

**Aus dem Institut für Pathologie
und Neuropathologie der Universität Tübingen
Abteilung Molekulare Pathologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Kandolf**

**Parvovirus B19-assoziierte inflammatorische
Kardiomyopathie: Inhibition der Virusreplikation durch
Adenovektor-vermittelte RNA-Interferenz**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Marius Rolf Gernot Brandt
aus
Bühl**

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. C.-T. Bock

2. Berichterstatter:

Professor Dr. A. May

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Parvovirus B19	1
1.1.1 Taxonomie der Parvoviren	1
1.1.2 Struktur des Parvovirus B19V	2
1.1.2.1 Genomische Struktur	2
1.1.2.2 Genom-Diversität.....	3
1.1.2.3 Kapsid und nichtstrukturelle Proteine	3
1.1.3 Infektionszyklus und Tropismus	4
1.1.4 Epidemiologie.....	6
1.1.5 Klinische Aspekte der Parvovirus B19-Infektion.....	6
1.1.5.1 Erythema infectiosum	7
1.1.5.2 Parvovirus B19-Infektionen in der Schwangerschaft	8
1.1.5.3 Arthropathie und Arthritis	9
1.1.5.4 Transiente aplastische Krise.....	9
1.1.5.5 Persistierende Anämie.....	10
1.1.5.6 B19V - assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie.....	10
1.1.5.7 Endotheliale und diastolische Dysfunktion.....	12
1.1.5.8 Weitere mit Parvovirus B19-assoziierte Krankheitsbilder	13
1.1.6 Therapie der Parvovirus B19-Infektion	13
1.2 RNA-Interferenz.....	14
1.2.1 Molekulare Mechanismen der RNA-Interferenz	14
1.2.2 Möglichkeiten der Induktion von RNAi.....	15
1.2.3 Unerwünschte Nebeneffekte der RNAi.....	17
1.2.3.1 Sequenzunabhängige Nebeneffekte.....	18
1.2.3.2 Sequenzabhängige Nebeneffekte.....	19
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Puffer und Lösungen.....	21

2.1.1 Allgemeine Puffer und Lösungen	21
2.1.2 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot.....	21
2.1.3 Medien für die Zellkultur	23
2.2 Kits.....	23
2.3 Antikörper	23
2.3.1 Primäre Antikörper	23
2.3.2 Sekundärer Antikörper	23
2.4 Protein-Standard.....	24
2.5 Verbrauchsmaterialien	24
2.6 Laborgeräte	24
2.7 Oligonukleotide	25
2.8 Aufreinigung und Quantifizierung von B19V-Partikeln	26
2.8.1 Aufreinigung von B19V-Partikeln aus Patientenserum.....	26
2.8.2 Bestimmung des Virustiters.....	26
2.9 shRNA und adenovirale Vektoren.....	26
2.10 Zellkultur	29
2.10.1 Verwendete Zelllinie	29
2.10.2 Kultivierung von Suspensionszellen	29
2.10.3 Kryokonservierung der Zellen	30
2.11 Durchflusszytometrie (FACS)	30
2.12 Infektion von UT-7/Epo-Zellen mit B19V-Partikeln.....	30
2.13 RNA-Analyse mittels quantitativer <i>real-time</i> PCR	31
2.13.1 Extraktion der RNA aus kultivierten Zellen.....	31
2.13.2 Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	31
2.14 Proteinanalyse mittels Western Blot	32
2.14.1 Zellernte und Proteinextraktion.....	32
2.14.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	32
2.14.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.14.4 Proteintransfer mittels Western Blotting	32

2.14.5 Antikörper-vermittelte spezifische Proteindetektion.....	33
2.14.6 Entfernung gebundener Antikörper („Stripping“)	33
2.15 Statistische Analysen.....	34
3 ERGEBNISSE	35
3.1 Evaluierung von drei VP2-spezifischen shRNAs.	36
3.2 Etablierung der adenoviralen Transduktion von UT-7/Epo-Zellen	38
3.3 Verlauf der B19V-Replikation nach Transduktion mit B19V-VP2- spezifischer shRNA	41
3.3.1 Verlauf der B19V-VP2-mRNA-Expression nach Transduktion mit Ad5shVP2 und Kontroll-shRNA.....	41
3.3.2 Verlauf der NS1-mRNA-Expression nach Transduktion mit Ad5shVP2 und Kontroll-shRNA.....	45
3.3.3 VP2-Proteinexpression nach Transduktion mit Ad5shVP2 und Kontroll-shRNA	47
4 DISKUSSION	49
4.1 Bestätigung der Spezifität und Effizienz der verwendeten shRNA.....	50
4.2 Parvovirus B19 repliziert in UT-7/Epo-Zellen	51
4.3 Ad5shVP2 inhibiert die Replikation von Parvovirus B19 in UT-7/Epo- Zellen.....	52
4.4 Ad5shVP2 vermittelt kein signifikantes Silencing von NS1	55
4.5 Probleme und Lösungsansätze bei therapeutischer RNA-Interferenz ..	56
4.5.1 Ausbildung von Escape mutants	56
4.5.2 Vektorproblem.....	58
4.6 Ausblick	60

5 ZUSAMMENFASSUNG	61
6 LITERATURVERZEICHNIS	63
7 DANKSAGUNG	75
8 LEBENSLAUF	76

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Ad5CMV-GFP	Adenovektor mit GFP-Gen
Ad5shCAR2 _m	Adenovektor mit CAR-spezifischer shRNA als Negativkontrolle
Ad5shVP2	Adenovektor mit VP2-spezifischer shRNA
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B19V	Parvovirus B19
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLB	<i>cell lysis buffer</i>
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-RNA
Epo	Erythropoietin
FACS	<i>fluorescent activated cell sorter</i>
FKS	Fetales Kälber-Serum
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
iCMP	Inflammatorische Kardiomyopathie
IL	Interleukin
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ORF	<i>open reading frame</i>

p.i.	<i>post infectionem</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TYK	Tyrosinkinase
WHO	World Health Organisation

1 EINLEITUNG

1.1 Parvovirus B19

Parvovirus B19 wurde 1974 per Zufall durch die australische Virologin Yvonne Cossart entdeckt, als bei der Untersuchung von Patientenseren auf Hepatitis B ungewöhnliche Ergebnisse auftraten. Die Bezeichnung B19 entsprang dabei der Kodierung der entsprechenden Probe (Nummer 19 in Reihe B) (Cossart et al., 1975). Eine Infektion mit Parvovirus B19 kann, je nach immunologischem und hämatologischem Status des Patienten, in der klinischen Manifestation stark variieren und reicht von milden, subklinischen Verläufen über das Erythema infectiosum bis hin zu schweren aplastischen Krisen und dem Hydrops fetalis.

1.1.1 Taxonomie der Parvoviren

Parvovirus B19 gehört der Familie der *Parvoviridae* an, welche sich in die Subfamilien *Densovirinae* und *Parvovirinae* aufteilt. *Parvovirinae* wiederum werden in die drei Gattungen Dependoviren, Parvoviren, und Erythroviren unterteilt. Letztere beide sind in der Lage, selbstständig zu replizieren, wohingegen Dependoviren zur Replikation auf Helferviren angewiesen sind (Berns, 1996).

Lange Zeit galt Parvovirus B19 als der einzige humanpathogene Vertreter aus der Familie der *Parvoviridae*, bis 2005 Parvovirus 4 und Bocavirus entdeckt wurden, die vermutlich an Erkrankungen des respiratorischen Trakts beteiligt sind (Allander et al., 2005; Jones et al., 2005).

Tab. 1: Klassifizierung der Subfamilie *Parvovirinae* (Heegaard and Brown, 2002).

Genus	Virus	Natürlicher Wirt
Parvovirus	“Aleutian mink disease virus” Canines Parvovirus “Mice minute virus” Porkines Parvovirus	Nerz, Frettchen, Stinktier, Waschbär Hund Maus, Ratte Schwein
Erythrovirus	Parvovirus B19 Affen-Parvovirus Makakken Parvovirus Rhesus Parvovirus	Mensch Cynomolgus-Affen Makakke Rhesus Affe
Dependovirus	Adeno-assoziiertes Virus 1-6 Vogel Adeno-assoziiertes Virus Bovines Adeno-assoziiertes Virus	Mensch Vogel Rind

1.1.2 Struktur des Parvovirus B19V

B19V besteht aus einem nicht umhüllten, ikosaedrischen Kapsid, das einen Durchmesser von etwa 22-26 nm aufweist, sowie einem Einzelstrang-DNA-Molekül (Berns, 1996).

1.1.2.1 Genomische Struktur

Die kodierende Region des Genoms besteht aus 4.830 Nukleotiden und wird von *inverted terminal repeats* (ITR) von jeweils 383 Nukleotiden flankiert. Die ITRs sind aus palindromischen Sequenzen aufgebaut und sind damit in der Lage, Haarnadelstrukturen auszubilden und fungieren als Primer für die Synthese des komplementären Stranges (Astell, 1990). Das B19V-Genom weist zwei große offene Leserahmen auf: zum einen für das einzige nichtstrukturele NS1-Protein sowie für die Kapsidproteine VP1 und VP2. Es sind bislang neun mRNA-Transkripte bekannt, welche alle durch den einzigen P6-Promoter reguliert werden (s. Abb. 1) (Ozawa et al., 1987).

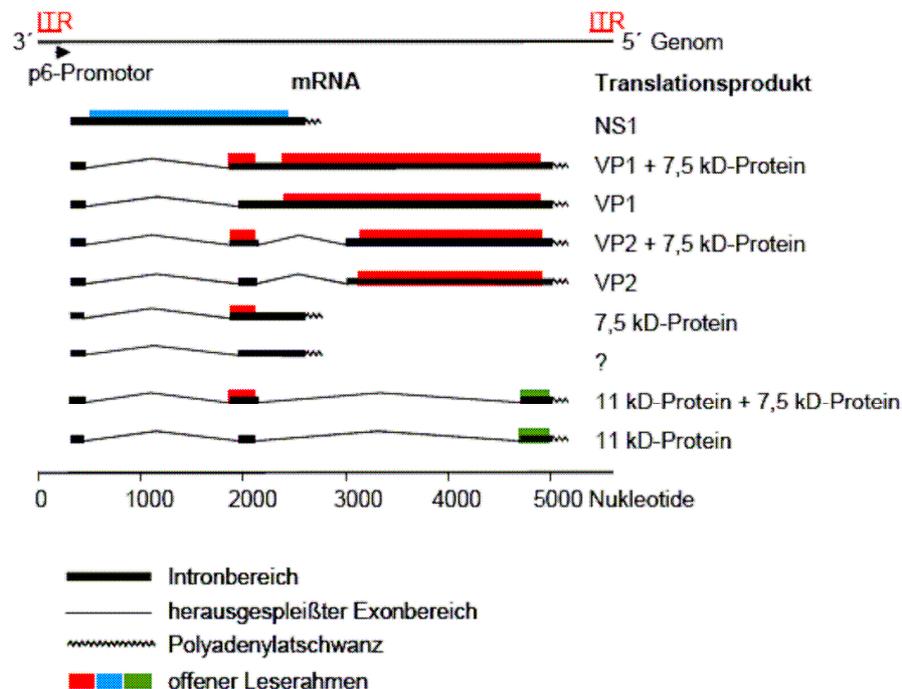


Abb. 1: Transkriptionskarte von B19V (Ozawa et al., 1987).

1.1.2.2 Genom-Diversität

Aufgrund DNA- und Aminosäuresequenzvergleichen lässt sich das Genus der Erythroviren in drei Genotypen einteilen: Genotyp 1 mit dem Prototyp Pvbaua, Genotyp 2 mit dem Prototyp Lali und Genotyp 3 (Prototyp V9). Abweichungen von über 8% der DNA-Sequenzen differenzieren diese 3 Genotypen voneinander, wohingegen innerhalb eines Genotyps die Abweichungen maximal 2% betragen (Servant et al., 2002). Eine Korrelation zwischen den einzelnen Genotypen und bestimmten klinischen Verläufen konnte bislang nicht festgestellt werden (Erdman et al., 1996). Vielmehr weisen die jeweiligen Genotypen spezifische geografische Verteilungsmuster auf. So finden sich die Genotypen 1 und 2 vorwiegend in westlichen Industrieländern, wohingegen Genotyp 3-Infektionen weitgehend auf Südamerika sowie auf Staaten in Afrika, die südlich der Sahara liegen, beschränkt sind (Candotti et al., 2004; Parsyan et al., 2007; Sanabani et al., 2006).

Auch konnte eine altersspezifische Verteilung der jeweiligen Genotypen festgestellt werden: bei jüngeren Patienten unter 50 Jahren mit B19V-Infektion liegt am häufigsten Genotyp 1 vor, während Genotyp 2 vor allem bei älteren Patienten zu finden ist (Norja et al., 2006a).

1.1.2.3 Kapsid und nichtstrukturelle Proteine

Das ikosaedrische Kapsid von B19V ist aus zwei Proteinen aufgebaut: VP1 und VP2, welche von sich überlappenden Leserahmen kodiert werden. VP2 besitzt ein Molekulargewicht von 58 kDa und macht 96% des Kapsids aus. Die verbleibenden 4% werden von VP1 (84 kDa) gebildet, welches aus VP2 und zusätzlichen 227 Aminosäuren am aminoterminalen Ende, der *VP1 unique region*, besteht (Ozawa and Young, 1987).

NS1, das wichtigste Nicht-Struktur-Protein von Parvovirus B19, besitzt ein Molekulargewicht von 77 kDa. Seine Funktion wurde bislang nicht vollständig charakterisiert, jedoch legen Untersuchungen des NS1-Proteins anderer *Parvovirinae* nahe, dass es über eine Transaktivierung des viralen P6-Promotors an der Kontrolle der Virusreplikation beteiligt ist (Christensen et al., 1995; Christensen et al., 1997). NS1 transaktiviert auch eine Reihe weiterer

zellulärer und viraler Promotoren, wie den IL-6- oder HIV1-Promotor (Mitchell, 2002). Darüber hinaus besitzt NS1 apoptotische und zytotoxische Effekte, welche auf seine Helikase-, ATPase- und Endonuklease-Funktion zurückgeführt werden (Doerig et al., 1990; Jindal et al., 1994; Moffatt et al., 1998). Neuere Untersuchungen konnten belegen, dass das NS1-Protein über eine Aktivierung von STAT3/PIAS3 zu einer Modulation der inflammatorischen Signaltransduktion fähig ist, was zur Persistenz der B19V-Infektion beitragen kann (Duechting et al., 2008). Als weitere Genprodukte sind bisher das 7,5 kDa-Protein, ein 11 kDa-Protein und ein als „X“ (oder auch 9,5 kDa-Protein) bezeichnetes Protein beschrieben worden (Luo and Astell, 1993; St Amand and Astell, 1993; Zhi et al., 2006). Die genaueren Funktionen dieser Proteine sind bislang weitgehend unbekannt, wobei für das 9,5 kDa-Protein ein Zusammenhang bei der Apoptoseentstehung diskutiert wird (Chen et al.).

1.1.3 Infektionszyklus und Tropismus

Wie bei anderen nichtumhüllten DNA-Viren umfasst der Infektionszyklus von B19V das Binden des Virus an seinen zellulären Rezeptor, die Internalisierung, die Translokation des Genoms in den Nukleus der Wirtszelle, sowie die DNA-Replikation, RNA-Transkription und schließlich die Bildung neuer Viruspartikel, die durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt werden (s. Abb. 2)

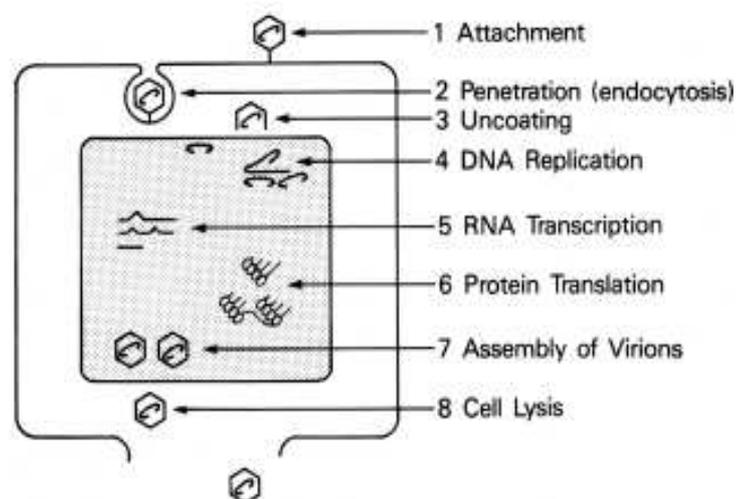


Abb. 2: Schematischer Infektionszyklus von B19V (Heegaard and Brown, 2002).

Als zellulärer Rezeptor dient das Glykolipid Globosid, auch als Blutgruppen P-Antigen beschrieben. Dabei fungiert das Hauptkapsidprotein VP2 als Rezeptorligand (Brown et al., 1993). Hinreichend für eine erfolgreiche Bindung sind die Kofaktoren $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin und das Autoantigen Ku80 (Munakata et al., 2005; Weigel-Kelley et al., 2003). Das P-Antigen wird vorwiegend auf erythroiden Vorläuferzellen exprimiert, was sich mit dem zu beobachtenden Tropismus von B19V zu diesen Zellen deckt (von dem Borne et al., 1986). Zudem findet sich das P-Antigen auf weiteren Zelltypen wie Megakaryozyten und Endothelzellen (Rouger et al., 1987), jedoch sind nur Erythropoietin-abhängig proliferierende und differenzierende Zellen voll permissiv für die B19V-Replikation (Gallinella et al., 2000).

Somit sind neben dem Vorhandensein der Rezeptoren zur Internalisierung weitere zelluläre Voraussetzungen für die erfolgreiche Replikation nötig: das Vorhandensein von S-Phase-spezifischen Transkriptionsfaktoren und eine relativ hohe Syntheserate von VP2 gegenüber NS1. In permissiven Zellen ermöglicht die Synthese von Kapsidproteinen die Bildung neuer Viruspartikel und somit eine produktive, lytische Infektion. In nicht-permissiven Zellen hingegen wird die Bildung der Strukturproteine durch eine veränderte 3'-Prozessierung der Transkripte von VP1 und VP2 verhindert, was zur Akkumulation des zytotoxischen NS1-Proteins führt, wohingegen in permissiven Zellen das Gleichgewicht der Synthese auf Seiten der Strukturproteine liegt (Abb. 3) (Liu et al., 1992).

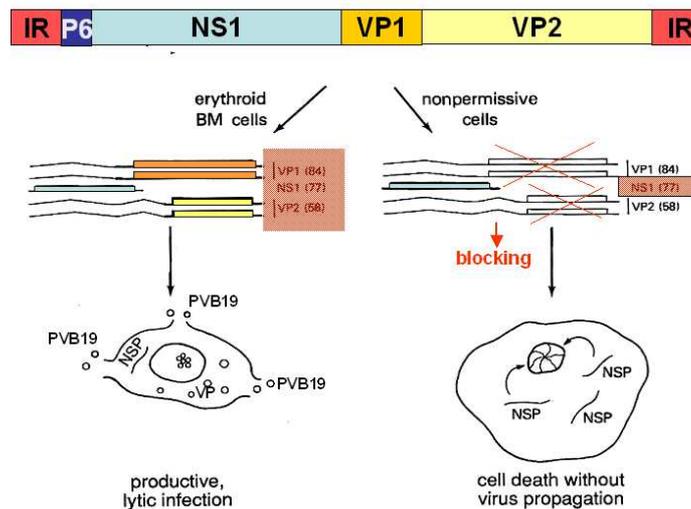


Abb. 3: Schema der B19V-Infektion in permissiven und nicht-permissiven Zellen. In permissiven Zellen liegt das Gleichgewicht der Proteinsynthese auf Seiten der Kapsidproteine. In nicht-permissiven Zellen dominiert die Synthese von NS1, wodurch es zum Zelltod kommt (Liu et al., 1992).

1.1.4 Epidemiologie

Parvovirus B19 ist ein weltweit verbreitetes und häufiges Virus. Die Prävalenz von B19V-spezifischen IgG-Antikörpern ist in den USA, Europa und Asien vergleichbar und steigt mit dem Alter. Bei 15jährigen beträgt die Seroprävalenz von IgG-Antikörpern bereits etwa 50%, bei unter 70jährigen etwa 85% (Anderson et al., 1986; Cohen and Buckley, 1988).

Die Übertragung von B19V erfolgt überwiegend über Tröpfcheninfektion und die sekundäre Ausbreitung in der häuslichen oder schulischen Umgebung ist ein häufiges Phänomen (Anderson et al., 1990; Woolf et al., 1989). Möglich ist auch die vertikale Übertragung von der Mutter auf den Fetus, die ca. bei einem Drittel aller serologisch bestätigten Primärinfektionen der Mutter auftritt. Berichtet wurde zudem über Übertragungen durch Blutprodukte, insbesondere durch Faktor VIII- und Faktor IX-Konzentrate (Azzi et al., 1999).

1.1.5 Klinische Aspekte der Parvovirus B19-Infektion

Die meisten Infektionen mit Parvovirus B19 verlaufen asymptomatisch (Woolf et al., 1989). Jedoch kann B19V, je nach Alter und immunologischem und hämatologischem Status des Patienten eine ätiopathogenetische Rolle bei

verschiedenen, zum Teil lebensbedrohlichen Krankheiten spielen. Eine Übersicht über die häufigsten durch Parvovirus B19 verursachten Krankheitsbilder gibt Tab.2.

Tab. 2: Häufige durch B19V verursachte Krankheitsbilder (modifiziert nach Young and Brown, 2004)

Krankheitsbild	Akut oder chronisch	Wirt
Erythema infectiosum	Akut	Kinder
Arthropathie	Akut oder chronisch	Erwachsene
Transiente aplastische Krise	Akut	Patienten mit erhöhter Erythropoese
Persistierende Anämie	Chronisch	Immundefiziente und immunsupprimierte Patienten
Hydrops fetalis und kongenitale Anämie	Akut oder chronisch	Feten
Myokarditis	Akut oder chronisch	Kinder und Erwachsene

1.1.5.1 Erythema infectiosum

Die häufigste Manifestation der Parvovirus B19-Infektion bei Kindern ist das Erythema infectiosum, auch als Ringelröteln oder *fifth disease* bekannt. Beim Erythema infectiosum handelt es sich um eine harmlose Kinderkrankheit, die sich durch ein girlandenförmiges Exanthem auszeichnet, das im Gesicht beginnt und sich in der Folge auf den Stamm und die Extremitäten ausbreitet.

In Experimenten von Anderson et al. konnte die intranasale Inokulation von B19V-Partikeln bei freiwilligen Probanden das Krankheitsbild auslösen und ermöglichte eine genaue Korrelation von klinischer Manifestation mit immunologischen und hämatologischen Veränderungen (s. Abb. 4) (Anderson et al., 1985).

