

**„Untersuchung der Anwendbarkeit von siRNA als
antivirales Agens zur Inhibition der Replikation von
Masernviren“**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Thorsten Reuter

aus

Esslingen a. N.

Würzburg, 2006

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation „ Untersuchung der Anwendbarkeit von siRNA als antivirales Agens zur Inhibition der Replikation von Masernviren “ selbständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß die Dissertation weder in gleicher Form noch in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, im April 2006

(Thorsten Reuter)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Masern Virus	6
1.2 Einführung	6
1.3 Klassifizierung	6
1.4 Klinik und Pathologie	7
1.5 Masern Virus induzierte Immunsuppression	9
1.6 Epidemiologie	9
1.7 Morphologie, Struktur und biologische Eigenschaften	10
1.8 Genomstruktur, Funktion und Replikation	12
1.8.1 Das virale RNP und nicht-Strukturproteine	13
1.8.2 Das Hüllproteine	15
1.9 Der Replikationszyklus	16
1.9.1 Rezeptor-Interaktion und Aufnahme	16
1.9.2 Intrazelluläre Replikation, Partikelzusammen- und Freisetzung	17
1.10 RNA Interferenz	19
1.10.1 Einführung RNA Interferenz	19
1.10.2 Prozessierung doppelsträngiger RNA	20
1.10.3 Der „RNA Silencing Complex“ (RISC)	20
1.10.4 mRNA Abbau und Inhibition der Translation	21
1.10.5 Regulation der RNA Interferenz	23
1.10.6 Anwendungsbereich der RNA Interferenz	24
1.10.7 Methoden zur siRNA Expression	24
1.10.8 Der lentivirale Vektor pLL3.7	26
1.11 Ziel der Arbeit	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Chemikalien	29
2.1.2 Antibiotika	30
2.1.3 Enzyme	30
2.1.4 Kits	30
2.1.5 Transfektionsreagenzien	30
2.1.6 Größen- und Längenstandarts	30
2.1.7 Antikörper und Antiseren	30
2.1.8 Oligonukleotide	31
2.1.9 Bakterien	32
2.1.10 Zelllinien	32
2.1.11 Medien	32
2.1.12 Plasmide	33
2.1.13 Puffer	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Zellbiologische Methoden	34
2.2.1.1 Zellkultur	34
2.2.1.2 siRNA Transfektion mit HiPerFect	34
2.2.1.3. DNA Transfektion mit Lipofectamin2000	34
2.2.1.4 Einfrieren / Auftauen von Zellen	34
2.2.1.5. Viruspräparation	35

2.2.1.6 Titerbestimmung der Viruspräparation mittels Plaquetest	35
2.2.1.7 Titerbestimmung der Viruspräparation mittels Endpunkttitration	36
2.2.2. Histochemische Methoden	36
2.2.2.1 Immunfluoreszenz	36
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	36
2.2.3.1 Agarose Gelelektrophorese	36
2.2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
2.2.3.3 Aufreinigung von PCR Produkten	37
2.2.3.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	37
2.2.3.5 Transformation von Bakterien	38
2.2.3.6 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse	38
2.2.3.7 Restriktionsverdau von DNA	39
2.2.3.8 Tricine-SDS-PAGE	39
2.2.3.9 Western Blot Analyse	39
2.2.3.10 „ShortCut“ siRNA Präparation	40
2.2.3.11 Real-Time PCR	41
3. Ergebnisse	43
3.1 Transkription doppelsträngiger RNA von DNA Plasmid-Vorlagen	43
3.2 ShortCut RNase-III Verdau	44
3.3 Kontrollen: Interferon-Induktion durch siRNA und Spezifität der siRNA	44
3.4 Versuchsaufbau der siRNA Experimente	46
3.5 Cis-Effekte der siRNA	46
3.6 Trans-Effekte der siRNA	47
3.7 Effekte der M-siRNA auf die Genexpression	48
3.7.1 Quantifizierung der Proteinexpression	49
3.8 Einfluss von Hüllprotein-spezifischer siRNA auf die Synzitenbildung	50
3.9 Einfluss von F/H siRNA auf die Expression der Glykoproteine	51
3.10 Einfluss der M-siRNA auf die Expression des M-Proteins	52
3.11 Einfluss von RNP spezifischer siRNA auf die Expression von MV-N und MV-P	53
3.12 Einfluss der MV spezifischen siRNA auf mRNA Ebene	54
3.12.1 Semi-quantitative RT-PCR	54
3.12.2 Real Time RT-PCR	56
3.13 Herstellung shRNA exprimierender lentiviraler Vektoren	58
3.13.1 Identifizierung der Zielsequenzen	58
3.13.2 Klonierung der „Short Hairpin“ Expressionskassette für L#1 und L#2	59
3.13.3 Produktion lentiviraler Partikel	60
4. Diskussion	61
4.1 RNA Interferenz gegen MV N-, P- und L	61
4.2 RNA Interferenz gegen die Nicht-Struktur Proteine F und H	64
4.3 RNA Interferenz gegen das Matrix Protein	65
4.4 Expression L-spezifischer shRNA durch den lentiviralen Vektor pLL 3.7	66
4.5 RNAi im Tiermodell	68
5. Zusammenfassung	71
5.1 Zusammenfassung (dt.)	71
5.2 Summary	71
6. Veröffentlichungen	73
6.1 Fachmagazine	73

6.2 Poster	73
7. Lebenslauf	74
8. Literaturverzeichnis	75

1. Einleitung

1.1 Masern Virus

1.2 Einführung

Akute Masern sind eine bekannte und gut definierte Erkrankung, die meistens bei Kindern oder jungen Erwachsenen auftritt. Der Erreger (Masernvirus) ist hoch ansteckend und persistiert in einer Bevölkerung, sobald eine genügende große Anzahl anfälliger Individuen vorhanden ist. Nach einer akuten Infektion erlangen die Erkrankten eine lang anhaltende Immunität gegenüber dem Virus. In der Zeit als Impfungen noch nicht verfügbar waren gab es die höchste Infektionsrate bei Kindern zwischen 5 und 9 Jahren (Entwickelte Länder). Ausbrüche und Epidemien hatten meist an Grundschulen ihren Anfang, wobei sich jüngere Kinder bei ihren Klassenkameraden ansteckten. Bis zum Alter von 20 Jahren waren ca. 99% der getesteten Personen bereits in Kontakt mit Masern Viren gewesen. Die Schwere der Erkrankung hängt stark von dem Ernährungszustand der infizierten Personen ab. Unterernährung begünstigt dabei einen schwereren Verlauf. Die Mortalität beträgt ca. 10%.

1.3 Klassifizierung

Das Masern Virus (MV) gehört zur Ordnung *Mononegavirales*, welche die Familien der *Rhabdo-*, *Filo-* und *Paramyxoviridae* einschließt. Da MV keine Virus assoziierte Neueramidase- Aktivität besitzt und intrazelluläre Einschlusskörper bildet wurde es in einem separaten Genus der *Morbiliviren* eingruppiert. Andere Mitglieder dieses Genus sind *Peste des petits ruminantes virus* (PPRV), welches Schafe und Ziegen infiziert, *Rinderpest Virus* (RPV), welches Rinder infiziert, *Canine distemper virus* (CDV), welches Carnivore infiziert, *Phocine distemper virus* (PDV), welches Robben und Seelöwen infiziert, *Dolphin morbilli virus* (DMV) und *Tümmeler morbillivirus* (PMV). Alle diese Viren zeigen antigenische Ähnlichkeiten und verursachen gleichartige Erkrankungen bei ihren Wirten.

1.4 Klinik und Pathologie

Die Masern sind eine schwere, hochfiebrige Krankheit. Asymptomatische oder subklinische Verläufe gibt es nur sehr selten. Die Inkubationszeit dauert etwa neun bis elf Tage. Zu den ersten Symptomen gehören Bindehautentzündung, Lichtscheue, Husten, Schnupfen und schnell ansteigendes Fieber. Ein sicheres Anzeichen sind die sog. Koplikschen Flecken in der Mundschleimhaut. Etwa 2-3 Tage nach den ersten Anzeichen sinkt das Fieber wieder. Erst anschließend tritt gleichzeitig mit erneutem Fieberanstieg der Hautausschlag auf, zuerst hinter den Ohren und im Nacken, dann im Gesicht. Innerhalb von wenigen Tagen breitet er sich auf den ganzen Körper aus. Nach 2-3 Tagen klingt das Exanthem wieder ab. Die symptomatische Phase dauert etwa 10 Tage. Komplikationen sind eine Pneumonie, Bronchopneumonie, Mittelohrentzündung und eine postinfektiöse autoimmune Encephalitis. Veränderungen im EEG werden auch ohne erkennbare Infektion des ZNS in 50% der Fälle gefunden. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Eine Leberentzündung tritt vor allem bei Erwachsenen auf. Sie beschränkt sich im wesentlichen auf das Epithel der Gallengänge. Eine Infektion des Darmepithels ist häufig und äußert sich durch Diarrhoe. Bei immundefizienten Patienten verlaufen die Masern schwer, zum Teil unter Ausbildung mehrkerniger Zellen im Bronchialbaum und in der Lunge (Riesenzellpneumonie).

Die Masernviren infizieren zuerst Schleimhautzellen der oberen Atemwege (Sakaguchi et al., 1986). Die Folgen sind Niesen, Schnupfen und Husten. Vom oberen Respirationstrakt kann sich das Virus weiter in den unteren Bronchialbaum ausbreiten und peribronchiale Entzündungen verursachen. Die Schädigung des bronchialen Flimmerepithels fördert die Überinfektion mit verschiedenen bakteriellen Erregern, so dass eine Lungenentzündung entstehen kann. Das an den primären Infektionsorten freigesetzte Virus infiziert Makrophagen oder dendritische Zellen, die es zu den drainierenden Lymphknoten bringen. Dort vermehrt sich das Virus und es kommt zur sog. Primären Virämie (Forthal et al., 1992). Weitere Vermehrungsorte sind Endothelzellen, Makrophagen, Mono- und Lymphozyten (Esolen et al., 1993; Schneider-Schaulies et al., 1991). Die charakteristischen Whartin-Finkeldeyschen Riesenzellen entstehen durch F-Protein vermittelte Fusion der infizierten Endothelzellen mit den Nachbarzellen. Sie finden sich später auch in anderen Geweben. Während der zweiten Virämie, die etwa drei bis fünf Tage andauert, vermehrt sich das Virus in verschiedenen Organen (Haut, Nieren, Leber, Harnblase, Gastrointestinaltrakt). Die Kapillarinfection der Haut äußert sich als Exanthem, in dem sich Virus nachweisen lässt. Das Auftreten des Ausschlags zeigt den Beginn der Immunantwort an. Bei Menschen mit geschädigtem Immunsystem fehlt diese Reaktion, es kommt zu keinem Exanthem. MHC

Klasse I-restringierte zytotoxische T-Zellen wandern in die infizierten Bereiche der Haut ein, lysieren infizierte Zellen und eliminieren so das Virus.

Komplikationen bei akuten Masern sind häufig und entstehen durch opportunistische Sekundärinfektionen nekrotischer Oberflächen wie z.B. im Respiratorischen- oder Gastrointestinaltrakt (Breitfeld et al., 1973; Gremillion and Crawford, 1981; Pullan et al., 1976). Die schwersten von Masern direkt induzierten Komplikationen sind die akute Einschlußkörperchen-Encephalitis (MIBE), die akute para- oder postinfektiöse Masern-Encephalitis (APME) und die subakute sklerosierende Panencephalitis (SSPE):

1. APME: Diese Form der Encephalitis findet man bei ca. einer von 1000-2000 Maserninfektionen. Sie tritt vor allem bei Kindern auf, die älter als 2 Jahre sind und entwickelt sich gleichzeitig mit oder etwa eine Woche nach Auftreten des Ausschlags. Das Masernvirus ist im Gehirn nicht nachweisbar. Die postinfektiöse Encephalitis äußert sich durch die Entmarkung der Myelinscheiden im Gehirn durch Autoimmunreaktionen. Es ist unklar, wodurch dieser Angriff auf körpereigenes Gewebe induziert wird und ob dabei Ähnlichkeiten zwischen viralen und zellulären Proteinen eine Rolle spielen. 10-20% der postinfektiösen Encephaliden verlaufen tödlich (Gendelman et al., 1984; Liebert et al., 1988).
2. MIBE: Diese stets tödliche Form der Encephalitis schließt sich nach einer Pause von sechs bis zehn Monaten an die akute Erkrankung an. Sie tritt nur bei Patienten mit Immundefekten oder -suppression auf. Das Masernvirus kann in diesen Fällen aus dem Gehirn isoliert werden. Die Krankheit erstreckt sich vorzugsweise auf die zellhaltigen Bereiche des Gehirns. Viele Neuronen und Gliazellen, in denen sich das Virus vermehrt, weisen Einschlußkörperchen auf (Baczko et al., 1988; Bitnun et al., 1999).
3. SSPE: Die stets tödliche SSPE ist eine seltene, späte Komplikation einer persistenten Masernvirusinfektion. Sie tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:10000 akuten Masernfällen sechs bis 15 Jahre nach der akuten Erkrankung auf, oft dann wenn die Infektion früh im Alter bis zu 2 Jahren erfolgte. Sie tritt häufiger bei männlichen als bei weiblichen Patienten auf. Die ersten Hinweise auf die Spätfolgen der Masernerkrankung geben sehr hohe Antikörpertiter im Blut und Liquor gegen die H- und N-Proteine. Vermutlich infiziert das Virus die Gehirnendothelzellen und tritt von dort in das Gehirn über. Im Gehirn finden sich Viren mit Mutationen im M-, H-, und F-Gen, die überwiegend nicht infektiös sind. Vermutlich kann sich die Infektion durch Weitergabe von Nukleoproteinkomplexen und durch Zellfusion im zentralen

Nervensystem ausbreiten (Dyken, 1985; Kirk et al., 1991; Rima and Duprex, 2005; Rima and Duprex, 2006).

1.5 Masern Virus induzierte Immunsuppression

Nach der Infektion baut der Wirt eine Immunabwehr gegen den Erreger auf. Im Fall der Masern kommt es aber zusätzlich zu einer generellen Immunsuppression gegenüber anderen Erregern. Bereits 1908 berichtete von Pirquet dabei vom Ausbleiben der Tuberkulinreaktion nach einer Maserninfektion. In der dritten Welt ist die Immunsuppression der Hauptgrund für die hohe Todesrate nach einer Infektion mit MV. Ein auffälliges Merkmal ist die Leukopenie (Permar et al., 2003). Verschiedene Gründe können dafür verantwortlich sein wie etwa Depletion der Zellen aufgrund der Virusinfektion oder durch apoptotische Prozesse. Die Immunsuppression ist noch nach Wochen aktiv, auch dann noch wenn die Anzahl der Lymphozyten den normalen Wert wieder erreicht hat und MV infizierte Zellen kaum noch im Organismus zu finden sind (Okada et al., 2001). Schlüsselemente der MV induzierten Immunsuppression sind die Einschränkung der DTH („delayed-type hypersensitivity“) Reaktion und die Einschränkung der Proliferation von Lymphozyten in Gegenwart viraler Hüllproteine (Schneider-Schaulies et al., 2002; Schneider-Schaulies et al., 2001).

1.6 Epidemiologie

Masern werden durch Aerosole und Tröpfcheninfektion weitergegeben, die durch Husten oder Niesen entstehen. Der Erreger ist hoch ansteckend und anfällige Individuen die sich in engem Kontakt zu Maserninfizierten aufhalten stecken sich mit 99% Wahrscheinlichkeit ebenfalls an. Man geht davon aus, dass die Masern in der Zeit aufgetreten sind als die Menschen anfangen sich in größere Gemeinschaften zu organisieren. Diese relativ großen Gruppen hatten genügend Nachkommen um die Masernviren mit immer neuen, anfälligen Individuen zu versorgen, so daß eine kontinuierliche Infektionskette aufrechterhalten werden konnte. Die Epidemiologie der Masern unterscheidet sich in Regionen mit niedrigem und hohem Impfdurchsatz. Bevor Impfungen möglich waren hatten ca. 90% einer Population bis zum Alter von 10 Jahren eine Maserninfektion hinter sich. In nicht geimpften Populationen brechen die Masern periodisch im Abstand von 2-5 Jahren aus. Dieses Zeitintervall verringert sich wenn die Populationsdichte steigt und der räumliche Abstand der Individuen zueinander abnimmt.

In geimpften Populationen vergrößert sich der Zeitabstand von Masernausbrüchen, wobei ein sehr hoher Impfdurchsatz (>95%) die endemische Ausbreitung unterbinden kann. So konnte in den USA z.B. durch entsprechende Impfbemühungen die Anzahl der Masernfälle von 400.000-500.000 Fällen (1960) auf ungefähr 100 Fälle (2003) pro Jahr reduziert werden. 1993 konnte sogar für eine Zeit von 12 Wochen kein einziger Fall einer Maserninfektion festgestellt werden, d. h. die Infektionskette wurde unterbrochen. Man nimmt an, daß alle folgenden Neuinfektionen durch gelegentliche Einschleppung in die USA verursacht wurden (Bellini and Rota, 1998). Im Rahmen der heutigen Mobilität der Menschen wird davon ausgegangen, daß auch in stark geimpften Populationen weiterhin Maserninfektionen auftreten, und zwar solange bis die Masern weltweit ausgerottet werden.

Die Masern bleiben eine häufige Erkrankung von Kindern auf der ganzen Welt. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, daß pro Jahr 30 Millionen Infektionen mit Masernviren auftreten. Ungefähr 775.000 Todesfälle stehen pro Jahr in Verbindung mit einer Maserninfektion, wobei davon alleine 500.000 Fälle in Afrika auftreten (WHO 1999). Im Gegensatz dazu wurden in vielen Ländern (Nordamerikanischen Staaten, Skandinavien und Großbritannien) die Masern durch entsprechende Impfprogramme fast vollständig eliminiert.

1.7 Morphologie, Struktur und biologische Eigenschaften

Masernviren bestehen aus einer Lipidhülle, die den viralen RNP (Ribo-Nukleoprotein) Komplex (Genomische RNA die mit Protein assoziiert ist) umschließt. Die zwei Transmembranproteine Fusionsprotein (F) und Haemagglutinin (H) sind in der Membran verankert. Das H Protein ist nahe an seinem Aminoterminus verankert (Typ II Glykoprotein), das F Protein am Carboxyterminus (Typ I Glykoprotein). Eine oder beide zytoplasmatischen Enden der Membranproteine interagieren funktionell mit dem Matrixprotein (M) (Moll et al., 2001; Moll et al., 2002), welches die Hülle mit der RNP Struktur verbindet. Die virale genomische RNA ist vollständig von dem Nukleokapsidprotein (N) umschlossen und mit dem Polymerasekomplex verbunden. Dieser besteht aus dem Phosphoprotein (P) und dem Large Protein (L). Dieser RNP Komplex schützt das Genom vor RNase-Degradation. Die Partikel sind pleomorph mit einer durchschnittlichen Größe von 120 bis >300nm. Sowohl filamentöse als auch irreguläre Formen sind bekannt. Das Volumen der Partikel schwankt zwischen 3×10^5 und $>10^7 \text{ nm}^3$ und kann >30 Genome unterbringen. Die Verpackung von mehreren Genomen *in vitro* wurde bereits bestätigt (Rager et al., 2002). Die Integrität der Hülle ist essentiell für

die Infektivität der Partikel, und Stoffe die diese beeinträchtigen (Detergentien oder andere fett-lösende Stoffe wie Aceton oder Äther) inaktivieren das Virus.

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Familie der Morbilliviren zeigt MV hämagglutinierende Aktivität. Das H Protein ist ein starkes virales Immunogen, und gegen H gerichtete Antikörper wirken inhibierend auf die hämagglutinierende Aktivität. Die Antikörper haben weiterhin neutralisierende Wirkung, da sie das Andocken des Virus an die Zelle verhindern. Die Fähigkeit von MV bei neutralem pH Zellmembranen zu fusionieren führt zu dem charakteristischen zytopathischen Effekt (CPE) und der Bildung von Riesenzellen.

1.8 Genomstruktur, Funktion und Replikation

Das 15894 Basenpaar (bp) lange Genom besteht aus einem nicht-segmentierten RNA Molekül negativer Orientierung und ist vollständig mit N Protein komplexiert. Die feste Packung verhindert wohl das bei den *Mononegavirales* Genomrekombinationen stattfinden können. Jedes N Protein bedeckt dabei sechs Nukleotide. Diese Anordnung scheint für die Replikation unbedingt nötig zu sein, da die virale Polymerase nur Genome repliziert deren Nukleotidzahl ein Multimer von sechs sind. Solange diese „Regel der Sechs“ (Calain and Roux, 1993) eingehalten wird toleriert MV Veränderungen seiner Genomlänge, welche z.B. durch die Einklonierung von Transgenen (eGFP usw) entstehen (Schneider et al., 2000).

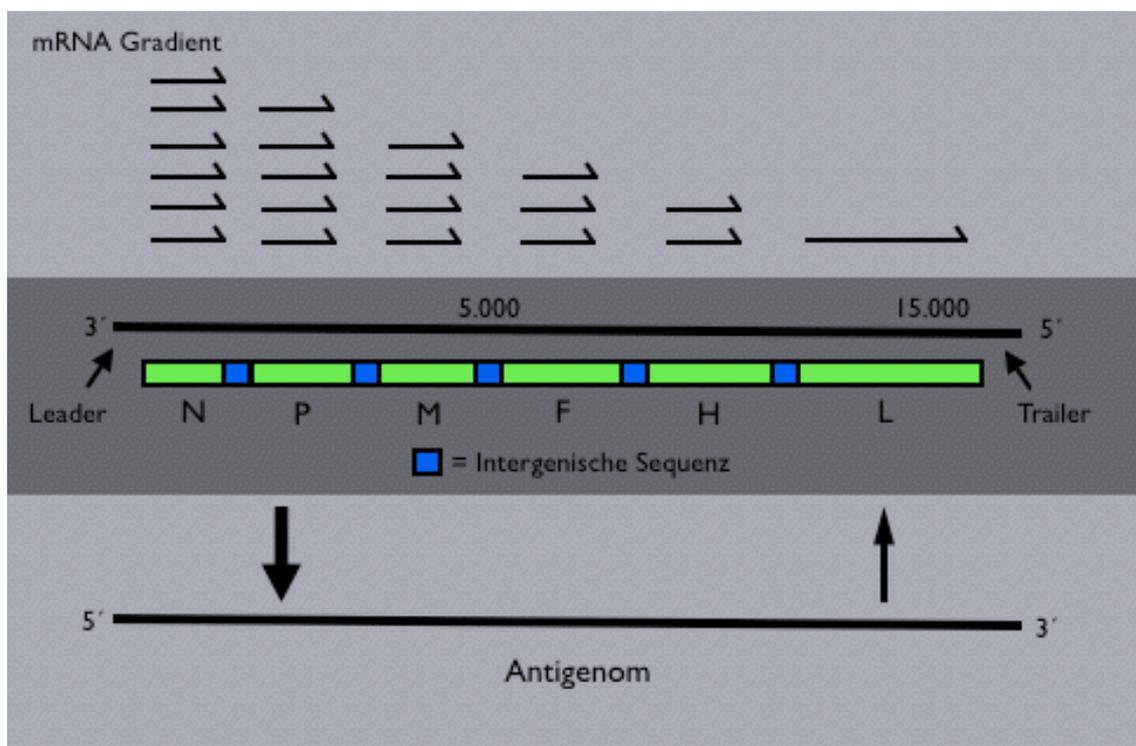


Abb. 1: Genomorganisation der Masernviren. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA, die als Negativstrang vorliegt. Unter der schematisch als Linie angegebenen RNA ist die Lage der verschiedenen viral kodierten Genen angegeben, die im Replikationsverlauf in mRNA transkribiert werden. Intergenische Sequenzen sind als blaue Quadrate dargestellt. Während der Replikation werden vom Genom sog. Antigenome hergestellt, die wiederum als Matrizen für die Produktion neuer Virusgenome dienen. Durch das mögliche Abfallen der RNA-abhängigen Polymerase vom Genom an den intergenischen Sequenzen entsteht ein Gradient an produzierter mRNA. Die Wahrscheinlichkeit das mRNA der Gene entsteht, nimmt um so mehr ab je weiter das Gen Richtung 5' Ende des Genoms liegt.

Das Standardgenom besteht aus 6 kontinuierlichen, nicht überlappenden Transkriptionseinheiten, die durch (bis auf die M/F Grenze) kurze, nicht kodierende Regionen voneinander getrennt sind (Abb. 1). Diese Regionen enthalten Sequenzen zur Termination der Transkription, Polyadenylierung und zur Transkriptions-Reinitialisierung (Bellini et al., 1994). Flankiert wird das Genom von nicht-codierenden 3' Leader und 5' Trailer Sequenzen, die spezifische Verpackungssignale sowie den viralen Promotor der viralen Transkription

und/oder Replikation der genomischen und antigenomischen RNA enthalten (Horikami and Moyer, 1995). Zur Transkription bindet der Polymerasekomplex am 3' Ende des genomischen RNP. Nach der Synthese und Termination einer kurzen RNA Leader Sequenz wird die Transkription wieder aufgenommen. Sie startet am Anfang der N kodierenden Region und geht bis zur intergenischen Stoppssequenz. Nach der Abgabe der mRNA wird die Transkription der nächsten Region eingeleitet. Durch diesen Start-Stopp Mechanismus werden nacheinander alle mRNAs erstellt. Da die Polymerase die Eigenschaft besitzt, an den intergenischen Sequenzen die Transkription einzustellen ist die Wahrscheinlichkeit einen kodierenden Bereich am 5' Ende zu erreichen um so geringer, je weiter Richtung 5' Ende die Region liegt. Dieses führt zu einem transkriptionellen Gradienten an mRNA. Diesen Gradienten findet man dann auch entsprechend auf Proteinebene. Manchmal kommt es dazu, dass der Polymerasekomplex an den intergenischen Sequenzen nicht stoppt und weiterläßt. Dies führt zur Entstehung bi- und trizistronischer, polyadenylierter Transkripte. Der Wechsel von Transkription zur Replikation wird vermutlich durch die Verfügbarkeit von N Proteinen gesteuert.

Innerhalb des P Genes werden zwei weitere Nicht-Strukturproteine kodiert: C (20kDa) und V (46kDa) (Bellini et al., 1985). Das C Protein wird in einem separaten Leseraster kodiert, das V Protein wird von einer ko-transkriptional editierten P mRNA translatiert.

