

Titel: RNA Interferenz-vermittelte Inhibierung von Adenoviren.

Humane Adenoviren sind eine häufige Ursache lebensbedrohender Infektionen bei immunsupprimierten Patienten wie zum Beispiel HIV-positive Patienten oder Empfängern von Organtransplantaten und allogenen Stammzellen. Zu den schwersten Folgen von Adenovirusinfektionen zählen Hämorrhagische Zystitis, Nephritis, Pneumonie, Hepatitis, Enterocolitis sowie eine disseminierte Infektion. Bei letzterer können die Mortalitätsraten bei bis zu knapp unter 80 Prozent liegen. Konstantes Monitoring der Patienten kann helfen, Hochrisikopatienten zu identifizieren. Während jedoch beispielsweise in der Behandlung von Cytomegalovirus-Infektionen in den letzten Jahren wichtige Fortschritte erzielt wurden, ist die Therapie von Adenovirusinfektionen immer noch unzufriedenstellend. Etliche potentielle antivirale Substanzen wurden bisher auf ihre Kapazität zur Inhibierung von Adenovirusinfektionen getestet, doch deren Effektivität stellte sich als beschränkt heraus und tödliche Krankheitsverläufe können nach wie vor nicht zur Gänze verhindert werden.

Auf Grund der Tatsache, dass die Anzahl der Transplantationen von Organen und hämatopoietischen Stammzellen stetig im Steigen begriffen ist und nach wie vor keine zufrieden stellende Therapiemethode zur Verfügung steht, ist die Entwicklung alternativer Behandlungsstrategien von höchster Dringlichkeit um die mit Adenovirusinfektionen zusammenhängende Mortalität bei immunsupprimierten Patienten zu senken.

Im Rahmen des Projekts wird untersucht, ob RNA Interferenz (RNAi) die Kapazität birgt, die Vermehrung von Adenoviren zu verhindern oder zu beschränken. Dies soll mittels small interfering RNAs (siRNAs) und artifizierender miRNAs (amiRNAs) erfolgen. Die Fähigkeit von siRNAs oder amiRNAs Adenoviren zu inhibieren könnte die Basis für die Entwicklung eines Therapeutikums zur Behandlung von lebensbedrohenden Adenovirusinfektionen darstellen.

## Einleitung:

Personen mit einem geschwächten Immunsystem wie zum Beispiel HIV-positive Patienten, Empfänger von Organtransplantaten oder hämatopoietischen Stammzellen, haben ein hohes Risiko, an einer lebensbedrohlichen Infektion mit Adenoviren zu erkranken. Im Falle von Stammzellempfängern, die eine systemische Infektion entwickeln, wurden Mortalitätsrate von beinahe 80% berichtet. Üblicherweise verabreichte Therapeutika sind von begrenzter Wirksamkeit und häufig mit hoher Toxizität assoziiert. Alternative Therapeutika sind noch in der Beobachtungsphase. Daher, und auf Grund der Tatsache, dass die Anzahl von Empfängern von Organtransplantaten und Stammzellen stetig im Steigen begriffen ist, ist die Entwicklung neuartiger Therapien von höchster Dringlichkeit.

RNA Interferenz ist ein zellulärer Mechanismus, der durch kurze RNA Moleküle (siRNAs oder miRNAs) getriggert wird. Bei Komplementarität dieser RNA Moleküle zu Target mRNAs führt dies zu einem Abbau der mRNAs und entsprechend zu einer Inhibierung der Expression der entsprechenden Gene. Dieser Mechanismus sollte auch eine Inhibierung der Expression adenoviraler Gene und somit der Virusreplikation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beitragen können.

## Methode:

RNA Interferenz vermitteltes Gene Silencing mittels siRNAs und artifiziellen microRNAs. siRNAs sind doppelsträngige kurze RNAs, die über die Seed Region mit einer komplementären mRNA im RNA Induced Silencing Komplex einer Zelle interagieren und zu einer Degradierung dieser Target RNAs führen. Die Methode beinhaltete das Design der gegen bestimmte Target mRNAs gerichtete siRNAs, das Austesten dieser siRNAs in *in vitro* end point dilution assays und reporter assays über Dual-Luciferase Systeme, sowie RT-qPCR zur Detektion der restlichen Target mRNA nach Transfektion der siRNAs in humane Zelllinien. Die siRNAs waren gegen 3'UTRs oder die CDS der einzelnen Gene gerichtet. Die siRNAs selber haben chemische Modifizierungen, die diese stabiler machen. Alternativ kamen adenovirale Expressionsvektoren zum Einsatz, die Analoge der einzelnen siRNAs als artifizielle miRNAs (amiRNAs) exprimierten. Dabei wurden einzelne amiRNA Einheiten verkettet um zu einer Vergrößerung der Kopienzahl der amiRNAs auf den Vektoren zu gelangen. Durch Transduktion wurden diese Vektoren in mit Adenoviren infizierte Zellen eingeführt.

## Ergebnisse:

siRNAs sind in der Lage die Expression adenoviraler Gene in vitro zu inhibieren. siRNAs gegen eine Reihe viraler mRNAs führen zu einer Abnahme der Anzahl infektiöser viraler Partikel. siRNAs sind doppelsträngige kurze RNAs, die über die Seed Region mit einer komplementären mRNA im RNA Induced Silencing Komplex einer Zelle interagieren und zu einer Degradierung dieser Target RNAs führen. Die Methode beinhaltet das Design der gegen bestimmte Target mRNAs gerichtete siRNAs, das Austesten dieser siRNAs in in vitro end point dilution assays und reporter assays über Dual-Luciferase Systeme, sowie RT-qPCR zur Detektion der restlichen Target mRNA nach Transfektion der siRNAs in humane Zelllinien. Die siRNAs waren gegen 3'UTRs oder die CDS der einzelnen Gene gerichtet. Die siRNAs selber haben chemische Modifizierungen, die diese stabiler machen. Alternativ kamen adenovirale Expressionsvektoren zum Einsatz, die Analoge der einzelnen siRNAs als artifizielle miRNAs (amiRNAs) exprimierten. Dabei wurden einzelne amiRNA Einheiten verkettet um zu einer Vergrößerung der Kopienzahl der amiRNAs auf den Vektoren zu gelangen. Durch Transduktion wurden diese Vektoren in humane Zelllinien eingeführt und gleichzeitig diese mit humanen Adenoviren infiziert. Die Auswirkung auf die Virusvermehrung wurde mittels end point virus dilution Assays oder über qPCR zur Detektion der viralen DNA ermittelt.

#### Diskussion/Conclusio:

Die Adenovirus Replikation lässt sich in vitro mittels siRNAs und artifizieller miRNAs typischerweise um 2 Zehnerpotenzen inhibieren. Generell ist die Inhibierung früher adenoviraler Gene effizienter als die Inhibierung später Gene. Die Inhibierung ist weiters dosisabhängig. amiRNAs zeigen eine ähnliche Inhibierungseffizienz. Die Methode hat somit Potenzial als Alternative zu bisherigen Therapeutika und soll in weiteren Studien auf ihre potenzielle Anwendbarkeit untersucht werden.