grabenartige Vertiefungen auf der Partikeloberfläche, sogenannte *Canyons*, die auf viraler Seite die Bindung an einen spezifischen, zellulären Rezeptor bestimmen [7-9]. Das Strukturprotein VP4 kleidet die Innenseite des ikosaedrischen Kapsids aus und ist über seine positiv-geladenen Aminosäurereste mit dem viralen RNA-Genom assoziiert. Das einzelsträngige Genom (Abb. 2) ist 7400bp lang und besitzt Plus- bzw. Positivstrang-Orientierung, d.h. es entspricht einer *messenger* RNA (mRNA) und kann direkt nach Einschleusung in die Zelle translatiert werden. An seinem 5'-Ende ist es kovalent mit einem kurzen viruskodierten Protein Vpg (3B; virales Protein, genomassoziiert) verbunden, das als Primer-Komplex für die Initiation der Replikation dient [5, 6, 10]. Zwischen dem Vpg und dem Startcodon für die Translation befindet sich ein nichttranslatierter Sequenzbereich (5' *untranslated region*, 5' UTR) mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur am 5'-Ende [4], die funktionell die Aktivität einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, IRES) besitzt und die Bindung von zellulären Ribosomen zur Translations-Initiation unabhängig von einer für eukaryotische mRNA typischen 5' *Cap*-Struktur erlaubt [11-15]. Das 3'-Ende des viralen Genoms ist polyadenyliert [5, 6, 10]. Zwischen dem Stopcodon für die Translationstermination und diesem Poly(A)-Anteil befindet sich ein kurzer, ebenfalls nicht translaterter Sequenzabschnitt (3' *untranslated region*, 3' UTR). Zwischen den zwei nicht-kodierenden Bereichen am 3'- und 5'-Ende liegt ein einziger offener Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der für ein Vorläufer-Polyprotein von annähernd 2200 Aminosäuren Länge kodiert. In seiner Sequenz sind alle Funktionen für den erfolgreichen Ablauf einer Infektion enthalten: im aminoterminalen Bereich befinden sich die Sequenzen der viralen Kapsidproteine (1A-1D), in den carboxyterminal orientierten Regionen die der Nichtstrukturproteine (2A-3D) [6]. Das Vorläuferprotein wird noch während seiner Translation proteolytisch in die einzelnen Komponenten gespalten (Abb. 2). Zunächst entfaltet dabei die virale Protease 2A, sobald ihre Sequenz in Aminosäuren übersetzt vorliegt, ihre Aktivität und trennt die aminoternale Protomersequenz von dem Polyprotein ab [16]. Nahezu alle weiteren Prozessierungsschritte erfolgen durch die virale Protease 3C. Sie spaltet zunächst das Nichtstruktur-Vorläuferprotein autokatalytisch intramolekular vor dem 3C-Anteil. Das entstandene proteolytisch aktive Zwischenprodukt 3CD trennt das Protomer in



1A/1B, 1C und 1D. Die anschließende intramolekulare Spaltung von 3CD in *trans* führt zur Trennung der RNA-abhängige RNA Polymerase 3D [6, 16, 17] von der weiterhin proteolytisch aktiven Protease 3C. Die Spaltung des VP0-Vorläuferproteins in VP4 und VP2 erfolgt erst im Verlauf der Virusreifung autokatalytisch durch proteolytische Aktivität im carboxyterminalen VP2- Abschnitt [6].

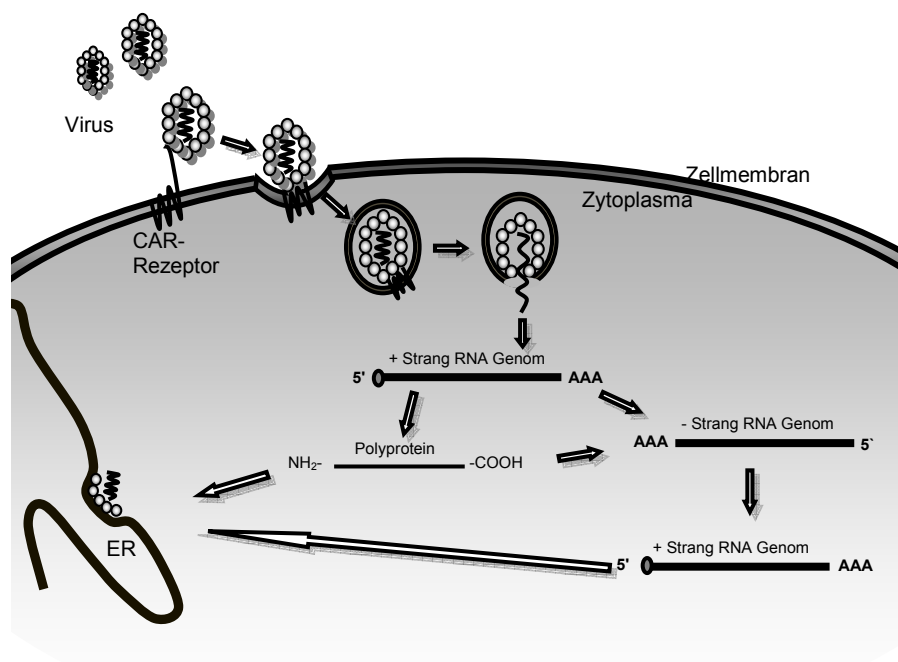


**Abb. 2: Schematische Darstellung der Organisation des CVB3-Genoms und der Polyproteinprozessierung durch enterovirale Proteasen (modifiziert nach Modrow und Falke [6]).** Das virale Genom besitzt am 5'-Ende ein kovalent gebundenes Protein Vpg, am 3'-Ende ist es polyadenyliert. Der einzige offene Leserahmen kodiert für ein Polyprotein, das durch die Aktivität der Proteasen 2A und 3CD bzw. 3C ko- bzw. posttranslational in die Einzelkomponenten gespalten wird. Die Pfeile geben die von ihnen durchgeführten Spaltungen an (nähere Einzelheiten siehe Text).

### 1.1.2 Infektionszyklus des Coxsackievirus B3

Der coxsackievirale Infektionszyklus (Abb. 3) beginnt mit der Adsorption des Virus an den zellulären Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) [18-20]. Die an der Zelloberfläche haftenden Viren gelangen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in das Zellinnere, wo ihr Genom nach Ansäuerung des Vesikelinneren und Umlagerung der Kapsidstruktur durch Poren in der Vesikelmembran in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen wird. Direkt nach diesem *Uncoating* wird die positiv-orientierte Einzelstrang-RNA intrazytoplasmatisch unter Verwendung der zellulären Translationsmaschinerie in das Polyprotein übersetzt. Wie bereits oben beschrieben wird dieses Vorläuferprotein noch während der Translation durch Aktivität

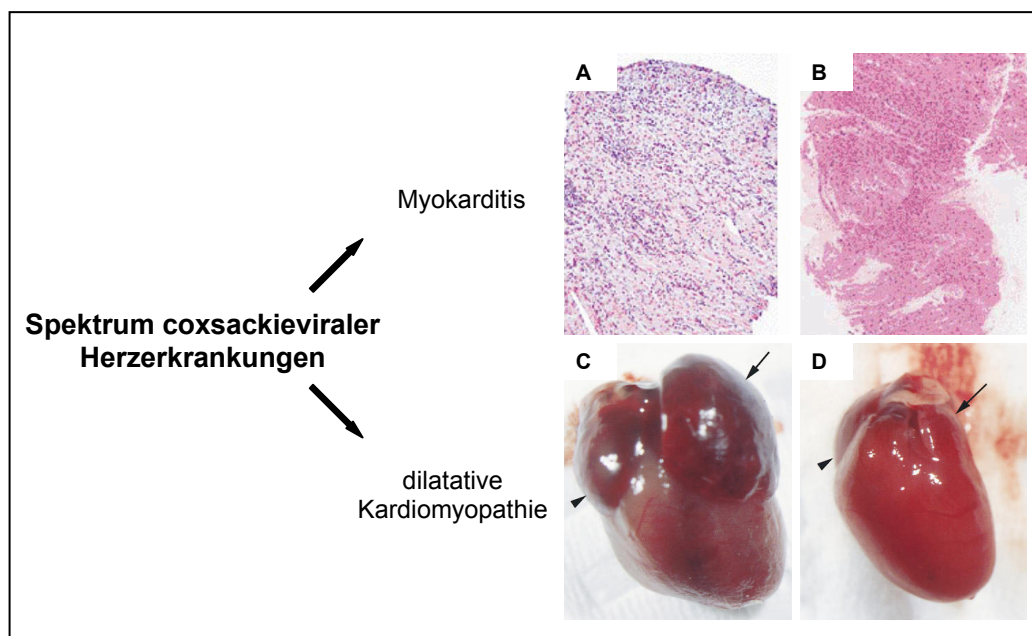
der virusspezifischen Proteasen 2A und 3C/3CD in die einzelnen Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten. Während dieses Vorgangs entstehen auch die für die Genomreplikation notwendige RNA-abhängige RNA Polymerase 3D sowie das Vpg als Protein-Primer für die Initiation der RNA-Synthese. Die Polymerase schreibt das Positivstranggenom in ein Negativstrang-Intermediat um, welches als Matrize für die Produktion neuer viraler Genome in Positivstrangorientierung dient. Dabei ist ihre Fehlerrate mit ungefähr  $4,5 \times 10^{-4}$  Fehlern pro Base verhältnismäßig hoch [21]. Dies führt zu einer hohen genetische Variabilität innerhalb der natürlichen Virus-Population und, unter therapeutischem Selektionsdruck, möglicherweise zur Entstehung behandlungsresistenter Virusvarianten. Sind in der Wirtszelle genügend Proteine und Genome für neue Virionen synthetisiert, lagern sie sich an intrazellulären Membrankompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) durch spontane Aggregation (*self-assembly*) zu infektiösen Viruspartikeln zusammen und werden durch eine Änderung der Membranpermeabilität im Rahmen des infektionsbedingten Todes der Zelle freigesetzt.



**Abb. 3: Infektionszyklus des Coxsackievirus B3.** Der coxsackievirale Infektionszyklus beginnt mit der Adsorption des Virus an den zellulären Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR). Nach Penetration in das Zellinnere entlässt das Virus sein Genom. Das *messenger*-ähnliche Positivstrang-RNA-Genom wird intrazytoplasmatisch unter Verwendung der zellulären Translationsmaschinerie in ein Polyprotein translatiert, das durch die viralen Proteasen in die Einzelkomponenten gespalten wird. Die dabei entstehende RNA-abhängige RNA Polymerase katalysiert die Replikation neuer Genome über ein Negativstrang-Intermediat. Die virale RNA lagert sich mit den viralen Proteinen an intrazellulären Membrankompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) durch *self-assembly* zu infektiösen Viruspartikeln zusammen, die schließlich freigesetzt werden.

### 1.1.3 Pathogenität des Coxsackievirus B3

Coxsackieviren gehören als Enteroviren zu einer der größten und wichtigsten Familien von human-infektiösen Pathogenen mit besonderer klinischer Signifikanz. Obwohl enterovirale Infektionen meist vollständig asymptomatisch verlaufen, können sie eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder hervorrufen. Diese reichen von leichten bzw. moderaten Erkrankungen mit respiratorischen oder gastrointestinalen Symptomen, Hautexanthenen (bekannt als Hand-Fuß-Mund-Krankheit) und akuter hämorrhagischer Konjunktivitis bis hin zu schweren, zum Teil tödlich verlaufenden Erkrankungen mit neurologischer sowie kardialer Manifestation, wie Meningitis, Paralysis und Myokarditis [22-24]. Das Coxsackievirus B3 gilt als einer der Hauptverursacher viraler Erkrankungen des Herzens [1, 23, 25]. Das Spektrum der coxsackieviralen Herzerkrankungen (Abb. 4) umfasst dabei sowohl akute als auch chronische Formen der Myokarditis [26], sowie einen Teil der dilatativen Kardiomyopathien (DCM), für die eine virale Ätiopathogenese gezeigt werden konnte.



**Abb. 4: Spektrum CVB3-induzierter Herzerkrankungen.** Der histopathologische Befund einer aktiven Myokarditis (A) auf Grundlage der Dallas-Kriterien basiert auf dem Vorhandensein von entzündlichem Infiltrat und Myozytolyse verglichen mit Hämatoxylin-Eosin-gefärbtem, normalem Myokardgewebe (B) [26]. Das Herz einer Maus zeigt unter transgener Expression Replikations-restringierter enteroviraler Genome (C) Charakteristika einer dilatativen Kardiomyopathie in Form eines deutlich vergrößerten linken (Pfeil) und rechten Atriums (Pfeilspitze) im Vergleich zu einem nicht transgenen Geschwister (D) [27]. Ein inflammatorisches Infiltrat ist bei der dilatativen Kardiomyopathie im Gegensatz zur Myokarditis nicht zu erwarten.

Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Umweltresistenz erfolgt die Übertragung der Coxsackieviren wie bei allen Enteroviren überwiegend fäkal-oral durch Schmutz- und Schmierinfektion sowie verunreinigtes Trinkwasser, obwohl auch eine Tröpfcheninfektion möglich ist [1, 23, 28]. Nach lokaler Ansiedlung und Vermehrung in den lymphatischen Organen des Oropharynx (Tonsillen) sowie des Gastrointestinal-Traktes (Peyerschen Plaques), kommt es zu einer hämatogenen Ausbreitung mit ausgeprägter Virämie und konsekutiv sekundärer Ansiedlung in den eigentlichen Zielorganen wie Pankreas [29] und insbesondere dem Herz [1]. Das klinische Erscheinungsbild einer CVB3-Infektion variiert erheblich und reicht von inapparenten oder milden Verläufen mit grippeähnlicher Symptomatik [30-33] bis hin zu schweren Erkrankungen mit meist kardialer Manifestation wie der akuten, selten fulminant verlaufenden Myokarditis (Herzmuskelentzündung) mit Arrhythmie, Herzversagen und plötzlichem Herztod oder deren chronischen Folgeerkrankungen. Neben seiner Relevanz für die Pathogenese viraler Herzerkrankungen, werden CVB3 auch extrakardiale Erkrankungen wie Hepatitis [34], Pankreatitis [35], aseptische Meningitis [36] und Enzephalomyelitis [37] zugeschrieben.

Die Pathogenese der akuten viralen Myokarditis und der chronischen viralen Herzmuskelerkrankungen (chronische Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie) erfolgt als dreiphasiger Krankheitsprozess mit einer viralen, einer inflammatorischen und einer chronischen Phase [38, 39]. Während der akuten Infektionsphase gilt die direkt zellzerstörende Wirkung der Viren als ursächlich für die myokardiale Gewebeschädigung [39]. Die intrazellulären Vorgänge bei der Virusvermehrung führen zu einer morphologischen Veränderung der Zelle, die als zytopathischer Effekt mikroskopisch sichtbar wird [40]. Der Zellkern verformt sich, das Chromatin kondensiert entlang der inneren Kernmembran [41]. Durch eine Änderung der Membranpermeabilität kommt es zur Abkuglung der Zellen, der die Lyse im Rahmen des infektionsbedingten Todes der Zelle folgt [42, 43]. Neben seiner Interferenz mit der zellulären Homöostase über pro- und anti-apoptische Signalwege [41, 44] wird auch die direkte proteolytische Interaktion seiner Proteasen mit Proteinen z.B. der zelleigenen Proteinbiosynthese [45-50] oder des Zytoskeletts [51, 52] für die Zytopathogenität des Virus verantwortlich gemacht. So kann etwa die virale Protease 2A durch Spaltung des zytoskelettalen Proteins Dystrophin die kardiale Myozyte nachhaltig schädigen [51, 52]. Durch proteolytische Spaltung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4G (*eukaryotic initiation factor 4G*, eIF4G) [45-47, 53] sowie des Poly(A)-Schwanz-bindenden Proteins PABP (*poly(A)-binding protein*) [48-50] können

die Proteasen 2A und 3C *Cap*-abhängige Translationsvorgänge in der Wirtszelle blockieren und damit die zelluläre Proteinsynthese unter gleichzeitiger Aufrechterhaltung der *Cap*-unabhängigen Translation viraler RNA verhindern (*Host cell shut-off*).

Der akuten Phase der Infektion folgt eine subakute Phase, die durch eine starke Aktivität des Immunsystems gekennzeichnet ist. In dieser Phase erfolgt eine Schädigung des Herzmuskels neben dem direkten Einfluss der viralen Proteasen und der virusbedingten Zytolyse auch durch eine oftmals überschießende Immunantwort [22, 39, 54, 55]. Der Virusinvasion tritt zuerst das angeborene Immunsystem entgegen. Im Rahmen einer infektionsbedingten Inflammationsreaktion kommt es zu einer ausgeprägten Infiltration des Gewebes mit reaktiven Entzündungszellen wie Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK) [55, 56], der vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin 2 (IL-2) und Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [39, 57] und konsekutiv zu einer gesteigerten Aktivität matrixdegradierender Enzyme, den Matrixmetalloproteinasen (MMPs) [57]. Dieser ersten Welle einer unspezifischen Immunantwort folgt eine zweite Verteidigungswelle aus T-Helfer (TH) -Lymphozyten und zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) als Teil der spezifischen, adaptiven Immunabwehr [39, 58]. Anhaltende inflammatorische Prozesse, damit verbundene negativ inotrope Effekte durch sezernierte Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 [59, 60], die fortschreitende Zerstörung der Extrazellulärmatrix [57, 61, 62] sowie T-Zell-vermittelte destruktive Immunprozesse [54, 55, 63] führen dabei zu einer fulminanten Myokardschädigung. Diese Phase der Myokarditis ist durch im Herzmuskel fokal bzw. diffus verteilte, herdförmige Läsionen mit Immunzellinfiltrat gekennzeichnet (Abb. 4A). Mit zunehmender Reaktion der adaptiven Immunabwehr kann jedoch in der Regel die sich ausbreitende Infektion eingedämmt werden [64, 65]. Es kommt meist innerhalb weniger Wochen zu einer vollständigen Viruseliminierung aus dem Organismus und einer in den meisten Fällen folgenlosen Ausheilung der akuten Herzmuskelentzündung [32, 64, 66, 67]. Aufgrund fehlender kardiomyozytärer Regeneration sowie im Rahmen der Defektheilung fortschreitender Fibrosierungsprozesse kann es jedoch auch zu einer bleibenden Störung der Myokardfunktion kommen.

Bei sehr wenigen Patienten kommt es jedoch nach der akuten Infektionsphase zu keiner vollständigen Viruseliminierung [32, 64, 67]. In Abhängigkeit von der Virulenz des Erregers [68], dem Immunstatus des Wirts [69, 70] sowie weiteren, bislang größtenteils ungeklärten Faktoren [71] gelingt es dem Virus, sich der Überwachung durch das

Immunsystem zu entziehen und die Inflammationsreaktion chronisch aufrecht zu erhalten oder in eine persistente Infektion ohne entzündliche Begleitreaktion überzugehen [25, 64]. Anhaltende intrakardiale Inflammationsprozesse und eine progrediente Fibrose im Krankheitsverlauf der chronische Myokarditis führen dabei zu einer zunehmenden Dilatation und Funktionseinschränkung des linken Ventrikels unter dem klinischen Bild einer inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie (DCMi) mit schwerster Herzinsuffizienz im Endstadium. Auch nach primärer Viruselimination können diese chronischen Entzündungsprozesse, offenbar aufgrund immunpathogenetischer Mechanismen, anhalten und über einen langen Zeitraum das Myokard zunehmend schädigen [72]. Eine coxsackievirale Persistenz kann auch zu dem Krankheitsbild einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (Abb. 4C) ohne entzündliche Veränderungen im Myokard führen [27, 32, 64, 73, 74]. Dabei scheint das virale Genom selbst einen direkten kardiomyozytopathischen Effekt auszuüben, sodass es bei latenter Infektion mit restringierter Replikation auch ohne zytolytische Freisetzung infektiöser Viren zu einer fortlaufenden Myokardschädigung kommt [27, 75]. Virale Kardiomyopathien können sich zu einer lebensbedrohenden, progressiven Erkrankung entwickeln, charakterisiert durch eine Vergrößerung der Herzkammern, myokardiale und ventrikuläre Dysfunktion und schließlich Herzversagen. Mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von unter 40% [26, 76] ist die Prognose einer klinisch manifesten DCM sehr ungünstig; Ultima Ratio ist nicht selten eine Herztransplantation.

## 1.2 RNA-Interferenz als Therapieoption

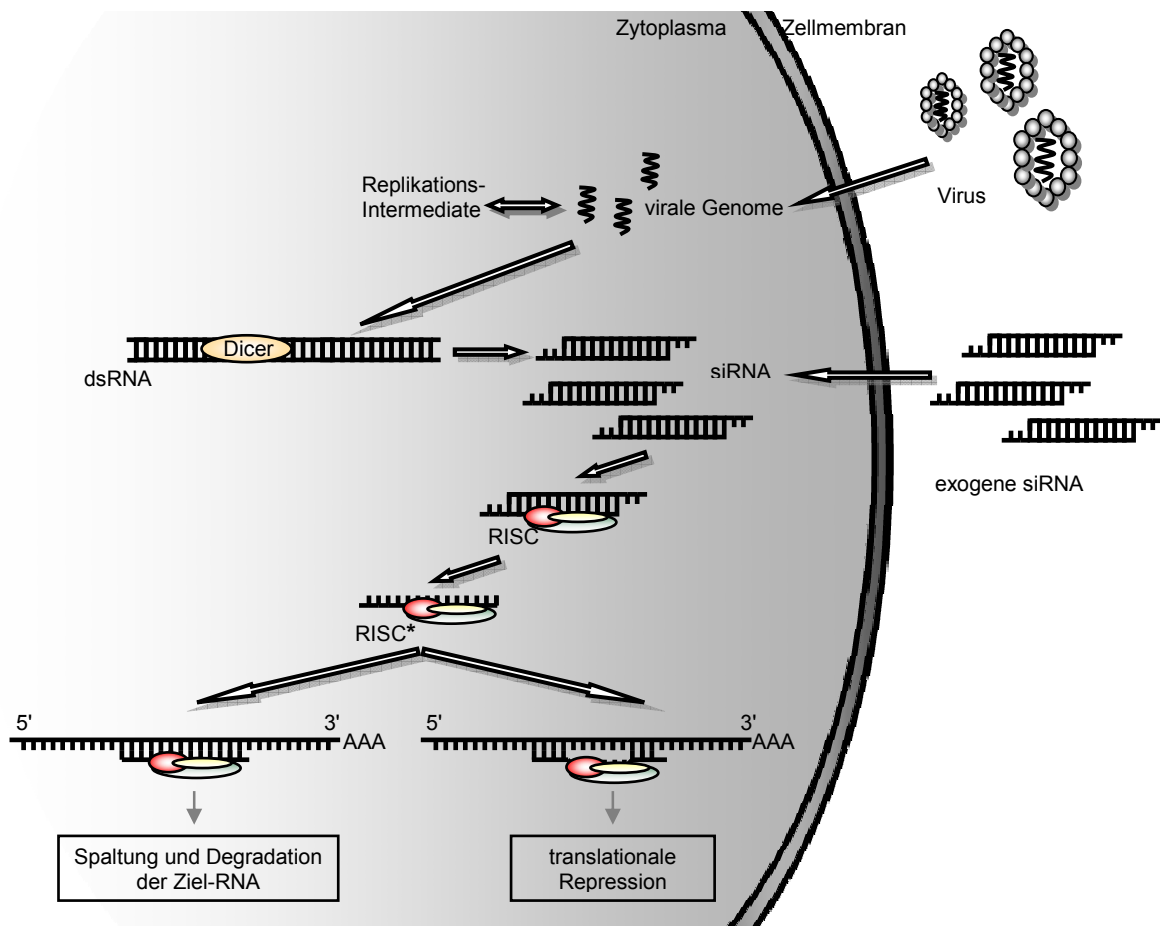
Die derzeitigen therapeutischen Möglichkeiten bei Infektionen mit CVB3 beschränken sich vor allem auf rein symptomatische Maßnahmen zur Behandlung der Herzinsuffizienz und auftretender Rhythmusstörungen [33, 77]. Als kausale Therapiestrategien werden Immunsuppression bei chronischer Inflammation und Viruselimination bei Viruspersistenz durch  $\beta$ -Interferon Gabe im Rahmen randomisierter Studien wie der BICC-Studie (*Betaferon® In Patients with Chronic Viral Cardiomyopathy*) klinisch überprüft. Spezifische Maßnahmen zur Prävention bzw. Therapie coxsackieviraler Infektionen sind bislang jedoch nicht verfügbar. Aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität insbesondere bei immunsupprimierten Patienten und Kindern ist die Entwicklung einer spezifischen anti-coxsackieviralen Therapie jedoch von besonderer medizinischer sowie ökonomischer Relevanz. Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) als natürlicher

Verteidigungsmechanismus der Zelle eröffnet hierfür eine neue und vielversprechende Ansatzmöglichkeit.

### 1.2.1 Mechanismus und therapeutisches Potential der RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz ist ein hochkonservierter, endogener Mechanismus zur Regulation der Genexpression durch sequenzspezifische RNA-Degradation. Erstmals durch Fire *et al.* als unerwartete Anomalie der *Antisense-Inhibition* der Genexpression in *Caenorhabditis elegans* entdeckt [78], erwies sich der Vorgang der RNA-Interferenz auch in zahlreichen höheren Organismen konserviert [79-81]. Das posttranskriptionale *gene silencing* (PTGS) wird durch lange, doppelsträngige RNA (dsRNA) Moleküle ausgelöst (Abb. 5). Gelangen diese in die Zelle, so werden sie durch eine dsRNA-spezifische, Dicer genannte Endonuklease in doppelsträngige *short interfering RNA* (siRNA) Moleküle von 21-23 Nukleotiden Länge prozessiert [80, 82, 83] und an den RNAi-Effektor-Komplex, einen *RNA-induced silencing complex* (RISC) genannten Multiprotein-Komplex [82, 84], übergeben. Innerhalb des RISC-Komplexes wird das doppelsträngige siRNA-Molekül entwunden und der Passagier- oder *sense* Strang aus dem Komplex entlassen. Der verbliebene Leit- oder *antisense* siRNA-Strang dirigiert den nunmehr aktivierten, siRNA-programmierten RISC-Komplex (RISC\*) zu vollständig oder nahezu vollständig komplementären RNA-Molekülen und hybridisiert via Watson-Crick-Basenpaarung. Schließlich erfolgt die präzise und höchst sequenzspezifische Spaltung der Ziel-RNA 10 Nukleotide stromabwärts des 5'-Endes des komplementären Stranges [85-87] durch die Endonuklease Argonaute 2 (AGO2), die Hauptkomponente der RISC *Slicer* Aktivität [88-91], gefolgt von der Nuklease-Degradation der geschnittenen RNA. Partielle Komplementarität zwischen einer siRNA-Sequenz und der *messenger* RNA führt dabei in Abhängigkeit vom Grad der Komplementarität zur translationalen Repression oder Destruktion des Zieltranskripts über einen microRNA-ähnlichen Mechanismus [92]. MicroRNAs (miRNAs) sind eine hochkonservierte Klasse an natürlich vorkommenden, kleinen, nicht-kodierenden RNA-Molekülen, die im Zellkern als lange Vorläuferstrukturen exprimiert werden. Diese primären miRNA (pri-miRNA) Transkripte werden in ungefähr 70 Nukleotid lange *precursor* miRNA (pre-miRNA) genannte Haarnadelstrukturen [93] prozessiert und durch das Karyopherin Exportin-5 über die Poren der Kernmembran in das Zytoplasma exportiert. Nach der Dicer-abhängigen Entfernung der Schleifenregion der pre-miRNA Haarnadelstruktur wird der reife miRNA-Duplex auf RISC geladen. Dort reguliert er posttranskriptional die endogene Genexpression unter Verwendung

der zellulären RNAi-Maschinerie entweder durch spezifische mRNA-Degradation oder translationale Repression eines Zielgens mit partieller Sequenzkomplementarität zur miRNA innerhalb der 3' nicht-kodierenden Region (3' UTR). Da sich die RNA-Interferenz vermutlich, neben ihrer Beteiligung an grundlegenden zellulären Prozessen bei der Determinierung von Zellschicksal und Differenzierung [94, 95], als endogener Verteidigungsmechanismus zur Bekämpfung exogener, genetischer Elemente wie Transposons und insbesondere viraler, doppelsträngiger RNA-Moleküle [96] entwickelt hat (Abb. 5), eröffnete die Entdeckung dieses ubiquitären Signaltransduktionsweges völlig neue Möglichkeiten für dessen gezielten Einsatz sowohl in der Grundlagenforschung als auch zu therapeutischem Zweck.



**Abb. 5: Mechanismus der RNA-Interferenz.** Als natürlicher Abwehrmechanismus der Zelle erkennt die RNAi-Maschinerie eindringende Fremd-Nukleinsäure wie insbesondere virale, doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) oder Replikations-Intermediate. Gelangen sie in die Zelle, so werden sie durch Dicer in siRNA-Moleküle prozessiert und an RISC übergeben. Innerhalb des RISC-Komplexes wird die siRNA entwunden und der Passagier-Strang entlassen. Der verbliebene Leit-siRNA-Strang dirigiert den nunmehr aktivierten RISC\*-Komplex zu vollständig oder nahezu vollständig komplementären RNA-Molekülen, wo er zur translationalen Repression oder Spaltung der Ziel-RNA führt. Durch die Einführung exogener siRNA kann der endogene RNAi-Signaltransduktionsweg experimentell zur Regulation der Genexpression ausgenutzt werden (nähere Einzelheiten siehe Text).



Als eine der größten wissenschaftlichen Entdeckung dieses Jahrzehnts entwickelte sich die Technik der RNA-Interferenz innerhalb kürzester Zeit zu einem unverzichtbaren Werkzeug bei der funktionellen Analyse niederer Organismen. In Säugetierzellen schlugen jedoch die ersten Versuche zur gezielten Inhibition einzelner Gene durch Behandlung mit langen dsRNA-Molekülen fehl. Die Einführung doppelsträngiger RNA-Moleküle mit einer Länge von über 30 Nukleotiden löste eine unspezifische Typ 1 Interferon-Antwort aus [97], die zu unspezifischer RNA-Degradation [98], Inhibition der Proteinsynthese [99] und letztendlich zum Zelltod führte [100]. Erst die bahnbrechende Entdeckung von Elbashir et al., dass die sequenzspezifische Degradation ebenso durch Transfektion synthetischer, 21-23bp langer siRNA-Moleküle ohne Interferenz mit zellulären Funktionen induziert werden kann [80], ermöglichte den Einsatz der RNAi auch in höheren Eukaryonten. Unter Nachahmung eines Dicer-Produkts betreten siRNA-Moleküle den RNA-Interferenz-Signalweg stromabwärts der Interferon-Signaltransduktionskaskade und umgehen damit meist die Stimulierung einer unspezifischen Stressreaktion (Abb. 5). Neben siRNAs können auch *short hairpin* RNAs (shRNAs) als Auslöser für das *gene silencing* dienen. Diese doppelsträngigen Haarnadelstrukturen werden ähnlich den miRNAs durch Dicer in funktionelle siRNAs prozessiert [101-103]. Beide Arten RNAi-Effektor-Moleküle können entweder durch chemische Synthese [80] oder Vektor-vermittelte Expression [104] generiert werden.

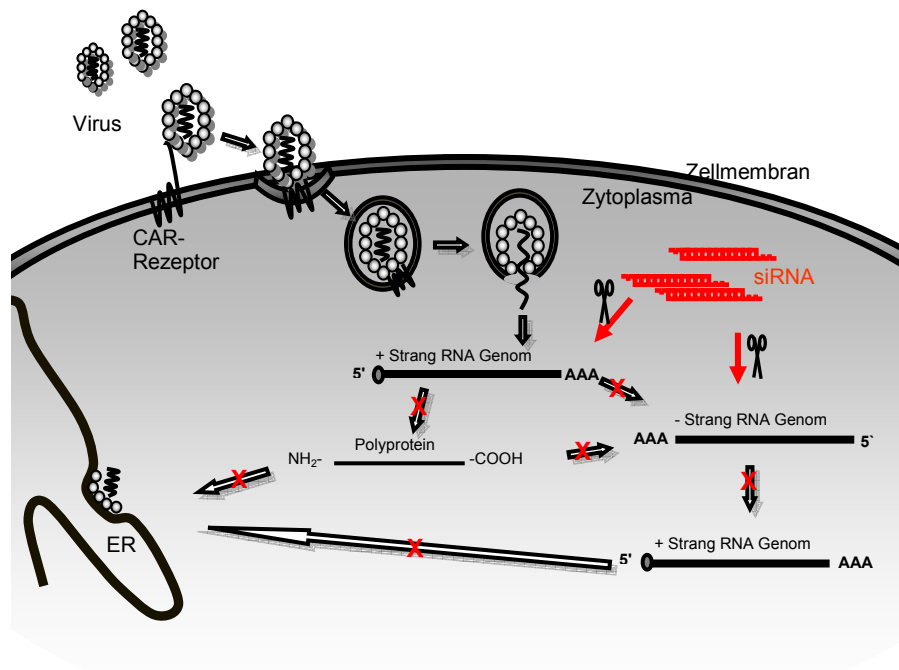
Die voranschreitende Entschlüsselung ganzer Genome im Rahmen humaner [105] sowie nicht-humaner Genomprojekte [106, 107] machte nahezu jedes RNA-Molekül für eine Nukleinsäure-basierte Intervention angreifbar. So erwies sich die RNAi-Technologie innerhalb weniger Jahre nicht nur als exzellentes experimentelles Werkzeug zur funktionellen Analyse zellulärer Prozesse wie Apoptose [108, 109] und Zellzyklusregulation [110], sondern ebenso als unverzichtbares und innovatives therapeutisches Werkzeug für Arzneimittelforschung und -entwicklung. Die Evidenz der durch siRNA übertragenen genomischen Immunität weckte großes Interesse, diesen natürlich auftretenden Vorgang im Kampf gegen eine Vielzahl schwer behandelbare Erkrankungen aus den Bereichen neurodegenerative Erkrankungen [111] wie Alzheimer, Huntington und Parkinson, Makuladegeneration, Autoimmun-Erkrankungen, dominante genetische Defekte und Krebs [112-115] auszunutzen. Die RNAi-vermittelte Inhibierung verschiedener Onkogene und Krebs-assoziiierter Gene erwies sich als höchst effizient zur Attenuierung von Tumorüberleben, Tumorwachstum, Tumordinvasion sowie Metastasierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [116, 117]. Angesichts ihrer biologischen Funktion in der Abwehr viraler

Angriffe [96], stellt die RNAi einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Wirkstoffe insbesondere zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten dar. Mögliche Ziele für eine RNAi-basierte anti-virale Therapie sind dabei sowohl virale, für die Virusreproduktion essentielle Gene als auch zelluläre Gene, die in den viralen Lebenszyklus involviert sind. Mittels RNAi *in vitro* inhibierte Pathogene von hoher klinischer Relevanz umfassen derzeit u.a. das humane Immundefizienzvirus [118-127], das Influenza Virus [128], das Herpes Simplex Virus [129], das Respiratorische Syncytial Virus (RSV) [130] und das Hepatitis B Virus [131-134]. Auch das dem Coxsackievirus nahe verwandte Poliovirus konnte mittels gegen die Kapsidregion sowie die 3D Polymerase gerichteter siRNA *in vitro* signifikant inhibiert werden [135, 136]. Bisher veröffentlichte *in vivo*-Nachweise der RNAi-vermittelten intrazellulären Immunität befassen sich mit dem Hepatitis B Virus [134, 137-139], Hepatitis C Virus [140, 141], Influenza Virus [142, 143], und dem Respiratorischen Syncytial Virus [144, 145]. Klinische Studien zur Evaluierung von Sicherheit und Verträglichkeit RNAi-basierter Therapeutika wurden begonnen. Zwei Phase 1 Studien eines Therapeutikums zur Behandlung RSV-assoziiierter Erkrankungen wurden bereits abgeschlossen und in gesunden Probanden als sicher und gut verträglich eingestuft [146]. In Anbetracht dieser vielversprechenden Forschungsergebnisse wurde eine klinische Studie der Phase 2 zur Prüfung von Sicherheit, Verträglichkeit und anti-RSV-Aktivität im Erkrankungsfall initiiert, die bereits erste ermutigende Ergebnisse erbrachte (Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge MA, USA).

### 1.2.2 Anti-coxsackievirales Potential der RNA-Interferenz

Coxsackievirale Persistenz nach einer akuten Infektion kann zur Pathogenese einer chronischen Herzmuskelerkrankung und letztlich dem Krankheitsbild einer dilatativen Kardiomyopathie führen. Dabei scheint die kardiale Gewebeschädigung neben dem direkten kardiomyozytopathischen Effekt des viralen Genoms [27, 75] auch infolge der durch Viruspersistenz ausgelösten immunmodulatorischen Mechanismen [65] zu erfolgen. Ein Therapiekonzept zur Förderung der Viruseliminierung sollte daher als vordringliche Strategemaßnahme zur Behandlung coxsackieviraler Erkrankungen gewählt werden. Die Entdeckung der RNAi-basierten Viruselimination eröffnete hierfür einen potentiellen Ansatzpunkt. Neben viralen, für die Virusreproduktion essentiellen Genen sowie zellulären Genen, die in den viralen Lebenszyklus involviert sind, stellt dabei das mRNA-ähnliche Genom des Coxsackievirus B3 selbst sogar in den nicht-kodierenden Sequenzbereichen ein

besonders vielversprechendes, therapeutisches Ziel für eine Nukleinsäure-basierte Intervention dar. Die Applikation spezifischer, gegen das coxsackievirale Genom gerichteter Moleküle sollte dabei zur Degradation der viralen Positivstrang-RNA sowie der Negativstrang-Intermediate und damit zu einer vollständigen Abschaltung der nachfolgenden Virusmaturation (Abb. 6) führen.



**Abb. 6: siRNA-vermittelte Interferenz mit dem coxsackieviralen Infektionszyklus.** Die Applikation spezifischer, gegen das coxsackievirale Genom gerichteter siRNA-Moleküle sollte zur Degradation der viralen Positivstrang-RNA sowie der Negativstrang-Intermediate und damit zu einer vollständigen Abschaltung der nachfolgenden Virusmaturation führen (CAR Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor, ER endoplasmatisches Retikulum; nähere Einzelheiten siehe Text).