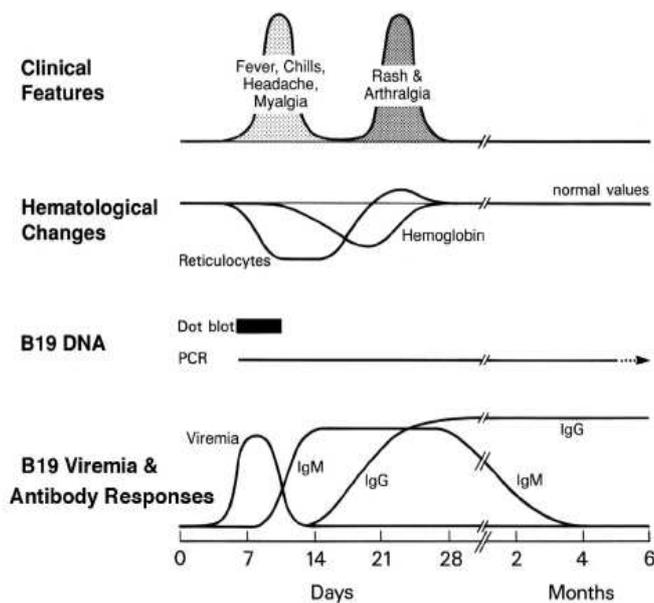


Abb. 4: Verlauf der B19-Infektion unter kontrollierten Bedingungen. Die meisten gesunden Probanden entwickelten in einem zweiphasigen Krankheitsverlauf zunächst unspezifische Symptome sowie ein Exanthem und Gelenksbeschwerden. Zeitlich korrelierte die Klinik mit dem Auftreten der Virämie und spezifischen B19V-Antikörpern. Es zeigte sich in der Regel eine Retikulozytopenie sowie ein leichter Hämoglobinabfall (Anderson et al., 1985).

1.1.5.2 Parvovirus B19-Infektionen in der Schwangerschaft

Eine Infektion mit B19V während der Schwangerschaft, gefolgt von einer transplazentaren Übertragung auf den Feten kann zum Abort oder Hydrops fetalis führen (Brown et al., 1984; Levy et al., 1997). B19V infiziert die fetale Leber, welche den Ort der Erythrozytenproduktion in der frühen Entwicklung darstellt. Das generalisierte Ödem beim Hydrops fetalis ist auf die schwere fetale Anämie und vermutlich auch auf die Myokarditis zurückzuführen, welche wiederum beide zur Herzinsuffizienz beitragen (Morey et al., 1992). Im Falle einer Infektion des Feten ist die Wahrscheinlichkeit, einen Hydrops fetalis zu entwickeln, im Zeitraum der 11.-23. Schwangerschaftswoche am größten, was mit dem hepatischen Zeitabschnitt der Erythropoese zusammenfällt (Yaegashi et al., 1998). Das Risiko einer transplazentaren Übertragung insgesamt bei erstinfizierten Schwangeren wird in der Literatur mit ca. 30% angegeben, bei einer Spontanabortrate von 5-9% (Miller et al., 1998; Rodis et al., 1990). Desweiteren existieren Fallberichte, die nahelegen, dass eine intrauterine

B19V-Infektion mit schwerer kongenitaler Anämie einhergehen kann (Brown et al., 1994a).

1.1.5.3 Arthropathie und Arthritis

Bei Erwachsenen, insbesondere bei Frauen mittleren Alters, kann die Infektion mit Parvovirus B19 Arthralgien und Arthritiden hervorrufen (Moore, 2000; Naides, 1998). Das symmetrische Befallsmuster, das insbesondere die Handgelenke mit einschließt, kann die Klinik einer Rheumatoiden Arthritis imitieren; zudem lässt sich nicht selten ein Rheumafaktor nachweisen. Jedoch ist die B19V-assoziierte Arthropathie durch ihren selbstlimitierenden, gutartigen Verlauf und das Fehlen von Gelenkdestruktionen charakterisiert. Eine ätiopathogenetische Rolle in der Entwicklung einer Rheumatoiden Arthritis scheint Parvovirus B19 nicht zu spielen, da die Seroprävalenz und das Vorhandensein von Virus-DNA in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis nicht höher ist als in Kontrollgruppen (Nikkari et al., 1994).

1.1.5.4 Transiente aplastische Krise

Eine Infektion mit B19V löst in der Regel vorübergehend einen deutlichen Rückgang der Retikulozytenzahlen aus. Bei Patienten mit einer normalen Lebensdauer der Erythrozyten bleibt der Hämoglobingehalt dabei meist stabil. Liegt jedoch ein erhöhter Bedarf an der Neubildung von Erythrozyten vor, wie es z.B. bei Patienten mit chronischer Hämolyse der Fall ist, kann durch B19V eine vorübergehende Anämie verursacht werden (Saarinen et al., 1986). Üblicherweise tritt eine transiente aplastische Krise im Leben eines Patienten nur einmal auf, was die Induktion einer lebenslangen Immunität vermuten lässt. Trotz des selbstlimitierenden Verlaufs dieses Krankheitsbildes kann die Anämie lebensbedrohliche Ausmaße annehmen und mit schweren Komplikationen wie Herzinsuffizienz, zerebrovaskulären Ereignissen und Sequestration der Milz einhergehen (Smith-Whitley et al., 2004).

1.1.5.5 Persistierende Anämie

Bei immundefizienten Patienten kann Parvovirus B19 aufgrund des Versagens des humoralen Immunsystems eine persistierende Infektion etablieren und dadurch eine chronische Anämie verursachen. Die zur persistierenden B19V-Infektion führende Immundefizienz kann sowohl durch hereditäre Immundefekte (z.B. Nezelof-Syndrom), Chemotherapie oder immunsupprimierende Medikamente als auch durch AIDS bedingt sein (Frickhofen et al., 1990; Heegaard and Schmiegelow, 2002; Kurtzman et al., 1989).

1.1.5.6 B19V - assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie

Nach der WHO-Klassifikation gehört die inflammatorische Kardiomyopathie (iCMP) zu den spezifischen Kardiomyopathien und bezeichnet eine Myokarditis, die mit einer kardialen Dysfunktion einhergeht. Dabei kann die iCMP eine Rolle bei der Pathogenese einer dilatativen Kardiomyopathie oder anderer Kardiomyopathieformen spielen (Richardson et al., 1996). Infektionen mit kardiotropen Viren wurden als Hauptursache entzündlicher Erkrankungen des Herzmuskels identifiziert. Seltener Ursachen einer akuten oder chronischen Myokarditis sind Infektionen mit Bakterien oder Pilzen sowie kardiotoxische Substanzen, Hypersensitivitätsreaktionen oder verschiedene Systemerkrankungen. Die klinische Präsentation der Erkrankung ist sehr variabel. Primäre Symptome können Angina pectoris-ähnliche Schmerzen, Herzrhythmusstörungen, Tachykardie, Abgeschlagenheit sowie die Zeichen einer Herzinsuffizienz sein. In den meisten Fällen verläuft eine virale Myokarditis selbstlimitierend und heilt folgenlos aus. Jedoch kann es auch zu fulminanten Verläufen mit akutem Versagen der linksventrikulären Funktion oder zur chronischen Entzündungsreaktion mit konsekutiver interstitieller Remodellierung kommen (Pauschinger et al., 2009).

In den vergangenen Jahren wurde neben Enteroviren, Adenoviren und verschiedenen Herpesviren zunehmend Parvovirus B19 als kardiotroper Erreger identifiziert (Bock et al., 2005; Klingel et al., 2004). Erste konkrete Hinweise auf eine ätiopathogenetische Rolle von Parvovirus B19 bei der Entwicklung einer iCMP lieferten *in-situ*-Hybridisierungsstudien, die den

Nachweis von B19V-Genomen im Endothel kleiner intramyokardialer Arteriolen und Venolen bei Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie erbrachten (Bültmann et al., 2003; Klingel et al., 2004). Immunhistochemisch konnte eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin beobachtet werden, welche einherging mit der intravaskulären Akkumulation, Margination, Adhäsion und Penetration von T-Lymphozyten und aktivierten Makrophagen ins benachbarte Myokard (s. Abb. 5).

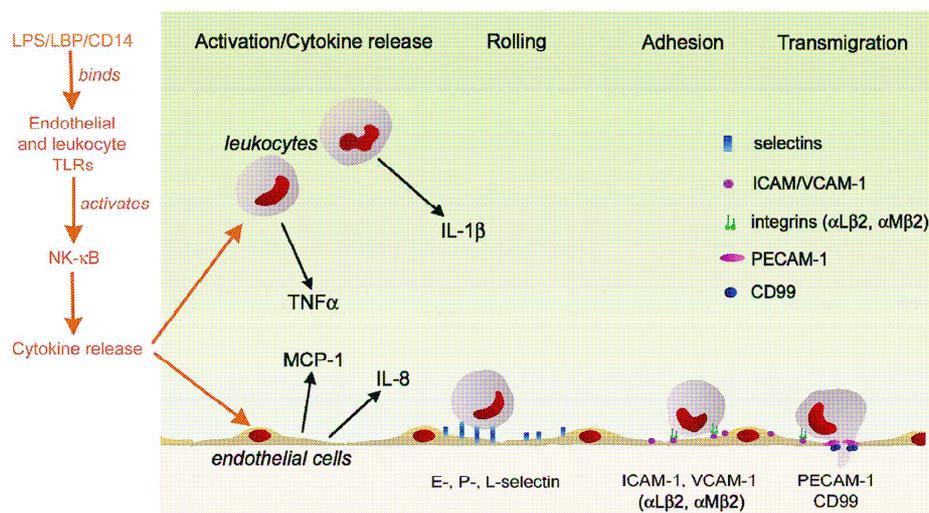


Abb. 5: Schematische Darstellung der Endothelzellaktivierung. Nach Aktivierung der Endothelzellen und Leukozyten werden pro-inflammatorische Faktoren freigesetzt. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wird gefördert und führt zur Akkumulation, Adhäsion und Transmigration der Leukozyten (Peters et al., 2003).

Da sich in den *in-situ* Hybridisierungen die Myozyten als durchweg negativ erwiesen, wird vermutet, dass die Schädigung kardialer Myozyten konsekutiv im Rahmen einer koronaren Mikrozirkulationsstörung zustande kommt (Bock et al., 2005; Kandolf, 2004). Bei einem Teil der Patienten kann diese so stark ausgeprägt sein, dass die akute Parvovirus B19-assoziierte Myokarditis mit den klinischen Symptomen eines Myokardinfarkts einhergeht (Bültmann et al., 2003; Kühl et al., 2003). Quantitative PCR-Analysen konnten bei akuter B19V-Infektion des Herzens meist eine hohe Viruslast von 10^4 bis 10^7 Genomäquivalenten pro μg isolierter Nucleinsäuren feststellen. Im Gegensatz dazu besteht bei der chronischen B19V-Infektion eine Viruspersistenz in

myokardialen Kapillaren mit relativ geringer Viruslast und einer makrophagenreichen Entzündung des benachbarten Myokards (Bock et al., 2010; Klingel et al., 2004). Pathogenetische Bedeutsamkeit bezüglich der Inflammation des Myokards kommt möglicherweise auch der hohen Expression von Zytokinen wie Interferon γ , TNF α sowie Interleukin-6 und Interleukin-8 zu (Nigro et al., 2000). Wichtig ist es festzuhalten, dass die Möglichkeit einer latenten Viruspersistenz in den Endothelzellen ohne immunhistologisch nachweisbarer Entzündungsreaktion bestehen kann. Eine ätiopathogenetisch bedeutsame Viruspersistenz festzustellen gelingt demnach nur durch das Zusammenführen histomorphologischer, klinischer und molekularbiologischer Befunde (Kühl et al., 2005).

1.1.5.7 Endotheliale und diastolische Dysfunktion

Abgesehen von akuten und chronischen Formen der Myokarditis gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der B19V-Infektion und der Ausbildung einer isolierten endothelialen und diastolischen Dysfunktion. So konnte im Rahmen einer Berliner Studie bei Patienten ohne iCMP mit ätiologisch unklarer diastolischer Dysfunktion B19V-Genom in 84% der Fälle durch Endomyokardbiopsien nachgewiesen werden (Tschöpe et al., 2005). Dabei legt die Assoziation von B19V mit der endothelialen Dysfunktion die Vermutung nahe, dass die endotheliale Dysfunktion eine pathogenetische Rolle bei der Ausbildung der diastolischen Dysfunktion spielen könnte. Die möglichen Pathomechanismen bei der Ausbildung einer diastolischen Dysfunktion sind noch nicht hinreichend geklärt. Zum einen ist das Endothel über die endotheliale NO-Synthase III (eNOS) an der Bereitstellung von Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt. NO wiederum beeinflusst die Funktion der Kalzium-ATPase SERCA und damit den diastolischen Relaxationsablauf (Paulus and Bronzwaer, 2002; Paulus et al., 1995). Zum anderen wird NO im Falle einer Entzündungsreaktion in großen Mengen durch NOS II (iNOS) gebildet (Drexler, 1999), was wiederum über die Zunahme von Sauerstoffradikalen und oxidativem Stress eine Dysfunktion der SERCA und

Apoptose sowie kardiale Remodellierungsvorgänge zur Folge haben kann (Dimmeler and Zeiher, 2000; Wollert and Drexler, 2002).

1.1.5.8 Weitere mit Parvovirus B19-assoziierte Krankheitsbilder

Fallberichte legen eine Assoziation von Parvovirus B19 mit einer Reihe weiterer Krankheitsbilder nahe, allerdings wurden diese Zusammenhänge durch kontrollierte Studien oft nicht bestätigt. Berichtet wurde über eine mögliche ätiologische Rolle von B19V bei fulminanten Hepatitiden (Langnas et al., 1995; Sokal et al., 1998), jedoch konnte in größeren Studien bei Patienten mit akuter und chronischer non-A-E-Hepatitis kein B19V-Genom nachgewiesen werden (Arista et al., 2003; He et al., 2003).

Ferner konnten B19V-DNA sowie B19V-spezifische IgG- und IgM-Antikörper bei Patienten mit nekrotisierender Vaskulitis (Finkel et al., 1994), Kawasaki-Syndrom (Nigro et al., 1994), Purpura Schönlein-Henoch (Ferguson et al., 1996) und Riesenzell-Arteriitis (Gabriel et al., 1999) nachgewiesen werden. Ob in diesen Fällen Parvovirus B19 eine kausale Rolle spielt, ist aber weitgehend unklar, da viele dieser Studien ohne Kontrollgruppe durchgeführt wurden (Young and Brown, 2004).

1.1.6 Therapie der Parvovirus B19-Infektion

Die meisten Infektionen mit B19V erfordern sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen keine spezifische Therapie. Im Falle einer transienten aplastischen Krise kann die Gabe von Erythrozytenkonzentraten notwendig sein und führt zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose (Harris, 1992). Eine B19V-Erstinfektion bei Schwangeren sollte wöchentlich durch Ultraschalluntersuchungen überwacht werden, um das Auftreten eines Hydrops fetalis frühzeitig diagnostizieren zu können. Eine intrauterine Bluttransfusion sollte in diesem Fall in Erwägung gezogen werden, da dieses Verfahren bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt wurde (Fairley et al., 1995; Goodear et al., 1998). Immundefiziente Patienten mit B19V-assoziiierter persistierender Anämie profitieren von einer Immunglobulingabe, welche bei diesem Kollektiv einen häufig kurativen Therapieansatz darstellt (Frickhofen et al., 1990; Kurtzman et al., 1989). Jedoch ist der Nutzen von Immunglobulinen bei B19V-assoziierten

Krankheiten, die nicht mit einer Virämie einhergehen, nicht eindeutig belegt (Young and Brown, 2004). Eine kausale Therapie der B19V-assoziierten inflammatorischen Kardiomyopathie existiert bislang nicht. Die Evaluation eines neuen antiviralen gentherapeutischen Ansatzes mittels *short hairpin RNA* im Zellkulturmodell ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.2 RNA-Interferenz

Als RNA-Interferenz (RNAi) wird die sequenzspezifische, post-transkriptionale Degradierung von mRNA durch doppelstrang-RNA (dsRNA) bezeichnet. Dieses Phänomen des *Gene Silencing* ist in einer Vielzahl von Organismen konserviert, unter anderem auch bei Säugetieren (Hannon, 2002). Am besten untersuchte Triggermoleküle der RNA-Interferenz sind die *small interfering RNAs* (siRNAs) und die *micro RNAs* (miRNAs). In den letzten Jahren konnten zahlreiche Arbeiten den potentiellen therapeutischen Nutzen der RNAi bei verschiedenen Erkrankungen *in vitro* und *in vivo* hervorheben, insbesondere bei Virusinfektionen, Malignomen sowie verschiedenen Erbkrankheiten (Martin and Caplen, 2007).

1.2.1 Molekulare Mechanismen der RNA-Interferenz

Seit der Entdeckung der RNAi im Jahr 1998 in *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998) wurden durch intensive Forschungen zahlreiche neue Erkenntnisse bezüglich der einzelnen Mechanismen der RNAi auf molekularer Ebene hinzugewonnen.

Initiiert wird das RNAi-vermittelte therapeutische *Gene Silencing* durch die Einführung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in die Zelle. Dort wird die dsRNA von einem dsRNA-bindenden Protein (*RNAi Defective family member-4* (RDE-4)) erkannt und von diesem gebunden (Grishok et al., 2000; Tabara et al., 2002). Diese Bindung ermöglicht die Rekrutierung der RNaseIII-Endonuclease (*Dicer*), welche daraufhin die dsRNA in 21-25 Basenpaare lange *small interfering RNAs* (siRNAs) spaltet (Bernstein et al., 2001). Die einzelsträngigen siRNAs werden durch eine Helikase entwunden (Nykanen et al., 2001) und in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut. Der RISC ist ein aus

RNA und Proteinen bestehender Komplex und für die spezifische Spaltung von mRNA verantwortlich, wobei der siRNA-Anteil des RISC der sequenzspezifischen Erkennung von komplementären Transkripten dient (Hammond et al., 2000). Im Gegensatz zur dsRNA umgehen in die Zelle eingebrachte synthetische siRNAs (21-30 bp) den Schritt der Spaltung durch den Dicer und werden nach Entwindung durch die Helikase direkt in den RISC inkorporiert (s. Abb. 6) (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001).

Durch umfangreiche Sequenzierungsanalysen wurden neuerdings auch siRNAs endogenen Ursprungs entdeckt (esiRNAs). Die esiRNAs sind in der Zelle für den Erhalt der genomischen Integrität verantwortlich, indem sie die Transkription unerwünschter Regionen im Genom (Retrotransposons, *repeat sequences*) stilllegen (Tam et al., 2008; Watanabe et al., 2008).

Eine weitere Klasse kleiner RNAs endogenen Ursprungs sind die miRNAs. Diese spielen eine fundamentale Rolle in der Regulation der Genexpression (Hatfield and Ruohola-Baker, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass miRNAs in verschiedene biologische Schlüsselprozesse wie Zelldifferenzierung, Apoptose und Proliferation involviert sind (Bartel, 2004; Harfe, 2005). Darüber hinaus scheinen Abweichungen von der normalen miRNA-Aktivität bei einer Vielzahl von Krankheiten wie Malignomen, metabolischen Erkrankungen und Infektionen pathogenetisch von Bedeutung zu sein. Demnach besteht großes Interesse an der Entwicklung von Therapieansätzen zur spezifischen Inhibition der miRNA-Funktion (Esau and Monia, 2007).

1.2.2 Möglichkeiten der Induktion von RNAi

Die Einführung von exogener, langer Doppelstrang-RNA zur Induktion der RNAi stellt ein Problem dar, da dsRNA ab einer Länge von 30 Nukleotiden über die Aktivierung einer dsRNA-abhängigen Proteinkinase eine Typ-1-Interferon-Antwort hervorruft. Dies führt zur allgemeinen Blockade der Translation und zur Apoptose (Gil and Esteban, 2000). Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, bietet die Transfektion der Zellen mit synthetischer siRNA, welche die Dicer-Produkte imitieren und direkt in den RISC eingebaut werden. Dieses Verfahren wird häufig angewandt, um die Funktion eines Gens zu untersuchen.

Der Nachteil hierbei ist die zeitlich begrenzte Gene Silencing-Aktivität der siRNA, je nach Effizienz der Transfektion hält die Geninaktivierung lediglich für 24-96 h an (Hannon, 2002; Martin and Caplen, 2007).

Um eine über einen längeren Zeitraum wirksame Geninaktivierung hervorzurufen, können *short hairpin RNA* (shRNA)-exprimierende Vektoren eingesetzt werden. Bei shRNAs handelt es sich um einzelsträngige RNA-Moleküle, die Haarnadelstrukturen ausbilden und vom zelleigenen RNAi-Apparat zu siRNA prozessiert und in den RISC eingebaut werden. Die stabile Expression der shRNA wird z.B. durch RNA Polymerase III (Pol III)-abhängige Promotoren wie U6 und H1 über einen längeren Zeitraum gewährleistet (Brummelkamp et al., 2002; Paddison et al., 2002; Sui et al., 2002).

Zur Freisetzung von siRNA wurden bereits verschiedene virale und nicht-virale Vektorsysteme entwickelt. Nicht-virale Vektoren haben den Vorteil der geringen Toxizität und Immunantwort und können leicht synthetisiert werden (Zhang et al., 2007). Der Vorteil von viralen Vektoren wie z.B. Typ 5-Adenoviren besteht insbesondere in einer hohen Effizienz der Transduktion *in vitro* (Pushparaj et al., 2008).

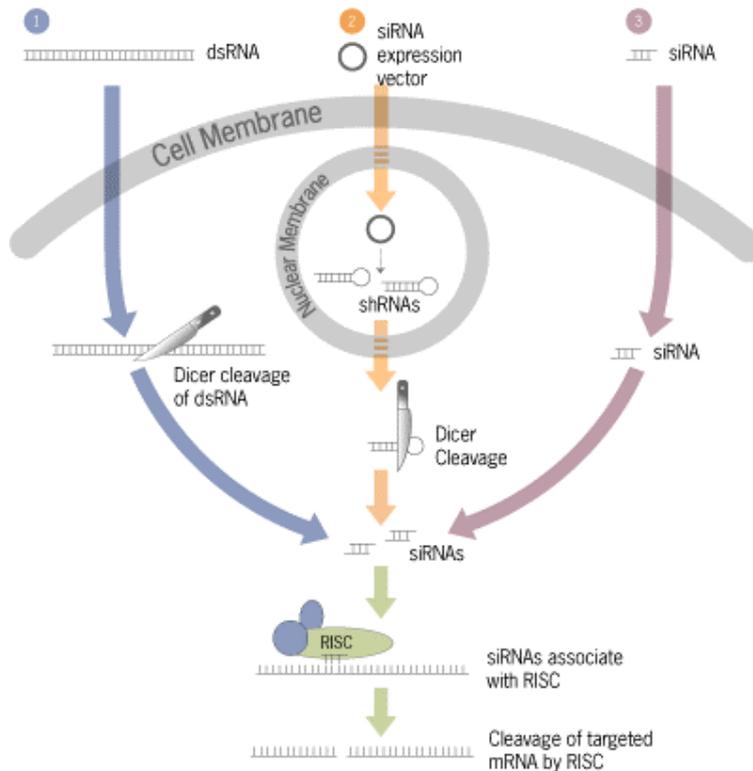


Abb. 6: Mechanismen der RNA-Interferenz. Der Weg der RNAi umfasst die Einführung einer langen dsRNA (1), oder *short hairpin RNA*-exprimierenden Vektoren (2). Die dsRNA oder shRNA wird anschließend zu 21-25-bp kleinen *small interfering RNAs* (siRNA) weiterverarbeitet. Die siRNAs werden durch eine Helikase entwunden, bevor sie in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut werden. Im RISC dienen sie der sequenzspezifischen Erkennung von komplementärer mRNA, während eine im RISC enthaltene Endonuklease für die Spaltung der mRNA verantwortlich ist. Eine weitere Möglichkeit zur Induktion der RNAi sind synthetische siRNAs (3). Nach Transfektion werden diese direkt durch die Helikase entwunden und in den RISC inkorporiert (modifiziert nach Pushparaj et al., 2008).