1.8.1 Das virale RNP und nicht-Strukturproteine

Das Nukleokapsidprotein N (60kDa) umschließt vollständig die genomische RNA und ist dabei das Ziel der viralen Polymerase um die Transkription / Replikation zu starten. Findet seine Expression ohne genomische RNA statt, aggregieren N Proteine im Zellkern sowie im Zytoplasma und bilden dort Nukleokapsid ähnlichen Strukturen. Die Fähigkeit mit phosphoryliertem P Protein stabile Komplexe zu bilden verhindert sowohl die Translokation in den Kern (N besitzt ein eigenes Kernlokalisationsignal) als auch die Komplexierung mit genomischer RNA während der Replikationsphase (Bankamp et al., 1996). Das N Protein interagiert auch mit zellulären Proteinen. Eine Domäne interagiert mit Hsp72 und spielt möglicherweise eine Rolle für den verstärkenden Effekt eines Hitzeschocks auf die MV Replikation (Vasconcelos et al., 1998; Zhang et al., 2002). Direkte Interaktion des N Proteins mit IRF-3 und IRF-3-assoziierten viral-aktivierten Kinasen ist eventuell an der Regulation der Interferonproduktion während einer Infektion beteiligt (tenOever et al., 2002).

Das P Protein (72kDa) liegt in hoher Zahl in infizierten Zellen vor, wird aber nur in geringer Zahl in Virionen verpackt. Es ist an den Serinresten 86, 151 und 180 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wird vermutlich durch die zelluläre Casein Kinase II vorgenommen. Sie ist essentiell für die Funktion von P als Polymerase-Kofaktor. Ebenso wichtig für die Transkription als auch Replikation ist die Eigenschaft des P Proteins zusammen mit dem L Protein stabile Komplexe zu bilden, wobei das L Protein offensichtlich von dieser Interaktion stabilisiert wird. Weiterhin wird angenommen, dass das P Protein als Transaktivator die Funktion von L reguliert (Horikami and Moyer, 1995).

Das V Protein, welches diffus in der Zelle verteilt vorliegt, wird von einer P mRNA exprimiert die speziell editiert wird. Ein G Nukleotid wird an Position 751 nach drei genomisch kodierten G Nukleotiden eingefügt (Cattaneo et al., 1989; Wardrop and Briedis, 1991). Da das V Protein die gleichen aminoterminalen 231 Aminosäuren besitzt, ist es wie das P Protein an den exakt gleichen Serinen phosphoryliert und damit auch in der Lage, durch diese Domänen mit dem N Protein Komplexe zu bilden. Es kann jedoch keine Komplexe mit dem L Protein bilden (Liston and Briedis, 1995; Tober et al., 1998).

Das C Protein (28 kDa) wird ebenfalls von der P mRNA exprimiert indem ein Startkodon 19 Nukleotide hinter dem Startkodon für P zum Translationsstart benutzt wird. Bis jetzt gibt es keine Beweise, dass V oder C mit anderen MV Proteinen interagieren, eventuell interagieren sie aber mit diversen zellulären Proteinen (Liston et al., 1995). Die Rolle der beiden Proteine für die Replikation der Masernviren selber ist nicht bekannt. Rekombinante Masernviren, bei denen diese beiden Proteine unbrauchbar gemacht wurden, können in Zellkultur ohne Probleme vermehrt werden (Radecke and Billeter, 1996). Vermutet wird aber, dass diese Proteine in der Regulation der Transkription und/oder Replikation in speziellen Zelltypen eine Rolle spielen bzw die Pathogenität *in vivo* steuern (Escoffier et al., 1999; Patterson et al., 2000; Valsamakis et al., 1998). Neuere Arbeiten zeigen, daß die Nicht-Strukturproteine von MV die Signalwegen von IFN- α / β und eventuell auch IFN- γ stören (Palosaari et al., 2003).

Das L Protein (220 kDa) wird in infizierten Zellen in nur sehr niedrigen Mengen exprimiert und ist auch nur in kleinsten Mengen in neuen Virionen zu finden. Es ist eine multifunktionale RNA spezifische RNA Polymerase, die sowohl mRNA, replikative Zwischenprodukte und genomische RNA produziert (Bankamp et al., 2002). Charakteristisch sind drei konservierte Domänen (D1, D2, D3) die durch variable Gelenkregionen (H1, H2)

miteinander verbunden sind. Zur Interaktion mit dem P Protein sind die N-terminalen 408 Aminosäuren des L Proteins nötig.

1.8.2 Die Hüllproteine

Der RNP Komplex wird von einer Lipidhülle umschlossen welche zwei Glykoproteine enthält: Das Hämagglutinin (H) und das Fusionsprotein (F), wobei diese als funktionale Komplexe vorliegen. Beide Proteine sind auch auf der Oberfläche infizierter Zellen zu finden. Das H Protein ist für das Anheften an die Zielzelle verantwortlich und hilft dem F Protein beim Fusionsprozess. Man geht in Membrannähe von einer Stabstruktur aus, welche dann in eine distale globuläre Kopfstruktur übergeht, die wiederum aus einer sechsflügeligen Propellerstruktur besteht (Crennell et al., 2000). Von 13 stark konservierten Cysteinen innerhalb der Ektodomäne sind die Positionen 287, 300, 381, 394, 494, 579 und 583 essentiell für die Oligomerisation und die richtige Proteinfaltung. Aminosäuren, die für die unterschiedlichen Interaktionen der verschiedenen Masernvirusstämmen mit ihren zellulären MV Rezeptoren (CD46, CD150) verantwortlich sind, liegen ebenfalls in dieser Ektodomäne (Bartz et al., 1996; Lecouturier et al., 1996). Zusätzlich zu der rezeptorbindenden Funktion unterstützt das H Protein das F Protein auch bei der Fusion. Wahrscheinlich liegt das daran, dass das H Protein für einen zur Fusion optimalen Abstand zur Zielmembran sorgt und die Interaktionen zur Fusion stabilisiert. Die zytoplasmatische Region des H Proteins ist noch für den Transport an die Zelloberfläche verantwortlich und enthält ein basolaterales Lokalisationssignal für polarisierte Zellen (Moll et al., 2001).

Das F Protein (Typ I Glykoprotein) wird als inaktives Vorläuferprotein von einer mRNA synthetisiert, welche eine bis zu 585 Nukleotide lange, GC reiche und nicht kodierende 5' Region besitzt. Man nimmt an, dass diese die Translationseffizienz beeinflusst (Wild and Buckland, 1995). Das Protein ist glykosyliert, oligomerisiert und wird zur Oberfläche transportiert. Das Vorläuferprotein wird durch proteolytische Spaltung im trans-Golgi durch eine Subtilisin-ähnliche Protease aktiviert. Es entsteht ein biologisch aktives Heterodimer aus F₁(40kDa) und F₂(18kDa), das durch Disulfidbrücken verbunden ist. Eine zentrale Cysteinereiche Region (aa 337-381) vermittelt die Interaktion mit dem H Protein (Fournier et al., 1997). Homo- und Hetero-Oligomerisation beider Glykoproteine findet im ER statt. Die Stärke der F/H Interaktion und die fusogene Aktivität des Komplexes werden noch durch den zytoplasmatischen Teil, abhängig von ihrer Interaktion mit dem M Protein reguliert. Interessanterweise wird der zytoplasmische Teil der F1 Untereinheit (aa 33) während einer persistenten Infektion häufig mutiert (Billeter et al., 1994).

Das M Protein (37 kDa) wird von einer mRNA translatiert, welche eine 400 Nukleotid lange, nicht-kodierende 3' Region enthält (Bellini et al., 1986). In infizierten Zellen ist es mit dem Nukleokapsidprotein und der inneren Seite der Plasmamembran assoziiert (Bellini et al., 1994). Sowohl auf physischer als auch auf funktioneller Ebene wurde eine Interaktion des M Proteins mit den zytoplasmatischen Enden der MV Glykoproteine gezeigt. Das M Protein beeinflusst die fusogene Aktivität des F/H Komplexes und führt zur apikalen Verlagerung der Glykoproteine und Virusfreisetzung in Epithelzellen (Plempner et al., 2002). Rekombinante Masernviren, deren M Gen deletiert wurde, produzieren kaum neue Viren und unterstützen damit die These, dass das M Protein für diesen Prozess nötig ist (Cathomen et al., 1998). Weiterhin beeinflusst es auch die MV Transkription negativ wenn es an den RNP gebunden ist (Suryanarayana et al., 1994). In persistenten Infektionen sind häufig Mutationen im Leseraster des M Proteins zu finden (Billeter et al., 1994).

1.9 Der Replikationszyklus

1.9.1 Rezeptor-Interaktion und Virusaufnahme

Die Expression von spezifischen Rezeptoren die mit MV-H interagieren können, stellt, neben dem Einfluß zellulärer Faktoren, die Grundlage für den viralen Tropismus dar. Während einer natürlichen Infektion haben die Masernviren einen ausgeprägten Tropismus für hämatopoetische Zellen, können aber auch andere Zelltypen infizieren, z.B. Epithelzellen. Daher sollte auf diesen Zellen ein Rezeptor zu finden sein. Dies ist auch der Fall für den ersten identifizierten MV Rezeptor, CD46 (Naniche et al., 1993). CD46 ist ein sog. „membran co-factor protein“ (MCP) und gehört zur Genfamilie der „regulators of complement“ (RCA) (Liszewski et al., 1991). CD46 wird auf allen Zellen exprimiert die einen Zellkern besitzen. Durch alternatives Spleisen entstehen verschiedene Isoformen von CD46. Sie werden gewebsabhängig produziert und sind alle in der Lage die MV Aufnahme zu unterstützen (Buchholz et al., 1996; Johnstone et al., 1993). CD46 bindet die Komponenten C3b und C4b des Komplementsystems über die SCR 3/4 Domäne und verhindert somit die Anlagerung des Komplements, welche sonst zur Zerstörung der Zelle durch dieses führen würde (Liszewski et al., 1991). Die Infektion von Zellen mit MV führt zur Herabregulation von CD46 (Bartz et al., 1996; Schneider-Schaulies et al., 1996). Bei Nagern, die transgen CD46 exprimieren, sind intracerebrale Infektionen, nicht aber periphere Infektionen möglich. Dies weist darauf hin, daß unbekannte Faktoren (intrazelluläre Faktoren oder auch Interferon) die MV Replikation einschränken. Es stellte sich auch bald heraus, daß nur bestimmte Virusstämme in der Lage

sind CD46 als Rezeptor zu nutzen. Dies sind hauptsächlich Impfstämme oder Wildtyp-Stämme, die auf Verozellen adaptiert wurden. Die meisten lymphotropen Wildtyp-Stämme und frische Isolate interagieren nicht mit CD46 und regulieren es auch nicht herab. Diese und alle anderen Stämme binden über das H Protein an CD150 (ein CD2 ähnliches Molekül der Ig Superfamilie) an der Zelloberfläche (Erlenhoefer et al., 2001; Tatsuo et al., 2000). CD150 wird von aktivierten und Gedächtnis- T und B Zellen, unreifen Thymozyten, nicht aber von frisch isolierten Monozyten und unreifen Dendritischen Zellen exprimiert.

Für das Binden von MV an CD150 ist die zweite V-ähnliche Domäne wichtig. Nach der Infektion oder nach Interaktion mit H wird CD150 abreguliert. Die Grundlage für unterschiedliche Rezeptornutzung durch MV liegt auch an bestimmten Aminosäuren (as) des H Proteins, besonders an as 481, as 546 und as 452 (Bartz et al., 1996). Ähnlich wie bei CD46 besitzt die zytoplasmatische Domäne von CD150 Bereiche zur Signalweitergabe (Morra et al., 2001).

Es ist unbekannt wie lymphotrope MV Stämme CD150-negative Zellen des Endothels, des Epithels oder neurale Zellen infiziert (McQuaid and Cosby, 2002). Es gibt Hinweise auf niederaffine Interaktion mit CD46 und zusätzliche unbekannte MV Rezeptoren (Manchester et al., 2002). Das Vorhandensein eines MV Rezeptors bestimmt auch nicht alleine den Gewebstropismus und die Anfälligkeit gegenüber einer Infektion. Es spielen auch noch zelluläre Faktoren eine Rolle, besonders wichtig sind hierbei wohl der Aktivierungs- und Entwicklungsstand der Zellen. So lassen sich z.B. mit dem an Nager angepaßten MV Stamm CAM/RB neuronale Zellen von neugeborenen und noch säugenden Mäusen infizieren. Bei erwachsenen Tieren ist die Anfälligkeit gegenüber einer Infektion vom Inzuchtstamm der Tiere abhängig (Niewiesk et al., 1993).

1.9.2 Intrazelluläre Replikation, Partikelzusammen- und Freisetzung

Wie alle Mitglieder der *Mononegavirales* repliziert MV ausschließlich im Zytoplasma. Die MV Transkription startet sobald sich der Polymerasekomplex an seinen Promoter am 3'Ende des Genoms bindet (Parks et al., 2001). Die Tendenz des Komplexes an den intergenischen Sequenzen von seiner Vorlage abzufallen und danach die Transkription wieder aufzunehmen wird auch von zellulären Faktoren beeinflusst. Dies zeigt sich an den Transkriptionsgradienten, die je nach Zelltyp unterschiedlich sein können (Schneider-Schaulies et al., 1995). Im Replikationsmodus läßt die Polymerase durch die intergenischen Sequenzen und erstellt eine Kopie des viralen Genoms, das sog. Antigenom. Es ist über die gesamte Länge mit N Protein komplexiert. Die im Zytoplasma vorliegenden Antigenome

dienen als Matrize für die Produktion neuer Virusgenome. Zytoskelettkomponenten spielen vermutlich eine Rolle im Transport der intrazellulären RNPs, die anfänglich im perinukleären Bereich entstehen und zur Zellmembran transportiert werden. F und H werden zur Zellmembran transportiert und sammeln sich dort in „Lipid Rafts“ an. Diese dienen wohl als Plattform für das Entstehen neuer Viren. Die Interaktion des M Proteins mit den zytoplasmatischen Teilen der Glykoproteine reguliert die fusogene Aktivität der Oberflächenproteine (Cathomen et al., 1998). Diese Eigenschaft könnte für die Virusverbreitung von Zelle zu Zelle wichtig sein. In persistenten Infektionen des Gehirns wird das M Leseraster häufig durch Mutationen zerstört, und das Fehlen des M Proteins könnte der Grund für eine verstärkte Zellfusion sein.

In diesen Fällen findet keine Produktion infektiöser Viren statt. Der Mechanismus der Virusfreisetzung ist weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass die Aggregate des M Proteins (zusammen mit Membran- assoziierten F/H Proteinen und RNP Komplexen) an der Zellmembran die Fähigkeit besitzen die Membranstruktur zu beeinflussen. Dies könnte zur Abschnürung von Membranteilen und somit zur Entstehung neuer Viren führen.

1.10 RNA Interferenz

1.10.1 Einführung RNA Interferenz

Doppelsträngige RNA (dsRNA) ist bei vielen Eukaryoten ein wichtiger Regulator der Genexpression. Sie löst verschiedene Arten der Genabschaltung („Gen Silencing“) aus, die im allgemeinen als RNA Interferenz (RNAi) bezeichnet werden (Elbashir et al., 2001a). Eine Schlüsselstellung nimmt hierbei die Prozessierung von dsRNA zu kurzen RNA Duplices von charakteristischer Größe und Struktur ein (Abb.2) (Elbashir et al., 2001b).

Zum ersten Mal wurde dieser Effekt in Pflanzen beschrieben und dort als „post-transcriptional gene silencing“ bezeichnet (Watson et al., 2005). Der Effekt wird von dsRNA unterschiedlicher Länge und aus unterschiedlichen Quellen ausgelöst. Die dsRNA wird relativ schnell in kurze RNA Doppelstränge von 21-28 Nukleotiden Länge umgewandelt. Sie wiederum sind dann für die Erkennung, den Abbau bzw für die Inhibition der Translation dieser einzelsträngigen mRNA und/oder von viralen Genomen/Antigenomen zuständig.

Je nach Quelle ihrer Herkunft unterscheidet man zwischen drei RNA Strukturen: „short interfering RNA“

(siRNA), „repeat-associated short interfering RNA“ (rasiRNA) und „micro RNA“ (miRNA) (Sontheimer and Carthew, 2005). In natürlicher Umgebung kann dsRNA von RNA-abhängigen RNA Polymerasen (z.B. bei Viren) oder durch das Hybridisieren von überlappenden Transkripten (z.B. von Transposons) entstehen. Doppelsträngige RNA dieser Art führt normalerweise zur mRNA Degradation. Zusätzlich führen endogene Transkripte zwischen 20-50 bp Länge, die fast oder ganz komplementäre invertierte Wiederholungen besitzen, zur Ausbildung von Haarnadelstrukturen. Diese werden zu miRNA verarbeitet und führen zur Translationsinhibition, wobei sie eventuell auch zur Degradierung der komplementären mRNA führen können. Zusätzlich kann dsRNA oder siRNA auch künstlich hergestellt werden und dazu benutzt werden in Zellkultur oder *in vivo* Gene auszuschalten.

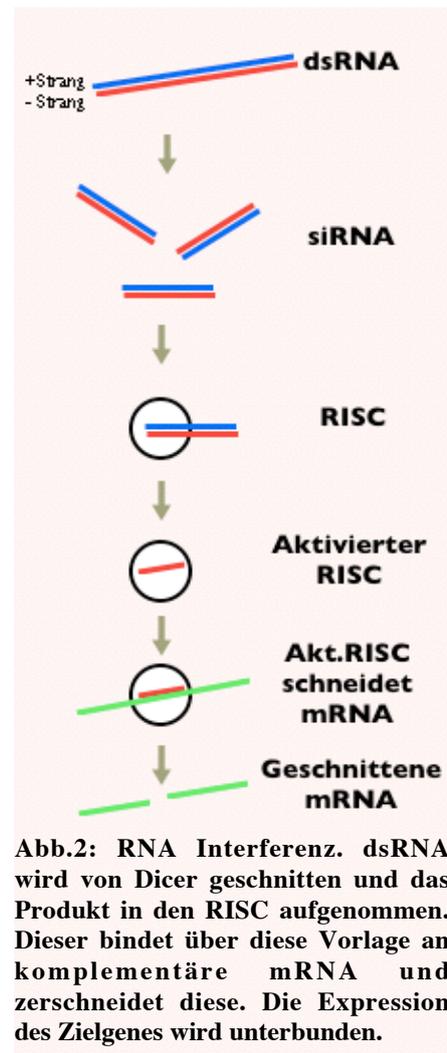


Abb.2: RNA Interferenz. dsRNA wird von Dicer geschnitten und das Produkt in den RISC aufgenommen. Dieser bindet über diese Vorlage an komplementäre mRNA und zerschneidet diese. Die Expression des Zielgenes wird unterbunden.

1.10.2 Prozessierung doppelsträngiger RNA

Kurze RNA Moleküle entstehen schrittweise. Der Prozess wird durch die dsRNA spezifischen RNase-III-Endonukleasen „Drosha“ und „Dicer“ vermittelt (Hammond, 2005; Tomari and Zamore, 2005). Um miRNA Vorläufer zu verarbeiten wird spezifisch das Enzym Drosha benötigt, nicht aber für die Verarbeitung langer dsRNA. MiRNA wird als langes Transkript im Zellkern hergestellt, welches dann dort von Drosha bearbeitet wird. Die RNA wird dabei U-förmig gefaltet. Am 5' Ende befindet sich ein Phosphat, am 3' Ende ein 2-Nukleotide langer Überhang. Viele Organismen besitzen mehr als ein Dicer-Gen, wobei die unterschiedlichen Dicer-Proteine spezifisch dsRNA aus unterschiedlichen Quellen bearbeiten (Lee et al., 2004). Ein Beispiel dafür ist *Drosophila melanogaster*: Dicer-1 (DCR-1) bevorzugt zur Verarbeitung miRNA Vorläufer, Dicer-2 (DCR-2) wird für lange dsRNA benötigt. DCR-2 ist stabil mit dem R2D2 Protein gekoppelt, welches eine Bindungsdomäne (dsRBD) für dsRNA besitzt, und dieser Komplex assoziiert sich mit den siRNA Duplices. Die Verarbeitung von dsRNA zu siRNA durch DCR-2 bzw den DCR-2/R2D2 Heterodimer ist ATP abhängig und benötigt eine RNA-Helikase Domäne. Das humane Enzym Dicer ist nicht ATP abhängig, der Grund hierfür ist unbekannt.

Vier Dicer ähnliche Proteine (DCL1-4) wurden bei *Arabidopsis thaliana* gefunden und drei davon verarbeiten dsRNA aus unterschiedlicher Quellen. DCL-1 verarbeitet miRNA Vorläufer wobei es dazu zwei weitere Proteine benötigt: HEN-1 und HYL-1. DCL-2 wird benötigt um siRNA herzustellen, die von viraler RNA abstammt, und DCL-3, welches zusammen mit HEN-1 zur Produktion rasiRNA benötigt wird. Bei *C. elegans* konnte bis jetzt nur ein Dicer Enzym gefunden werden, das DCR-1 Protein. Man geht davon aus, dass bei *C. elegans* und Säugern noch unbekannte Proteine existieren, die mit Dicer interagieren und somit dsRNA aus unterschiedlichen Quellen nutzbar machen.

1.10.3 Der „RNA Silencing Complex“ (RISC)

Die siRNA und miRNA Duplices assoziieren sich mit dem sog. „RNA Silencing Complex“ (RISC) (Tang, 2005). Dieser Komplex enthält jeweils nur einen der beiden RNA Stränge. Der Proteinkomplex enthält immer Proteine der Familie Argonaut (Ago), die vermutlich direkt RNA binden (Meister et al., 2004). Verschiedene Formen dieses Komplexes wurden bisher gefunden. Die Größe der Komplexe variiert stark von 130-160 kDa und bis zu 500kDa bei *D.melanogaster*. Vermutlich entstehen diese Proteinkomplexe nicht durch die Oligomerisierung von verschiedenen RISC, sondern wohl eher durch transiente

Wechselwirkung von RISC mit anderen Proteinen die für die Verarbeitung von dsRNA zuständig sind wie Dicer/R2D2 oder andere, noch unbekannte Proteine.

Die Aktivität von RISC ist ATP abhängig. Eventuell wird diese Energie benötigt um siRNA/miRNA Komplexe zu trennen und Strukturumlagerungen durchzuführen. Mögliche Kandidaten, die diese Prozesse durchführen, sind RNA Helikasen. Mehrere ATPasen spielen dabei eine Rolle, wobei bisher nur eine näher charakterisiert wurde, nämlich die DEAD-box RNA Helikase „Armitage“. Sie wird von *D. melanogaster* nach der Dicer Prozessierung für die Zusammensetzung des RISC benötigt.

Im Rahmen der Identifizierung von wirksamen siRNA Duplices wurde festgestellt, dass die Sequenz der Duplices Einfluss auf das Verhältnis von Plus- (gleiche Sequenz wie das Zielgen) oder Negativ-Strang (komplementäre Sequenz zum Zielgen) hat, der in den RISC eingebaut wird. RNA Duplices die zu einer starken Herabregulation des Zielgens führen haben eine reduzierte Thermostabilität des 5'Endes des Negativ-Strangs. Eventuell ermöglicht diese Anordnung, dass die Trennung der Stränge an dieser Seite einfacher ist bzw eine höhere Zugänglichkeit besteht. Somit würde dann der eine Strang des RNA Duplices bevorzugt in den RISC eingebaut.

Die einzelsträngige siRNA/miRNA ist extrem fest mit dem Ago Protein verbunden. Ago Proteine haben eine Molekulare Masse von ca 100 kDa und enthalten zwei konservierte Domänen: PAZ (Piwi-Argonaut-Zwille) und PIWI. Man nimmt an das die PIWI Domäne mit Dicer interagiert. Kristallstrukturanalysen zeigen, dass die PIWI Domäne starke Ähnlichkeit mit Mitgliedern der RNase H Familie teilt. Da RNase H den RNA Strang von RNA-DNA Duplices schneidet wird angenommen, dass das Ago Protein die RNA von RNA-siRNA Komplexen schneidet (Liu et al., 2004). Auch wird angenommen, dass die PAZ Domäne zur Interaktion zwischen Ago und Dicer dient, da die PAZ Domäne ebenfalls bei vielen Dicer-RNase Enzymen vorkommt und Ago Proteine mit Dicer koimmunpräzipitiert werden. Weitere Studien führen zu der Ansicht, dass PAZ speziell den Terminus der siRNA/miRNA Duplices erkennt, besonders die typischen 2 Nukleotide langen Überhänge am 3'Ende. Diese Interaktion zwischen den RNA Duplices und PAZ stellt sicher, dass keine anderen, unbeteiligten RNA Moleküle in den RISC eingebaut werden können.

1.10.4 mRNA Abbau und Inhibition der Translation

Der in den RISC eingebaute RNA Einzelstrang führt dazu, dass komplementäre mRNA erkannt und geschnitten wird. RISC schneidet die Ziel-RNA dabei in der Mitte der komplementären Region, wobei dieser Vorgang kein ATP benötigt. Das wiederholte Schneiden der Ziel-RNA erfordert aber, dass die alte mRNA wieder freigegeben wird und dies funktioniert effizienter wenn ATP vorhanden ist. Diese ATP abhängige Verbesserung des Vorgangs lässt darauf schließen, dass eventuell RNA Helikasen beteiligt sind. Diese beschleunigen vielleicht die Freigabe der mRNA aus dem RISC oder reorganisieren den Komplex in eine andere Form. RISC besitzt ganz offensichtlich Endonukleaseaktivität, die Fähigkeit kann aber bis jetzt nicht eindeutig einem Protein zugewiesen werden. Die Hydrolyse der Ziel-RNA erfordert Magnesium Ionen und ähnelt damit dem Mechanismus, mit dem Dicer dsRNA schneidet. Die kleine Masse eines minimal aktiven RISC spricht aber gegen eine Beteiligung von Dicer in diesem Prozeß. Aus mechanistischen Gründen kann auch die Tudor-SN Nuklease als verantwortliches Enzym ausgeschlossen werden. Möglicherweise besitzen die Ago Proteine Nukleaseaktivität. Ungeklärt bleibt aber auch in diesem Fall warum nur manche Ago Proteine diese Nukleaseaktivität aufweisen (humanes Ago2), während andere Ago Proteine (humanes Ago1 und 3) dies nicht tun, obwohl sie die dafür nötigen Domänen durchaus besitzen. Der genaue Mechanismus bleibt also ungeklärt.