### 1.3 Ziele der Dissertation

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte auf Basis der RNA-Interferenz ein hochinnovativer Therapieansatz zur Behandlung coxsackieviraler Infektionen entwickelt und für die klinische Anwendung nutzbar gemacht werden. Ziel des ersten Projektabschnittes war die Evaluierung des therapeutischen Potentials der anti-coxsackieviralen RNAi hinsichtlich einer Attenuierung der viralen Replikation, Proteinexpression sowie Zytotoxizität in einer permissiven Zelllinie sowie im experimentellen Tiermodell. Der zweite Teil des Projektes beschäftigte sich mit verschiedensten Facetten einer klinischen Implementierung der

therapeutisch ausgerichteten RNAi zur wirksamen Behandlung coxsackieviraler Infektionen beim Menschen. Im Vordergrund standen hierbei Faktoren, wie die Selektion der genomischen Zielsequenz, die Entstehung einer resistenten Viruspopulation sowie die siRNA intrinsische Nuklease-Stabilität, die das anti-virale Potential der RNAi signifikant beeinflussen könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, biochemische Reagenzien, *Kits*

Agarose SeaKem LE	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Agarose Seaplaque (Low melting)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Sparks, MD, USA
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	USB Europe GmbH, Staufen
<i>Colorimetric Cytotoxicity Detection Kit</i> (LDH)	Roche, Mannheim
<i>DC (Detergent Compatible) Protein Assay Kit</i>	BioRad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA-Ladepuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA-Längenstandard ( <i>Gene ruler DNA ladder mix</i> )	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DTT (D,L-Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL-Nachweissystem	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA
Einbettmedium ( <i>Fluorescence Mounting Medium</i> )	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethanol	MerckKGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	Difco, Sparks, MD, USA
Hoechst-Farbstoff 33342	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kristallviolett (= Hexamethyl-p-Rosanilinchlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	AppliChem, Darmstadt
<i>mMessage mMachine™ Transcription Kit</i>	Ambion, Cambridgeshire, UK
Natrium-Ortho-Vanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NP-40 (= Nonidet® P-40)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nucleobond AX20	Macherey-Nagel, Düren
Oligofectamine Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinmarker SeeBlue Plus 2	Invitrogen, Karlsruhe
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR <i>Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Stripping-Lösung Re-Blot Plus Strong</i>	Chemicon, Hampshire, UK
<i>RNase Away</i>	Roth, Karlsruhe
RNeasy-Mini <i>Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Silencer™ siRNA Labeling Kit</i>	Ambion, Cambridgeshire, UK
SDS (20% wässrige Natrium-Dodecylsulfat-Lösung)	Biomol, Hamburg
Superfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Trizma® base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Borat-EDTA für Agarosegelelektrophorese	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Glycin-Gradientengel Novex® (4-20%)	Invitrogen, Karlsruhe
TBE Laufpuffer Novex® (5x)	Invitrogen, Karlsruhe
TBE-Urea-Polyacrylamid Gel Novex® (15%)	Invitrogen, Karlsruhe
TBE-Urea Sample Buffer Novex® (2x)	Invitrogen, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trockenmilch	AppliChem, Darmstadt
Trypton	Difco, Sparks, MD, USA
Tween 20 (= Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Diagonal GmbH & CoKG, Münster
ELISA-96well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<i>Glas Beads</i> (2,5mm dia)	BioSpec Products, Bartlesville, OK
Nitrocellulose-Membran Hybond ECL	GE Healthcare, München
Röntgenfilme Super RX Fujifilm	Siemens, Erlangen
<i>Western-Blot-Papier</i> (Whatman)	Whatman GmbH, Dassel

Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nambrecht
Zellkulturplatten 6-Loch	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellsieb 70µm Cell Strainer Nylon	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zweikammerobjektträger LabTek™ Permanox	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

### 2.1.3 Geräte

<i>Bead-Beater</i> Wig-L-Bug MSD	Crescent Dental Mfg Co, Elgin, IL
Biofuge fresco Heraeus	Kendro, Asheville, NC
Biofuge pico Heraeus	Kendro, Asheville, NC
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	HeraCell Heraeus, München
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
ELISA-Lesegerät (Biotrak II)	Amersham Biosciences, Freiburg
ELISA-Lesegerät (MR5000)	Dynatech, Guernsey, UK
Fluoreszenzmikroskop, invers	Leica, München
Gelelektrophoresekammer	MWG Biotech, Ebersberg
Homogenisator (Micra D8)	Art Labortechnik, Müllheim
Kamera AxioCam	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Axiovert 100 invers	Zeiss, Jena
Megafuge 1.0R Heraeus	Kendro, Asheville, NC
NALGENE™ Cryo 1°C <i>Freezing Container</i>	Nalgene/Nunc-International, Rochester, NY
PCR System Gene Amp 9600	Applied Biosystems, Weiterstadt
Spektrometer (Gene Quant pro)	Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilbank	Heraeus, München
Ultraschallbad SonorexSuper	Brandelin Electronic, Berlin
<i>Western-Blot SDS-Page-Elektrophorese Kammer</i> (XCell SureLock™)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Western-Blot XCell II Blot Modul</i>	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.4 Bakterien

DH5α kompetente E. coli #18265-017	Invitrogen, Karlsruhe
------------------------------------	-----------------------

### 2.1.5 Viren

- CVB3 H3: kardiotrope Woodruff-Variante des Coxsackievirus B3 (GenBank U57056) [68]
- CVB3-eGFP: *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) exprimierendes, infektiöses Coxsackievirus B3 [36, 147]

### 2.1.6 Zelllinien

- HeLa-Zellen: humane Zervix-Karzinom-Zellen (ATCC, Manassas, USA #CCL-2)
- COS-7-Zellen: Affen-Nierenzellen (ATCC, Manassas, USA #CRL-1651)

### 2.1.7 Zellkulturmedien, Zusätze, Reagenzien

- |                                      |                            |
|--------------------------------------|----------------------------|
| DMEM-Flüssigmedium #32430-100        | Invitrogen, Karlsruhe      |
| DMEM-Pulvermedium #52100-039         | Invitrogen, Karlsruhe      |
| Fötales Rinderserum (FBS) #26170-043 | Invitrogen, Karlsruhe      |
| Penicillin/ Streptomycin #15140-122  | Invitrogen, Karlsruhe      |
| Natrium Bicarbonat #25080060         | Invitrogen, Karlsruhe      |
| Natrium Pyruvat #11360-039           | Invitrogen, Karlsruhe      |
| Trypsin/ EDTA #25300-054             | Invitrogen, Karlsruhe      |
| OptiMEM-Medium #31985-047            | Invitrogen, Karlsruhe      |
| PBS #D-8537                          | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

### 2.1.8 Enzyme

- |                                      |                                      |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| ClaI Restriktionsenzym               | New England Biolabs, Frankfurt a. M. |
| Takara™ Taq Polymerase               | Chemicon, Hampshire, UK              |
| Superscript II Reverse Transcriptase | Invitrogen, Karlsruhe                |
| RNase A                              | Qiagen, Hilden                       |
| RNase H                              | Invitrogen, Karlsruhe                |



## 2.1.9 Antikörper

### Primärantikörper

anti-VP1: Kaninchen, polyklonal  
(Freundliche Gabe von Prof. Dr. Andreas Henke, Jena)  
1:500 in 1% Trockenmilch

anti-Actin (I-19): Ziege, polyklonal  
Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA, #sc-1616  
1:500 in 1% Trockenmilch

### Sekundärantikörper

anti-Ziege IgG: Rind, polyklonal, HRP konjugiert  
Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA, #sc-2350  
1:5000 in 5% Trockenmilch

anti-Kaninchen IgG: Esel, polyklonal, HRP konjugiert  
Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA, #sc-2313  
1:5000 in 5% Trockenmilch

(IgG = Immunglobulin G, HRP = *Horseradish* Peroxidase (Meerrettichperoxidase))

## 2.1.10 Plasmide

pH3 CVB3: Vektor: pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe)  
Insert: CVB3 H3 cDNA (GenBank U57056) [68]

pCVB3-eGFP: Vektor: pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe)  
Insert: CVB3 5' UTR / eGFP / CVB3 ORF – Fusionsgen  
Freundliche Gabe von Ralph Feuer, Ph.D. und J. Lindsay Whitton,  
M.D., Ph.D. (Scripps Research Institute, La Jolla, Californien) [36,  
147]

## 2.1.11 Oligonukleotide

### 2.1.11.1 siRNA

Geeignete siRNA-Zielsequenzen wurden unter Berücksichtigung publizierter Richtlinien von Reynolds *et al.* [148] mit Hilfe eines Web-gestützten Algorithmus ([http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)) identifiziert (Tabelle 1). Standard siRNAs wurden als 21 Nukleotid lange, duplex Oligonukleotide mit 3'-dTdT Überhängen von Dharmacon (Lafayette, Colorado, USA) in der *ready-to-use* Option erworben. Zur Bestimmung der *in vitro* bzw. *in vivo* Transfektionseffizienz wurden diese vom Hersteller zusätzlich am 5'-Ende des *sense* Stranges mit einem Fluorochrom (Cy3 bzw. Cy5) konjugiert. Als Kontrollen wurden siRNA-Moleküle mit Punktmutationen in der ursprünglichen coxsackieviralen Sequenz sowie eine kommerziell erhältliche *scrambled* siRNA (siRNA-SCR) von der Firma Ambion (Cambridgeshire, England, *Silencer Negative Control* No. 1 siRNA, #4610) gewählt. Die *Stealth*<sup>TM</sup> RNAi siRNAs wurden als 25 Nukleotid lange, duplex Oligonukleotide mit proprietären chemischen Modifikationen von Invitrogen (Karlsruhe) erworben. Dabei wurden die Standard siRNA-Sequenzen mit Hilfe eines von der Firma angebotenen Algorithmus (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/extend.do?pid=4306975426260353697>) in *Stealth*<sup>TM</sup> RNAi siRNA-Sequenzen konvertiert (Tabelle 1). Vor Verwendung wurden alle siRNA-Moleküle gemäß Herstellerangaben in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

### 2.1.11.2 Primer

Die Primer wurden, wenn nicht anders angegeben, über Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

#### Primer zur Evaluierung der coxsackieviralen Replikation siRNA-behandelter Zellen

CP1	5'- ACCTTTGTGCGCCTGTT -3'	Pos. 68-84	Sinn
CP2	5'- CACGGACACCCAAAGTA -3'	Pos. 546-562	Gegensinn

zugrundeliegende Nukleotidsequenz (Datenbank, Zugangsnummer): GenBank U57056

GAPDH-Primer-Set (Stratagene, La Jolla, Californien, USA #302047)

GAPDH_fwd	5'- CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA -3'	Pos. 152-175	Sinn
-----------	----------------------------------	--------------	------

GAPDH_rev	5'- TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC -3'	Pos. 749-726	Gegensinn
-----------	----------------------------------	--------------	-----------

zugrundeliegende Nukleotidsequenz (Datenbank, Zugangsnummer): GenBank BT006893

Tabelle 1: siRNA-Sequenzen

siRNA-Name	Sequenz <sup>1</sup>	Nukleotid Position <sup>2</sup>
<b>Standard-siRNA</b>		
siRNA- 2A <sup>α</sup>	5' – GGUGUGAGCAUGGUGUCAUdt dt –3' Sinn 3' – dt dtCCACACUCGUACCACAGUA –5' Gegensinn	3637-3657
siRNA- 2A <sup>β</sup>	5' – GAGAGUGAGUACUACCCUAdt dt –3' Sinn 3' – dt dtCUCUCACUCAUGAUGGGAU –5' Gegensinn	3551-3569
siRNA- 3C <sup>α</sup>	5' – GGAUGGUACAAACCUAGAA dt dt –3' Sinn 3' – dt dtCCUACCAUGUUUGGAUCUU –5' Gegensinn	5557-5575
siRNA- 3C <sup>β</sup>	5' – GACAGAGUAUGGUGAGUUCdt dt –3' Sinn 3' – dt dtCUGUCUCAUACCACUCAAG –5' Gegensinn	5419-5437
siRNA- 3D <sup>α</sup>	5' – CGAGUGCAGGUUACCCUUAdt dt –3' Sinn 3' – dt dtGCUCACGUCCAAUGGGAAU –5' Gegensinn	6252-6270
siRNA- 3D <sup>β</sup>	5' – GUUACUUGGACUAACGUCAdt dt –3' Sinn 3' – dt dtCAAUGAACCGUAUUGCAGU –5' Gegensinn	7010-7028
siRNA- VP1	5' – CCAGGAUGCACAGAUCCUAdt dt –3' Sinn 3' – dt dtGGUCCUACGUGUCUAGGAU –5' Gegensinn	2845-2863
siRNA- VP2	5' – CCAGACGUUGCCACAUGUAdt dt –3' Sinn 3' – dt dtGGUCUGCAACGGUGUACAU –5' Gegensinn	1115-1133
siRNA- 5'UTR <sup>α</sup>	5' – GUAACACACUCCGAUCAACdt dt –3' Sinn 3' – dt dtCAUUGUGUGAGGCUAGUUG –5' Gegensinn	116-134
siRNA- 5'UTR <sup>β</sup>	5' – UACAGACAUGGUGCGAAGAdt dt –3' Sinn 3' – dt dtAUGUCUGUACCACGCUUCU –5' Gegensinn	407-425
siRNA- 2A <sup>α neg. KO</sup>	5' – GGUGUGAGCGUAGUGUCAUdt dt –3' Sinn 3' – dt dtCCACACUCGCAUCACAGUA –5' Gegensinn	-
siRNA- 3C <sup>α neg. KO</sup>	5' – GGACGGCACCAACUUAGAA dt dt –3' Sinn 3' – dt dtCCUGCCGUGGUUGAUCUU –5' Gegensinn	-
siRNA- 3C <sup>β neg. KO</sup>	5' – UAUGCGAGUUACCAUGC dt dt –3' Sinn 3' – dt dtAUACCGUCAAAUGGUACG –5' Gegensinn	-
siRNA- 3D <sup>β neg. KO</sup>	5' – GUUACUUGGACCAACGCCAdt dt –3' Sinn 3' – dt dtCAAUGGACCUGGUUGCAGU –5' Gegensinn	-
siRNA- 3D <sup>β mut.</sup>	5' – GUUACUUGGAUAACGUCAdt dt –3' Sinn 3' – dt dtCAAUGAACCUUAUUGCAGU –5' Gegensinn	-
<b>modifizierte (Stealth) siRNA</b>		
siRNA- 3C <sup>α stealth</sup>	5' – GGUAUAGGAUGGUACAAACCUAGAA –3' Sinn 3' – CCUAUUCUACCAUGUUUGGAUCUU –5' Gegensinn	5551-5575
siRNA- 3C <sup>β stealth</sup>	5' – AGUGAAGACAGAGUAUGGUGAGUUC –3' Sinn 3' – UCACUUCUGUCUCAUACCACUCAAG –5' Gegensinn	5413-5437
siRNA- 3D <sup>β stealth</sup>	5' – AAUGAAGUUACUUGGACUAACGUCA –3' Sinn 3' – UUACUUCAAUGAACCGUAUUGCAGU –5' Gegensinn	7004-7028

<sup>1</sup> Punkt-mutierte Nukleotide sind rot gekennzeichnet.<sup>2</sup> zugrundeliegende Nukleotidsequenz (Datenbank, Zugangsnummer): GenBank U57056

Primer zur genotypischen Resistenzanalyse der nach siRNA-Behandlung entstandenen Viruspopulationen

3C <sup>α</sup> _ fwd	5'- GACCAACCATCCTGATGAATGACC -3'	Pos. 5493–5516 Sinn
3C <sup>α</sup> _ rev	5'- GTAATCCGTGACTTGTCCCACC -3'	Pos. 5728–5707 Gegensinn
3C <sup>β</sup> _ fwd	5'- GAATACCCAACCAGAAGCCCAAG -3'	Pos. 5310–5332 Sinn
3C <sup>β</sup> _ rev	5'- GCCCACCTATCATAAATGCCCAAC -3'	Pos. 5443–5466 Gegensinn
3D <sup>β</sup> _ fwd	5'- ACACCAGCAGACAAAGGGGAG -3'	Pos. 6977–6997 Sinn
3D <sup>β</sup> _ rev	5'- CCAATAAGCACAATGAGCGCA -3'	Pos. 7155–7175. Gegensinn

zugrundeliegende Nukleotidsequenz (Datenbank, Zugangsnummer): GenBank U57056

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 *In vitro* Untersuchungen

#### 2.2.1.1 Zellbiologische Methoden

##### 2.2.1.1.1 Kultivierung der HeLa- bzw. Cos-7-Zellen

Die Kultivierung der HeLa- bzw. Cos-7-Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in Dulbecco's-modifiziertem *Eagle* Medium (DMEM), das, soweit nicht anders angegeben, mit 100u/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin sowie 5% hitzeinaktiviertem, fötalen Rinderserum (FBS) supplementiert wurde. Das Medium wurde zwei- bis dreimal pro Woche gewechselt und die Zellen bei Erreichen der Subkonfluenz passagiert. Hierzu wurde der Zellrasen mit Phosphat-gepufferte Saline-Lösung (PBS) gewaschen und die Zellen mit 0,02ml/cm<sup>2</sup> Trypsin bei 37°C von der Wachstumsoberfläche gelöst. Nach Stoppen der Trypsinierungsreaktion mittels Zugabe eines äquivalenten Volumens serumhaltigem DMEM-Mediums wurde die Suspension kurz mit 600g bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend im Verhältnis 1:3 bis 1:5 weiter passagiert. Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte unter Zugabe von 10% DMSO im Isopropanol-gefüllten *Cryo Freezing Container* bei –70°C. Zur längerfristigen Konservierung wurden die Zellen bei –196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 2.2.1.1.2 (Ko-)Transfektion adhärenter HeLa-Zellen mit siRNA

Die Introduktion der siRNA in die HeLa-Zellen erfolgt mit Hilfe des lipid-basierten Transfektionsreagenz Oligofectamine. Hierfür wurden die Zellen in einer Dichte von  $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$  Wachstumsfläche ausgesät, so dass sie nach 24h eine Konfluenz von 30-40% erreichten. Zur Komplexbildung wurde je Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte mit einer Wachstumsfläche von  $9,5\text{cm}^2$  300pmol siRNA mit 4 $\mu\text{l}$  Oligofectamine gemischt und in serumreduziertem OptiMEM-Medium in einem Gesamtvolumen von 200 $\mu\text{l}$  für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit serumfreien DMEM und Zugabe von 800 $\mu\text{l}$  OptiMEM, wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Zum Verteilen der Komplexe wurde die Platte vorsichtig geschwenkt und für 4h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach einem Mediumwechsel mit serumhaltigem DMEM und einer weiteren 6-stündigen Inkubationsperiode, wurde die Transfektion zur Erhöhung der Effizienz wiederholt. Bei der Kotransfektion verschiedener siRNAs wurden 4 $\mu\text{l}$  des Transfektionsreagenz und jeweils 300 pmol jeder einzelnen siRNA in OptiMEM in einem Gesamtvolumen von 200 $\mu\text{l}$  aufgenommen. Fluoreszenzmikroskopische Analysen (siehe 2.2.1.4.2) erfolgten im Zweikammer-Objektträgersystem. Zur Komplexbildung wurde hierbei je Kammer mit einer Wachstumsfläche von  $4,2\text{cm}^2$  133pmol siRNA mit 1,8 $\mu\text{l}$  Oligofectamine gemischt und in serumreduziertem OptiMEM-Medium in einem Gesamtvolumen von 90 $\mu\text{l}$  inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit serumfreien DMEM und Zugabe von 360 $\mu\text{l}$  OptiMEM, wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben.

#### 2.2.1.1.3 Bestimmung der Proliferation siRNA-transfizierter Zellen nach CVB3-Infektion

Zur Bestimmung der zellulären Proliferation infizierter und/oder transfizierter HeLa-Zellen wurden 4 Zufallsansichten pro Ansatz und Zeitpunkt fotodokumentiert (Mikroskop: Axiovert 100, Zeiss; Vergrößerung: 100x). Die Zählung der adhärenen Zellen erfolgte software-basiert unter Verwendung der *IPLab for Windows* Version 3.7 Software (Scanalytics, Rockwell, Maryland, USA).

## 2.2.1.2 Virologische Methoden

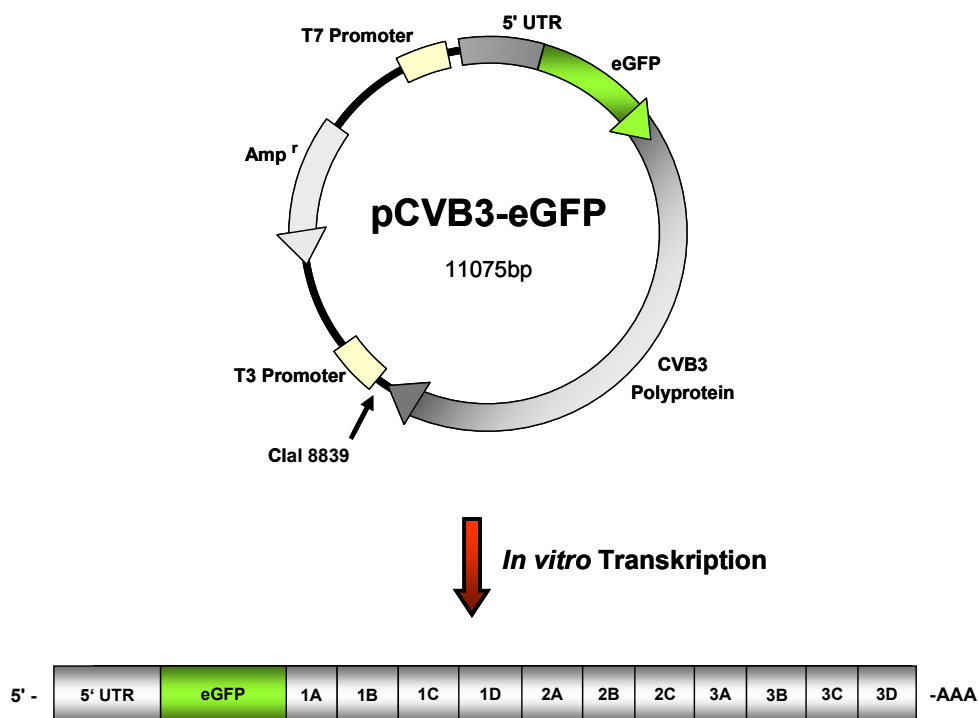
### 2.2.1.2.1 Herstellung und Propagierung des Wildtyp-CVB3-Virusstocks

Das in dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Virus stammte von einer infektiösen cDNA-Kopie der Woodruff-CVB3-Variante in dem Plasmid-Expressionsvektor pcDNA3 [68]. Die in diesem Vektor enthaltene CMV (Cytomegalie-Virus) Promoterstruktur erlaubt eine starke, konstitutive Expression der viralen Sequenz in eukaryotischen Zellen. Die Generierung des CVB3-Virusstocks erfolgte durch Transfektion des Plasmids in für CVB3 nicht permissive Cos-7-Zellen unter Benutzung von Superfect als Transfektionsreagenz. Die Transfektion erfolgte im 6-Loch-Zellkulturformat gemäß Herstellerangaben. Zur Komplexbildung wurde je Vertiefung 5µg des Plasmids mit 10µl Superfect gemischt, in serum- und antibiotikumfreien DMEM-Medium in einem Gesamtvolumen von 160µl für 5-10min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 1ml supplementiertem DMEM zu den Zellen gegeben. Der nach 48-stündiger Expression virushaltige Zellüberstand wurde nach Zentrifugation zur Inokulation von HeLa-Zellen für 48h bei 37°C in 6-Loch-Platten verwendet. Nach Ablösen der Zellen mit einem Zellkratzer vom Plattenboden in den Überstand wurde das in den Zellen befindliche Virus durch dreimaliges Einfrieren (-70°C) und Auftauen der Zellsuspension freigesetzt. Zelldebris wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 800g entfernt und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert. Zur weiteren Vermehrung wurden HeLa-Zellen mit einer 80%-igen Konfluenz in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75cm<sup>2</sup> mit je 1 ml der Virussuspension inokuliert. Nach 1h Inkubation bei 37°C wurde das Kulturmedium ohne vorherige Entfernung des initialen Inokulums auf 7ml mit DMEM aufgefüllt. Nach Sichtbarwerden eines zytopathischen Effekts bei ca. 50% der Zellen (nach ca. 8-16h), wurden die Zellen mit einem Zellkratzer vom Plattenboden in den Überstand abgelöst und das in den Zellen befindliche Virus durch dreimaliges Einfrieren (-70°C) und Auftauen der Zellsuspension freigesetzt. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch 30-minütige Zentrifugation bei 800g wurde die Viruspräparation anschließend zur Plaque-Aufreinigung (siehe 2.2.1.2.4) eingesetzt.

### 2.2.1.2.2 Herstellung eines rekombinanten CVB3-eGFP-Virusstocks

Für die Herstellung eines rekombinanten, eGFP-exprimierenden CVB3-Virusstocks wurde das von Ralph Feuer, Ph.D. und J. Lindsay Whitton, M.D., Ph.D. (Scripps Research

Institute, La Jolla, Californien, USA) [36, 147] freundlicherweise zur Verfügung gestellte pCVB3-eGFP-Plasmid (Abb. 7) verwendet. Es enthielt neben einem Ampicillin-Resistenz-Gen ( $Amp^r$ ) ein Fusionsgen, zusammengesetzt aus der CVB3 5' UTR sowie dem für eGFP sowie das CVB3-Polyprotein kodierenden offenen Leserahmen. Da pCVB3-eGFP in eukaryotischen Zellen nur eine sehr geringe Promoteraktivität aufweist, wurde zunächst virale cRNA (*complementary RNA*) generiert. Hierfür besaß das für die *in vitro* Transkription konstruierte Ausgangsplasmid das Fusionsgen flankierende T7 und T3 RNA Polymerase Promotoren, wobei die Verwendung des stromaufwärts gelegenen T7 Polymerase Promoters für die virale cRNA-Synthese zur einer Generierung viraler Positivstränge führte. Durch Linearisierung des Vektors an einer stromabwärts des *Inserts* liegenden ClaI-Restriktionsschnittstelle vor der *in vitro* Transkription wurde dabei die Entstehung extrem langer und heterogener Transkripte durch sogenannte *rolling circle transcription* vermieden. Rekombinante, eGFP-exprimierende Virusstocks wurden anschließend durch Transfektion der synthetisierten viralen RNA in empfängliche HeLa-Zellen generiert.



**Abb. 7: Ausgangsplasmid pCVB3-eGFP zur Generierung eines rekombinanten, eGFP-exprimierenden CVB3-Virusstocks.** Zur Herstellung des rekombinanten Virusstocks wurde das Plasmid pCVB3-eGFP verwendet. Neben einem Ampicillin-Resistenz-Gen ( $Amp^r$ ) enthielt das für die *in vitro* Transkription konstruierte Ausgangsplasmid ein von T7 und T3 RNA Polymerase Promotoren flankiertes CVB3 5'UTR – eGFP – CVB3 *open reading frame* – Fusionsgen. Die Verwendung des T7 Polymerase Promoters stromaufwärts des Fusionsgens führte zur Synthese des viralen Positivstranges. Die stromabwärts bei Basenpaar (bp) 8839 liegende ClaI-Restriktionsschnittstelle diente zur Linearisierung des Vektors vor der cRNA-Synthese (nähere Einzelheiten siehe Text).

### Plasmid-Präparation

10ng des Plasmids wurden in 50µl kompetente E.coli Bakterien (DH5α) durch Hitzeschock bei 42°C für 90s transformiert. Nach Überführung in 950µl antibiotikumfreies LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) und 1h Inkubation bei 37°C, wurden 100µl des Ansatzes auf einer LB-Agarplatte (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 15g/l Bacto-Agar, 50µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus den über Nacht gewachsenen Kolonien mittels eines modifizierten Verfahrens der alkalischen Lyse [149] mit anschließender Isopropanolpräzipitation der DNA. Hierzu wurden 3ml LB-Medium mit 50µg/ml Ampicillin mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 200upm und 37°C inkubiert. Nach Überführung in ein Eppendorfreaktionsgefäß wurde die Bakteriensuspension anschließend bei 2500g und Raumtemperatur für 1min zentrifugiert und das so gewonnene Bakterienpellet in 300µl Puffer P1 (50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8, 400µg/ml RNase A) resuspendiert. Zur Lyse wurde 300µl Puffer P2 (0,2N NaOH, 1% SDS) zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Präzipitation der Proteine durch Zugabe von 300µl eiskaltem Puffer P3 (3M Natriumacetat pH 4,8) und 10min Inkubation auf Eis wurde das Zelldebris 30min bei 16000g und 4°C abzentrifugiert. 800µl des proteinfreien Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend zur Fällung der DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt.

### *in vitro* Transkription

Zur Linearisierung des rekombinanten Plasmids pCVB3-eGFP wurden 20µg der aufgereinigten DNA mit 1 *Unit* ClaI pro µg DNA gemäß Herstellerangaben verdaut. Das linearisierte Plasmid wurden mittels des Nucleobond AX 20 *Purification Kit* aufgereinigt und am Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260nm quantifiziert. Die anschließende *in vitro* Transkription mit T7 RNA Polymerase erfolgte unter Verwendung des *mMessage mMachine* Transkriptions-*Kits* von Ambion. Zur RNA-Synthese wurden 1µg ClaI linearisierter pCVB3-eGFP-DNA, 10µl 2x NTP/*Cap* Mix, 1,5µl GTP sowie 2µl Enzym Mix (T7) in 1x Reaktionspuffer mit einem Gesamtvolumen von 20µl angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 2,5h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 30µl Nuklease-freiem Wasser wurde die synthetisierte RNA anschließend mit 25µl LiCl Präzipitationslösung (7,5M LiCl, 50mM EDTA) bei -20°C für 30min präzipitiert, 15min bei 16000g bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet



mit 70% Ethanol gewaschen und in 22µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die cRNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt.

### Herstellung und Propagierung des rekombinanten Virusstocks

Die Generierung eines rekombinanten CVB3-Virusstocks erfolgte durch Transfektion der cRNA in HeLa-Zellen unter Benutzung von Lipofectamine 2000 als Transfektionsreagenz. Hierfür wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  Wachstumsfläche in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, so dass sie nach 24h eine Konfluenz von 80% erreichten. Zur Komplexbildung wurde je Vertiefung 1µg CVB3-eGFP-RNA mit 4µl Lipofectamine gemischt und in serumreduziertem OptiMEM-Medium in einem Gesamtvolumen von 200µl für 15-30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 1ml vorgewärmten OptiMEM-Medium und Zugabe von 800µl OptiMEM, wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Zum Verteilen der Komplexe wurde die Platte vorsichtig geschwenkt und für 3h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen und Mediumwechsel mit serumhaltigem DMEM wurden die Platten für 8-16h, bis zur Ausbildung eines deutlich sichtbaren zytopathischen Effekts bei etwa 50% der Zellen, im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen mit einem Zellkratzer vom Plattenboden in den Überstand wurde das in den Zellen befindliche Virus durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen der Zellsuspension in einem Trockeneis-Ethanol-Bad freigesetzt. Zelldebris wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 800g entfernt, der Überstand (Virusstock Passage 1) in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und zur weiteren Infektion verwendet. Hierbei wurden HeLa-Zellen mit einer 80%-igen Konfluenz in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von  $175 \text{cm}^2$  mit der aus je 2 Vertiefungen der 6-Loch-Zellkulturplatten gepoolten Virussuspension inokuliert. Durch die Infektion der Zellen mit einer relativ hohen *Multiplicity of Infection* (MOI, entspricht dem zahlenmäßigen Verhältnis von Viruspartikel zu Zielzelle), wurde dabei die virale Replikationsrate möglichst gering gehalten, um hochtitrige CVB3-eGFP-Präparationen mit hoher Reinheit zu produzieren. Nach 1h Inkubation bei 37°C wurde das Kulturmedium ohne vorherige Entfernung des initialen Inokulums auf 20ml aufgefüllt. Nach Sichtbarwerden eines zytopathischen Effekts bei ca. 50% der Zellen (nach ca. 8-16h), wurden die Zellen wiederum mit einem Zellkratzer vom Plattenboden in den Überstand abgelöst und das in den Zellen

befindliche Virus durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen der Zellsuspension freigesetzt. Zelldebris wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 800g entfernt, der Überstand (Virusstock Passage 2) in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und bei -70°C gelagert. Der Titer des CVB3-eGFP-Virusstocks wurde mittels PFA bestimmt (siehe 2.2.1.2.3). Die Bewertung der erhaltenen Viruspräparationen erfolgte durch Untersuchung der Gesamtpopulation hinsichtlich Expression von eGFP in Abhängigkeit von der Viruspartikelmenge mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie PFA. Sie ergab eine eGFP-Expressionsrate von nahezu 98%.

#### 2.2.1.2.3 *Plaque Forming Assay* (PFA)

Die Bestimmung der Virustiter erfolgte durch den Plaque-Test [68], bei dem ein konfluent Gewebekulturzellrasen mit Virusverdünnungen inokuliert und anschließend mit Agarose überschichtet wird. Durch Überschichtung des Zellrasens kann die Virusausbreitung nur in direkt umgebende Zellen erfolgen. Dies führt zu Entstehung lokal begrenzter lytischer Herde (Plaques) die durch Färbung des Zellrasens mit Kristallviolett makroskopisch sichtbar gemacht und ausgezählt werden können.

Für den Plaque-Test wurden HeLa-Zellen in einer Dichte von  $6 \times 10^4/\text{cm}^2$  Wachstumsfläche in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Von der zu titrierenden Viruslösung wurde eine Verdünnungsreihe in DMEM-Medium hergestellt, von der 300µl je Verdünnungsstufe auf den Zellrasen bei Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz übertragen wurden. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit leichtem Schwenken alle 10min wurden die Kulturen mit je 3ml eines 1:1-Gemisch von 1,3%-iger Seaplaque-Agarose und 2x DMEM (2,5% w/v DMEM-Pulvermedium; 0,04% FBS; 0,02% Penicillin-Streptomycin; 90mM Natrium Bicarbonat; 2mM Natrium Pyruvat) überschichtet und für weitere 48h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine 5-minütige Behandlung mit einem 1:3-Essigsäure-Methanol-Gemisch fixiert. Nach vorsichtiger Entfernung der Agarose wurden die Plaques durch Färbung der Zellen mit Kristallviolett (1,5% w/v in PBS) sichtbar gemacht. Anhand des ausplattierten Volumens und der ermittelten Plaque-Zahl bezogen auf die verwendete Verdünnung wurde der Virustiter in pfu/ml (*Plaque Forming Unit/ml*) berechnet. Ein Plaque wird dabei auf die

Infektion mit einem infektiösen viralen Partikel als Plaque-formende Einheit (*Plaque Forming Unit*, pfu) zurückgeführt.

#### 2.2.1.2.4 Plaque-Aufreinigung

Die Plaque-Aufreinigung einer Virussuspension erfolgte ähnlich dem Plaque-Test (siehe 2.2.1.2.3) durch Inokulation eines 80-90% konfluenten Gewebekulturzellrasens mit Virusverdünnungen und anschließender Überschichtung mit Agarose. Nach 48h Inkubation wurden jedoch die mithilfe eines Lichtmikroskopes sichtbaren Plaques unter der Sicherheitswerkbank mit einer abgeschnittenen, sterilen Pipettenspitze aus der Agarose ausgestochen, in 1ml DMEM aufgenommen und das nach dreimaligem Einfrieren (-70 °C) und Auftauen aus den lytischen Zellen freigesetzte Virus durch Infektion frischer HeLa-Zellen propagiert.

#### 2.2.1.2.5 Coxsackievirus-Infektion adhärenter Zellen

HeLa-Zellen wurden in Mehrfach-Ansätzen wie oben beschrieben ausgesät und zweifach transfiziert. 6h nach dem zweiten Mediumwechsel erfolgte die Infektion der HeLa-Zellen mit Wildtyp-, rekombinantem bzw. mutiertem Coxsackievirus mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI, entspricht dem zahlenmäßige Verhältnis von Viruspartikel zu Zielzelle) von 5 in einem Volumen von 50µl DMEM/cm<sup>2</sup> Wachstumsoberfläche. Nach 1h Inkubation im Brutschrank unter leichtem Schwenken alle 10min wurde der virushaltige Überstand abgenommen, der Zellrasen zweifach mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. Die Zeitangabe *post infectionem* (p.i.) verweist dabei auf den Beginn der Virusinokulation.

#### 2.2.1.2.6 Charakterisierung einer möglichen viralen Resistenzentwicklung unter siRNA-Selektionsdruck

Zur Charakterisierung einer möglichen Resistenzentwicklung unter therapeutischen Selektionsdruck wurden jeweils mit ein, zwei oder drei verschiedenen siRNAs behandelte Viruspopulationen am Ende eines Infektionszyklus (60, 128 bzw. 144h p.i.) aus den Zellkultur-Überständen (1. Passage) gewonnen. Zur phänotypischen Messung der

Resistenzentwicklung wurden diese Viren nach Bestimmung der Virustiter (siehe 2.2.1.2.3) zur Infektion (MOI = 5) von mit denselben bzw. distinkten siRNAs vorbehandelten HeLa-Zellen (2. Passage) verwendet und ihre Empfindlichkeit gegenüber der erneuten siRNA-Therapie im Proliferations- (siehe 2.2.1.1.3), LDH- (siehe 2.2.1.4.3) sowie *Plaque Forming Assay* (siehe 2.2.1.2.3) quantifiziert. Im Rahmen einer genotypischen Resistenzanalyse wurde die Diversität dieser nach siRNA-Exposition entstandenen Quasispezies durch genomische Sequenzanalyse (siehe 2.2.1.3.2) einzelner Plaque-purifizierter Virusvarianten der 1. Passage in den verschiedenen siRNA-Zielsequenz-Bereichen bestimmt.

### 2.2.1.3 Molekularbiologische Methoden

Alle nicht aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Protokollen aus *Current Protocols in Molecular Biology* [150] durchgeführt.

#### 2.2.1.3.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus adhärennten Zellen

Für die Isolierung zellulärer sowie viraler RNA wurden die Zellen wie in 2.2.1.1.1 beschrieben abtrypsiniert, zur Entfernung von Serum- und Trypsinresten mit PBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini-Kit Systems. Dabei wurden die Zellen zunächst mit  $350\mu\text{l}$  (bei  $<5 \times 10^6$  Zellen) bzw.  $600\mu\text{l}$  (bei  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen) des guanidinisothiocyanat- und  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen RLT-Puffers lysiert. Anschließend wurde das Lysat über QIAshredder-Säulchen homogenisiert. Die folgenden Schritte erfolgten gemäß Herstellerangaben. Die Gesamt-RNA wurde mit  $30\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert und am Spektrometer bei einer Wellenlänge von  $260\text{nm}$  quantifiziert, wobei die Reinheit aus dem Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt wurde.

#### 2.2.1.3.2 Semiquantitative RT-PCR

Die Untersuchung der viralen Genexpression in transfizierten und/oder infizierten HeLa-Zellen 5, 12 und 24h nach Infektion erfolgte semiquantitative mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Dabei wurde die virale Positiv- wie

auch Negativstrang-RNA-Expression mit spezifischen, in dem 5' UTR Bereich des CVB3-Gemoms liegenden Primern (CP1 zur Detektion der Negativstrang-RNA und CP2 zur Detektion der Positivstrang-RNA) bestimmt. Für die Transkription der viralen RNA in cDNA wurden 2µg Gesamt-RNA (bzw. virale CVB3 RNA als positive Kontrolle) gemäß Herstellerangaben mit 2pmol der CVB3-spezifischen Primer und 10mM dNTP versetzt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 5min bei 65°C wurden 5x *First-Strand Buffer*, 0,1M DTT sowie 200u Superscript II Reverse Transkriptase zugegeben und das Reaktionsgemisch für 50min bei 42°C inkubiert. Nach Inaktivierung der Reaktion durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C, wurde die RNA durch Inkubation mit E.coli RNase H bei 37°C für 20min abgebaut und die synthetisierte DNA am Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260nm quantifiziert. Zur PCR Amplifikation wurden je 80ng der erhaltenen cDNA, 2µl eines 2,5mM dNTP-Mixes, 2,5u Taq DNA Polymerase und 50 pmol jedes Primers des Primerpaars CP1/CP2 in 1x Reaktionspuffer mit einem Gesamtvolumen von 25µl angesetzt. Die PCR-Konditionen beinhalteten einen initialen Denaturierungsschritt von 5min bei 94°C und schließlich 15 Zyklen, die 1min bei 94°C zur Denaturierung, 1min bei 52°C zum Anlagern der Primer und 2min bei 72°C zur Elongation umfassten. Die Unterbrechung der Amplifikation nach 15 Zyklen ermöglichte die semiquantitative Bestimmung der PCR-Produkt-Akkumulation in der Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase). Nur in dieser Phase verhält sich die Intensität der Bandensignale proportional zur Anzahl der PCR-Produkte. Die optimale Zyklen-Anzahl innerhalb des verhältnismäßig kleinen logarithmischen Bereichs der Amplifikation wurde in Vorarbeit determiniert. Zur Gewährleistung von Sensitivität und Spezifität wurden geeignete Kontrollen bei jedem Schritt integriert. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH). Zur Bestimmung der GAPDH-Expression wurden 2µg Gesamt-RNA mit dem reversen (Gegensinn) Primer des GAPDH-Primersets wie oben beschrieben revers transkribiert. Anschließend wurden wiederum je 80ng der erhaltenen cDNA mit Taq DNA Polymerase und dem GAPDH-Primerpaar PCR amplifiziert. Die PCR-Konditionen beinhalteten einen initialen Denaturierungsschritt von 5min bei 94°C und schließlich 36 Zyklen, die 45s bei 94°C zur Denaturierung, 45s bei 60°C zum Anlagern der Primer und 90s bei 72°C zur Elongation umfassten. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch auf 1%-igen Ethidiumbromid-Agarose-Gelen aufgetrennt und das Ergebnis fotodokumentiert.

