

Cindy Zhang  
Dr. med.

## **Towards an RNA interference and Adeno-associated virus-based gene therapy targeting hepatitis E virus**

Fach/Einrichtung: Hygiene  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Dirk Grimm

Infektionen mit dem Hepatitis-E-Virus sind eine der führenden Ursachen weltweit für akute Hepatitiden. Dabei sind lebensmittelbedingte, zoonotische oder iatrogene Infektionen des Genotyps 3 in erster Linie für endemische Infektionen in den Industrienationen verantwortlich. Diese können bei Patienten mit einer zugrundeliegenden Lebererkrankung zu schwerwiegenden Verläufen führen und sich bei immungeschwächten Patienten zu chronischen Infektionen entwickeln. Bisher beschränken sich die Therapieoptionen auf die zulassungsüberschreitende Anwendung von Ribavirin und pegyliertem Interferon- $\alpha$ , wobei zunehmende Berichte über Behandlungsversagen und Arzneimittelresistenzen die Notwendigkeit der Entwicklung eines Hepatitis-E-Virus-spezifischen antiviralen Medikamentes unterstreichen.

Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Ansatz basiert auf Small hairpin RNAs, die gegen die RNA des Hepatitis-E-Virus gerichtet sind und über Adeno-assoziierte Viren eingeschleust werden. Für die gezielte *in vitro* Transduktion von S10-3 Zellen, einer Hepatom-Zelllinie, und aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteten leberzellähnlichen Zellen wurde der passendste virale Vektor identifiziert: das Adeno-assoziierte Virus des Serotyps 6.

Insgesamt wurden 20 verschiedene Small hairpin RNAs entwickelt, in Adeno-assoziierte Viren verpackt und an S10-3 Zellen getestet, die ein selektierbares Hepatitis-E-Virus-Replikon des Genotyps 3 mit einem Gaussia-Luciferase-Reporter beherbergen. In diesem Surrogat-Modell zeigten fast alle Small hairpin RNAs eine signifikante Senkung der Gaussia-Luciferase-Aktivität von bis zu 95%. Die drei wirksamsten Kandidaten zielen auf die Methyltransferase, die Basis einer intrinsischen Stammschleife von Bedeutung für die virale Replikation, oder das 3'-Ende des offenen Leserasters 2. Die weiterführende Validierung dieser Kandidaten erfolgte in Hepatitis-E-Virus-infizierten S10-3 Zellen sowie in den physiologisch relevanteren leberzellähnlichen Zellen. Hier bewirkten die Small hairpin RNAs eine Reduktion der Hepatitis-E-Virus-Kapsidproteine und RNA-Genome von bis zu 80 %. Die Kombination der drei verschiedenen Small hairpin RNAs in einem Vektor führte zu einer Potenzierung der Langzeitinhibition, sodass nach drei Wochen die Menge an Hepatitis-E-Virus-RNA nahe der Nachweisgrenze lag und kein Kapsidprotein mehr nachgewiesen werden konnte.

Dieser Effekt ist am ehesten das Resultat einer Kombination aus einem hocheffizienten Übertragungsvektor, potenten Small hairpin RNA-Sequenzen und zugänglichen Zielregionen. In früheren Studien führte die Verwendung einzelner RNA-Interferenzauslöser zum Auftreten von Flucht-Varianten. Die Kombination mehrerer RNA-Interferenzauslöser genügte jedoch um

dies zu umgehen. In dieser Studie führte die strategische Kombination der drei stärksten Small hairpin RNAs ebenfalls zu einer nachhaltigen Wirkung. Zudem zeigten weder die einzelnen noch die dreifach Small hairpin RNAs zytotoxische Effekte *in vitro*.

Für die Anwendung in dieser Arbeit wurde das Adeno-assoziierte Virus des Serotyps 6 ausgewählt, aber die Vielfalt der natürlich vorkommenden und biotechnologisch herstellbaren Kapsid-Varianten ermöglicht die flexible Pseudotypisierung von Transgenen, um gewünschte Anforderungen zu erfüllen. In Anbetracht der hepatischen und extrahepatischen Replikation des Hepatitis-E-Virus könnte die individuelle Wahl einer Kapsid-Variante eine präzise Ansteuerung der infizierten Zellen *in vivo* ermöglichen.

Da die Wirkungsweise der Small hairpin RNA unter anderem auf der Spaltung und dem Abbau der Ziel-RNA beruht, hat dieser Ansatz das Potenzial, virale Reservoirs aktiv zu eliminieren und die Virusinfektion zu beenden. Diese Proof-of-Concept Studie könnte zur Entwicklung eines dringend benötigten Hepatitis-E-Virus-spezifischen antiviralen Medikaments beitragen. Angesichts der bereits erfolgten Zulassung von Medikamenten auf der Basis von Adeno-assoziierten Viren und der zunehmenden Fortschritte auf dem Gebiet der Gentherapie könnten weitere Optimierungen zur Erhöhung der Sicherheit, Spezifität und Skalierbarkeit diesen Ansatz für die zukünftige klinische Behandlung chronisch infizierter Patienten ermöglichen.