Der Mechanismus der miRNA induzierten Translationshemmung ist weitgehend unbekannt. Die Ziel-RNA enthält in ihrer 3' nicht kodierenden Region (3'UTR) mehrere Erkennungssequenzen für die miRNA. Sowohl miRNA als auch die zugehörige mRNA wurden mit Polyribosomen assoziiert vorgefunden. Dies lässt darauf schließen, dass die miRNA das Voranschreiten der Elongation während der Translation blockiert, weniger den Translationsstart. Was die Sache erheblich kompliziert ist der Tatbestand, dass miRNA auch als siRNA, und siRNA wiederum auch als miRNA dienen kann (Doench et al., 2003; Zeng et al., 2003). Dies wurde öfters damit begründet, dass der Grad der Sequenzübereinstimmung zwischen siRNA/miRNA und der Ziel-mRNA die Grundlage für den weiteren Verlauf, also Abbau oder Translationshemmung, ist. Eine Alternative besteht in der Annahme, dass dsRNA mit Proteinen einen Komplex bildet und dass die Zusammensetzung dieses Komplexes den weiteren Vorgang definiert. Dieses Model würde auch teilweise erklären, warum eine gewisse Redundanz der Ago Protein-Familie existiert. Möglicherweise sind beides Prozesse die gleichzeitig zur Kontrolle der Genexpression verwendet werden.

1.10.5 Regulation der RNA Interferenz

RNAi kann die Genexpression regulieren, unterliegt aber auch selber einer Regulation. So benötigt zum Beispiel die systemische Genabschaltung bei Pflanzen und Nematoden, die durch eine Weitergabe des Signals zwischen den Zellen erreicht wird, eine spezielle Gruppe von Proteinen, den sog RNA-abhängigen RNA Polymerasen (RdRP). Man geht davon aus, dass RdRP den Silencing-Effekt verstärken, indem sie dsRNA der Ziel-mRNA oder ihrer Spaltprodukte herstellen. Bei *D.melanogaster* und Vertebraten existieren nachweislich keine Proteine, die analog zu den RdRP sind, und es kommt hier auch nicht zu einer Verstärkung der Genabschaltung.

In vielen Organismen ist dsRNA ein Teil der Immunantwort gegen RNA Viren und transposable Elemente. Manche Viren produzieren Genprodukte, die die RNA Interferenz des Wirts stören. Sie stellen dazu dsRNA bindende Protein her, die mit den Komplexen bzw Prozessen der RNAi der Wirtszelle interferieren und diese stören. Ein Beispiel ist das p19 Suppressorprotein des Tombus-Virus, das mit 21bp langen siRNA Duplices assoziiert. Andere Mechanismen der RNAi Inhibition zielen auf den RISC ab oder unterbinden das Signal zur systemischen Genabschaltung.

Doppelsträngige RNA dient nicht nur Dicer, sondern auch dsRNA-spezifischen Adenosin-Deaminasen, welche Adenosin in Inosin umwandeln, als Substrat. Werden nun doppelsträngige RNAs in dieser Art editiert, können sie von Dicer nur schlecht oder gar nicht mehr verarbeitet werden. Ein anderer negativer Regulator ist ERI-1 (es besitzt Exonukleasedomänen) bei *C.elegans*. Er wird spezifisch in Neuronen exprimiert, und knock-out Mutanten für ERI-1 führen zu erhöhter RNA Interferenz in den Neuronen, wobei biochemische Analysen darauf hinweisen, dass ERI-1 siRNA als Substrat nutzt.

1.10.6 Anwendungsbereiche der RNA Interferenz

Die Entdeckung der RNA Interferenz stellt sicherlich einen Meilenstein im Bereich der biologischen Forschung dar. Die RNA Interferenz ermöglicht nicht nur völlig neue Möglichkeiten, um die Funktion von Genen zu analysieren, sondern stellt auch ein großes Potential dar, das therapeutisch genutzt werden kann (Sioud, 2004).

Nach der ersten Beschreibung von RNAi in Säugerzellen wurde relativ schnell begonnen, die RNA Interferenz zur Therapie gegen Krankheiten einzusetzen. Vorteil hierbei ist die starke und spezifische Abschaltung von Genen, bzw deren Produkte. Mögliche Ziele sind Onkogene, Wachstumsfaktoren und Einzel-Nukleotid Polymorphismen. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, RNAi zur Therapie von Viruserkrankungen einzusetzen. Bisher wurde RNAi

erfolgreich eingesetzt, um HIV, Influenza A, das West Nil Virus, Hepatitis B und C Virus und das Respiratorische Synzytial Virus (RSV) zu inhibieren (Kumar et al., 2006; Song et al., 2003; Ying et al., 2003). Versuche mit Mäusen haben bereits gezeigt, dass siRNA auch gegen virale Pathogene *in vivo* funktioniert (Morrissey et al., 2005).

Mit der *in vivo* Applikation sind aber noch offene Fragen verbunden, die genauer untersucht werden müssen. So muß siRNA in den meisten Fällen gewebspezifisch eingesetzt werden, da die Pathogene aufgrund ihres Tropismus nur bestimmte Organe befallen. Es muß sichergestellt werden, dass die siRNA das Zielorgan erreicht und dort in genügend hoher Konzentration vorliegt, um das Zielprotein abzuschalten. Auch ist bekannt, dass eigentlich spezifische siRNAs manchmal unspezifische Effekte hervorrufen, so daß auch die Expression anderer Proteine beeinflusst werden kann (sog. „Off-Target Effect“) (Lin et al., 2005). Diese entstehen wohl durch Abbau oder Translationshemmung von Proteinen, die eine ähnliche Nukleotidsequenz besitzen wie die eigentlichen Zielgene. Solche Effekte sind natürlich unerwünscht, da sie negative oder toxische Effekte verursachen könnten. Auch ist nicht bekannt welche Effekte auftreten, wenn die zelluläre RNA Interferenz Maschinerie, die ja im natürlichem Umfeld ein Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression darstellt, durch Fremd-siRNA belegt oder eingeschränkt wird.

1.10.7 Methoden zur siRNA Expression

Um künstlich RNAi zu induzieren, muß siRNA, die spezifisch für das Zielgen ist, in die Zelle kommen. Dazu gibt es zwei Wege: 1) die Transfektion von *in vitro* hergestellter siRNA, 2) durch interne Expression von siRNA, die entweder auf Plasmiden oder von viralen Vektoren kodiert wird, die sog. shRNA („Short Hairpin RNA“). In Abb.3 ist schematisch dargestellt, wie siRNA *in vitro* biochemisch hergestellt werden kann: Es besteht die Möglichkeit DNA-Zielsequenzen mit einem T7 RNA Promoter auszustatten und von einer DNA Vorlage dsRNA herzustellen. In diesem Prozeß können entweder nur kurze RNA Duplices entstehen, so dass die siRNA aus einer homogenen Mischung gleicher siRNA besteht, oder es wird lange dsRNA hergestellt, die mit Dicer *in vitro* verdaut wird. So entsteht eine Mischung von heterogenen siRNA (Ji et al., 2003).

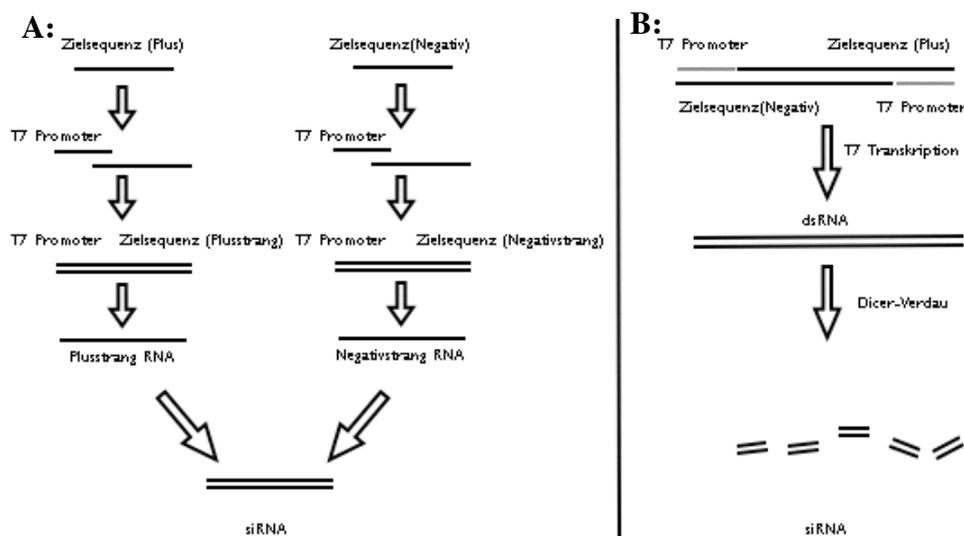


Abb.3: Schematische *in vitro* Produktion von siRNA. **A:** Von DNA Oligomeren werden mittels eines T7 RNA Promoters RNA Transkripte hergestellt. Die komplementären RNA binden aneinander und bilden kurze siRNA Duplices. Sie sind alle spezifisch für die gleiche Zielsequenz. **B:** Ein PCR Produkt der Zielsequenz mit T7 RNA Promotoren wird von einer DNA Vorlage hergestellt. Das Produkt kann zwischen 150 und 1500bp lang sein. Es werden von dieser Vorlage dsRNA transkribiert und mit Dicer verdaut. Es entsteht eine Mischung von 18-25bp langen siRNA Duplices, die jeweils einen Teil der Zielsequenz erkennen.

Zum zweiten besteht die Möglichkeit, siRNA von einer Expressionkassette zu exprimieren, die Teil eines Plasmids oder viralen Vektors ist. Abb.4 zeigt den Aufbau einer solchen Kassette. Unter der Kontrolle eines RNA Polymerase Promoters, üblich sind dabei der U6 oder H1 Promoter, wird ein RNA Transkript erstellt. Es besteht aus der siRNA-Zielsequenz (19bp), einer Haarnadelsequenz, der komplementären siRNA Sequenz (19bp) und einer Terminations-Sequenz (3-4 bp). Die komplementären Sequenzen binden aneinander und

bleiben durch die Haarnadelstruktur verbunden. In dieser Form werden die shRNA vom RISC erkannt und aufgenommen, so dass es zur RNAi des Zielgens kommt (Hannon and Conklin, 2004).

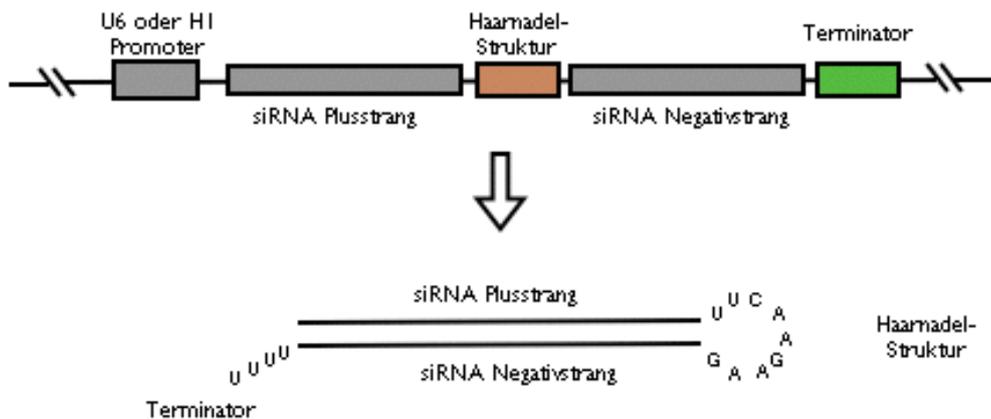


Abb.4: Schematischer Aufbau einer shRNA Expressionskassette. Unter der Kontrolle eines RNA Polymerase Promoters wird ein RNA Transkript erstellt. Es enthält die siRNA Zielsequenz, eine Haarnadel-Struktur Sequenz, die komplementäre siRNA Sequenz und einen Terminator. Das Transkript fñgt sich zu einer sog shRNA zusammen. Diese wird von dem RISC erkannt und es kommt zu RNAi des Zielgens

Die Haarnadelstruktur selber kann maßgeblich für die Effizienz der shRNA sein, und in neueren Arbeiten wurde die klassische Struktur (UUCAAGAAG) gegen andere Haarnadel-Strukturen ausgetauscht (z.B.: CUGUGAAGCCACAGAUGGG). Diese Sequenzen basieren auf Haarnadel-Strukturen, die bei natürlicher miRNA auftauchen (Boden et al., 2004).

1.10.8 Der lentivirale Vektor pLL3.7

Retrovirale Vektoren sind in den letzten Jahren bevorzugt bei gentherapeutischen Ansätzen verwendet worden. Sie sind meist von murinen Leukämieviren (MLV) abgeleitet, welche nur sich teilende Zellen infizieren können. Für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen sind deshalb lentivirale Vektoren etabliert worden, um post-mitotische Zellen wie Neuronen, effizient infizieren zu können (Wong et al., 2005). Lentivirale Vektoren sind vom humanen Immundefizienzvirus (HIV) abgeleitet (Loewen and Poeschla, 2005). Hierzu wurden die viralen Gensequenzen durch ein Transgen ersetzt. Bei der Herstellung der Vektoren in Zellen sind deshalb entsprechende Helferplasmide notwendig, welche die viralen Proteine für die Verpackung des Vektors exprimieren. Die entstandenen rekombinanten Vektoren werden über ihre Oberflächenproteine an die Zielzelle absorbiert, die Capside

werden in das Zytoplasma aufgenommen, die transgene RNA wird in doppelsträngige DNA überschrieben und in das Wirtszellgenom integriert. Der Vorteil ist eine stabile Integration des therapeutischen Fremdgens, welches bei der Teilung auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Nachteilig ist die unspezifische Integration von Retroviren. Bei therapeutischen Strategien sind bisher hauptsächlich lentivirale Vektoren, die neurotrophe Faktoren exprimieren, im Tiermodell erfolgreich eingesetzt worden. Verschiedene Strategien für die Expression von RNAi zur Herabregulation von Zielproteinen werden getestet.

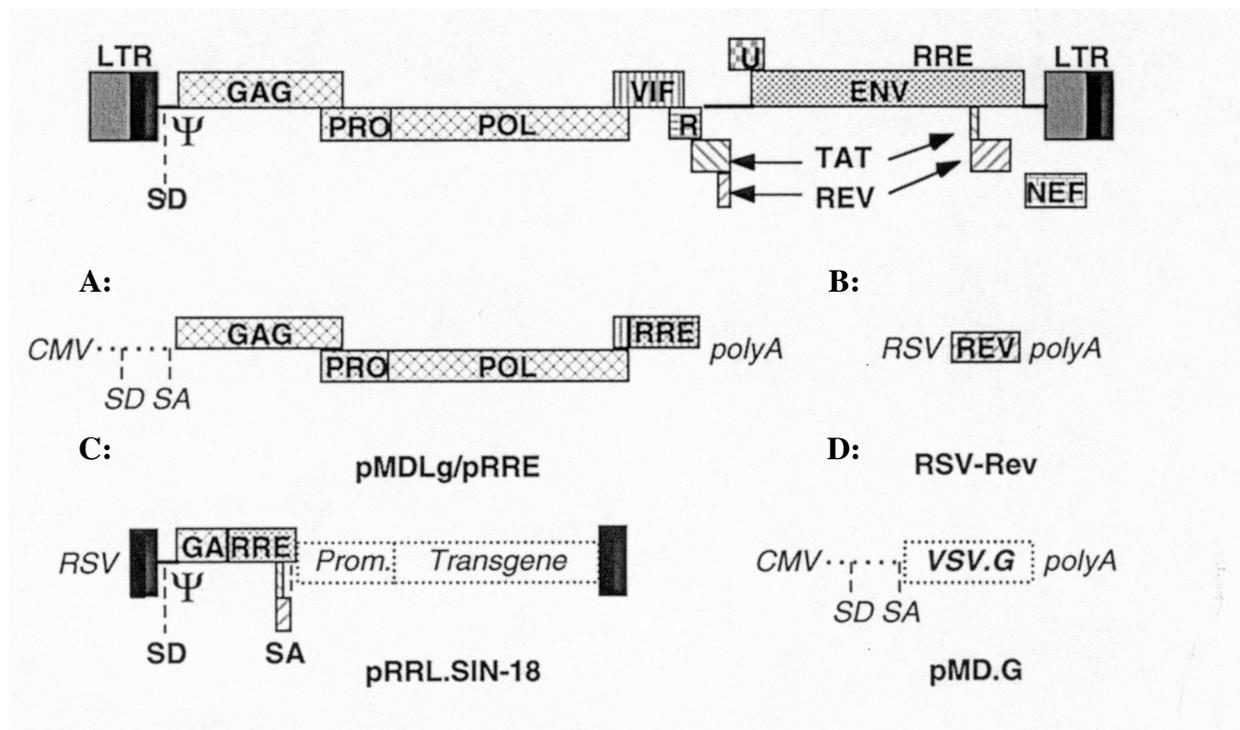


Abb.5: Schematische Darstellung eines kompletten Lentivirus und der vier Helferplasmide zur Herstellung von selbst-inaktivierenden (sin) lentiviralen Vektoren (A-D). Siehe auch Rubinson et al., Nature Genetics.

Die viralen LTRs, die Leserahmen der viralen Gene, die 5'-Spliss-Donorstelle (SD), das Verpackungssignal (Psi) und das RRE („Ref Responsive Element“) sind als Rechtecke dargestellt. Für die Herstellung des Vektors sind vier DNA Helferplasmide notwendig (Fig.5). **pMDLg/pRRE** exprimiert die gag und pol Gene unter Kontrolle des artifiziellen CMV Promoters und Intron und poly A Sequenzen des humanen β -globin Gens. Da die Transkripte von gag und pol cis-aktive Sequenzen enthalten, werden sie nur exprimiert, wenn sie durch die Bindung von Rev an RRE in den Kern transportiert werden. Alle weiteren Gene wurden deletiert oder ersetzt. Das zweite Plasmid, **RSV-Rev** exprimiert Rev. Auf dem dritten Plasmid **pRRL.SIN** sind cis-Elemente von HIV und die Expressionskassette für das Transgen (in dieser Arbeit eine Kassette die shRNA exprimiert, siehe Abb.4) enthalten. Die ursprünglichen LTRs sind verändert worden. Das 5'-LTR enthält einen artifiziellen RSV Promotor anstelle der U3,

um eine Tat-unabhängige Transkription zu ermöglichen. In der 3'LTR Sequenz ist die U3 Region deletiert, welche die TATA Box enthält. Somit entsteht ein Vektor, der sich nach einer Transduktion von Zellen selbst inaktiviert, denn die TATA Box ist als Template für die LTRs des integrierten Provirus nicht mehr vorhanden. Das vierte Plasmid **pMD.G** kodiert für ein heterologes Oberflächenprotein des Vesikular Stomatitis Virus (VSV), um dem Vektor einen veränderten Tropismus zu verleihen.

1.11 Ziele der Arbeit

Die Technik der RNA Interferenz (RNAi) kann in verschiedenen Bereichen angewandt werden: Zur Analyse von Genfunktionen und als antivirales Agens. Masernviren können zu persistenten Infektionen des ZNS führen, die meist schwere und tödliche Krankheitsverläufe nach sich ziehen. Therapeutische Ansätze sind dabei von großem Interesse, besonders weil es bis heute keine geeigneten Behandlungsmethoden für solche Patienten gibt. Deshalb sollte untersucht werden, ob RNA Interferenz als antivirales Agens gegen Masernviren eingesetzt werden kann. Es wurden alle sechs Gene als Ziel der RNAi ausgewählt, wobei die Proteine von besonderem Interesse waren, die Teile der viralen Polymerase und des RNP-Komplexes bilden, also das Nukleokapsid-, das Phospho- und das Large-Protein.

Die erste Aufgabe bestand darin, das System der RNAi gegen Masern zu etablieren. Dazu soll mittels dem Enzym Dicer (RNase-III) für jedes der sechs Masernvirusgene eine Mischung heterogener siRNAs hergestellt und ein Versuchsaufbau etabliert werden, der effektiv zur RNA Interferenz führte. Danach sollen die Effekte der siRNA abhängig von ihrem Zielgen untersucht und charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Falls nicht gesondert angegeben wurden die Chemikalien von Appllichem(Darmstadt) und Sigma / Fluka (Deisenhofen) erworben.

Agarose	Qbiogen/Invitrogen
APS (Amoiniumpersulfat)	
Bis/Acrylamid	
Bromphenolblau	
CaCl ₂	
DAPI (4', 6-Diamidino 2-Phenylindole, Dihydrochlorid)	MoleculareProbes
DMSO (Dimethylsulfoxid)	
Ethanol	
Ethidiumbromid	
Glycerol	
Glycin	
Hefeextrakt	BD
Hexansäure	
Isopropanal	
KCL	
KH ₂ PO ₄	
Methanol	
MgCl ₂	
Moviol	
Na ₂ HPO ₄	
NaCl	
PFA (Paraformaldehyd)	
SDS (Natriumlaurylsulfat)	
β-Mercaptoethanol	
TEMED (N, N, N'; N' - Tetramethylendiamin)	
Tris (Tris-Hydroxymethylaminomethan)	
Triton X-100	
Trypton	ICN Biomedicals

Tween

2.1.2. Antibiotika

Ampicilin	Stammlösung 100 mg/ml
Penicilin	Stammlösung 50 mg/m
Streptomycin	Stammlösung 50 mg/ml

2.1.3. Enzyme

Restriktionsenzyme: MBI Fermentas oder New England Biolabs

Polymerasen: T7 RNA Polymerase von MBI Fermentas; Taq Polymerase von Amersham; MMLV Reverse Transkriptase, RNaseH von Promega, SYBR Green PCR Mix von BioRad

DNA- Modifizierende Enzyme: T4 DNA Ligase und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) von MBI Fermentas

2.1.4. Kits

„RNeasy Kit“ (RNA Gewinnung/Aufreinigung), „QiAquick Nucleotid Removal Kit“, „Plasmid Mini/Midi Kit“. Alle Kits von Qiagen.

2.1.5. Transfektionsreagenzien

Für Plasmid DNA: „Lipofectamin2000“, Invitrogen

Für siRNA: „HiPerFect“, Qiagen

2.1.6. Größen- und Längenstandarts

1kb Ladder; MBI Fermentas

50 bp Ladder; MBI Fermentas

Proteinladder „PageRuler™“, Prestained Protein Ladder; MBI Fermentas

2.1.7. Antikörper und Antiseren

Primärantikörper (alle Maus-Monoklonal); Falls nicht anders angegeben aus der eigenen Arbeitsgruppe:

F227 (anti MV Nukleokapsid N)

P3 (anti MV Phosphoprotein P)

MAB8910 (anti MV Matrixprotein M); Chemicon

A504 (anti MV-F)

K83 (anti MV-H)

MAB143 (Mx)

Sekundärantikörper:

Ziege anti Maus FITC, Dianova

Kaninchen anti Mause HRP, Dianova

Ziege anti Maus HRP, Dianova

2.1.8 Oligonukleotide

Die Primer enthalten am 5' Ende die Erkennungssequenz der T7 RNA Polymerase gefolgt von der Virus-spezifischen Sequenz (5-taatacgactcactatag-.....-3):

PSC-N: Frw 5-accattacatcaggatccgg-3, Rev 5-tgaaaagtattggtccgcctcat-3

pSC-P: Frw 5-acccaatgtgctcgaaagtc-3, Rev 5-ggcctgaatctctgcctatg-3

pSC-M: Frw 5-agagtcatagatcctggtctaggc-3, Rev 5-ctcaggaagtgctctgtattgtcg-3

pCG-F1: Frw 5-gtgcaagctacaaagttatgactcg-3, Rev 5-tacaagatagttggtcatagacgg-3

pCG-H5: Frw 5-tgtctctgagcttgatcgggt-3, Rev 5-aagtctaacaggacagcgacatg-3

pEMC-La: L1 Frw 5-cctcaaaaaggggaattcg-3, Rev 5-tcatcagaaaaccggtttgg-3

pEMC-La: L2 Frw 5-gcaaggtttgctctgatcca-3, Rev 5-ggacctcaaggccgtaata-3

Primer für die Realtime PCR:

MV-N: Frw: 5-ccctctgctctggagctatg-3; Rev: 5-gccaatgtggaactgacctt-3

MV-P: Frw: 5-atcagacaaccaggacagg-3; Rev: 5-agtgttgatgcctggagat-3

MV-M: Frw: 5-gagcaactctctgaggcaac-3; Rev: 5-ttgtcatggagagctttgc-3

Masern Genom: Frw: 5-gagaaacagattattatgacggg-3; Rev: 5-caaagctgggaatagaaact-3

Hamster GAPDH: Frw 5-gtattggacgaatggtacca-3; Rev: 5-ggtagagtcatactggaacatgtagacc-3

Primer zu Insert-Überprüfung bei pLL 3.7:

„Colonyprimer 5'(31)“: 5-aggaaactcacctaactgtaa-3

„Colonyprimer 3'(32)“: 5-cggccgcttaagcttgaac-3

siRNA Construction Kit, Sequenzen für:

L#1: gtaaagagtctcaacatgt

L#2: gattcgagctttgacccat.

pLL 3.7 Primer (shRNA Kasette):

L#1(+):tgtaaagagtctcaacatgtttcaagagaacatggtgagactctttacttttttc

L#1(-):tcgagaaaaaagtaaagagtctcaacatgttctcttgaaacatggtgagactctttaca

L#2(+):tgattcgagctttgaccatttcaagagaatgggtcaaagctcgaatcttttttc

L#2(-):tcgagaaaaaagattcgagctttgaccattctcttgaaatgggtcaaagctcgaatca

2.1.9 Bakterien

E.coli XL-10 Gold, Invitrogen

2.1.10 Zelllinien

Vero: Nierenfibroblastenzelllinie (Afrikanische grüne Meerkatze)

B95a: EBV-transformierte Affen-B-Zelllinie

BJAB: Lymphoblastoide B-Zelllinie, Human

CHO 5.3: Zellen aus den Ovarien des chinesischen Hamsters, exprimieren stabil CD46

CHO-SLAM: Zellen aus den Ovarien des chinesischen Hamsters, exprimieren stabil CD150

2.1.11 Medien

Bakterienmedium:

LB: 10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

mit H₂O auf 1l auffüllen und autoklavieren

LB-Agar: LB-Medium +1,5 % (w/v) Agar, autoklavieren. Antibiotika werden erst zugegeben, wenn die Temperatur der Lösung unter 50°C gefallen ist

Zellkulturmedium:

MEM Medienküche, Institut

FCS Biochrom AG, Berlin

2.1.12 Plasmide

Name:	Enthält:
pSC-N	(Nukleokapsid)
pSC-P	(Phospho-Protein)
pSC-M	(Matrix-Protein)
pCG-F1	(Fusions-Protein)
pCG-H5	(Haemagglutinin)
pEMC-La	(Large-Protein)

2.1.13 Puffer

Agarose Gelelektrophorese Laufpuffer:

50xTris-Acetat-EDTA (TAE): 242 g Tris, 57,1 ml konz. Essigsäure, EDTA 18,6 g, H₂O ad 1l

6x Probenpuffer: Bromphenolblau 0,25%, Xylencyanol 0,25%, Glycerol 30%

Tricine-SDS-Protein-Polyacrylamidgelelektrophorese:

10xLaufpuffer: 10 g SDS, 144 g Glycin, 30 g Tris, H₂O ad 1l; pH 8,7

Blotpuffer I: 36,34 g Tris, 200 ml MetOH, H₂O ad 1l; pH 10,7

Blotpuffer II: 3 g Tris, 200 ml MetOH, H₂O ad 1l; pH 7,4

Blotpuffer III: 5,25 g Aminocaprinsäure, 2 g Tris, 200 ml MetOH, H₂O ad 1l; pH 9,4

4xProteinlaufpuffer (gleichzeitig auch Lysisbuffer): 2 ml 1M TrisCL pH 6.8, 0,8 g SDS, 4 ml 10% Glycerol, 0,4 ml 14,7M β -Mercaptoethanol, 8mg Bromophenolblau

Zellkultur:

ATV: NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, D-Glukose 5 mM, NaHCO₃ 70 mM, Trypsin 500 mg/l, Versene 200 mg/l

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHPO₄x7H₂O 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, CaCl₂ 1,5 mM, MgCl₂ 1 mM

Einfriermedium: 90% Fötale Kälberserum (FCS) und 10% DMSO

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen gehalten. Sobald die Zellen einen konfluenten Monolayer bilden müssen sie gesplittet werden. Das Medium wird verworfen und die Zellen ca. 4 min in ATV Lösung belassen. Dadurch lösen sich die Zellen ab. Die suspendierten Zellen werden mit dem gleichen Volumen Zellkulturmedium gemischt und bei 200 g/5 min/RT abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in frischem Medium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

CHO5.3, 293T sowie Vero Zellen wurden in MEM 10%FCS, 120 mg/ml P/S; BJAB Zellen in RPMI 1640 10%FCS, 120 mg/ml P/S kultiviert.