1.2.3 Unerwünschte Nebeneffekte der RNAi

Unerwünschten Nebeneffekten der RNAi (*off-target*-Effekte) liegen verschiedene Mechanismen zugrunde, die sowohl sequenzabhängig als auch sequenzunabhängig auftreten können. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über möglicherweise auftretende unerwünschte Nebeneffekte und Möglichkeiten, deren Auftreten zu minimieren.

Tab. 3: Unerwünschte Nebeneffekte der RNAi und Ansätze zu deren Minimierung (Martin and Caplen, 2007).

Nebeneffekt	Typ	Möglichkeiten der Minimierung
Sättigung des endogenen RNAi-Apparats	Sequenzunabhängig	Möglichst geringe Effektor-Konzentration einsetzen
		Kontroll-Effektoren zum Vergleich einsetzen
Immunantwort	Sequenzunabhängig	Möglichst geringe Effektor-Konzentration einsetzen
Immunantwort	Sequenzabhängig	Bekannte stimulierende Bindungsmotive vermeiden
		Chemisch modifizierte Effektoren verwenden
		Mehrere Effektoren zur Bestätigung der Spezifität einsetzen
Silencing von off-target-mRNA durch partielle Komplementarität	Sequenzabhängig	Möglichst geringe Effektor-Konzentration einsetzen
		Mehrere Effektoren zur Bestätigung der Spezifität einsetzen

1.2.3.1 Sequenzunabhängige Nebeneffekte

Nebeneffekte unspezifischer Art ergeben sich zum einen aus der Inhibition von endogener miRNA-Aktivität. Dies scheint durch die Sättigung von Exportin 5 vermittelt zu sein, eine Komponente des RNAi-Weges, die für den Export der pre-miRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma verantwortlich ist (Grimm et al., 2006; Yi et al., 2005). Zum anderen wurde kürzlich gezeigt, dass auch kleine siRNA-Moleküle sowie shRNAs unabhängig von ihrer Sequenz in der Lage sind, eine Interferonantwort hervorzurufen (Bridge et al., 2003; Kariko et al., 2004; Sledz et al., 2003). Dieser Effekt ist abhängig von der Größe der verwendeten Oligonukleotide, wobei der Schwellenwert zur Induktion einer Interferonantwort zusätzlich von der verwendeten Zelllinie abhängig ist (Reynolds et al., 2006).

Aus diesen Erkenntnissen zu sequenzunabhängigen Nebeneffekten ergeben sich Konsequenzen bezüglich des Designs von RNAi-Experimenten. Wichtig ist, dass die Konzentration der RNAi-Effektormoleküle bzw. die Dosis der Vektoren so niedrig wie möglich gehalten wird. Für eine korrekte Interpretation der Ergebnisse ist zudem der Einsatz von siRNA- oder shRNA-Kontrollen nötig. Um die Aktivierung einer Interferonantwort zu verhindern, wurden in der Literatur

chemische Modifikationen beschrieben (Martin and Caplen, 2007; Puthenveetil et al., 2006).

1.2.3.2 Sequenzabhängige Nebeneffekte

Insbesondere Nukleotide mit hohem GU-Anteil können auch sequenzabhängig eine Immunantwort hervorrufen. Die GU-reichen Sequenzen werden in diesem Fall vermutlich durch Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt, was mit einer erhöhten Expression von Interferon- α , Interleukin-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) einhergeht (Judge et al., 2005). Es wird jedoch angenommen, dass dieser Effekt *in vitro* keine große Rolle spielt, da nur Zellen des Immunsystems die entsprechenden TLRs exprimieren. Bei der *in vivo*-Applikation muss dieses Phänomen allerdings in Betracht gezogen werden (Martin and Caplen, 2007).

Die Hauptursache sequenzabhängiger Nebeneffekte stellen Interaktionen zwischen RNAi-Effektormolekülen und (off-target) mRNA mit partieller Komplementarität dar. Die off-target-Transkripte weisen dabei häufig in ihrer 3'UTR-Region komplementäre Sequenzen zu den 5'-Enden der RNAi-Effektormoleküle auf (Birmingham et al., 2006; Jackson et al., 2006). Inwieweit dieser Effekt konzentrationsabhängig ist, wird derzeit noch diskutiert. In einigen Arbeiten wird dieser Effekt als nicht konzentrationsabhängig beschrieben und trat auch bei geringer siRNA-Konzentration in gleichem Maße auf wie das Silencing des Zielgens (Jackson et al., 2003). (Semizarov et al., 2003)) beschrieben eine Konzentrationsabhängigkeit des Effekts und konnten durch eine Verminderung der siRNA-Dosis die Nebeneffekte im Vergleich zum Haupteffekt signifikant vermindern. Zur Verhinderung dieser sequenzabhängigen Nebeneffekte kann neben der Verminderung der Dosis auch ein stringentes Design der siRNA bzw. shRNA beitragen. So sollten z.B. bekannte, die Interferonsynthese stimulierende Sequenzen vermieden werden (Birmingham et al., 2006).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Kürzlich veröffentlichte Arbeiten konnten belegen, dass Parvovirus B19 durch eine Infektion intramyokardialer Endothelien mit akuter und chronischer kardialer Dysfunktion sowie einer inflammatorischen Kardiomyopathie assoziiert sein kann. Eine spezifische Therapie der B19V-assoziierten iCMP existiert bislang nicht. Das posttranskriptionale *Gene Silencing* mittels shRNA wurde bereits mehrfach als hocheffektiv bei der Inhibition von Virusinfektionen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben.

In dieser Arbeit soll der Effekt adenoviral transduzierter shRNA-Konstrukte auf die B19V-Infektion untersucht werden. Dazu werden UT-7/Epo-Zellen mit shRNA, welche gegen das B19V-Hauptkapsidprotein VP2 gerichtet ist, transduziert. Im Anschluß sollte die virale Replikation anhand quantitativer Analysen der Expression der B19V-Proteine VP2 und NS1 untersucht werden. Die Ergebnisse sollen eine grundlegende Evaluation dieses gentherapeutischen Ansatzes der Parvovirus B19-Infektion ermöglichen und Ausgangspunkt für weitere *in vitro*- und *in vivo*-Studien darstellen, mit dem Ziel, innovative Therapieoptionen der B19V-assoziierten inflammatorischen Kardiomyopathie aufzuzeigen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Puffer und Lösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von den Firmen Sigma Aldrich, Roth und VWR (Merck) International bezogen. Alle Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser (Millipore) angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert (0,22 µm Filtermembran).

2.1.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

10 x PBS

NaCl	80 g/l
KCl	2 g/l
Na ₂ HPO ₄	11,5 g/l
KH ₂ PO ₄	2 g/l
pH 7,4 wurde mit HCl eingestellt; vor Gebrauch auf 1 x verdünnt	

10 x TBS

Tris	10 mM
NaCl	90 g/l
pH 7,6 wurde mit HCl eingestellt; vor Gebrauch auf 1 x verdünnt	

2.1.2 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot

Trenngelpuffer

Tris	3 M
pH 8,9 wurde mit HCl eingestellt	

Sammelgelpuffer

Tris	470 mM
pH 6,7 wurde mit HCl eingestellt	

Tab. 4: Pipettierschema für 12,5%iges SDS-PAGE-Trenngel

Trenngel	12,5 %
dH ₂ O	4,75 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml
10 % SDS	150 µl
Acrylamid (37,5 : 1; 30 %)	6,25 ml
10 % APS	130 µl
TEMED	13 µl

Tab. 5: Pipettierschema für das SDS-PAGE-Sammelgel

Sammelgel	4 %
dH ₂ O	6 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
Acrylamid (37,5 : 1; 30 %)	1,3 ml
10 % APS	100 µl
TEMED	15 µl

10 x Elektrophorese-Puffer (SDS-PAGE)

Tris	250 mM
Glycin	2 M
vor Gebrauch auf 1 x verdünnt und 0,1 % (v/v) SDS zugeben.	

Transferpuffer

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
pH 8,3 wird mit HCl eingestellt	
SDS	0,037 % (v/v)
Methanol	20 % (v/v)

„Complete-Cell Lysis Buffer”(C-CLB)

Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Triton-X100	1 % (v/v)
Natriumorthovanadat	1 mM
Natriummolybdat	0,1 mM
DTT	1 mM
β-Glycerophosphat	10 mM
Natriumfluorid	10 mM
eine halbe Tablette Complete Mini EDTA-free protease inhibitor (Roche) wurde im Gemisch gelöst, Lagerung bei 4°C.	

4 x Lämmli-Probenpuffer

Tris	250 mM
SDS	8 % (v/v)
Glycerin	40 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,008 % (v/v)
pH 6,8 wurde mit HCl eingestellt, Lagerung bei -20°C	

“Stripping-Buffer”

Glycin	200 mM
Tween 20	0,05 % (v/v)
pH 2,0 wurde mit HCl eingestellt, Lagerung bei 4°C.	

Tab. 6: Pipettierschema für die *Enhanced Chemiluminescence* Lösungen (ECL)

ECL 1		ECL 2
17,7 ml	dH ₂ O	18 ml
2 ml	1 M Tris-HCl (pH 8,5)	2 ml
200 µl (2,75 mM)	Luminol	-
88 µl (0,43 mM)	Cumarinsäure	-
-	H ₂ O ₂ (30%)	12 µl
lichtgeschützte Lagerung bei 4°C, vor Gebrauch wurden die beiden Lösungen im Verhältnis 1:1 vermischt		

2.1.3 Medien für die Zellkultur

Lösung für die Zell-Kryokonservierung

FKS (Fetales Kälberserum)	900 µl
DMSO (Dimethylsulfoxid)	100 µl

2.2 Kits

Die Anwendung und Lagerung der Kits erfolgte soweit nicht anders angegeben nach Herstellerangaben.

Bezeichnung des Kits

Hersteller

Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
NucleoSpin RNA II	Macherey Nagel
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

<u>Bezeichnung des Antikörpers</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
PVB19-VP	Kaninchen	1:700	DAKO
GAPDH-HRP	Ziege	1:200	Santa Cruz

2.3.2 Sekundärer Antikörper

<u>Bezeichnung des Antikörpers</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:3000	DIANOVA
Anti-Ziege-HRP	Esel	1:2000	DIANOVA

2.4 Protein-Standard

<u>Bezeichnung des Standards</u>	<u>Hersteller</u>
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas

2.5 Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Nunc, Kimberley Clark, Neolab, Feather, Greiner, Sarstedt, Eppendorf, Biomol und Millipore erworben.

2.6 Laborgeräte

<u>Bezeichnung des Geräts</u>	<u>Hersteller</u>
Brutschrank	Heraeus
Durchflusszytometer (FACS)	Becton Dickinson
Elektrophoresekammer „Mini Protean II“	Bio-Rad
Expositionskassetten	Dr. Goos-Suprema
Feinwaage MC1	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop Axio Vision CD 19	Carl Zeiss
Glasküvetten	Bio-Rad
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop IMT-2 Phasenkontrast KLWCD 0:30	Olympus
Neubauer-Zählkammer	Brand
PCR-Gerät „TGradient Thermocycler“	Biometra
Photometer „SmartSpec 3000“	Bio-Rad
pH-Meter pH 525	WTW
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe Accu-Jet, Accu-JetPro	Neolab
Real-time PCR-Gerät TaqMan®	Applied Biosystems
Schüttelinkubator „innova 4000“	New Brunswick
Schütteltisch „Rocky“	Fröbel
SemiDry Blotter „Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“	Bio-Rad
Spannungsquelle „Electrophoresis Power Supply EPS200“	Pharmacia Biotech
Spannungsquelle „PowerPac 300“	Bio-Rad
Sterilwerkbänke „LaminAir HB2448“	Heraeus
Taumel-Inkubator	Neolab

Thermomixer	Eppendorf
Vortex VF2	Janke & Kunckel
Waage „Sartorius Basic“	Sartorius
Wasserbad	GFL
Zellbrutschrank „Typ 6000“	Heraeus

Verwendete Zentrifugen

Eppendorf 5417C	Eppendorf
Minifuge	Neolab
Sorvall RT 6000D, Rotor: H1000B	Sorvall
Sorvall MC 12V, Rotor: R-12/M.18	Sorvall
Sorvall RC-5B, Rotor: GSA	Sorvall
Heraeus Multifuge 1S-R	Heraeus

2.7 Oligonukleotide

Alle hier verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland synthetisiert und bezogen.

Tab. 7: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
ATP-S-6-FP	5'-cag tga tta tag gct ttc gct cta a-3'	Taqman Primer
ATP-S-6-RP	5'-cag ggc tat tgg ttg aat gag ta-3'	Taqman Primer
ATP-S-6-Probe	FAM 5'-agc cca cct ctt acc aca agg cac a-3' TAMRA	Taqman Probe
VP2-FP	5'-tgg ccc att ttc aag gaa gt-3'	Taqman Primer
VP2-RP	5'-ctg aag tca tgc ttg ggt att ttt c-3'	Taqman Primer
VP2-Probe	FAM 5'-ccg gaa gtt ccc gct tac aac-3' TAMRA	Taqman Probe
NS1-FP	5'-tcc ctg gaa tta atg cag atg c-3'	Taqman Primer
NS1-RP	5'-cac tgc tgc tga tac tgg tgt ct-3'	Taqman Primer
NS1-Probe	FAM 5'-acc tcc aaa cca ccc caa ttg tca ca-3' TAMRA	Taqman Probe

2.8 Aufreinigung und Quantifizierung von B19V-Partikeln

2.8.1 Aufreinigung von B19V-Partikeln aus Patientenserum

Zunächst wurden zur Herstellung eines 20%igen Sucrosekissens 20 g Sucrose in 100 ml 1x PBS gelöst und sterilfiltriert. Von der Sucroslösung wurde 1 ml in ein Zentrifugationsröhrchen (Servall) pipettiert. Nach Verdünnung des hochtitrigen B19V-Patientensersums (10^{11} Kopien/ml, Blutbank Frankfurt) mit 500 μ l PBS wurde dieses auf das Sucrosekissen geschichtet und das Zentrifugationsröhrchen mit PBS aufgefüllt, um ein Kollabieren der Röhrchen in der Ultrazentrifuge zu verhindern. Die Zentrifugation erfolgte für 90 min bei 100.000 g. Anschließend wurden Serum und Zuckerlösung abpipettiert und das Pellet in 1 ml PBS aufgelöst. Die PBS-Viren-Lösung wurde in einen Dialyseschlauch transferiert und über Nacht bei 4 °C in 2 l PBS auf dem Magnetrührer inkubiert.

2.8.2 Bestimmung des Virustiters

Zur anschließenden Bestimmung des Virustiters erfolgte eine absolute Quantifizierung der Kopienzahlen mittels *real-time* quantitativer PCR im TaqMan®-System (Applied Biosystems). Verwendet wurden VP2-spezifische Primer (Kap 2.7). Die Proben wurden in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 mit dem TaqMan® Universal PCR Master Mix eingesetzt und auf einen mitgeführten Standard (0,01 pg-100 pg) bezogen. Hierbei handelte es sich um ein VP2-enthaltendes Plasmid. Der Virustiter wurde errechnet, indem jede der einzelnen Verdünnungen auf den Standard bezogen wurde und aus diesen Werten das arithmetische Mittel gebildet wurde. Die Lagerung der Viruslösung erfolgte bei -20°C.

Tab. 8: PCR-Programm zur Bestimmung des B19V-Titers

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	10 min	einmalig bei Start
95°C	15 sec	45 Zyklen
60°C	1 min	

2.9 shRNA und adenovirale Vektoren

Die adenoviralen Vektoren wurden zur Transduktion der Zellen mit VP2-spezifischen bzw. Kontroll-shRNA-Konstrukten verwendet. Der Vektor

Ad5CMV-GFP wurde verwendet, um die Zellen mit dem Reporter-gen für das *green fluorescent protein* (grün fluoreszierendes Protein, GFP) zu transduzieren (Kap. 2.8). Alle verwendeten Adenoviren (Genotyp 5) wurden freundlicherweise von Dr. Henry Fechner, Campus Benjamin Franklin, Abteilung Kardiologie und Pulmologie, Berlin, zur Verfügung gestellt. Die adenoviralen Vektoren waren aufgrund einer Deletion im E1- und E3-Gen replikationsdefizient.

Die VP2-spezifische shRNA wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jens Kurreck, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart, generiert und getestet. Es wurden drei verschiedene VP2-spezifische shRNAs generiert und hinsichtlich Spezifität und Effektivität in Co-Transfektionsexperimenten getestet. Hierzu wurde ein Plasmid, welches ein EGFP-B19V-VP2-Fusionsprodukt exprimiert, entwickelt und in HMEC-1-Zellen (Kap. 2.10.1) eingebracht. Parallel dazu erfolgte die Transfektion mit den verschiedenen shRNA-exprimierenden Plasmiden. Im Fluoreszenzmikroskop konnte anschließend die je nach Wirksamkeit der shRNA unterschiedlich ausgeprägte Reduktion der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dabei stellte sich ein Konstrukt als hocheffektiv heraus (s. Tab. 9), welches dann zur Herstellung des Vektors Ad5shVP2 verwendet wurde. Die Silencing-Aktivität dieses Vektors wurde anschließend mittels semi-quantitativer RT-PCR und Western-Blot bestätigt. Die hier beschriebene Entwicklung und Evaluierung der shRNAs sowie des Vektors Ad5shVP2 entstand in Kooperation mit Dr. Henry Fechner und Prof. Dr. Jens Kurreck. Die im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Experimente werden im Ergebnisteil ausführlich dargestellt (Kap. 3.1).

Die Kontroll-shRNA (shCAR_{2m}) war hochspezifisch für die mRNA des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors der Maus (Fechner et al., 2007). Im verwendeten Zellkulturmodell mit humanen UT-7/Epo-Zellen konnte diese shRNA als „nonsense“-shRNA ohne zu erwartende spezifische Wirkungen angesehen werden und eignete sich somit gut als Negativkontrolle.

Nach Einklonierung der jeweiligen shRNA-Konstrukte (shCAR_{2m} und shVP2) in das Basisplasmid über BamHI/HindIII (Abb. 7) wurden die viralen Vektoren durch Ligation der Plasmide über eine singuläre XbaI-Schnittstelle in RR5 und SpeI in den Plasmiden hergestellt.

Tab. 9: Sequenzen der Klonierungsoligonukleotide von shVP2. Beim Annealen bildeten sich eine BamHI und eine HindIII-Schnittstelle, über welche die Oligonukleotide in das Basisplasmid eingebracht wurden. Verwendet wurde eine 21mere Target-Sequenz im Virusgenom.

shVP2-Sequenzen	
Sense	5'-GAT CCC GGG AAT TAC TAC CTT AGT TCA TTC AAG AGA TGA ACT AAG GTA GTA ATT CCCTTT TTT GGA AA-3'
Antisense	5'-AGC TTT TCC AAA AAA GGG AAT TAC TAC CTT AGT TCA TCT CTT GAA TGA ACT AAG GTAGTA ATT CCC GG-3'
Zielsequenz im Virusgenom	GGG AAT TAC TAC CTT AGT TCA

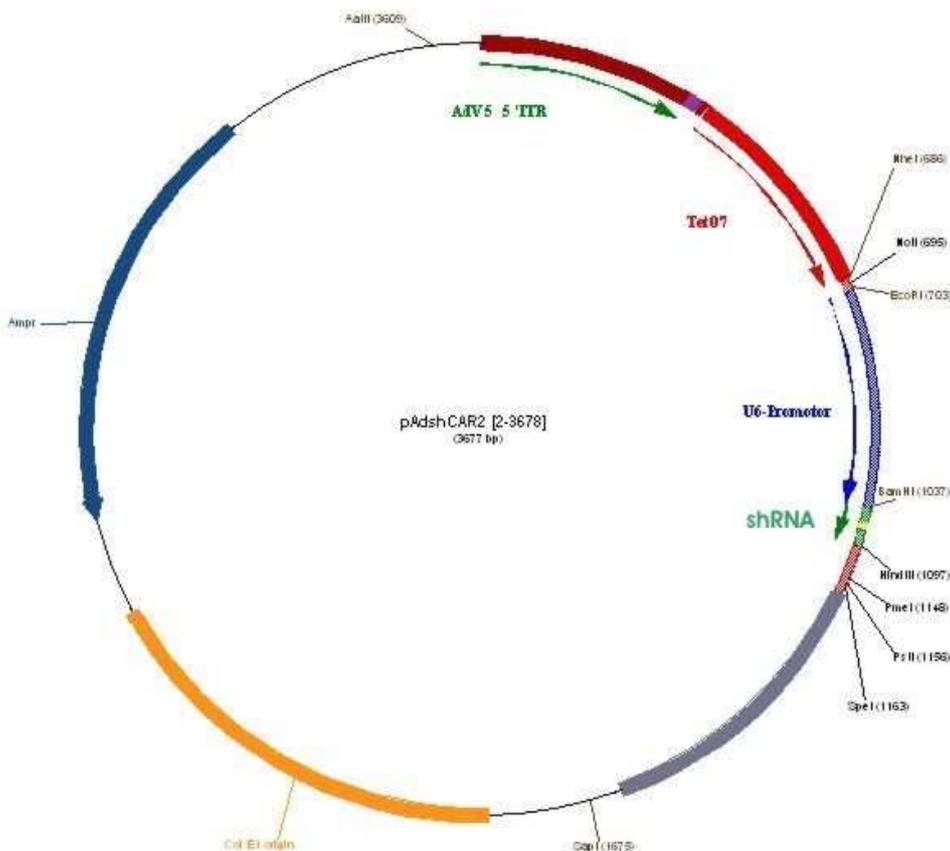


Abb. 7: Zur Konstruktion der Adenovektoren verwendetes Plasmid mit shRNA. Die shRNA-Expression wird durch einen RNA-Polymerase III-Promotor (U6) gesteuert (Quelle: Dr. Henry Fechner, Campus Benjamin Franklin, Abteilung Kardiologie und Pulmologie, Berlin).

Tab. 10 Verwendete Adenovektoren

Bezeichnung	Verwendung
Ad5CMV-GFP	Kontrolltransduktion des GFP-Reportergens zur Dosisbestimmung.
Ad5shVP2	Transduktion der VP2-shRNA
Ad5shCAR2 _m	Transduktion der Kontroll-shRNA

2.10 Zellkultur

2.10.1 Verwendete Zelllinie

UT-7/Epo	Humane Leukämiezellen mit megakaryoblastischem Phänotyp
HMEC-1	Humane Endothelzellen (Ades et al., 1992)

Für die funktionellen Experimente wurde die UT-7/Epo-Zelllinie verwendet, da diese als hoch permissiv für die Parvovirus B19-Replikation beschrieben wurde (Shimomura et al., 1992). Dabei kann die Produktion von neuen Viruspartikeln in diesen Zellen mit der B19V-Replikation in normalen Zielpopulationen wie Knochenmarks- oder fetalen Leberzellen verglichen werden. Die Besonderheit der UT-7/Epo-Zelllinie im Gegensatz zu Knochenmarks- oder Leberkulturzellen besteht darin, dass die persistierende B19V-Infektion nicht zytotoxisch für diese Zellen ist. Voraussetzung für die erfolgreiche Replikation in UT-7/Epo-Zellen ist, dass das Zellwachstum unter der Stimulation von humanem Erythropoietin stattfindet.