Zur genomischen Sequenzanalyse einer potentiell nach siRNA-Exposition punktmutierten Viruspopulation wurde virale RNA 10h nach Infektion mit einem nach Vorbehandlung mit siRNA-3C<sup>α</sup>, -3C<sup>β</sup> und/oder -3D<sup>β</sup> Plaque-purifizierten Virus (siehe 2.2.1.2.6) aus HeLa-Zellen wie oben beschrieben isoliert und mit dem jeweiligen Gen-spezifischen reversen (rev) Primer (3C<sup>α</sup>\_ rev zur Amplifikation der genomischen 3C<sup>α</sup> Region; 3C<sup>β</sup>\_ rev zur Amplifikation der genomischen 3C<sup>β</sup> Region und 3D<sup>β</sup>\_ rev zur Amplifikation der genomischen 3D<sup>β</sup> Region) revers transkribiert. Anschließend wurden wiederum je 80ng der erhaltenen cDNA mit Taq DNA Polymerase und dem entsprechenden Primerpaar (3C<sup>α</sup>\_ rev / 3C<sup>α</sup>\_ fwd; 3C<sup>β</sup>\_ rev / 3C<sup>β</sup>\_ fwd; 3D<sup>β</sup>\_ rev / 3D<sup>β</sup>\_ fwd) PCR amplifiziert. Die PCR-Konditionen beinhalteten einen initialen Denaturierungsschritt von 5min bei 94°C und schließlich 30 Zyklen, die 45s bei 94°C zur Denaturierung, 45s bei 59°C zum Anlagern der Primer und 25s bei 72°C zur Elongation umfassten. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung mit dem Qiaquick PCR *Purification Kit* gemäß Herstellerangaben zur Sequenzierung verschickt (Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

#### 2.2.1.3.3 Bestimmung der siRNA intrinsischen Serumstabilität

Zur Bestimmung der Serumstabilität verschiedener Standard- sowie chemisch modifizierter (*Stealth*) siRNA-Moleküle wurden jeweils 4,8µmol siRNA in DMEM mit einem Gesamtvolumen von 9,5µl mit 30% Serum einer gesunden Typ I Interferon Rezeptor defizienten Maus (siehe 2.2.2), in etwa dem natürlichen Serumanteil am Gesamtblutvolumen entsprechend, bei 37°C für 0, 4 und 24h inkubiert. Nach Zugabe einer äquivalenten Menge 2x Novex<sup>®</sup> TBE-Urea *Sample Buffer* wurden die Proben für 3min bei 70°C denaturiert und anschließend im 15% denaturierenden Novex<sup>®</sup> TBE-Urea-Polyacrylamidgel für 75min bei 180 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis wurde nach 20-minütiger Färbung der Gele mit 2µg/ml Ethidiumbromid sowie 10-minütiger Entfärbung fotodokumentiert.

#### 2.2.1.4 Proteinbiochemische Methoden

##### 2.2.1.4.1 *Western-Blot*

Für die Isolierung zellulärer sowie viraler Proteine wurden die transfizierten und/oder infizierten HeLa-Zellen wie in 2.2.1.1.1 beschrieben abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und in

flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Zellpellets in 50-100µl eiskaltem Lysepuffer (100mM NaCl; 10mM Trizma® base pH 7,4; 1% NP40; 0,1% Proteaseinhibitor-Cocktail; 0,1% Natrium-Ortho-Vanadat) resuspendiert und nach einer 1-stündigen Inkubation auf Eis zur Vervollständigung der Zelllyse dreimal 10s im eiskalten Ultraschallbad behandelt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 16000g und 4°C wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach einer an Lowry [151] angelehnten Methode mittels eines kolorimetrischen DC (*Detergent Compatible*) Protein Assay Kits von BioRad gemäß Herstellerangaben. Die Messung der Farbreaktion erfolgte im ELISA-Lesegerät (Biotrak II) bei 750nm; die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit BSA Standards quantifiziert. Nach der Quantifizierung wurden äquivalente Proteinmengen (45-50µg Protein pro Tasche) mit 5x Lämmli-Puffer (0,125M Tris-HCl pH 6,8; 30% Glycerol; 6% SDS; 0,005% Bromphenolblau; 250mM DTT) versetzt und bei 95°C für 10min denaturiert. Die Proteinauftrennung erfolgte mittels *SDS-PAGE*-Gelelektrophorese im 4-20% Tris-Glycin-Gradientengel für 120min bei 125 Volt (Laufpuffer: 25mM Trizma® base; 192mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3). Als Molekulargewichtsmarker wurde der SeeBlue Plus 2 - Proteinstandard verwendet. Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Hybond ECL Nitrocellulose-Membranen wurde im *Wet-Blot*-Verfahren gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Der Transfer erfolgte für 120min bei 30 Volt und Raumtemperatur (Transferpuffer: 12mM Trizma® base; 96mM Glycin; pH 8,3; 20% v/v Methanol). Sein Erfolg sowie die Gleichmäßigkeit der Ladung wurden durch Färbung der Proteine mit PonceauS überprüft. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran durch Behandlung mit 1 bzw. 5% Trockenmilch in TBS-T (20mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 0,05% Tween®20) für 1h bei Raumtemperatur blockiert und die Membran mit dem Primärantikörper in optimaler Verdünnung (siehe 2.1.9) auf dem Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran (15min in TBS-T) erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 1h bei RT. Nach wiederholtem Waschen der Membran in TBS-T (3x 15min) und TBS (20mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl) (1x 5min) wurde die Bindung des Antikörpers mittels ECL (*Enhanced Chemiluminescent Detection*) sowie Röntgenfilm-Exposition detektiert. Durch Behandlung der Membran mit 10ml *Stripping*-Lösung für 10min bei Raumtemperatur konnten die gebundenen Antikörper zur Analyse weiterer Proteine wieder entfernt und die Membran nach mehrmaligem kurzem Waschen in TBS-T und Blocken mit Trockenmilch erneut mit primärem Antikörper inkubiert werden.

#### 2.2.1.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Korrelation der siRNA-bedingten viralen Attenuierung mit dem intrazellulären siRNA-Level wurden mittels einem siRNA *Labeling Kit* (Silencer™ Ambion) gemäß Herstellerangabe mit Cy3 fluoreszenzmarkierte, rotes Licht emittierende siRNA-Moleküle zur Transfektion (siehe 2.2.1.1.2) von HeLa-Zellen im Zweikammer-Objektträgersystem verwendet. 6h nach dem Mediumwechsel der zweiten Transfektion erfolgte die Infektion der HeLa-Zellen mit rekombinantes, eGFP-exprimierendem CVB3 (siehe 2.2.1.2.2) mit einem MOI von 5 (siehe 2.2.1.2.5). Zu bestimmten Zeitpunkten nach Infektion wurden die Präparate mit Paraformaldehyd (4% in PBS) für 5min bei Raumtemperatur fixiert, zweimal mit PBS gewaschen, mit Einbettmedium eingedeckt und fluoreszenzmikroskopiert.

Die (Ko-)Transfektionseffizienz wurde fluoreszenzmikroskopisch durch Einbringung kommerziell erhältlicher Cy3-markierter siRNA-Moleküle bestimmt. Hierbei wurden die Zellen 5h nach der zweiten Transfektion mit 4% Paraformaldehyd für 5min bei Raumtemperatur fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS mit Hoechst-Farbstoff 33342 (10µg/ml in PBS) für 5min gefärbt. Der Hoechst-Farbstoff interkaliert dabei in die DNA der Zelle, sodass der Zellkern durch eine blaue Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Schließlich wurden die Präparate 3min mit PBS gewaschen, mit Einbettmedium eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

#### 2.2.1.4.3 Bestimmung der LDH-Freisetzung (Lactat-Dehydrogenase-Assay)

Die intrazellulären Replikationsvorgänge nach einer coxsackieviralen Infektion führen zu einer mikroskopisch sichtbaren, morphologischen Veränderung der Zelle, die als zytopathischer Effekt bezeichnet wird. Durch Änderung der Membranpermeabilität kommt es zur Abkuglung der Zellen, der die Lyse im Rahmen des infektionsbedingten Todes der Zelle folgt. Der zytopathogene Effekt eines Virus kann an der Freisetzung einer enzymatisch aktiven Substanz aus dem Zytosol infizierter Zellen als Maß der Zellschädigung gemessen werden. Zur Evaluierung der Attenuierung der viralen Zytogenität durch siRNA wurde ein kolorimetrischer LDH-Aktivitätstest eingesetzt (*Colorimetric Cytotoxicity Detection Kit*). Bei diesem wurde die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH) als zytoplasmatisches



Enzym, das nach Zytolyse aus infizierten Zellen in den Zellüberstand freigesetzt wird, bestimmt. Die Messung erfolgt dabei durch die LDH katalysierte Oxidation des in den Reaktionsansatz zugegebenen Lactats zu Pyruvat unter gleichzeitiger Reduktion des ebenfalls zugesetzten  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$ . Katalysiert durch das bakterielle Enzym Diaphorase reduziert  $\text{NADH}/\text{H}^+$  in einem zweiten Reaktionsschritt das zugesetzte Tetrazolium-Salz enzymatisch zu einem intensiv rot gefärbten Formazansalz, welches photometrisch bei 492nm bestimmt werden kann. Hierfür wurden 100 $\mu\text{l}$  des durch Zentrifugation (900g, 5min, 4°C) zellfreien Überstandes infizierten und/oder transfizierten Zellen mit 100 $\mu\text{l}$  Reaktionsmix gemäß Herstellerangaben inkubiert.

### **2.2.2 *In vivo* Untersuchungen**

Das therapeutische *in vivo* Potential der siRNA zur Attenuierung der coxsackieviralen Zytopathogenität wurde in Typ I Interferon Rezeptor (IFNR) defizienten Mäusen [152] untersucht. Diese Mäuse sind höchst empfänglich für coxsackievirale Infektionen verbunden mit einer hohen Mortalität früh nach Infektion selbst bei Inokulation mit niedrigen Virustitern, meistens aufgrund einer fulminanten Hepatitis, verursacht durch einen dramatischen Anstieg viraler RNA in der Leber [34]. Typ I Interferon Rezeptor defiziente Mäuse wurden über B&K Universal Ltd (Aldbrough Hull, England) bezogen. Für die Versuche wurden ausschließlich 6-8 Wochen alte Mäuse mit einwandfreiem Gesundheitszustand und einem Gewicht von 20 bis 25g verwendet.

Infektion, hydrodynamische Transfektion, Tötung, Blut- bzw. Organentnahme sowie Betreuung der Mäuse wurden von Dr. med. vet. Cornelia Michaelis unter Beachtung der tierschutzrechtlichen Bestimmungen sowie nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 25.05.1998 durchgeführt.

### 2.2.2.1 Infektion der Mäuse

Um das therapeutische Potential der RNA-Interferenz in diesem Tiermodell zu bestimmen, wurden die Mäuse zunächst mit der üblicherweise letalen Dosis von  $5 \times 10^3$  *Plaque Forming Units* der kardiotropen Variante des Coxsackievirus CVB3 H3 inokuliert. Hierfür wurde der Virusstock auf ein finales Volumen von 0,1ml mit PBS verdünnt und der sicher fixierten Maus intraperitoneal injiziert.

### 2.2.2.2 Hydrodynamische siRNA-Transfektion

Die siRNA zur Attenuierung der viralen Pathogenität wurde den Mäusen systemisch entsprechend einer modifizierten Methode der hydrodynamische siRNA-Transfektion [153-155] appliziert. Der siRNA-Transfer erfolgt bei dieser Technik durch die rapide Injektion einer großen Menge nackter siRNA in einem großen Volumen (von bis zu 8% des Körpergewichts) über die Schwanzvene. Hierfür wurden die Mäuse zunächst durch intraperitoneale Applikation von Midazolam (Dormicum® 5mg/kg Körpergewicht), Medetomidin (Domitor® 0,5mg/kg Körpergewicht) und Fentanyl (Fentanyl® 0,05mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Anschließend wurden 0,6nmol siRNA/g Körpergewicht in einem Gesamtvolumen von 1,6ml physiologischer NaCl-Lösung (0,9%) innerhalb von 20s systemisch unter Verwendung eines Venenverweilkatheters (Neoflon 0,7x19mm, Becton Dickinson) über die Schwanzvene appliziert. Die hydrodynamische siRNA Injektion wurde zweifach (6 und 14h p.i.) bzw. dreifach (6, 14 und 48h p.i.) durchgeführt. Die Mäuse der Kontrollgruppen erhielten eine 0,9% NaCl-Lösung mit siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup> bzw. ohne siRNA. Die Bestimmung der *in vivo* siRNA-Transfektionseffizienz erfolgte durchflusszytometrisch durch Einbringung kommerziell erhältlicher Cy5-markierter siRNA-Moleküle in CVB3-infizierte Mäuse (siehe 2.2.2.4).

### 2.2.2.3 Tötung der Mäuse und Blut- bzw. Organentnahme

Die infizierten Tiere unterstanden in den Tagen nach Infektion bzw. Transfektion aufmerksamer Beobachtung hinsichtlich Allgemeinbefinden, Verhalten, Aktivität, Futteraufnahme und Kotabsatz. Bei Anzeichen von Schmerzen, dargestellt durch hochgezogenen Bauch, struppiges Fell, trübe Augen, Gewichtsverlust und Apathie, wurden

die Tiere sofort durch zervikale Dislokation getötet. Dieser Zeitpunkt wurde als Todeszeitpunkt für die Erstellung der Überlebenskurve definiert. Nach Tötung der Tiere wurden Organproben von Herz, Lunge, Leber und Niere entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur Aufarbeitung für die Virustiterbestimmung (siehe 2.2.2.5) bzw. für die Bestimmung der viralen Proteinexpression (bzw. 2.2.2.6) gelagert. Zur Untersuchung des Infektionsverlaufs wurden in einer weiteren Versuchsreihe Tiere 42-48h nach Infektion euthanasiert; anschließend wurden Blut und Organe für die Untersuchungen entnommen. Für die histologische Bewertung der virusbedingten Gewebeschädigung wurden Teile von Leber und Herz in 4% Paraformaldehyd eingelegt, nach 24h in 70% Ethanol eingebettet und bis zur Aufarbeitung bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert (siehe 2.2.2.7). Für die Bestimmung der Viruslast (siehe 2.2.2.5) bzw. der viralen Proteinexpression (siehe 2.2.2.6) wurden Gewebeproben von Herz, Lunge, Leber und Niere in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Tiergruppen der Versuchsreihe zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 10h nach der zweiten hydrodynamischen Transfektion mit Cy5-fluoreszenzmarkierter siRNA durch zervikale Dislokation getötet. Leber und Herz wurden sofort nach Entnahme zur FACS-Analyse weiterverarbeitet (siehe 2.2.2.4).

#### 2.2.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der *in vivo* siRNA-Transfektionseffizienz

Nach Entnahme von Leber und Herz aus dem Tierkörper wurden die Organe unter Zugabe von 10-20ml PBS mit einem Skalpell und anschließend im Glasmörser zerkleinert und zweimal durch ein Zellsieb filtriert, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die filtrierte Einzelzellsuspension wurde 10min bei 300g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in einem geeignetem Volumen PBS resuspendiert. Die Analyse der Zellen wurde an einem FACSCalibur-Gerät mit der CELLQuest-Software (Version 3.3, Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Die Cy5-gefärbten siRNA-Moleküle emittieren dabei nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488nm Fluoreszenzsignale bei 525nm, die von dem Zytometer über den Fluoreszenzkanal FL1 (530/30nm Bandpassfilter) aufgezeichnet werden. Nach Messung von 10.000 Zellen pro Ansatz erfolgte die Software-basierte quantitative Auswertung unter Verwendung von ModFit *LT*<sup>TM</sup>-Software (Version 3.0, Verity,

Topsham, Maine, USA). Als Kontrollen wurden Zellen infizierter, jedoch nicht-transfizierter Tiere verwendet.

#### 2.2.2.5 Organaufarbeitung für *Plaque Forming Assay* im Homogenisator

Die Aufarbeitung der Organe für *Plaque Forming Assay* erfolgte durch mechanischen Aufschluss im Gewebe-Homogenisator. Hierzu wurden die gewogenen Organproben in 1ml supplementiertes DMEM-Zellkulturmedium eingelegt und im Micra D-8 Homogenisator bei ca. 25000upm unter dem Abzug für jeweils 10s homogenisiert. Der Aufschluss wurde bis zur vollständigen Homogenisierung der Probe mehrfach wiederholt. Zur Freisetzung des in den Zellen befindlichen Virus wurde die Suspension in einem Trockeneis-Ethanol-Bad dreimalig eingefroren und aufgetaut. Zelldebris wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 900g und 4°C entfernt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und bei -70°C gelagert. Die Proben wurde direkt zum Bestimmen der Virustiter pro Gramm Organ im *Plaque Forming Assay* eingesetzt (siehe 2.2.1.2.3).

#### 2.2.2.6 Organaufarbeitung für *Western-Blot* im *Bead-Beater*

Die Aufarbeitung der Leber für den *Western-Blot* erfolgte neben der chemischen Lyse zusätzlich durch mechanischen Aufschluss mit Glaskügelchen (*Beads*) in einem sogenannten *Bead-Beater*. Hierzu wurden die gewogenen Organproben mit etwa 0,3ml Glaskügelchen und 1ml eiskaltem Lysepuffer (100mM NaCl; 10mM Tris-Base pH 7,4; 1% NP40; 0,1% Proteaseinhibitor-Cocktail; 0,1% Natrium-Ortho-Vanadat) vermischt und mit einem *Bead-Beater* (80s; 4200upm) homogenisiert. Der Aufschluss im *Bead-Beater* wurde zur vollständigen Lyse der Probe bei Bedarf mehrfach wiederholt. Zelldebris wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 16000g und 4°C entfernt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und bei -70°C gelagert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte die Proteinauftrennung mittels *SDS-PAGE* (siehe 2.2.1.4.1).

#### 2.2.2.7 Histologie

Für die histologische Bewertung der virusbedingten Gewebeschädigung wurden Teile von Leber und Herz in 4% Paraformaldehyd eingelegt und nach 24h in 70% Ethanol

umgebettet. Die fixierten Gewebe wurden im Pathologischen Institut des Klinikums Rechts der Isar in Paraffin eingebettet. Es wurden 10µm Schnitte angefertigt, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und vom Pathologen, Herrn Dr. S. Seidl, histopathologisch beurteilt. Die virusbedingte Schädigung der Leber in Form von Nekrosen und inflammatorischen Zellinfiltraten wurde semiquantitativ unter Verwendung eines standardisierten Bewertungsmodus (Leber *Injury-Score*) wie folgt graduiert: 0=keine, 1=leichtgradige, 2=mäßiggradige, 3=schwergradige Gewebeschädigung.

#### 2.2.2.8 Bestimmung des ALT-Serum-Levels

Das Blut wurde nach dem Gerinnungsvorgang für 10min bei 400g zentrifugiert und das Serum abgetrennt. Zur Messung der Alanin-Aminotransferase (ALT) Enzymaktivität als Parameter für die Schädigung der Leber wurde das Serum an ein auf klinische Chemie spezialisiertes, veterinärmedizinisches Labor (Synlab Vet, Augsburg) geschickt.

#### 2.2.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte±Standardabweichung. Die Signifikanzen der Variabilität zwischen den Mittelwerten der experimentellen Gruppen wurden durch ANOVA (*one/two way analysis of variance*) unter der Verwendung der SPSS für WINDOWS 10.0 Software bestimmt. Unterschiede zwischen einzelnen experimentellen Gruppen wurden bei  $P < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

## 3 Ergebnisse

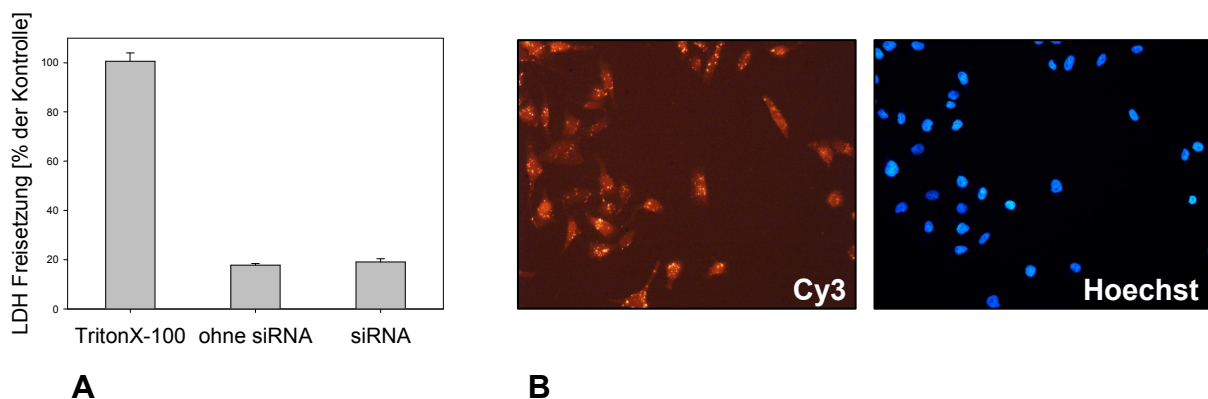
### 3.1 Therapeutisches Potential der anti-coxsackieviralen RNA-Interferenz

Die Entdeckung der RNAi-basierten Viruselimination eröffnete eine erfolgsversprechende Ansatzmöglichkeit zur Behandlung coxsackieviraler Infektionen beim Menschen. Im Rahmen des ersten Projektabschnittes sollte das therapeutische Potential der RNAi unter Verwendung einer spezifischen, gegen das virale Genom gerichteten siRNA in einer permissiven, humanen Zelllinie sowie im experimentellen Tiermodell gezeigt werden.

#### 3.1.1 Attenuierung der coxsackieviralen Pathogenität in einer für CVB3 permissiven Zelllinie

##### 3.1.1.1 Etablierung eines effizienten siRNA-Applikationssystems

Die Einführung der siRNA in die für CVB3 höchst permissiven, humanen HeLa-Zellen erfolgte mit Hilfe eines lipid-basierten Transfektionsreagens. Die Transfektion erwies sich hierbei nicht signifikant zytotoxisch für die Zellen gemessen an der LDH-Freisetzung als Maß der Zellschädigung (Abb. 8A). Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurden zwei aufeinanderfolgende Transfektionen durchgeführt. Dies führte zu einer konsistenten Transfektionseffizienz von über 65% der Zellen, ermittelt anhand der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung von Cy3-markierten, rotes Licht emittierenden siRNA-Molekülen 5h nach Transfektion (Abb. 8B).



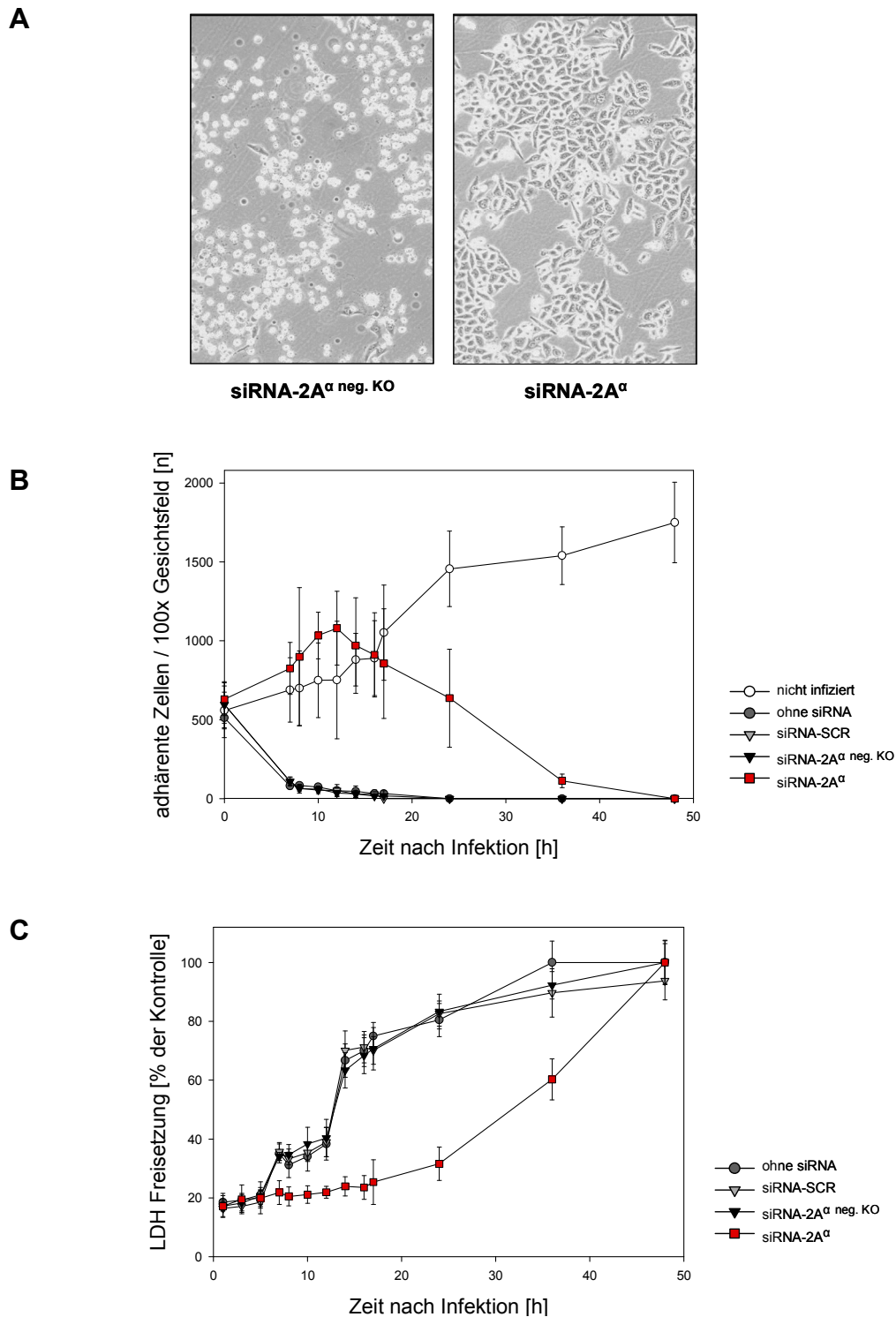
**Abb. 8: Lipid-basierte siRNA-Transfektion von HeLa-Zellen.** A, LDH-Freisetzung transfizierter (siRNA) und nicht-transfizierter (ohne siRNA) Zellen als Maß ihrer Schädigung nach 5h im Vergleich zu 100%-ig mit 1% TritonX-100 lysierten Zellen. B, Zur Bestimmung der *in vitro* Transfektionseffizienz wurden Zellen mit Cy3-fluoreszenzmarkierten siRNA-Molekülen zweifach transfiziert und die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff angefärbt (100x Vergrößerung).

### 3.1.1.2 siRNA-vermittelte anti-virale RNA-Interferenz

Als Ziel der sequenzspezifischen RNA-Destruktion wurde die genomische Region der viralen Protease 2A gewählt. Die Protease 2A stellt ein für die Virusmaturation wie auch die virale Zytopathogenität wichtiges Nichtstrukturprotein dar [52, 156]. Da ihre Nukleotidsequenz aufgrund ihrer katalytischen Aktivität hochkonserviert sein muss, stellt sie einen attraktiven therapeutischen Angriffspunkt für eine siRNA-vermittelte Kontrolle der viralen Replikation und Proteinexpression dar. Um die Wirksamkeit einer gegen diese Region gerichteten siRNA-2A<sup>α</sup> bestimmen zu können, wurden HeLa-Zellen zweifach mit siRNA transfiziert und anschließend mit Wildtyp-CVB3 infiziert. Als Kontrollen wurden hierbei siRNA-Moleküle mit zwei Punktmutationen in der ursprünglichen coxsackieviralen siRNA-2A<sup>α</sup>-Sequenz (siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup>) sowie eine kommerziell erhältliche *scrambled* siRNA (siRNA-SCR) gewählt. Die Transfektion der Kontroll-siRNA-Moleküle zeigte dabei keinen messbaren Effekt auf zelluläre Proliferation (Abb. 9B) sowie virale Zytotoxizität (Abb. 9C) und Replikation (Abb. 10). siRNA-2A<sup>α</sup> zeigte sich hingegen hochwirksam zur Attenuierung der coxsackieviralen Zytopathogenität.

#### 3.1.1.2.1 Signifikante Attenuierung der viralen Zytopathogenität

Eine Attenuierung der viralen Zytopathogenität durch siRNA-2A<sup>α</sup> wurde anhand der Vitalität sowie zytosolischen LDH-Freisetzung von infizierten und transfizierten Zellen bestimmt. Die hohe Virulenz des zur Infektion verwendeten Coxsackievirus B3 Stammes führte ohne siRNA-Behandlung bereits 12h nach CVB3-Infektion zur Abkugelung fast aller Zellen, der die Lyse im Rahmen des infektionsbedingten Todes der Zelle folgte (Abb. 9B). Dieser stark ausgeprägte zytopathische Effekt trat ebenfalls nach Einführung der Kontroll-siRNAs siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup> (Abb. 9A und B) und siRNA-SCR (Abb. 9B) auf. Eine Applikation von siRNA-2A<sup>α</sup> vermittelte permissiven HeLa-Zellen hingegen anti-virale Immunität während der frühen Phase der Infektion. So konnte der vitale Phänotyp infizierter Zellen bis zu 12h nach Infektion aufrechterhalten werden (Abb. 9A). Zudem ermöglichte die Transfektion von siRNA-2A<sup>α</sup> bis zu 18h nach Infektion ein den nicht-infizierten Zellen ähnliches Zellwachstum (Abb. 9B). Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte hierbei visuell durch Zählung der adhärennten Zellen zu distinkten Zeitpunkten nach Infektion. Die mittels ELISA gemessene LDH-Freisetzung aus dem Zytosol beschädigter Zellen wurde durch siRNA-2A<sup>α</sup> bis zu 36h nach Infektion um bis zu 60% gehemmt (Abb. 9C).

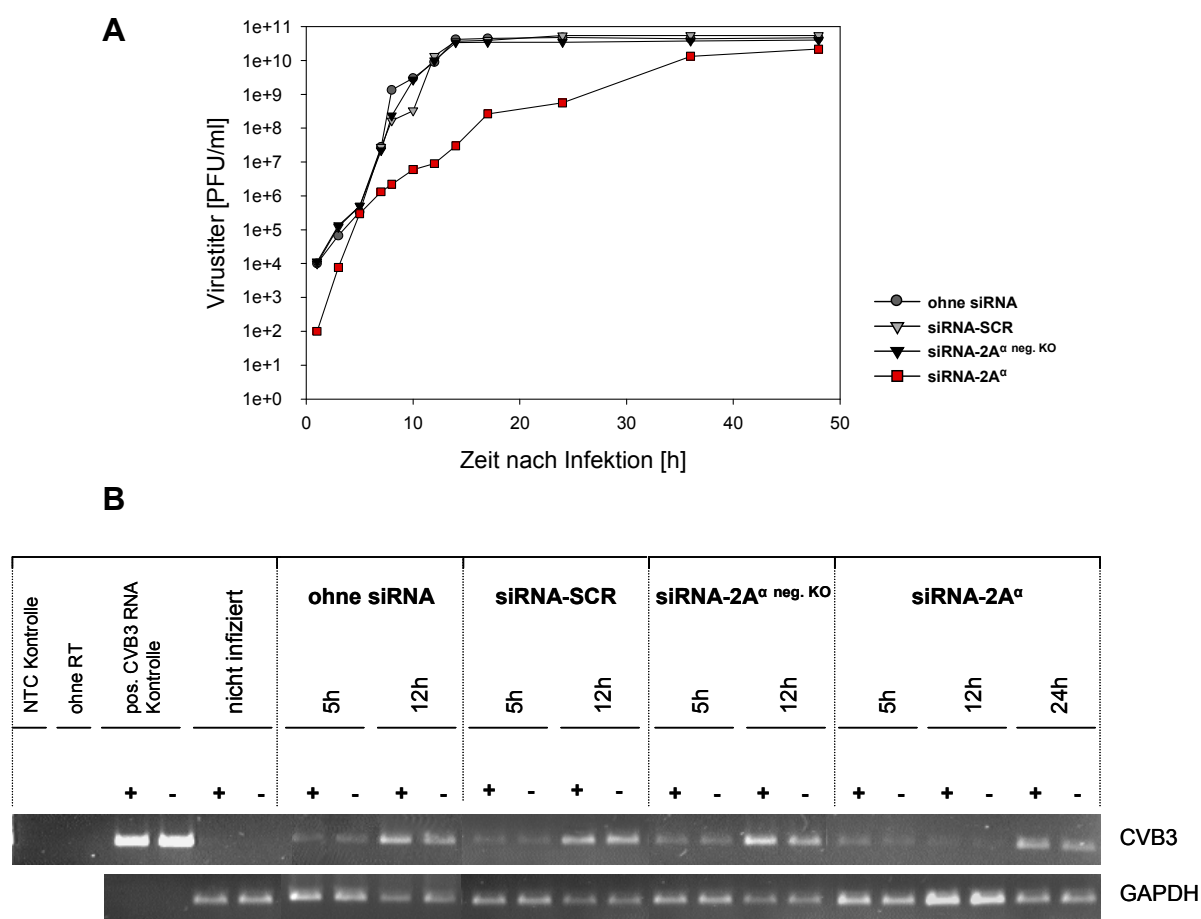


**Abb. 9: Attenuierung der coxsackieviralen Zytotoxizität *in vitro* durch siRNA-2A<sup>α</sup>.** A, Der vitale Phänotyp nicht-infizierter Zellen wurde 12h nach Infektion durch siRNA-2A<sup>α</sup> aufrechterhalten. Repräsentative Phasenkontrast-Bilder von infizierten, mit siRNA-2A<sup>α</sup>- bzw. siRNA-2A<sup>α</sup> neg. KO-behandelten HeLa-Zellen (100x Vergrößerung). Während der frühen Phase der Infektion vermittelte siRNA-2A<sup>α</sup> anti-virale Immunität, gemessen an der zellulären Proliferation (B) ( $P$ =nicht signifikant siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelte Zellen versus nicht-infizierte Zellen bis zu 18h nach Infektion;  $P < 0.001$  siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelte Zellen versus siRNA-2A<sup>α</sup> neg. KO-behandelte Zellen) bzw. der zytosolischen LDH-Freisetzung (C) ( $P < 0.001$  versus siRNA-2A<sup>α</sup> neg. KO-Kontrolle) infizierter und transfizierter Zellen.



### 3.1.1.2.2 Signifikante Attenuierung der viralen Replikation

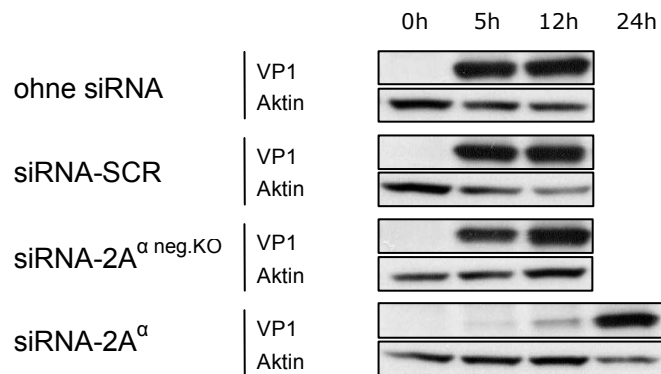
Gegen die 2A Region gerichtete siRNA zeigte sich auch hochwirksam zur Inhibierung der initialen viralen Replikation (Abb. 10A). Zu einem Zeitpunkt maximaler Virusreplikation der Kontroll-Zellen war die Virusfreisetzung aus siRNA-2A<sup>α</sup>-transfizierten Zellen bis zu 1000fach inhibiert. Die maximale Replikationsrate wurde in diesen Zellen nicht vor 48h nach Infektion erreicht. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ergab die RT-PCR-Analyse siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelter Zellen eine signifikante Inhibition der viralen Genexpression während der frühen Stadien der Infektion im Vergleich zu nur infizierten oder zudem mit siRNA-SCR bzw. siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup> behandelten Zellen (Abb. 10B). Dabei wurde sowohl die virale Positiv- als auch Negativstrang-Expression gehemmt.



**Abb. 10: Attenuierung der coxsackieviralen Replikation *in vitro* durch siRNA-2A<sup>α</sup>.** A, Bestimmung der viralen Replikation mittels *Plaque Forming Assay* aus dem Überstand transfizierter und infizierter Zellen ( $P < 0.001$  versus siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup>-Kontrolle, logarithmische Skala). Die virale Replikation war bis zu 24h nach Infektion signifikant durch siRNA-2A<sup>α</sup> inhibiert. B, Die RT-PCR-Analyse der coxsackieviralen Genexpression (obere Reihe) in infizierten HeLa-Zellen zeigte die signifikante Inhibition von viraler Positiv (+) – wie auch Negativ (-) – Strang-Expression durch siRNA-2A<sup>α</sup> während der frühen Stadien der Infektion. Der Anteil an eukaryotischer RNA in der eingesetzten Gesamt-RNA wurde mittels RT-PCR von GAPDH mRNA (untere Reihe) bestimmt. Die Analyse der Kontrollzellen beschränkte sich aufgrund ihrer infektionsbedingten Lyse auf die frühen Zeitpunkte. (NTC *no template* Kontrolle, RT Reverse Transkriptase, pos. positive)

### 3.1.1.2.3 Signifikante Attenuierung der viralen Proteinexpression

Auch die Untersuchung der viralen Proteinexpression CVB3-infizierter und transfizierter HeLa-Zellen mittels *Western-Blot*-Analyse des viralen Kapsidproteins VP1 ergab eine signifikante Inhibition durch siRNA-2A<sup>α</sup> während der frühen Stadien der Infektion im Vergleich zu nur infizierten oder zudem mit siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup> bzw. siRNA-SCR behandelten Zellen (Abb. 11).