2.2.1.2 siRNA Transfektion mit HiPerFect

Am Tag der Transfektion werden in einer 24-Loch Platte 4,5x10⁴ Zellen/500 μ l pro Napf ausplattiert. 0,4 μ g siRNA werden in 100 μ l Serum freien Medium verdünnt und kurz gevortext. Es werden 2 μ l HiPerfect dazugegeben und wieder kurz gevortext. Die Mischung wird für 7 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Transfektionskomplexe bilden können. Danach wird die Mischung zu den ausplattierten Zellen dazugetropft.

2.2.1.3 DNA Transfektion mit Lipofektamin 2000

Ein Tag vor der Transfektion werden die Zellen so ausplattiert, daß am folgenden Tag die Dichte der Zellen bei ca. 90-95% liegt. Die DNA wird in serumfreiem Medium verdünnt und mit Lipofektamin 2000 gemischt (je nach Napfgröße verschiedene Mengen z.B.: in einer 24-Loch Platte pro Napf 0.8 μ g DNA und 1 μ l Lipofektamin in 100 μ l Medium). Die Mischung wird kurz gevortext und dann für 20 min bei RT inkubiert, damit sich Transfektionskomplexe bilden können. Die Mischung wird danach auf die ausplattierten Zellen aufgetropft.

2.2.1.4 Einfrieren/Auftauen von Zellen

Zellen werden mittels ATV Lösung abgelöst und bei 200 g/5 min/RT abzentrifugiert. Die Zellen werden danach in Einfriermedium resuspendiert (90% FCS, 10% DMSO) und in Kyroröhrchen gegeben und bei -80°C für 24h eingefroren. Danach werden die Zellen für die längere Lagerung in flüssigen Stickstoff verbracht.

Zum Auftauen der Zellen wird das Kyroröhrchen in warmen Wasser (37°C) aufgetaut. Es wird frisches Medium dazugegeben und die Zellen bei 200 g/5 min/RT abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen erneut in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen werden dann in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert.

2.2.1.5 Viruspräparation

Masernvirus, Edmonston Stamm: Vero Zellen werden in großen Zellkulturflaschen (175cm²) bis zu einer Dichte von ca. 80% kultiviert. Die Zellen werden mit MV Edmonston mit einer MOI von 0,01 infiziert. Bis zur maximalen Synzytienbildung werden die Zellen bei 37°C, 5%CO₂ gehalten. Zur Viruspräparation wird das Medium bis auf einen Rest (ca. 5ml) abgezogen. Die Zellen werden mittels eines Zellschabers abgelöst und in Lösung gebracht. Diese Lösung wird bei -80°C eingefroren und danach wieder aufgetaut. Durch das Einfrieren werden die Zellen zerstört und die viralen Partikel freigesetzt. Zelltrümmer werden bei 1500 g/15 min/4°C abzentrifugiert und der Überstand als Virusvorrat aliquotiert (Lagerung bei -80°C). Die Viruskonzentration wird über einen Plaquetest bestimmt.

Masernvirus, WTFb Stamm (Wildtyp): Es werden 1x10⁸ BJAB Zellen mit einer MOI von 0,01 mit Masernvirus WTFb infiziert. Die Zellen werden in einer sog. „Roller-bottle“ bei 37°C, 5%CO₂ kultiviert. Nach mehreren Tagen ist die Infektion soweit fortgeschritten, dass nun keine Einzelzellen mehr, sondern nur Riesenzellen zu finden sind. Die Zellen werden bei 200 g/5 min/RT abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf einen kleineren Rest (5ml) verworfen. Die Zellen werden resuspendiert. Diese Lösung wird bei -80°C eingefroren und danach wieder aufgetaut. Durch das Einfrieren werden die Zellen zerstört und die viralen Partikel freigesetzt. Zelltrümmer werden bei 1500g/15min/4°C abzentrifugiert und der Überstand als Virusvorrat aliquotiert (Lagerung bei -80°C). Die Viruskonzentration wird über eine Endpunkttitration oder Plaquetest auf Vero-SLAM Zellen bestimmt.

2.2.1.6 Titerbestimmung der Viruspräparation mittels Plaquetest

Zur Titerbestimmung wird eine 1:10 Verdünnungsreihe des präparierten Virus hergestellt. Mit den Virusverdünnungen werden Vero Zellen infiziert. Diese werden so ausplattiert, dass sie bei der Infektion eine Dichte von ca. 90% haben (6-Loch Platte). Die Infektion wird für eine Stunde durchgeführt. Danach wird das Medium abgezogen und die Zellen mit Softagar (37°C) überschichtet. Nach Erstarren des Softagars werden die Zellen invers bei 37°C, 5%CO₂ für 5-6 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit haben sich Plaques gebildet (Punktförmige

Bereiche in denen das Virus den Zellmonolayer durch Zellyse zerstört hat). Da jeder Plaque von einer Infektion durch ein Virus entstanden ist lässt sich aufgrund der Verdünnungsstufe und der Anzahl der Plaques der Virustiter errechnen.

2.2.1.7 Titerbestimmung der Viruspräparation mittels Endpunkttitration

Für eine Endpunkttitration wird ein zu 50% konfluenten B95a-Zell-Monolayer mit 1:4 angesetzten Verdünnungsreihen des Virus in Medium mit 5% FCS überschichtet und anschließend fünf Tage bei 37°C inkubiert. Es wird der letzte Napf ausgewertet, in dem das Virus noch zu einer deutlichen Infektion führt. Aus jeweils 3 Ansätzen wird der Mittelwert bestimmt.

2.2.2 Histochemische Methoden

2.2.2.1 Immunfluoreszenz

Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und in 4% Paraformaldehyd Lösung für 10min fixiert. Sollen intrazelluläre Antigene angefärbt werden müssen dazu die Membranen permeabilisiert werden. Dazu wird eine 0,025% Triton X-100 Lösung auf die Zellen gegeben (5 min/RT). Die Zellen werden danach für 30min mit MEM 10% FCS inkubiert um unspezifische Bindungsstellen mit Proteinen abzusättigen. Nach waschen mit PBS werden die Zellen mit Erst- und Zweitantikörper (Fluorochrom gekoppelt) inkubiert (jeweils in kleinem Volumen/4°C/30 min). Die Zellen können danach optional eingedeckt werden (Moviol) um ein Austrocknen des Präparates zu verhindern.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Agarose Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen trägt man sie auf ein Agarosegel auf an dem eine Stromspannung anliegt. 0,6-3% Agarose-TAE Lösung (je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente) wird aufgeköcht und mit Ethidiumbromid versetzt (2µl einer 10% Ethidiumbromidlösung / 100ml), einem in die DNA interkalierenden Farbstoff. Den Proben wird Ladepuffer zugegeben und die DNA in die Taschen des Gels geladen. In einer Laufkammer mit 1xTAE werden 30-90 Volt angelegt. Da DNA negativ geladen ist wird sie nach ihrer Ladung aufgetrennt während sie von der Anode zur Kathode läuft.

2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion / PCR

Mittels PCR lassen sich DNA Fragmente spezifisch amplifizieren. Dabei werden in zyklischer Abfolge von Schritten spezifische Primer an die DNA Matrix gebunden (Annealing). Es folgt eine Elongation der gebundenen Primer durch eine thermostabile Polymerase, die von einer Phase der thermischen Denaturierung der Stränge gefolgt wird. In jedem Zyklus wird so das PCR Produkt exponentiell vermehrt.

Reaktionsansatz: 200 μ g Plasmid-DNA
 100 pmol sense Primer
 100 pmol antisense Primer
 1x Kugel PuReTaqTM Ready-To-Go PCR Beads (Amersham)

PCR Programm (je nach Anwendung unterschiedlich)

95°C, 30 sec (Denaturierung)
60°C, 20 sec (Primerbindung)
72°C, 30 sec (Elongationszeit)
→ 25 Zyklen

2.2.3.3 Aufreinigung von PCR Produkten

PCR Produkte werden über Anionenaustauschersäulen aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit; QIAGEN). Das PCR Produkt wird auf eine bestimmte Salzkonzentration gebracht, auf die Säulen aufgetragen und durchzentrifugiert (8000g/30sec/RT) An der Säulenmatrix (z.B. Dextran, Cellulose), welche positiv geladen ist, werden die negativ geladenen Nukleinsäuren gebunden. Je nach Ionenstärke und PH-Wert binden Proteine, einzelne bzw kurze Nukleotide nicht an die Matrix und werden so von dem PCR Produkt getrennt. Um das Salz loszuwerden wird danach mit Alkohol gewaschen. Das aufgereinigte PCR Produkt kann danach mit H₂O von der Säule eluiert werden.

2.2.3.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Nukleinsäurekonzentrationen werden photometrisch bestimmt. Die zu bestimmende Nukleinsäure wird verdünnt (3 μ Probe + 70 μ H₂O) und in eine Messküvette überführt. Durch Extinktion der Lösung bei der Wellenlänge 260 nm kann man mit den anderen

Parametern zusammen die Konzentration unter Annahme folgender Werte ($1 \text{ OD}_{260}=40 \text{ }\mu\text{g RNA/ml}$; $1 \text{ OD}_{260}=50 \text{ }\mu\text{g DNA/ml}$) errechnen.

Der Grad der Verunreinigung kann durch das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt werden: Saubere RNA-Präparationen besitzen einen Quotienten von 2,0; saubere DNA einen Quotienten von 1,8.

2.2.3.5 Transformation von Bakterien

Darunter versteht man das Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien, um diese zu vermehren. Die kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut und die Plasmid-DNA dazu gegeben und bei 4°C 30 min inkubiert. Danach erfolgt der sog. „Hitzeschock“ ($42^\circ\text{C}/30\text{sec}$). Die Bakterien werden noch mal kurz auf Eis abgekühlt und dann mit Nährmedium (1xLB) bei $37^\circ\text{C}/60\text{min}$ inkubiert, damit sich die auf dem Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz ausbilden kann. Die Bakterien werden dann auf Selektionsplatten (AB je nach Resistenz) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gehalten.

2.2.3.6 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Plasmide werden mittels „QIAGEN Plasmid Mini/Midi/Maxi Kit“ aus Bakterienkulturen isoliert. Die Bakterienkultur wird abzentrifugiert ($1500\text{g}/10\text{min}$), der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wird in LsgI gelöst und die Bakterien mit LsgII lysiert ($0,2 \text{ N NaOH} / 1\% \text{ w/v SDS}$). Anschließend gibt man LsgIII dazu ($3 \text{ M Kaliumacetat pH } 5.2$) und mischt gut. Die Lösung wird klar, enthält aber Kalium-SDS Flocken, welche schwer löslich sind und deshalb ausfallen. Die Flocken werden abzentrifugiert und der Überstand auf Anionenaustauschersäulen gegeben. Die Plasmid-DNA wird über diese isoliert und in H_2O eluiert (nähere siehe 2.5.3.)

2.2.3.7 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA, indem sie spezifische Sequenzfolgen erkennen (meist palindromische Basenfolge). Die Restriktionsendonukleasen trennen den DNA -Strang entweder in sog. *sticky ends* (Überhang eines Strangendes) oder *blunt ends* (glattes Ende beider Stränge). Restriktionsverdau werden sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken verwendet. Eine Enzymeinheit (u) ist definiert als Menge des Enzyms, die nötig ist, um in einer Stunde $1 \mu\text{g}$ $\square\square$ DNA zu verdauen.

Typischer Reaktionsansatz: DNA 05-1 μg

10x Puffer	2 μ l
Enzym	5 u
H ₂ O	ad 20 μ l

Die Inkubationszeit liegt zwischen 1h-2h. Die Inkubationstemperatur ist vom eingesetzten Enzym abhängig.

2.2.3.8 Tricine-SDS-PAGE

Die Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von Proteinen ihrem Gewicht entsprechend. Dazu werden die Proteine durch SDS und β -Mercaptoethanol denaturiert. Die Proteine erhalten durch das SDS, welches sich an sie anlagert, alle die gleiche Ladung (-). Somit kann die proteinspezifische Ladung vernachlässigt werden. Damit ist gewährleistet, dass sich die Proteine nur nach ihrer Größe auftrennen. Das Acrylamid polymerisiert durch freie Radikale, die von APS freigesetzt und von TEMED stabilisiert werden.

Trenngel 10%

1,5M Tris (pH 8,9)	4,0 ml
H ₂ O	6,5 ml
Bis-/Acrylamid(30%)	5,3 ml
20% SDS	80 μ l
TEMED	5 μ l
APS (10%)	140 μ l

Sammelgel 5%

1M (pH 6,8)	1,2 ml
H ₂ O	6,0 ml
Bis-/Acrylamid(30%)	1,3 ml
20% SDS	50 μ l
TEMED	10 μ l
APS (10%)	100 μ l

Die Kammern der Laufapparatur werden mit Laufpuffer gefüllt (1g SDS; 14,4g Glycerin; 3g Tris; ad 1l H₂O). Der Gellauf erfolgt bei 30mA für ca 2-3h.

2.2.3.9 Western Blot Analyse

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen werden sie auf eine Nitrozellulose-Membran fixiert. Das Gel wird aus der Apparatur genommen und auf mit Transferpuffer angefeuchtete Filterpapiere gelegt (von unten nach oben Filterpapier getränkt in: 3x BlottPufferI, 2x BlottPufferII, Membran in BlottPufferII, Gel, 4x BlottPuffer III). An die Blottkammer werden 100mA für 1h angelegt (Kleines Gel, 7,3 cm x 8,3 cm; Dicke: 1,5 mm) . Die Proteine im Gel werden so elektrophoretisch aus dem Gel auf die Membran

transferiert. Die Membran wird danach für 1h in PBS-Tween, 5% Milchpulver blockiert. Die Milchpulverlösung wird ersetzt und der Erst-Antikörper dazugegeben (Verdünnung je nach Antikörper von 1:500 bis 1:5000) und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler geschwenkt und inkubiert. Das Milchpulver wird verworfen und die Membran 2x mit PBS-Tween gewaschen. Danach wird wieder 1h mit PBS-Tween, 5% Milchpulver blockiert. Daraufhin wird der Zweitantikörper (Horse-Radish-Peroxidase(HRP) konjugiert) inokuliert (1h/RT). Die Membran wird 2x mit PBS-Tween gewaschen und zwischen zwei Folien in eine Röntgenkassette eingelegt. Die Membran wird mit ECL Lösung betropft, die durch die an den Zweitantikörper gekoppelte HRP das ECL umsetzt und dabei eine Chemolumineszenz hervorruft. Diese kann dann auf dem aufgelegten Röntgenfilm abgebildet werden. Belichtungszeiten variieren je nach Signalstärke (zwischen 30 sec und 20 min). Die Röntgenfilme werden je 1min entwickelt, gewässert und danach für 1min fixiert.

2.2.3.10 „ShortCut“ siRNA Präparation

Von den Zielsequenzen werden DNA Amplifikate via PCR hergestellt. Die verwendeten Primer besitzen am 5' Ende eine T7 RNA Polymerase-Promoter Sequenz. Die Produkte enthalten also die Zielsequenz, flankiert durch den T7 Promoter. Durch Transkription mittels einer T7 RNA Polymerase entstehen doppelsträngige RNA Moleküle. Die RNA Transkripte (300-700 bp lang) werden mittels ShortCut Rnase III verdaut. Es entsteht eine heterogene Mischung kurzer (18-25bp) siRNAs. Die siRNAs können dann in Zellen transfiziert werden und führen dort zur RNA Interferenz.

PCR:

Deckel 105°C

94°C 15sec

64°C 15sec

72°C 45sec

→ 30 Zyklen

Transkription T7 RNA Polymerase:

1 µg DNA

10 µl 5x Buffer

5 µl 20mM NTPs

30 u T7 RNA Polymerase

ad 50 μ l H₂O

➔ Inkubation über Nacht bei 37°C

ShortCut RNaseIII Verdau:

50 μ l dsRNA (gesamter Transkriptionsansatz)

10 μ l 10x Buffer

10 u ShortCut RNase III

10 μ l 10x MnCl₂

ad 100 μ l H₂O

siRNA Aufreinigung:

Die siRNA wird über Säulen aufgereinigt (Rneasy Kit/ Qiagen). 100 μ l aus dem Verdau werden mit 100 μ l RLT/1% β -Mercaptoethanol verستetzt. Danach werden 100 μ l Isopropanol zugegeben und die Probe auf eine Säule aufgetragen und durchzentrifugiert. Die siRNA befindet sich danach im Durchfluss. Es werden unverdaute dsRNA Stücke und Reste der DNA Template in der Säule zurückbehalten. Der Durchfluss wird mit 200 μ l Isopropanol gemischt und auf eine neue Säule aufgetragen. Unter dieser hohen Alkoholkonzentration bindet nun auch die siRNA an die Säulenmatrix. Die Lösung wird durchzentrifugiert und die Säule mit RPE Puffer 2x gewaschen. Die siRNA lässt sich dann mit Wasser eluieren.

2.2.3.11 Real Time PCR

Die Reverse Transkription wurde mit der „M-MLV Reverse Transkriptase RNase H⁻, Point Mutant“ (Promega) entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es werden dazu 1 μ g RNA eingesetzt. Es wurden oligo(dT) und Zufalls-Hexamere als Primer eingesetzt. Die cDNA wird 1:10 verdünnt und davon 1 μ l in einer 25 μ l PCR Reaktion eingesetzt. Als Master-Mix wird 1x iQTMSYBR-Green (BioRad) verwendet. Pro Probe werden je 0,5 μ l Primer (20mM) eingesetzt. PCR Produkte für GAPDH werden UV vermessen und eine Verdünnungsreihe erstellt (je 10⁷ bis 10² Moleküle/ μ l). Aus dieser Verdünnungsreihe wird die Standardkurve für die Real Time PCR erstellt. Die PCR wird auf dem iCycler iQTM Multicolour Real Time Detection System (BioRad) in einer 96-Loch PCR Platte (BioRad) durchgeführt.

PCR-Protokol:

1)Aktivierungsphase für die Polymerase	06:00 min	95°C
2)Denaturierung	00:30 sec	95°C
3)Annealing	00:30 sec	60°C

4)Elongation

00:30 sec 72°C

Wiederholungen x40

Die Fluoreszenzintensität wird während jedem Zyklus gemessen. Nach dem letzten Zyklus werden die Produkte bei 95°C/1min denaturiert und dann bei 55°C/1min wieder hybridisiert. Es wird eine Schmelzkurve ermittelt indem der Verlust der Fluoreszenzintensität gemessen wird während die Temperatur (beginnend bei 55°C) in 1°C Schritten (je 10s) angehoben wird (45Zyklen). Die Schmelzkurve gibt Aufschluss darüber, ob die erzeugten PCR Produkte die gleiche Größe haben. Dies kann noch überprüft werden, indem man die Produkte auf einem Agarosegel auftrennt.

Die Effizienz(E) der Primer wird durch den Standart ermittelt, wobei angenommen wird: $E=10^{(-1/\text{Steigung})}$ und das E_{GAPDH} gleich der $E_{\text{N-/M-/Geno-Primer}}$ ist. Die Effizienz sollte zwischen 80-100% liegen. Die Quantifikation der Transkripte folgt dem Modell von Pfaffl (Pfaffl, 2001). Die Menge der Transkripte wird im Bezug zum Haushaltsgen GAPDH normalisiert und als relative Expressionsrate R dargestellt: $R=E_x \cdot \Delta Ct_x / E_{\text{ref}} \cdot \Delta Ct_{\text{ref}}$ (wobei x das „gene of interest“ ist, ref das Haushaltsgen GAPDH, ΔCt die Differenz der „threshold cycles (Ct) zwischen Kontrolle und behandelte Probe und E die Effizienz der eingesetzten Primerpaars).

3. Ergebnisse

3.1 Transkription doppelsträngiger RNA von DNA Plasmid-Vorlagen

Um spezifische siRNA für die jeweiligen MV Gene herzustellen, wurden PCR Produkte der einzelnen Gene hergestellt. Die PCR Primer fügen ihren jeweiligen Produkten am 5' Ende einen T7 RNA Polymerase Promoter (5'-taatacactactatag-.....-3') an. Als Vorlage für die PCR dienen DNA Plasmide, in denen die jeweiligen MV Gene einkloniert wurden. Im einzelnen sind dies die Plasmide pSC-N (Nukleokapsid), pSC-P (Phospho-Protein), pSC-M (Matrix-Protein), pCG-F1 (Fusions-Protein), pCG-H5 (Hämagglutinin) und pEMC-La (Large-Protein). Von diesen PCR Produkten kann mittels der T7 RNA Polymerase RNA transkribiert werden. Die komplementären Stränge lagern sich nach der Transkription zusammen und bilden doppelsträngige RNA (dsRNA). Die Lokalisation der Zielsequenzen im MV Genom sind in Abb.6 schematisch dargestellt, die jeweilige Länge der dsRNA Transkripte ist unter dem jeweiligen Gen angegeben.

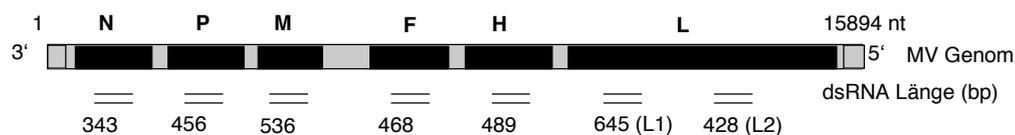


Abb.6: Lokalisation und Länge der dsRNA Transkripte im MV Genom. Die Länge der dsRNA Transkripte sind 342bp für das N Protein, 456bp für das P Protein, 536bp für M Protein, 468 für F Protein und 489 für H Protein. Für das L Protein wurden zwei Sequenzen ausgewählt, L1 mit 645bp und L2 mit 428bp Länge.

Die Auswahl der Sequenzen ist dabei zufällig und basiert auf keinen Regeln oder Auswahlkriterien.

Die dsRNA Transkripte werden in einem 1,5% Agarosegel auf die richtige Länge und auf die Abwesenheit falscher RNA Transkripte überprüft. Dies ist in Abb.7 dargestellt:

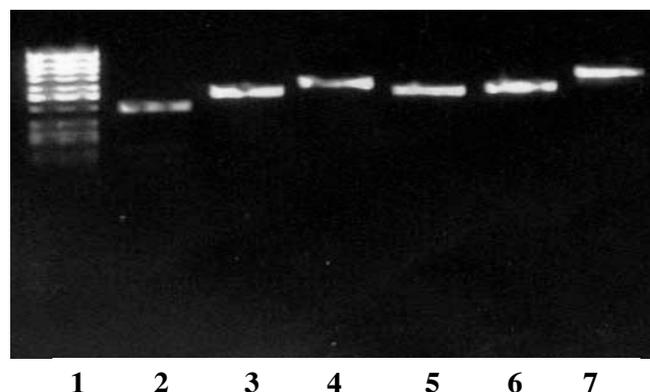


Abb.7: dsRNA Transkripte aufgetrennt auf einem 1,5% Agarosegel. Jeweils aufgetragen ist 1=50bp Marker, 2=N (343bp), 3=P (456bp), 4=M(536), 5=F (468bp), 6=H (489) und 7= L1 (654).

3.2 ShortCut Rnase-III Verdau

Die dsRNA aus der Transkription wird anschließend mit der Endonuklease “Dicer” verdaut. Diese schneidet die dsRNA, so daß 18-25bp kurze RNA Duplices entstehen (siRNA). Die Produkte des Verdau werden über Anionenaustauscher-Säulen gereinigt. Diese Aufreinigung entfernt Nukleotide, unverdaute RNA und restliche DNA der Vorlage. Die verdaute RNA wird noch auf einem 3% Agarosegel aufgetrennt, um den Verdau auf Vollständigkeit und Abwesenheit anderer Nukleinsäuren zu überprüfen (Abb.8).

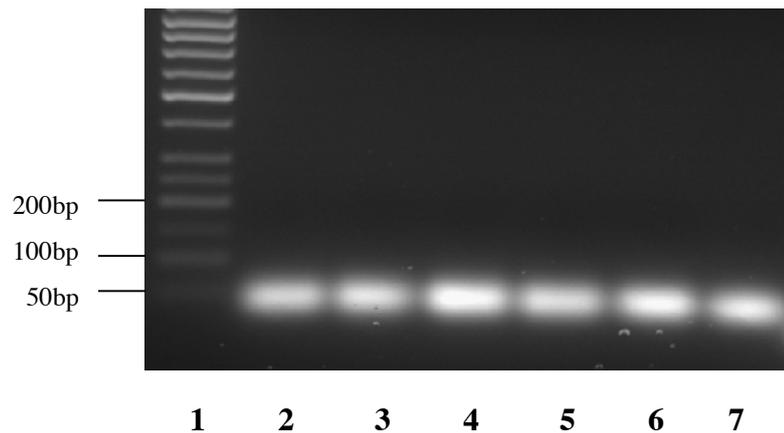


Abb.8: ShortCut RNase-III Verdau. Doppelsträngige RNA wird mittels Dicer in kurze siRNA Duplices von 18-25bp Länge geschnitten. Die Produkte sind auf einem 3% Agarosegel aufgetrennt, nachdem sie über eine Anionenaustauschersäule aufgereinigt wurden. Es sind keine Reste der DNA Vorlage oder unverdaute RNA zu erkennen. Aufgetragen ist: 1= 50bp Marker (Links sind zusätzlich die Markerbanden für 200bp, 100bp und 50bp angegeben, 2= N-siRNA, 3=P-siRNA, 4= M-siRNA, 5= F-siRNA, 6= H-siRNA und 7= L1-siRNA.