2.10.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Kultivierung der UT-7/Epo-Zelllinie erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Als Nährmedium für UT-7/Epo-Zellen wurde RPMI-Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin und 2 Units rekombinantem humanem Erythropoietin (hEpo, Roche) versetzt. Alle 3-5 Tage wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 mit neuem Medium verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Bei jedem zweiten

Passagiervorgang wurden die Zellen für 4 min bei 800 U/min abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellen in neuem Medium resuspendiert.

2.10.3 Kryokonservierung der Zellen

Die Suspensionszellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen bei 900 U/min für 5 min zentrifugiert. Das vom Überstand befreite Zell-Pellet wurde in der Zell-Kryokonservierungslösung resuspendiert und nach einer zweiwöchigen Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.11 Durchflusszytometrie (FACS)

Das FACS wurde herangezogen, um die Transduzierbarkeit der UT-7/Epo-Zellen mit Adenoviren zu testen. Hierzu wurden in einem Dosisescalationsexperiment UT-7/Epo-Zellen mit dem GFP-exprimierenden Vektor Ad5CMV-GFP (s. Kap. 2.6) in steigender MOI (20, 40, 100, 200, 400) transduziert. 48h p.i. wurden die Zellen durch Abzentrifugieren geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Nach anschließender Resuspendierung in 500 μl PBS konnten jeweils 10000 Zellen im Durchflusszytometer auf die Expression von GFP überprüft werden. Zur Schwellenwertbestimmung der GFP-Expression dienten als Negativkontrolle nicht-infizierte UT-7/Epo-Zellen.

2.12 Infektion von UT-7/Epo-Zellen mit B19V-Partikeln

2×10^5 Zellen wurden in 300 μl IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2 U Epo/ml in 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach Zugabe der B19V-Lösung (Dosis= 10^4 Viruspartikel/Zelle) erfolgte die Inkubation zunächst 2 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 45 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank. Anschließend wurde das IMDM mit oben beschriebenen Zusätzen auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und die Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ fortgeführt.

2.13 RNA-Analyse mittels quantitativer *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR mittels TaqMan® wurde herangezogen, um den zeitlichen Verlauf der VP2- und NS1-mRNA-Expression nach Transduktion der mit B19V-infizierten Zellen mit VP2-spezifischer shRNA zu untersuchen.

2.13.1 Extraktion der RNA aus kultivierten Zellen

2x 10⁵ UT-7/Epo-Zellen wurden wie im Kap. 2.12 beschrieben mit einer Dosis von 10⁴-B19V-Genomkopien pro Zelle infiziert. 24 h später erfolgte die Transduktion der Zellen mit Ad5shVP2 sowie dem Kontrollvektor Ad5shCAR2_m mit einer jeweiligen MOI von 200. Bei dieser MOI war im Dosisescalationsexperiment mit dem Vektor Ad5GFP eine Transduktionsrate von 73,3% ermittelt worden. Als zweite Kontrolle dienten Zellen, die zeitgleich lediglich mit B19V infiziert wurden. Die behandelten Zellen wurden 12 h, 24 h, 48 h und 72 h nach adenoviraler Transduktion geerntet (s. Kap. 2.8). Aus dem gewonnenen Zellpellet wurde mit dem NucleoSpin RNA II–Kit die zelluläre RNA extrahiert. Dabei wurde das Herstellerprotokoll dahingehend geändert, dass der DNaseI-Verdau auf 30 min ausgedehnt wurde. Nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben bei –80 °C gelagert.

2.13.2 Quantitative *real-time* PCR

Es wurden bis zu 2 µg der extrahierten RNA mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Kap. 2.2) in cDNA umgeschrieben. Bei der anschließenden relativen Quantifizierung der VP2- und NS1-Expression wurden jeweils 2 µl der cDNA zusammen mit den entsprechenden Primern und Proben (Kap. 2.7) und dem TaqMan® Universal PCR Master Mix (Kap. 2.2) eingesetzt. Die relative Quantifizierung erfolgte durch die Normalisierung der Expression des Zielgens mit der des *Housekeeping*-Gens ATP-Synthase-6 nach der „2^{–ΔΔC_T}–Methode“ (Livak and Schmittgen, 2001). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das *Housekeeping*-Gen betreffen. In den Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf. Das Programm für die PCR erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben.

2.14 Proteinanalyse mittels Western Blot

2.14.1 Zellernte und Proteinextraktion

Zur Untersuchung der VP2-Proteinexpression wurden UT-7/Epo-Zellen wie unter 2.9 beschrieben mit B19V-Partikeln infiziert. 24 h später erfolgte die Transduktion der Zellen mit Ad5shVP2 und Ad5shCAR2_m mit einer MOI von 200. Als zweite Negativkontrolle dienten zeitgleich B19V-infizierte Zellen. 48 h nach adenoviraler Transduktion wurden die Zellen geerntet (Kap. 2.8). Das Zellpellet wurde mit 50 µl C-CLB (Kap. 2.1.2) versetzt und mit diesem für 1 h bei 4 °C inkubiert, so dass eine vollständige Lyse der Zellen stattfinden konnte. Anschließend wurden durch 3-minütige Zentrifugation bei 13000 x g und 4 °C die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand für nachfolgende Proteinanalysen herangezogen. Nach Entnahme von 1 µl des Zelllysates zur Proteinkonzentrationsbestimmung (Kap. 2.11.2) wurden 1/3 des Probevolumens 4x Lämmli-Probenpuffer hinzugegeben. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

2.14.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mit dem Bio-Rad Protein-Assay ermittelt. 1 µl Zelllysate bzw. 1 µl C-CLB (Leerwert) wurden zu einem Gemisch aus 800 µl dH₂O und 200 µl Bradford-Reagenz gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm.

2.14.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unmittelbar vor der Beladung der Gele mit 25 µg Protein pro Tasche wurden die Proteinextrakte für 3 min bei 95 °C gekocht. Vom Proteinstandard (Kap. 2.4) wurden 7 µl geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 30 min bei 35 mA und anschließend bei 55 mA bis die Bromphenolblau-Bande das Gel verlassen hat (ca. 120 min).

2.14.4 Proteintransfer mittels Western Blotting

Der Transfer der durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine von den SDS-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PA-Gele) auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen erfolgte durch Semi-Dry (Western) Blotting. Für jeden Ansatz wurde eine PVDF-Membran 10 sec in Methanol „aktiviert“ und neben dem PA-

Gel und 6 Streifen Gel Blotting Papier 5 min in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgte bei 90 mA pro Gel (entspricht ca. 1,9 mA/cm²) für 85 min bei 4°C.

2.14.5 Antikörper-vermittelte spezifische Proteindetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in 0,2% TBST (0,2% Tween 20) mit 5% Magermilch für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (VP2- oder GAPDH-spezifisch) erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelinkubator. Dazu wurde der Primärantikörper in 5% Milch verdünnt und von dieser Inkubationslösung wurden 3 ml in ein 50 ml-Falconröhrchen gegeben, in das die Membran überführt wurde.

Die Membran wurde anschließend 3 x 10 min mit 0,2% TBST (0,2% Tween 20) gewaschen und auf dem Taumelinkubator mit dem Zweitantikörper in 1% Milch in TBST für 45 min bei RT inkubiert. Abschließend erfolgten drei weitere Waschschrte mit TBST für jeweils 10 min. Durch die Benetzung der Membran mit frischer ECL1/ECL2-Lösung (Kap. 2.1.2) konnten anhand der Chemilumineszenz die spezifischen Proteinbanden durch das Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden.

2.14.6 Entfernung gebundener Antikörper („Stripping“)

Die mit Proteinen beladenen PVDF-Membranen wurden im Rahmen dieser Arbeit bis zu zwei Mal zum Protein-Nachweis herangezogen. Voraussetzung dafür war die Entfernung der primären und sekundären Antikörper durch die „Stripping“-Prozedur. Dazu wurde die Membran zunächst für 30 s in Methanol „aktiviert“ und 3 x 10 min in TBST gewaschen. Es erfolgte anschließend eine 30-minütige Inkubation im Stripping-Puffer bei 70°C im Wasserbad. Abschließend wurde die Membran erneut für 3 x 10 min in TBST gewaschen. Auf diese Weise wurde nach der Detektion der untersuchten Proteine der Nachweis von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als *housekeeping*-Protein erbracht.

2.15 Statistische Analysen

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte durch two-way ANOVA („*analysis of variance*“) mit anschließendem Bonferroni-Test unter Verwendung des Programms GraphPad Prism Version 4.03 für Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA. Die Diagramme, die durch die Mittelwerte mehrerer Versuchsreihen entstanden, wurden durch die Angabe des *Standard Error of the Mean* (SEM) ergänzt. Angegebene p-Werte beziehen sich dabei auf alle Zeitpunkte der Messungen zusammen. p-Werte <0,05 wurden dabei als statistisch signifikant, p-Werte <0,001 als statistisch hochsignifikant bewertet.

3 ERGEBNISSE

Von Parvovirus B19 konnte gezeigt werden, dass die persistierende B19V-Infektion intramyokardialer Endothelien mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie und kardialer Dysfunktion einhergehen kann (Bock et al., 2005). Eine spezifische Therapie der B19V-Infektion existiert bislang nicht.

Zur Evaluation eines neuen gentherapeutischen Ansatzes der B19V-Infektion mittels RNAi wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jens Kurreck, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart, und Dr. Henry Fechner, Campus Benjamin Franklin, Abteilung Kardiologie und Pulmologie, Berlin, 3 VP2-spezifische shRNA-Konstrukte entwickelt und in Co-Transfektionsexperimenten getestet. Das wirksamste Konstrukt wurde in einen replikationsdefizienten Adenovektor kloniert und dessen Silencing-Aktivität in VP2-transfizierten endothelialen HMEC-1-Zellen überprüft.

Daraufhin wurde der Einfluss der shRNA-exprimierenden Adenovektoren auf die Replikation von Parvovirus B19 in funktionellen Experimenten untersucht. Durchgeführt wurden die Experimente in einem *in-vitro*-Modell in UT-7/Epo-Zellen. Die UT-7/Epo-Zelllinie stammt aus dem Knochenmark eines an akuter megakaryoblastischer Leukämie erkrankten Patienten ab und wurde als hoch permissiv für die B19V-Replikation beschrieben.

In einem ersten Schritt wurde die Transduzierbarkeit von UT-7/Epo-Zellen mit Adenovektoren mit Hilfe des Reportergens GFP im FACS überprüft, um die geeignete *multiplicity of infection* (MOI) für diese Zellen zu ermitteln. Nach Behandlung von B19V-infizierten Zellen mit entsprechenden Adenovektoren erfolgte die Analyse der Expression von VP2 sowie der des nichtstrukturalen Proteins NS1 über einen Zeitraum von 12 h – 72 h auf RNA- und auf Proteinebene.

3.1 Evaluierung von drei Parvovirus B19-VP2-spezifischen shRNAs.

Um verschiedene, neu generierte, Parvovirus B19-VP2-spezifische shRNA-Konstrukte hinsichtlich Spezifität und Effektivität zu beurteilen, wurden Co-Transfektionsexperimente in HMEC-1-Zellen durchgeführt. Insgesamt wurden drei shRNA-Konstrukte eingesetzt (Kap. 2.9). HMEC-1-Zellen wurden hierfür verwendet, da diese für die Etablierung der shRNA ein adäquates System darstellen. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit einem Plasmid, welches ein EGFP-VP2-Fusionsprodukt exprimiert. Parallel dazu wurden die Zellen mit den verschiedenen shRNA-exprimierenden Plasmiden in einer Dosis von 0,4 µg und 0,8 µg transfiziert. Da die Expression von VP2 an die von EGFP gekoppelt war, konnte anhand der Reduktion der Fluoreszenz das Ausmaß der Silencing-Aktivität der einzelnen shRNA-Konstrukte im Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Zusätzlich wurde die GFP-Proteinexpression im Western Blot überprüft. Alle drei shRNA-Moleküle waren zu einem Silencing von VP2-EGFP in der Lage (Abb. 8). Es stellte sich jedoch eines der drei neu entwickelten Konstrukte (shRNA3) als besonders effektiv heraus, erkennbar an einer niedrigen Fluoreszenzrate bei einer Dosis von 0,8 µg shRNA (Abb. 8) und einer nicht detektierbaren GFP-Proteinexpression im Western Blot (Abb. 9). Folgend wurde dieses Konstrukt (shRNA3) in replikationsdefiziente Adenovektoren Ad5shVP2 einkloniert.

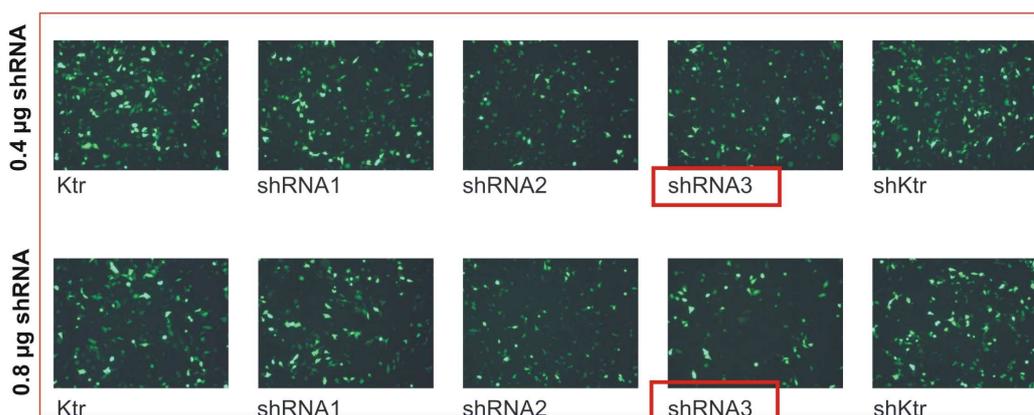


Abb. 8: Evaluation von drei verschiedenen, VP2-spezifischen shRNA-Konstrukten in der Fluoreszenzmikroskopie. HMEC-1-Zellen wurden mit einem EGFP-VP2-exprimierenden Vektor und den verschiedenen shRNA-Konstrukten transfiziert. Je nach Wirksamkeit der shRNA konnte eine unterschiedliche Reduktion der Fluoreszenz und damit auch der Silencing-Aktivität festgestellt werden. Eine hochwirksame VP2-EGFP-Inhibition zeigte insbesondere shRNA3 in einer Dosis von 0,8 µg. Daher wurde dieses Konstrukt zur Einklonierung in den Adenovektor verwendet.

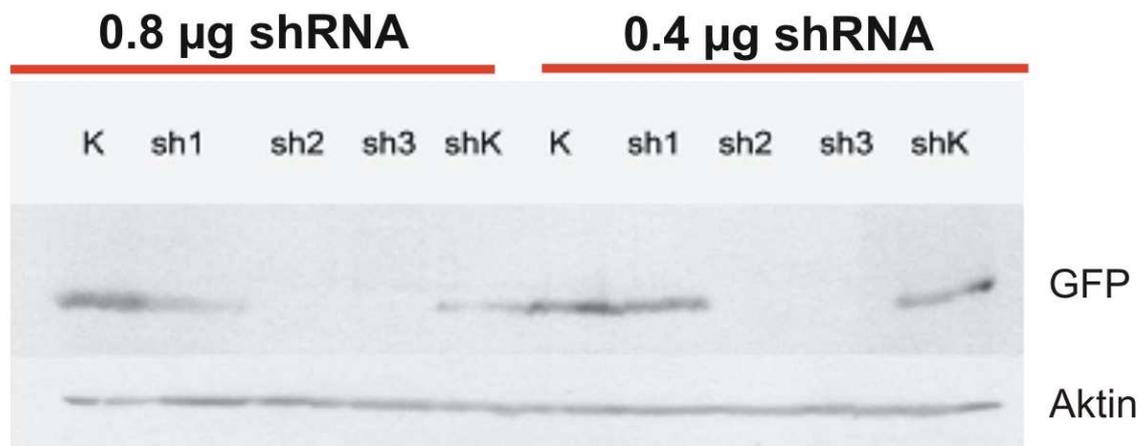


Abb. 9: Evaluation von drei verschiedenen, VP2-spezifischen shRNA-Konstrukten im Western Blot. HMEC-1-Zellen wurden mit einem EGFP-VP2-exprimierenden Vektor und den verschiedenen shRNA-Konstrukten transfiziert. Anhand der reduzierten GFP-Proteinexpression konnte die Silencing-Aktivität der shRNA-Konstrukte auf Proteinebene beurteilt werden. shRNA2 und shRNA3 stellten sich als effektiv heraus. shRNA3 wurde zur Einklonierung in den Vektor Ad5shVP2 verwendet (K = Kontrolle, shK = shRNA-Kontrollkonstrukt).

In einem weiteren Schritt wurde die Silencing-Aktivität des Ad5shVP2-Vektors in HMEC-1-Zellen überprüft. Hierzu wurden VP2-transfizierte Zellen mit dem Vektor Ad5shVP2 infiziert. Die Reduktion der VP2-mRNA wurde 24 h und 48 h post infectionem (p.i.) durch eine semi-quantitative RT-PCR analysiert. Nach 24 h konnte bereits eine verminderte Expression von VP2 im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden. Nach 48 h konnte in den mit Ad5shVP2 behandelten Zellen keine VP2-mRNA-Expression mehr nachgewiesen werden (Abb. 10).

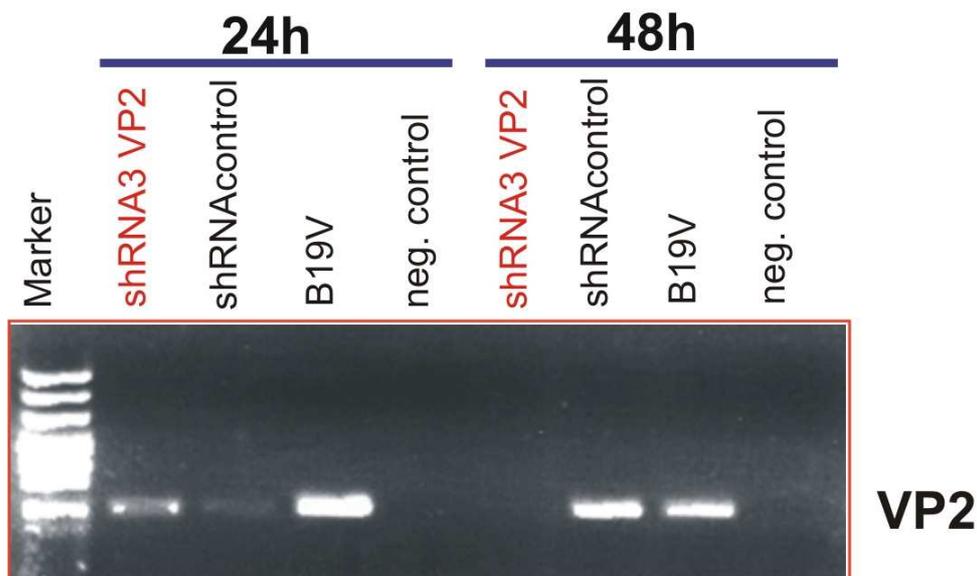


Abb. 10: Semi-quantitative RT-PCR von VP2-transfizierten und mit Ad5shVP2 transduzierten HMEC-1-Zellen. 24 h p.i. zeigte sich bereits eine verminderte VP2-mRNA-Expression. Nach 48 h war keine VP2-mRNA mehr detektierbar. Der Vektor Ad5shVP2 war demnach zu einem hocheffizienten Silencing des VP2-Gens in der Lage.

3.2 Etablierung und Optimierung der adenoviralen Transduktion von UT-7/Epo-Zellen

Um die für UT-7/Epo-Zellen geeignete *multiplicity of infection* (MOI) für die spätere shRNA-Transduktion zu ermitteln, wurde ein Dosisescalationsexperiment mit dem GFP-exprimierenden Vektor Ad5CMV-GFP (Kap. 2.7) durchgeführt. Als MOI wird das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu deren Zielzellen bezeichnet. Bei einer MOI von 1 werden genauso viele Viruspartikel eingesetzt, wie sich Zellen in der Kultur befinden. Die Zellen wurden in steigender MOI (20, 40, 100, 200, 400) infiziert und 48 h später geerntet. Im *fluorescent activated cell sorter* (FACS) konnte die GFP-Expression der Zellen gemessen werden. Von der GFP-Expressionsrate wiederum konnte auf die Transduktionsrate der Zellen geschlossen werden. Zur Kontrolle (Schwellenwertbestimmung der GFP-Detektion) wurden unbehandelte UT-7/Epo-Zellen ausgesät und geerntet. Bei keiner der eingesetzten MOIs konnten zytotoxische Effekte wie z.B. eine Reduktion des Zellwachstums im Mikroskop beobachtet werden. Die höchste Transduktionsrate von 73,3% ergab sich bei einer MOI von 200. Eine weitere Erhöhung der MOI auf 400 erbrachte

eine leichte Verringerung der Transduktionsrate auf 71,9% (Abb. 11 und Abb. 12). Demnach wurde für alle weiteren Experimente eine MOI von 200 gewählt.

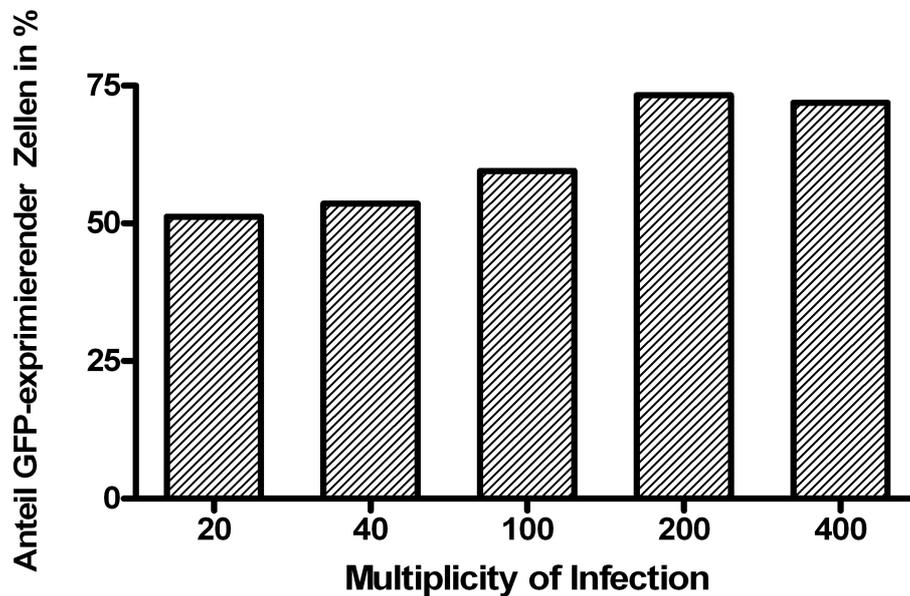


Abb. 11: Ergebnisse der FACS-Analyse von Ad5CMV-GFP-transduzierten Zellen. UT-7/Epo-Zellen wurden mit dem Vektor Ad5CMV-GFP in verschiedenen MOIs transduziert. (20, 40, 100, 200, 400), nach 48 h geerntet und anschließend im FACS auf die GFP-Expression überprüft. Von dieser konnte dann auf die Transduktionsrate der Zellen geschlossen werden. Zur Schwellenwertbestimmung dienten als Negativkontrolle nicht infizierte UT-7/Epo-Zellen. Es zeigte sich, dass bei einer MOI von 200 eine maximale Transduktionsrate von ca. 73% erreicht werden konnte. Eine weitere Erhöhung der MOI auf 400 erbrachte eine leichte Verringerung der Transduktionsrate auf 71%.