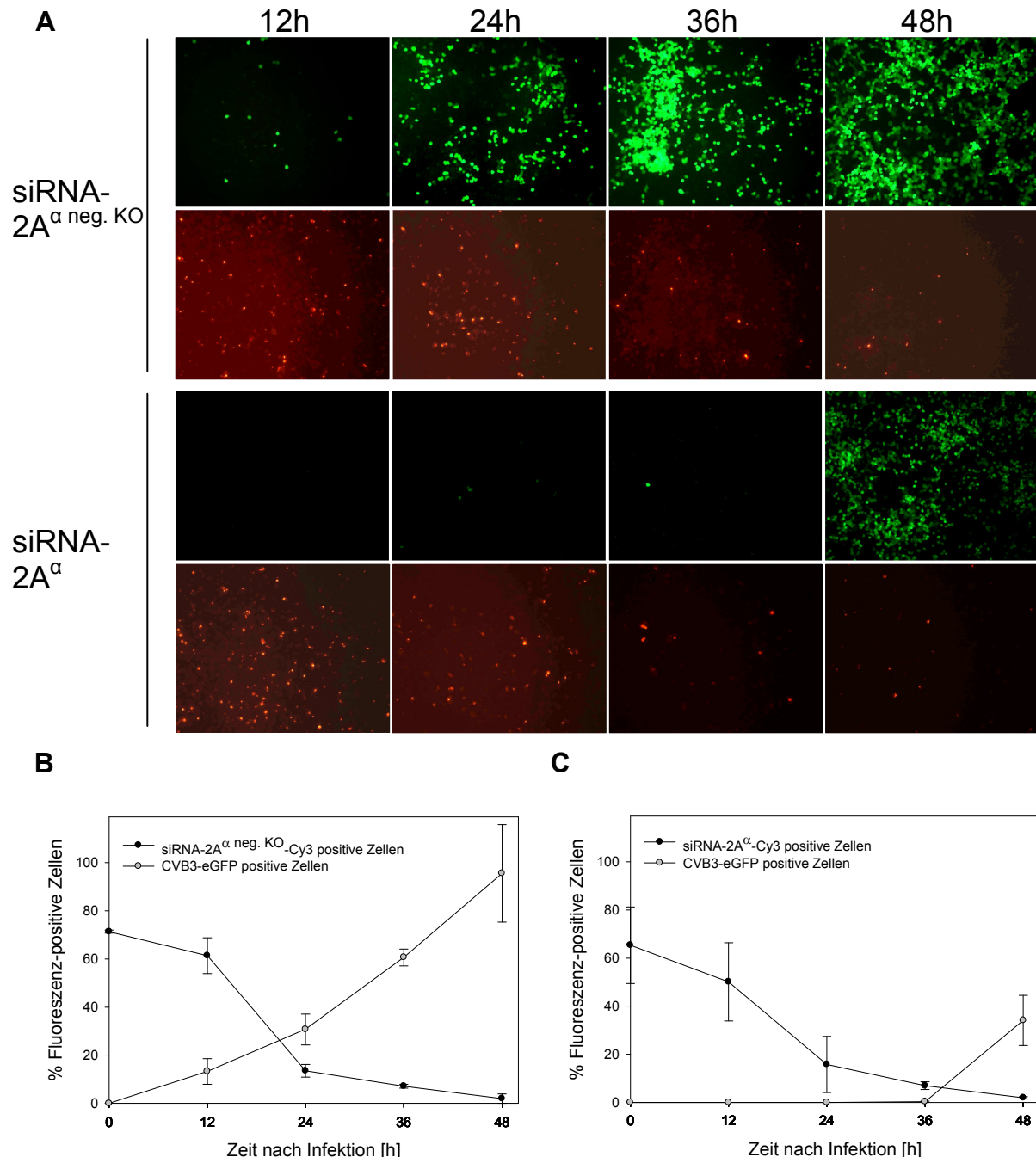


**Abb. 11: Attenuierung der coxsackieviralen Proteinexpression *in vitro* durch siRNA-2A<sup>α</sup>.** Bei der Bestimmung der viralen Proteinexpression mittels *Western-Blot*-Analyse des viralen Kapsidproteins VP1 konnte eine siRNA-2A<sup>α</sup>-bedingte Verzögerung der viralen Proteinexpression um einen Faktor von bis zu 5 beobachtet werden. Das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin diente als interne Ladungskontrolle. Die Analyse der Kontrollzellen beschränkte sich aufgrund ihrer infektionsbedingten Lyse auf die frühen Zeitpunkte.

### 3.1.1.3 Korrelation der siRNA-vermittelten Inhibition mit dem intrazellulären siRNA-Level

Durch den Einsatz von siRNA-2A<sup>α</sup> wurden sowohl die virale Replikation als auch die (zytopathische) Proteinexpression inhibiert; damit ist ein effizienter dualer Ansatzpunkt zur Therapie coxsackieviraler Erkrankungen gegeben. Trotz initialer signifikanter Attenuierung war der therapeutische Effekt jedoch nur transient. Um zu untersuchen, ob dies eine unzureichende Effektivität der siRNA-2A<sup>α</sup> oder vielmehr ein kontinuierlich abnehmendes zelluläres siRNA-Level verursacht, wurden siRNA- 2A<sup>α</sup>- sowie siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup>-Moleküle mit dem Fluorochrom Cy3 markiert. Durch Transfektion der fluoreszenzmarkierten, rotes Licht emittierenden siRNA-Moleküle und anschließende Infektion der Zellen mit rekombinantem, das *green fluorescent protein* (eGFP) exprimierendem Coxsackievirus B3 konnte gezeigt werden, dass virale Replikation wie auch Proteinexpression inhibiert werden, solange intrazellulär siRNA-2A<sup>α</sup> in effektiver Dosis detektierbar ist (Abb. 12A, untere 2 Reihen; Abb. 12C). Abnehmende siRNA-Level sind hierbei auf Verdünnung durch Zellproliferation bzw. Nuklease-bedingte Degradation zurückzuführen. In siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup> – transfizierten und CVB3-eGFP-infizierten Zellen hingegen kann trotz effektiver siRNA-Level

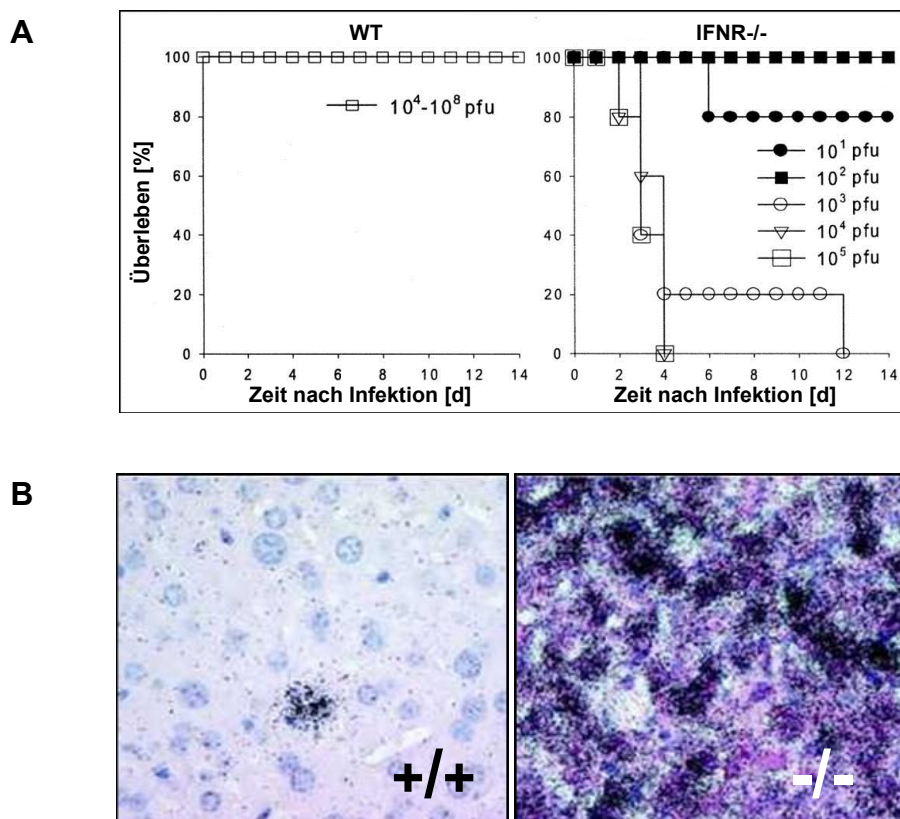
bereits 12h nach Infektion die coxsackievirale Genexpression beobachtet werden (Abb. 12A, obere 2 Reihen; Abb. 12B). Das zur Infektion verwendete rekombinante, eGFP-exprimierende Coxsackievirus weist dabei einen vergleichsweise langsamen Replikationszyklus [36, 147] mit verzögerter Genexpression im Vergleich zum Wildtyp-CVB3 auf.



**Abb. 12: Korrelation der siRNA-bedingten coxsackieviralen Attenuierung mit dem intrazellulären siRNA-Level.** A, Zur Bestimmung der Korrelation der siRNA-vermittelten Inhibition mit dem intrazellulären siRNA-Level wurden Zellen mit Cy3-fluoreszenzmarkierten, rotes Licht emittierenden siRNA-Molekülen transfiziert und mit einem rekombinanten, eGFP-exprimierenden (grünes Licht emittierend) CVB3 infiziert. siRNA-2A<sup>α</sup>-transfizierte Zellen (zwei untere Reihen) zeigten im Vergleich zu siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup>-behandelten Zellen (zwei obere Reihen) eine signifikante Inhibition der viralen Expression, solange intrazellulär siRNA detektierbar war (Vergrößerung 100x). B, C, Die quantitative Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse bestätigte diese Beobachtung.

### 3.1.2. Attenuierung der coxsackieviralen Pathogenität im experimentellen Tiermodell

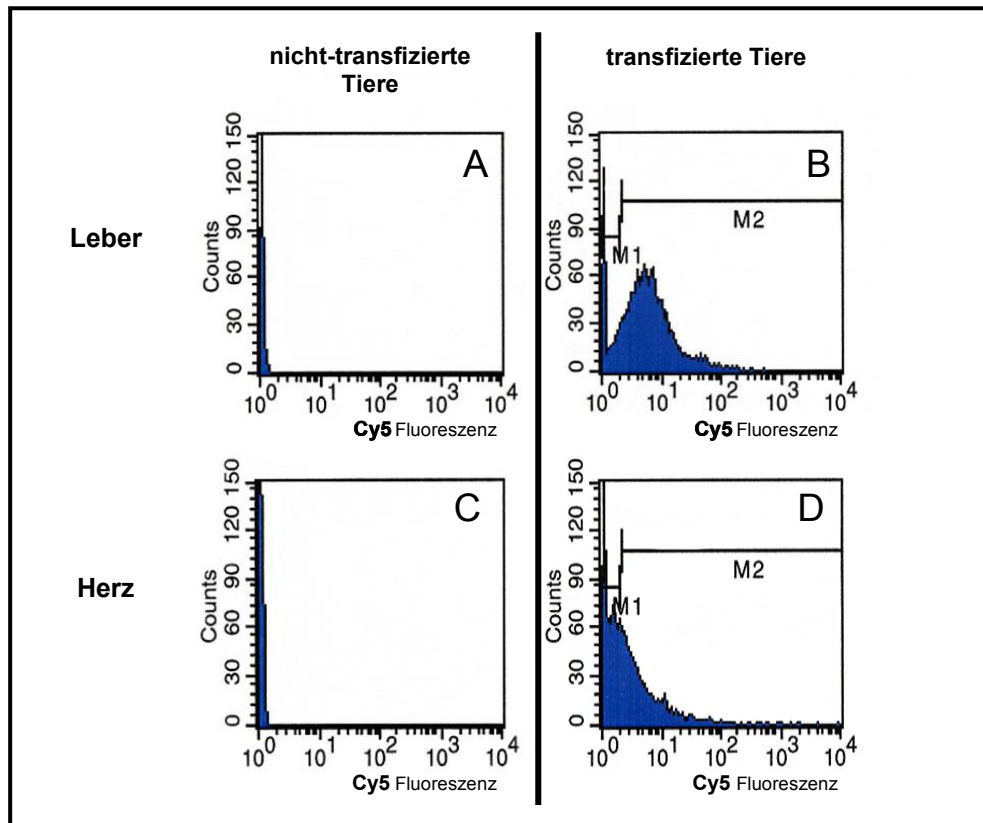
Eine Verifizierung des *in vitro* beobachteten therapeutischen Effekts der siRNA-2A<sup>α</sup> *in vivo* wurde in Typ I Interferon Rezeptor (IFNR) defizienten Mäusen [152] erbracht. Diese Mäuse sind höchst empfänglich für coxsackievirale Infektionen, verbunden mit einer hohen Mortalität früh nach Infektion selbst bei Inokulation mit niedrigen Virustitern (Abb. 13A), meistens aufgrund einer fulminanten Hepatitis, verursacht durch den dramatischen Anstieg viraler RNA in der Leber (Abb. 13B) [34]. Um eine Aussage über den Effekt der siRNA-2A<sup>α</sup> auf Überleben, Virusreplikation und Gewebeschädigung zu erhalten, wurden Typ I IFNR defiziente Mäuse nach Infektion mit einer gewöhnlich letalen Dosis von  $5 \times 10^3$  pfu des Wildtyp-CVB3 zweifach bzw. dreifach hydrodynamisch mit siRNA-2A<sup>α</sup> bzw. der punktmutierten Kontroll-siRNA-2A<sup>α</sup> neg. KO transfiziert (Abb. 15A). Der siRNA-Transfer erfolgt bei dieser Technik durch rapide Injektion einer großen Menge nackter siRNA in einem hohen Volumen über die Schwanzvene [153-155].



**Abb. 13: CVB3-Infektion Typ I Interferon Rezeptor defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.** A, Überleben von Typ I Interferon Rezeptor defizienten Mäusen (IFNR <sup>-/-</sup>) versus Wildtyp-Mäusen (WT) nach coxsackieviraler Infektion mit verschiedenen Virustitern (pfu, *Plaque Forming Unit*) [34]. B, *In situ* Hybridisierung coxsackieviraler RNA in der Leber von Wildtyp- (+/+) Mäusen versus Typ I IFNR defizienten (-/-) Mäusen [34].

### 3.1.2.1 Etablierung eines effizienten *in vivo* Applikationssystems

Mittels FACS-Analyse der Organe transfizierter IFNR *Knockout* Mäuse (Abb. 14) konnte eine Transfektionseffizienz von über 80% der Leberzellen und 50% der Herzzellen 10h nach der zweiten Applikation Cy5-fluoreszenzmarkierter siRNA-Moleküle bestimmt werden.

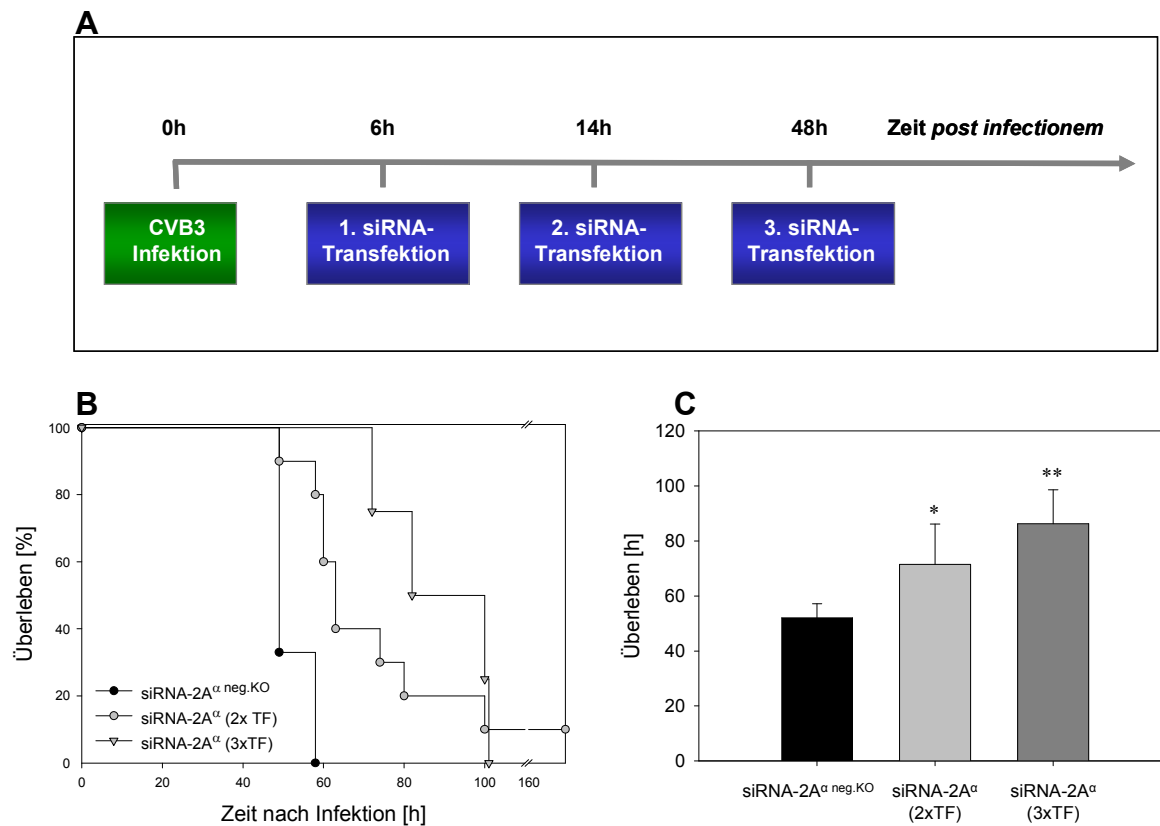


**Abb. 14: Durchflusszytometrische Bestimmung der *in vivo* siRNA-Transfektionseffizienz.** FACS-Analyse von Leber- (A und B) und Herzzellen (C und D), isoliert aus Typ I IFNR defizienten Mäusen. Leber- (A) und Herzzellen (C) nicht-transfizierter Mäuse zeigten keine messbare Fluoreszenz. Nach hydrodynamischer Transfektion von Cy5-fluoreszenzmarkierten siRNA-2A<sup>α</sup>-Molekülen ergab sich eine Transfektionseffizienz von 83,3±5,7% für die Leber (B) und 50,2±4,2% für das Herz (D)(je n=3). M1 umfasst hierbei die für Cy5-Fluoreszenz negativen, M2 die für Cy5-Fluoreszenz positiven Zellen.

### 3.1.2.2 Signifikant verlängertes Überleben CVB3-infizierter Mäuse nach hydrodynamischer Transfektion von siRNA-2A<sup>α</sup>

Die Transfektion nicht-infizierter Tiere zeigte keine erhöhte Mortalität Typ I IFNR defizienter Mäuse. Ebenso zeigte die Transfektion von Kontroll-siRNA-2A<sup>α</sup> neg.KO keine Wirkung auf das Überleben nach coxsackieviraler Infektion im Vergleich zu infizierten, aber nicht siRNA-behandelten Tieren. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten von mit identischen CVB3-Titern infizierten Tieren [34], starben alle Mäuse, die keine spezifische

siRNA-2A<sup>α</sup> erhalten hatten, 52±5h nach Infektion. Durch Einführung von siRNA-2A<sup>α</sup> konnte das Überleben behandelter Mäuse signifikant verlängert werden (Abb. 15B und C), eine Maus von acht überlebte die Infektion sogar auf Dauer, was bislang in keinem anderen der zahlreichen Experimenten mit diesen Tieren der Fall war. Durch eine zusätzliche dritte siRNA-2A<sup>α</sup>-Transfektion konnte die Lebensspanne nochmals signifikant verlängert werden.

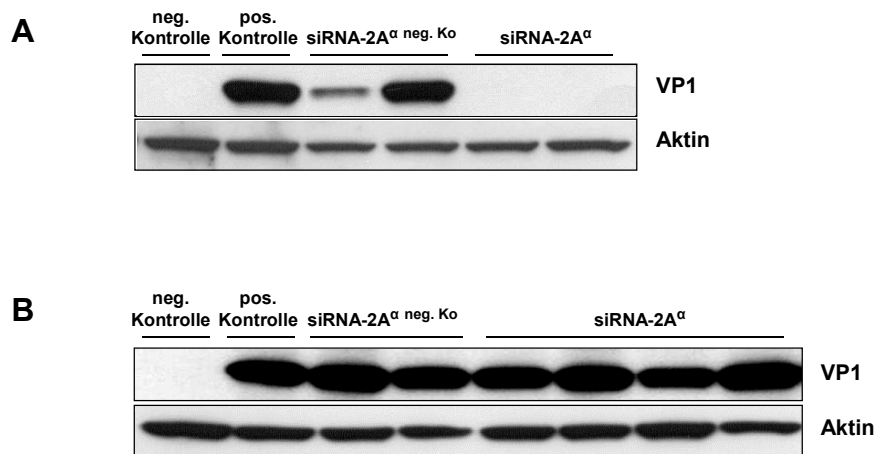


**Abb. 15: Attenuierung der coxsackieviralen Pathogenität im experimentellen Tiermodell durch hydrodynamische siRNA-Transfektion.** Typ I IFNR defiziente Mäuse wurden mit einer letalen Dosis CVB3 inokuliert und zweifach (2xTF) bzw. dreifach (3xTF) hydrodynamisch mit siRNA-2A<sup>α</sup> (n=8 bzw. 4) bzw. siRNA-2A<sup>α</sup> neg.KO (n=3) transfiziert. A, Schematische Darstellung des Versuchsansatzes. B, C, Die hydrodynamische Transfektion von siRNA-2A<sup>α</sup> verlängerte das Überleben CVB3-infizierter, Typ I IFNR defizienter Mäuse signifikant, dargestellt in B als Kaplan-Meier-Kurve (P<0.01 für beide siRNA-2A<sup>α</sup>-Gruppen versus der siRNA-2A<sup>α</sup> neg.KO-Gruppe), in C als mediane Überlebenszeit (\*P<0.05, \*\*P<0.01 versus siRNA-2A<sup>α</sup> neg.KO-Kontrolle). Eine Maus überlebte die Infektion vollständig (nicht eingeschlossen in C). Die Transfektion von Kontroll-siRNA-2A<sup>α</sup> zeigte im Vergleich zu infizierten aber nicht siRNA-behandelten Tieren keine Wirkung auf das Überleben.

### 3.1.2.3 Attenuierung der viralen Proteinexpression und Replikation

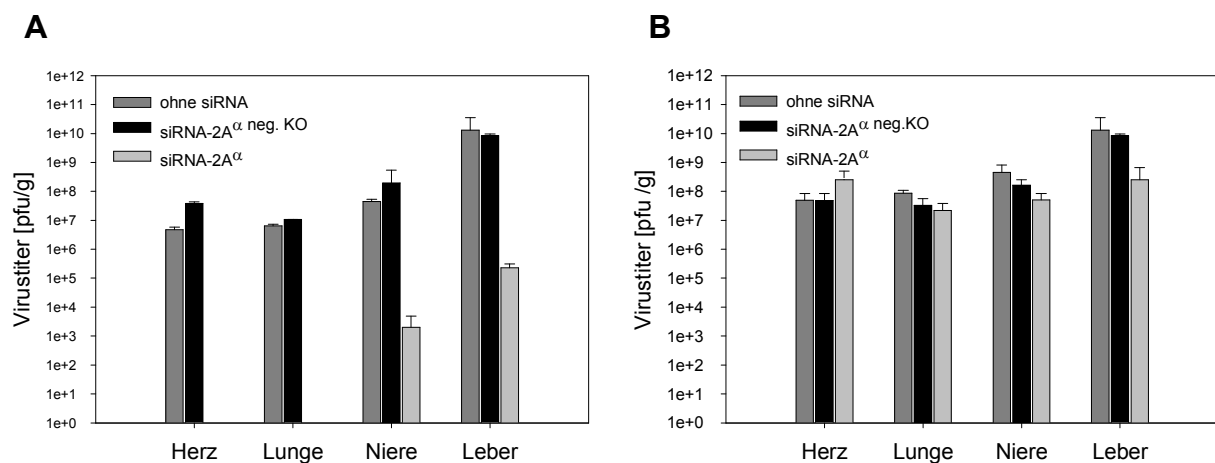
Mittels *Western-Blot*-Analyse des viralen Kapsidproteins VP1 konnte eine signifikante Attenuierung der viralen Proteinexpression in der Leber durch siRNA-2A<sup>α</sup>-Applikation 42h nach Infektion, kurz vor dem virusbedingten Tod der Kontroll-Tiere, nachgewiesen werden (Abb. 16A). Zwischen mit Kontroll-siRNA-2A<sup>α</sup> neg.KO behandelten, infizierten und infizierten, aber unbehandelten Mäusen wurde hingegen keine Differenz detektiert. Zum Zeitpunkt ihres

Todes zeigten auch siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelte Mäuse in Übereinstimmung mit einer virusbedingten, vermutlich hepatischen Todesursache eine der Kontroll-Gruppe ähnliche virale Proteinexpression in der Leber (Abb. 16B).



**Abb. 16: Inhibition der viralen Proteinexpression durch siRNA-2A<sup>α</sup> *in vivo*.** A, Die Expression des viralen Kapsidproteins VP1 in der Leber siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelter Mäuse war 42h nach Infektion signifikant reduziert (je n=2). B, Zum Zeitpunkt des Todes zeigten siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelte Mäuse (n=4) eine der siRNA-2A<sup>α</sup> neg. KO-Gruppe (n=2) ähnliche Expression. Als negative (neg.) Kontrolle diente eine nicht-infizierte Maus, als positive (pos.) Kontrolle eine infizierte aber nicht-transfizierte Maus.  $\beta$ -Aktin diente als interne Ladungskontrolle.

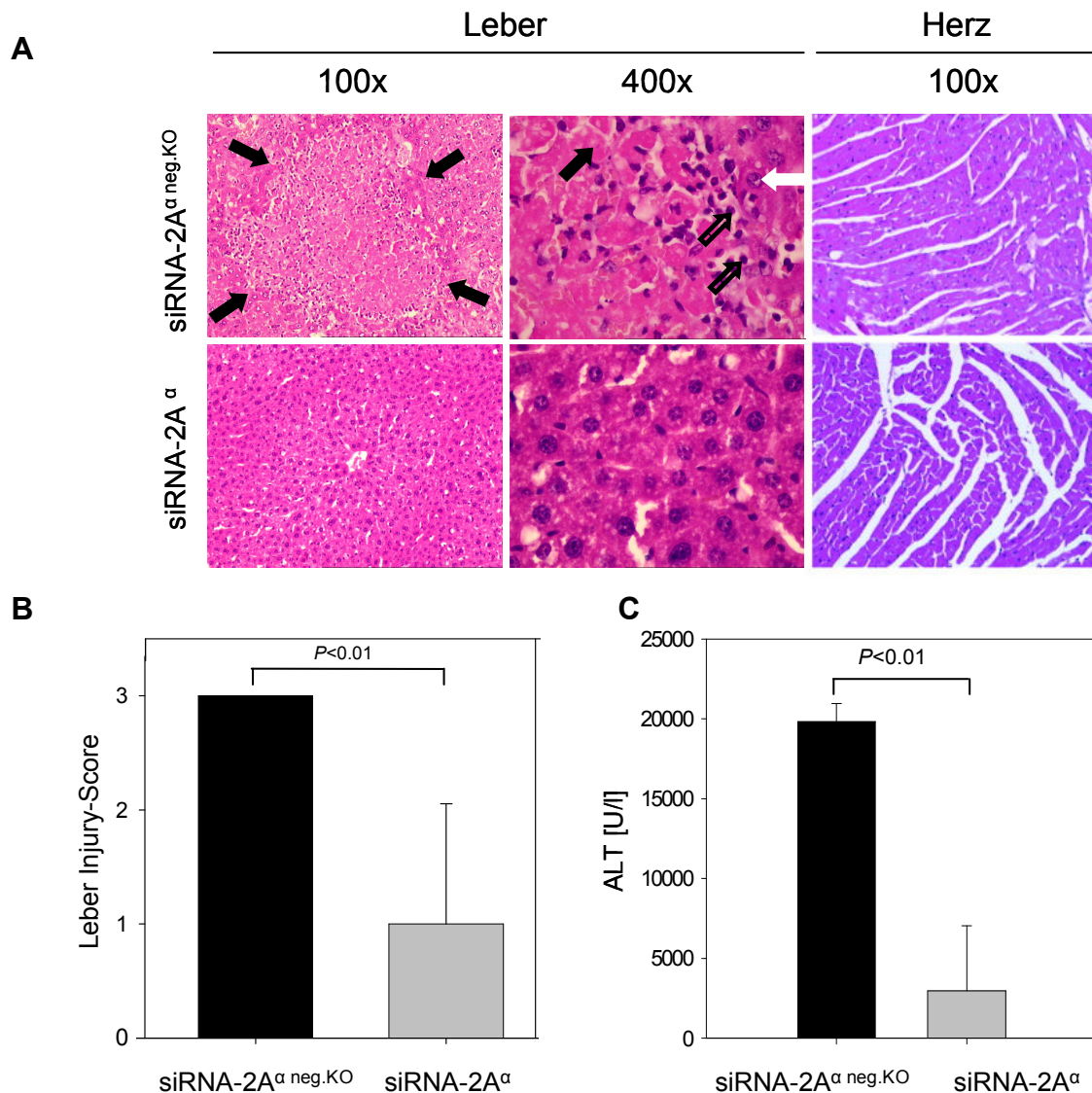
Eine Untersuchung der Virustiter 42h nach Infektion mittels *Plaque Forming Assay* ergab eine siRNA-2A<sup>α</sup>-vermittelte Inhibition um das über 10.000fache in verschiedenen Geweben infizierter Mäuse (Abb. 17A). Zum Zeitpunkt ihres Todes zeigten siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelte Tiere eine den Kontroll-Gruppen ähnliche Viruslast in Übereinstimmung mit einer durch den dramatischen Anstieg viraler RNA in der Leber bedingten Todesursache (Abb. 17B).



**Abb. 17: Inhibition der viralen Replikation durch siRNA-2A<sup>α</sup> *in vivo*.** A, Die virale Replikation war in verschiedenen Geweben 42h nach Infektion durch siRNA-2A<sup>α</sup> deutlich inhibiert; der mittels *Plaque Forming Assay* ermittelte virale Titer der Leber war um einen Faktor von  $>10^4$  reduziert, in Herz und Lunge konnte kein Virus nachgewiesen werden. B, Zum Zeitpunkt des Todes zeigten siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelte Tiere eine den Kontroll-Gruppen ähnliche Viruslast. (jeweils logarithmische Skala)

### 3.1.2.4 Einfluss auf die virusbedingte Gewebeschädigung

Die Einführung protektiver siRNA-2A<sup>α</sup> führte 42-48h nach Infektion durch Inhibition der viralen Replikation sowie der (zytopathischen) Proteinexpression konsekutiv zu einer verminderten Leberschädigung (Abb. 18).



**Abb. 18: Inhibition der virusbedingten Gewebeschädigung durch siRNA-2A<sup>α</sup> *in vivo*.** A, Repräsentative Hematoxylin-Eosin-gefärbte histologische Gewebesektion aus Leber und Herz siRNA-2A<sup>α</sup> neg. KO- (obere Reihe) bzw. siRNA-2A<sup>α</sup>- (untere Reihe) behandelter Mäuse 48h nach Infektion. siRNA-2A<sup>α</sup> neg.KO-transfiziertes, hepatisches Gewebe zeigte zwischen vitalen Hepatozyten (weißer Pfeil) deutlich eine virusbedingte Schädigung in Form von azinösen Nekrosen (schwarzer Pfeil) und inflammatorischen Zellinfiltraten (offener schwarzer Pfeil). Nach Einführung protektiver siRNA-2A<sup>α</sup> fehlten diese zytopathischen Merkmale (linke und mittlere Bilder, untere Reihe). Die histologische Analyse des Herzmuskels (ganz rechts, oben und unten) zeigte bei beiden Tiergruppen keinen zytopathischen Effekt. B, Die semiquantitative histologische Bewertung der Leber hinsichtlich Nekrosen und inflammatorischen Zellinfiltraten (nähere Einzelheiten siehe 2.2.2.7) 42-48h nach Infektion zeigte eine signifikante Verminderung der virusbedingten Gewebeschädigung durch siRNA-2A<sup>α</sup> (n=10 für siRNA-2A<sup>α</sup>- und n=3 für -2A<sup>α</sup> neg. KO- behandelte Mäuse). Damit übereinstimmend war das Alanin-Aminotransferase (ALT) Serum-Level als Marker der hepatischen Gewebeschädigung von siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelten Mäusen 48h nach Infektion signifikant niedriger als das von siRNA-2A<sup>α</sup> neg. KO-transfizierten Mäusen (C) (n=6 für siRNA-2A<sup>α</sup>- und n=3 für 2A<sup>α</sup> neg. KO-behandelte Mäuse).



siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup>-transfiziertes, hepatisches Gewebe zeigte in der histologischen Analyse deutlich eine virusbedingte Schädigung in Form von Nekrosen und inflammatorischen Zellinfiltraten (Abb. 18A). Nach siRNA-2A<sup>α</sup>-Applikation fehlten diese zytopathischen Merkmale. Die semiquantitative histologische Bestimmung des Leber *Injury-Scores* ergab eine signifikante Verminderung der virusbedingten Gewebeschädigung nach Applikation von siRNA-2A<sup>α</sup> (Abb. 18B). Auch zeigten Kontroll-siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup>-transfizierte Mäuse verglichen mit siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelten Mäusen einen signifikant höheren Alanin-Aminotransferase (ALT) Serumspiegel als weiteren Parameter für die virusbedingte Schädigung der Leber (Abb. 18C). In Übereinstimmung mit publizierten Daten hinsichtlich einer inflammatorischen Zellinfiltration frühestens 4-5 Tage nach Virusinokulation sowie gleichbleibender Creatinkinase (CK) Spiegel als Parameter einer Herzschädigung CVB3-infizierter Typ I IFNR defizienter Mäuse zum Zeitpunkt ihres Todes [34] zeigte die histologische Analyse des Herzmuskels bei beiden Tiergruppen keinen zytopathischen Effekt (Abb. 18A).

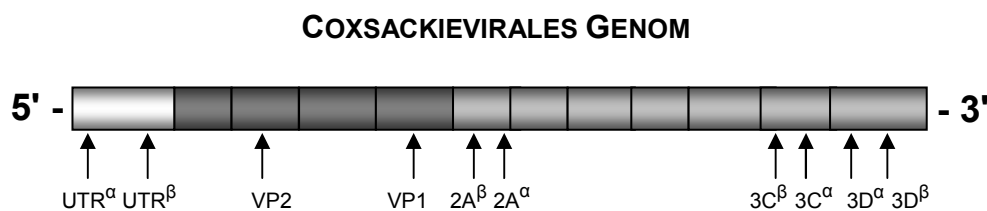
### **3.2. Faktoren, die das therapeutische Potential der anti-coxsackieviralen RNA-Interferenz beeinflussen**

Im Rahmen des vorangegangenen Projektabschnittes konnte das therapeutische Potential der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz zur Inhibition coxsackieviraler Infektionen *in vitro* wie auch *in vivo* deutlich gezeigt werden. Der Schwerpunkt des folgenden Projektabschnittes lag nun in einer Optimierung des Therapiekonzepts hinsichtlich Effektivität (durch Selektion der genomischen Zielsequenz), Stabilität (durch siRNA intrinsische Nuklease-Beständigkeit), und eines erfolgreichen Resistenzmanagements (zur Vermeidung behandlungsresistenter Virusvarianten) als Grundvoraussetzungen für seine Translation in den klinischen Alltag.

#### **3.2.1. Selektion der genomischen Zielsequenzen**

Zur Identifizierung der für das siRNA-vermittelte *Silencing* effektivsten Zielstrukturen innerhalb des coxsackieviralen Genoms wurde das therapeutische Potential verschiedener, gegen distinkte Regionen des gesamten coxsackieviralen Genoms gerichteter siRNAs

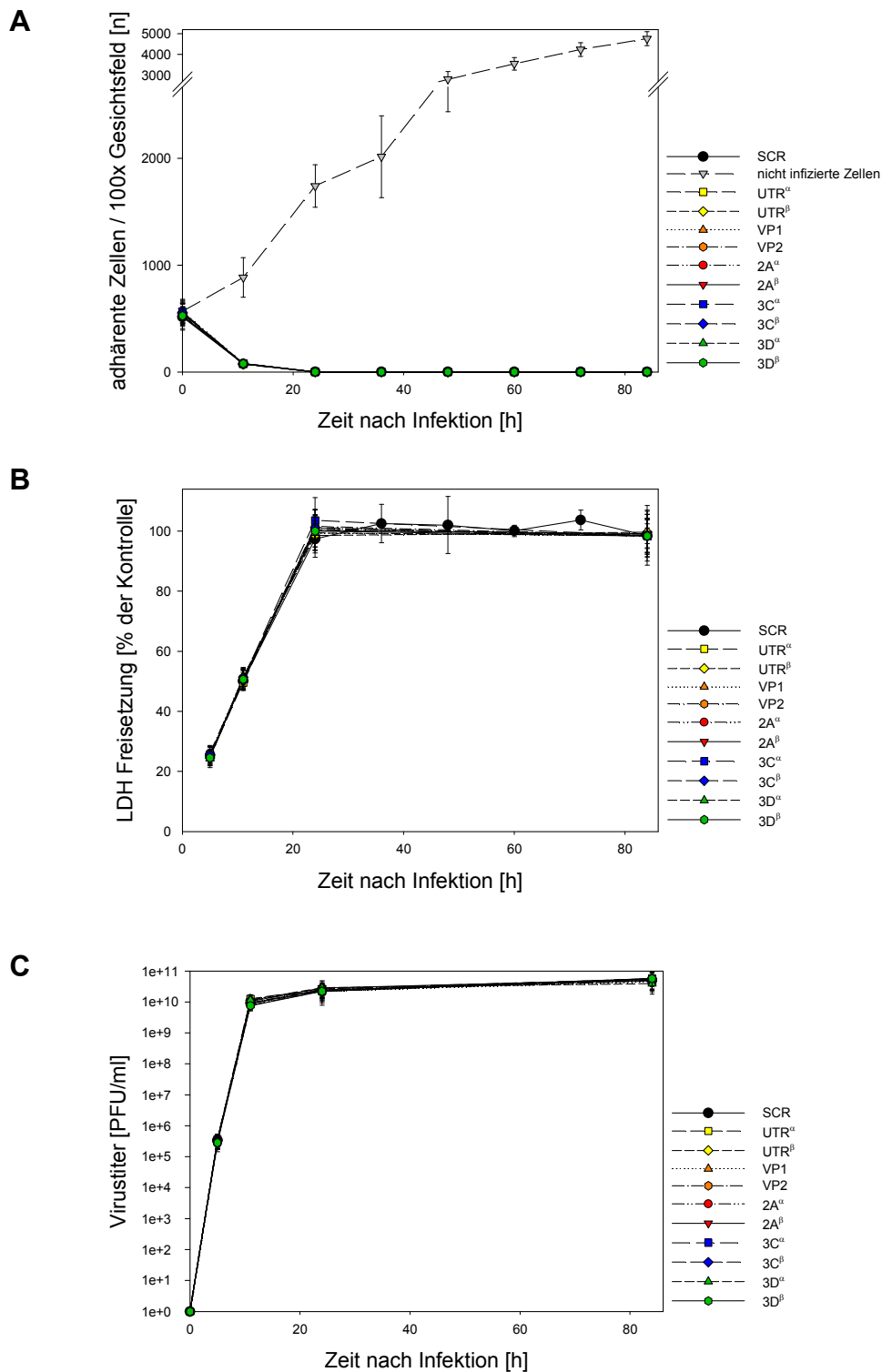
untersucht (Abb. 19). Die Zielsequenzen umfassten dabei die 5' *untranslated region* (siRNA-5'UTR<sup>α</sup>, siRNA-5'UTR<sup>β</sup>), die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2 (siRNA-VP1, siRNA-VP2), die viralen Proteasen 2A und 3C (siRNA-2A<sup>α</sup>, siRNA-2A<sup>β</sup>, siRNA-3C<sup>α</sup>, siRNA-3C<sup>β</sup>) sowie die RNA-abhängige RNA Polymerase 3D (siRNA-3D<sup>α</sup>, siRNA-3D<sup>β</sup>). Geeignete siRNA-Bindungsmotive wurden unter Berücksichtigung publizierter Richtlinien von Reynolds et al. [148] mit Hilfe eines Web-gestützten Algorithmus identifiziert ([http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)).