3.3 Kontrollen: Interferon-Induktion durch siRNA und Spezifität der siRNA

Es ist bekannt, dass doppelsträngige RNA in Säugerzellen eine Immunantwort auf zellulärem Level auslöst, die zur Induktion der Interferonantwort führt. Merkmal davon ist unspezifischer Abbau von RNA und Repression der allgemeinen Proteinsynthese (Williams BR). Im folgenden Versuch wird gezeigt, dass die Transfektion der siRNA keine Interferon-Induktion hervorruft, und somit die antivirale Wirkung alleine auf der spezifischen Wirkung der jeweiligen siRNA basiert.

Zur Kontrolle ob durch die Transfektion der siRNA Interferon induziert wird, dient der Nachweis von Mx Protein. Die Expression von Mx-Protein wird durch Typ-I-Interferon induziert und hemmt die Replikation verschiedener Viren mit negativsträngigem Genom oder RNA Intermediaten während der Replikation. In Abb.9 wurde die Induktion von Mx-Protein mittels Western Blot Analyse überprüft: Da CHO 5.3 Zellen (Hamsterzellen) nicht auf

humanes IFN reagieren, wurden die oben beschriebene dsRNA (unverdaut, 456bp lang) zur Induktion des Mx-Protein benutzt. Gleiche Mengen transfizierter siRNA induziert das Mx Protein nicht. Zur Kontrolle wurde noch die IFN-induzierte Expression von Mx Protein in humanen Zellen (BJAB) überprüft.

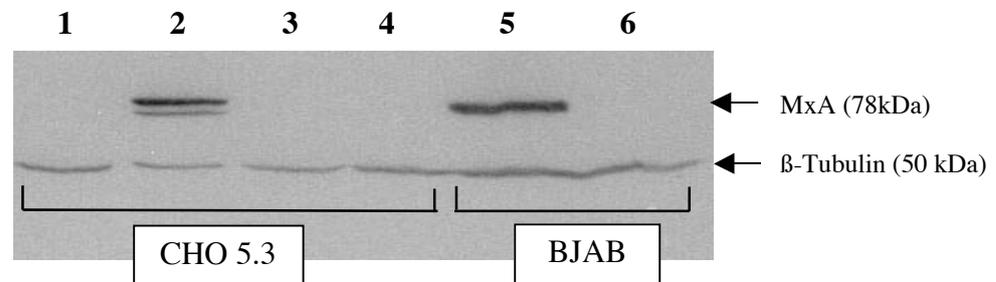


Abb.9: Mx-Induktion. Als Kontrolle wird MxA in BJAB (humane Zelllinie) durch Gabe von 100u IFN (Typ-1) induziert. Spur 1: Negativkontrolle CHO 5.3 mit humanem IFN (100u), 2: CHO 5.3 transfiziert mit 300 ng dsRNA, 3: CHO 5.3 transfiziert mit 300 ng siRNA, 4: Unbehandelte CHO 5.3, 5: BJAB mit 100u IFN, 6: Unbehandelte BJAB. Der Westernblot wurde 48h nach Transfektion / IFN Behandlung durchgeführt.

Zur weiteren Kontrolle der Spezifität wurden Zellen mit einer siRNA transfiziert, die nicht gegen MV Sequenzen gerichtet ist (siRNA gegen CD150). Mittels einer Western Blot Analyse (Abb.10) wurde der Effekt dieser siRNA auf die MV Gen-Expression überprüft:

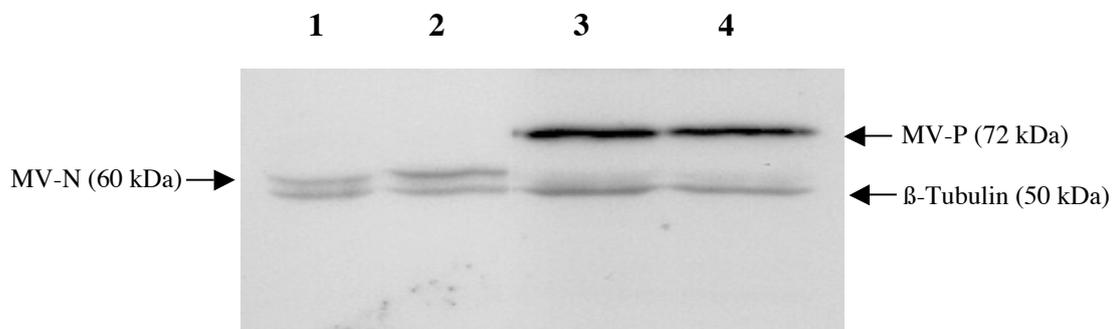


Abb.10: Wirkung unspezifischer siRNA auf MV Infektion. 1×10^5 CHO 5.3 Zellen werden mit unspezifischer siRNA transfiziert (300 ng, siRNA-CD150) und 18h später mit MV Edomonston (MOI 0,3) infiziert. Nach weiteren 40h wird ein Western Blot durchgeführt. 1: CHO 5.3, nicht transfiziert, 2: CHO 5.3 mit siRNA-CD150 transfiziert, 3: CHO 5.3, nicht transfiziert, 4: CHO 5.3 mit siRNA-CD150 transfiziert. Als Ladekontrolle dient beta-Tubulin, Spur 1+2 sind mit MV anti-N Antikörper (F227), 3+4 mit MV anti-P (P3) Antikörper behandelt.

Unspezifische siRNA beeinflusst die Expression von MV-N und MV-P nicht. Um die Expression der viralen Gene zu beeinflussen muss die siRNA spezifisch sein.

3.4 Versuchsaufbau der siRNA Experimente

Um die Effekte der siRNA zu analysieren wurden die Zellen nach folgendem Protokoll behandelt: $4,5 \times 10^5$ CHO5.3 werden in einer 24-Loch Platte ausgesäht und mit 300ng siRNA transfiziert. 18 Stunden später werden die Zellen mit Masernvirus Stamm Edmonston infiziert (MOI: 0,5). Nach weiteren 40 Stunden werden die Proben zur Analyse benutzt.

3.5 Cis-Effekte der siRNA

Die Zellen wurden nach dem angegebenen Muster (3.4) behandelt. Die Proben wurden mittels eines Western Blots analysiert. Es sollte geprüft werden, ob die Genexpression der jeweiligen Zielgene durch die passende siRNA unterbunden wird (Abb.11)

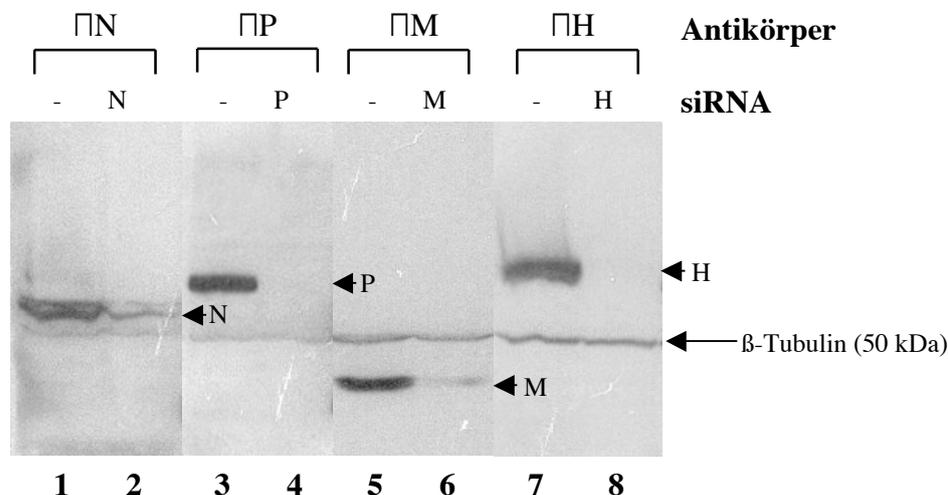


Abb.11: Cis Effekte der siRNA. Mittels Western Blot wurde überprüft, ob die jeweilige siRNA die Expression des Zielgens unterbindet. Die einzelnen Spuren wurden wie folgt entwickelt: 1+2 anti MV-N(F227), 3+4 anti MV-P (P3), 5+6 anti MV-M (MAB8910), 7+8 anti MV-H (Polyklonales Serum). Die jeweils eingesetzte siRNA ist: 2: N-siRNA, 4: P-siRNA, 6: M-siRNA und 8:H-siRNA. Als Ladekontrolle wurde ein β -Tubulin Antikörper eingesetzt.

Aufgrund des Western Blots ist ersichtlich, dass die eingesetzten siRNAs jeweils in der Lage sind, die Expression des Zielgens zu unterbinden.

3.6 Transeffekte der siRNA

Das N-, P- und L- Protein bilden zusammen den RNA-abhängige RNA Polymerase-Komplex und zusammen mit der RNA den RNP-Komplex. Wird die Expression eines dieser Proteine unterbunden, sollte dies generell die Transkription bzw Replikation, und damit auch die Expression der restlichen MV Proteine unterbinden.

Um dies zu überprüfen werden Zellen mit spezifischer siRNA behandelt (jeweils gegen N, P, und L) und die Expression anderer viraler Proteine überprüft (Abb.12):

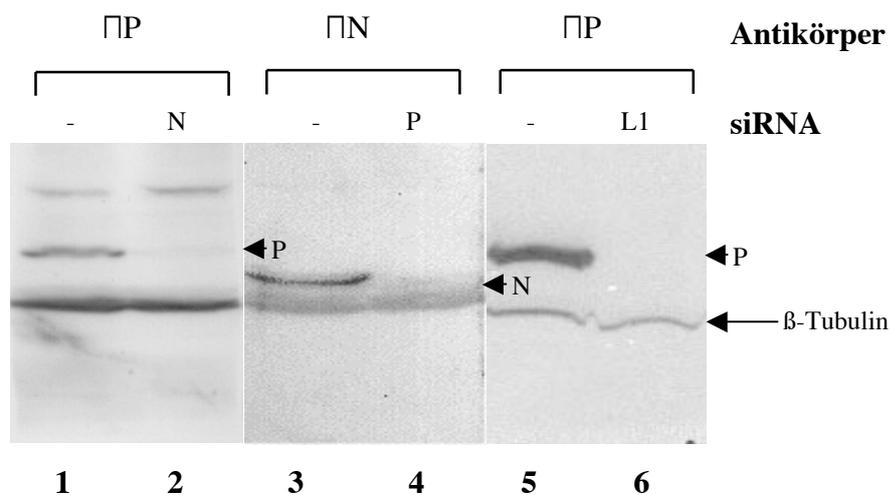


Abb.12: Trans-Effekte der siRNA. Mittels Western Blot wurde überprüft, wie spezifische siRNA die Expression anderer viraler Genprodukte beeinflusst. Die einzelnen Spuren wurden wie folgt entwickelt: 1+2 anti MV-P(P3), 3+4 anti MV-N (F227), 5+6 anti MV-P (P3). Die jeweils eingesetzte siRNA ist: 2: N-siRNA, 4: P-siRNA, 6: L1-siRNA. Als Ladekontrolle wird ein β -Tubulin Antikörper eingesetzt.

Der Versuch zeigt, dass N-siRNA die Expression von P, P-siRNA die Expression von N und L1-siRNA die Expression von P verhindert. Dies lässt darauf schließen, dass siRNA gegen das N-, P- und L-Protein die Transkription / Replikation stark einschränkt oder vollständig verhindert.

3.7 Effekte der M-siRNA auf die Genexpression

Wie bereits von beschrieben führt die Abwesenheit des M-Proteins zu einer verstärkten Fusogenität der Masernviren und zu stark eingeschränkter Produktion neuer Virionen. Im folgenden Versuch wird analysiert, welchen Effekt M-siRNA auf die Genexpression der anderen viralen Proteine hat. Dazu wurden Zellen nach obigem Muster mit M-siRNA transfiziert und mittels Western Blot die Expression des N-, P-, F- und H-Proteins analysiert (Abb.13):

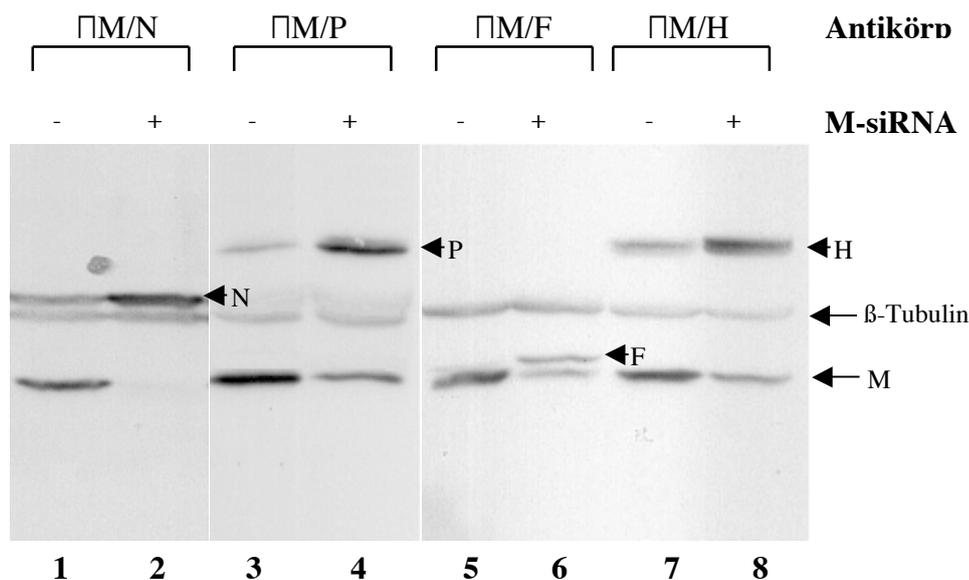


Abb.13: Effekt von M-siRNA auf die MV Genexpression. CHO 5.3 Zellen wurden mit M-siRNA behandelt und ein Western Blot durchgeführt. Die Spuren wurden wie folgt entwickelt: 1-8 mit anti MV-M (MAB8910) und β -Tubulin. Zusätzlich: 1+2 anti MV-N (F227), 3+4 anti MV-P (P3), 5+6 anti MV-F (Polyklonales Serum), 7+8 anti MV-H (Polyklonales Serum). Die Proben 2, 4, 6 und 8 wurden mit M-siRNA behandelt.

Wie auf dem Blot zu sehen ist führt die Transfektion von M-siRNA zu einer verringerten M-Protein Expression (Spur 2, 4, 6, 8) und dabei gleichzeitig zu verstärkter Expression des N-Protein (Spur 2), des P-Proteins (4), des F-Proteins (6) und des H-Proteins (8).

3.7.1 Quantifizierung der Proteinexpression

Die entwickelten Filme wurden eingescannt und mittels der AIDA Software quantifiziert. Dazu wurde um jede Bande des Western Blots ein Quadrat gleicher Größe gelegt und die Pixeldichte der Banden verglichen. Die Proteinexpression der unbehandelten Zellen wird jeweils als 100% angesetzt. Das Ergebnis ist in Abb.14 dargestellt:

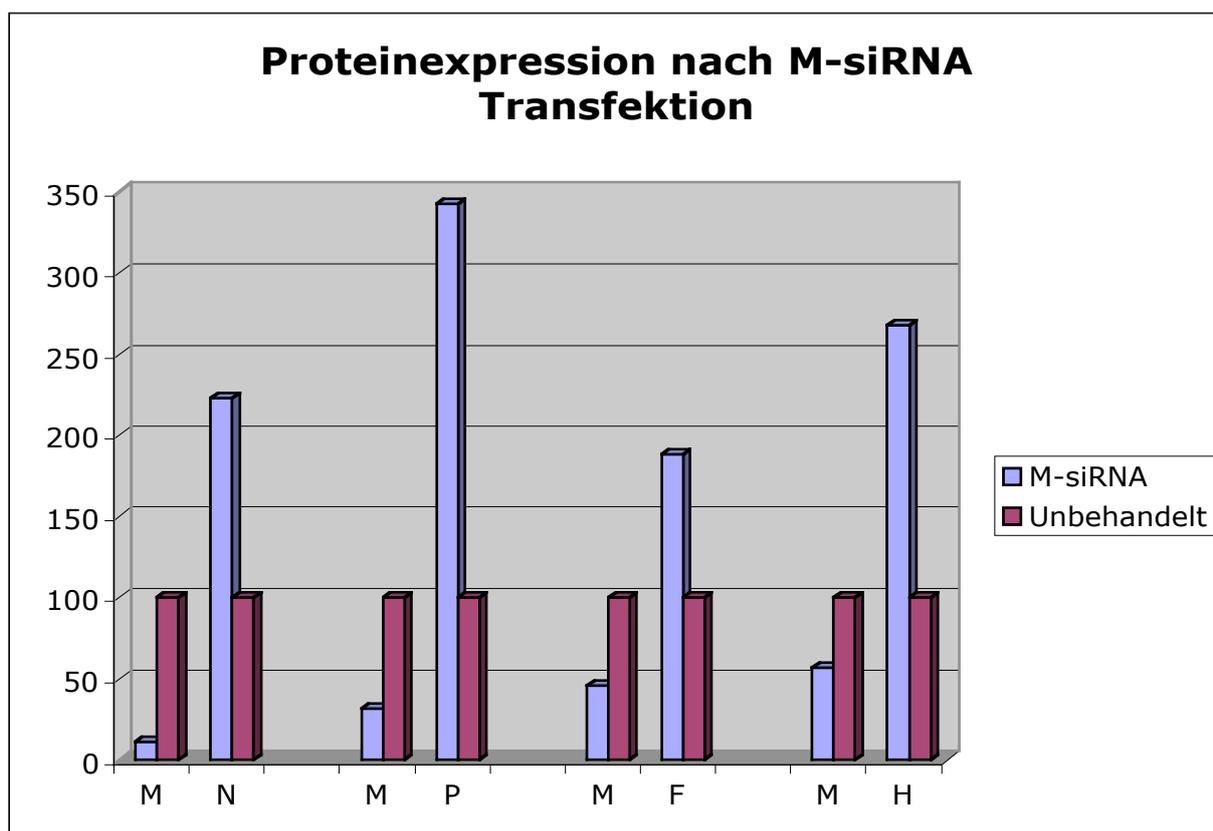


Abb.14: Proteinexpression nach M-siRNA Transfektion. Links ist jeweils die Expression des M Proteins, rechts davon die Expression von N, P, F oder H dargestellt. Die Expression der unbehandelten Zellen wird als 100 (%) angesetzt.

Die Inhibition des M Proteins führt zu einer verstärkten Expression von N, P F und H. Die Expression des N-Proteins steigt im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf 223%, die Expression des P-Proteins auf 343%, die Expression des F-Proteins auf 188% und die Expression des H-Proteins auf 268% an.

3.8 Einfluß von Hüllprotein-spezifischer siRNA auf die Synzytiumbildung

CHO 5.3 Zellen wurden auf Objektträgern ausplattiert und mit M-siRNA, F-siRNA oder H-siRNA transfiziert und 18h nach Transfektion mit MV Edmonston infiziert (MOI 0,5). Die Bilder wurden 40h p.I. aufgenommen (Abb.15).

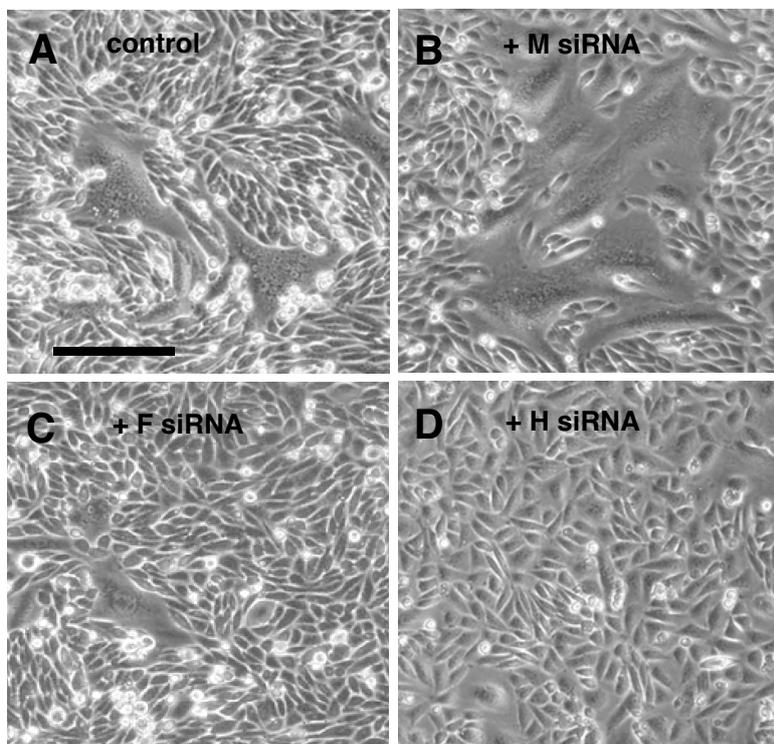


Abb.15: Synzytiumbildung nach MV Infektion. CHO 5.3 wurden mit A) CD-150-siRNA B) M-siRNA C) F-siRNA oder D) H-siRNA (300ng) transfiziert und 18h später mit MV Edmonston infiziert (MOI 0,5). Die Bilder wurden 40h p.I. aufgenommen. Der Balken in A entspricht 20 μ m.

Die Zellen, die mit M-siRNA transfiziert wurden, zeigen stark erhöhte fusogene Aktivität. Dieser Effekt wurde bereits für ein rekombinantes Masernvirus beschrieben, bei dem das M Leseraster deletiert wurde. Die Inhibition der Expression des M-Proteins durch M-siRNA führt zu einem ähnlichen Effekt.

Die mit F-siRNA oder H-siRNA transfizierten Zellen zeigen geringe bis keine Synzytienbildung. Zur Fusion mit Nachbarzellen ist die Koexpression von F und H nötig. Fehlt eines der beiden Proteine kommt es nicht zur Fusion. Dies zeigt auch dieser Versuch mit F-/H-siRNA.

3.9 Einfluß von F-/H-siRNA auf die Expression der Glykoproteine

CHO 5.3 Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und nach angegebenen Protokoll behandelt. 40h p.I. wurden die Zellen zur Immunfluoreszenz vorbereitet (Abb.16). Die Zellen wurden mit CD150-siRNA(Kontrolle), F-siRNA oder H-siRNA transfiziert.

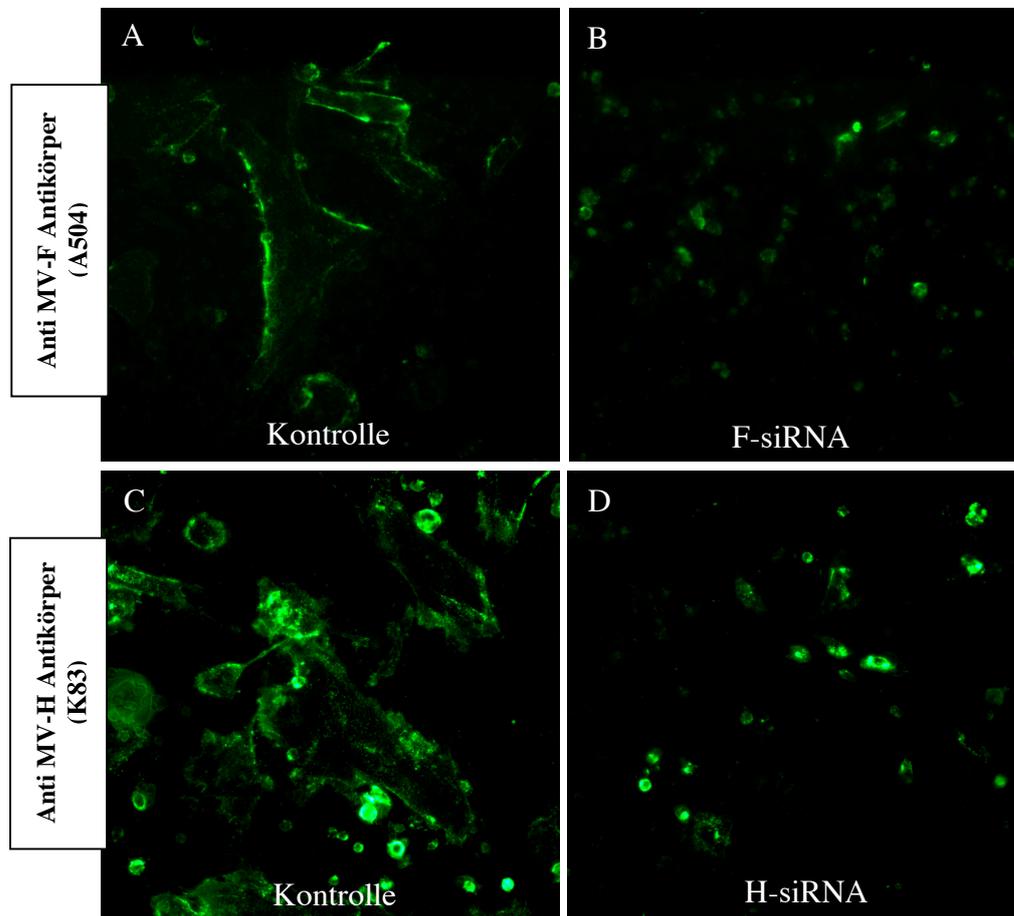


Abb.16: Einfluß von F-/H-siRNA auf die Expression von MV-F und MV-H. A) und C) wurden mit Kontroll siRNA (CD150-siRNA) transfiziert, B) mit F-siRNA und D) mit H-siRNA. A) und B) wurden mit dem MV-F spezifischen Antikörper A504, C) und D) mit dem MV-H spezifischen Antikörper K83 gefärbt. Als Zweitantikörper wurde ein FITC konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper eingesetzt.

In Abbildung A) erkennt man Synzytien, an deren Oberfläche das F Protein exprimiert wird, im Gegensatz dazu sind in Abbildung B) keine Synzytien zu erkennen und die Expression des F Protein ist stark reduziert. Nur wenige vereinzelte Zellen sind noch positiv markiert. In Abbildung C) ist das H Protein gefärbt. Zu erkennen sind sehr große Synzytien, auf deren Oberfläche das H Protein exprimiert wird. Bei den mit H-siRNA transfizierten Zellen sind keine Synzytien zu erkennen, und die H-Expression beschränkt sich auf einzelne Zellen. Sowohl die F- wie H-siRNA sind also in der Lage die Expression ihres Zielgens zu

unterbinden. Fehlt entweder das F- oder H-Protein kann der Virus auch keine Zellfusion mehr induzieren und es kommt nicht zur Synzytienbildung.