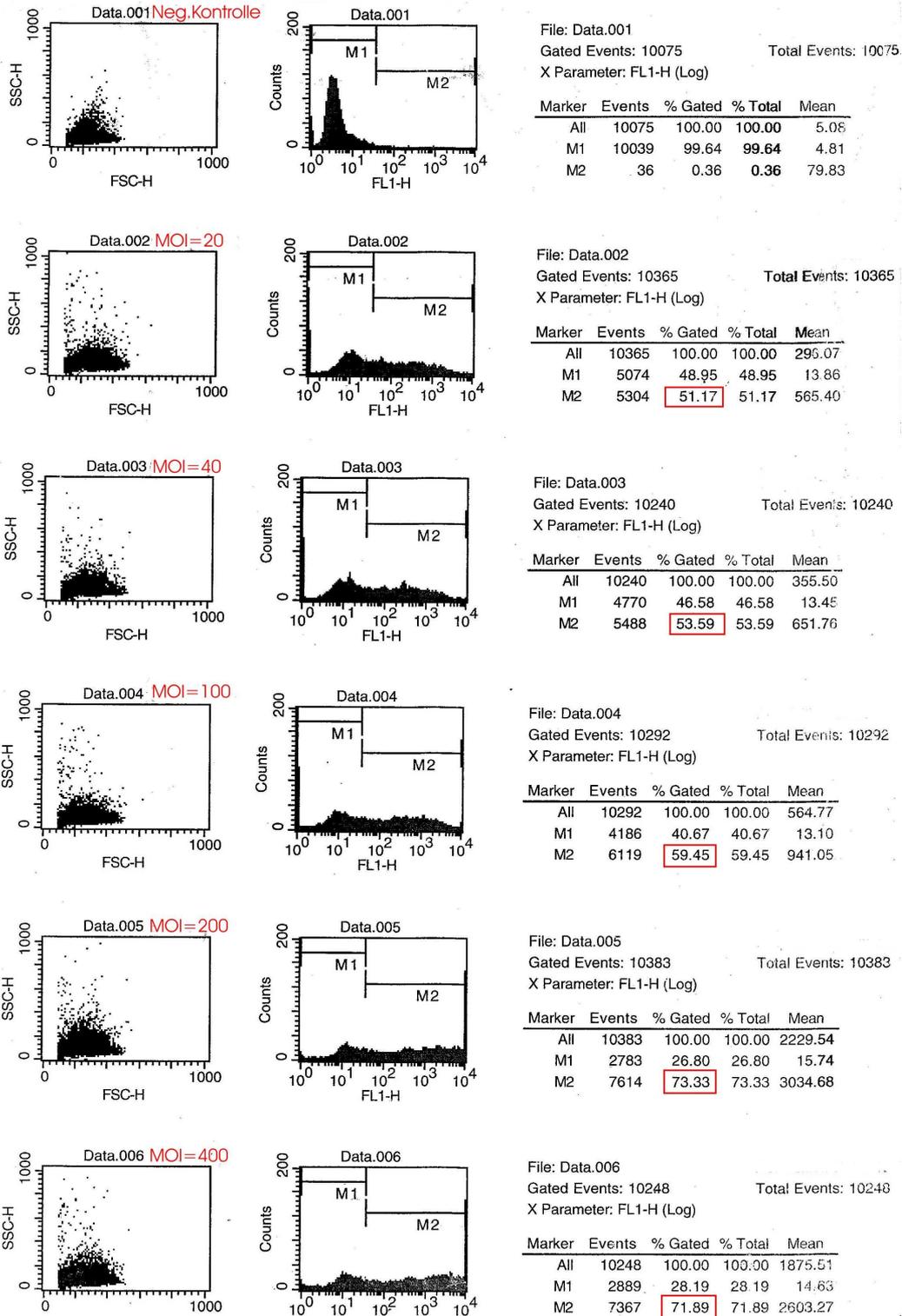


Abb. 12: Ergebnisse der FACS-Analyse von Ad5CMV-GFP-transduzierten UT-7/Epo-Zellen. M1 stellt den Intensitätsbereich der Fluoreszenz dar, der mit Hilfe nicht infizierter Kontrollzellen als negativ definiert wurde, M2 den positiven Bereich. Höchste Fluoreszenz- und damit Transduktionsrate (73,3%) ergab eine MOI von 200 (FSC-H: Zellgröße, SSC-H: Zellgranularität, FL1-H: Bandbreitenfilter GFP-Frequenz).

3.3 Verlauf der Parvovirus B19-Replikation nach Transduktion mit B19V-VP2-spezifischer shRNA

Eine Inhibierung der VP2-Expression sollte zur Unterdrückung der B19V-Replikation beitragen. Um dies zu überprüfen, wurden shRNA-Konstrukte verwendet, welche sich zuvor in Kotransfektionsexperimenten als VP2-spezifisch und effektiv erwiesen hatten (Kap. 2.9).

Der Einfluss der adenoviral transduzierten shRNA auf die B19V-Replikation wurde anhand der Expression der mRNA des Hauptkapsidproteins VP2 sowie des nichtstrukturalen Proteins NS1 über einen mehrtägigen Zeitraum untersucht. Hierzu wurden UT-7/Epo-Zellen 24 h nach Infektion mit B19V-Partikeln mit den entsprechenden Adenovektoren behandelt und 12 h, 24 h, 48 h und 72 h p.i. geerntet. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein zytopathischer Effekt wie z.B. eine Abrundung der Zellen oder eine Reduktion des Zellwachstums im Mikroskop nachgewiesen werden. Die VP2- sowie die NS1-mRNA wurden mittels *real-time* PCR relativ quantifiziert, wobei zur Normierung die konstant exprimierte mRNA des *housekeeping*-Gens ATP-Synthetase-6 verwendet wurde. Als Kontrolle dienten zum einen UT-7/Epo-Zellen, die lediglich mit B19V-Partikeln infiziert wurden sowie B19V-infizierte Zellen, die mit dem Kontrollvektor Ad5shCAR2_m behandelt wurden.

3.3.1 Verlauf der Parvovirus B19-VP2-mRNA-Expression nach Transduktion mit Ad5shVP2 und Kontroll-shRNA.

Unabhängig davon, ob bzw. mit welcher shRNA die mit Parvovirus B19 infizierten Zellen transduziert wurden, zeigte sich ein mehr oder weniger ausgeprägter Anstieg der VP2-mRNA-Expression ab dem Zeitpunkt 24 h p.i. (Abb. 13 A-C, Abb. 14) (der Ausdruck p.i. bezieht sich hierbei immer auf den Zeitpunkt der adenoviralen Transduktion). Der Anstieg war in den lediglich mit B19V infizierten Zellen (no sh) und in den mit Kontroll-shRNA-behandelten Zellen (shCAR) statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$, two-way Anova) und zwischen 24 h und 48 h p.i. am stärksten ausgeprägt, gefolgt von einem etwas schwächeren Anstieg zwischen 48 h und 72 h. Zu beobachten war, dass die VP2-mRNA-Expression in den mit Kontroll-shRNA behandelten Zellen zwischen 24 h und 72 h etwas niedriger verlief (statistisch nicht signifikant) als in den lediglich mit B19V (no sh) infizierten Zellen. Eine deutliche Verminderung der

VP2-mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich in den Zellen, welche mit VP2-spezifischer shRNA transduziert wurden. Auch in diesen war zwar ein leichter Anstieg zwischen 24 h und 72 h zu beobachten, jedoch war dieser minimal ausgeprägt. Die Varianzanalyse mittels two-way Anova konnte zeigen, dass die Reduktion der VP2-mRNA in den mit Ad5shVP2 behandelten Zellen statistisch signifikant war ($p=0,0108$) (Abb. 14).

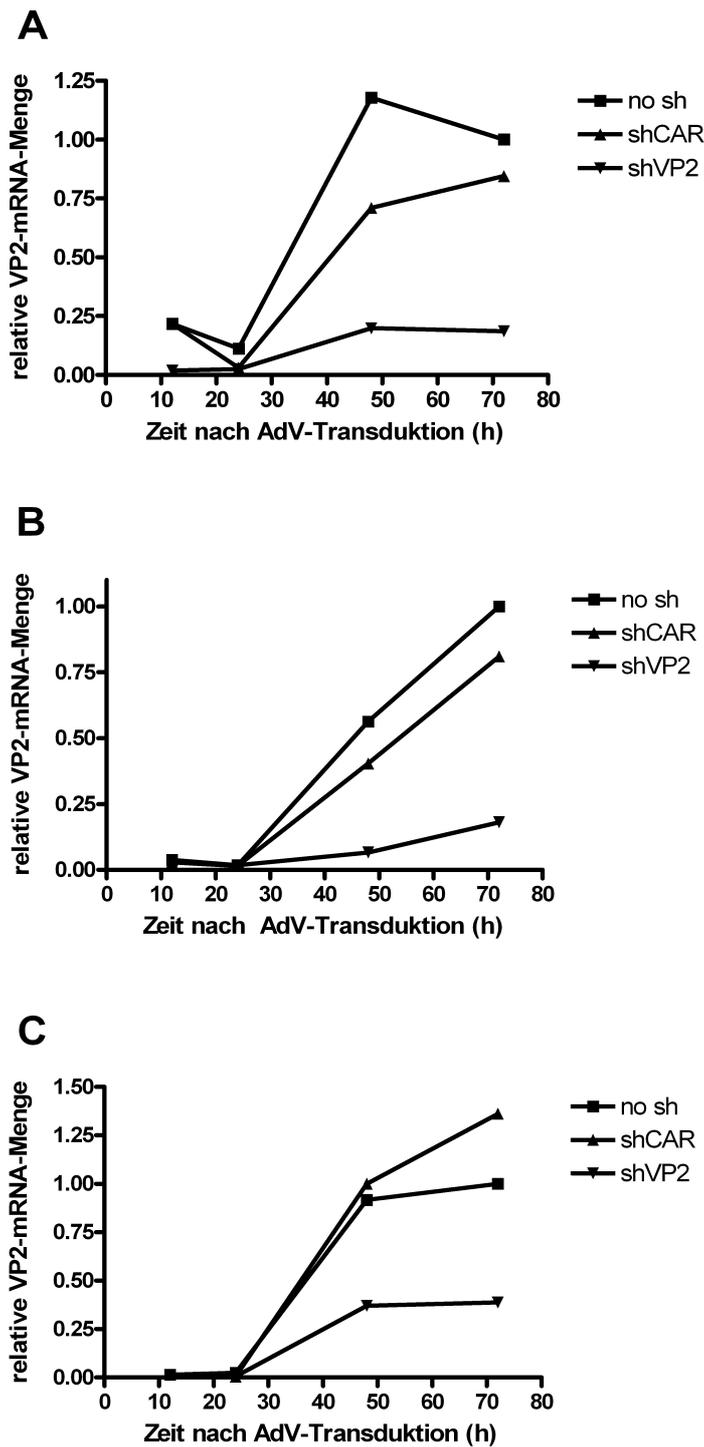


Abb. 13: *real-time* PCR-Analysen der VP2-mRNA-Expression nach Behandlung von B19V-infizierten UT-7/Epo-Zellen mit adenoviraler shRNA gegen VP2. Die Zellen wurden 12h, 24h, 48h und 72h nach adenoviraler Transduktion geerntet, die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. 2 μ l der cDNA wurden zur *real-time* PCR eingesetzt, wobei die Resultate auf das Haushaltsgen ATP-Synthase-6 korrigiert wurden. A-C stellen jeweils unter den gleichen Bedingungen durchgeführte Experimente dar.

(no sh = reine B19V-Kontrolle, shCAR = Kontroll-shRNA, shVP2 = VP2-spezifische shRNA)

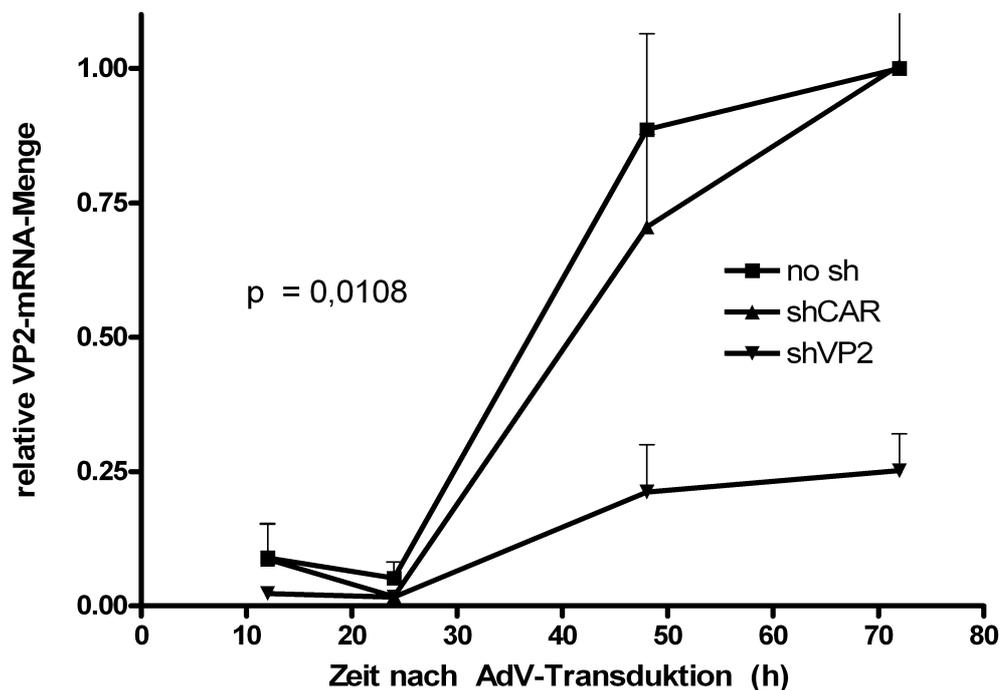


Abb. 14: *real-time* PCR-Analysen der VP2-mRNA-Expression nach Behandlung von B19V-infizierten UT-7/Epo-Zellen mit adenoviraler shRNA gegen VP2. Zusammenfassung von **Abb. 13 A-C**. Die Zellen wurden 12 h, 24 h, 48 h und 72 h nach entsprechender Behandlung geerntet. Nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurden 2 μ l cDNA zur *real-time* PCR eingesetzt. Die Varianzanalyse mittels two-way ANOVA zeigte, dass die Behandlung der B19V-infizierten Zellen mit Ad5shVP2 eine statistisch signifikante Reduktion der VP2-mRNA bewirken konnte ($p=0,0108$). Der Anstieg der VP2-mRNA-Menge in Abhängigkeit der Zeit war in den lediglich mit B19V infizierten Zellen (no sh) und in den mit Kontroll-shRNA behandelten Zellen (shCAR) statistisch hochsignifikant ($p<0,0001$, nicht in Abbildung dargestellt), ($n=3$). (no sh = reine B19V-Kontrolle, shCAR = Kontroll-shRNA, shVP2 = VP2-spezifische shRNA)

3.3.2 Verlauf der Parvovirus B19-NS1-mRNA-Expression nach Transduktion mit Ad5shVP2 und Kontroll-shRNA

NS1 stellt das wichtigste nichtstrukturelle Protein von Parvovirus B19 dar und ist an der Regulation der Virusreplikation sowie an zytotoxischen und proapoptotischen Prozessen beteiligt, welche auf seine Helikase-, ATPase- und Endonuklease-Funktion zurückgeführt werden (Kap. 1.1.2.3). Demnach war es im Rahmen dieser Arbeit von hohem Interesse zu untersuchen, ob auch die NS1-Expression, welche kein direktes Ziel der verwendeten shRNA darstellte, durch den Vektor Ad5shVP2 beeinflusst wird. Hierzu wurden quantitative *real-time* PCR-Analysen der NS1-mRNA-Expression über einen mehrtätigen Zeitraum nach adenoviraler Transduktion der UT-7/Epo-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 A-C sowie zusammengefasst in Abb. 16 dargestellt.

Bis zum Zeitpunkt 24 h p.i. konnte keine Zunahme der NS1-Expression detektiert werden. Erst zwischen 24 h und 48 h p.i. zeigte sich in allen Proben ein Anstieg der NS1-mRNA-Menge. Am stärksten war der Anstieg in den lediglich mit B19V-infizierten Zellen (ohne shRNA-Behandlung) zu beobachten. Auch in den Zellen, die mit der Kontroll-shRNA transduziert wurden, konnte ein deutlicher Anstieg in diesem Zeitabschnitt beobachtet werden, allerdings auf etwas niedrigerem Niveau. Der Verlauf der Produktion von NS1-Transkripten bis zum Zeitpunkt 48 h p.i. deckte sich somit weitgehend mit der VP2-Expression (Kap. 3.3.1 Abb. 13/14). Zwischen 48 h und 72 h nach Zeitpunkt der adenoviralen Transduktion konnte jedoch, im Gegensatz zur VP2-Expression, keine weitere deutliche Zunahme der NS1-mRNA-Menge beobachtet werden. Eine etwas schwächer ausgeprägte Zunahme der NS1-mRNA-Menge zeigten die mit Ad5shVP2 behandelten Zellen. Dieser Unterschied war statistisch allerdings nicht signifikant ($p=0,1106$). Es konnte somit gezeigt werden, dass in UT-7/Epo-Zellen eine deutliche NS1-Transkription in den ersten 3 Tagen nach Infektion der Zellen mit Parvovirus B19-Partikeln stattfindet. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass auch NS1 in Maßen durch die VP2-spezifische shRNA inhibiert werden könnte. Jedoch liefern die bisherigen Daten keine ausreichende Evidenz, um diese Hypothese eindeutig bestätigen zu können.

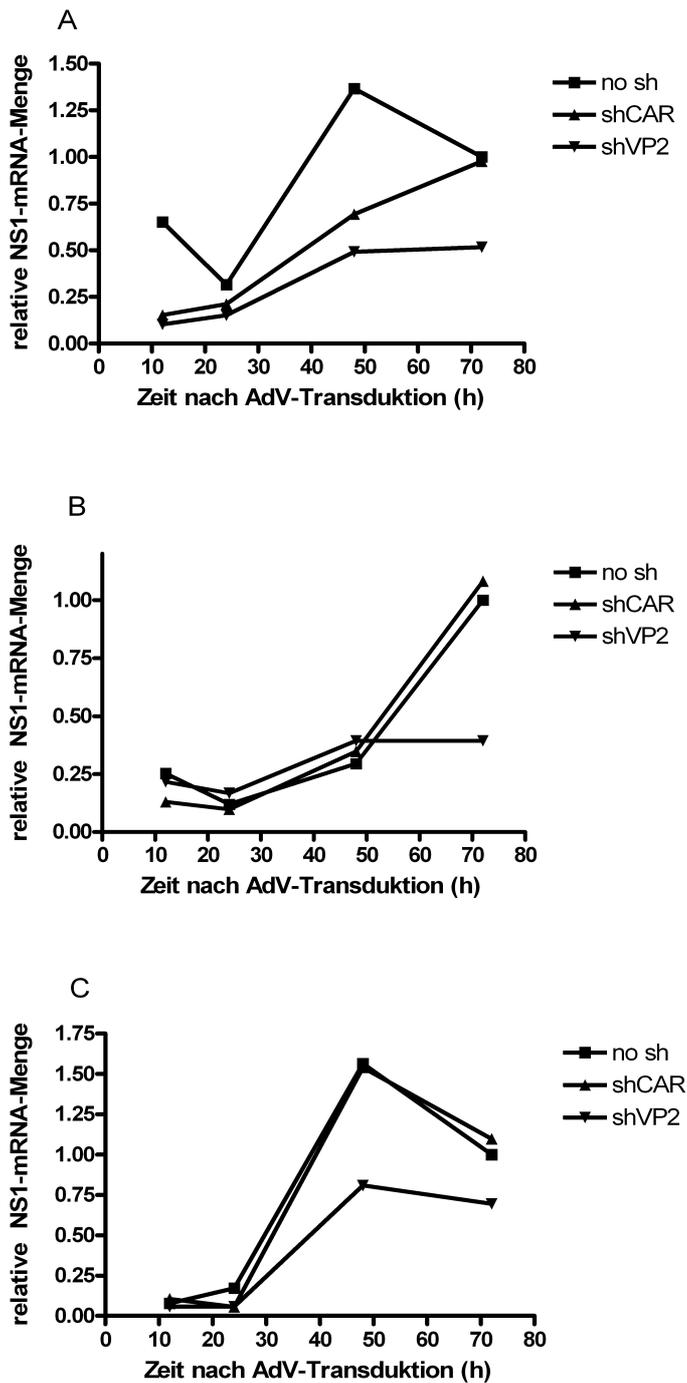


Abb. 15: *real-time* PCR-Analysen der B19V-NS1-mRNA-Expression nach Behandlung von B19V-infizierten UT-7/Epo-Zellen mit adenoviraler shRNA gegen VP2. Die Zellen wurden 12h, 24h, 48h und 72h nach adenoviraler Transduktion geerntet, die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. 2 μ l der cDNA wurden zur *real time*-PCR eingesetzt, wobei die Resultate mit dem Haushaltsgen ATP-Synthetase-6 abgeglichen wurden. A-C stellen jeweils unter den gleichen Bedingungen durchgeführte Experimente dar.
(no sh = reine B19V-Kontrolle, shCAR = Kontroll-shRNA, shVP2 = VP2-spezifische shRNA)

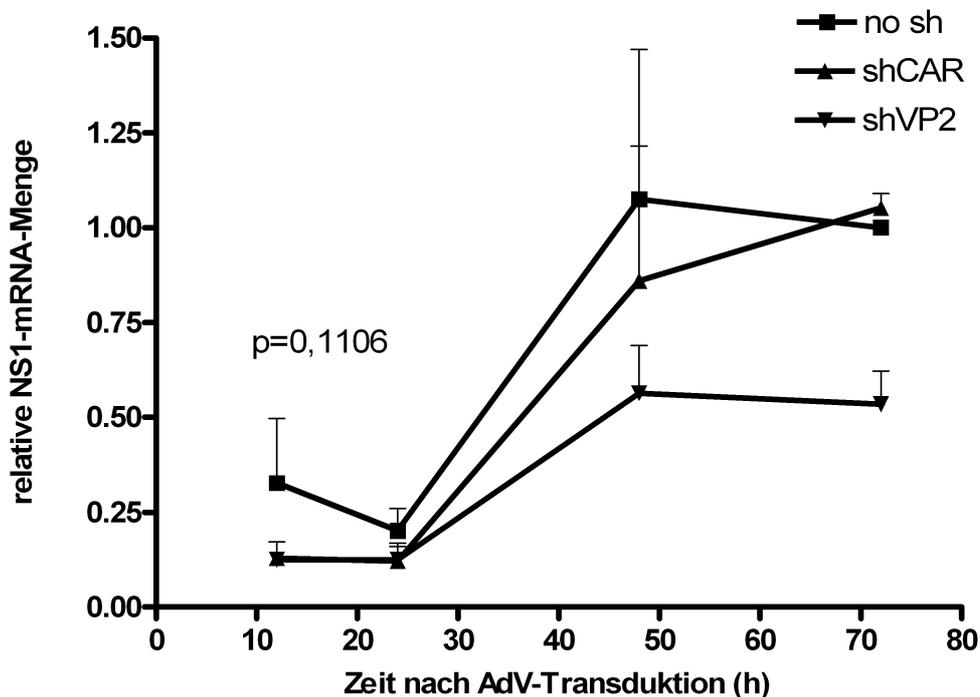


Abb. 16: *real-time* PCR-Analysen der NS1-mRNA-Expression nach Behandlung von B19V-infizierten UT-7/Epo-Zellen mit adenoviraler shRNA gegen VP2. Zusammenfassung von Abb. 15 A-C. Die Zellen wurden 12 h, 24 h, 48 h und 72h nach entsprechender Behandlung geerntet. Nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurden 2 μ l cDNA zur *real-time* PCR eingesetzt. Der Anstieg der NS1-mRNA-Menge in Abhängigkeit der Zeit war statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$, two-way ANOVA, nicht in Abbildung dargestellt). Die Reduktion der NS1-mRNA-Menge in den mit Ad5shVP2 behandelten Zellen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,1106$), ($n = 3$).