**Abb. 19: Selektion genomischer Zielregionen für die anti-coxsackievirale RNA-Interferenz.**

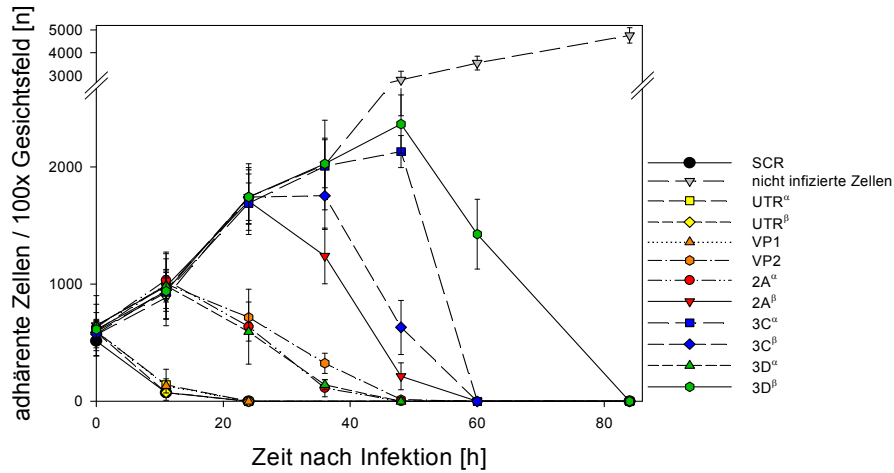
Um die therapeutische Wirksamkeit dieser verschiedenen, gegen distinkte Regionen des gesamten coxsackieviralen Genoms gerichteten siRNAs zu bestimmen, wurden HeLa-Zellen zweifach mit siRNA transfiziert und anschließend mit Wildtyp-CVB3 infiziert. Anschließend wurde die Attenuierung der viralen Zytotoxigenität durch Bestimmung der Zellproliferation sowie der zytosolischen LDH-Freisetzung nach CVB3-Infektion untersucht. Die Inhibition der viralen Replikation wurde mittels *Plaque Forming Assay* aus dem Überstand der infizierten Zellen bestimmt. Als Kontrollen wurden siRNA-Moleküle mit mindestens zwei Punktmutationen in der ursprünglichen coxsackieviralen siRNA-Sequenz sowie die *scrambled* siRNA siRNA-SCR gewählt. Die Transfektion dieser Kontroll-siRNA-Moleküle zeigte keinen messbaren Effekt auf zelluläre Proliferation sowie virale Replikation und Zytotoxizität (Abb. 20A-C). Spezifische gegen die 5' UTR sowie das Kapsidprotein VP1 gerichtete siRNA-Moleküle führten zu keiner signifikanten Attenuierung der viralen Zytotoxigenität (Abb. 21A-C). Die restlichen siRNAs variierten in ihrer Wirksamkeit. Ihr anti-virales Potential ließ sich in ansteigender Reihenfolge wie folgt einstufen:  $2A^{\alpha} \leq 3D^{\alpha} \leq VP2 < 2A^{\beta} < 3C^{\beta} < 3C^{\alpha} < 3D^{\beta}$ . Die signifikanteste Reduktion der coxsackieviralen Pathogenität wurde durch Applikation der gegen die virale Polymerase 3D gerichtete siRNA-3D<sup>β</sup> erreicht. Ihre Einführung vermittelte permissiven HeLa-Zellen mehr als zwei Tage anti-virale Immunität. Die Zytotoxizität wurde bis zu 72h nach Infektion signifikant inhibiert und

die virale Replikation bis zu 100.000fach inhibiert. Für die folgenden Experimente wurden die drei effektivsten siRNAs  $3C^{\alpha}$ ,  $3C^{\beta}$  und  $3D^{\beta}$  verwendet.

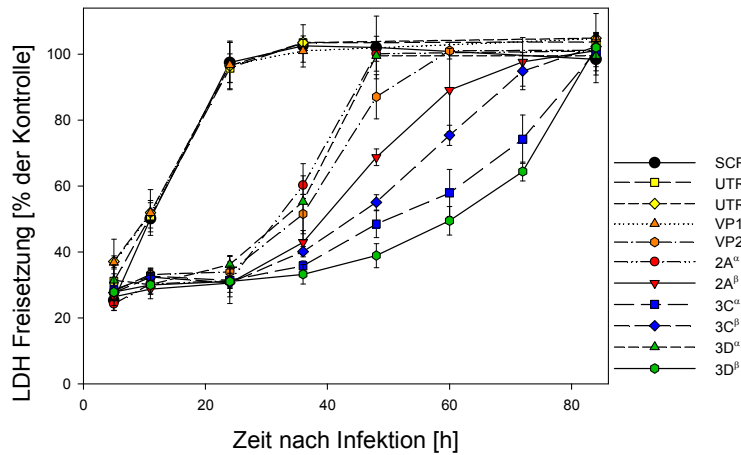


**Abb. 20: Therapeutische Wirksamkeit verschiedener Kontroll-siRNAs mit mindestens zwei Punktmutationen in der ursprünglichen coxsackieviralen Sequenz.** Eine Attenuierung der viralen Zytopathogenität wurde durch Quantifizierung der zellulären Proliferation (A) sowie Messung der zytosolischen LDH-Freisetzung infizierter und/oder transfizierter HeLa-Zellen (B) evaluiert. Eine Inhibition der viralen Replikation wurde mittels *Plaque Forming Assay* aus den Überständen infizierter und transfizierter, permissiver HeLa-Zellen untersucht (C).

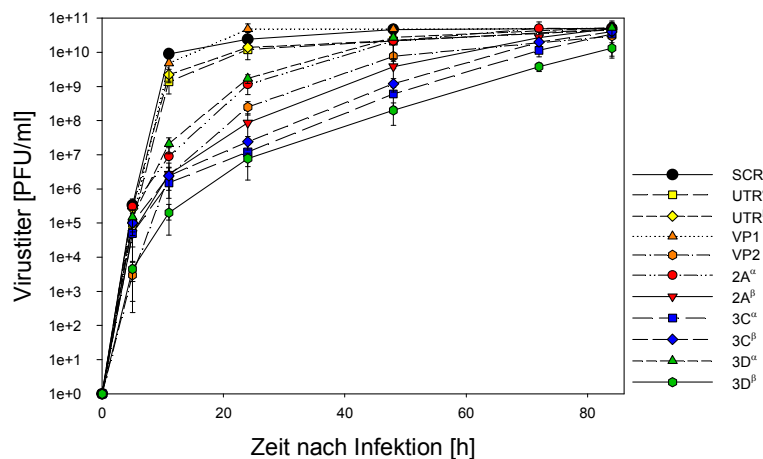
A



B



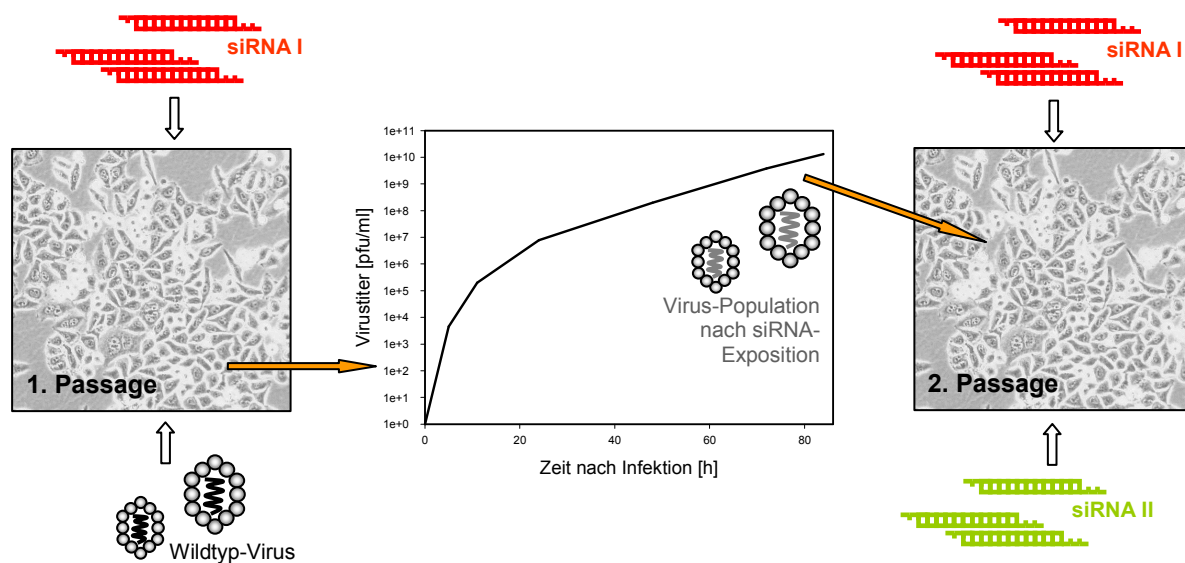
C



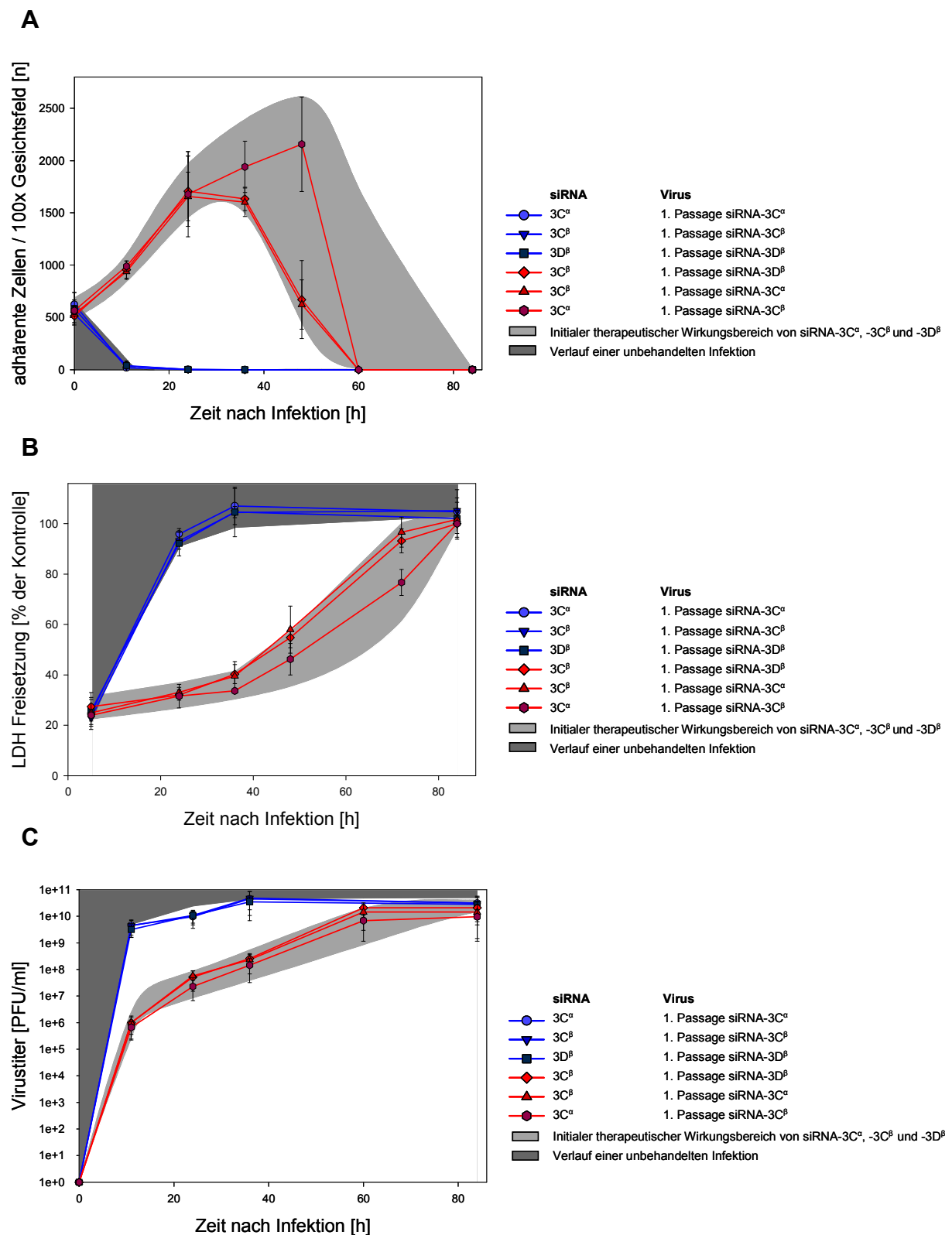
**Abb. 21: Therapeutische Wirksamkeit verschiedener, gegen das gesamte coxsackievirale Genom gerichteter siRNAs.** Die Attenuierung der viralen Zytopathogenität durch die verschiedenen, gegen distinkte Regionen des coxsackieviralen Genoms gerichteten siRNAs wurde durch Quantifizierung der zellulären Proliferation (A) sowie Messung der zytosolischen LDH-Freisetzung infizierter und/oder transfizierter HeLa-Zellen (B) bestimmt. Die Inhibition der virale Replikation wurde mittels *Plaque Forming Assay* aus den Überständen infizierter und transfizierter, permissiver HeLa-Zellen untersucht (C).

### 3.2.2. Entstehung einer resistenten Viruspopulation

Angesichts ihrer hohen Mutationsfähigkeit stellt die Entstehung behandlungsresistenter Flucht- (*Escape*) Mutanten unter therapeutischem Selektionsdruck ein Hauptproblem jeder anti-viralen Therapiemaßnahme dar. Um zu klären, ob die trotz initialer signifikanter Attenuierung beobachtete nur transiente therapeutische Wirksamkeit der siRNA neben dem kontinuierlich abnehmenden zellulären siRNA-Level auch auf viraler Flucht (*Viral Escape*) beruht, wurde eine Viruspopulation nach siRNA-Exposition am Ende eines Infektionszyklus aus dem Zellkultur-Überstand (1. Passage) gewonnen und zur Infektion von mit derselben siRNA bzw. mit einer anderen siRNA behandelten Zellen verwendet (2. Passage) (Abb. 22). Ihre Empfindlichkeit gegenüber der erneuten siRNA-Therapie wurde im Proliferations- (Abb. 23A), LDH- (Abb. 23B) sowie *Plaque Forming Assay* (Abb. 23C) quantifiziert. Unter dem Selektionsdruck einer siRNA konnte die Entstehung einer resistenten Quasispezies beobachtet werden. Diese konnte durch wiederholte Behandlung mit derselben siRNA nicht, jedoch durch Applikation einer gegen eine andere Zielsequenz gerichteten siRNA attenuiert werden.

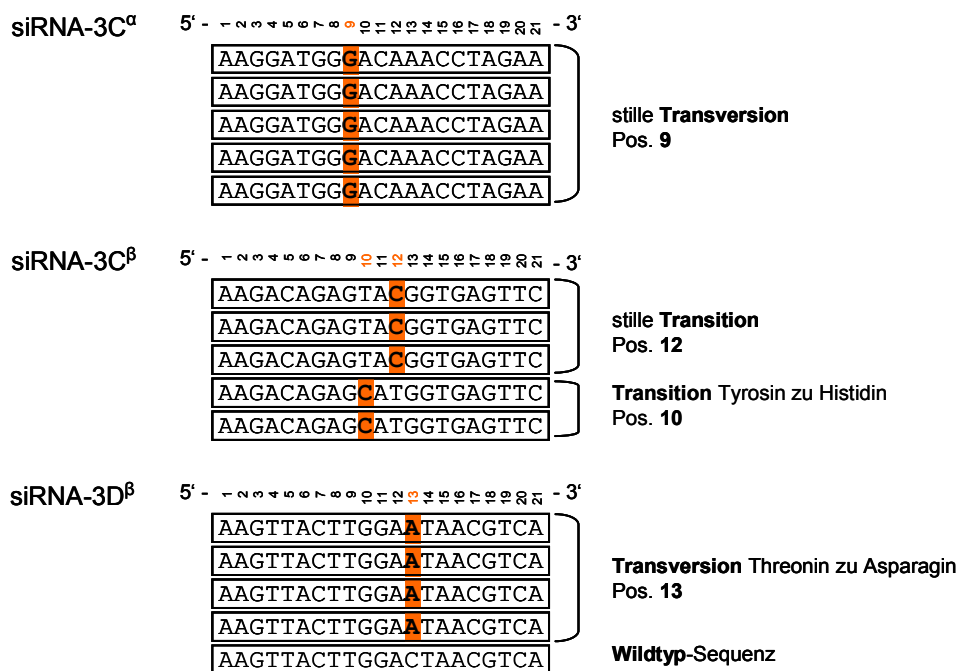


**Abb. 22: Versuchsansatz zur Evaluierung eines möglichen *Viral Escape* nach siRNA-Exposition.** Die nach siRNA-Exposition (1. Passage) entstandene Viruspopulation wurde am Ende eines Infektionszyklus isoliert und zur Infektion von mit derselben siRNA (siRNA I) bzw. mit einer anderen siRNA (siRNA II) behandelten Zellen verwendet (2. Passage).



**Abb. 23: Entstehung einer resistenten Viruspopulation nach siRNA-Exposition.** Eine nach 60-stündiger siRNA-Exposition entstandene Viruspopulation wurde in einem zweiten Infektionszyklus mit derselben (blaue Linien) bzw. einer gegen eine andere Zielsequenz gerichteten (rote Linien) siRNA behandelt und ihre Empfindlichkeit gegenüber der erneuten siRNA-Therapie im Proliferations- (A), LDH- (B) sowie *Plaque Forming Assay* (C) hinsichtlich einer möglichen Resistenzentwicklung analysiert. Grau hinterlegte Flächen kennzeichnen den initialen therapeutischen Wirkungsbereich der siRNAs 3C<sup>α</sup>, 3C<sup>β</sup> und 3D<sup>β</sup> (grau) bzw. den Verlauf einer unbehandelten Infektion (dunkelgrau).

Im Rahmen einer genotypischen Resistenzanalyse dieser Quasispezies durch Sequenzierung einzelner Plaque-purifizierter Virusnachkommen, konnten bei 14 von 15 der untersuchten Viren Mutationen in den entsprechenden siRNA-Zielsequenz-Bereichen identifiziert werden (Abb. 24), jeweils verteilt auf ein oder zwei Nukleotide im Zentrum des Bindungsmotivs. Nach siRNA-3C<sup>α</sup>-Exposition ergab die genomische Sequenzanalyse ausschließlich stille T- nach G-Transversionen in Position 9 der siRNA-Erkennungssequenz. Die nach siRNA-3C<sup>β</sup>-Behandlung entstandene Virusnachkommenschaft zeigte stille T- nach C-Transitionen in Position 12 der siRNA-Zielregion bzw. T- nach C-Transitionen in Position 10, die zu einem Aminosäureaustausch von Tyrosin (TAT) zu Histidin (CAT) führten. siRNA-3D<sup>β</sup>-vorbehandelte, mutierte Viren trugen C- nach A-Transversionen in Position 13 der Zielsequenz, die zu einem Aminosäureaustausch von Threonin (ACT) zu Asparagin (AAT) führten.



**Abb. 24: Entstehung einer punktmutierten Viruspopulation nach siRNA-Exposition.** Die genomische Sequenzanalyse der am Ende eines Infektionszyklus aus mit siRNA-3C<sup>α</sup>- (oben), -3C<sup>β</sup>- (mitte) bzw. -3D<sup>β</sup>- (unten) behandelten HeLa-Zellen isolierten und Plaque-purifizierten Viren ergab größtenteils virale Genome mit Mutationen im siRNA-Bindungsmotiv. Punktmutierte Nukleotide sind rot gekennzeichnet. (Pos. Position)

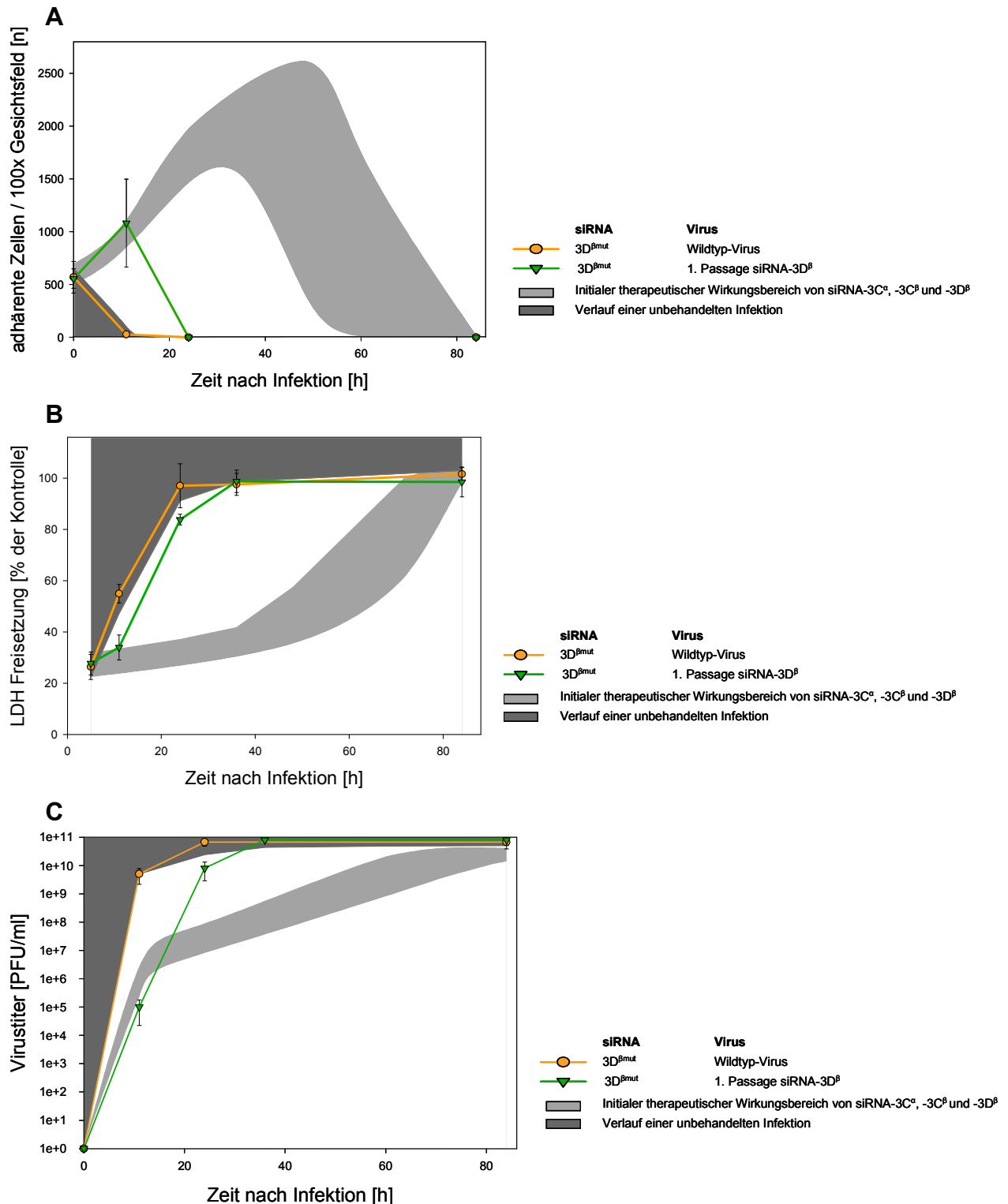
Um zu überprüfen, ob diese einzelnen Nukleotidsubstitutionen in zentraler Position des siRNA-Bindungsmotivs tatsächlich ausreichen, um dem Virus Resistenz gegenüber einem siRNA-basierten Therapeutikum zu verleihen, wurde eine artifizielle siRNA-3D<sup>β</sup> mut mit der nach siRNA-3D<sup>β</sup>-Exposition beobachteten C- nach A-Transversion in Position 13 der ursprünglichen coxsackieviralen Sequenz generiert und ihr therapeutisches Potential in mit

Wildtyp-Virus bzw. mit siRNA-3D<sup>β</sup> exponierten Virusnachkommen infizierten Zellen bestimmt. Die Introduktion der einzelnen Mutation neutralisierte die therapeutische Wirksamkeit der ursprünglichen siRNA-3D<sup>β</sup> bei Wildtyp-Virus-Infektionen vollständig (Abb. 25). Bei Behandlung der unter siRNA-3D<sup>β</sup>-Selektionsdruck entstandenen Quasispezies besaß siRNA-3D<sup>β mut</sup>, vermutlich aufgrund anti-viraler Aktivität gegenüber dem mutierten Teil der viralen Mischpopulation, eine geringe therapeutische Wirksamkeit.

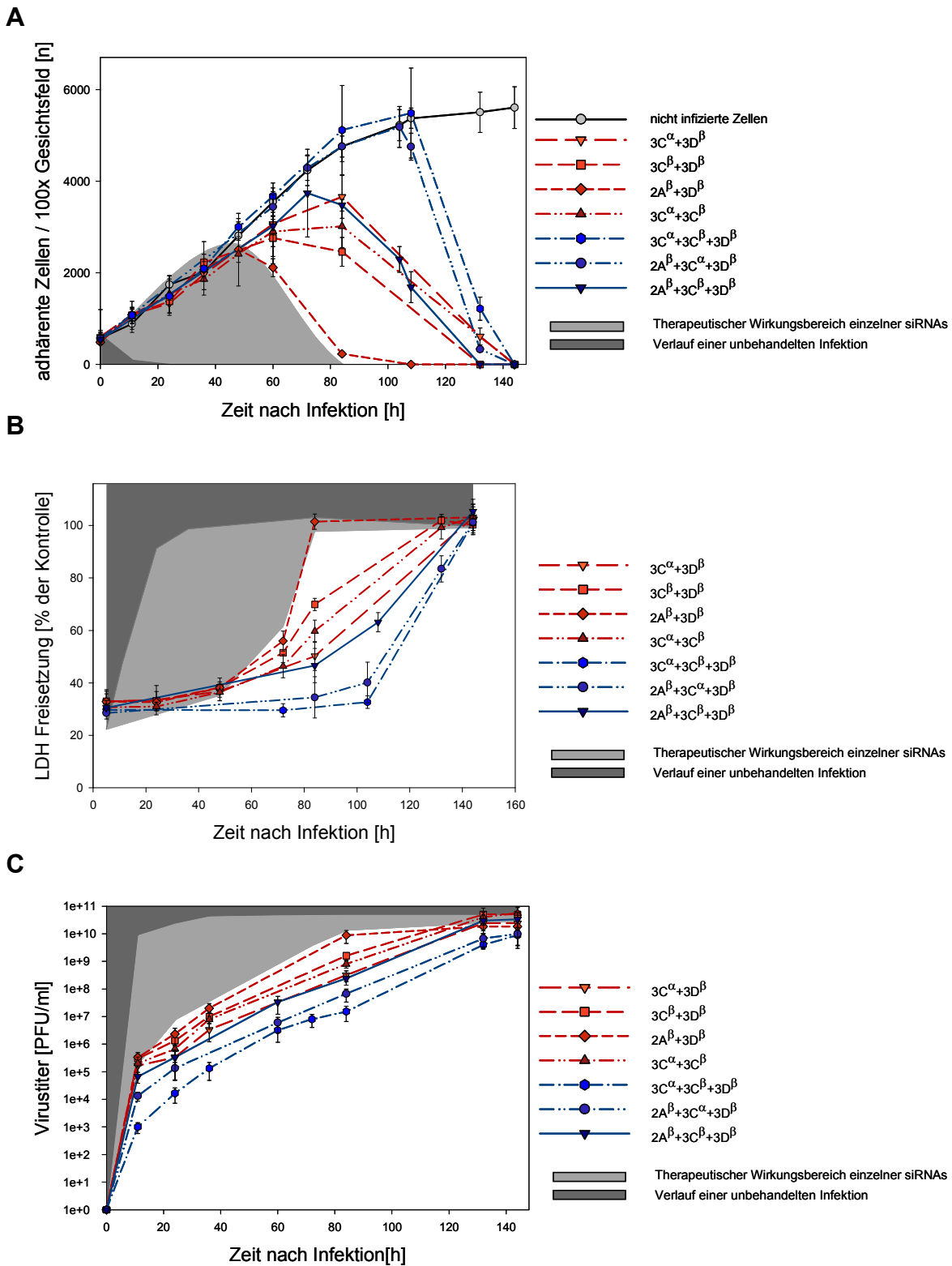
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen die hohe Anfälligkeit der anti-coxsackieviralen RNAi für virale Fluchtmechanismen als eine der Hauptdeterminanten für ein Behandlungsversagen unter einer nicht vollständig suppressiven Therapie. Nach initialer Unterdrückung der Virusreplikation führt die Bildung therapieresistenter Fluchtmutanten durch einzelne zentrale Punktmutationen zu einem raschen Wiederanstieg der Viruslast. Analog einer klassischen anti-viralen Kombinationstherapie, bei der mehrere Wirkstoffe gleichzeitig angewandt werden, sollte dieser Gefahr hier durch Einsatz eines gleichzeitig gegen mehrere virale Zielsequenzen gerichteten siRNA-Pools begegnet und durch Suppression eines *Viral Escape* die therapeutische Effektivität der einfachen Behandlung erhöht werden. Die Wirksamkeit verschiedener kombinatorischer Behandlungsstrategien zur Inhibition von Wildtyp-CVB3 wurde anhand der zellulären Proliferation, der zytosolischen LDH- sowie Virusfreisetzung in den Zellkulturüberstand bestimmt (Abb. 26). Durch Transfektion verschiedener Kombinationen aus 2 bis 3 gegen verschiedene Zielstrukturen gerichteten siRNAs konnte die therapeutische Wirksamkeit der einfachen Behandlung signifikant erhöht werden. Ein Cocktail aus drei verschiedenen siRNAs zeigte sich dabei effektiver zur Attenuierung von viraler Zytopathogenität sowie Replikation als eine Kombination aus nur zwei verschiedenen siRNA-Molekülen. Die Kotransfektion von siRNA-3C<sup>α</sup>, -3C<sup>β</sup> und -3D<sup>β</sup> führte zur Inhibition der viralen Zytopathogenität bis zu 120h nach Infektion im Vergleich zu 12h bei einer unbehandelten Infektion. Die genomische Sequenzanalyse Plaque-purifizierter Viren ergab ein signifikant reduziertes Auftreten resistenzrelevanter Mutationen nach kombinierter siRNA-Applikation (Abb. 27A). Insbesondere durch eine simultane Behandlung mit drei verschiedenen siRNAs konnte die Entstehung punktmutierter Viren nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 27B) und die anti-virale Aktivität gegenüber einer mit dieser Kombinationstherapie vorbehandelten Virusnachkommenschaft bei wiederholter Behandlung aufrechterhalten werden (Abb. 28). Da eine therapeutische Applikation von zwei siRNAs nicht ausreicht, um die Entstehung



resistenzassoziierter Mutationen zu unterdrücken, ist ihre Effektivität gegenüber der nach längerer siRNA-Exposition zum Teil mutierten Virusnachkommenschaft deutlich vermindert.

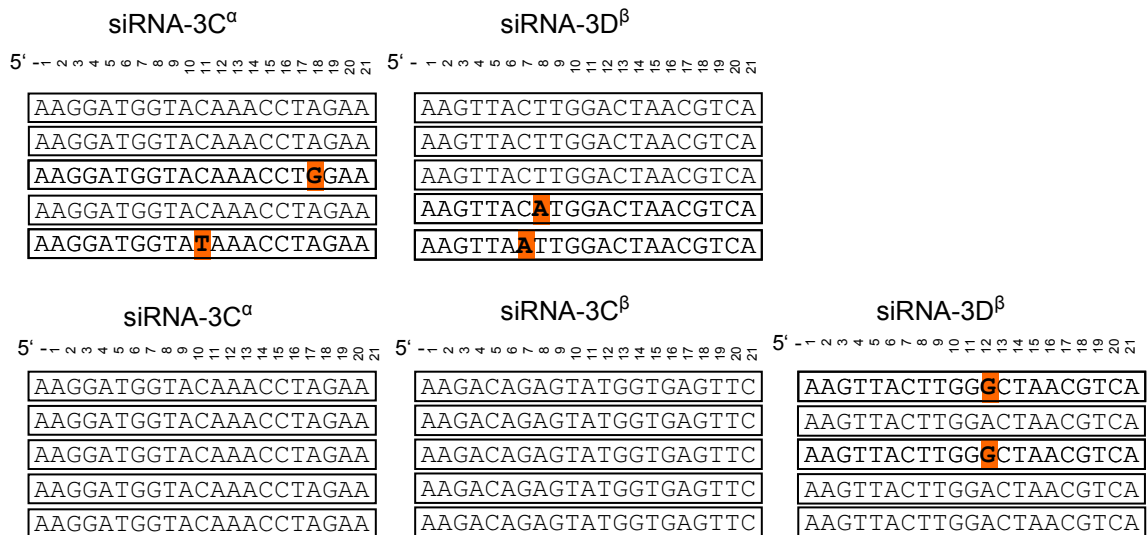


**Abb. 25: Die Einführung einer einzelnen Mutation führt zu einem resistenten Phänotyp.** Die Effektivität einer siRNA-3D<sup>β mut</sup> mit der unter siRNA-3D<sup>β</sup>-Selektionsdruck vorrangig aufgetretenen Mutation in der ursprünglichen Sequenz wurde durch Quantifizierung der zellulären Proliferation (A), Messung der zytosolischen LDH-Freisetzung (B) sowie mittels *Plaque Forming Assay* aus Zellüberständen (C) bestimmt. Durch Einführung der Mutation wurde die Wirksamkeit der siRNA-3D<sup>β</sup> bei Wildtyp-Virus-Infektionen vollständig, bei Infektionen mit siRNA-3D<sup>β</sup> exponierten Viren größtenteils neutralisiert. Grau hinterlegte Flächen kennzeichnen den initialen therapeutischen Wirkungsbereich der siRNAs 3C<sup>α</sup>, 3C<sup>β</sup> und 3D<sup>β</sup> (grau) bzw. den Verlauf einer unbehandelten Infektion (dunkelgrau).

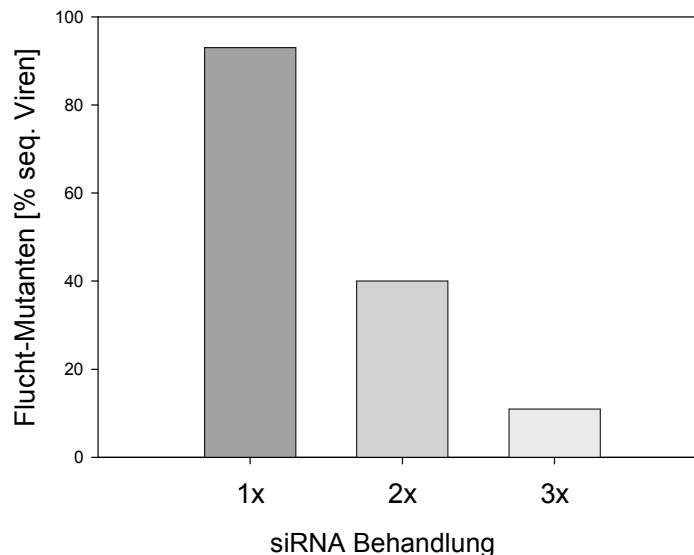


**Abb. 26: Evaluierung des therapeutischen Potentials verschiedener siRNA-Kombinationen.** Die Effektivität verschiedener kombinatorischer Behandlungsstrategien wurde an der zellulären Proliferation (A) sowie der viralen Zytotoxizität (B) und Replikation (C) gemessen. Die kombinierte Behandlung mit gegen verschiedene virale Regionen gerichteten siRNAs verstärkte den anti-viralen Effekt der einfachen Behandlung. Grau hinterlegte Flächen kennzeichnen den initialen therapeutischen Wirkungsbereich einzelner siRNAs (grau) bzw. den Verlauf einer unbehandelten Infektion (dunkelgrau).

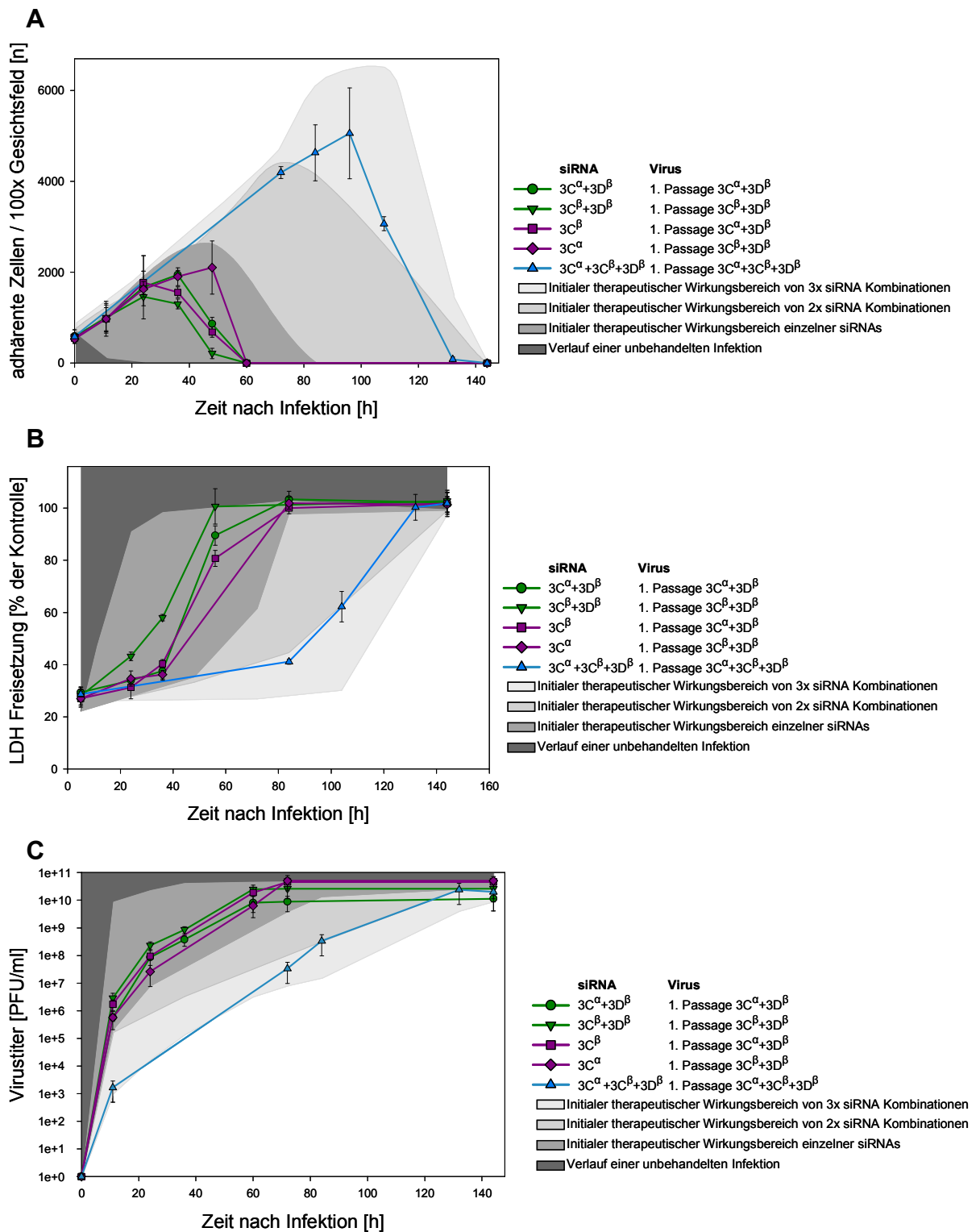
A



B



**Abb. 27: Kombinierte siRNA-Applikation supprimiert die Entstehung punktmutierter Viren.** A, Die genomische Sequenzanalyse Plaque-purifizierter Viren ergab, dass die Vorbehandlung mit einer dualen, gleichzeitig gegen 3C<sup>α</sup> und 3D<sup>β</sup> gerichteten siRNA-Kombination für 128h (obere Reihe) oder mit einer dreifachen, gleichzeitig gegen 3C<sup>α</sup>, 3C<sup>β</sup> und 3D<sup>β</sup> gerichteten siRNA-Kombination für 144h (untere Reihe) die Entstehung punktmutierter Viren signifikant reduziert. Punktmutierte Nukleotide sind rot gekennzeichnet. Die quantitative Darstellung in (B) als Prozent mutierter Zielsequenzen der sequenzierten (seq.) Genome Plaque-purifizierter Viren zeigt, dass durch simultane Behandlung mit drei siRNAs das Auftreten resistenzassoziierter Mutationen im Virusgenom fast vollständig unterdrückt wird.