3.10 Einfluß von M-siRNA auf die Expression des M-Proteins

CHO 5.3 Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und nach angegebenen Protokoll behandelt. 40h p.I. wurden die Zellen zur Immunfluoreszenz vorbereitet. Die Zellen wurden mit CD150-siRNA(Kontrolle) oder M-siRNA transfiziert (Abb.17).

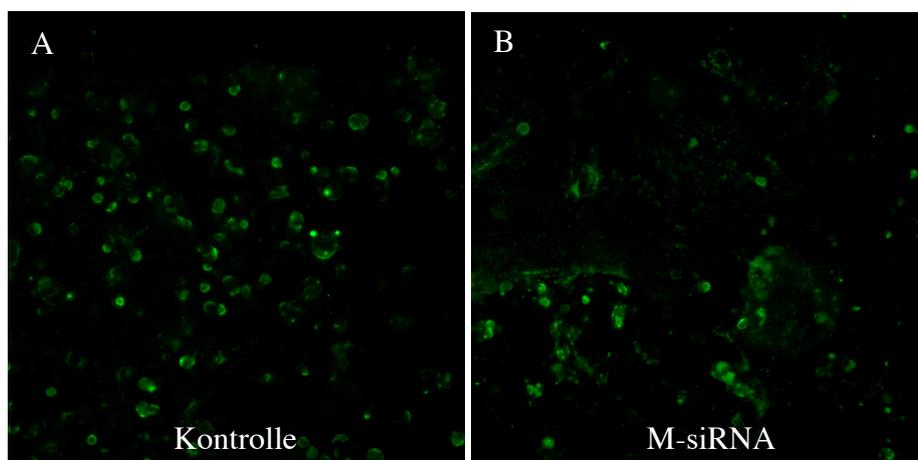


Abb.17: Einfluss von M-siRNA auf die Expression des M-Proteins. Die Zellen wurden transfiziert mit A) CD150-siRNA (Kontrolle) oder B) M-siRNA. Die Zellen wurden mit anti MV-M Antikörper (MAB8910) gefärbt. Als Zweitantikörper wurde ein FITC konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper eingesetzt

In den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen ist die Expression des M Proteins normal. In den mit M-siRNA transfizierten Zellen bilden sich sehr große Synzytien aus. In diesen ist das M Protein schwach exprimiert und das M-Protein ist diffus im Zytoplasma der Synzytien verteilt.

3.11 Einfluß von RNP spezifischer siRNA auf die Expression von MV-N und MV-P

CHO 5.3 Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und nach angegebenem Protokoll behandelt. 40h p.I. wurden die Zellen zur Immunfluoreszenz vorbereitet (Abb.18). Die Zellen wurden entweder mit CD150-siRNA (Kontrolle), N-siRNA, P-siRNA oder L1-siRNA behandelt. Da für das L-Protein keine spezifischen Antikörper vorhanden sind, werden die mit L1-siRNA behandelten Zellen für das Nukleokapsid (F227) gefärbt.

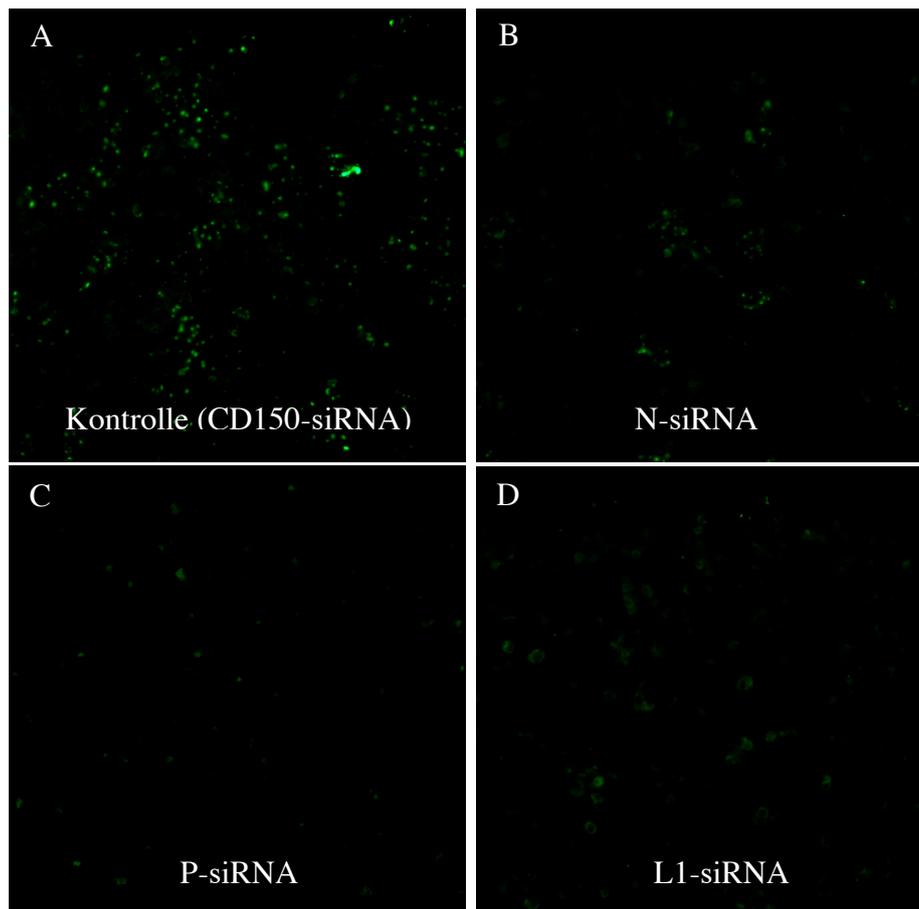


Abb.18: Einfluß von RNP-spezifischer siRNA. CHO 5.3 wurden nach Transfektion von siRNA mit MV Edmonston (MOI 0,5) infiziert. 40h p.I. wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Zellen wurden jeweils transfiziert mit : A) CD150si-RNA (Kontrolle), B) N-siRNA, C) P-siRNA, D) L1-siRNA. Die Proben wurden mit anti MV-N Antikörper (F227) behandelt, nur C) mit anti MV-P (P3) Antikörper. Als Zweit-Antikörper wird ein FITC konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper benutzt.

Die siRNA gegen N reduziert die Expression von MV-N, P-siRNA die Expression von MV-P und die L1-siRNA die Expression von MV-N. Die siRNAs sind demnach funktionell.

3.12 Einfluß der MV spezifischen siRNA auf der mRNA Ebene

3.12.1 Semi-quantitative RT-PCR

Um den Einfluss der siRNA auf die mRNA zu analysieren wurden CHO 5.3 Zellen nach dem angegebenen Protokoll behandelt. 40h p.I. wurde die gesamte RNA extrahiert. Da das virale Genom keine Poly(A) Ende besitzt, wurden die cDNA mit Zufalls-Hexameren, die cDNA zur Analyse der viralen mRNA mittels Poly d(T) Primer erstellt. Es wurde zuerst eine semi-quantitative PCR durchgeführt, wobei die Proben bei verschiedenen Zyklen entnommen wurden (GAPDH Proben bei Zyklus 24, siRNA Proben bei Zyklus 30). So wird garantiert, dass die PCR sich in der Phase der Amplifikation, und nicht schon im Bereich der Sättigung ist. Es wurden von den Proben 1:3 Verdünnungen hergestellt und diese auf einem Agarosegel aufgetrennt. Um die Proben untereinander zu vergleichen wurde geprüft, in welchen Verdünnungsstufen sich jeweils gleiche Mengen des Haushaltsgens finden. Dies dient der Abgleichung der Proben untereinander, da man davon ausgeht, dass in diesem Fall gleich viel Ausgangsmaterial vorliegt. Die Ergebnisse sind in Abb.19 und Abb.20 dargestellt:

Abb.19A: Semi-quantitative PCR der viralen mRNA. A) Einfluß von N-siRNA und M-siRNA auf die mRNA. Untersucht wurden die M-mRNA und die P-mRNA. Die orangenen Boxen zeigen die Proben an, die aufgrund der etwa gleichen GAPDH Signalstärke miteinander verglichen werden. Aufgetragen ist jeweils eine 1:3 Verdünnung des PCR Produktes (1/0,3/0,1): Kontrolle (Spur 1-3), N-siRNA (4-6) und M-siRNA (7-9).

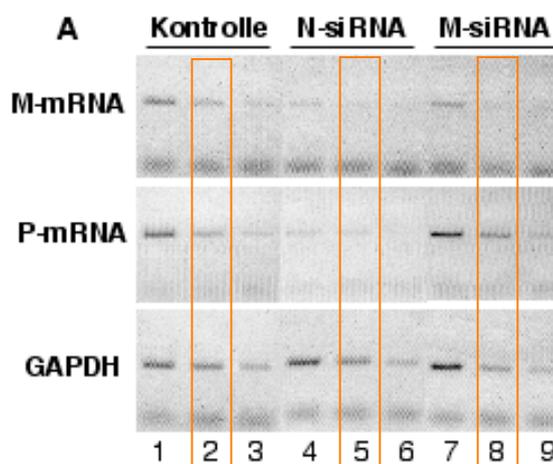


Abb.19B: Semi-quantitative PCR der viralen mRNA. A) Einfluß von L1-siRNA und L2-siRNA auf die mRNA. Untersucht wurden die M-mRNA und die P-mRNA. Die orangenen Boxen zeigen die Proben an, die aufgrund der etwa gleichen GAPDH Signalstärke miteinander verglichen werden. Aufgetragen ist jeweils eine 1:3 Verdünnung des PCR Produktes (1/0,3/0,1): Kontrolle (Spur 1-3), L1-siRNA (4-6) und L2-siRNA (7-9).

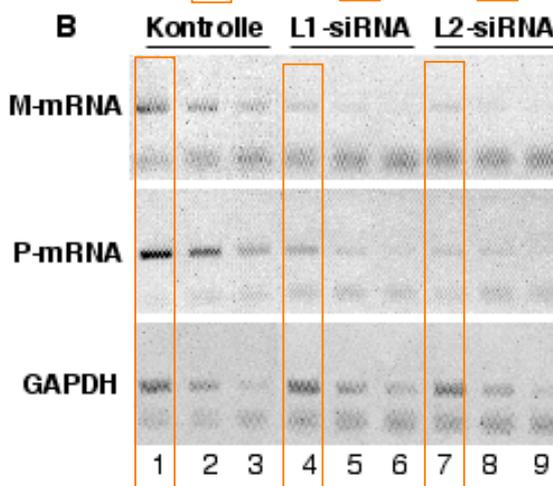


Abb.20A: Semi-quantitative PCR der viralen Genome. A) Einfluß von N-siRNA und M-siRNA auf die virale Replikation (es werden für die PCR Genom-spezifische Primer eingesetzt). Die orangenen Boxen zeigen die Proben an, die aufgrund der etwa gleichen GAPDH Signalstärke miteinander verglichen werden. Aufgetragen ist jeweils eine 1:3 Verdünnung des PCR Produktes (1/0,3/0,1): Kontrolle (Spur 1-3), N-siRNA (4-6) und M-siRNA (7-9).

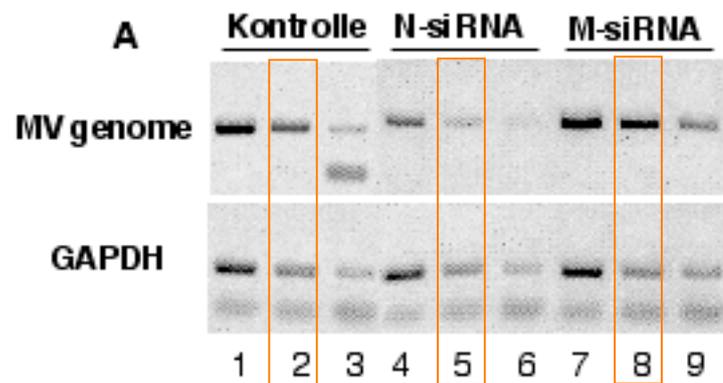
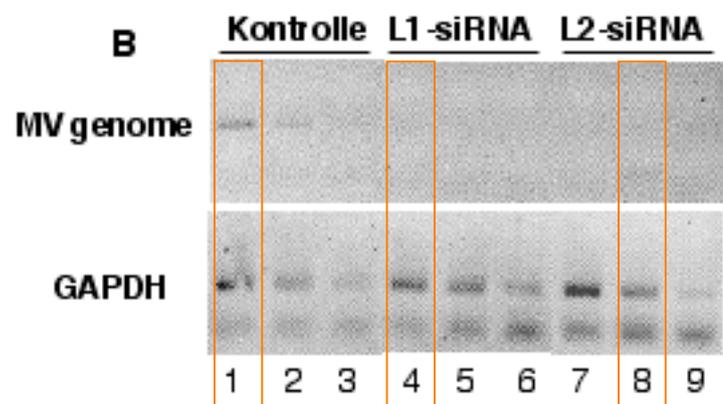


Abb.20B: Semi-quantitative PCR der viralen mRNA. A) Einfluß von L1-siRNA und L2-siRNA auf die virale Replikation (es werden für die PCR Genom-spezifische Primer eingesetzt). Die orangenen Boxen zeigen die Proben an, die aufgrund der etwa gleichen GAPDH Signalstärke miteinander verglichen werden. Aufgetragen ist jeweils eine 1:3 Verdünnung des PCR Produktes (1/0,3/0,1): Kontrolle (Spur 1-3), L1-siRNA (4-6) und L2-siRNA (7-8).



Vergleich der mRNA Level:

M-mRNA: Alle eingesetzten siRNA, also N-siRNA, M-siRNA, L1-siRNA und L2-siRNA reduzieren die Menge der M-mRNA. Im Fall der N-siRNA, L1-siRNA und L2-siRNA wird generell die virale Replikation gehemmt, daher wird entsprechend auch weniger M-mRNA hergestellt. Im Fall der M-siRNA wird die M-mRNA auch reduziert, hier findet direkter Abbau der M-mRNA statt.

P-mRNA: Die P-mRNA Level werden reduziert, wenn die Zellen mit N-siRNA, L1-siRNA oder L2 siRNA behandelt werden. Werden die Zellen mit M-siRNA behandelt kommt es zu einem erhöhtem Level an P-mRNA (Vergleich: Abb.19A Spur 1 (Kontrolle) und Spur 7 (M-siRNA)). Der Unterschied liegt ungefähr im Bereich einer Verdünnungsstufe, dies entspricht eine Verstärkung um den Faktor 1,5 bis 3.

Vergleich der Genom-spezifischen PCR Produkte:

Werden die Zellen mit N-siRNA, L1-siRNA oder L2-siRNA transfiziert wird die virale Transkription und Replikation gehemmt. Somit kann sich das Virus nur langsam (Vergleich: Abb.20A Spur 2 (Kontrolle) und Spur 5 (N-siRNA)) bzw überhaupt nicht mehr replizieren (Vergleich: Abb.20A Spur 1 (Kontrolle) und Spur 4/8 (L1-siRNA/L2-siRNA)).

Werden die Zellen mit M-siRNA transfiziert, wird mehr Genom-spezifisches Produkt in der PCR amplifiziert (Vergleich: Fig.20A Spur 3 (Kontrolle) und Spur 9 (M-siRNA)). Der Unterschied liegt ungefähr im Bereich einer Verdünnungsstufe, dies entspricht eine Verstärkung um den Faktor 1,5 bis 3.

3.12.2 Real Time RT-PCR

Um die Ergebnisse, die aus der sqRT-PCR stammen, besser quantifizieren zu können, wurden die Versuche wiederholt und mittels Real Time RT-PCR analysiert.

CHO 5.3 Zellen wurden nach dem angegebenen Protokoll behandelt. 40h p.I. wurde die gesamte RNA extrahiert. Da das virale Genom keine Poly(A) Enden besitzt, wurden zur Herstellung der cDNA Zufalls-Hexamere als Primer benutzt. Die cDNA zur Analyse der viralen mRNA wurde mittels Poly d(T) Primer erstellt.

Für die Real Time PCR werden je Experiment pro Probe zwei Ansätze gemessen, um daraus einen Mittelwert zu bilden. Für alle Proben werden auch jeweils zwei Ansätze des Haushalt GAPDH gemessen und der Mittelwert erstellt, damit die Proben untereinander abgeglichen werden können. Es wurden drei Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse wurden verrechnet und die Standardabweichung ermittelt (Abb.21).

	Pos	siN	siM	siL1	siL2
P mRNA	1	0,04	2,22	0,08	0,11
StAbw	0	0,017	0,458	0,038	0,040
	Pos	siN	siM	siL1	siL2
M mRNA	1	0,04	0,23	0,2	0,17
StAbw	0	0,016	0,101	0,044	0,065
	Pos	siN	siM	siL1	siL2
MV Genom	1	0,16	1,96	0,13	0,16
StAbw	0	0,138	0,249	0,107	0,032

Abb.21: Relative Expression der viralen mRNA und des viralen Genoms. Der Kontrolle (Pos) wird als Wert der Expression 1 zugeordnet. Dargestellt ist die relative Expression der mRNA/Genome unter Einfluß der verschiedenen siRNA gegenüber der Kontrolle. Die jeweilige Standardabweichung (StAbw) ist grau unterlegt.

Die Daten aus der Tabelle (Abb.21) wurden noch graphisch ausgewertet (Fig.22-24):

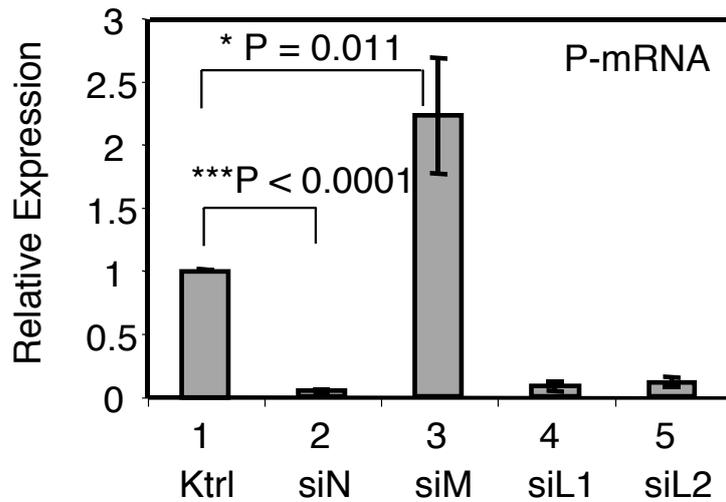


Abb.22: Relative Expression der P-mRNA. Die Expression der Kontrolle ist 1. Die relative Expression der P-siRNA nach Transfektion von N-siRNA, M-siRNA, L1-siRNA und L2-siRNA ist in Relation zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

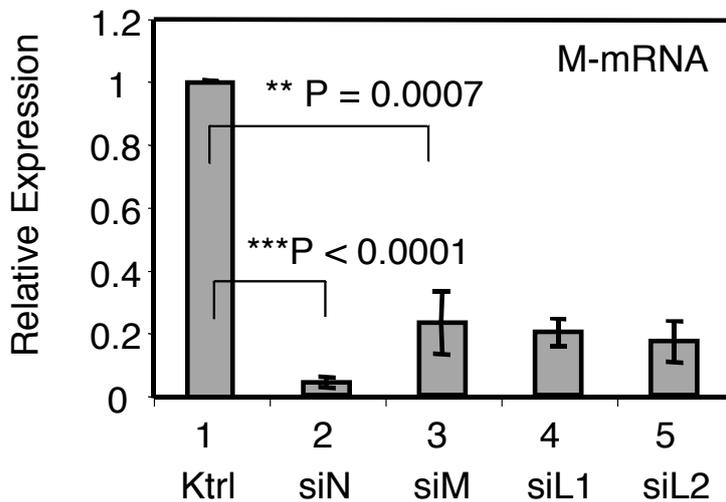


Abb.23: Relative Expression der M-mRNA. Die Expression der Kontrolle ist 1. Die relative Expression der M-siRNA nach Transfektion von N-siRNA, M-siRNA, L1-siRNA und L2-siRNA ist in Relation zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

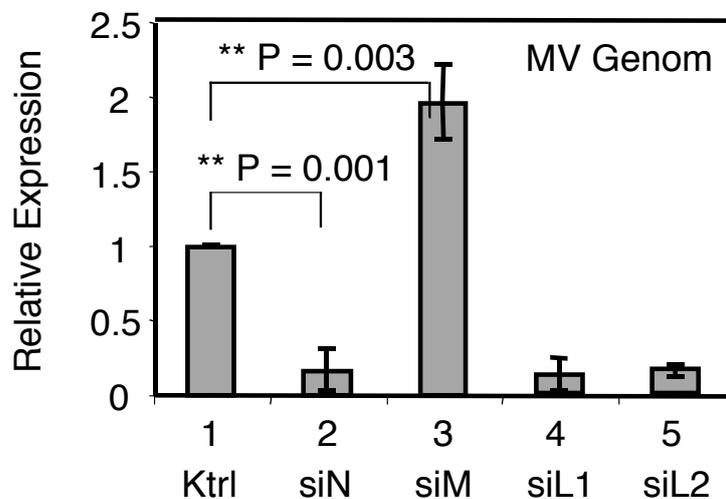


Abb.24: Relative Expression des viralen Genoms. Die Expression der Kontrolle ist 1. Die relative Expression der viralen Genome nach Transfektion von N-siRNA, M-siRNA, L1-siRNA und L2-siRNA ist in Relation zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Ergebnisse der Real Time PCR bestätigen die Daten der Semiquantitativen RT-PCR. N-, L1-, und L2 siRNA reduzieren die Expression ihre jeweiligen Zielgens und verhindern so die Transkription und Replikation. Die M-siRNA führt zu einer verstärkten Expression von P-mRNA und einer Erhöhung der relativen Genomanzahl um den Faktor 2. Die Ergebnisse werden auf ihre Signifikanz getestet (Unpaired student's t test), wobei * die Signifikanz angibt (**mittel, ***hoch).

3.13 Herstellung shRNA exprimierender lentiviraler Vektoren

Um Zelllinien herzustellen, die permanent siRNA exprimieren, sollen Zellen mit shRNA exprimierenden lentiviralen Vektoren infiziert werden. Das Zielgen für die RNA Interferenz ist dabei das L-Protein der Masernviren.

3.13.1 Identifikation von Zielsequenzen

Es werden kurze (21bp) siRNA Sequenzen, basierend auf den Algorithmen der Firma Ambion (www.ambion.com), ausgetestet, die gegen das L-Protein gerichtet sind. Die Zellen werden nach dem üblichen Protokoll behandelt und die Expression von MV-N und MV-M durch Westernblot überprüft (Abb.25). Es wurden von einer größeren Anzahl Sequenzen nur zwei wirksame siRNA identifiziert. Die Sequenzen sind: L#1: gtaaagagtctcaacatgt und L#2: gattcgagctttgacccat.

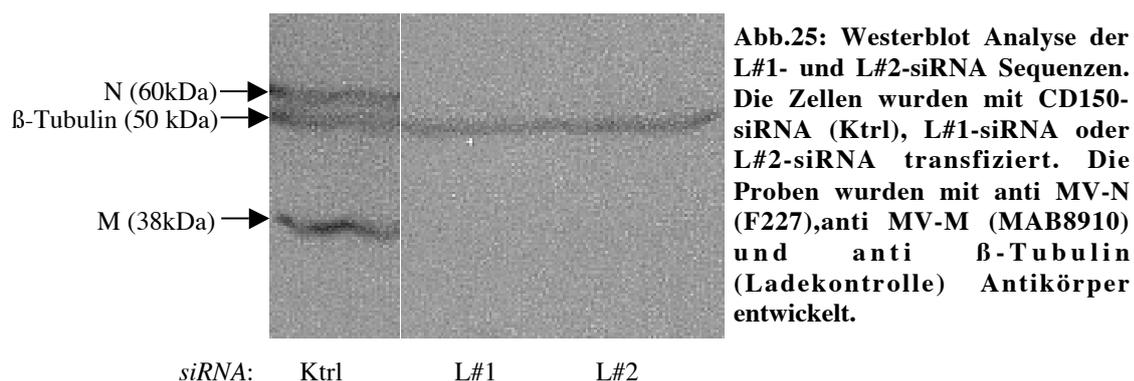


Abb.25: Westernblot Analyse der L#1- und L#2-siRNA Sequenzen. Die Zellen wurden mit CD150-siRNA (Ktrl), L#1-siRNA oder L#2-siRNA transfiziert. Die Proben wurden mit anti MV-N (F227), anti MV-M (MAB8910) und anti β-Tubulin (Ladekontrolle) Antikörper entwickelt.

Beide Sequenzen induzieren RNAi, da auf dem Westernblot nach Transfektion der L#1 oder L#2-siRNA kein MV-N oder MV-M Protein zu detektieren ist.

3.13.2 Klonierung der “Short Hairpin” Expressionskassette für L#1 und L#2

Mit den Sequenzen L#1 und L#2 und eine unspezifische Kontrollsequenz “Tat” (spezifisch für HIV “tat”) wird je eine shRNA Expressionskassette hergestellt. Dazu werden DNA Oligomere (Plusstrang und Negativstrang) synthetisiert, deren 3'Enden komplementär sind ($5\text{'-}3\text{'}$). Diese Primer werden in einer PCR Reaktion verbunden und verlängert (95°C 5 min, 50°C 30 s, 68°C 20 min). Es entsteht ein dsDNA Oligomer. Die Primer sind so konstruiert, dass an den Enden Restriktionsschnittstellen für XhoI und HpaI entstehen. Sowohl das dsDNA Oligomer als auch das Plasmid pLL 3.7 (entspricht pRR.SIN-18 in Fig.5) werden mit den angegebenen Enzymen verdaut und das Insert einkloniert. Die Ligationsprodukte werden in Bakterien transformiert und auf LB-Platten ausplattiert. Eine Anzahl Klone wird ausgewählt und in einer sog Kolonie-PCR (Klone werden von der LB-Platte genommen und direkt für die PCR eingesetzt) überprüft. Es werden PCR Primer eingesetzt, die den Bereich der “Multiple Cloning Site” amplifizieren. Ist das Insert enthalten wird das PCR Produkt entsprechend verlängert. Auf einem Agarosegel sind so die positiven Klone gut von negativen Klonen zu unterscheiden.

Positive Klone wurden identifiziert, die Plasmide isoliert und mittels einer Midipräparation vermehrt.