(no sh = reine B19V-Kontrolle, shCAR = Kontroll-shRNA, shVP2 = VP2-spezifische shRNA)

3.3.3 VP2-Proteinexpression nach Transduktion mit Ad5shVP2 und Kontroll-shRNA

Um den Einfluss der VP2-spezifischen shRNA auf die VP2-Proteinexpression zu untersuchen, wurde eine Proteinanalyse mittels Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden UT-7/Epo-Zellen mit Parvovirus B19 infiziert und 24 h später mit dem VP2-spezifischen shRNA-exprimierenden Vektoren Ad5shVP2 sowie dem Kontrollvektor Ad5shCAR2_m behandelt. Als zweite Negativkontrolle dienten auch hier lediglich mit B19V infizierte Zellen. Die Ernte der Zellen folgte 48 h nach adenoviraler Transduktion. Dieser Zeitpunkt wurde ausgewählt, da in den

quantitativen *real-time* PCR-Analysen hier bereits eine deutliche Inhibition der Virusreplikation festzustellen war (Kap. 3.2.1). Die Western Blot-Analyse konnte demonstrieren, dass die VP2-spezifische shRNA in der Lage war, die VP2-Expression auch auf Proteinebene deutlich zu supprimieren (Abb. 17).

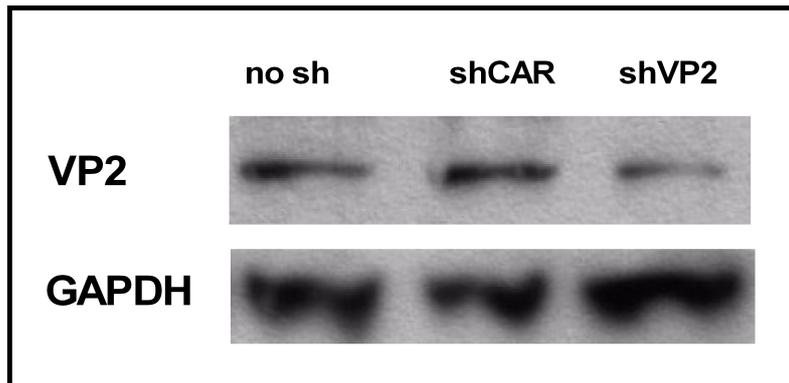


Abb. 17: Western Blot-Analyse der VP2-Proteinexpression in UT-7/Epo-Zellen nach Transduktion mit VP2-spezifischer shRNA. Mit B19V infizierte UT-7/Epo-Zellen wurden 48 h nach adenoviraler Transduktion geerntet. Die Detektion von VP2 in den Zelllysaten erfolgte mit Hilfe VP-spezifischer Antikörper (Kap. 2.3). Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen das Haushaltsgen GAPDH. In den mit VP2-spezifischer shRNA transduzierten Zellen zeigte sich eine Verminderung der VP2-Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen. (no sh = reine B19V-Kontrolle, shCAR = Kontroll-shRNA)

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse zeigen, dass im verwendeten Zellkulturmodell in Parvovirus B19-permissiven UT-7/Epo-Zellen die adenoviral transduzierte shRNA zu einem effektiven Silencing des viralen VP2-Gens auf mRNA-Ebene in der Lage war. Auch auf Proteinebene konnte eine RNAi-vermittelte Inhibition von VP2 im Western Blot detektiert werden. Zusätzlich lieferten die Daten Hinweise auf ein mäßiggradiges RNAi-vermitteltes Silencing des NS1-Gens auf mRNA-Ebene.

4 DISKUSSION

Parvovirus B19 wurde in den letzten Jahren zunehmend als kardiotroper Erreger erkannt. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit einer persistierenden B19V-Infektion von intramyokardialen Endothelien eine inflammatorische Kardiomyopathie mit kardialer Dysfunktion einhergehen kann (Bock et al., 2005; Klingel et al., 2004). Studien aus Tübingen lieferten Hinweise, dass die Prävalenz von Parvovirus B19 in Endomyokard-Biopsien bei Patienten mit klinisch vermuteter Myokarditis bei 36,7% liegt (Kandolf, 2004). Da bislang keine spezifische Therapie der Parvovirus B19-Infektion existiert, ist es von hoher Relevanz, hierzu neue antivirale Therapiestrategien aufzuzeigen und zu entwickeln.

Das posttranskriptionale *Gene Silencing* mittels RNA-Interferenz wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Inhibition viraler Infektionen *in vitro* und *in vivo* eingesetzt, darunter bei HIV, Influenza A, Masernvirus sowie HBV und HCV (Asparuhova et al., 2008; Ren et al., 2006; Sui et al., 2009; Takigawa et al., 2004; Zinke et al., 2009). Demnach stellt der Mechanismus der RNAi auch bei der Parvovirus B19-Infektion einen vielversprechenden gentherapeutischen Ansatz dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von B19V-VP2-spezifischer short hairpin RNA auf die Virusreplikation *in vitro* untersucht. Dazu erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Henry Fechner, Campus Benjamin Franklin, Abteilung Kardiologie und Pulmologie, Berlin und Prof. Dr. Jens Kurreck, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart, die Entwicklung und Testung eines adenoviralen Vektorsystems zur Transduktion der Zellen mit B19V-VP2-spezifischer shRNA. Die funktionellen Experimente wurden im UT-7/Epo-Zellkultursystem durchgeführt, welches als hoch permissiv für die Replikation von Parvovirus B19 beschrieben wurde (Shimomura et al., 1992). Über einen mehrtägigen Zeitraum wurde die Virusreplikation nach Transduktion der infizierten Zellen mit shRNA auf RNA-Ebene analysiert. Zusätzlich erfolgte zum Zeitpunkt 48h p.i. eine Western-Blot-Analyse, um die Silencing-Aktivität auf Proteinebene zu überprüfen.

4.1 Bestätigung der Spezifität und Effizienz der verwendeten shRNA

Bei der Evaluierung von neu entwickelten shRNA- oder siRNA-Konstrukten ist es bedeutsam zu unterscheiden, ob der beobachtete Effekt auf eine spezifische Silencing-Aktivität des Konstrukts zurückzuführen ist oder ob es sich lediglich um einen sequenzspezifischen Nebeneffekt handelt (s. Kap. 1.2.3.2). Dies kann untersucht werden, indem mehrere RNAi-Effektormoleküle entwickelt werden, die alle gegen das gleiche Target gerichtet sind, sich aber in ihrer Sequenz leicht unterscheiden. Ist ein Silencing des Zielgens lediglich bei einem oder wenigen der untersuchten siRNA/shRNA-Konstrukte zu beobachten, so lässt dies vermuten, dass es sich hierbei um einen Nebeneffekt handelt, bedingt z.B. durch eine sequenzabhängige Aktivierung der zellulären Interferonantwort. Die Anzahl von RNAi-Effektormolekülen, die nötig ist, um die Target-Spezifität der untersuchten shRNA-Sequenzen zu bestätigen, wird von Martin und Caplen (2007) mit mindestens zwei angegeben. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene, gegen B19V-VP2 gerichtete shRNA-Konstrukte entwickelt. Co-Transfektionsexperimente von Zellen, die ein EGFP-VP2-Fusionsprodukt exprimierten und mit den verschiedenen shRNAs transfiziert wurden, konnten zeigen, dass alle drei Konstrukte in der Lage waren, ein Silencing von VP2 zu vermitteln. Dies spricht dafür, dass es sich um einen Target-spezifischen Effekt handelte, welcher somit auf die Komplementarität der shRNA-Konstrukte zur VP2-mRNA zurückzuführen war. Auch sequenzunabhängige Nebeneffekte, welche eine Sättigung des endogenen RNAi-Apparates (Grimm et al., 2006) oder eine unspezifische Stimulation der Immunantwort (Kariko et al., 2004) zur Ursache haben, können Probleme bereiten, wenn es darum geht, die Wirksamkeit neu entwickelter shRNAs zu beurteilen. Hierzu ist die Verwendung einer shRNA-Kontrolle, die eine beliebige („nonsense-“) Sequenz enthält, unerlässlich. Die Kontroll-shRNA, welche zur Evaluierung der drei VP2-spezifischen shRNAs im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit eingesetzt wurde, vermittelte kein Silencing von VP2. Somit waren auch sequenzunabhängige Nebeneffekte als Störfaktor bei der Beurteilung der Wirksamkeit der shRNAs weitgehend ausgeschlossen. In der Ausprägung der Silencing-Aktivität allerdings unterschieden sich die drei Konstrukte voneinander. So war in den mit shRNA3 behandelten Zellen die Inhibition von VP2 am stärksten ausgeprägt, erkennbar sowohl in der

Fluoreszenzmikroskopie als auch im Western Blot (Kap. 3.1). ShRNA 3 wurde demnach zur Einklonierung in den Typ-5 adenoviralen Vektor verwendet.

4.2 Parvovirus B19 repliziert in UT-7/Epo-Zellen

Um den Einfluss von RNA-Interferenz auf die Replikation von Parvovirus B19 *in vitro* zu untersuchen, musste für die funktionellen Experimente eine Zelllinie ausgewählt werden, die in möglichst hohem Maße permissiv für eine produktive Parvovirus B19-Infektion ist. Kennzeichnend hierfür ist ein Gleichgewicht der Proteinsynthese auf Seiten der Kapsidproteine (Liu et al., 1992). Shimomura et al. (1992) konnten zeigen, dass UT-7/Epo-Zellen mit megakaryoblastischem Phänotyp hoch permissiv für eine B19V-Infektion sind, erkennbar an einer Produktion sowohl des nichtstrukturalen Proteins NS1 als auch der Strukturproteine VP1 und VP2. In Übereinstimmung dazu zeigte sich in den Experimenten der vorliegenden Arbeit ein deutlicher Anstieg von VP2-mRNA ab dem Zeitpunkt 48 h nach B19V-Infektion (s. Kap. 3.3, Abb. 14). Eine Zunahme von viraler mRNA kann als Marker der Virusvermehrung gewertet werden, da es sich bei mRNA um ein Replikationsintermediat handelt. Ebenfalls zu beobachten war ein (etwas schwächer ausgeprägter) Anstieg der NS1-mRNA im Zeitraum 48 h bis 72 h nach B19V-Infektion (Kap. 3.3, Abb. 16). Während die Synthese von VP2-mRNA auch noch im weiteren Verlauf der Infektion zunahm, stagnierte die Bildung von NS1-Transkripten ab diesem Zeitpunkt. Es lag somit ab dem Zeitpunkt 48 h nach B19V-Infektion das Gleichgewicht der Synthese auf Seiten der Strukturproteine. Dieser Effekt konnte auch auf Proteinebene beobachtet werden (Kap. 3.3.3). Folglich ermöglichte das verwendete Zellkulturmodell eine produktive B19V-Infektion mit Bildung neuer Viruspartikel und war daher gut geeignet, um den Einfluss von adenoviral vermittelter RNA-Interferenz auf die Virusreplikation zu untersuchen.

4.3 Ad5shVP2 inhibiert die Replikation von Parvovirus B19 in UT-7/Epo-Zellen

Die vor wenigen Jahren erstmals beschriebene RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus des posttranskriptionalen *Gene Silencing*, der sowohl natürlicherweise in Säugetierzellen auftritt als auch experimentell hervorgerufen werden kann. Eine häufig genutzte Möglichkeit zur experimentellen Induktion von RNAi stellen rekombinante virale Vektoren dar, wie z.B. Typ 5-Adenoviren. Diese bieten den Vorteil eines effizienten Gentransfers (Pushparaj et al., 2008) und weisen einen breiten Tropismus auf, was sie zu vielfältig einsetzbaren Vektoren macht. Der potentielle therapeutische Nutzen von adenoviral vermittelter RNA-Interferenz konnte bereits in verschiedenen Bereichen demonstriert werden. So wurde in einer *in vivo*-Studie gezeigt, dass Schweine und Meerschweinchen vor einer Infektion mit dem Maul- und Klauenseuchevirus durch shRNA-exprimierende Adenovektoren geschützt werden können (Chen et al., 2006). Adenoviral vermitteltes Gene Silencing wurde auch zur Behandlung von Herzerkrankungen, bei denen die Kalziumhomöostase von Myozyten gestört ist, erprobt. In einer Arbeit von Fechner et al. konnte adenovirale shRNA über eine Inhibition von Phospholamban die Kalziumaufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum von Kardiomyozyten verbessern (Fechner et al., 2007). Zur Transduktion von Knochenmarks- oder hämatopoietischen Zellen jedoch wurden adenovirale Vektoren als schwach wirksam beschrieben (Pushparaj et al., 2008; Yotnda et al., 2001). Hingegen konnte gezeigt werden, dass CD35+ hämatopoietische Stammzellen durch Stimulation mit einem Cocktail aus verschiedenen Zytokinen für eine Transduktion mittels Typ 5-Adenoviren empfänglich gemacht werden können, was auf eine Reduktion der viralen Zytotoxizität zurückzuführen ist (MacKenzie et al., 2000). Für die vorliegende Arbeit wurde die Fähigkeit von Typ 5-Adenoviren zur Transduktion von UT-7/Epo-Zellen, welche Zellen des hämatopoietischen Systems darstellen, in einem Dosisescalationsexperiment mit dem Vektor Ad5CMV-GFP getestet. Es stellte sich heraus, dass bei einer MOI von 200 eine hohe adenovirale Transduktionsrate von 73% erreicht werden konnte (Kap. 3.2). Möglicherweise ist hier, vergleichbar mit der Zytokinstimulation von MacKenzie et al., die Behandlung der Zellen mit dem Wachstumsfaktor Erythropoietin (Epo) der entscheidende Parameter, welcher

die erfolgreiche adenovirale Transduktion ermöglicht. Auch hierfür kommt als Erklärung in Betracht, dass die Epo-Behandlung über den wachstumsanregenden Effekt eine protektive Wirkung auf die Zellen ausübt und somit auch eine erfolgreiche Transduktion bei mäßig hohen MOIs ermöglicht.

Im UT-7/Epo-Zellkultursystem wurde in einer mehrtägigen Zeitkinetik der Einfluss des shRNA exprimierenden Vektors Ad5shVP2 auf die virale mRNA-Expression untersucht. Es zeigte sich, dass die VP2-spezifische shRNA zu einem effektiven *Silencing* von VP2 in der Lage war, erkennbar an einer deutlich verminderten Expression von VP2-mRNA ab dem Zeitpunkt 24 h p.i. im Vergleich zu den Kontrollen. In Übereinstimmung hierzu konnte auch auf Proteinebene in der Western Blot-Analyse eine Reduktion des VP2-Proteins durch Ad5shVP2 beobachtet werden. Die Inhibition auf Proteinebene imponierte als etwas schwächer ausgeprägt als auf RNA-Ebene. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass zum Zeitpunkt der Zellernte noch VP2-Proteine vorhanden waren, die bereits vor der Transduktion mit Ad5shVP2 synthetisiert wurden und somit von der RNA-Interferenz unbeeinflusst bleiben konnten. Je nach Stabilität des VP2-Proteins wäre dann im weiteren Zeitverlauf zu erwarten, dass sich der inhibitorische Effekt der shRNA noch stärker durchsetzt.

Für eine erfolgreiche Virusreplikation muss gewährleistet sein, dass eine Vervielfältigung viraler Nukleinsäuren und eine Expression virusspezifischer Proteine stattfindet, was schließlich die Morphogenese kompletter neuer Viruspartikel ermöglicht. Das ikosaedrische Kapsid von Parvovirus B19 besteht zu 96% aus dem VP2-Protein (Ozawa and Young, 1987). Da sich in den Experimenten der vorliegenden Arbeit die VP2-Synthese durch den Vektor Ad5shVP2 deutlich inhibieren ließ, kann daraus gefolgert werden, dass Ad5shVP2 in der Lage ist, die Replikation von Parvovirus B19 *in vitro* deutlich einzuschränken. Ein vollständiges Silencing des VP2-Gens fand nicht statt. Die Ursache für die restliche VP2-Expression in den mit shRNA behandelten Zellen könnte in der nicht vollständigen Transduktionsrate liegen, im Dosisescalationsexperiment waren mit dem GFP-exprimierenden Adenovektor bei einer MOI von 500 maximal 73% der Zellen transduzierbar. Jedoch muss auch beachtet werden, dass im Allgemeinen durch RNAi selten das vollständige Ausschalten einer Genexpression erreicht wird, weswegen für RNAi eher der

Begriff der „*knockdown*“-Technologie verwendet wird als der Begriff des „*knockout*“ (Kurreck, 2009).

Um den Effekt der gegen VP2 gerichteten shRNA hinsichtlich seiner Spezifität beurteilen zu können (s. Kap. 4.1), wurden die Zellen zusätzlich mit dem Kontrollvektor Ad5shCAR2_m in gleicher MOI behandelt. Hierbei handelte es sich um den gleichen Typ 5-adenoviralen Vektor (s. Kap. 2.7, Abb. 7), welcher allerdings eine shRNA exprimiert, die gegen den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor der Maus gerichtet war (Fechner et al., 2007) und sich somit gut als Kontrollvektor eignete. Zu beobachten war, dass die VP2-mRNA-Expression in den mit Kontroll-shRNA behandelten Zellen zwischen 24 h und 72 h durchschnittlich etwas niedriger verlief als in den lediglich mit B19V infizierten Zellen. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese gering ausgeprägte VP2-Inhibition durch Ad5shCAR2_m auf einem sequenzunabhängigen Nebeneffekt beruht. Denkbar ist eine Stimulation der Interferon α/β -Synthese. Dieser Nebeneffekt kann über die Aktivierung einer dsRNA-abhängigen Proteinkinase R erfolgen (Sledz et al., 2003). Eine sequenzabhängige Stimulation der Interferonantwort, die vermutlich über die Bindung an Toll-like-Rezeptoren (TLR) vermittelt wird (Hornung et al., 2005), erscheint als Erklärung unwahrscheinlich, da die entsprechenden TLRs nur von Immunzellen in relevantem Ausmaß exprimiert werden. Während eine Aktivierung des Typ 1-Interferonsystems unter experimentellen Bedingungen unerwünscht ist, sind hingegen therapeutische Anwendungsgebiete der RNA-Interferenz vorstellbar, in denen dieser Effekt nicht nur in Kauf genommen, sondern auch gezielt eingesetzt werden könnte. Interferone induzieren die Synthese der Proteinkinase R sowie der 2'5'-Oligo-Adenylat-Synthetase (OAS), welche beide durch Bindung von dsRNA aktiv werden. Die Aktivierung der Proteinkinase R führt zur Phosphorylierung des Translationsfaktors EIF2A, was eine Inhibition der Translation zur Folge hat, während die OAS eine sequenzspezifische Degradation sowohl zelleigener als auch viraler mRNA bewirkt (Minks et al., 1979; Schlee et al., 2006). Daraus resultiert eine proliferationshemmende und virostatistische Wirkung. Es ist somit denkbar, dass im Rahmen therapeutischer Applikationen von siRNA oder shRNA insbesondere bei Virusinfektionen Interferon-stimulierende Sequenzen gezielt eingesetzt werden könnten, um das

spezifische Gene Silencing mit der unspezifischen Immunstimulation zu einer noch wirksameren Gentherapie zu verbinden.

4.4 Ad5shVP2 vermittelt kein signifikantes Silencing von NS1

Während Ad5shVP2 ein statistisch signifikantes *Silencing* von VP2 ermöglichte, war die in der quantitativen *real-time* PCR tendenziell erkennbare Reduktion von NS1-mRNA statistisch nicht signifikant. Daher muss davon ausgegangen werden, dass trotz einer RNAi-induzierten Hemmung der Virusreplikation das virale NS1-Protein intrazellulär akkumuliert. Im UT-7/Epo-Zellkultursystem mag dieser Effekt noch vergleichsweise gering ausfallen, da sich B19V-permissive Zelltypen durch eine relativ geringe Syntheserate von NS1 gegenüber den Strukturproteinen auszeichnen (Gallinella et al., 2000; Liu et al., 1992). In nicht-permissiven (Endothel-)zellen, die aufgrund einer veränderten 3'-Prozessierung der Transkripte von VP1 und VP2 eine relativ hohe Syntheserate von NS1 aufweisen, müsste die Akkumulation dann in noch höherem Maße stattfinden. Die B19V-assoziierte chronische inflammatorische Kardiomyopathie ist charakterisiert durch eine persistierende Infektion von intramyokardialen Endothelien, die mit einer konsekutiven Schädigung der Kardiomyozyten einhergeht (Kandolf, 2004). Verschiedene Arbeiten zeigen, dass in diesem Zusammenhang NS1 wahrscheinlich mehrere pathogenetisch bedeutsame Funktionen zuzuschreiben sind. Zum einen besitzt NS1 apoptotische und zytotoxische Effekte, die vermutlich auf seiner Helikase-, ATPase- und Endonuklease-Aktivität beruhen (Doerig et al., 1990; Jindal et al., 1994; Moffatt et al., 1998). Darüber hinaus belegen neuere Untersuchungen aus der Abteilung für Molekulare Pathologie Tübingen, dass NS1 in der Lage ist, mit dem inflammatorischen STAT3/PIAS3-Signalweg zu interagieren. Mit der STAT3-Aktivierung durch NS1 geht eine Aktivierung von Genen einher, die in die Immunantwort der Zelle involviert sind, wie die des IL-10-Rezeptor α , IL-2-Rezeptor α und der IFN-Rezeptor-Proteine. Gene, die bei der Virusabwehr tragende Funktionen besitzen wie OAS1 (Oligoadenylatsynthetase) und TYK2 (Tyrosinkinase) werden hingegen durch die NS1-induzierte STAT3-Aktivierung vermindert exprimiert. Diese Mechanismen können sowohl zur Endothelzellschädigung als auch zur Persistenz von B19V beitragen und

werden demnach als ein wichtiger pathogenetischer Prozess bei der Entwicklung einer chronischen iCMP diskutiert (Duechting et al., 2008).