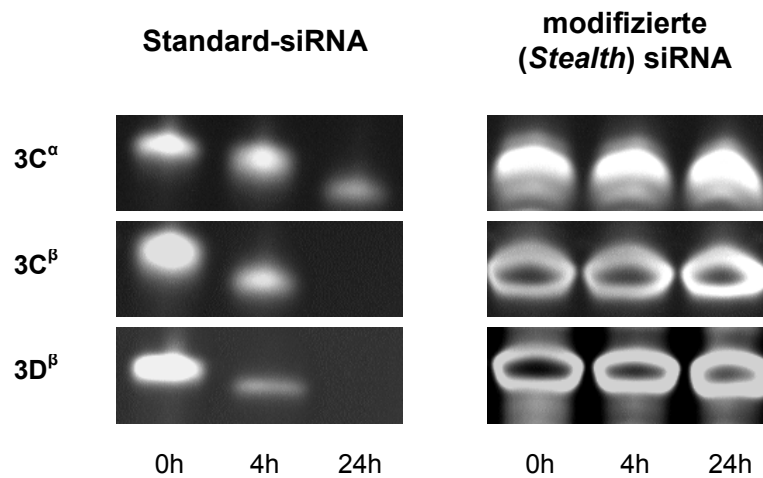
**Abb. 28: Aufrechterhaltung des therapeutischen Potentials durch Suppression eines *Viral Escape*.** Durch nahezu vollständige Suppression des *Viral Escape* blieb die Wirksamkeit der 3x Kombinationstherapie bei ihrem wiederholten Einsatz gegenüber der vorbehandelten Viruspopulation im Proliferations- (A), LDH- (B) sowie *Plaque Forming Assay* (C) erhalten. Da die Behandlung mit einer bzw. zwei siRNAs nicht ausreichte, um die Entstehung resistenzassoziierter Mutationen zu unterdrücken, war ihre anti-virale Aktivität gegenüber der nach längerer siRNA-Exposition zum Teil mutierten Virusnachkommenschaft vermindert. Grau hinterlegte Flächen kennzeichnen den initialen Wirkungsbereich einer zwei- bzw. dreifachen siRNA-Kombinationstherapie, den Wirkungsbereich einer siRNA-Monotherapie sowie den Verlauf einer unbehandelten Infektion.

### 3.2.3. siRNA intrinsische Nuklease-Stabilität

Eine Amplifikation des lokalen, siRNA-induzierten Degradationssignals führt in einigen Eukaryonten wie Pflanzen [157, 158] und Nematoden [159] zu einer lang anhaltenden und sich systemisch ausbreitenden Gen-Inhibition [78, 160]. Dem Menschen fehlt jedoch für diesen als transitives *silencing* bezeichneten Vorgang die notwendige RNA-abhängige RNA Polymerase [161, 162]. Kontinuierlich abnehmende zelluläre siRNA-Level werden daher das therapeutische Potential insbesondere bei ihrem klinischen Einsatz gegen persistierende Virusinfektionen stark limitieren. Abnehmende Konzentrationen sind hierbei auf Verdünnung durch Zellproliferation, aber insbesondere auch auf Nuklease-bedingte Degradation zurückzuführen. Zwar ist ein doppelsträngiges siRNA-Molekül wesentlich stabiler als ein RNA-Einzelstrang, es übersteht einen Nuklease-Angriff jedoch trotzdem nicht lange (Abb. 29). Zum Schutz instabiler siRNA gegen nukleolytischen Abbau, haben sich chemische Modifikationen als äußerst hilfreich erwiesen [163]. In diesem Zusammenhang sollte die Verwendung chemisch modifizierter *Stealth*<sup>TM</sup> RNAi siRNA-Moleküle (Invitrogen) die Langzeiteffektivität unserer anti-coxsackieviralen Therapiemaßnahme verbessern und so einen entscheidenden Schritt auf ihrem Weg in den klinischen Alltag voranbringen. Im Vergleich zu Standard-siRNAs sollen *Stealth*-siRNAs als 25 Nukleotid lange, duplex Oligonukleotide mit proprietären chemischen Modifikationen laut Hersteller eine verbesserte intrinsische Nuklease-Beständigkeit besitzen.

#### 3.2.3.1 siRNA intrinsische Serumstabilität

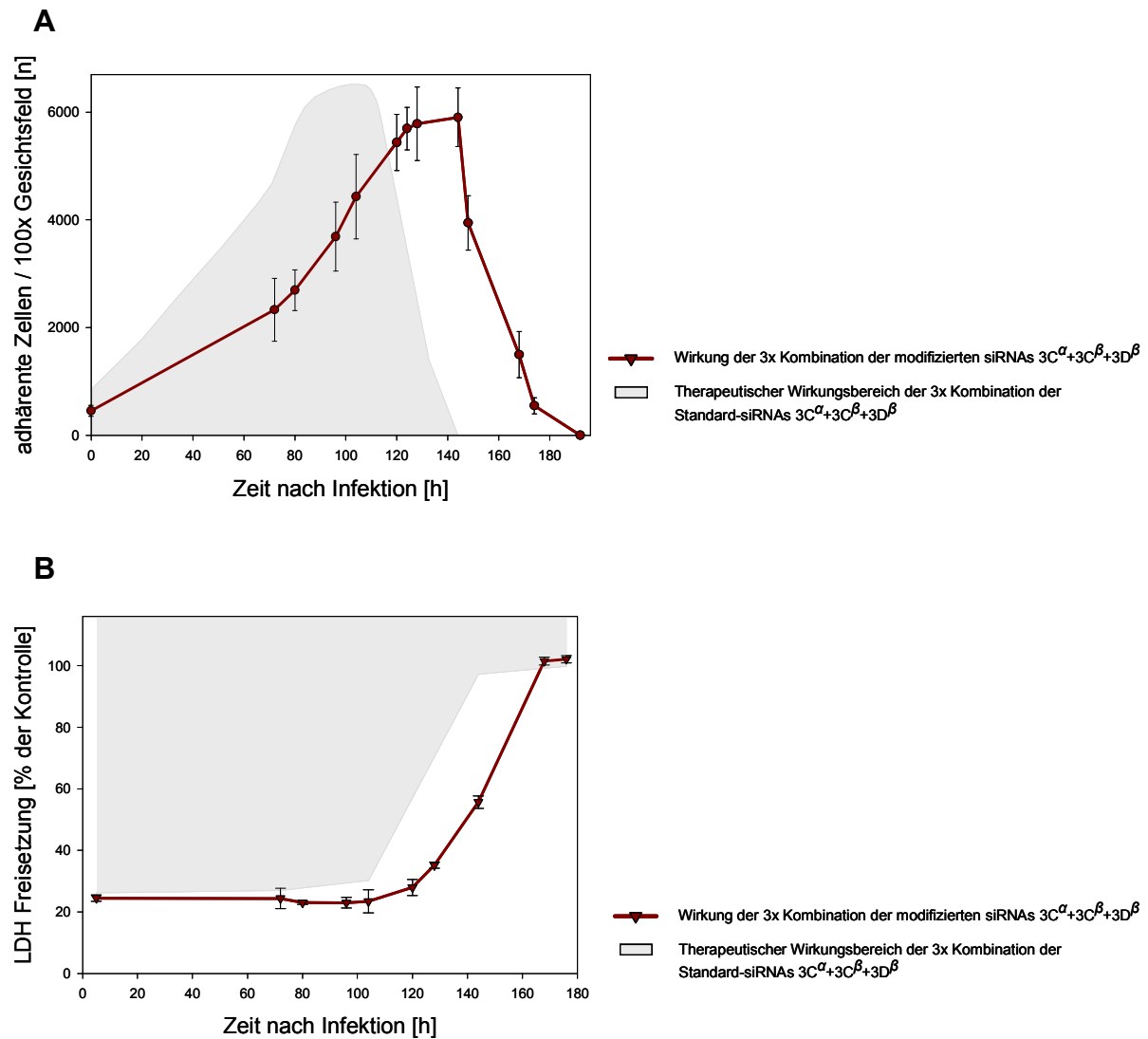
Zunächst wurden die mit Hilfe eines von Invitrogen angebotenen Algorithmus aus den hochpotenten Standard-siRNA-Sequenzen  $3C^{\alpha}$ ,  $3C^{\beta}$  und  $3D^{\beta}$  konvertierten *Stealth*-siRNAs  $3C^{\alpha \text{ stealth}}$ ,  $3C^{\beta \text{ stealth}}$  und  $3D^{\beta \text{ stealth}}$  hinsichtlich ihrer Nuklease-Beständigkeit in 30% Serum einer gesunden Typ I Interferon Rezeptor defizienten Maus, in etwa dem natürlichen Serumanteil am Gesamtblutvolumen entsprechend, untersucht. Die gelelektrophoretische Analyse der verschiedenen siRNAs nach Seruminkubation zeigte deutlich die Instabilität der Standard-siRNA gegenüber Serumnuklease-Angriffen in Form schnell abnehmender siRNA-Banden mit höherer elektrophoretischer Mobilität infolge einer terminalen Verkürzung der noch verbliebenen Moleküle um einige Nukleotide (Abb. 29). Die chemische *Stealth*-Modifikation stabilisierte jedoch das siRNA-Molekül über 24h gegen eine Nuklease-bedingte Degradation in murinem Serum.



**Abb. 29: Serumstabilität von Standard- sowie chemisch modifizierter siRNA-3C<sup>α</sup>, -3C<sup>β</sup> und -3D<sup>β</sup>.** Die *Stealth*-Modifikation stabilisiert das siRNA-Molekül über 24h gegen Nuklease-bedingte Degradation in murinem Serum.

### 3.2.3.2 Verstärkter therapeutischer Effekt durch Verwendung chemisch modifizierter siRNA

Die Einführung chemischer Modifikationen erhöht die Stabilität eines synthetischen siRNA-Moleküls, kann jedoch negative Auswirkungen auf seine RNAi-Effizienz haben [164]. Um zu klären, ob durch Anwendung der *Stealth*<sup>TM</sup> RNAi-Technologie eine Stabilisierung der siRNA erreicht wird und gleichzeitig ihr hohes inhibitorisches Potential erhalten bleibt, wurden permissive HeLa-Zellen mit einer Kombination der chemisch modifizierten *Stealth*-siRNAs 3C<sup>α stealth</sup>, 3C<sup>β stealth</sup> und 3D<sup>β stealth</sup> transfiziert und anschließend mit Wildtyp-CVB3 infiziert. Die Effektivität der kombinatorischen Behandlungsstrategie wurde anschließend an der Zellproliferation (Abb. 30A) sowie der zytosolischen LDH-Freisetzung gemessen (Abb. 30B). Durch kombinierte Behandlung mit chemisch modifizierten *Stealth*-siRNAs konnte die Dauer des RNAi-Effekts der Dreifachkombination aus den Standard-siRNAs 3C<sup>α</sup>, 3C<sup>β</sup> und 3D<sup>β</sup> deutlich verlängert werden. Die Kofunktion der chemisch modifizierten *Stealth*-siRNA-Moleküle 3C<sup>α stealth</sup>, 3C<sup>β stealth</sup> und 3D<sup>β stealth</sup> führte zu einer Inhibition der viralen Zytogenität bis zu 152h nach Infektion im Vergleich zu 120h bei Behandlung mit der Standard Dreifachkombination bzw. 12h bei einer unbehandelten Infektion.



**Abb. 30: Verbessertes therapeutisches Potential durch Verwendung chemisch modifizierter *Stealth*-siRNA.** Die Effektivität kombinatorischer Behandlungsstrategien chemisch modifizierter siRNAs wurde an der zellulären Proliferation (A) sowie der viralen Zytotoxizität (B) gemessen. Die kombinierte Behandlung mit chemisch modifizierten *Stealth*-siRNAs verstärkte den anti-viralen Effekt der dreifachen Behandlung mit Standard-siRNAs. Die hellgrau hinterlegte Fläche kennzeichnet den initialen therapeutischen Wirkungsbereich der dreifachen Kombination der Standard-siRNAs  $3C^{\alpha}$ ,  $3C^{\beta}$  und  $3D^{\beta}$ .

## 4. Diskussion

Virale Herzerkrankungen umfassen akute und chronische Formen der Myokarditis, sowie einen Teil der dilatativen Kardiomyopathien, für die eine virale Ätiopathogenese gezeigt werden konnte. Ihre häufigsten Erreger stammen aus der Gruppe der Enteroviren, wie das Coxsackievirus B3, das als einer der Hauptverursacher dieser teils lebensbedrohlichen Erkrankungen insbesondere bei immunsupprimierten Patienten und Kindern gilt [1, 23, 25]. Spezifische Therapiemaßnahmen sind derzeit nicht verfügbar, die therapeutischen Möglichkeiten beschränken sich auf rein symptomatische Behandlungsschemata. Aufgrund einer hohen Morbidität und Mortalität, insbesondere bei coxsackievirus-induzierten Herzerkrankungen, ist jedoch die Entwicklung einer spezifischen Therapie von großer medizinischer wie auch ökonomischer Relevanz. Da im Verlauf der CVB3-Infektion eine Schädigung des Myokards neben der direkt zellzerstörenden Wirkung der Viren [27, 52, 75] auch infolge der durch Viruspersistenz ausgelösten, immunpathologischen Mechanismen [65] zu erfolgen scheint, muss hierbei eine vollständige Viruselimination als kausale Strategemaßnahme angestrebt werden. Die Entdeckung der RNA-Interferenz als endogener Mechanismus der Virusabwehr eröffnete hierfür eine neue und vielversprechende Ansatzmöglichkeit. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte das anti-coxsackievirale Potential der RNAi unter Verwendung spezifischer, gegen das virale Genom gerichteter siRNA-Moleküle gezeigt und für die klinische Anwendung optimiert werden.

### 4.1 Therapeutisches Potential der anti-coxsackieviralen RNA-Interferenz

Den ersten wissenschaftlichen Nachweis einer anti-enteroviralen Wirksamkeit der RNAi erbrachten Studien am Poliovirus. Die therapeutische Applikation von gegen die genomischen Regionen der Kapsidproteine bzw. der RNA-abhängigen RNA Polymerase gerichteter siRNA zeigte sich *in vitro* höchst wirksam zur Inhibition polioviraler Infektionen [135, 136]. Trotz einer nahezu vollständigen Viruselimination führte jedoch die Entstehung einer behandlungsresistenten Viruspopulation zu einem raschen Wiederanstieg der Viruslast. Der Austausch einer einzelnen Base in zentraler Position des siRNA-Bindungsmotivs verlieh den Virusnachkommen Resistenz gegenüber dem siRNA-basierten Angriff. Um das Risiko für ein Behandlungsversagen infolge einer derartigen Resistenzentwicklung aber auch der natürlichen Genomvariabilität zu minimieren, erfolgte die Auswahl geeigneter siRNA-Zielsequenzen in der vorliegenden Dissertation aus hochkonservierten genomischen



Bereichen, beginnend mit der für die virale Protease 2A kodierenden Region. Die Protease 2A ist ein für die Virusmaturation wie auch die virale Zytopathogenität wichtiges Nichtstrukturprotein [52, 156]. Da ihre Nukleotidsequenz aufgrund ihrer katalytischen Aktivität hochkonserviert sein muss, stellt sie ein geeignetes Ziel für eine sequenzspezifische Destruktion der viralen RNA dar. Zudem wurden klinisch relevante Mutationen des enteroviralen Genoms bislang hauptsächlich in der für die viralen Strukturproteine kodierenden Region lokalisiert [68, 165].

#### **4.1.1 siRNA-2A<sup>α</sup>-vermittelte Attenuierung der viralen Pathogenität *in vitro***

Gegen die Protease 2A gerichtete siRNA zeigte sich *in vitro* hochwirksam zur Attenuierung von Coxsackievirus B3. Ihre Transfektion vermittelte permissiven HeLa-Zellen während der frühen Phase der Infektion anti-virale Immunität unter Inhibition der viralen Replikation im Vergleich zu nur infizierten oder infizierten und mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Da sie sowohl die virale Positiv- als auch Negativstrang-Expression hemmt, stellt sie einen effizienten dualen Ansatzpunkt zur Inhibition der viralen Replikation und (zytopathischen) Proteinexpression dar. Ihre Eignung zur Behandlung coxsackieviraler Erkrankungen beim Menschen sollte neben der Zellkultur auch im experimentellen Tiermodell überprüft werden.

#### **4.1.2 siRNA-2A<sup>α</sup>-vermittelte Attenuierung der viralen Pathogenität *in vivo***

Das Hauptziel einer *in vivo* Applikation der anti-coxsackieviralen siRNA ist die Therapie viraler Herzerkrankungen. Dennoch erfolgte eine erste Verifizierung des anti-coxsackieviralen Potentials der RNAi in Typ I IFNR defizienten Mäusen [152]. Diese Mäuse sind höchst empfänglich für coxsackievirale Infektionen und sterben selbst bei Inokulation mit niedrigen Virustitern früh nach Infektion, jedoch infolge des dramatischen Anstiegs viraler RNA in der Leber meist aufgrund einer fulminanten Hepatitis [34]. In den letzten Jahren wurden bedeutende Fortschritte in der Aufklärung der Pathogenese coxsackieviraler Erkrankungen erzielt. Insbesondere tierexperimentell gewonnene Daten aus gentechnisch veränderten Mäusen trugen dabei wesentlich zu unserem heutigen Verständnis dieser Erkrankungen bei [166]. Auch hier ermöglichte die Verwendung des hochvulnerablen IFNR *Knockout* Modells für einen ersten *proof of principle*, neben der Bestimmung intermediärer

Parameter wie Virusreplikation und Organschädigung mit überwiegend prognostischer Bedeutung, die Wahl harter Endpunkte, wie Mortalität und Überleben, als eindeutig messbare Indikatoren für die anti-virale Effektivität.

Eine *in vivo* Anwendung der RNA-Interferenz wird durch die enzymatische Instabilität der siRNA sowie ihre geringe Aufnahme in das Zielgewebe wesentlich beeinträchtigt. Verschiedene Studien konnten jedoch einen Transfer nicht-komplexierter siRNA in die intakte Maus durch hydrodynamische Transfektion zeigen [153-155]. Bei dieser Technik erfolgt die siRNA-Applikation über die Schwanzvene durch rapide Injektion einer großen Menge nackter siRNA in einem hohen Volumen von bis zu 8% des Körpergewichts. Der genaue Aufnahme-Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, doch scheint das Gefäßepithel durch Anstieg des venösen Drucks kurzzeitig porös zu werden und stark vaskularisiertem Gewebe eine transiente Nukleinsäureaufnahme zu erlauben [167]. Es kommt zu einer lokalen Anreicherung der siRNA in Niere, Milz, Lunge, Pankreas und, mit einer Transfektionseffizienz zwischen 70% und 89% [155, 168], insbesondere der Leber [169]. Aufgrund der erheblichen Belastung für den gesamten Organismus ist eine hydrodynamische siRNA Gabe beim Menschen nicht durchführbar. Für einen klinischen Einsatz der siRNA zur Therapie viraler Herzerkrankungen muss daher ein alternatives Verfahren zur effizienten, myospezifischen siRNA-Applikation entwickelt werden. Für einen ersten *proof of principle* stellt die hydrodynamische siRNA-Applikation jedoch eine elegante und nebenwirkungsarme Methode dar, vor allem da sie sich angesichts der hohen Transfektionseffizienz der Leber besonders zur Behandlung hepatischer Erkrankungen [170], wie in unserem Tiermodell, eignet. Nach hydrodynamischer Transfektion Cy5-fluoreszenzmarkierter siRNA-2A<sup>α</sup> ergab sich in unserem System eine Transfektionsrate von 83.3±5.7% aller Hepatozyten. Für das Herz konnte eine Rate von über 50% erzielt werden.

Durch die hydrodynamische Gabe von siRNA-2A<sup>α</sup> konnte das Überleben behandelter Typ I IFNR defizienter Mäuse signifikant verlängert werden, eine Maus von acht Mäusen überlebte nach vollständiger Viruselimination die Infektion sogar auf Dauer. Dies konnte bislang in keinem anderen der zahlreichen Experimente mit diesen Tieren beobachtet werden. Die Einführung der Kontroll-siRNA-2A<sup>α neg. KO</sup> zeigte hingegen, verglichen mit infizierten, aber nicht siRNA-behandelten Tieren, keine Wirkung auf das Überleben. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten von mit identischen CVB3-Titern infizierten Tieren [34] starben diese Mäuse 52±5h nach Infektion. Unterschiede in der

Überlebensdauer von mit gleicher siRNA-2A<sup>α</sup>-Dosis behandelte Mäusen sind hierbei vermutlich auf Abweichungen in der hydrodynamischen Transfektionseffizienz zurückzuführen. Kurz vor dem virusbedingten Tod der Kontroll-Tiere wiesen siRNA-2A<sup>α</sup>-behandelte Mäuse eine signifikant verminderte Schädigung der Leber auf; die Viruslast in Leber, Lunge und Niere war deutlich reduziert. Im Herz konnte nach Introdution protektiver siRNA-2A<sup>α</sup> zu diesem Zeitpunkt kein Virus detektiert werden, eine Beobachtung, die angesichts einer Transfektionseffizienz von 50.2±4.2% für das Herz vom anti-coxsackieviralen Potential der RNAi auch bei kardialer Manifestation der Erkrankung zeugt.

Die hydrodynamische siRNA-2A<sup>α</sup> Applikation vermittelte ein verlängertes Überleben und verminderte signifikant die Schädigung der in diesem Tiermodell hochvulnerablen Leber. Dennoch führte die Virusinfektion zu einem späteren Zeitpunkt bei der Mehrzahl der Tiere zum Tode. Einem Nuklease-bedingten Abbau der siRNA und der Bildung eines Reservoirs für ungehemmte Replikation durch nicht-transfizierte Hepatozyten als mögliche Ursachen hierfür konnte durch wiederholte siRNA Gabe begegnet werden. So verlängerte eine zusätzliche dritte siRNA-2A<sup>α</sup>-Transfektion die Lebensspanne im Vergleich zu der zweifach transfizierter Tiere nochmals signifikant. Dennoch ermöglichte auch sie kein Überleben. Da als Tiermodell ein gentechnisch veränderter Mausstamm mit höchster Empfänglichkeit für CVB3-Infektionen gewählt wurde, kann jedoch bereits die deutliche Verlängerung der Überlebensspanne als Beweis für das außerordentlich hohe *in vivo* Potential der anti-coxsackieviralen RNAi gewertet werden. Dies gilt insbesondere, da im Normalfall bereits eine Verzögerung der viralen Expression dem Immunsystem Zeit zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort geben würde.

#### **4.1.3 Einfluss einer Interferon-Antwort auf das anti-virale Potential**

Die Introdution doppelsträngiger RNA-Moleküle kann in Säugetierzellen eine unspezifische Typ 1 Interferon-Antwort auslösen [97]. Interferone sind dafür bekannt, dass sie die Replikation von Coxsackievirus B3 hemmen können [171]. Dennoch macht die Verwendung 21 Nukleotid langer siRNAs zur sequenzspezifischen RNA-Degradation die Beobachtung eines unspezifischen protektiven Effekts der siRNA-2A<sup>α</sup> durch Induktion einer Interferon-Antwort in unseren Experimenten sehr unwahrscheinlich, da diese Moleküle den RNA-Interferenz-Signalweg unter Nachahmung eines Dicer-Produkts stromabwärts der Interferon-Signaltransduktionskaskade betreten und so die Stimulierung einer unspezifischen

Stressreaktion meist umgehen. Zudem zeigte die Verwendung von Kontroll-siRNA-Molekülen mit Punktmutationen in der ursprünglichen coxsackieviralen Sequenz bzw. einer kommerziell erhältlichen *scrambled* siRNA die Spezifität des siRNA-2A<sup>a</sup>-vermittelten Effekts. Ihre Transfektion hatte keine Wirkung auf den Verlauf der coxsackieviralen Infektion. Dabei bleibt fraglich, ob eine siRNA-basierte Interferon-Induktion bei einem klinischen Einsatz das anti-(coxsackie)virale RNAi-Potential durch Kombination der sequenzspezifischen Abwehr mit einer virus-ähnlichen, unspezifischen Immunstimulation steigern [172] oder nur ein erhöhtes Risiko für einen fatalen Ausgang durch autoimmune oder systemisch inflammatorische Reaktionen des Körpers mit sich bringen würde.

## **4.2 Faktoren, die das therapeutische Potential der anti-coxsackieviralen RNA-Interferenz beeinflussen**

Die RNA-Interferenz hat sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als hochwirksam zur Attenuierung coxsackieviraler Infektionen erwiesen. Ein Einsatz im klinischen Alltag erfordert jedoch eine Kombination aus höchster Effektivität, um konsequent und frühzeitig eine Replikation und Ausbreitung der Viren im menschlichen Körper zu verhindern, ausreichender Stabilität zur Behandlung persistierender Virusinfektionen und erfolgreichem Resistenzmanagement zur Vermeidung behandlungsresistenter Virusvarianten. Der Schwerpunkt des zweiten Projektabschnittes lag daher in einer Optimierung des Therapiekonzepts hinsichtlich dieser Faktoren als Grundvoraussetzung für seine klinische Translation.

### **4.2.1 Die Selektion der genomischen Region**

Mit voranschreitender Entschlüsselung der komplexen Vorgänge der RNA-Interferenz bei Erkennung und Zerstörung von Fremd-RNA konnten eine Vielzahl allgemeiner Richtlinien für das Design funktionaler siRNAs herausgegeben werden. So sollten beispielsweise siRNA-Duplexe mit einem G/C-Gehalt zwischen 30 und 52% [148, 173] gewählt werden, die weder intrinsische Sekundärstrukturen noch interne Wiederholungen enthalten. Ein zu geringer G/C-Gehalt scheint den Duplex zu destabilisieren, ein zu hoher hingegen eine Beladung des Effektor-Komplexes sowie die Freisetzung des

Spaltungsproduktes zu behindern [174]. Intrinsische Sekundärstrukturen können die Inkorporation der siRNA in RISC erschweren. Auch die thermodynamische Stabilität am 5'-Ende des *antisense* Stranges gegenüber der des *sense* Stranges beeinflusst die Dynamik des asymmetrischen Einbaus der siRNA in RISC und somit ihre Leistungsfähigkeit deutlich [175, 176]. Positionsspezifische Determinanten, wie die Präferenz spezieller Basen in bestimmten Positionen des Duplex, können ebenso entscheidend für die Funktionalität einer siRNA sein [148]. Die Entwicklung moderner Algorithmen für ein rationales siRNA-Design unter Berücksichtigung dieser und anderer struktureller, thermodynamischer und positionsspezifischer Kriterien ermöglichte eine breite Anwendung der siRNA in Forschung und Entwicklung. Doch obgleich ihr Einsatz die Erfolgswahrscheinlichkeit einer siRNA deutlich verbessert, ist er hierfür keine Gewähr; vielmals variieren siRNAs drastisch in ihrer Wirksamkeit [177-179]. Strukturelle Eigenheiten der Ziel-RNA, wie eine lokale intramolekulare Faltung, scheinen hier auf die Erkennung und Prozessierung durch RISC einzuwirken und zu einer verminderten Effektivität der siRNA zu führen [177, 179-181]. Dabei verursachen insbesondere lokale Sekundärstrukturen der mRNA in der Zielregion diesen Positionseffekt der Angriffsstelle. Luo und Chang [182] zeigten, dass die Zugänglichkeit einer Zielsequenz durch einen einzelnen Parameter charakterisiert werden kann, den *hydrogen bond (H-b) index*. Die Effizienz eines *Silencings* korreliert dabei umgekehrt proportional mit dem (H-b) Index als der durchschnittlichen Anzahl an Wasserstoffbrücken (*hydrogen bond*) zwischen den Nukleotiden der Zielregion und der restlichen RNA. Auch Yoshinari et al. konnten zeigen, dass die Effektivität verschiedener, gegen das HIV-1 *transactivation response element* (TAR) gerichteter siRNAs signifikant durch die ausgeprägte Haarnadelstruktur von TAR beeinflusst wird [183]. Brown et al. bestätigten die Unzugänglichkeit des hochstrukturierten TAR Bereiches indem sie zeigten, dass die Funktionalität einer siRNA durch Zerstörung der Sekundärstruktur unter Verwendung von zu den Regionen 5' oder 3' des siRNA-Bindungsmotivs komplementären 2'-O-Methyl Oligonukleotiden wiedergewonnen werden kann [184].

Das mRNA-ähnliche Genom des Coxsackievirus B3 repräsentiert in seinem gesamten kodierenden wie nicht-kodierenden Sequenzbereich ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für eine Nukleinsäure-basierte Intervention. Dennoch determinierte auch hier die Selektion der genomischen Zielsequenz die Effektivität der anti-viralen RNA-Interferenz. Zielsequenzen im 5' nicht-kodierenden sowie dem für die viralen Strukturproteine kodierenden Bereich zeigten kaum anti-virale Effektivität, gegen die für die

Nichtstrukturproteine kodierenden Regionen gerichtete siRNA-Moleküle hingegen schon, variierten jedoch in ihrer Wirksamkeit. Die wirksamsten siRNAs wurden innerhalb der 3CD Region identifiziert. Unter Inhibition der viralen Replikation um einen Faktor von bis zu 10.000 im Vergleich zu der am wenigsten effektiven siRNA aus der Nicht- bzw. Strukturprotein-Region, vermittelte ihre Einführung mehr als 2 Tage anti-virale Immunität. Die Spezifität dieser Ergebnisse zeigte die Verwendung von Kontroll-siRNA-Molekülen mit mindestens zwei Punktmutationen in der ursprünglichen coxsackieviralen siRNA-Sequenz. Ihre Transfektion hatte keinen messbaren Effekt auf zelluläre Proliferation sowie virale Zytotoxizität und Replikation. Diese Beobachtung eines Positionseffektes des coxsackieviralen Genoms steht in Einklang mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen. So besaßen gegen die kodierende Region von CVB3 gerichtete siRNAs allgemein deutliche anti-virale Aktivität [185-189], genomische Ziele in der 5' und 3' UTR waren hingegen weniger effektiv [186, 188, 189]. Da das siRNA-Design jeweils unter strenger Berücksichtigung der allgemeinen Richtlinien erfolgte, scheint auch hier eine sterische Behinderung durch Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen der viralen Ziel-RNA oder durch an die regulatorischen genomischen Regionen bindende Proteine, die das siRNA-Bindungsmotiv für den RNAi-Angriffskomplex unzugänglich machen, für eine Variation der anti-viralen Effektivität verantwortlich zu sein. Insbesondere die stark gefaltete Struktur der 5' UTR mit ihren ausgeprägten Haarnadelmotiven könnte eine Bindung der siRNA signifikant behindern. Zwar konnten Dutkiewicz et al. funktionale, mit *Locked Nucleic Acid* (LNA) modifizierte siRNAs gegen die komplexe coxsackievirale 5' UTR identifizieren, ein extensives *Screening* eines *in vitro* 5' UTR Transkripts in einem RNase H *Assay* war jedoch zur Identifikation geeigneter Angriffsstellen, die für eine Hybridisierung mit komplementären, anhand eines kürzlich publizierten CVB3 5' UTR Strukturmodells ausgewählten Oligonukleotiden zugänglich waren, nötig [190]. Auch wenn angesichts ihres hohen Konservierungsgrades insbesondere die 5' UTR ein attraktives Ziel für eine anti-virale Strategie darstellt, zeigen diese Ergebnisse, dass die Effektivität der RNAi-Therapie durch Wahl der siRNA-Zielsequenz aus der genomischen, für Nichtstrukturproteine kodierenden Region, zumindest im Zusammenhang mit Coxsackieviren, deutlich verbessert werden kann.

#### 4.2.2 Die Entstehung einer resistenten Viruspopulation

Zur Bekämpfung viraler Erkrankungen bietet die Technik der RNAi neben einer hohen Wirksamkeit auch eine nahezu ideale Spezifität. Bereits geringe Abweichungen der

Nukleotidsequenz verhindern meist eine Erkennung und den Abbau durch RISC. Gerade diese beispiellose Spezifität kann jedoch in einem anti-enteroviralen Ansatz auch von Nachteil sein. Die hohe Mutationsrate der viralen RNA-abhängigen RNA Polymerase führt zu einer hohen genetischen Variabilität innerhalb der natürlichen Enterovirus-Population und erschwert die Identifikation einzelner, in den verschiedenen klinischen Isolaten konservierter Zielsequenzen für die therapeutische RNAi. Unter einer nicht vollständig suppressiven Therapie fördert sie zudem die Entstehung mutierter Virusvarianten, die, bei Mutation innerhalb des Erkennungsmotivs, der siRNA entkommen und die virale Replikation aufrechterhalten können. Ein derartiges Auftreten behandlungsresistenter Viren mit Punktmutationen und Deletionen in der siRNA-Zielsequenz unter therapeutischem Selektionsdruck konnte trotz der Wahl hochkonservierter genomischer Zielsequenzen bei verschiedensten Viren [122, 127, 135, 136], darunter auch Mitgliedern der Enterovirus-Familie, beobachtet werden. Auch die anti-coxsackievirale RNAi zeigte sich unter einer nicht vollständig suppressiven Therapie höchst anfällig für eine virale Flucht als vermutlich eine der Hauptdeterminanten für die nur transiente Wirksamkeit der siRNA in unseren Experimenten. Unter dem selektivem Druck einer einzelnen siRNA entstand eine behandlungsresistente Virusnachkommenschaft, die durch wiederholte Behandlung mit derselben siRNA nicht, jedoch durch Applikation einer gegen eine andere Zielsequenz gerichteten siRNA attenuiert werden konnte. Die genomische Sequenzanalyse einzelner Plaque-purifizierter Virusnachkommen zeigte bei 14 von 15 der untersuchten Viren einzelne Punktmutationen in der zentralen Region der siRNA-Erkennungssequenz. Da dieser Bereich kritisch für eine effektive Bindung der siRNA ist [135, 191], verleihen Mutationen an dieser Stelle der Zielsequenz vermutlich einen besonderen Selektionsvorteil. Um zu zeigen, dass die einzelnen Nukleotidsubstitutionen für einen vollständigen Effektivitäts-Verlust der siRNA ausreichen, wurde eine artifizielle siRNA-3D<sup>β</sup> mut mit der nach siRNA-3D<sup>β</sup>-Exposition hauptsächlich beobachteten Mutation in der ursprünglichen coxsackieviralen Sequenz generiert und ihr therapeutisches Potential in mit Wildtyp-Virus-infizierten HeLa-Zellen bestimmt. Die Einführung der einzelnen Mutation neutralisierte die therapeutische Wirksamkeit der ursprünglichen siRNA-3D<sup>β</sup> bei Wildtyp-Virus-Infektionen vollständig. Trotz eindeutiger und reproduzierbarer Ergebnisse in den hier durchgeführten Experimenten stehen diese Beobachtungen im Widerspruch zu Daten anderer Forschungsgruppen, die keinerlei Evidenz für eine coxsackievirale Flucht finden konnten [185, 189]. Die genauen Gründe hierfür sind nicht nachvollziehbar, mögliche Erklärungen wären jedoch eine fehlende Plaque-Purifikation der Virusnachkommenschaft vor der genomischen Sequenzanalyse, eine

suboptimale Effizienz bei der siRNA-Transfektion oder die Verwendung einer anderen Coxsackievirus B3-Variante.

#### 4.2.2.1 Verhinderung eines *Viral Escape* durch die Wahl hochkonservierter genomischer Bereiche

Deletionen und Nukleotidsubstitutionen in hochkonservierten Bereichen des viralen Genoms können die Viabilität und Virulenz eines Virus stark beeinträchtigt. Ein RNAi-basierter Angriff dieser Regionen sollte daher einem Entkommen der Viren infolge genomischer Instabilität sowie der natürlichen Diversität der Viruspopulation entgegenwirken. Lee et al. konnten in diesem Zusammenhang das universale und mutationsresistente anti-virale Potential einer siRNA mit Komplementarität zu einer vollständig konservierten Sequenz innerhalb des *cis-acting replication element* des viralen Proteins 2C der humanen Enterovirus B (HEB) Serotypen CVA9, CVB1–6 und Echo6–7 gegenüber den verschiedenen HEB Spezies zeigen [192]. Wie bereits beschrieben sind jedoch hochkonservierte genomische Regionen häufig aufgrund sterischer Behinderung durch Sekundär- und Tertiärstrukturen bzw. durch an regulatorische, genomische Regionen bindende Proteine für den RNAi-Angriffskomplex nicht frei zugänglich. Zudem konnten wir trotz Wahl der konservierten, für die virale RNA-abhängige RNA Polymerase 3D und die virale Protease 3C kodierenden, genomischen Regionen als Ziel für unsere Nukleinsäure-basierte Intervention die Entstehung einer punktmutierten, siRNA-resistenten Quasispezies beobachten. Stille Transversionen auf *wobble*-Positionen sowie konservative Transversionen, die die physikochemischen Eigenschaften der Viren erhalten, sicherten hier größtenteils die Propagierung lebensfähiger Nachkommen.