Abb.26 zeigt eine Beispiel-PCR der positiv identifizierten Klone mit den Colonyprimer 5'(31) und Colonyprimer 3'(32). Die Bezeichnung der Klone ist pLL3.7-mi L1/x oder L2/x (wobei pLL3.7 das Plasmid angibt, mi für die Haarnadelstruktur steht, die von natürlich vorkommender miRNA übernommen wurde, L1 oder L2 sich auf die bereits bekannten Sequenzen aus Abschnitt 3.13.1 bezieht, und /x die Nummer des Klons ist).

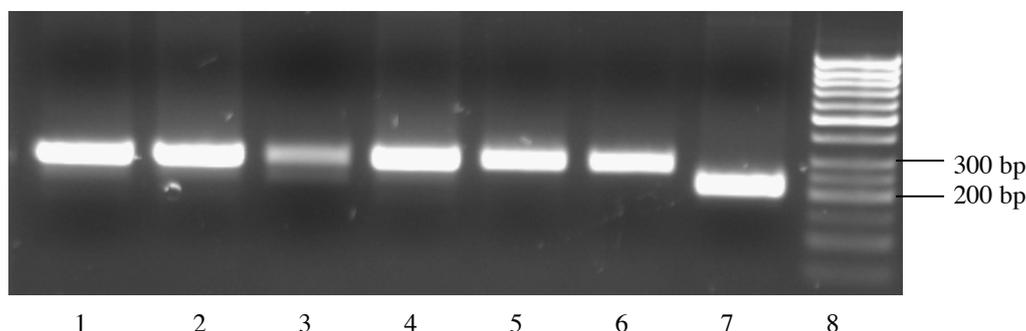


Abb.26: PCR Produkte der positiven Klone. Die PCR Produkte der Plasmide, die ein Insert in der MCS besitzen, sind ungefähr 90bp länger als die Produkte der Plasmide ohne Insert. Aufgetragen sind: 1) Klon pLL3.7-miL1/1, 2) pLL3.7-miL1/3, 3) pLL3.7-miL2/2, 4) pLL3.7-miL2/4, 5) pLL3.7-tat/1 6), pLL3.7-tat/2, 7) pLL3.7 ohne Insert und 8) 50bp Marker.

Die jeweiligen shRNA Expressionskassette wurden erfolgreich in das Plasmid pLL 3.7 inkloniert.

3.13.3 Produktion lentiviraler Partikel

Um lentivirale Partikel herzustellen werden 293T Zellen zur Transfektion in 6-Loch Platten ausplattiert. Die Zellen werden dann mit folgenden Plasmiden transfiziert (Vergleiche Abb.5, Seite 27)):

1)pLL3.7 mit der inklonierten shRNA- und einer (bereits vorhandenen) eGFP Expressionskassette, 2) pMDLg/pRRE, 3) RSV-REV und 4)pMD.G.

Durch die Expression der viralen Proteine, welche auf den Plasmide kodiert sind, entstehen lentivirale Partikel, die in den Überstand abgegeben werden. Der Überstand wird nach 1-2 Tagen gesammelt und zur Infektion bereits neu ausplattierter 293T Zellen benutzt. Da der lentivirale Vektor auch eine eGFP Expressionskassette besitzt, können Zellen, in die das Virus integriert ist, leicht mittels Immunfluoreszenz oder FACS Analyse identifiziert werden. Die Zellen, die das Provirus besitzen, werden mittels eines Cell-Sorters von nicht infizierten Zellen getrennt. Dieser Vorgang muss zwei bis dreimal wiederholt werden, um eine möglichst reine Zellkultur zu bekommen.

Zum Zeitpunkt an dem diese Arbeit geschrieben wird sind diese Schritte noch nicht abgeschlossen.

4. Diskussion

Der Einsatz der RNA-Interferenz bietet sich grundsätzlich auf zwei Gebieten an. Zum einen kann RNAi dabei helfen die Funktion von Genen aufzuklären, indem „Knock-out“ Mutanten geschaffen werden können, zum anderen kann die RNAi auch therapeutisch genutzt werden um gegen Pathogene oder Onkogene eingesetzt zu werden. Die in dieser Arbeit eingesetzten siRNAs decken beide Bereiche ab: Mit den siRNAs gegen die MV N-, P- und L-mRNA sollte untersucht werden, ob diese die Translation und/oder die Replikation beeinflussen können und welche dieser siRNAs das größte therapeutische Potential dazu hat. Die siRNAs gegen die MV F-, H- und M-mRNA befinden sich in dem anderen Anwendungsbereich, der Analyse von Genfunktionen.

4.1 RNA-Interferenz gegen MV N-, P- und L

Als Ziel für die RNA-Interferenz sollte ein Genprodukt ausgewählt werden, welches im Bereich der Transkription und Replikation eine Schlüsselstellung einnimmt. Für Masernviren sind dies das Nukleokapsid-, das Phospho- und das Large-Protein. Theoretisch bieten die Gene verschiedene Vor- und Nachteile, die sie zu mehr oder weniger geeigneten Zielen machen: Wie bereits beschrieben entsteht bei der Transkription der viralen mRNA ein Gradient, der der Anordnung der Gene auf dem Genom, also N-P-M-F-H-L, entspricht. Dabei liegt die N-mRNA ungefähr 5-250 mal häufiger vor als die L-mRNA, dieser Gradient kann je nach Typ der Zelllinie, die infiziert wird, unterschiedlich steil sein. Aufgrund dieses Gradienten stellt sich die Frage, ob es nicht einfacher ist, L-mRNA effektiv durch RNAi zu zerstören, als z.B. N-mRNA, die in erheblich größeren Mengen vorliegt. Auch funktionelle Aspekte spielen eine Rolle. Das N-Protein umschließt und organisiert das Masernvirus Genom, verpackt neu entstehende Genome und interagiert bei der Replikation mit dem Polymerase-Komplex (bestehend aus dem P- und L-Protein). Das N Protein ist auch für die Kontrolle der Umschaltung von Transkription zur Replikation wichtig. Man nimmt dabei an, dass erst eine bestimmte Menge von N-Protein synthetisiert werden muß, bevor ein Umschalten der Transkription zur Replikation stattfindet. Die Inhibition des N-Proteins durch RNAi könnte also die Interaktion mit dem Polymerase Komplex stören sowie das Umschalten von Transkription zur Replikation verzögern oder unterbinden.

Das P-Protein bildet zusammen mit dem L-Protein den eigentlichen Polymerase-Komplex. Es ist dafür verantwortlich, dass die Polymerase während der Transkription/Replikation am Genom entlang wandern kann. Dabei vermittelt das P-Protein die Anlagerung der Polymerase an das N-Protein. Im P-Leseraster werden zusätzlich noch das C- und V-Protein kodiert,

wobei das V-Protein vermutlich die Typ-I Interferon Antwort inhibiert. Das P-Gen bietet sich also auch als Ziel für die RNA Interferenz an, da dadurch die Transkription/Replikation und die Expression der C/V Leseraster stark beeinträchtigt werden kann.

Das L-Protein ist die eigentliche Polymerase der Masernviren und alle katalytischen Eigenschaften des Polymerase-Komplexes gehen von ihm aus. RNAi gegen das L-Protein sollte also sehr effektiv die Transkription/Replikation inhibieren, wobei aber nicht klar ist, ob geringe Mengen L-Protein dennoch zur Transkription/Replikation ausreichen. Betrachtet man den Transkriptions-Gradienten, fällt auf, dass von allen mRNAs am wenigsten L-mRNA produziert wird. Das lässt darauf schließen, dass die Masernviren während der Transkription/Replikation generell nur sehr wenig L-Protein benötigen. Sollte die für die L-mRNA spezifische siRNA also nicht zu 100% effektiv sein, könnte ein Restbestand des L-Proteins dazu führen, dass die Replikation, wenn auch auf niedrigem Level, aufrechterhalten werden könnte. Bei der Virusfreigabe wird das L-Protein in sehr geringen Mengen in die viralen Partikel verpackt, damit das Virus nach der Infektion einer anderen Zelle auf eine eigene virale Polymerase zurückgreifen kann. Demnach ist bei den hier gemachten Versuchen das L-Protein nach Infektion, durch das Input-Virus mitgebracht, vorhanden. Die L-siRNA inhibiert also die Neusynthese des L-Proteins, das L-Protein des Input-Virus bleibt unbeeinflusst. Die siRNAs gegen die L-mRNA waren dennoch in der Lage, die Transkription/Replikation zu inhibieren. Eventuell ist die mitgebrachte Menge des L-Proteins nur ausreichend, um die Transkription anzufahren, aber nicht ausreichend, um eine kontinuierliche Transkription/Replikation durchzuführen. Ob die L-siRNA in der Lage ist, diesen Effekt auch bei persistenten Infektionen zu vermitteln, müsste getestet werden. Bei einer persistenten Infektion liegt vermutlich durch die kontinuierliche Transkription eine erheblich größere Mengen an L-Protein vor. Dies könnte dann dazu führen, dass das Virus die durch siRNA vermittelte transiente Herabregulation der L-mRNA mit dem vorhandenen L-Protein überbrücken könnte. Eventuell wäre dazu eine kontinuierliche Expression von shRNA besser geeignet. Ein großer Vorteil der RNAi mit dem L-Gen liegt darin, dass große Sequenzbereiche des Gens konserviert sind. Mutationen in solchen konservierten Bereichen entstehen kaum, da sonst essentielle Funktionen des Proteins verloren gingen und die Virusvermehrung abbrechen würde. Man hat bei Versuchen zur RNA-Interferenz mit Viren bereits gesehen, dass Viren aufgrund des Selektionsdrucks, den die eingesetzte siRNA ausübt, Mutationen in ihr Genom eingefügt haben. Der Austausch einer einzigen Base in der siRNA Zielsequenz hat dabei dazu geführt, dass die Expression des Zielgens nicht mehr negativ beeinflusst wurde und sich das Virus wieder normal replizieren konnte. Die in dieser Arbeit

jeweils eingesetzte siRNA wird durch den Verdau von langen dsRNA Transkripten hergestellt, somit decken die einzelnen siRNAs große Sequenzbereiche ab und sollten es dem Virus dadurch fast unmöglich machen, durch Mutation von einzelnen Basen oder Abschnitten der RNA-Interferenz zu entkommen. Wird aber über eine shRNA Expressionskassette nur eine spezifische siRNA Sequenz als Zielbereich benutzt, spielt die Auswahl solcher konservierter Sequenzen eine wichtige Rolle.

Die mit N-, P- und L1/L2-siRNA durchgeführten Experimente zeigen, dass die Expression der Zielgene durch RNAi inhibiert werden kann. Dies ist mittels Westernblot in Abb.11 (Seite 4) und Abb.12 (Seite 5) nachgewiesen. Die Expression des N-Proteins (nach N-siRNA Transfektion) ist in Abb.11 noch in geringen Mengen nachzuweisen, der Nachweis des P-Proteins (nach P-siRNA Transfektion) gelingt nicht mehr, da die Proteinmenge unter der Detektionsgrenze des Western Blots liegt. Abb.12 (Seite) zeigt die trans-Effekte auf Proteinebene nach Transfektion mit N-, P- und L1-siRNA. Hier zeigt sich, dass die Inhibition der Proteine durch RNA Interferenz die Synthese anderer viraler Proteine verhindert, da vermutlich keine Transkription/Replikation mehr stattfinden kann. Im Abschnitt 3.12.1 wird mittels PCR der Einfluß der RNAi auf mRNA Ebene analysiert. Diese Analyse wurde sowohl mittels einer semi-quantitativen RT-PCR als auch durch eine Real Time PCR durchgeführt. Abb.19 und Abb.20 (Seite 12 und 13) zeigen den Einfluß der siRNA auf die P-mRNA und auf das virale Genom. Sowohl N-siRNA wie auch L1/L2-siRNA reduzieren sowohl die jeweilige mRNA als auch die Genom Menge stark. Die Real Time PCR ermöglicht eine bessere Quantifizierung der Reduktion. In Abschnitt 3.12.2 (Seite 14) sind 3 unabhängige Experimente zu einem Durchschnittswert zusammengefaßt. Es wurde die relative Expression der mRNA und des Genoms nach Transfektion der siRNA analysiert (Abb.21 (Seite)): N-siRNA reduziert die P-mRNA um 96%, die M-mRNA um 96% und das Genom um 84%. Die L1-siRNA reduziert die P-mRNA um 92%, die M-mRNA auf 80% und das Genom auf 87%. Die L2-siRNA reduziert die P-mRNA um 89%, die M-mRNA um 83% und das Genom um 84%.

Da die gegen N, P und L gerichteten siRNAs vergleichbar gut funktioniert haben scheint der Transkriptionsgradient der mRNA keinen negativen Effekt auf die RNA-Interferenz zu haben. Vermutlich besitzen die Zellen durch die siRNA Transfektion bereits einen aktiven RISC, der nach der Infektion sofort virale mRNA angreift. Damit bleibt dem Virus möglicherweise keine Zeit, einen solchen Gradienten aufzubauen, was dann für gleiche Startbedingungen für jede siRNA sorgt, unabhängig vom Zielgen.

In der Einleitung der Diskussion stellte sich die Frage, ob manche Proteine aufgrund ihrer Eigenschaften besser als Ziel zur RNAi geeignet sind als andere. Diese Frage ist vor allem für einen therapeutischen Ansatz zu beantworten, da die Zellen bereits mit Virus belastet sind, bevor die siRNA appliziert wird. Demnach kann sich in diesem besonderen Umfeld die Eignung der verschiedenen Zielgene zur RNA-Interferenz stark unterscheiden. Der hier angewandte Versuchsaufbau kann diese Fragen allerdings nicht beantworten. Dazu wären noch Experimente mit Zelllinien nötig, die persistent mit MV infiziert sind. Die durchgeführten Arbeiten zeigen aber, dass sowohl siRNA gegen N, P oder L das Potential haben, die Transkription und Replikation von Masernviren äußerst effektiv zu unterbinden.

4.2 RNA Interferenz gegen die Nicht-Struktur Proteine F und H

Die Membranhülle der Masernviren enthält zwei virale Proteine, das Fusions Protein (F) und das Haemagglutinin (H). Die H und F Glykoproteine interagieren miteinander um den biologisch aktiven Fusionskomplex zu bilden. Es wird davon ausgegangen, dass das H Protein nach der Bindung an die zellulären Rezeptoren strukturelle Änderungen des F Proteins induziert, welche dann den Fusionsprozess einleiten. Um neue Zellen zu infizieren oder um mit benachbarten Zellen zu fusionieren ist also die Anwesenheit beider Proteine essentiell. Wird entweder H oder F durch siRNA herabreguliert, kann man erwarten, dass die Zell-Zell Fusion stark abnimmt. Diese Erwartung wurde durch die Versuche mit siRNA, die sich entweder gegen das H oder F Protein richten, bestätigt. Die Abbildungen Abb. 15 (Seite 8) und Abb. 16 (Seite 10) zeigen, dass die Fähigkeit zur Fusion nach Transfektion mit siRNA stark eingeschränkt ist.

Interessanterweise wurde in einer Arbeit von Koschel unter anderem Plasmid-kodierte antisense mRNA komplementär zu der Sequenz des H Proteins eingesetzt, um die Expression des H Glykoproteins zu unterbinden (Koschel et al., 1994). Diese antisense RNA konnte sowohl die Infektion/Replikation in permissiven Zellen verhindern, als auch persistent infizierte C6 Ratten Gliomazellen von der Viruslast befreien. Es scheint also möglich zu sein, dass virale Proteine, die nicht dem essentiellen Polymerase Komplex oder RNP zugeordnet sind, zur Inhibition der gesamten Virusreplikation führen können. Der Mechanismus, auf dem dieser Effekt beruht ist aber nicht bekannt. Zwei Argumente sprechen aber gegen die Wahl des H Gens als Ziel der RNA Interferenz zu therapeutischen Zwecken. Zum einen wurden diese Versuche an persistent infizierten C6 Ratten-Zellen gemacht. In wie weit diese persistent infizierten Zellen als Modell für SSPE Erkrankungen gelten können ist fraglich. Weder konnten die Untersuchungen dieser Zelllinien schlüssige Informationen für den

Grund der Persistenz liefern, noch konnte gezeigt werden, dass dieses Modell den Vorgängen in echten SSPE Infektionen entspricht. Ein anderer Grund, der gegen H als Ziel der RNA Interferenz spricht, sind die molekularen Grundlagen der persistenten Infektion von Masernviren. Anscheinend sind die Viren für die Persistenz nicht unbedingt auf funktionierende F oder H Proteine angewiesen. SSPE Patienten haben sehr hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern gegen Masernantigene im Serum und der Rückenmarksflüssigkeit, die zur Hyperimmunität führen. Zusätzlich sind viele Bereiche des Maserngenoms, darunter F und H, durch Mutationen verändert. Auch verändert sich der Transkriptionsgradient der viralen mRNA bei SSPE Patienten. Er wird relativ steil, was dazu führt, dass nur sehr wenig F und H Protein gebildet wird. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass zur Aufrechterhaltung der persistenten Infektion weder das F noch das H Protein essentiell sind. Deshalb ist siRNA, die gegen F oder H gerichtet ist, wohl nicht dazu geeignet, *in vivo* zu therapeutischen Zwecken gegen eine persistente Masernvirusinfektion eingesetzt zu werden.

4.3 RNA Interferenz gegen das Matrix Protein

Die Herabregulation des Matrix Proteins sollte zu verstärkter Synzitenbildung führen. Dieser Effekt wurde bereits bei rekombinaten Masernviren beobachtet, deren Matrix Gen deletiert wurde. Dieser Effekt konnte nach Transfektion der M-siRNA ebenfalls beobachtet werden (siehe Abb.15 B, Seite 8). Interessanterweise erhöhte sich nach der Transfektion der M-siRNA im Vergleich zu der Kontrolle sowohl die Menge der viralen mRNA, der genomische RNA als auch die Expression viraler Proteine. Die Menge der viralen mRNA und des viralen Genoms wurden dabei um den Faktor 2 bis 2,5 erhöht. Dies läßt darauf schließen, dass das Matrix Protein die Aktivität des Polymerase Komplexes einschränkt. Diese Einschränkung wirkt demnach sowohl auf die mRNA wie auch die Synthese von genomischer RNA. Dieser Befund stimmt mit anderen Beobachtungen überein, in denen mittels eines *in vitro* Transkriptionsassays mit aufgereinigten RNP Komplexen die virale Transkription durch das Matrix Protein gehemmt wird. In Zellen in denen das M Protein alleine exprimiert wird, ist es gleichmäßig in der Zelle verteilt. In infizierten Zellen ändert sich dies, das Protein ist dann direkt unter der Zellmembran vorzufinden. Es nimmt dabei Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung der viralen Proteine und beeinflusst so auch die Virusfreisetzung. Neuere Arbeiten mit Masern und Rinderpest Virus (RPV) haben gezeigt, dass die virale Polymerase während des Replikationszyklus auch direkt an der Plasmamembran mit dem Matrix Protein interagiert. Eventuell ist dies der Bereich, indem das Matrixprotein die Aktivität der

Polymerase beeinflusst. Auch bei anderen Viren, wie Sendai Virus, VSV und Influenza Virus agiert das jeweilige Matrix Protein als Inhibitor der Transkription. In manchen Fällen sind dabei auch zelluläre Faktoren beteiligt, so z. B. bei Sendai Viren. Hier wird die inhibitorische Wirkung des Matrix Proteins durch die Interaktion mit β -Tubulin aufgehoben. Im Fall der Rhabies Viren inhibiert das Matrix Protein die Transkription, führt dafür aber zu einer Verstärkung der Replikation. Dieser Zusammenhang trifft für Masenviren nicht zu, da die M-siRNA zu einem Anstieg sowohl der Transkription als auch der Replikation führte.

Die von SSPE Patienten isolierten viralen Genome sind durch zahlreiche Mutationen charakterisiert, die die Bildung funktioneller Virionen verhindern. Die Mutationen, die dazu führen, dass die Virusfreisetzung unterbunden wird, konzentrieren sich dabei auf das zytoplasmatische Ende des F Proteins und das M Protein. Die Funktion des M Proteins wird durch die Mutationen in verschiedenen Bereichen gestört: Oft ist das Startkodon zerstört oder das Protein wird instabil, auch wird die proteolytische Degradation verstärkt und es kommt generell zu Basenaustauschen in seinem Leseraster. Zusätzlich existieren transkriptionelle Mechanismen, die die Transkription des Matrix Proteins beeinflussen. Einer führt dazu, dass die Polymerase nicht an der intergenischen Sequenz zwischen P und M abfällt, sondern weiter durchläuft. So entstehen durchgängige P/M Transkripte. Da es aber äußerst unwahrscheinlich ist, dass solche Transkripte bei der Proteinsynthese bis zu Ende translatiert werden, entstehen von diesen P/M-mRNAs keine M Proteine. Der zweite Mechanismus wurde bereits angesprochen. In Zellen des humanen ZNS besteht ein sehr steiler Expressionsgradient. Es entstehen aufgrund dieses Gradienten kaum Transkripte von Genen, die Richtung 5' Ende des Genoms liegen. Die sind hauptsächlich F, H und L. Diese beschriebenen Prozesse also Mutationen und Veränderungen der Transkription führen schließlich zu viralen Partikeln, die kein M Protein mehr besitzen.

Es ist demnach aufgrund der in dieser Arbeit gemachten Beobachtung davon auszugehen, dass die Abwesenheit des Matrix Proteins die Transkription und Replikation dieser Viren verstärkt. Eventuell führen diese Mutationen bei der Ausbreitung im Gehirn zu einem Selektionsvorteil gegenüber Viren, die diese Mutationen nicht aufweisen.

4.4 Expression von L-spezifischer shRNA durch den lentiviralen Vector pLL 3.7

Der Einsatz von siRNA kann zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen eingesetzt werden. Die Herabregulation von Zielgenen in Zellkultur findet dabei nur temporär statt. Wenn die Zellen sich teilen nimmt gleichzeitig die Konzentration der siRNA in jeder einzelnen Zelle ab, so dass der Effekt der RNA-Interferenz abgeschwächt wird und letztlich

ganz verschwindet. In vielen Fällen ist eine transiente Herabregulation der Zielgene sicherlich ausreichend und effektive siRNA Sequenzen können so z.B. getestet werden, oder wie im Fall dieser Arbeit, virale Gene herabreguliert werden, um die virale Replikation zu verhindern. Da Masernviren sich bei einer akuten Infektion zumindest auf einem niedrigen Level replizieren müssen um die Infektion aufrecht zu erhalten, kann eine transiente Transfektion der siRNA bereits ausreichend sein, um die Infektion abubrechen.

In anderen Bereichen bringt die kurzfristige Transfektion von siRNA aber Nachteile mit sich. Besonders bei persistierenden Virusinfektion könnte die Inhibition der mRNA über einen längeren Zeitraum nötig sein, um die Infektion zu therapieren. Deshalb hat man damit begonnen die eigentlichen siRNA Sequenzen in Expressionskassetten für die sog. shRNA einzufügen. Unter der Kontrolle eines ständig aktiven U6 oder H1 Promoters wird so eine RNA Sequenz exprimiert, die sich in eine bestimmte Sekundärstruktur (Short Hairpin) faltet. Diese wird in den RISC aufgenommen und führt zu RNAi (Siolas et al., 2005). Die Effizienz der Transfektion spielt für die erfolgreiche Herabregulation des Zielgens eine entscheidende Rolle. Neuronale oder primäre Zellen lassen sich chemisch oft nur relativ schlecht transfizieren, was die Anwendung von siRNA schwierig macht. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist es, virale Vektoren zu konstruieren, die eine shRNA Expressionkassette besitzen. Lentivirale Vektoren haben gegenüber chemisch transfizierten siRNA zusätzliche Eigenschaften: Sie können sowohl sich teilende als auch sich nicht-teilende Zellen infizieren, sie integrieren die shRNA Expressionskassette stabil in das Genom der Wirtszelle, exprimieren ihr Transgen über lange Zeiträume (Li et al., 2005b) und es ist möglich die Oberflächenproteine zu pseudotypisieren (Cronin et al., 2005). Somit lassen sich gewebsspezifische Partikel herstellen, die dann genau die Zellen infizieren, die auch von den Pathogenen betroffen sind. Nachteile sind mögliche Mutationen von Genen der Wirtszelle, die durch zufällige Integration des Virusgenoms entstehen können. Auch werden virale Partikel durch das Immunsystem erkannt und eine entsprechende Immunantwort eingeleitet, was bei mehrfacher Gabe dieser Vektoren von Nachteil ist.

Es ist durch bestimmte Algorithmen möglich, siRNA Sequenzen zu bestimmen, die eine vergleichsweise hohe Wahrscheinlichkeit haben die mRNA ihres Zielgens abzubauen. Diese Algorithmen funktionieren aber nicht, wenn es darum geht, effiziente shRNA Strukturen voraus zu sagen. Eventuell spielen dabei noch andere Faktoren eine Rolle, denen bis jetzt wenig Beachtung zuteil wurde. So besitzen die meisten bis jetzt in Arbeiten eingesetzten shRNA Expressionskassetten eine traditionelle Haarnadelstruktur. Es konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der shRNA stark verbessert werden kann, wenn diese Haarnadelstruktur

gegen eine andere Struktur ausgetauscht wurde, z.B. durch eine bei natürlicher miRNA vorkommenden Sequenz.

Da also keine besonders effizienten siRNA Sequenzen vorbestimmt werden können, ist der Ansatz in dieser Arbeit, zuerst kurze 21bp lange siRNAs zu identifizieren, die erfolgreich die Expression des L-Gens unterbinden. Diese Sequenzen sollen dann in eine shRNA Expressionskassette eingesetzt werden, wobei die übliche Haarnadelsequenz gegen die von Boden et al. beschriebene, verbesserte Sequenz ausgetauscht wurde. Von vielen getesteten Sequenzen gegen das L-Gen konnten nur zwei wirksame identifiziert werden (Abb.25, Seite 16). Beide Sequenzen konnten nach Transfektion und Infektion mit Masern die Expression des Nukleokapsids und des Matrix Proteins so weit unterdrücken, dass diese Proteine im Western Blot nicht mehr nachweisbar waren. In den so behandelten Proben konnten auch keine durch Masernviren induzierten Synzotien mehr gefunden werden.

Die Sequenzen wurden danach in eine shRNA Expressionskassette eingefügt, die dann in den Vektor pLL 3.7 inkloniert wurde. In Fig.26 auf Seite 17 sind die Klone dargestellt, in die die Kassette erfolgreich inkloniert wurde. Mit Hilfe dieser Plasmide sollen dann lentivirale Partikel hergestellt werden, mit denen dann CHO 5.3 Zellen und mit Masernvirus persistent infizierter Zelllinien infiziert werden sollen. Da für Folgeversuche nur Zellpopulationen von hohem Reinheitsgrad benutzt werden können, werden die nicht infizierten Zellen mit Hilfe eines Zellsortierers aussortiert (nicht infizierte Zellen besitzen kein eGFP). Zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit konnte noch nicht getestet werden, ob die hier hergestellte shRNA funktioniert.