Zieht man diese Erkenntnisse im Kontext der Ergebnisse dieser Arbeit in Betracht, muss davon ausgegangen werden, dass eine alleinige Suppression der B19V-Replikation mittels VP2-Silencing nicht ausreicht. Vielmehr sollte in weiteren Experimenten zusätzlich Augenmerk auf eine effektive Inhibition von NS1 gelegt werden, um entscheidenden Einfluss auf die pathogenetischen Prozesse der B19V-assoziierten iCMP nehmen zu können. Denkbar wäre die Entwicklung einer Kombinationstherapie, bei der neben einer VP2-spezifischen shRNA, durch welche, wie in dieser Arbeit demonstriert, die Virusreplikation effizient gehemmt werden kann, zusätzlich ein NS1-spezifisches *Silencing* zum Einsatz kommt.

4.5 Probleme und Lösungsansätze bei therapeutischer RNA-Interferenz

4.5.1 Ausbildung von Escape mutants

Chronische Virusinfektionen wie die B19V-assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie erfordern vermutlich eine RNAi-Therapie über einen längeren Zeitraum hinweg. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass eine prolongierte Behandlung von virusinfizierten Zellen mit shRNA zur Selektion resistenter Varianten führen kann. Dies gilt insbesondere dann, wenn die RNAi-induzierte Inhibition nicht vollständig ist. In Experimenten von Boden et. al konnte die HIV-1-Replikation *in vitro* durch eine stabil exprimierte shRNA über einen Zeitraum von 3 Wochen lang erfolgreich gehemmt werden. Ab dem 25. Tag der Zellkultivierung entwickelte sich jedoch eine Abnahme der antiviralen shRNA-Aktivität. Sequenzierungsanalysen zeigten, dass eine Punktmutation innerhalb der Zielsequenz im Virusgenom verantwortlich für den Rückgang der antiviralen Aktivität der shRNA war (Boden et al., 2003). Vergleichbare Daten existieren zur Langzeitbehandlung einer HCV-Infektion mit siRNA *in vitro*: nach mehreren Behandlungszyklen mit der zunächst hoch wirksamen siRNA zeigte sich eine Zunahme von viraler RNA. Auch dieses Phänomen ließ sich auf eine Punktmutation in der Zielsequenz der siRNA zurückführen (Wilson and Richardson, 2005). Auch die Behandlung von Poliovirus-Infektionen in HeLa-Zellen mit siRNAs führte zur Entwicklung von resistenten Varianten innerhalb 40 h post infectionem durch verschiedene Punktmutationen innerhalb der

Zielsequenz. Die genauere Analyse der verschiedenen Mutanten zeigte hier jedoch, dass die Ausprägung der Resistenz abhängig von der Lokalisation der Mutation war. So bewirkten Mutationen im zentralen Bereich und auf der 5'-Seite eine nahezu vollständige Resistenz, während eine Mutation auf der 3'-Seite der Zielsequenz nur geringe Auswirkungen auf die Effektivität der siRNA hatte (Gitlin et al., 2005).

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit trat innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraumes von 72 h p.i. kein deutlicher Anstieg der VP2-mRNA in den mit Ad5shVP2 behandelten Zellen auf. Somit ergab sich zumindest innerhalb des untersuchten Zeitraumes kein Hinweis auf die Entwicklung von resistenten Mutanten. Allerdings ist auch hier nicht ausgeschlossen, dass es bei einer längerfristigen Behandlung mit VP2-spezifischer shRNA zur Entwicklung von Resistenzen durch Mutationen im B19V-Genom kommen und sich das Virus auf diese Weise dem Einfluss antiviraler shRNA entziehen könnte. Letztendlich scheint eine RNAi-Therapie mit nur einem Target zur Behandlung chronischer Virusinfektionen nicht suffizient zu sein. Eine Möglichkeit, der Bildung von resistenten Mutanten entgegenzuwirken, besteht darin, eine Kombination aus mehreren shRNAs einzusetzen. Erfolgreich angewandt wurde dieses Prinzip bereits u.a. bei HIV-1-infizierten Zellen, indem mehrere, gegen konservierte Regionen im Virusgenom gerichtete shRNAs eingesetzt wurden. Dies führte zu einer deutlich verzögerten Entwicklung von resistenten Mutanten im Vergleich zur Monotherapie (ter Brake et al., 2006). Demnach kann postuliert werden, dass eine Kombinationstherapie aus VP2- und NS1-spezifischer shRNA nicht nur die zytotoxischen Effekte von NS1 (s. Kap. 4.4), sondern auch die Selektion von *Escape*-Mutanten vermutlich minimieren könnte. Eine begünstigende Rolle hierbei dürfte auch die geringe Sequenzvariabilität von NS1 spielen (Heegaard and Brown, 2002).

Eine interessante Alternative zum Silencing viraler Gene stellt in dieser Hinsicht auch die Inhibition von weniger variablen Faktoren der Wirtszelle dar, die im Infektionszyklus des Virus entscheidende Funktionen einnehmen. Diese Ziele, die sowohl Virus-bindende Rezeptoren als auch intrazelluläre Moleküle darstellen können, bieten den Vorteil, dass die Entwicklung von *Escape*-Mutationen weitaus weniger wahrscheinlich als bei Sequenzen im Virusgenom ist. Den potentiellen therapeutischen Nutzen konnten bereits verschiedene

Arbeiten hervorheben. Fechner et al. (2007) konnten zeigen, dass die Coxsackievirus B3- und Adenovirusinfektion in myokardialen Zellen durch eine shRNA-vermittelte Inhibition des gemeinsamen Rezeptors der Viren (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor, CAR) erfolgreich verhindert werden kann. In einem vergleichbaren Ansatz wurde die Transmission von HIV-1 von infizierten Dendritischen Zellen (DC) auf CD4-positive T-Zellen durch ein shRNA-induziertes Silencing des DC-spezifischen interzellulären Adhäsionsmoleküls DC-SIGN inhibiert (Arrighi et al., 2004). Für Parvovirus B19 stellt das Blutgruppen P-Antigen den zellulären Rezeptor dar (Brown et al., 1993). Dementsprechend sind Personen mit dem seltenen p-Phänotyp, deren Erythrozyten das P-Antigen nicht exprimieren, für eine B19V-Infektion nicht empfänglich (Brown et al., 1994b). Ein RNAi-vermitteltes Silencing des P-Antigens kann demnach auch bei der B19V-Infektion als Ergänzung in Betracht gezogen werden und müsste im Falle der B19V-assoziierten iCMP zumindest in der Lage sein, die weitere Ausbreitung der Infektion zu reduzieren.

4.5.2 Vektorproblem

Eine weitere große Herausforderung bei der Entwicklung klinischer Anwendungen der RNAi ist die Freisetzung entsprechender Effektormoleküle in die Zelle. Da es sich bei Oligonukleotiden um mehrfach negativ geladene Makromoleküle handelt, kann eine Aufnahme von siRNA oder shRNA in die Zelle nicht spontan stattfinden. Eine weit verbreitete Möglichkeit zur Transduktion von Zellen mit shRNA stellen rekombinante virale Vektorsysteme dar. In der vorliegenden Arbeit wurde ein replikationsdefizienter Typ 5-Adenovektor mit Erfolg eingesetzt. Jedoch wirft die gentherapeutische Anwendung von Adenoviren *in vivo* verschiedene Probleme auf. Adenoviren können aufgrund ihres breiten Tropismus Verursacher zahlreicher Erkrankungen verschiedener Organsysteme sein, dabei sind hauptsächlich Augen, Respirations- und Gastrointestinaltrakt betroffen. Die für diese Arbeit verwendeten Adenoviren waren durch eine Deletion im E1- und E3-Gen replikationsdefizient, wodurch zumindest das Problem der Zytotoxizität deutlich verringert werden kann. Das Hauptproblem bei der Anwendung von Adenoviren *in vivo* stellt jedoch die Induktion einer starken Immunantwort dar. Im Rahmen einer klinischen Studie in Pennsylvania trat bei einem 18jährigen Probanden

wenige Stunden nach Behandlung mit Adenoviren in hoher Dosis eine fatale Immunreaktion auf, die innerhalb weniger Tage zu seinem Tod führte (Lehrman, 1999). Somit scheint es unumgänglich, sicherere Vektorsysteme zu entwickeln, wenn es gilt, eine klinisch anwendbare RNAi-Therapie der B19V-assoziierten iCMP zu etablieren. In den letzten Jahren wurden zunehmend Adeno-assoziierte Viren (AAV) erfolgreich als Vektoren eingesetzt. AAV gehören, wie Parvovirus B19, ebenfalls zur Familie der *Parvoviridae* und werden in die Gattung der Dependoviren eingeordnet, welche nur in Anwesenheit von Helferviren replizieren können. Als Vektoren zeichnen sich AAV durch fehlende Pathogenität, eine lang andauernde, stabile transgene Expression und die Verwendbarkeit verschiedener Serotypen zur Steuerung der Gewebespezifität aus. Zudem ist die zelluläre Immunantwort weitaus schwächer ausgeprägt als bei Adenoviren (Daya and Berns, 2008). Dadurch konnten AAV bereits in mehreren klinischen Studien (Phase I-III) eingesetzt werden, unter anderem zur Gentherapie der Parkinson-Krankheit (Kaplitt et al., 2007), der Cystischen Fibrose (Moss et al., 2004) oder der Hämophilie B (Manno et al., 2006). Auch in RNAi-Experimenten wurden AAV erfolgreich verwendet. So konnte in einer der ersten *in vivo*-Studien ein Silencing des Dopamin-synthetisierenden Enzyms Tyrosinhydroxylase im Mittelhirn von Mäusen durch shRNA-exprimierende AAV-Vektoren vermittelt werden. Als Resultat ließen sich motorische und Verhaltensänderungen registrieren (Hommel et al., 2003). Da bei der B19V-assoziierten iCMP die persistierende Infektion von intramyokardialen Endothelzellen Ausgangspunkt in der Pathogenese der Erkrankung ist, muss im Falle einer Verwendung von AAV bei dieser Erkrankung eine Suszeptibilität des entsprechenden Gewebes, respektive des Endothels, vorhanden sein. Ein ausgeprägter kardialer Tropismus scheint bei mehreren AAV-Serotypen gegeben zu sein (Daya and Berns, 2008; Zincarelli et al., 2008), wohingegen bislang nur wenige Daten bezüglich der AAV-Suszeptibilität von Endothelzellen existieren. Für die AAV-Serotypen 1 und 5 wurde eine hohe Fähigkeit zur Transduzierbarkeit von Endothelzellen beschrieben, während der zur Zeit am häufigsten verwendete Serotyp 2 eine deutlich schwächer ausgeprägte Transduktionsfähigkeit von Endothelzellen aufzuweisen scheint (Chen et al., 2005; Sen et al., 2008). Eine hohe Transduktionsrate im Zielgewebe sowie eine möglichst hohe Gewebespezifität können gewährleisten, dass auch eine

geringe MOI zu einer ausreichenden shRNA-Expression führt, wodurch das Risiko von Immunreaktionen minimiert werden könnte. Vielversprechend scheinen demnach sogenannte *pseudotyping*-Ansätze, bei denen das Genom eines AAV-Serotyps mit dem Kapsid eines anderen Serotyps kombiniert wird, um den Tropismus exakter steuern zu können (Daya and Berns, 2008). Die molekularen Mechanismen der AAV-Transduktion von Endothelzellen müssten jedoch noch intensiver erforscht werden, um einen möglichst effizienten AAV-Vektor für eine klinisch anwendbare RNAi-basierte Therapie der B19V-assoziierten iCMP entwickeln zu können.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass adenoviral vermittelte RNA-Interferenz zu einem effektiven *Silencing* des B19V-VP2-Gens in infizierten UT-7/Epo-Zellen in der Lage ist und demnach die Virusreplikation deutlich zu inhibieren vermag. Eine mögliche klinische Anwendung erfordert jedoch noch weiterführende Untersuchungen und umfangreiche Weiterentwicklungen dieses grundsätzlich vielversprechenden Therapieansatzes. Sinnvoll wäre es zu untersuchen, ob der Einfluss von Ad5shVP2 auf die B19V-Replikation auch in Endothelzellen vergleichbar stark ausgeprägt ist. Der Abteilung für Molekulare Pathologie der Universität Tübingen steht in Kürze ein B19V-transgenes Mausmodell zur Verfügung, in welchem der Einfluss von antiviraler shRNA *in vivo* analysiert werden könnte. Hierzu wäre die Entwicklung eines AAV-Vektors, der sowohl für die in dieser Arbeit verwendete VP2-shRNA als auch für eine NS1-shRNA kodiert, sinnvoll. Besonders interessant erscheint in diesem Zusammenhang die Frage, inwieweit das RNAi-vermittelte *Gene Silencing* Auswirkungen auf histologische Zeichen der myokardialen Inflammation sowie auf die kardiale und endotheliale Dysfunktion hat.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Parvovirus B19, Erreger der Ringelröteln, des Hydrops fetalis und transienter aplastischer Krisen wurde in den letzten Jahren zunehmend als kardiotropes Virus erkannt. Dabei konnte gezeigt werden, dass B19V über eine persistierende Infektion intramyokardialer Endothelien mit kardialer Dysfunktion und einer inflammatorischen Kardiomyopathie einhergehen kann. Eine spezifische Therapie der B19V-assoziierten inflammatorischen Kardiomyopathie steht gegenwärtig nicht zur Verfügung. Der vor wenigen Jahren erstmals beschriebene Mechanismus des sequenzspezifischen, posttranskriptionalen *Gene Silencing* mittels RNA-Interferenz/shRNA wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Inhibition verschiedener Virusinfektionen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt und scheint demnach auch bei der B19V-Infektion ein vielversprechender gentherapeutischer Ansatz zu sein.

Dementsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig der Einfluss von adenoviral vermittelter shRNA-Konstrukte, welche gegen das Hauptkapsidprotein VP2 von B19V gerichtet waren, auf die Replikation von B19V im UT-7/Epo-Zellkultursystem untersucht. Hierzu wurde über einen mehrtägigen Zeitraum die mRNA von VP2 sowie die des nichtstrukturalen Proteins NS1 nach Transduktion der infizierten Zellen mit shRNA quantifiziert. Zusätzlich erfolgte eine Western-Blot-Analyse von VP2, um die *Silencing*-Aktivität des Adenovektors auf Proteinebene zu überprüfen. Es zeigte sich, dass die verwendete shRNA zu einem deutlichen Silencing von VP2 auf mRNA- und auf Proteinebene und somit zu einer effektiven Inhibition der Virusreplikation in der Lage war.

Die tendenziell erkennbare leichte Reduktion von NS1-mRNA nach Behandlung der Zellen mit shRNA war statistisch nicht signifikant. Folglich ist anzunehmen, dass es zu einer intrazellulären Akkumulation von NS1 kommt. Da NS1 aufgrund seiner zytotoxischen und immunmodulatorischen Wirkung bei der Pathogenese der B19V-assoziierten iCMP bedeutsame Funktionen zuzuschreiben sind, sollten weitere RNAi-Experimente zusätzlich auf eine Inhibition von NS1 abzielen. Eine Kombinationstherapie von VP2- und NS1-spezifischer shRNA müsste zudem das Risiko der Entwicklung von resistenten

Mutanten senken, ein Problem, das häufig bei längerfristiger antiviraler RNAi-Therapie entsteht.

Die in dieser Arbeit erfolgreiche Anwendung von Adenoviren als RNAi-Vektoren birgt *in vivo* die Gefahr einer starken Immunreaktion. Daher sollten für eine zukünftige klinisch einsetzbare RNAi-Therapie der inflammatorischen Kardiomyopathie sicherere Vektorsysteme entwickelt werden. Für diesen Zweck geeignet scheinen insbesondere AAV-Vektoren, welche nur minimale Immunreaktionen hervorrufen.

Die ermutigenden Ergebnisse dieser Arbeit sollen Ausgangspunkt für weitere Zellkulturexperimente und *in vivo*-Studien am B19V-transgenen Mausmodell sein, um sich einer klinischen Evaluation dieses gentherapeutischen Ansatzes einen Schritt zu nähern.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ades, E. W., F. J. Candal, R. A. Swerlick, V. G. George, S. Summers, D. C. Bosse, T. J. Lawley, 1992: HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*, 99, 6, 683-90.
- Allander, T., M. T. Tammi, M. Eriksson, A. Bjerkner, A. Tiveljung-Lindell, B. Andersson, 2005: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 36, 12891-6.
- Anderson, L. J., S. M. Gillespie, T. J. Torok, E. S. Hurwitz, C. J. Tsou, G. W. Gary, 1990: Risk of infection following exposures to human parvovirus B19. *Behring Inst Mitt*, 85, 60-3.
- Anderson, L. J., C. Tsou, R. A. Parker, T. L. Chorba, H. Wulff, P. Tattersall, P. P. Mortimer, 1986: Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 24, 4, 522-6.
- Anderson, M. J., P. G. Higgins, L. R. Davis, J. S. Willman, S. E. Jones, I. M. Kidd, J. R. Pattison, D. A. Tyrrell, 1985: Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis*, 152, 2, 257-65.
- Arista, S., S. De Grazia, V. Di Marco, R. Di Stefano, A. Craxi, 2003: Parvovirus B19 and "cryptogenic" chronic hepatitis. *J Hepatol*, 38, 3, 375-6.
- Arrighi, J. F., M. Pion, M. Wiznerowicz, T. B. Geijtenbeek, E. Garcia, S. Abraham, F. Leuba, V. Dutoit, O. Ducrey-Rundquist, Y. van Kooyk, D. Trono, V. Piguet, 2004: Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J Virol*, 78, 20, 10848-55.
- Asparuhova, M. B., I. Barde, D. Trono, K. Schranz, D. Schumperli, 2008: Development and characterization of a triple combination gene therapy vector inhibiting HIV-1 multiplication. *J Gene Med*, 10, 10, 1059-70.
- Astell, C. R. (1990). Terminal hairpins of parvovirus genomes and their role in DNA replication. Handbook of parvoviruses.
- Azzi, A., M. Morfini, P. M. Mannucci, 1999: The transfusion-associated transmission of parvovirus B19. *Transfus Med Rev*, 13, 3, 194-204.
- Bartel, D. P., 2004: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 2, 281-97.
- Berns, K. I., 1996: Parvoviridae: the viruses and their replication. *Fields virology*, 2173-97.

- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, 2001: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 6818, 363-6.
- Birmingham, A., E. M. Anderson, A. Reynolds, D. Ilesley-Tyree, D. Leake, Y. Fedorov, S. Baskerville, E. Maksimova, K. Robinson, J. Karpilow, W. S. Marshall, A. Khvorova, 2006: 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods*, 3, 3, 199-204.
- Bock, C. T., K. Klingel, S. Aberle, A. Duechting, A. Lupescu, F. Lang, R. Kandolf, 2005: Human parvovirus B19: a new emerging pathogen of inflammatory cardiomyopathy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52, 7-8, 340-3.
- Bock, C. T., K. Klingel, R. Kandolf, 2010: Human parvovirus B19-associated myocarditis. *N Engl J Med*, 362, 13, 1248-9.
- Boden, D., O. Pusch, F. Lee, L. Tucker, B. Ramratnam, 2003: Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol*, 77, 21, 11531-5.
- Bridge, A. J., S. Pebernard, A. Ducraux, A. L. Nicoulaz, R. Iggo, 2003: Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*, 34, 3, 263-4.
- Brown, K. E., S. M. Anderson, N. S. Young, 1993: Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*, 262, 5130, 114-7.
- Brown, K. E., S. W. Green, J. Antunez de Mayolo, J. A. Bellanti, S. D. Smith, T. J. Smith, N. S. Young, 1994a: Congenital anaemia after transplacental B19 parvovirus infection. *Lancet*, 343, 8902, 895-6.
- Brown, K. E., J. R. Hibbs, G. Gallinella, S. M. Anderson, E. D. Lehman, P. McCarthy, N. S. Young, 1994b: Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med*, 330, 17, 1192-6.
- Brown, T., A. Anand, L. D. Ritchie, J. P. Clewley, T. M. Reid, 1984: Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet*, 2, 8410, 1033-4.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards, R. Agami, 2002: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296, 5567, 550-3.
- Bültmann, B. D., K. Klingel, K. Sotlar, C. T. Bock, H. A. Baba, M. Sauter, R. Kandolf, 2003: Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease. *Hum Pathol*, 34, 1, 92-5.

- Candotti, D., N. Etiz, A. Parsyan, J. P. Allain, 2004: Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J Virol*, 78, 22, 12169-78.
- Chen, A. Y., E. Y. Zhang, W. Guan, F. Cheng, S. Kleiboeker, T. M. Yankee, J. Qiu, The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood*, 115, 5, 1070-80.
- Chen, S., M. Kapturczak, S. A. Loiler, S. Zolotukhin, O. Y. Glushakova, K. M. Madsen, R. J. Samulski, W. W. Hauswirth, M. Campbell-Thompson, K. I. Berns, T. R. Flotte, M. A. Atkinson, C. C. Tisher, A. Agarwal, 2005: Efficient transduction of vascular endothelial cells with recombinant adeno-associated virus serotype 1 and 5 vectors. *Hum Gene Ther*, 16, 2, 235-47.
- Chen, W., M. Liu, Y. Jiao, W. Yan, X. Wei, J. Chen, L. Fei, Y. Liu, X. Zuo, F. Yang, Y. Lu, Z. Zheng, 2006: Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both in vitro and in vivo. *J Virol*, 80, 7, 3559-66.
- Christensen, J., S. F. Cotmore, P. Tattersall, 1995: Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J Virol*, 69, 9, 5422-30.
- Christensen, J., S. F. Cotmore, P. Tattersall, 1997: A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J Virol*, 71, 2, 1405-16.
- Cohen, B. J., M. M. Buckley, 1988: The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J Med Microbiol*, 25, 2, 151-3.
- Cossart, Y. E., A. M. Field, B. Cant, D. Widdows, 1975: Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*, 1, 7898, 72-3.
- Daya, S., K. I. Berns, 2008: Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*, 21, 4, 583-93.
- Dimmeler, S., A. M. Zeiher, 2000: Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res*, 87, 6, 434-9.
- Doerig, C., B. Hirt, J. P. Antonietti, P. Beard, 1990: Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J Virol*, 64, 1, 387-96.
- Drexler, H., 1999: Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc Res*, 43, 3, 572-9.
- Duechting, A., C. Tschöpe, H. Kaiser, T. Lamkemeyer, N. Tanaka, S. Aberle, F. Lang, J. Torresi, R. Kandolf, C. T. Bock, 2008: Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. *J Virol*, 82, 16, 7942-52.