#### 4.2.2.2 Verhinderung eines *Viral Escape* durch die Wahl zellulärer Zielstrukturen

Eine andere Möglichkeit zur Verhinderung eines *Viral Escape* wäre daher die Wahl zellulärer, für die Virusreproduktion essentieller Zielstrukturen für die Nukleinsäure-basierte Intervention, da diese wesentlich Mutations-unanfälliger sind. Dabei stellen insbesondere virale Rezeptoren vielversprechende Angriffspunkte dar. Ihre Suppression behindert nicht nur die Replikation und Maturation sondern bereits auch den Eintritt der Viren in die Zelle. So führte eine Inhibition der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor-Expression, als zelluläres Gen



für die Anheftung und Internalisierung verschiedener Coxsackie- und Adenovirus-Subtypen in die Wirtszelle [18-20], in Zellkulturversuchen zu einer signifikanten Attenuierung der viralen Replikation [188, 193]. Da jedoch zelluläre Gene neben einer Interaktion mit dem Virus meist noch andere, physiologische Funktionen übernehmen, könnte ihr *Silencing* die Viabilität der gesamten Zelle gefährden. So wird für CAR beispielsweise, neben seiner Rezeptorfunktion, eine Beteiligung an Prozessen der Zelladhäsion sowie der Zell-Zell-Kontaktfindung vermutet [194, 195]. Als integraler Bestandteil von Verschlusskontakten (*Tight-Junctions*) polarisierter Epithelzellen [196] wird CAR zur Ausbildung der interzellulären Diffusionsbarriere dringend benötigt [195]. Eine Inhibition könnte zu einer folgenschweren Beeinträchtigung der epithelialen Barrierefunktion führen. Die klinische Anwendbarkeit zellulärer Zielstrukturen für eine RNAi-basierte anti-virale Therapie müsste daher sorgfältig im Einzelnen geprüft werden.

#### 4.2.2.3 Verhinderung eines *Viral Escape* durch eine kombinatorische Behandlungsstrategie

Der vielversprechendere Ansatz zur Vermeidung einer Resistenzbildung ist daher die Anwendung einer kombinatorischen Behandlungsstrategie. Im Vergleich zur konventionellen Monotherapie kombiniert sie verschiedene Inhibitoren viraler und/oder zellulärer Gene. Angesichts der begrenzten Mutationsrate der viralen Polymerase sollten mehrere, gegen verschiedene, idealerweise hochkonservierte Zielstrukturen innerhalb des viralen Genoms gerichtete siRNAs gleichzeitig entweder in Form eines *Silencer* Cocktails, der aus verschiedenen si/shRNAs besteht, oder eines einzelnen Vektors, der verschiedene si/shRNAs ko-exprimiert, angewandt, die hohe Wahrscheinlichkeit für die Entstehung behandlungsresistenter Viren deutlich verringern. Tatsächlich führte die Kotransfektion eines gegen verschiedene virale Regionen gerichteten siRNAs-Pools durch Inhibition der viralen Flucht zu einer signifikanten Verstärkung des anti-viralen Effekts gegen Poliovirus [135, 136, 197]. Auch im Falle des Coxsackievirus konnte die Entstehung punktmutierter Virusvarianten durch Einsatz eines gleichzeitig gegen verschiedene genomische Regionen des viralen Genoms gerichteten siRNA-Pools minimiert werden. Die genomische Sequenzanalyse Plaque-purifizierter Viren ergab eine signifikante Reduktion resistenzrelevanter Mutationen in den Bereichen der siRNA-Bindungsstellen nach Vorbehandlung mit verschiedenen siRNA-Kombinationen. Insbesondere durch simultane Behandlung mit drei verschiedenen siRNAs konnte die Entstehung punktmutierter Viren nahezu vollständig unterdrückt und die anti-

virale Aktivität gegenüber einer mit dieser Kombinationstherapie vorbehandelten Virusnachkommenschaft bei wiederholter Anwendung aufrechterhalten werden. Die therapeutische Applikation von zwei siRNAs verringerte zwar den Anteil mutierter Zielsequenzen von über 90% nach siRNA-Monotherapie um mehr als die Hälfte auf ungefähr 40 %, reichte jedoch nicht aus, um das Auftreten resistenzassoziierter Mutationen vollständig zu unterdrücken. Im anti-coxsackieviralen Therapieansatz scheint daher eine kombinierte Applikation von mindestens drei verschiedenen siRNAs angezeigt. Hierbei kann auch ein Endoribonuklease-präparierter siRNA (esiRNA) Pool zur Anwendung kommen. So führte die Transfektion eines durch enzymatischen Verdau langer *in vitro*-transkribierter dsRNA-Moleküle generierten *Silencer* Cocktails, der große Bereiche des gesamten CBV3 Genoms abdeckte, vermutlich durch Unterdrückung entstehender punktmutierter Viren, im Vergleich zur Verwendung einer einzelnen siRNA nicht nur zu verbesserter anti-viraler Immunität, sondern sogar zu einer Replikations-Inhibition verwandter Enterovirus B Spezies, wie CVB4 und CVA9 [198]. Als heterogenes Gemisch verschiedenster Sequenz-Fragmente wird der esiRNA-Pool jedoch vermutlich immer mehr Homologien zu menschlichen Genen aufweisen als eine definierte Kombination chemisch synthetisierter siRNA.

#### 4.2.3 Die siRNA intrinsische Nuklease-Stabilität

Eine Amplifikation des lokalen, siRNA-induzierten Degradationssignals führt in einigen Eukaryonten, wie Pflanzen [157, 158] und Nematoden [159], zu einer lang anhaltenden und sich systemisch ausbreitenden Inhibition der Genexpression [78, 160]. Dem Menschen fehlt jedoch für diesen als transitives *silencing* bezeichneten Vorgang die notwendige RNA-abhängige RNA Polymerase [161, 162]. Kontinuierlich durch Zellproliferation und Nuklease-bedingte Degradation abnehmende zelluläre siRNA-Level [199] werden daher die Langzeiteffektivität und damit das therapeutische Potential der anti-viralen RNAi insbesondere bei einem klinischen Einsatz gegen persistierende CVB3-Infektionen stark limitieren. Auch in den vorliegenden Experimenten führte der nur transiente Effekt der siRNA- 2A<sup>q</sup> trotz initialer signifikanter Attenuierung der viralen Replikation während der späteren Phasen der Infektion zu einem raschen Wiederanstieg der Viruslast und letztendlich dem Zelltod. Eine Fluoreszenzmarkierung von siRNA und Coxsackievirus in der Zellkultur zeigte, dass dieser Effektivitätsverlust tatsächlich mit einer Abnahme der zellulären siRNA- 2A<sup>q</sup>-Konzentration unter ein detektierbares Level einherging.

#### 4.2.3.1 Erhöhung der anti-viralen Effektivität durch chemische Modifikation der Effektor-Moleküle

Neben einer wiederholten siRNA Gabe, die den therapeutischen Ausgang der anti-coxsackieviralen RNAi *in vivo* deutlich verbesserte, sollte daher eine Optimierung der siRNA intrinsischen Nuklease-Stabilität durch chemische Modifikation das therapeutische Potential signifikant steigern. Zwar ist das doppelsträngige siRNA-Molekül wesentlich stabiler als ein RNA-Einzelstrang, es übersteht einen Nuklease-Angriff jedoch trotzdem nicht lange. Zum Schutz der instabilen siRNA gegen nukleolytischen Abbau haben sich Modifikationen des Phosphodiester-Rückgrats, wie beispielsweise der Ersatz der Phosphate des siRNA-Duplexes durch Phosphorothioate [200-202] mit einem Schwefelatom oder Boranophosphate [203] mit einem Boratom anstelle des nicht-brückenbildenden Sauerstoffatoms, aber auch Modifikationen der Basen wie eine Inkorporation von 2'-Fluoro-Pyrimidin-Ribonukleotiden in den siRNA-Duplex [204] oder der Ribose [164, 200, 202, 205] durch 2'-O-Methyl-, 2'-O-Methoxyethyl- und 2'-Desoxy-2'-Fluoro-Substitutionen als hilfreich erwiesen. Auch die Einführung von *Locked Nucleic Acid*-Nukleotiden als synthetische, bityklische RNA-Analoga mit einer 2'-O, 4'-C Methylenebrücke, die die Ribose in eine 3'-endo Konformation zwingt und so LNA-modifizierten siRNA-Molekülen (siLNAs) eine deutlich erhöhte Serumnuklease-Resistenz überträgt, ist eine gängige Methode der siRNA-Modifikation. Die anti-virale Wirksamkeit einer gegen die komplexe coxsackievirale 5' UTR gerichteten siRNA konnte durch Inkorporation von LNA-Nukleotiden verbessert werden [190]. Auf ähnliche Weise sollte die Effektivität unserer anti-coxsackieviralen Therapiemaßnahme durch Verwendung chemisch modifizierter *Stealth* RNAi™ siRNA-Moleküle (Invitrogen) gesteigert werden. Als 25 Nukleotid lange, duplex Oligonukleotide mit proprietären chemischen Modifikationen sollen *Stealth*-siRNAs im Vergleich zu Standard-siRNAs laut Hersteller eine deutlich verbesserte intrinsische Nuklease-Beständigkeit besitzen. Tatsächlich stabilisierte die chemische *Stealth*-Modifikation das siRNA-Molekül über 24h gegen Nuklease-bedingte Degradation in murinem Serum und steigerte so die Effektivität der Dreifachkombination der siRNAs 3C<sup>α</sup>, 3C<sup>β</sup> und 3D<sup>β</sup>. Die Kotransfektion der chemisch modifizierten *Stealth*-siRNA-Moleküle 3C<sup>α</sup> <sup>stealth</sup>, 3C<sup>β</sup> <sup>stealth</sup> und 3D<sup>β</sup> <sup>stealth</sup> führte zu einer Inhibition der viralen Zytogenität bis zu 152h nach Infektion im Vergleich zu 120h bei Behandlung mit der Standard-Dreifachkombination bzw. 12h bei einer unbehandelten Infektion.

Obwohl eine chemische Modifikation die anti-virale Effektivität einer siRNA durch Erhöhung der Nuklease-Resistenz deutlich verbessern kann, ist bei der Entwicklung chemisch

modifizierter Oligonukleotide für den Klinikgebrauch aufgrund möglicher toxischer Nebenwirkungen dennoch Vorsicht geboten. Auch wenn insbesondere natürlich vorkommende RNA-Modifikationen wie 2'-O-Methyl-Substitutionen sicherlich kein großes Sicherheitsrisiko darstellen [206], wurde bereits gezeigt, dass eine LNA-Modifikation von *antisense* Oligonukleotiden beispielsweise in der Maus eine ausgeprägte Hepatotoxizität auslösen kann [207]. Ebenso führte die Langzeitgabe 2'-Fluoropyrimidin-stabilisierter Aptamere in Ratte und Murmeltier zur Inkorporation modifizierter Nukleotide in die nukleäre und mitochondriale DNA, wenn vermutlich auch mit geringer toxikologischer Relevanz [208].

#### 4.2.3.2 Erhöhung der anti-viralen Effektivität durch endogene Amplifikation der Effektor-Moleküle

Eine uneingeschränkte Persistenz der inhibitorischen Aktivität kann trotz Zellteilung und Nuklease-bedingter Degradation durch eine Plasmid-basierte, endogene Amplifikation des Effektor-Moleküls erreicht werden [209, 210]. Hierfür verwendete Expressionkassetten synthetisieren, meist unter Kontrolle eines RNA Polymerase III Promoters, entweder getrennt voneinander *sense* und *antisense* Stränge, die anschließend einen aktiven siRNA-Duplex bilden, oder *short hairpin* RNA-Moleküle als Haarnadelstrukturen, die natürlich vorkommende miRNAs imitieren. Beide Arten von duplex RNAs werden nach der Synthese durch das Karyopherin Exportin-5 über die Poren der Kernmembran in das Zytoplasma exportiert, wo die shRNAs durch Dicer in funktionsfähige siRNAs prozessiert werden, hybridisierte siRNA-Duplexe hingegen RISC direkt betreten. Da die Plasmide kontinuierlich große Menge an siRNA/shRNA exprimieren, führt ihre Transfektion im Gegensatz zu chemisch synthetisierter siRNA zu einer starken und lang anhaltenden Gen-Inhibition [141]. So konnten Kim et al. die anti-coxsackievirale Wirksamkeit Plasmid-exprimierter shRNAs in Cos-7-Zellen und Mäusen zeigen [186]. Niedrige Transfektionseffizienzen limitieren jedoch häufig den Plasmid-Einsatz in Säugetier- und insbesondere Primärzellen [86]. Angesichts höherer Transduktionseffizienzen bietet hier ein viraler Gentransfer eine valide Alternative. Die Verwendung retro- [101], lenti- [211] oder adenoviraler [212] Expressionssysteme ermöglicht einen effizienten Nukleinsäure-Transfer in ein breites Spektrum an proliferierenden bzw. nicht-proliferierenden Säugetier- und Stammzellen sowie in transgene Mäuse. Die Lentivirus-basierte intrazelluläre Expression von gegen das *cis-acting replication element* des Proteins 2C gerichteter *short hairpin* RNA erwies sich *in vitro* höchst effektiv zur

Inhibition der coxsackieviralen Replikation und Proteinexpression [213]. Zudem schützte das lentivirale Transfersystem infizierte Mäuse vor einer viralen Myokarditis und verbesserte die Überlebensrate von 20% auf bis zu 50%. Ebenso führte die intravenöse Gabe eines kardiotropen adeno-assoziierten Virus (AAV), das aktive shRNAs gegen die coxsackievirale RNA-abhängige RNA Polymerase exprimiert, in Myokarditis empfänglichen Mäuse zu einer signifikanten Attenuierung der virus-induzierten kardialen Dysfunktion [214]. Wenngleich in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte zur Erhöhung der Sicherheit viraler Vektoren erzielt wurden, birgt ihre Anwendung im Patienten jedoch immer noch wichtige Sicherheitsrisiken [215]. Neben einer ungewollten immunogenen oder inflammatorischen Wirtsantwort oder der Entstehung replikationskompetenter Viren stellen auch die Insertionsmutagenese als Folge der sequenz-unspezifischen, retroviralen Integration in das Wirtsgenom und die hieraus resultierende Gefahr einer onkogenen Transformation mögliche Komplikationen einer viralen Gentherapie dar. Auch die lang-anhaltende shRNA/siRNA-Überexpression beinhaltet ein ernstzunehmendes Gesundheitsrisiko, da sie zu einer Interferenz mit der endogenen miRNA-Prozessierung führen könnte, falls beispielsweise das Karyopherin Exportin-5, ein Protein das sowohl für den nukleären Export und die Stabilisierung der shRNA/siRNA als auch der miRNA äußerst wichtig ist, übersättigt wird. So zeigten Grimm et al., dass eine AAV-basierte, konstitutive shRNA-Überexpression in der Maus signifikante hepatozelluläre Toxizität erzeugen und so letztlich zum Tod des Tieres führen kann [216]. Synthetische siRNAs, die RISC nach ihrer Transfektion ins Zytoplasma direkt betreten, beteiligen sich hingegen nicht am fatalen Exportin-5-Konkurrenzkampf. Obwohl gerade bei der Behandlung chronischer Infektionen eine kontinuierliche siRNA/shRNA-Bereitstellung höchst sinnvoll erscheint und das Risiko für eine Übersättigung des endogenen RNAi-Signaltransduktionsweges sicherlich durch Modulation der shRNA/siRNA-Expression durch induzierbare Expressionssysteme, bei denen spezifische Induktoren oder Repressoren aber auch moderate Promotersysteme die Transkription kontrollieren, minimiert werden kann, sollten angesichts des hohen immunogenen und toxischen Potentials Vektor-basierter Expressionssysteme dennoch chemisch stabilisierte, synthetische siRNA-Moleküle, die zwar zeitlich begrenzt, dafür aber größtenteils nicht toxisch wirken, in der Klinik bevorzugt Anwendung finden.

## 5. Zusammenfassung

Die Entdeckung der durch siRNA übertragenen genomischen Immunität eröffnete in den letzten Jahren völlig neue Möglichkeiten für den gezielten Einsatz des ubiquitären RNAi-Signaltransduktionsweges nicht nur als experimentelles Werkzeug sondern auch als innovative therapeutische Option für eine Vielzahl bislang nicht oder nur unzureichend behandelbare Erkrankungen. Als natürlicher Verteidigungsmechanismus der Zelle gegen Virusinfektionen stellt die RNA-Interferenz auch einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt zur Bekämpfung viraler Infektionskrankheiten dar. Bereits zahlreiche Studien konnten das erhebliche anti-virale Potential der RNAi zeigen. Das Coxsackievirus B3 gehört als Enterovirus zu einer der größten und wichtigsten Familien von humanen, infektiösen Pathogenen mit besonderer medizinischer aber auch ökonomischer Signifikanz. Obwohl seine Infektionen meist vollständig asymptomatisch verlaufen, kann es auch lebensbedrohliche Krankheitsbilder mit meist kardialer aber auch extrakardialer Manifestation hervorrufen, die oftmals in chronisch-progrediente Verlaufsformen übergehen. Aufgrund hoher Morbidität und Mortalität insbesondere bei immunsupprimierten Patienten und Kindern ist die Entwicklung einer spezifischen Therapiemaßnahme zur Behandlung CVB3-assoziiierter Erkrankungen in jedem Krankheitsstadium (akuten wie auch chronischen) von höchstem Interesse. Auch in einem sehr fortgeschrittenen Stadium erscheint eine RNAi-basierte Viruselimination äußerst wichtig, da eine Persistenz des coxsackieviralen Genoms mit der Pathogenese chronischer Erkrankungen in Zusammenhang steht. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte das anti-coxsackievirale Potential der RNAi sowie deren Probleme systematisch *in vitro* und *in vivo* evaluiert und für die klinische Anwendung optimiert werden.

Spezifische, gegen das coxsackievirale Genom gerichtete siRNAs zeigten sich hochwirksam zur Attenuierung der viralen Replikation und virusbedingten Zellschädigung. In für eine CVB3-Infektion höchst vulnerablen Typ I IFNR defizienten Mäusen führte die hydrodynamische Gabe protektiver siRNA durch Inhibition der viralen Replikation konsekutiv zu signifikant reduzierten Virustitern, einer attenuierten Gewebeschädigung und einer signifikant verlängerten Überlebensdauer. Durch eine wiederholte siRNA-Transfektion konnte die Lebensspanne infizierter Mäuse im Vergleich zur einfachen Applikation nochmals signifikant verlängert werden. Verschiedene Kontroll-siRNAs zeigten hingegen weder *in vitro* noch *in vivo* Wirksamkeit.

Trotz der vielversprechenden initialen Ergebnisse, die das therapeutische Potential der RNAi zur Behandlung Coxsackievirus-assoziiierter Erkrankungen unterstreichen, stellt die Translation des experimentellen Konzepts in eine klinische Anwendung eine echte Herausforderung dar. Die klinische Applikation dieser Therapieoption erfordert eine Kombination aus höchster Effektivität, ausreichender Stabilität und einem erfolgreichen Resistenzmanagement zur Vermeidung behandlungsresistenter Virusvarianten. Ein systematisches *Screening* des gesamten CVB3-Genoms auf funktionale siRNA-Sequenzen zeigte den Einfluss der genomischen Regionen auf die Effektivität der RNAi-Therapie. Genomische Zielsequenzen im 5' nicht-kodierenden sowie dem für die viralen Strukturproteine kodierenden Bereich besaßen eine signifikant schlechtere anti-virale Effektivität als Ziele in der für die Nichtstrukturproteine kodierenden Region. Die wirksamsten siRNAs wurden innerhalb der 3CD Region identifiziert und führten zu einem ungefähr vierfach verlängerten Überleben der Zellen und einer maximalen Inhibition der frühen viralen Replikation um über das Tausendfache im Vergleich zu der am wenigsten effektiven siRNA aus der Nicht- bzw. Strukturprotein-Region. Eine weitere Hauptdeterminante für eine Limitation der therapeutischen Wirksamkeit stellt die Entstehung behandlungsresistenter *Escape*-Varianten mit Punktmutationen im siRNA-Bindungsmotiv dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung einer kombinatorischen Behandlungsstrategie in Form eines *Silencer* Cocktails, der gleichzeitig gegen verschiedene Regionen des coxsackieviralen Genoms gerichtet ist, dem Fluchtmechanismus jedoch entgegenwirkt. Durch simultane Behandlung mit mindestens drei verschiedenen siRNAs konnte die Entstehung punktmutierter Viren nahezu vollständig unterdrückt und die anti-virale Aktivität aufrechterhalten werden. Angesichts derzeit verfügbarer molekularer Techniken wie der RT-PCR, die eine Identifikation der coxsackieviralen RNA binnen Stunden erlauben, ermöglicht die kombinierte siRNA Behandlung zudem einen raschen Behandlungsbeginn auch bei limitierter Sequenzinformation über das vorliegende klinische Isolat. Eine durch Introdution chemischer Modifikationen verbesserte Biostabilität des siRNA-Duplexes kann die therapeutische Wirksamkeit der anti-coxsackieviralen RNAi schließlich noch zusätzlich verbessern. So führte die Applikation eines chemisch modifizierten *Silencer* Cocktails, der aus drei verschiedenen, gegen distinkte Zielsequenzen innerhalb der genomischen 3CD Region gerichteten siRNAs bestand, bis zu 152h nach Infektion zu einer attenuierten coxsackieviralen Zytopathogenität im Vergleich zu 12h bei einer unbehandelten Infektion.

Sicherlich müssen noch einige Hürden insbesondere hinsichtlich der Sicherheit und eines gewebespezifischen *in vivo* Transfers überwunden werden, bevor erste klinische Studien begonnen werden können. Angesichts der enormen Anstrengungen und des rasanten Fortschritts auf dem Gebiet der RNAi besteht jedoch begründete Hoffnung auf eine RNAi-basierte Therapie coxsackieviraler Herzerkrankungen in nicht allzu ferner Zukunft.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften publiziert:

1. Merl S, Michaelis C, Jaschke B, Vorpahl M, Seidl S, Wessely R. Targeting 2A protease by RNA interference attenuates coxsackieviral cytopathogenicity and promotes survival in highly susceptible mice. *Circulation*. 2005;111(13):1583-92.
2. Merl S, Wessely R. Anti-coxsackieviral efficacy of RNA interference is highly dependent on genomic target selection and emergence of escape mutants. *Oligonucleotides*. 2007;17(1):44-53.

Allgemeine Aspekte für eine RNAi-basierte anti-virale Therapie wurden, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, in folgenden Fachzeitschriften publiziert:

1. Merl S, Wessely R. Targeting Viral Heart Disease by RNA Interference. *RNA Technologies in Cardiovascular Medicine and Research*. Springer Berlin Heidelberg. 2008:89-107
2. Schönhofer-Merl S, Wessely R. RNA interference to treat enteroviral disease: current status and clinical perspectives. *Curr Mol Med*. 2010 Aug 1;10(6):550-64.



## 6. Summary

The evidence of siRNA conferring genomic immunity has opened novel possibilities to exploit the endogenous RNA interference pathway not only as an experimental tool but also as a therapeutic strategy in the fight against a broad range of yet intractable diseases. In this context, the RNAi technology shows great promise for future treatment of in particular virus-mediated diseases, reflected by numerous studies that underscore the potential of RNAi against viral infections. Coxsackieviral diseases are widespread and impose considerable medical and economical importance. Though most patients with coxsackieviral infections remain completely asymptomatic, as most sequelae are subclinical and self-limiting, coxsackieviruses have also been implicated in a wide spectrum of devastating diseases with in particular cardiac but also extracardiac manifestation, often evolving into chronic progressive diseases. With Coxsackievirus B3 being responsible for significant morbidity and mortality, the development of specific treatment modalities for coxsackieviral infections at all stages of the disease process (acute as well as chronic) is definitely of particular interest. On the basis of persistent coxsackieviral genome being associated with the pathogenesis of chronic diseases, RNAi-based virus elimination seems to be important irrespective of a progressive stage of infection. The aim of the present thesis was to evaluate the impact of an RNAi-based therapeutic strategy on coxsackieviral replication and cytopathogenicity *in vitro* and *in vivo* and to optimize it for clinical translation.

RNA interference directed against the coxsackieviral genome proved highly effective for inhibition of viral replication and virus-mediated cell injury. In highly susceptible type I IFNR knockout mice, hydrodynamic tail vein injection of anti-coxsackieviral siRNA effectively conferred intracellular immunity leading to significant reduced viral titers, attenuated tissue damage, and even prolonged survival. Repeated siRNA administration further improved survival in this animal model compared to single application. Various control siRNA molecules had no protective effect *in vitro* or *in vivo*.

Despite these encouraging findings, suggesting a potential therapeutic role for RNAi against CVB3-related diseases, the translation of the experimental concept to human application faces serious challenges. To pave its way from bench to bedside, it is of key importance to combine maximal efficacy with superior stability and enduring resistance to viral escape. A systematic screen of the entire CVB3 genome for single siRNA efficacies revealed genomic target selection to have major impact on the therapeutic outcome. Genomic

targets located in the 5' untranslated, non-coding region as well as in the regions coding for structural proteins were less effective compared to targets selected in the nonstructural protein coding region. The most effective single siRNAs were identified within the 3CD region and resulted in an approximately four fold prolongation of cell survival and maximal inhibition of early viral replication by 10.000 fold compared to the least effective siRNAs in the nonstructural or structural protein coding region, respectively. The major obstacle limiting the therapeutic effectiveness of RNAi is the emergence of viral escape mutants harboring single point mutations in the siRNA binding motif. Yet, a combinatorial RNAi approach with the delivery of siRNA silencer cocktails co-targeting simultaneously multiple regions of the coxsackieviral genome could be identified as suitable strategy to counter viral RNAi escape mechanisms. The appearance of escape mutants was sufficiently suppressed by combined administration of at least three distinct siRNA molecules. With currently available molecular techniques like RT-PCR allowing the identification of coxsackieviral RNA within hours, the application of a combinatorial RNAi approach will in addition facilitate a rapid treatment initiation targeting clinical isolates, even when sequence information is limited. Finally, the introduction of chemical modifications also helps to improve siRNA biostability and with it therapeutic long-term outcome of the anti-coxsackieviral RNAi. An application of a chemically modified silencer cocktail consisting of three different siRNAs directed against distinct targets within the genomic 3CD region led up to 152h after infection to attenuated coxsackieviral cytopathogenicity compared to 12h for an untreated infection.

Though these findings are promising steps towards clinical applicability, several critical issues including security aspects and in particular tissue-specific *in vivo* delivery still need to be solved before this novel therapeutic approach may enter the clinical trials arena. Yet, tremendous efforts and the rapid progress in the field of RNAi raises hope, that RNAi may evolve as a treatment option against coxsackieviral heart diseases in the not too distant future.

## A Literaturverzeichnis

- [1] J. F. Woodruff, "Viral myocarditis. A review," *Am J Pathol*, vol. 101, pp. 425-84, 1980.
- [2] R. E. F. Matthews, "Classification and nomenclature of viruses.," *Intervirology*, vol. 17, pp. 1-199, 1982.
- [3] M. G. Rossmann and J. E. Johnson, "Icosahedral RNA virus structure," *Annu Rev Biochem*, vol. 58, pp. 533-73, 1989.
- [4] R. Kandolf, "Myokarditis und Kardiomyopathie.," *Verh Dtsch Ges Pathol*, vol. 80, pp. 127-38, 1996.
- [5] R. R. Rueckert, "Picornaviridae: The Viruses and Their Replication.," in *Fundamental Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds., ed New York: Raven, pp. 477-522, 1996.
- [6] S. Modrow and D. Falke, "Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in Plusstrangorientierung.," in *Molekulare Virologie*, ed Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 113-42, 1998.
- [7] J. K. Muckelbauer and M. G. Rossmann, "The structure of coxsackievirus B3," *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 223, pp. 191-208, 1997.
- [8] J. M. Hogle, M. Chow, and D. J. Filman, "Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution," *Science*, vol. 229, pp. 1358-65, 1985.
- [9] M. G. Rossmann, E. Arnold, J. W. Erickson, E. A. Frankengerger, J. P. Griffith, H. J. Hecht, J. E. Johnson, G. Kamer, M. Luo, A. G. Mosser, and et al., "Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses," *Nature*, vol. 317, pp. 145-53, 1985.
- [10] E. Wimmer, "Genome-linked proteins of viruses," *Cell*, vol. 28, pp. 199-201, 1982.
- [11] S. K. Jang, M. V. Davies, R. J. Kaufman, and E. Wimmer, "Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo," *J Virol*, vol. 63, pp. 1651-60, 1989.
- [12] S. K. Jang, T. V. Pestova, C. U. Hellen, G. W. Witherell, and E. Wimmer, "Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site," *Enzyme*, vol. 44, pp. 292-309, 1990.
- [13] J. Pelletier and N. Sonenberg, "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA," *Nature*, vol. 334, pp. 320-5, 1988.
- [14] R. J. Jackson, M. T. Howell, and A. Kaminski, "The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation," *Trends Biochem Sci*, vol. 15, pp. 477-83, 1990.
- [15] G. J. Belsham and N. Sonenberg, "RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation," *Microbiol Rev*, vol. 60, pp. 499-511, 1996.
- [16] J. Seipelt, A. Guarne, E. Bergmann, M. James, W. Sommergruber, I. Fita, and T. Skern, "The structures of picornaviral proteinases," *Virus Res*, vol. 62, pp. 159-68, 1999.
- [17] K. Miyashita, J. Okunishi, R. Utsumi, S. Tagiri, K. Hotta, T. Komano, T. Tamura, and N. Satoh, "Cleavage specificity of coxsackievirus 3C proteinase for peptide substrate (2): Importance of the P2 and P4 residues," *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 60, pp. 1528-9, 1996.
- [18] J. M. Bergelson, J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg, "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5," *Science*, vol. 275, pp. 1320-3, 1997.

- [19] R. P. Tomko, R. Xu, and L. Philipson, "HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, pp. 3352-6, 1997.
- [20] S. D. Carson, N. N. Chapman, and S. M. Tracy, "Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 233, pp. 325-8, 1997.
- [21] V. R. Wells, S. J. Plotch, and J. J. DeStefano, "Determination of the mutation rate of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase," *Virus Res*, vol. 74, pp. 119-32, 2001.
- [22] J. L. Whitton, "Immunopathology during coxsackievirus infection," *Springer Semin Immunopathol*, vol. 24, pp. 201-13, 2002.
- [23] K. S. Kim, G. Hufnagel, N. M. Chapman, and S. Tracy, "The group B coxsackieviruses and myocarditis," *Rev Med Virol*, vol. 11, pp. 355-68, 2001.
- [24] J. L. Melnick, "Current status of poliovirus infections," *Clin Microbiol Rev*, vol. 9, pp. 293-300, 1996.
- [25] R. Kandolf, M. Sauter, C. Aepinus, J. J. Schnorr, H. C. Selinka, and K. Klingel, "Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system," *Virus Res*, vol. 62, pp. 149-58, 1999.
- [26] A. M. Feldman and D. McNamara, "Myocarditis," *N Engl J Med*, vol. 343, pp. 1388-98, 2000.
- [27] R. Wessely, K. Klingel, L. F. Santana, N. Dalton, M. Hongo, W. Jonathan Lederer, R. Kandolf, and K. U. Knowlton, "Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy," *J Clin Invest*, vol. 102, pp. 1444-53, 1998.
- [28] T. Hyypia, T. Hovi, N. J. Knowles, and G. Stanway, "Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties," *J Gen Virol*, vol. 78 ( Pt 1), pp. 1-11, 1997.
- [29] H. Harvala, H. Kalimo, J. Bergelson, G. Stanway, and T. Hyypia, "Tissue tropism of recombinant coxsackieviruses in an adult mouse model," *J Gen Virol*, vol. 86, pp. 1897-907, 2005.
- [30] I. P. Hunziker, S. Harkins, R. Feuer, C. T. Cornell, and J. L. Whitton, "Generation and analysis of an RNA vaccine that protects against coxsackievirus B3 challenge," *Virology*, vol. 330, pp. 196-208, 2004.
- [31] H. H. Sigusch, D. Reinhardt, and H. R. Figulla, "Klinisches Bild und Differentialdiagnose von Kardiomyopathie und Myokarditis.," *Med Klinik*, vol. 93, pp. 236-9, 1998.
- [32] G. Mall, "Morphologie der Myokarditis.," *Internist*, vol. 36, pp. 425-9, 1995.
- [33] G. Hufnagel, S. Pankuweit, and B. Maisch, "Therapy of dilated cardiomyopathies with and without inflammation.," *Med Klin (Munich)*, vol. 93, pp. 240-51, 1998.
- [34] R. Wessely, K. Klingel, K. U. Knowlton, and R. Kandolf, "Cardioselective infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication," *Circulation*, vol. 103, pp. 756-61, 2001.
- [35] C. Zaragoza, C. J. Ocampo, M. Saura, C. Bao, M. Leppo, A. Lafond-Walker, D. R. Thiemann, R. Hruban, and C. J. Lowenstein, "Inducible nitric oxide synthase protection against coxsackievirus pancreatitis," *J Immunol*, vol. 163, pp. 5497-504, 1999.
- [36] R. Feuer, I. Mena, R. R. Pagarigan, S. Harkins, D. E. Hassett, and J. L. Whitton, "Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease," *Am J Pathol*, vol. 163, pp. 1379-93, 2003.

- [37] S. Bauer, G. Gottesman, L. Sirota, I. Litmanovitz, S. Ashkenazi, and I. Levi, "Severe Coxsackie virus B infection in preterm newborns treated with pleconaril," *Eur J Pediatr*, vol. 161, pp. 491-3, 2002.
- [38] P. P. Liu and J. W. Mason, "Advances in the understanding of myocarditis," *Circulation*, vol. 104, pp. 1076-82, 2001.
- [39] C. Kawai, "From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future," *Circulation*, vol. 99, pp. 1091-100, 1999.
- [40] B. M. McManus, L. H. Chow, J. E. Wilson, D. R. Anderson, J. M. Gulizia, C. J. Gauntt, K. E. Klingel, K. W. Beisel, and R. Kandolf, "Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis," *Clin Immunol Immunopathol*, vol. 68, pp. 159-69, 1993.
- [41] M. Campanella, A. S. de Jong, K. W. Lanke, W. J. Melchers, P. H. Willems, P. Pinton, R. Rizzuto, and F. J. van Kuppeveld, "The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 18440-50, 2004.
- [42] L. Carrasco, "Modification of membrane permeability by animal viruses," *Adv Virus Res*, vol. 45, pp. 61-112, 1995.
- [43] C. M. Carthy, D. J. Granville, K. A. Watson, D. R. Anderson, J. E. Wilson, D. Yang, D. W. Hunt, and B. M. McManus, "Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells," *J Virol*, vol. 72, pp. 7669-75, 1998.
- [44] A. Henke, M. Nestler, S. Strunze, H. P. Saluz, P. Hortschansky, B. Menzel, U. Martin, R. Zell, A. Stelzner, and T. Munder, "The apoptotic capability of coxsackievirus B3 is influenced by the efficient interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic host protein Siva," *Virology*, vol. 289, pp. 15-22, 2001.
- [45] D. Etchison, S. C. Milburn, I. Edery, N. Sonenberg, and J. W. Hershey, "Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex," *J Biol Chem*, vol. 257, pp. 14806-10, 1982.
- [46] B. J. Lamphear, R. Yan, F. Yang, D. Waters, H. D. Liebig, H. Klump, E. Kuechler, T. Skern, and R. E. Rhoads, "Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus," *J Biol Chem*, vol. 268, pp. 19200-3, Sep 1993.
- [47] B. J. Lamphear, R. Kirchweger, T. Skern, and R. E. Rhoads, "Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation," *J Biol Chem*, vol. 270, pp. 21975-83, 1995.
- [48] M. Joachims, P. C. Van Breugel, and R. E. Lloyd, "Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro," *J Virol*, vol. 73, pp. 718-27, 1999.
- [49] V. Kerekatte, B. D. Keiper, C. Badorff, A. Cai, K. U. Knowlton, and R. E. Rhoads, "Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff?," *J Virol*, vol. 73, pp. 709-17, 1999.
- [50] N. M. Kuyumku-Martinez, M. Joachims, and R. E. Lloyd, "Efficient cleavage of Ribosome-Associated Poy(A)-Binding Protein by Enterovirus 3C Protease.," *J Virol*, vol. 76, pp. 2062-2074, 2002.
- [51] C. Badorff, G. H. Lee, and K. U. Knowlton, "Enteroviral cardiomyopathy: bad news for the dystrophin-glycoprotein complex," *Herz*, vol. 25, pp. 227-32, 2000.

- [52] C. Badorff, G. H. Lee, B. J. Lamphear, M. E. Martone, K. P. Campbell, R. E. Rhoads, and K. U. Knowlton, "Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy," *Nat Med*, vol. 5, pp. 320-6, 1999.
- [53] A. Gradi, H. Imataka, Y. V. Svitkin, E. Rom, B. Raught, S. Morino, and N. Sonenberg, "A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G," *Mol Cell Biol*, vol. 18, pp. 334-42, 1998.
- [54] S. A. Huber, L. P. Job, and J. F. Woodruff, "Lysis of infected myofibers by coxsackievirus B-3-immune T lymphocytes," *Am J Pathol*, vol. 98, pp. 681-94, 1980.
- [55] A. Henke, S. Huber, A. Stelzner, and J. L. Whitton, "The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis," *J Virol*, vol. 69, pp. 6720-8, 1995.
- [56] J. R. Gebhard, C. M. Perry, S. Harkins, T. Lane, I. Mena, V. C. Asensio, I. L. Campbell, and J. L. Whitton, "Coxsackievirus B3-induced myocarditis: perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance," *Am J Pathol*, vol. 153, pp. 417-28, 1998.
- [57] J. Li, P. L. Schwimmbeck, C. Tschöpe, S. Leschka, L. Husmann, S. Rutschow, F. Reichenbach, M. Noutsias, U. Kobalz, W. Poller, F. Spillmann, H. Zeichhardt, H. P. Schultheiss, and M. Pauschinger, "Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction," *Cardiovasc Res*, vol. 56, pp. 235-47, 2002.
- [58] B. Maisch, I. Portig, A. Ristic, G. Hufnagel, and S. Pankuweit, "Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report," *Herz*, vol. 25, pp. 200-9, 2000.
- [59] D. R. Meldrum, "Tumor necrosis factor in the heart," *Am J Physiol*, vol. 274, pp. R577-95, 1998.
- [60] T. Gulick, M. K. Chung, S. J. Pieper, L. G. Lange, and G. F. Schreiner, "Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 86, pp. 6753-7, 1989.
- [61] A. M. Deschamps and F. G. Spinale, "Matrix modulation and heart failure: new concepts question old beliefs," *Curr Opin Cardiol*, vol. 20, pp. 211-6, 2005.
- [62] S. J. Crocker, R. F. Frausto, J. K. Whitmire, N. Benning, R. Milner, and J. L. Whitton, "Amelioration of coxsackievirus B3-mediated myocarditis by inhibition of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1," *Am J Pathol*, vol. 171, pp. 1762-73, 2007.
- [63] M. Guthrie, P. A. Lodge, and S. A. Huber, "Cardiac injury in myocarditis induced by Coxsackievirus group B, type 3 in Balb/c mice is mediated by Lyt 2 + cytolytic lymphocytes," *Cell Immunol*, vol. 88, pp. 558-67, 1984.
- [64] R. Kandolf, "Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy.," *Med Klin (Munich)*, vol. 93, pp. 215-22, 1998.
- [65] K. U. Knowlton and C. Badorff, "The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance," *Circ Res*, vol. 85, pp. 559-61, 1999.
- [66] W. Böcker, H. Denk, and P. U. Heitz, *Pathologie*, 2 ed. Jena: Urban&Fischer München, 2000.
- [67] H. P. Schultheiß, M. Pauschinger, and U. Köhl, "Pathogenese der entzündlichen Kardiomyopathie.," *Med Klinik*, vol. 93, pp. 229-35, 1998.
- [68] K. U. Knowlton, E. S. Jeon, N. Berkley, R. Wessely, and S. Huber, "A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3," *J Virol*, vol. 70, pp. 7811-8, 1996.
- [69] E. K. Godeny and C. J. Gauntt, "Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication," *J Immunol*, vol. 139, pp. 913-8, 1987.