4.5 RNAi Experimente im Tiermodell

Der Mechanismus der RNA Interferenz konnte in dieser Arbeit unter anderem dazu genutzt werden um in Zellkultur die Replikation von Masern zu unterdrücken. Da der Mechanismus der RNAi in Zukunft auch zu therapeutischen Zwecken genutzt werden könnte, sollte als nächstes untersucht werden, welches Potential diese Technik *in vivo* besitzt. Dabei kann evaluiert werden, welche Applikationstechniken, also siRNA oder von Plasmiden und viralen Vektoren exprimierte shRNA, sich in welchem Bereich als sinnvoll oder unnützlich erweisen.

Wird siRNA zur *in vivo* Applikation verwendet, stellt sich zuerst die Frage, wie die siRNA an den Ort kommt, an dem sie wirken soll. Eine Möglichkeit ist die direkte Injektion am Zielort. So wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass so die siRNA erfolgreich in Organe wie Augen, Lunge und das zentrale Nervensystem verabreicht werden konnte (Kumar et al., 2006;

Li et al., 2005a; Reich et al., 2003). So konnte zum Beispiel in Mäusen das Respiratorische Synzytial Virus (RSV) durch nasal applizierte siRNA an der Replikation gehindert werden (Bitko et al., 2005). Bei dieser Arbeit sind zwei Punkte besonders interessant gewesen: Zum einen aktiviert die siRNA weder eine IFN- α oder IFN- β Antwort *in vivo*, was für die Wirksamkeit der siRNA spricht. Zum anderen hatte die siRNA auch dann einen relativ starken inhibitorischen Effekt, wenn sie ohne Transfektionsreagenz verabreicht wurde.

Solche Applikationen weisen aber noch Nachteile für eine Anwendung bei Patienten auf. Zum einen sind die beschriebenen Applikationstechniken beim Menschen nicht ohne weiteres anzuwenden. Die Applikation sollte, wenn möglich, über konventionelle und klinisch erprobte Wege durchgeführt werden können. Lokale Injektionen sind auch keine Lösung, wenn die siRNA systemisch wirken muss. Für diesen Fall muss dafür gesorgt werden, dass bestimmte Kriterien eingehalten werden, darunter die Stabilität der siRNA, die Fähigkeit in die Zellen aufgenommen zu werden und eine hohe Bioavialität zu besitzen. Erste Arbeiten dazu wurden von der Firma Alnylam durchgeführt. Um die angesprochenen Kriterien zu erfüllen wurden die siRNA Duplice chemisch verändert, und zwar in der Form, dass am 3' Ende des +Strangs Cholesterol angefügt wurde (chol-siRNA). In Versuchen zeigte diese Modifikation keine Einschränkung der Wirkung der siRNA, dafür aber verbesserte pharmakologische Eigenschaften. Nach genaueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die chol-siRNA an humanes Serumalbumin (HSA) bindet, während unmodifizierte siRNA dies nicht tut. Radioaktive chol-siRNA hat bei der Untersuchung der Halbwertszeit im Plasma von $t_{1/2} = 95$ min, die unmodifizierte siRNA von $t_{1/2} = 6$ min, was zeigt, dass die chol-siRNAs erheblich stabiler als unmodifizierte siRNAs sind. Dies könnte daran liegen, dass die Bindung der siRNA an das HSA die siRNA vor dem Abbau durch Exo- und Endonukleasen schützt, welche im Blut vorhanden sind. Auch konnte die chol-siRNA sehr gut vom Gewebe aufgenommen werden, so dass sie 24h nach Injektion sowohl im Herz, Nieren und der Lunge nachgewiesen werden konnte. Dem gegenüber konnte unmodifizierte siRNA in keinem dieser Organe gefunden werden (Soutschek et al., 2004). Diese Arbeiten zeigen, dass siRNA *in vivo* gut als therapeutisches Agens eingesetzt werden kann, und dass die Weiterentwicklung der siRNA durch chemische Verbindungen ihre Wirksamkeit stark anheben kann.

Eine andere Art, siRNA in die Zellen zu bringen, ist ihre Expression mittels shRNA Expressionskassetten, wobei sie durch Plasmide oder virale Vektoren exprimiert werden können. Die Plasmide sind wohl für eine *in vivo* Applikation am schlechtesten geeignet, da sie weder zielgerichtet appliziert und, im Vergleich zu kleinen siRNA Molekülen, auch erheblich schlechter in Zielzellen transfiziert werden können. Diese Schwachpunkte können vermieden

werden, wenn virale Vektoren verwendet werden. Aufgrund ihres Tropismus können sie zielgerichtet eingesetzt werden, und durch die Mechanismen, die das Virus zum Eintritt in die Zielzellen nutzt, ist auch dafür gesorgt, dass die shRNA in die Zelle hinein kommt. Momentan werden dazu meist zwei Systeme verwendet: Adenovirale Vektoren oder lentivirale Vektoren (Bahi et al., 2005; Grimm et al., 2005). Adenovirale Vektoren exprimieren die shRNA nur transient, da sie sich nicht in das Genom des Wirtes integrieren. Dies kann eventuell ausreichend sein, um das gesetzte Ziel zu erreichen. Nachteilig an ihnen ist sicherlich, dass sie nur einmal verabreicht werden können. Nach der ersten Injektion bildet das Immunsystem Antikörper gegen die viralen Partikel, so dass sie bei einer zweiten Gabe zum größten Teil von den Antikörpern neutralisiert werden und so kaum noch wirken können. Lentivirale Vektoren haben den Vorteil, dass sie stabil in das Genom des Wirts eingebaut werden, und somit die shRNA kontinuierlich über einen langen Zeitraum exprimieren können. Dies könnte vor allem dann ein Vorteil sein, wenn z.B. ein viraler Erreger therapiert werden soll, bei dem eine transiente siRNA Expression nicht ausreichend ist, um den Erreger zu eliminieren. Auch würde diese stabile Expression nötig sein, wenn dadurch genetische Schäden des Patienten ausgeglichen werden sollen, zum Beispiel bei Einzel-Nukleotid Polymorphismen. Ein weiterer Vorteil ist, dass diese Technik bereits in der medizinischen Anwendung steht und dort bereits mit Erfolg eingesetzt werden konnte, zwar nicht im Bezug auf siRNA aber bereits zur Therapie von Gendefekten. Deshalb konnten mit dieser Technik schon viele Erfahrungen gesammelt werden. Der Nachteil dieser viralen Vektoren hat sich dabei aber auch gezeigt. Es gab Patienten, die eine bis dahin unbekannte Allergie gegen Proteine des viralen Vektors hatten und nach der Applikation aufgrund des daraus folgenden anaphylaktischen Schocks verstorben sind. Bei anderen Patienten konnte zwar die Gentherapie erfolgreich durchgeführt werden, das Virus zerstörte bei der Integration in das Wirtsgenom aber Gene oder regulatorische Elemente, so dass es zu der Entstehung einer Krebserkrankung kam. Somit lässt sich sagen, dass virale Vektoren eine Form der Applikation für shRNA sein können, aber auch ein gewisses Risikopotential besitzen.

In der Arbeitsgruppe von J. Schneider-Schaulies wurde kürzlich ein Tiermodell in der Maus etabliert, welches als Nager-Modell der SSPE dient. In diesem Modell könnte untersucht werden, ob siRNAs, die sich gegen die N, P- und L-mRNA richten, die Ausbildung der persistenten Infektion verhindern können und ob sie nach einer Infektion zur Therapie benutzt werden können. Auch könnte untersucht werden, ob sich normale siRNA oder shRNA exprimierende virale Vektoren für diese Anwendung besser eignen, sowohl im Bezug auf ihre Wirksamkeit als auch auf ihre Distribution im ZNS.

5. Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung (dt.)

Im Gegensatz zu genetisch modifizierten Viren ermöglicht der Einsatz von siRNA zur RNA Interferenz (RNAi) die post-transkriptionelle Inhibition der Gen-Expression zur Analyse von Infektionen mit völlig identischen Viren. Mittels RNase-III hergestellter siRNA wurde die Expression der sechs Masernvirus Gene unterbunden.

Ist die siRNA gegen das Nukleokapsid (N)-, das Phospho (P)- oder gegen das Large (L)-Protein gerichtet, kommt es zur effektiven Einschränkung der Replikation und der generellen Gen-Expression. Diese drei Proteine sind für Transkription und Replikation essentiell, da die Genprodukte dieser drei Proteine die RNA-abhängige RNA Polymerase und den Ribonukleoproteinkomplex (RNP) bilden. SiRNA gegen das Fusionsprotein (F) und das Hämagglutinin (H) schränken das Ausmaß der Zell-Zell Fusion ein. Interessanterweise führt die Inhibition der Expression des Matrix-Proteins (M) nicht nur zu einer Verstärkung der fusogenen Aktivität, sondern erhöht gleichzeitig die Expression der übrigen viralen mRNA und genomischer RNA um den Faktor 2-2,5, so dass das Verhältnis mRNA:Genom konstant bleibt. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass M als negativer Regulator der viralen Polymeraseaktivität wirkt, und sowohl die Produktion von mRNA wie auch die Genom-Replikation in gleichem Maß beeinflusst.

Anschließend wurden synthetische siRNAs gegen die L-mRNA gesucht. Effektive Sequenzen wurden dann, in Form einer shRNA Expressionskassette, in einen lentiviralen Vektor inkloniert. Damit sollen dann lentivirale Partikel hergestellt werden, mit denen Zellen infiziert werden können, so dass diese Zellen dann stabil siRNA exprimieren. Dieser Teil der Arbeit war zum Zeitpunkt der Niederschrift noch nicht beendet.

5.2 Summary

In contrast to studies with genetically modified viruses, RNA interference (RNAi) allows the analysis of virus-infections with identical viruses and posttranscriptional ablation of individual gene functions. Using RNaseIII-generated multiple short interfering RNA (siRNA) against the six measles virus (MV) genes, we found efficient downregulation of viral gene expression in general with siRNAs against the nucleocapsid (N)-, phosphoprotein (P)-, and polymerase (L)-mRNAs, the translation products of which are forming the ribonucleoprotein (RNP) complex. Silencing of the RNP-mRNAs was highly efficient in reducing viral messenger and genomic RNAs. SiRNAs against the mRNAs for the haemagglutinin (H)- and

fusion (F) proteins reduced the extent of cell-cell fusion. Interestingly, siRNA-mediated knockdown of the matrix (M) protein not only enhanced cell-cell fusion, but also increased the levels of both, mRNAs and genomic RNA by a factor of 2 to 2.5, so that the genome to mRNA-ratio was constant. These findings indicate that M acts as a negative regulator of the viral polymerase activity, affecting mRNA transcription and genome replication to the same extent.

In addition, two synthetic siRNA targetting the L-mRNA, were identified. These two sequences were cloned into a shRNA expressing lentiviral vector, which can then be used to produce pseudotyped lentiviral particles. Cells infected with these viral particles will express the siRNA continuously. This work was not finished when this thesis was written.

6. Veröffentlichungen

6.1 Fachmagazine

- **Reuter T, Heldmann M, Schimmers S, Schepers K, Dittmer U**, “Protection of mice against Friend retrovirus infection by vaccination with antigen-loaded, spleen derived dendritic cells”, *Vaccine*, 2004 Jul 29, 22 (21-22):2686-9
- **Reuter T, Weissbrich B, Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J**, “RNA interference with measles virus N-, P- and L-mRNAs efficiently prevents, and with matrix protein-mRNA enhances viral transcription”, *Journal of Virology*, accepted March 06

6.2 Poster

- **Reuter T, Taupp D, Schneider-Schaulies J**, „ Attempts to inhibit measles virus infection by siRNA“, *Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) März 2004*
- **Reuter T, Schneider-Schaulies J**, „Inhibition of measles virus infection by RNA interference“, *Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) März 2005*

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Reuter, Thorsten

Geboren: 08.07.19975, Esslingen a.N.

Familienstand: Ledig

Schulbildung

1981-1986 Klosterhof Grundschule Nellingen

1986- 1995 Otto-Hahn Gymnasium Nellingen

Wehrdienst

1995-1997 Bundeswehr; Heer, PzGrenBtl. 294, Stetten a.k.M.

Universität

10/1997-07/2002 Universität Würzburg, Studium der Biologie

02/2003-06/2006 Dissertation am Institut für Virologie und Immunbiologie

8.Literaturverzeichnis

- Baczko, K., Liebert, U. G., Cattaneo, R., Billeter, M. A., Roos, R. P., and ter Meulen, V. (1988). Restriction of measles virus gene expression in measles inclusion body encephalitis. *J Infect Dis* 158, 144-150.
- Bahi, A., Boyer, F., Kolira, M., and Dreyer, J. L. (2005). In vivo gene silencing of CD81 by lentiviral expression of small interference RNAs suppresses cocaine-induced behaviour. *J Neurochem* 92, 1243-1255.
- Bankamp, B., Horikami, S. M., Thompson, P. D., Huber, M., Billeter, M., and Moyer, S. A. (1996). Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *Virology* 216, 272-277.
- Bankamp, B., Kearney, S. P., Liu, X., Bellini, W. J., and Rota, P. A. (2002). Activity of polymerase proteins of vaccine and wild-type measles virus strains in a minigenome replication assay. *J Virol* 76, 7073-7081.
- Bartz, R., Brinckmann, U., Dunster, L. M., Rima, B., Ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (1996). Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *Virology* 224, 334-337.
- Bellini, W. J., Englund, G., Richardson, C. D., Rozenblatt, S., and Lazzarini, R. A. (1986). Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences. *J Virol* 58, 408-416.
- Bellini, W. J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H., and Richardson, C. D. (1985). Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53, 908-919.
- Bellini, W. J., Rota, J. S., and Rota, P. A. (1994). Virology of measles virus. *J Infect Dis* 170 Suppl 1, S15-23.
- Bellini, W. J., and Rota, P. A. (1998). Genetic diversity of wild-type measles viruses: implications for global measles elimination programs. *Emerg Infect Dis* 4, 29-35.
- Billeter, M. A., Cattaneo, R., Spielhofer, P., Kaelin, K., Huber, M., Schmid, A., Baczko, K., and ter Meulen, V. (1994). Generation and properties of measles virus mutations typically associated with subacute sclerosing panencephalitis. *Ann N Y Acad Sci* 724, 367-377.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., and Barik, S. (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11, 50-55.
- Bitnun, A., Shannon, P., Durward, A., Rota, P. A., Bellini, W. J., Graham, C., Wang, E., Ford-Jones, E. L., Cox, P., Becker, L., *et al.* (1999). Measles inclusion-body encephalitis caused by the vaccine strain of measles virus. *Clin Infect Dis* 29, 855-861.
- Boden, D., Pusch, O., Silbermann, R., Lee, F., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2004). Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res* 32, 1154-1158.

- Breitfeld, V., Hashida, Y., Sherman, F. E., Odagiri, K., and Yunis, E. J. (1973). Fatal measles infection in children with leukemia. *Lab Invest* 28, 279-291.
- Buchholz, C. J., Schneider, U., Devaux, P., Gerlier, D., and Cattaneo, R. (1996). Cell entry by measles virus: long hybrid receptors uncouple binding from membrane fusion. *J Virol* 70, 3716-3723.
- Calain, P., and Roux, L. (1993). The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 67, 4822-4830.
- Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M. A., and Cattaneo, R. (1998). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J* 17, 3899-3908.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Bacsko, K., and Billeter, M. A. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56, 759-764.
- Crennell, S., Takimoto, T., Portner, A., and Taylor, G. (2000). Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Biol* 7, 1068-1074.
- Cronin, J., Zhang, X. Y., and Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5, 387-398.
- Doench, J. G., Petersen, C. P., and Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17, 438-442.
- Dyken, P. R. (1985). Subacute sclerosing panencephalitis. Current status. *Neurol Clin* 3, 179-196.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Erlenhofer, C., Wurzer, W. J., Loffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (2001). CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* 75, 4499-4505.
- Escoffier, C., Manie, S., Vincent, S., Muller, C. P., Billeter, M., and Gerlier, D. (1999). Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J Virol* 73, 1695-1698.
- Esolen, L. M., Ward, B. J., Moench, T. R., and Griffin, D. E. (1993). Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis* 168, 47-52.
- Forthal, D. N., Aarnaes, S., Blanding, J., de la Maza, L., and Tilles, J. G. (1992). Degree and length of viremia in adults with measles. *J Infect Dis* 166, 421-424.
- Fournier, P., Brons, N. H., Berbers, G. A., Wiesmuller, K. H., Fleckenstein, B. T., Schneider, F., Jung, G., and Muller, C. P. (1997). Antibodies to a new linear site at the topographical or

functional interface between the haemagglutinin and fusion proteins protect against measles encephalitis. *J Gen Virol* 78 (Pt 6), 1295-1302.

Gendelman, H. E., Wolinsky, J. S., Johnson, R. T., Pressman, N. J., Pezeshkpour, G. H., and Boisset, G. F. (1984). Measles encephalomyelitis: lack of evidence of viral invasion of the central nervous system and quantitative study of the nature of demyelination. *Ann Neurol* 15, 353-360.

Gremillion, D. H., and Crawford, G. E. (1981). Measles pneumonia in young adults. An analysis of 106 cases. *Am J Med* 71, 539-542.

Grimm, D., Pandey, K., and Kay, M. A. (2005). Adeno-associated virus vectors for short hairpin RNA expression. *Methods Enzymol* 392, 381-405.

Hammond, S. M. (2005). Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 579, 5822-5829.

Hannon, G. J., and Conklin, D. S. (2004). RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells. *Methods Mol Biol* 257, 255-266.

Horikami, S. M., and Moyer, S. A. (1995). Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 35-50.

Ji, J., Wernli, M., Klimkait, T., and Erb, P. (2003). Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett* 552, 247-252.

Johnstone, R. W., Loveland, B. E., and McKenzie, I. F. (1993). Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal human tissues. *Immunology* 79, 341-347.

Kirk, J., Zhou, A. L., McQuaid, S., Cosby, S. L., and Allen, I. V. (1991). Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: ultrastructural and in situ hybridization evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17, 289-297.

Kumar, P., Lee, S. K., Shankar, P., and Manjunath, N. (2006). A Single siRNA Suppresses Fatal Encephalitis Induced by Two Different Flaviviruses. *PLoS Med* 3, e96.

Lecouturier, V., Fayolle, J., Caballero, M., Carabana, J., Celma, M. L., Fernandez-Munoz, R., Wild, T. F., and Buckland, R. (1996). Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *J Virol* 70, 4200-4204.

Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., and Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69-81.

Li, B. J., Tang, Q., Cheng, D., Qin, C., Xie, F. Y., Wei, Q., Xu, J., Liu, Y., Zheng, B. J., Woodle, M. C., *et al.* (2005a). Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* 11, 944-951.

- Li, M. J., Kim, J., Li, S., Zaia, J., Yee, J. K., Anderson, J., Akkina, R., and Rossi, J. J. (2005b). Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. *Mol Ther* 12, 900-909.
- Liebert, U. G., Linington, C., and ter Meulen, V. (1988). Induction of autoimmune reactions to myelin basic protein in measles virus encephalitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 17, 103-118.
- Lin, X., Ruan, X., Anderson, M. G., McDowell, J. A., Kroeger, P. E., Fesik, S. W., and Shen, Y. (2005). siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res* 33, 4527-4535.
- Liston, P., and Briedis, D. J. (1995). Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *J Virol* 69, 6742-6750.
- Liston, P., DiFlumeri, C., and Briedis, D. J. (1995). Protein interactions entered into by the measles virus P, V, and C proteins. *Virus Res* 38, 241-259.
- Liszewski, M. K., Post, T. W., and Atkinson, J. P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 9, 431-455.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
- Loewen, N., and Poeschla, E. M. (2005). Lentiviral vectors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99, 169-191.
- Manchester, M., Smith, K. A., Eto, D. S., Perkin, H. B., and Torbett, B. E. (2002). Targeting and hematopoietic suppression of human CD34+ cells by measles virus. *J Virol* 76, 6636-6642.
- McQuaid, S., and Cosby, S. L. (2002). An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab Invest* 82, 403-409.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197.
- Moll, M., Klenk, H. D., Herrler, G., and Maisner, A. (2001). A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 276, 17887-17894.
- Moll, M., Klenk, H. D., and Maisner, A. (2002). Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol* 76, 7174-7186.

- Morra, M., Lu, J., Poy, F., Martin, M., Sayos, J., Calpe, S., Gullo, C., Howie, D., Rietdijk, S., Thompson, A., *et al.* (2001). Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *Embo J* 20, 5840-5852.
- Morrissey, D. V., Lockridge, J. A., Shaw, L., Blanchard, K., Jensen, K., Breen, W., Hartsough, K., Machemer, L., Radka, S., Jadhav, V., *et al.* (2005). Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23, 1002-1007.
- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T. F., Rossi, B., Rabourdin-Combe, C., and Gerlier, D. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67, 6025-6032.
- Niewiesk, S., Brinckmann, U., Bankamp, B., Sirak, S., Liebert, U. G., and ter Meulen, V. (1993). Susceptibility to measles virus-induced encephalitis in mice correlates with impaired antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 67, 75-81.
- Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., and Tashiro, M. (2001). Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol* 146, 859-874.
- Palosaari, H., Parisien, J. P., Rodriguez, J. J., Ulane, C. M., and Horvath, C. M. (2003). STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* 77, 7635-7644.
- Parks, C. L., Lerch, R. A., Walpita, P., Wang, H. P., Sidhu, M. S., and Udem, S. A. (2001). Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75, 921-933.
- Patterson, J. B., Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M. A., and Oldstone, M. B. (2000). V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology* 267, 80-89.
- Permar, S. R., Moss, W. J., Ryon, J. J., Douek, D. C., Monze, M., and Griffin, D. E. (2003). Increased thymic output during acute measles virus infection. *J Virol* 77, 7872-7879.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Plempner, R. K., Hammond, A. L., Gerlier, D., Fielding, A. K., and Cattaneo, R. (2002). Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *J Virol* 76, 5051-5061.
- Pullan, C. R., Noble, T. C., Scott, D. J., Wisniewski, K., and Gardner, P. S. (1976). Atypical measles infections in leukaemic children on immunosuppressive treatment. *Br Med J* 1, 1562-1565.
- Radecke, F., and Billeter, M. A. (1996). The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells. *Virology* 217, 418-421.
- Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W. P., and Cattaneo, R. (2002). Polyploid measles virus with hexameric genome length. *Embo J* 21, 2364-2372.

Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A. M., Bennett, J., and Tolentino, M. J. (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 9, 210-216.

Rima, B. K., and Duprex, W. P. (2005). Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res* 111, 132-147.

Rima, B. K., and Duprex, W. P. (2006). Morbilliviruses and human disease. *J Pathol* 208, 199-214.

Sakaguchi, M., Yoshikawa, Y., Yamanouchi, K., Sata, T., Nagashima, K., and Takeda, K. (1986). Growth of measles virus in epithelial and lymphoid tissues of cynomolgus monkeys. *Microbiol Immunol* 30, 1067-1073.

Schneider, U., Bullough, F., Vongpunsawad, S., Russell, S. J., and Cattaneo, R. (2000). Recombinant measles viruses efficiently entering cells through targeted receptors. *J Virol* 74, 9928-9936.

Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J. J., Schlender, J., Dunster, L. M., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. (1996). Receptor (CD46) modulation and complement-mediated lysis of uninfected cells after contact with measles virus-infected cells. *J Virol* 70, 255-263.

Schneider-Schaulies, S., Bieback, K., Avota, E., Klagge, I., and ter Meulen, V. (2002). Regulation of gene expression in lymphocytes and antigen-presenting cells by measles virus: consequences for immunomodulation. *J Mol Med* 80, 73-85.

Schneider-Schaulies, S., Kreth, H. W., Hofmann, G., Billeter, M., and Ter Meulen, V. (1991). Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology* 182, 703-711.

Schneider-Schaulies, S., Niewiesk, S., Schneider-Schaulies, J., and ter Meulen, V. (2001). Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med* 1, 163-181.

Schneider-Schaulies, S., Schneider-Schaulies, J., Dunster, L. M., and ter Meulen, V. (1995). Measles virus gene expression in neural cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 101-116.

Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P. S., Paddison, P. J., Hannon, G. J., and Cleary, M. A. (2005). Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 23, 227-231.

Sioud, M. (2004). Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol Sci* 25, 22-28.

Song, E., Lee, S. K., Dykxhoorn, D. M., Novina, C., Zhang, D., Crawford, K., Cerny, J., Sharp, P. A., Lieberman, J., Manjunath, N., and Shankar, P. (2003). Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol* 77, 7174-7181.

Sontheimer, E. J., and Carthew, R. W. (2005). Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell* 122, 9-12.

-
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., *et al.* (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* *432*, 173-178.
- Suryanarayana, K., Baczko, K., ter Meulen, V., and Wagner, R. R. (1994). Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol* *68*, 1532-1543.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* *30*, 106-114.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* *406*, 893-897.
- tenOever, B. R., Servant, M. J., Grandvaux, N., Lin, R., and Hiscott, J. (2002). Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol* *76*, 3659-3669.
- Tober, C., Seufert, M., Schneider, H., Billeter, M. A., Johnston, I. C., Niewiesk, S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (1998). Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol* *72*, 8124-8132.
- Tomari, Y., and Zamore, P. D. (2005). MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol* *15*, R61-64.
- Valsamakis, A., Schneider, H., Auwaerter, P. G., Kaneshima, H., Billeter, M. A., and Griffin, D. E. (1998). Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J Virol* *72*, 7754-7761.
- Vasconcelos, D., Norrby, E., and Oglesbee, M. (1998). The cellular stress response increases measles virus-induced cytopathic effect. *J Gen Virol* *79* (Pt 7), 1769-1773.
- Wardrop, E. A., and Briedis, D. J. (1991). Characterization of V protein in measles virus-infected cells. *J Virol* *65*, 3421-3428.
- Watson, J. M., Fusaro, A. F., Wang, M., and Waterhouse, P. M. (2005). RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett* *579*, 5982-5987.
- Wild, T. F., and Buckland, R. (1995). Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* *191*, 51-64.
- Wong, L. F., Goodhead, L., Prat, C., Mitrophanous, K. A., Kingsman, S. M., and Mazarakis, N. D. (2005). Lentivirus-Mediated Gene Transfer to the Central Nervous System: Therapeutic and Research Applications. *Hum Gene Ther.*
- Ying, C., De Clercq, E., and Neyts, J. (2003). Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* *309*, 482-484.
- Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B. R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9779-9784.

Zhang, X., Glendening, C., Linke, H., Parks, C. L., Brooks, C., Udem, S. A., and Oglesbee, M. (2002). Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol* 76, 8737-8746.