- Erdman, D. D., E. L. Durigon, Q. Y. Wang, L. J. Anderson, 1996: Genetic diversity of human parvovirus B19: sequence analysis of the VP1/VP2 gene from multiple isolates. *J Gen Virol*, 77 (Pt 11), 2767-74.
- Esau, C. C., B. P. Monia, 2007: Therapeutic potential for microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, 59, 2-3, 101-14.
- Fairley, C. K., J. S. Smoleniec, O. E. Caul, E. Miller, 1995: Observational study of effect of intrauterine transfusions on outcome of fetal hydrops after parvovirus B19 infection. *Lancet*, 346, 8986, 1335-7.
- Fechner, H., S. Pinkert, X. Wang, I. Sipo, L. Suckau, J. Kurreck, A. Dorner, K. Sollerbrant, H. Zeichhardt, H. P. Grunert, R. Vetter, H. P. Schultheiss, W. Poller, 2007: Coxsackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited by vector-mediated RNA interference targeting their common receptor. *Gene Ther*, 14, 12, 960-71.
- Ferguson, P. J., F. T. Saulsbury, S. F. Dowell, T. J. Torok, D. D. Erdman, L. J. Anderson, 1996: Prevalence of human parvovirus B19 infection in children with Henoch-Schonlein purpura. *Arthritis Rheum*, 39, 5, 880-1.
- Finkel, T. H., T. J. Torok, P. J. Ferguson, E. L. Durigon, S. R. Zaki, D. Y. Leung, R. J. Harbeck, E. W. Gelfand, F. T. Saulsbury, J. R. Hollister, et al., 1994: Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotising vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent? *Lancet*, 343, 8908, 1255-8.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, 1998: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 6669, 806-11.
- Frickhofen, N., J. L. Abkowitz, M. Safford, J. M. Berry, J. Antunez-de-Mayolo, A. Astrow, R. Cohen, I. Halperin, L. King, D. Mintzer, et al., 1990: Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Intern Med*, 113, 12, 926-33.
- Gabriel, S. E., M. Espy, D. D. Erdman, J. Bjornsson, T. F. Smith, G. G. Hunder, 1999: The role of parvovirus B19 in the pathogenesis of giant cell arteritis: a preliminary evaluation. *Arthritis Rheum*, 42, 6, 1255-8.
- Gallinella, G., E. Manaresi, E. Zuffi, S. Venturoli, L. Bonsi, G. P. Bagnara, M. Musiani, M. Zerbini, 2000: Different patterns of restriction to B19 parvovirus replication in human blast cell lines. *Virology*, 278, 2, 361-7.
- Gil, J., M. Esteban, 2000: Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, 5, 2, 107-14.
- Gitlin, L., J. K. Stone, R. Andino, 2005: Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *J Virol*, 79, 2, 1027-35.

- Goodear, M., C. Hayward, C. Crowther, 1998: Foetal intracardiac transfusion for the treatment of severe anaemia due to human parvovirus B-19 infection. *Australas Radiol*, 42, 3, 275-7.
- Grimm, D., K. L. Streetz, C. L. Jopling, T. A. Storm, K. Pandey, C. R. Davis, P. Marion, F. Salazar, M. A. Kay, 2006: Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 441, 7092, 537-41.
- Grishok, A., A. E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D. L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun, C. C. Mello, 2001: Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106, 1, 23-34.
- Grishok, A., H. Tabara, C. C. Mello, 2000: Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*, 287, 5462, 2494-7.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, 2000: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404, 6775, 293-6.
- Hannon, G. J., 2002: RNA interference. *Nature*, 418, 6894, 244-51.
- Harfe, B. D., 2005: MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 4, 410-5.
- Harris, J. W., 1992: Parvovirus B19 for the hematologist. *Am J Hematol*, 39, 2, 119-30.
- Hatfield, S., H. Ruohola-Baker, 2008: microRNA and stem cell function. *Cell Tissue Res*, 331, 1, 57-66.
- He, Z., H. Zhuang, X. Wang, S. Song, Q. Dong, J. Yan, G. C. Buehring, G. Luo, 2003: Retrospective analysis of non-A-E hepatitis: possible role of hepatitis B and C virus infection. *J Med Virol*, 69, 1, 59-65.
- Heegaard, E. D., K. E. Brown, 2002: Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev*, 15, 3, 485-505.
- Heegaard, E. D., K. Schmiegelow, 2002: Serologic study on parvovirus b19 infection in childhood acute lymphoblastic leukemia during chemotherapy: clinical and hematologic implications. *J Pediatr Hematol Oncol*, 24, 5, 368-73.
- Hommel, J. D., R. M. Sears, D. Georgescu, D. L. Simmons, R. J. DiLeone, 2003: Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med*, 9, 12, 1539-44.
- Hornung, V., M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougerolles, S. Endres, G. Hartmann, 2005: Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med*, 11, 3, 263-70.

- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, P. D. Zamore, 2001: A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293, 5531, 834-8.
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet, P. S. Linsley, 2003: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 21, 6, 635-7.
- Jackson, A. L., J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova, P. S. Linsley, 2006: Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA*, 12, 7, 1197-205.
- Jindal, H. K., C. B. Yong, G. M. Wilson, P. Tam, C. R. Astell, 1994: Mutations in the NTP-binding motif of minute virus of mice (MVM) NS-1 protein uncouple ATPase and DNA helicase functions. *J Biol Chem*, 269, 5, 3283-9.
- Jones, M. S., A. Kapoor, V. V. Lukashov, P. Simmonds, F. Hecht, E. Delwart, 2005: New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol*, 79, 13, 8230-6.
- Judge, A. D., V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan, 2005: Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol*, 23, 4, 457-62.
- Kandolf, R., 2004: [Virus etiology of inflammatory cardiomyopathy]. *Dtsch Med Wochenschr*, 129, 41, 2187-92.
- Kaplitt, M. G., A. Feigin, C. Tang, H. L. Fitzsimons, P. Mattis, P. A. Lawlor, R. J. Bland, D. Young, K. Strybing, D. Eidelberg, M. J. During, 2007: Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet*, 369, 9579, 2097-105.
- Kariko, K., P. Bhuyan, J. Capodici, D. Weissman, 2004: Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol*, 172, 11, 6545-9.
- Klingel, K., M. Sauter, C. T. Bock, G. Szalay, J. J. Schnorr, R. Kandolf, 2004: Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol*, 193, 2-3, 101-7.
- Kühl, U., M. Pauschinger, T. Bock, K. Klingel, C. P. Schwimmbeck, B. Seeberg, L. Krautwurm, W. Poller, H. P. Schultheiss, R. Kandolf, 2003: Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation*, 108, 8, 945-50.
- Kühl, U., M. Pauschinger, M. Noutsias, B. Seeberg, T. Bock, D. Lassner, W. Poller, R. Kandolf, H. P. Schultheiss, 2005: High prevalence of viral

- genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation*, 111, 7, 887-93.
- Kurreck, J., 2009: RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 8, 1378-98.
- Kurtzman, G., N. Frickhofen, J. Kimball, D. W. Jenkins, A. W. Nienhuis, N. S. Young, 1989: Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N Engl J Med*, 321, 8, 519-23.
- Langnas, A. N., R. S. Markin, M. S. Cattral, S. J. Naides, 1995: Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology*, 22, 6, 1661-5.
- Lehrman, S., 1999: Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature*, 401, 6753, 517-8.
- Levy, R., A. Weissman, G. Blomberg, Z. J. Hagay, 1997: Infection by parvovirus B 19 during pregnancy: a review. *Obstet Gynecol Surv*, 52, 4, 254-9.
- Liu, J. M., S. W. Green, T. Shimada, N. S. Young, 1992: A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J Virol*, 66, 8, 4686-92.
- Livak, K. J., T. D. Schmittgen, 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 4, 402-8.
- Luo, W., C. R. Astell, 1993: A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology*, 195, 2, 448-55.
- MacKenzie, K. L., N. R. Hackett, R. G. Crystal, M. A. Moore, 2000: Adenoviral vector-mediated gene transfer to primitive human hematopoietic progenitor cells: assessment of transduction and toxicity in long-term culture. *Blood*, 96, 1, 100-8.
- Manno, C. S., G. F. Pierce, V. R. Arruda, B. Glader, M. Ragni, J. J. Rasko, M. C. Ozelo, K. Hoots, P. Blatt, B. Konkle, M. Dake, R. Kaye, M. Razavi, A. Zajko, J. Zehnder, P. K. Rustagi, H. Nakai, A. Chew, D. Leonard, J. F. Wright, R. R. Lessard, J. M. Sommer, M. Tigges, D. Sabatino, A. Luk, H. Jiang, F. Mingozzi, L. Couto, H. C. Ertl, K. A. High, M. A. Kay, 2006: Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*, 12, 3, 342-7.
- Martin, S. E., N. J. Caplen, 2007: Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8, 81-108.
- Miller, E., C. K. Fairley, B. J. Cohen, C. Seng, 1998: Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 105, 2, 174-8.

- Minks, M. A., D. K. West, S. Benveniste, C. Baglioni, 1979: Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem*, 254, 20, 10180-3.
- Mitchell, L. A., 2002: Parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein as a transactivator of interleukin-6 synthesis: common pathway in inflammatory sequelae of human parvovirus infections? *J Med Virol*, 67, 2, 267-74.
- Moffatt, S., N. Yaegashi, K. Tada, N. Tanaka, K. Sugamura, 1998: Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol*, 72, 4, 3018-28.
- Moore, T. L., 2000: Parvovirus-associated arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 12, 4, 289-94.
- Morey, A. L., J. W. Keeling, H. J. Porter, K. A. Fleming, 1992: Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus. *Br J Obstet Gynaecol*, 99, 7, 566-74.
- Moss, R. B., D. Rodman, L. T. Spencer, M. L. Aitken, P. L. Zeitlin, D. Waltz, C. Milla, A. S. Brody, J. P. Clancy, B. Ramsey, N. Hamblett, A. E. Heald, 2004: Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest*, 125, 2, 509-21.
- Munakata, Y., T. Saito-Ito, K. Kumura-Ishii, J. Huang, T. Kodera, T. Ishii, Y. Hirabayashi, Y. Koyanagi, T. Sasaki, 2005: Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood*, 106, 10, 3449-56.
- Naides, S. J., 1998: Rheumatic manifestations of parvovirus B19 infection. *Rheum Dis Clin North Am*, 24, 2, 375-401.
- Nigro, G., V. Bastianon, V. Colloridi, F. Ventriglia, P. Gallo, G. D'Amati, W. C. Koch, S. P. Adler, 2000: Human parvovirus B19 infection in infancy associated with acute and chronic lymphocytic myocarditis and high cytokine levels: report of 3 cases and review. *Clin Infect Dis*, 31, 1, 65-9.
- Nigro, G., M. Zerbini, A. Krzysztofiak, G. Gentilomi, M. A. Porcaro, T. Mango, M. Musiani, 1994: Active or recent parvovirus B19 infection in children with Kawasaki disease. *Lancet*, 343, 8908, 1260-1.
- Nikkari, S., R. Luukkainen, T. Mottonen, O. Meurman, P. Hannonen, M. Skurnik, P. Toivanen, 1994: Does parvovirus B19 have a role in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*, 53, 2, 106-11.
- Norja, P., K. Hokynar, L. M. Aaltonen, R. Chen, A. Ranki, E. K. Partio, O. Kiviluoto, I. Davidkin, T. Leivo, A. M. Eis-Hubinger, B. Schneider, H. P. Fischer, R. Tolba, O. Vapalahti, A. Vaheri, M. Soderlund-Venermo, K. Hedman, 2006a: Bioportfolio: lifelong persistence of variant and

- prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19, 7450-3.
- Nykanen, A., B. Haley, P. D. Zamore, 2001: ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107, 3, 309-21.
- Ozawa, K., J. Ayub, Y. S. Hao, G. Kurtzman, T. Shimada, N. Young, 1987: Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J Virol*, 61, 8, 2395-406.
- Ozawa, K., N. Young, 1987: Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J Virol*, 61, 8, 2627-30.
- Paddison, P. J., A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon, D. S. Conklin, 2002: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 16, 8, 948-58.
- Parsyan, A., C. Szmaragd, J. P. Allain, D. Candotti, 2007: Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J Gen Virol*, 88, Pt 2, 428-31.
- Paulus, W. J., J. G. Bronzwaer, 2002: Myocardial contractile effects of nitric oxide. *Heart Fail Rev*, 7, 4, 371-83.
- Paulus, W. J., P. J. Vantrimpont, A. M. Shah, 1995: Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans. *Circulation*, 92, 8, 2119-26.
- Pauschinger, M., J. Bilger, J. Schwab, 2009: [Myocarditis]. *Dtsch Med Wochenschr*, 134, 16, 835-44; quiz 845-8.
- Peters, K., R. E. Unger, J. Brunner, C. J. Kirkpatrick, 2003: Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res*, 60, 1, 49-57.
- Pushparaj, P. N., J. J. Aarthi, J. Manikandan, S. D. Kumar, 2008: siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo applications. *J Dent Res*, 87, 11, 992-1003.
- Puthenveetil, S., L. Whitby, J. Ren, K. Kelnar, J. F. Krebs, P. A. Beal, 2006: Controlling activation of the RNA-dependent protein kinase by siRNAs using site-specific chemical modification. *Nucleic Acids Res*, 34, 17, 4900-11.
- Ren, X., G. Luo, Z. Xie, L. Zhou, X. Kong, A. Xu, 2006: Inhibition of multiple gene expression and virus replication of HBV by stable RNA interference in 2.2.15 cells. *J Hepatol*, 44, 4, 663-70.
- Reynolds, A., E. M. Anderson, A. Vermeulen, Y. Fedorov, K. Robinson, D. Leake, J. Karpilow, W. S. Marshall, A. Khvorova, 2006: Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA*, 12, 6, 988-93.

- Richardson, P., W. McKenna, M. Bristow, B. Maisch, B. Mautner, J. O'Connell, E. Olsen, G. Thiene, J. Goodwin, I. Gyarfás, I. Martin, P. Nordet, 1996: Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93, 5, 841-2.
- Rodis, J. F., D. L. Quinn, G. W. Gary, Jr., L. J. Anderson, S. Rosengren, M. L. Cartter, W. A. Campbell, A. M. Vintzileos, 1990: Management and outcomes of pregnancies complicated by human B19 parvovirus infection: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol*, 163, 4 Pt 1, 1168-71.
- Rouger, P., P. Gane, C. Salmon, 1987: Tissue distribution of H, Lewis and P antigens as shown by a panel of 18 monoclonal antibodies. *Rev Fr Transfus Immunohematol*, 30, 5, 699-708.
- Saarinen, U. M., T. L. Chorba, P. Tattersall, N. S. Young, L. J. Anderson, E. Palmer, P. F. Coccia, 1986: Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood*, 67, 5, 1411-7.
- Sanabani, S., W. K. Neto, J. Pereira, E. C. Sabino, 2006: Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *J Clin Microbiol*, 44, 2, 604-6.
- Schlee, M., V. Hornung, G. Hartmann, 2006: siRNA and isRNA: two edges of one sword. *Mol Ther*, 14, 4, 463-70.
- Semizarov, D., L. Frost, A. Sarthy, P. Kroeger, D. N. Halbert, S. W. Fesik, 2003: Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11, 6347-52.
- Sen, S., S. Conroy, S. O. Hynes, J. McMahon, A. O'Doherty, J. S. Bartlett, Y. Akhtar, T. Adegbola, C. E. Connolly, S. Sultan, F. Barry, Z. S. Katusic, T. O'Brien, 2008: Gene delivery to the vasculature mediated by low-titre adeno-associated virus serotypes 1 and 5. *J Gene Med*, 10, 2, 143-51.
- Servant, A., S. Laperche, F. Lallemand, V. Marinho, G. De Saint Maur, J. F. Meritet, A. Garbarg-Chenon, 2002: Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol*, 76, 18, 9124-34.
- Shimomura, S., N. Komatsu, N. Frickhofen, S. Anderson, S. Kajigaya, N. S. Young, 1992: First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. *Blood*, 79, 1, 18-24.
- Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, B. R. Williams, 2003: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 5, 9, 834-9.
- Smith-Whitley, K., H. Zhao, R. L. Hodinka, J. Kwiatkowski, R. Cecil, T. Cecil, A. Cnaan, K. Ohene-Frempong, 2004: Epidemiology of human parvovirus B19 in children with sickle cell disease. *Blood*, 103, 2, 422-7.

- Sokal, E. M., M. Melchior, C. Cornu, A. T. Vandembroucke, J. P. Buts, B. J. Cohen, G. Burtonboy, 1998: Acute parvovirus B19 infection associated with fulminant hepatitis of favourable prognosis in young children. *Lancet*, 352, 9142, 1739-41.
- St Amand, J., C. R. Astell, 1993: Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology*, 192, 1, 121-31.
- Sui, G., C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, W. C. Forrester, 2002: A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8, 5515-20.
- Sui, H. Y., G. Y. Zhao, J. D. Huang, D. Y. Jin, K. Y. Yuen, B. J. Zheng, 2009: Small interfering RNA targeting m2 gene induces effective and long term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One*, 4, 5, e5671.
- Tabara, H., E. Yigit, H. Siomi, C. C. Mello, 2002: The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*, 109, 7, 861-71.
- Takigawa, Y., M. Nagano-Fujii, L. Deng, R. Hidajat, M. Tanaka, H. Mizuta, H. Hotta, 2004: Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol*, 48, 8, 591-8.
- Tam, O. H., A. A. Aravin, P. Stein, A. Girard, E. P. Murchison, S. Cheloufi, E. Hodges, M. Anger, R. Sachidanandam, R. M. Schultz, G. J. Hannon, 2008: Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, 453, 7194, 534-8.
- ter Brake, O., P. Konstantinova, M. Ceylan, B. Berkhout, 2006: Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Mol Ther*, 14, 6, 883-92.
- Tschöpe, C., C. T. Bock, M. Kasner, M. Noutsias, D. Westermann, P. L. Schwimmbeck, M. Pauschinger, W. C. Poller, U. Kuhl, R. Kandolf, H. P. Schultheiss, 2005: High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation*, 111, 7, 879-86.
- von dem Borne, A. E., M. J. Bos, N. Joustra-Maas, J. F. Tromp, M. B. van't Veer, R. van Wijngaarden-du Bois, P. A. Tetteroo, 1986: A murine monoclonal IgM antibody specific for blood group P antigen (globoside). *Br J Haematol*, 63, 1, 35-46.
- Watanabe, T., Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Obata, H. Chiba, Y. Kohara, T. Kono, T. Nakano, M. A. Surani, Y. Sakaki, H. Sasaki, 2008: Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 453, 7194, 539-43.

- Weigel-Kelley, K. A., M. C. Yoder, A. Srivastava, 2003: Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood*, 102, 12, 3927-33.
- Wilson, J. A., C. D. Richardson, 2005: Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol*, 79, 11, 7050-8.
- Wollert, K. C., H. Drexler, 2002: Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev*, 7, 4, 317-25.
- Wolf, A. D., G. V. Campion, A. Chishick, S. Wise, B. J. Cohen, P. T. Klouda, O. Caul, P. A. Dieppe, 1989: Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch Intern Med*, 149, 5, 1153-6.
- Yaegashi, N., T. Niinuma, H. Chisaka, T. Watanabe, S. Uehara, K. Okamura, S. Moffatt, K. Sugamura, A. Yajima, 1998: The incidence of, and factors leading to, parvovirus B19-related hydrops fetalis following maternal infection; report of 10 cases and meta-analysis. *J Infect*, 37, 1, 28-35.
- Yi, R., B. P. Doehle, Y. Qin, I. G. Macara, B. R. Cullen, 2005: Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA*, 11, 2, 220-6.
- Yotnda, P., H. Onishi, H. E. Heslop, D. Shayakhmetov, A. Lieber, M. Brenner, A. Davis, 2001: Efficient infection of primitive hematopoietic stem cells by modified adenovirus. *Gene Ther*, 8, 12, 930-7.
- Young, N. S., K. E. Brown, 2004: Parvovirus B19. *N Engl J Med*, 350, 6, 586-97.
- Zhang, S., B. Zhao, H. Jiang, B. Wang, B. Ma, 2007: Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J Control Release*, 123, 1, 1-10.
- Zhi, N., I. P. Mills, J. Lu, S. Wong, C. Filippone, K. E. Brown, 2006: Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J Virol*, 80, 12, 5941-50.
- Zincarelli, C., S. Soltys, G. Rengo, J. E. Rabinowitz, 2008: Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*, 16, 6, 1073-80.
- Zinke, M., S. Kendl, K. Singethan, M. Fehrholz, D. Reuter, L. Rennick, M. J. Herold, J. Schneider-Schaulies, 2009: Clearance of measles virus from persistently infected cells by short hairpin RNA. *J Virol*, 83, 18, 9423-31.

7 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. C.-Thomas Bock für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Übernahme des Erstgutachtens, die Diskussionsbereitschaft sowie für seine freundliche Unterstützung, die mir auch in schwierigen Phasen den entscheidenden Aufschwung geben konnte.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Kandolf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Abteilung für Molekulare Pathologie.

Herzlicher Dank gebührt auch Frau Anja Düchting für die freundliche Betreuung in der Anfangsphase der Arbeit und Frau Heike Kaiser für ihre Hilfsbereitschaft bei der methodischen Einarbeitung.

Großer Dank gilt auch Frau Stefanie Simonovic, Frau Friederike Utta und Frau Rosa Mammato, die mir stets mit ihrer Erfahrung und wertvollen Ratschlägen zur Seite standen und dadurch einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit lieferten. Frau Stefanie Simonovic danke ich darüber hinaus für das Korrekturlesen der Dissertation.

Für die fachlichen Ratschläge zum Umgang mit den Adenovektoren bin ich Herrn Henry Fechner zu Dank verpflichtet.

Frau Susanne Aberle, Frau Birgit Haack, Herrn Bernd Köberlein sowie den weiteren Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die vielen fachlichen Anregungen und ihren Beitrag zur angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Die medizinischen Doktoranden der Abteilung (Ariane, Christian, Christine, Markus, Martin und Stefan) waren durch ihre Kollegialität und den Erfahrungsaustausch im Labor eine große Stütze. Dafür herzlichen Dank.

Meiner Freundin Agnes Hirschmann danke ich für ihre Unterstützung und ihre Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

8 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Marius Rolf Gernot Brandt
Geburtsdatum	22.02.1984
Geburtsort	Bühl/Baden
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

STUDIUM

23.11.2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit März 2007	Dissertation in der Abteilung für Molekulare Pathologie, Institut für Pathologie, Tübingen: <i>Parvovirus B19-assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie: Inhibition der Virusreplikation durch Adenovektor-vermittelte RNA-Interferenz.</i>
September 2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Oktober 2004	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen

FREIWILLIGES SOZIALES JAHR

August 2003 – Juli 2004	Im Rettungsdienst beim DRK Kreisverband Reutlingen, Ausbildung zum Rettungssanitäter
-------------------------	--

SCHULE

1994 – 2003	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Metzingen, Abschluss: Abitur
1990 – 1994	Grundschule Metzingen

VERÖFFENTLICHUNGEN

Poster	75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 16.-18. April 2009: <i>Inhibition der Parvovirus B19-Replikation in UT-7/Epo-Zellen durch B19V-VP2-shRNA-Konstrukte.</i> M. Brandt , J. Kurreck, H. Fechner, R. Kandolf, C.-T. Bock (Tübingen, Stuttgart, Berlin)
--------	--