- [70] C. Leipner, K. Grun, M. Borchers, and A. Stelzner, "The outcome of coxsackievirus B3-(CVB3-) induced myocarditis is influenced by the cellular immune status," *Herz*, vol. 25, pp. 245-8, 2000.
- [71] C. M. Carthy, D. Yang, D. R. Anderson, J. E. Wilson, and B. M. McManus, "Myocarditis as systemic disease: new perspectives on pathogenesis," *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 24, pp. 997-1003, 1997.
- [72] P. A. Lodge, M. Herzum, J. Olszewski, and S. A. Huber, "Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms," *Am J Pathol*, vol. 128, pp. 455-63, 1987.
- [73] R. Kandolf, K. Klingel, R. Zell, H. C. Selinka, U. Raab, W. Schneider-Brachert, and B. Bultmann, "Molecular pathogenesis of enterovirus-induced myocarditis: virus persistence and chronic inflammation," *Intervirology*, vol. 35, pp. 140-51, 1993.
- [74] Y. Juilliere, N. Danchin, S. Briancon, K. Khalife, G. Ethevenot, A. Balaud, J. M. Gilgenkrantz, C. Pernot, and F. Cherrier, "Dilated cardiomyopathy: long-term follow-up and predictors of survival," *Int J Cardiol*, vol. 21, pp. 269-77, 1988.
- [75] R. Wessely, A. Henke, R. Zell, R. Kandolf, and K. U. Knowlton, "Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes," *Circulation*, vol. 98, pp. 450-7, 1998.
- [76] B. Maisch, "Prognostische Determinanten bei Myokarditis und Perimyokarditis.," *Dtsch Arzteblatt*, vol. 87, pp. 251-6, 1990.
- [77] R. H. Schwinger, "Chronic heart failure. Diagnosis and therapy.," *Med Monatsschr Pharm*, vol. 23, pp. 142-8, 2000.
- [78] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello, "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," *Nature*, vol. 391, pp. 806-11, 1998.
- [79] S. M. Elbashir, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs," *Genes Dev*, vol. 15, pp. 188-200, 2001.
- [80] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl, "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells," *Nature*, vol. 411, pp. 494-8, 2001.
- [81] E. Billy, V. Brondani, H. Zhang, U. Muller, and W. Filipowicz, "Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, pp. 14428-33, 2001.
- [82] S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, and G. J. Hannon, "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells," *Nature*, vol. 404, pp. 293-6, 2000.
- [83] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon, "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference," *Nature*, vol. 409, pp. 363-6, 2001.
- [84] S. M. Hammond, A. A. Caudy, and G. J. Hannon, "Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA," *Nat Rev Genet*, vol. 2, pp. 110-9, 2001.
- [85] H. H. Park and H. Wu, "Gauging length: recognition of small interfering RNAs," *Structure*, vol. 12, pp. 172-3, 2004.
- [86] D. M. Dykxhoorn, C. D. Novina, and P. A. Sharp, "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 4, pp. 457-67, 2003.
- [87] L. Joshua-Tor, "siRNAs at RISC," *Structure*, vol. 12, pp. 1120-2, Jul 2004.
- [88] J. Liu, M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, and G. J. Hannon, "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi," *Science*, vol. 305, pp. 1437-41, 2004.

- [89] S. M. Hammond, S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi, and G. J. Hannon, "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi," *Science*, vol. 293, pp. 1146-50, 2001.
- [90] K. Okamura, A. Ishizuka, H. Siomi, and M. C. Siomi, "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways," *Genes Dev*, vol. 18, pp. 1655-66, 2004.
- [91] T. A. Rand, K. Ginalski, N. V. Grishin, and X. Wang, "Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 14385-9, 2004.
- [92] L. He and G. J. Hannon, "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation," *Nat Rev Genet*, vol. 5, pp. 522-31, 2004.
- [93] Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, and V. N. Kim, "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing," *Nature*, vol. 425, pp. 415-9, 2003.
- [94] J. E. Abrahamte, A. L. Daul, M. Li, M. L. Volk, J. M. Tennessen, E. A. Miller, and A. E. Rougvie, "The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs," *Dev Cell*, vol. 4, pp. 625-37, 2003.
- [95] J. Brennecke, D. R. Hipfner, A. Stark, R. B. Russell, and S. M. Cohen, "bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*," *Cell*, vol. 113, pp. 25-36, 2003.
- [96] J. Downward, "RNA interference," *BMJ*, vol. 328, pp. 1245-8, 2004.
- [97] C. A. Sledz, M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, and B. R. Williams, "Activation of the interferon system by short-interfering RNAs," *Nat Cell Biol*, vol. 5, pp. 834-9, 2003.
- [98] B. R. Williams, "Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation," *Biochem Soc Trans*, vol. 25, pp. 509-13, 1997.
- [99] M. J. Clemens and A. Elia, "The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function," *J Interferon Cytokine Res*, vol. 17, pp. 503-24, 1997.
- [100] G. R. Stark, I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber, "How cells respond to interferons," *Annu Rev Biochem*, vol. 67, pp. 227-64, 1998.
- [101] T. R. Brummelkamp, R. Bernards, and R. Agami, "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells," *Science*, vol. 296, pp. 550-3, 2002.
- [102] M. Miyagishi and K. Taira, "U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells," *Nat Biotechnol*, vol. 20, pp. 497-500, 2002.
- [103] C. P. Paul, P. D. Good, I. Winer, and D. R. Engelke, "Effective expression of small interfering RNA in human cells," *Nat Biotechnol*, vol. 20, pp. 505-8, 2002.
- [104] L. Zheng, J. Liu, S. Batalov, D. Zhou, A. Orth, S. Ding, and P. G. Schultz, "An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 135-40, 2004.
- [105] F. S. Collins, A. Patrinos, E. Jordan, A. Chakravarti, R. Gesteland, and L. Walters, "New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003," *Science*, vol. 282, pp. 682-9, 1998.
- [106] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver, "Life with 6000 genes," *Science*, vol. 274, pp. 546-567, 1996.
- [107] R. D. Fleischmann, M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, and et al., "Whole-



- genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd," *Science*, vol. 269, pp. 496-512, 1995.
- [108] N. N. Kartasheva, A. Contente, C. Lenz-Stoppler, J. Roth, and M. Dobbelstein, "p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop," *Oncogene*, vol. 21, pp. 4715-27, 2002.
- [109] P. Lassus, X. Opitz-Araya, and Y. Lazebnik, "Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization," *Science*, vol. 297, pp. 1352-4, 2002.
- [110] Z. Chen, V. B. Indjeian, M. McManus, L. Wang, and B. D. Dynlacht, "CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells," *Dev Cell*, vol. 3, pp. 339-50, 2002.
- [111] E. Rodriguez-Lebron and P. Gonzalez-Alegre, "Silencing neurodegenerative disease: bringing RNA interference to the clinic," *Expert Rev Neurother*, vol. 6, pp. 223-33, 2006.
- [112] Y. Dorsett and T. Tuschl, "siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 3, pp. 318-29, 2004.
- [113] P. Shankar, N. Manjunath, and J. Lieberman, "The prospect of silencing disease using RNA interference," *JAMA*, vol. 293, pp. 1367-73, 2005.
- [114] S. Barik, "Silence of the transcripts: RNA interference in medicine," *J Mol Med*, vol. 83, pp. 764-73, 2005.
- [115] J. M. Alisky and B. L. Davidson, "Towards therapy using RNA interference," *Am J Pharmacogenomics*, vol. 4, pp. 45-51, 2004.
- [116] I. Friedrich, A. Shir, S. Klein, and A. Levitzki, "RNA molecules as anti-cancer agents," *Semin Cancer Biol*, vol. 14, pp. 223-30, 2004.
- [117] A. L. Gartel and E. S. Kandel, "RNA interference in cancer," *Biomol Eng*, vol. 23, pp. 17-34, 2006.
- [118] J. M. Jacque, K. Triques, and M. Stevenson, "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference," *Nature*, vol. 418, pp. 435-8, 2002.
- [119] C. D. Novina, M. F. Murray, D. M. Dykxhoorn, P. J. Beresford, J. Riess, S. K. Lee, R. G. Collman, J. Lieberman, P. Shankar, and P. A. Sharp, "siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection," *Nat Med*, vol. 8, pp. 681-6, 2002.
- [120] W. Y. Hu, C. P. Myers, J. M. Kilzer, S. L. Pfaff, and F. D. Bushman, "Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference," *Curr Biol*, vol. 12, pp. 1301-11, 2002.
- [121] G. A. Coburn and B. R. Cullen, "Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference," *J Virol*, vol. 76, pp. 9225-31, 2002.
- [122] D. Boden, O. Pusch, F. Lee, L. Tucker, and B. Ramratnam, "Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference," *J Virol*, vol. 77, pp. 11531-5, 2003.
- [123] J. Ji, M. Wernli, T. Klimkait, and P. Erb, "Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs," *FEBS Lett*, vol. 552, pp. 247-52, 2003.
- [124] M. T. Lee, G. A. Coburn, M. O. McClure, and B. R. Cullen, "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector," *J Virol*, vol. 77, pp. 11964-72, 2003.
- [125] W. S. Park, M. Hayafune, N. Miyano-Kurosaki, and H. Takaku, "Specific HIV-1 env gene silencing by small interfering RNAs in human peripheral blood mononuclear cells," *Gene Ther*, vol. 10, pp. 2046-50, 2003.
- [126] N. S. Lee, T. Dohjima, G. Bauer, H. Li, M. J. Li, A. Ehsani, P. Salvaterra, and J. Rossi, "Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells," *Nat Biotechnol*, vol. 20, pp. 500-5, 2002.

- [127] A. T. Das, T. R. Brummelkamp, E. M. Westerhout, M. Vink, M. Madiredjo, R. Bernards, and B. Berkhout, "Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition," *J Virol*, vol. 78, pp. 2601-5, 2004.
- [128] Q. Ge, M. T. McManus, T. Nguyen, C. H. Shen, P. A. Sharp, H. N. Eisen, and J. Chen, "RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 2718-23, 2003.
- [129] D. Palliser, D. Chowdhury, Q. Y. Wang, S. J. Lee, R. T. Bronson, D. M. Knipe, and J. Lieberman, "An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection," *Nature*, vol. 439, pp. 89-94, 2006.
- [130] V. Bitko and S. Barik, "Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses," *BMC Microbiol*, vol. 1, p. 34, 2001.
- [131] A. Shlomai and Y. Shaul, "Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference," *Hepatology*, vol. 37, pp. 764-70, 2003.
- [132] K. Hamasaki, K. Nakao, K. Matsumoto, T. Ichikawa, H. Ishikawa, and K. Eguchi, "Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication," *FEBS Lett*, vol. 543, pp. 51-4, 2003.
- [133] C. Ying, E. De Clercq, and J. Neyts, "Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 309, pp. 482-4, 2003.
- [134] A. P. McCaffrey, H. Nakai, K. Pandey, Z. Huang, F. H. Salazar, H. Xu, S. F. Wieland, P. L. Marion, and M. A. Kay, "Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference," *Nat Biotechnol*, vol. 21, pp. 639-44, 2003.
- [135] L. Gitlin, J. K. Stone, and R. Andino, "Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches," *J Virol*, vol. 79, pp. 1027-35, 2005.
- [136] L. Gitlin, S. Karelsky, and R. Andino, "Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells," *Nature*, vol. 418, pp. 430-4, 2002.
- [137] H. Giladi, M. Ketzinel-Gilad, L. Rivkin, Y. Felig, O. Nussbaum, and E. Galun, "Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice," *Mol Ther*, vol. 8, pp. 769-76, 2003.
- [138] D. V. Morrissey, J. A. Lockridge, L. Shaw, K. Blanchard, K. Jensen, W. Breen, K. Hartsough, L. Machemer, S. Radka, V. Jadhav, N. Vaish, S. Zinnen, C. Vargeese, K. Bowman, C. S. Shaffer, L. B. Jeffs, A. Judge, I. MacLachlan, and B. Polisky, "Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs," *Nat Biotechnol*, vol. 23, pp. 1002-7, 2005.
- [139] D. V. Morrissey, K. Blanchard, L. Shaw, K. Jensen, J. A. Lockridge, B. Dickinson, J. A. McSwiggen, C. Vargeese, K. Bowman, C. S. Shaffer, B. A. Polisky, and S. Zinnen, "Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication," *Hepatology*, vol. 41, pp. 1349-56, 2005.
- [140] Q. Wang, C. H. Contag, H. Ilves, B. H. Johnston, and R. L. Kaspar, "Small hairpin RNAs efficiently inhibit hepatitis C IRES-mediated gene expression in human tissue culture cells and a mouse model," *Mol Ther*, vol. 12, pp. 562-8, 2005.
- [141] A. P. McCaffrey, L. Meuse, T. T. Pham, D. S. Conklin, G. J. Hannon, and M. A. Kay, "RNA interference in adult mice," *Nature*, vol. 418, pp. 38-9, Jul 4 2002.
- [142] Q. Ge, L. Filip, A. Bai, T. Nguyen, H. N. Eisen, and J. Chen, "Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 8676-81, 2004.

- [143] S. M. Tompkins, C. Y. Lo, T. M. Tumpey, and S. L. Epstein, "Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 8682-6, 2004.
- [144] V. Bitko, A. Musiyenko, O. Shulyayeva, and S. Barik, "Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA," *Nat Med*, vol. 11, pp. 50-5, 2005.
- [145] W. Zhang, H. Yang, X. Kong, S. Mohapatra, H. San Juan-Vergara, G. Hellermann, S. Behera, R. Singam, R. F. Lockey, and S. S. Mohapatra, "Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene," *Nat Med*, vol. 11, pp. 56-62, 2005.
- [146] J. DeVincenzo, J. E. Cehelsky, R. Alvarez, S. Elbashir, J. Harborth, I. Toudjarska, L. Nechev, V. Murugaiah, A. Van Vliet, A. K. Vaishnav, and R. Meyers, "Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV)," *Antiviral Res*, vol. 77, pp. 225-31, 2008.
- [147] R. Feuer, I. Mena, R. Pagarigan, M. K. Slifka, and J. L. Whitton, "Cell cycle status affects coxsackievirus replication, persistence, and reactivation in vitro," *J Virol*, vol. 76, pp. 4430-40, 2002.
- [148] A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall, and A. Khvorova, "Rational siRNA design for RNA interference," *Nat Biotechnol*, vol. 22, pp. 326-30, 2004.
- [149] H. C. Birnboim and J. Doly, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA," *Nucleic Acids Res*, vol. 7, pp. 1513-23, 1979.
- [150] F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and S. K., *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Green and Wiley, 1994.
- [151] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *J Biol Chem*, vol. 193, pp. 265-75, 1951.
- [152] U. Muller, U. Steinhoff, L. F. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet, "Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense," *Science*, vol. 264, pp. 1918-21, 1994.
- [153] F. Liu, Y. Song, and D. Liu, "Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA," *Gene Ther*, vol. 6, pp. 1258-66, 1999.
- [154] G. Zhang, V. Budker, and J. A. Wolff, "High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA," *Hum Gene Ther*, vol. 10, pp. 1735-7, 1999.
- [155] L. Zender, S. Hutker, C. Liedtke, H. L. Tillmann, S. Zender, B. Mundt, M. Waltemathe, T. Gosling, P. Flemming, N. P. Malek, C. Trautwein, M. P. Manns, F. Kuhnel, and S. Kubicka, "Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 7797-802, 2003.
- [156] X. Zhao, B. J. Lamphear, D. Xiong, K. Knowlton, and R. E. Rhoads, "Protection of cap-dependent protein synthesis in vivo and in vitro with an eIF4G-1 variant highly resistant to cleavage by Coxsackievirus 2A protease," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 4449-57, 2003.
- [157] J. C. Palauqui and H. Vaucheret, "Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, pp. 9675-80, 1998.
- [158] O. Voinnet, P. Vain, S. Angell, and D. C. Baulcombe, "Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA," *Cell*, vol. 95, pp. 177-87, 1998.
- [159] A. Grishok and C. C. Mello, "RNAi (Nematodes: *Caenorhabditis elegans*)," *Adv Genet*, vol. 46, pp. 339-60, 2002.

- [160] J. R. Kennerdell and R. W. Carthew, "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway," *Cell*, vol. 95, pp. 1017-26, 1998.
- [161] J. T. Chi, H. Y. Chang, N. N. Wang, D. S. Chang, N. Dunphy, and P. O. Brown, "Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 6343-6, 2003.
- [162] P. Stein, P. Svoboda, M. Anger, and R. M. Schultz, "RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase," *RNA*, vol. 9, pp. 187-92, 2003.
- [163] A. deFougerolles, M. Manoharan, R. Meyers, and H. P. Vornlocher, "RNA interference in vivo: towards synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics," *Methods Enzymol*, vol. 392, pp. 278-296, 2005.
- [164] F. Czauderna, M. Fechtner, S. Dames, H. Aygun, A. Klippel, G. J. Pronk, K. Giese, and J. Kaufmann, "Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells," *Nucleic Acids Res*, vol. 31, pp. 2705-16, 2003.
- [165] N. Kawamura, M. Kohara, S. Abe, T. Komatsu, K. Tago, M. Arita, and A. Nomoto, "Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype," *J Virol*, vol. 63, pp. 1302-9, 1989.
- [166] R. Wessely, "Coxsackieviral replication and pathogenicity: lessons from gene modified animal models," *Med Microbiol Immunol*, vol. 193, pp. 71-4, 2004.
- [167] G. Zhang, X. Gao, Y. K. Song, R. Vollmer, D. B. Stolz, J. Z. Gasiorowski, D. A. Dean, and D. Liu, "Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery," *Gene Ther*, vol. 11, pp. 675-82, 2004.
- [168] E. Song, S. K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar, and J. Lieberman, "RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis," *Nat Med*, vol. 9, pp. 347-51, 2003.
- [169] D. R. Sorensen, M. Leirdal, and M. Sioud, "Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice," *J Mol Biol*, vol. 327, pp. 761-6, 2003.
- [170] B. L. Davidson, "Hepatic diseases--hitting the target with inhibitory RNAs," *N Engl J Med*, vol. 349, pp. 2357-9, 2003.
- [171] A. Heim, A. Canu, P. Kirschner, T. Simon, G. Mall, P. H. Hofschneider, and R. Kandolf, "Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackievirus B3-infected carrier cultures of human myocardial fibroblasts," *J Infect Dis*, vol. 166, pp. 958-65, 1992.
- [172] M. Sioud, "Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization," *J Mol Biol*, vol. 348, pp. 1079-90, 2005.
- [173] A. M. Chalk, C. Wahlestedt, and E. L. Sonnhammer, "Improved and automated prediction of effective siRNA," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 319, pp. 264-74, 2004.
- [174] Y. Pei and T. Tuschl, "On the art of identifying effective and specific siRNAs," *Nat Methods*, vol. 3, pp. 670-6, 2006.
- [175] A. Khvorova, A. Reynolds, and S. D. Jayasena, "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias," *Cell*, vol. 115, pp. 209-16, 2003.
- [176] D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P. D. Zamore, "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex," *Cell*, vol. 115, pp. 199-208, 2003.
- [177] T. A. Vickers, S. Koo, C. F. Bennett, S. T. Croke, N. M. Dean, and B. F. Baker, "Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 7108-18, 2003.

- [178] R. Kretschmer-Kazemi Far and G. Sczakiel, "The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides," *Nucleic Acids Res*, vol. 31, pp. 4417-24, 2003.
- [179] T. Holen, M. Amarzguioui, M. T. Wiiger, E. Babaie, and H. Prydz, "Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor," *Nucleic Acids Res*, vol. 30, pp. 1757-66, 2002.
- [180] E. A. Bohula, A. J. Salisbury, M. Sohail, M. P. Playford, J. Riedemann, E. M. Southern, and V. M. Macaulay, "The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 15991-7, 2003.
- [181] B. S. Heale, H. S. Soifer, C. Bowers, and J. J. Rossi, "siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures," *Nucleic Acids Res*, vol. 33, p. e30, 2005.
- [182] K. Q. Luo and D. C. Chang, "The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 318, pp. 303-10, 2004.
- [183] K. Yoshinari, M. Miyagishi, and K. Taira, "Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region," *Nucleic Acids Res*, vol. 32, pp. 691-9, 2004.
- [184] K. M. Brown, C. Y. Chu, and T. M. Rana, "Target accessibility dictates the potency of human RISC," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 12, pp. 469-70, 2005.
- [185] J. Ahn, E. S. Jun, H. S. Lee, S. Y. Yoon, D. Kim, C. H. Joo, Y. K. Kim, and H. Lee, "A small interfering RNA targeting coxsackievirus B3 protects permissive HeLa cells from viral challenge," *J Virol*, vol. 79, pp. 8620-4, 2005.
- [186] J. Y. Kim, S. K. Chung, H. Y. Hwang, H. Kim, J. H. Kim, J. H. Nam, and S. I. Park, "Expression of short hairpin RNAs against the coxsackievirus B3 exerts potential antiviral effects in Cos-7 cells and in mice," *Virus Res*, vol. 125, pp. 9-13, 2007.
- [187] S. Schubert, H. P. Grunert, H. Zeichhardt, D. Werk, V. A. Erdmann, and J. Kurreck, "Maintaining inhibition: siRNA double expression vectors against coxsackieviral RNAs," *J Mol Biol*, vol. 346, pp. 457-65, 2005.
- [188] D. Werk, S. Schubert, V. Lindig, H. P. Grunert, H. Zeichhardt, V. A. Erdmann, and J. Kurreck, "Developing an effective RNA interference strategy against a plus-strand RNA virus: silencing of coxsackievirus B3 and its cognate coxsackievirus-adenovirus receptor," *Biol Chem*, vol. 386, pp. 857-63, 2005.
- [189] J. Yuan, P. K. Cheung, H. M. Zhang, D. Chau, and D. Yang, "Inhibition of coxsackievirus B3 replication by small interfering RNAs requires perfect sequence match in the central region of the viral positive strand," *J Virol*, vol. 79, pp. 2151-9, 2005.
- [190] M. Dutkiewicz, H. P. Grunert, H. Zeichhardt, S. W. Lena, J. Wengel, and J. Kurreck, "Design of LNA-modified siRNAs against the highly structured 5' UTR of coxsackievirus B3," *FEBS Lett*, vol. 582, pp. 3061-6, 2008.
- [191] S. M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate," *EMBO J*, vol. 20, pp. 6877-88, 2001.
- [192] H. S. Lee, J. Ahn, Y. Jee, I. S. Seo, E. J. Jeon, E. S. Jeon, C. H. Joo, Y. K. Kim, and H. Lee, "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*, vol. 88, pp. 2003-12, 2007.
- [193] H. Fechner, S. Pinkert, X. Wang, I. Sipo, L. Suckau, J. Kurreck, A. Dorner, K. Sollerbrant, H. Zeichhardt, H. P. Grunert, R. Vetter, H. P. Schultheiss, and W. Poller, "Coxsackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited

- by vector-mediated RNA interference targeting their common receptor," *Gene Ther*, vol. 14, pp. 960-71, 2007.
- [194] A. Bruning and I. B. Runnebaum, "CAR is a cell-cell adhesion protein in human cancer cells and is expressionally modulated by dexamethasone, TNFalpha, and TGFbeta," *Gene Ther*, vol. 10, pp. 198-205, 2003.
- [195] C. J. Cohen, J. T. Shieh, R. J. Pickles, T. Okegawa, J. T. Hsieh, and J. M. Bergelson, "The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, pp. 15191-6, 2001.
- [196] C. B. Coyne and J. M. Bergelson, "CAR: a virus receptor within the tight junction," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 57, pp. 869-82, 2005.
- [197] A. Saulnier, I. Pelletier, K. Labadie, and F. Colbere-Garapin, "Complete cure of persistent virus infections by antiviral siRNAs," *Mol Ther*, vol. 13, pp. 142-50, 2006.
- [198] M. Nygardas, T. Vuorinen, A. P. Aalto, D. H. Bamford, and V. Hukkanen, "Inhibition of coxsackievirus B3 and related enteroviruses by antiviral short interfering RNA pools produced using phi6 RNA-dependent RNA polymerase," *J Gen Virol*, vol. 90, pp. 2468-73, 2009.
- [199] M. T. McManus and P. A. Sharp, "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs," *Nat Rev Genet*, vol. 3, pp. 737-47, 2002.
- [200] D. A. Braasch, S. Jensen, Y. Liu, K. Kaur, K. Arar, M. A. White, and D. R. Corey, "RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA," *Biochemistry*, vol. 42, pp. 7967-75, 2003.
- [201] J. Harborth, S. M. Elbashir, K. Vandeburgh, H. Manninga, S. A. Scaringe, K. Weber, and T. Tuschl, "Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing," *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, vol. 13, pp. 83-105, 2003.
- [202] S. Choung, Y. J. Kim, S. Kim, H. O. Park, and Y. C. Choi, "Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 342, pp. 919-27, 2006.
- [203] A. H. Hall, J. Wan, E. E. Shaughnessy, B. Ramsay Shaw, and K. A. Alexander, "RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships," *Nucleic Acids Res*, vol. 32, pp. 5991-6000, 2004.
- [204] J. M. Layzer, A. P. McCaffrey, A. K. Tanner, Z. Huang, M. A. Kay, and B. A. Sullenger, "In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs," *RNA*, vol. 10, pp. 766-71, 2004.
- [205] T. P. Prakash, C. R. Allerson, P. Dande, T. A. Vickers, N. Sioufi, R. Jarres, B. F. Baker, E. E. Swayze, R. H. Griffey, and B. Bhat, "Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells," *J Med Chem*, vol. 48, pp. 4247-53, 2005.
- [206] M. Amarguioui, T. Holen, E. Babaie, and H. Prydz, "Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA," *Nucleic Acids Res*, vol. 31, pp. 589-95, 2003.
- [207] E. E. Swayze, A. M. Siwkowski, E. V. Wancewicz, M. T. Migawa, T. K. Wyrzykiewicz, G. Hung, B. P. Monia, and C. F. Bennett, "Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals," *Nucleic Acids Res*, vol. 35, pp. 687-700, 2007.
- [208] F. C. Richardson, C. Zhang, S. R. Lehrman, H. Koc, J. A. Swenberg, K. A. Richardson, and R. A. Bendele, "Quantification of 2'-fluoro-2'-deoxyuridine and 2'-fluoro-2'-deoxycytidine in DNA and RNA isolated from rats and woodchucks using LC/MS/MS," *Chem Res Toxicol*, vol. 15, pp. 922-6, 2002.
- [209] T. Tuschl and A. Borkhardt, "Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy," *Mol Interv*, vol. 2, pp. 158-67, 2002.

- [210] J. Y. Yu, S. L. DeRuiter, and D. L. Turner, "RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, pp. 6047-52, 2002.
- [211] D. A. Rubinson, C. P. Dillon, A. V. Kwiatkowski, C. Sievers, L. Yang, J. Kopinja, D. L. Rooney, M. Zhang, M. M. Ihrig, M. T. McManus, F. B. Gertler, M. L. Scott, and L. Van Parijs, "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference," *Nat Genet*, vol. 33, pp. 401-6, 2003.
- [212] G. J. Arts, E. Langemeijer, R. Tissingh, L. Ma, H. Pavliska, K. Dokic, R. Dooijes, E. Mesic, R. Clasen, F. Michiels, J. van der Schueren, M. Lambrecht, S. Herman, R. Brys, K. Thys, M. Hoffmann, P. Tomme, and H. van Es, "Adenoviral vectors expressing siRNAs for discovery and validation of gene function," *Genome Res*, vol. 13, pp. 2325-32, 2003.
- [213] Y. J. Kim, J. Ahn, S. Y. Jeung, D. S. Kim, H. N. Na, Y. J. Cho, S. H. Yun, Y. Jee, E. S. Jeon, H. Lee, and J. H. Nam, "Recombinant lentivirus-delivered short hairpin RNAs targeted to conserved coxsackievirus sequences protect against viral myocarditis and improve survival rate in an animal model," *Virus Genes*, vol. 36, pp. 141-6, 2008.
- [214] H. Fechner, I. Sipo, D. Westermann, S. Pinkert, X. Wang, L. Suckau, J. Kurreck, H. Zeichhardt, O. Muller, R. Vetter, V. Erdmann, C. Tschope, and W. Poller, "Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy," *J Mol Med (Berl)*, vol. 86, pp. 987-97, 2008.
- [215] C. E. Thomas, A. Ehrhardt, and M. A. Kay, "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy," *Nat Rev Genet*, vol. 4, pp. 346-58, 2003.
- [216] D. Grimm, K. L. Streetz, C. L. Jopling, T. A. Storm, K. Pandey, C. R. Davis, P. Marion, F. Salazar, and M. A. Kay, "Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways," *Nature*, vol. 441, pp. 537-41, 2006.

## B Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: siRNA-Sequenzen

## C Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur der Picornaviridae.

Abb. 2: Schematische Darstellung der Organisation des CVB3-Genoms und der Polyproteinprozessierung durch enterovirale Proteasen.

Abb. 3: Infektionszyklus des Coxsackievirus B3.

Abb. 4: Spektrum CVB3-induzierter Herzerkrankungen.

Abb. 5: Mechanismus der RNA-Interferenz.

Abb. 6: siRNA-vermittelte Interferenz mit dem coxsackieviralen Infektionszyklus.

- Abb. 7: Ausgangsplasmid pCVB3-eGFP zur Generierung eines rekombinanten, eGFP-exprimierenden CVB3-Virusstocks.
- Abb. 8: Lipid-basierte siRNA-Transfektion von HeLa-Zellen.
- Abb. 9: Attenuierung der coxsackieviralen Zytopathogenität *in vitro* durch siRNA-2A<sup>α</sup>.
- Abb. 10: Attenuierung der coxsackieviralen Replikation *in vitro* durch siRNA-2A<sup>α</sup>.
- Abb. 11: Attenuierung der coxsackieviralen Proteinexpression *in vitro* durch siRNA-2A<sup>α</sup>.
- Abb. 12: Korrelation der siRNA-bedingten coxsackieviralen Attenuierung mit dem intrazellulären siRNA-Level.
- Abb. 13: CVB3-Infektion Typ I Interferon Rezeptor defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.
- Abb. 14: Durchflusszytometrische Bestimmung der *in vivo* siRNA-Transfektionseffizienz.
- Abb. 15: Attenuierung der coxsackieviralen Pathogenität im experimentellen Tiermodell durch hydrodynamische siRNA-Transfektion.
- Abb. 16: Inhibition der viralen Proteinexpression durch siRNA-2A<sup>α</sup> *in vivo*.
- Abb. 17: Inhibition der viralen Replikation durch siRNA-2A<sup>α</sup> *in vivo*.
- Abb. 18: Inhibition der virusbedingten Gewebeschädigung durch siRNA-2A<sup>α</sup> *in vivo*.
- Abb. 19: Selektion genomischer Zielregionen für die anti-coxsackievirale RNA-Interferenz.
- Abb. 20: Therapeutische Wirksamkeit verschiedener Kontroll-siRNAs mit mindestens zwei Punktmutationen in der ursprünglichen coxsackieviralen Sequenz.
- Abb. 21: Therapeutische Wirksamkeit verschiedener, gegen das gesamte coxsackievirale Genom gerichteter siRNAs.
- Abb. 22: Versuchsansatz zur Evaluierung eines möglichen *Viral Escape* nach siRNA-Exposition.
- Abb. 23: Entstehung einer resistenten Viruspopulation nach siRNA-Exposition.
- Abb. 24: Entstehung einer punktmultierten Viruspopulation nach siRNA-Exposition.
- Abb. 25: Die Einführung einer einzelnen Mutation führt zu einem resistenten Phänotyp.
- Abb. 26: Evaluierung des therapeutischen Potentials verschiedener siRNA-Kombinationen.
- Abb. 27: Kombinierte siRNA-Applikation supprimiert die Entstehung punktmultierteter Viren.
- Abb. 28: Aufrechterhaltung des therapeutischen Potentials durch Suppression eines *Viral Escape*.
- Abb. 29: Serumstabilität von Standard- sowie chemisch modifizierter siRNA-3C<sup>α</sup>, -3C<sup>β</sup> und -3D<sup>β</sup>.
- Abb. 30: Verbessertes therapeutisches Potential durch Verwendung chemisch modifizierter *Stealth*-siRNA.



## D Abkürzungsverzeichnis

AAV	adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>Cap</i>	<i>Cap</i> -Strukturanalog (m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G)
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CK	Creatinkinase
CMV	Cytomegalie-Virus
cRNA	komplementäre RNA ( <i>complementary RNA</i> )
CVB3	Coxsackievirus B3
DC	<i>Detergent Compatible</i>
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DCMi	inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DMEM	Dulbecco's-modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>DesoxyriboNucleic Acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescent Detection</i>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	endoplasmatischen Retikulum
esiRNA	Endoribonuklease-präparierte siRNA
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	fötales Rinderserum

---

Fwd	<i>forward</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H-b Index	Wasserstoffbrücken ( <i>hydrogen bond</i> ) Index
HEB	humane Enterovirus B Serotypen
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IgG	Immunglobulin G
IFNR	Interferon Rezeptor
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	molar
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl
NAD <sup>+</sup> bzw. NADH/H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte bzw. reduzierte Form)
neg.	negative
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NTC	<i>no template control</i>
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p.i.	<i>post infectionem</i>
PFA	<i>Plaque Forming Assay</i>
pfu	Plaque-formende Einheit ( <i>Plaque Forming Unit</i> )

---

Pos.	Position
pos.	positiv
Rev	<i>reverse</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>RiboNucleic Acid</i> )
RNAi	RNA-Interferenz ( <i>RNA interference</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase <i>oder</i> Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
siLNA	LNA-modifizierte siRNA
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
TAR	<i>transactivation response element</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Trisgepufferte Saline
TF	Transfektion
u	Einheit der Enzymaktivität ( <i>unit</i> )
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volt
Vpg	virales Protein, genomassoziiert
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

## E Danksagung

Bei meinen Arbeiten für die vorliegende Dissertation habe ich vielfältige Unterstützung und Förderung erfahren, für die ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank ausdrücken möchte. Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Organische Chemie und Biochemie an der Technischen Universität München, Herrn Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher, für seine langjährige Betreuung und für sein

nie nachlassendes Interesse an meiner Arbeit, sowie Herrn Prof. Dr. Rainer Wessely, der nicht nur die wissenschaftliche Betreuung meines Projektes am Deutschen Herzzentrum übernommen, sondern mich auch in Hinblick auf meine fachliche Weiterentwicklung stets gefördert hat. Die vorliegende Dissertation wäre ohne ihre außergewöhnliche Anteilnahme am Fortgang meiner Arbeiten sowie die gute und intensive Zusammenarbeit nicht möglich gewesen. Dafür, dass sich die für mich so wertvolle Unterstützung innerhalb meiner Arbeitsgruppe am Deutschen Herzzentrum auch nach dem Weggang von Herrn Prof. Dr. Wessely nahtlos fortsetzte, bin ich seinem Nachfolger, Herrn Dr. Michael Joner, sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Albert Schömig danke ich sehr für die Möglichkeit diese Arbeit in der Abteilung für Experimentelle Erwachsenenkardiologie am Deutschen Herzzentrum durchführen zu können und für die wohlwollende Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Cornelia Michaelis für die Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten sowie bei Herrn Dr. Stefan Seidl vom Pathologischen Institut des Klinikums Rechts der Isar für die histopathologische Beurteilung der Gewebeschnitte.

Auch möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wessely bzw. Joner für das angenehme Arbeitsklima danken. Insbesondere Frau Dr. Birgit Blauch danke ich ganz herzlich für die Unterstützung und die gemeinsam verbrachte Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Allen weiteren Kolleg(inn)en der Experimentellen Erwachsenen- sowie Kinderkardiologie gilt ebenso ein großes Dankeschön für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere Frau Birgit Campbell und Frau Monika Hölderle danke ich für ihre unermüdliche Hilfs- und Gesprächsbereitschaft sowie das immer ausgesprochen nette Arbeitsklima. Danke auch an Frau Dr. Isabell Seitz-Merwald und Herrn Falko Sorge für die schöne gemeinsame Zeit im Labor und die daraus erwachsene Freundschaft.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für ihre gleichermaßen moralische wie tatkräftige Unterstützung, ihre Kraft und ihre Zuversicht, die mich während der gesamten Arbeit stets begleitet haben.

## F Lebenslauf

## G Vorträge

70. Jahrestagung der DGK, Mannheim, 2004

„Therapeutische Applikation von gegen die Protease 2A Region gerichteten short interfering RNA Molekülen führt zur Attenuierung coxsackieviraler Replikation und Cytopathogenität“

[S. Merl, M. Vorpahl, C. Bradaric, R. Wessely]

72. Jahrestagung der DGK, Mannheim, 2006

„Selektion der genomischen Zielsequenz sowie kombinierte siRNA-Applikation determinieren die Wirksamkeit therapeutischer antiviraler RNA-Interferenz“

[S. Merl, M. Vorpahl, C. Bradaric, R. Wessely]

## H Publikationen

**Merl S**, Michaelis C, Jaschke B, Vorpahl M, Seidl S, Wessely R

Targeting 2A protease by RNA interference attenuates coxsackieviral cytopathogenicity and promotes survival in highly susceptible mice.

Circulation. 2005;111(13):1583-92.

**Merl S**, Wessely R

Anti-coxsackieviral efficacy of RNA interference is highly dependent on genomic target selection and emergence of escape mutants.

Oligonucleotides. 2007;17(1):44-53.

Wessely R, Blaich B, Belaiba RS, **Merl S**, Görlach A, Kastrati A, Schömig A.

Comparative characterization of cellular and molecular anti-restenotic profiles of paclitaxel and sirolimus. Implications for local drug delivery.

Thromb Haemost. 2007;97(6):1003-12.

**Merl S**, Wessely R

Targeting Viral Heart Disease by RNA Interference.

RNA Technologies in Cardiovascular Medicine and Research. Springer Berlin Heidelberg. 2008:89-107

Joner M, Morimoto K, Kasukawa H, Steigerwald K, **Merl S**, Nakazawa G, John MC, Finn AV, Acampado E, Kolodgie FD, Gold HK, Virmani R

Site-specific targeting of nanoparticle prednisolone reduces in-stent restenosis in a rabbit model of established atheroma.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28(11):1960-6.

**Merl S**, Steigerwald K, Kastrati A, Wieczorek A, Vorpahl M, Mannhold R, Vogeser M, Hausleiter J, Joner M, Schömig A, Wessely R

The pre-clinical assessment of rapamycin-eluting, durable polymer-free stent coating concepts.

Biomaterials. 2009;30(4):632-7.

**Schönhofer-Merl S**, Wessely R

RNA interference to treat enteroviral disease: current status and clinical perspectives.

Curr Mol Med. 2010 Aug 1;10(6):550-64.

Joner M, Nakazawa G, Bonsignore C, Acampado E, Steigerwald K, **Merl S**, Vallbracht T, Kolodgie FD, Virmani R

Histopathologic evaluation of nitinol self-expanding stents in an animal model of advanced atherosclerotic lesions.

EuroIntervention. 2010;5(6):737-44.

**Schönhofer-Merl S**, Torres-Ruiz RA

The Sos-recruitment system (SRS) as a tool to analyze cellular localization of plant proteins: membrane localization of Arabidopsis thaliana PEPINO/PASTICCINO2.

Mol Genet Genomics. 2010;283(5):439-49.