



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Georg Sczakiel

**Zielstrukturbasierte Entwicklung von
Antisense-Oligonukleotiden und *small-interfering-RNAs*
gegen die 5'-UTR von SARS-CoV-2**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Shabnam Temori
aus Hamburg

Lübeck, 2025

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Sczakiel

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Weckmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.11.2025

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	5
1.1 SARS-CoV-2	5
1.1.1 Epidemiologie und Geschichte der Coronaviren	5
1.1.2 Aufbau des Viruspartikels	7
1.1.2.1 Strukturproteine	8
1.1.2.2 Genom	10
1.1.3 Replikationszyklus	15
1.1.3.1 Subgenomische-RNA	17
1.1.4 Wirkstoffe gegen SARS-CoV-2	18
1.1.4.1 Impfstoffe	18
1.1.4.2 Monoklonale Antikörper	19
1.1.4.3 <i>Small molecule antiviral drugs</i>	20
1.2. Strukturelle und molekulare Grundlagen der Nukleinsäurewirkstoffe	22
1.2.1 mRNA als Zielsequenz für nukleinsäurebasierte Wirkstoffe	23
1.2.2 Antisense-Oligonukleotide	24
1.2.3 <i>Small-interfering RNA</i>	26
1.3 Aufgabenstellung	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte	30
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3 Chemikalien	33
2.1.4 Puffer und Lösungen	35
2.1.5 Enzyme	37
2.1.6 Kits	38
2.1.7 Größenmarker	38
2.1.8 Zellkultur	38
2.1.8.1 Zellkulturmedien und -zusätze	38
2.1.8.2 Humane Zelllinien	39
2.1.9 Bakterienkultur	39
2.1.9.2 Bakterienstämme	40
2.1.10 Nukleinsäuren	40
2.1.10.1 Primer	40
2.1.10.2 Oligonukleotide	41
2.1.10.3 Plasmide und Replikons	42
2.1.11 Programme und Weblinks	43
2.2 Methoden	44
2.2.1 Zellbiologische Methoden	44
2.2.1.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen	44

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen und Inkulturnahme.....	45
2.2.1.3 Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmung	45
2.2.1.4 Transfektion von Zellen mit Oligonukleotiden	45
2.2.1.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Fluroeszenzmikroskopie	46
2.2.1.6 Zellernte.....	47
2.2.1.6.1 Zellernte für RNA-Isolation	47
2.2.1.6.2 Zellernte für Vitalitätsmessung.....	47
2.2.1.6.3 Zellernte für Duale Luciferase Reporter-Assay.....	48
2.2.1.7 Dualer Luciferase Reporter-Assay.....	48
2.2.1.8 Vitalitätstest	50
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	50
2.2.2.1 DEPC-Behandlung von Wasser.....	50
2.2.2.2 RNA-Isolation.....	50
2.2.2.2.1 RNA-Isolation aus Säugerzellen.....	50
2.2.2.2.2 DNA-Hydrolyse.....	51
2.2.2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	51
2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	52
2.2.2.4 Hybridisierung von siRNA.....	53
2.2.2.5 Reverse Transkription	53
2.2.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR	54
2.2.2.7 Elektrophoretische Auftrennung und Detektion von Nukleinsäuren.....	56
2.2.2.7.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese.....	56
2.2.2.7.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
2.2.2.7.2.1 Analytische native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	58
2.2.2.7.2.2 Analytische semi-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
2.2.2.7.3 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Stains-All und Sybr-Gold	58
2.2.3 Mikrobiologische Methoden.....	59
2.2.3.1 Klonierung von DNA-Fragmenten in kompetente Bakterienzellen	59
2.2.3.1.1 Analytischer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	59
2.2.3.1.2 DNA-Isolation aus Agarose-Gelen.....	59
2.2.3.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten.....	60
2.2.3.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen.....	60
2.2.3.1.5 Herstellung von Glycerinkulturen zur Konservierung ausgewählter Bakterienstämme.....	61
2.2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	61
2.2.3.2.1 Minipräparation	61
2.2.3.2.2 Midipräparation	61
2.2.3.2.3 Maxipräparation.....	62
2.2.3.2.4 <i>Large-Construct</i> Präparation	62
2.2.3.3 Kolonie-PCR.....	62
2.2.3.4 Sequenzierung von DNA.....	63
3. Ergebnisse	65

3.1. Sequenzvergleich der 5'-UTRs der SARS-CoV-2 Subtypen.....	66
3.2. Sekundärstrukturvorhersage der SARS-CoV-2 5'-UTR und Definierung der lokalen Zielsequenzen.....	70
3.3. Entwurf von SARS-CoV-2 gerichteten Oligonukleotiden	73
3.4. Hemmstudien in einem plasmidbasierten Testsystem mit SARS-CoV-2 Zielsequenzen ...	77
3.4.1 Funktionelle Studien zur Untersuchung der Antisense-Oligonukleotide.....	79
3.4.1.1 Überprüfung der Wirksamkeit der ASOs bei konstanter Konzentration	79
3.4.1.2 Dosis-Wirkungsbeziehung	82
3.4.1.3 Detaillierte BLAST-Analyse für as203 und as240	83
3.4.1.4 Mechanismusbezogene Studien (RNase H-Effekt)	84
3.4.1.5 Einfluss einer Kombination der ASOs auf die Hemmwirkung	86
3.4.1.6 Hemmstudien auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR	87
3.4.2 Bestimmung von <i>small-interfering</i> RNAs als Inhibitoren gegen SARS-CoV-2 Zielsequenzen und funktionelle Studien	90
3.4.2.1 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs.....	93
3.4.2.2 Dosis-Wirkungsbeziehung	95
3.4.2.3 Kombination der siRNAs	98
3.4.2.4 Einfluss einer Punktmutation auf die Hemmung der siRNAs sowie ASOs.....	99
3.4.2.5 Inhibitionsstudien auf der RNA-Ebene	102
3.4.3 Exkurs: Mutation des uORFs und der Einfluss auf den Translationsmechanismus	105
3.4.4 Fazit zu Hemmstudien in einem plasmidbasierten Testsystem mit SARS-CoV-2 Zielsequenzen	107
3.5. Studien in einem Replikon-basierten Testsystem das SARS-CoV-1 und -2 Zielsequenzen beherbergt.....	109
3.5.1 Analyse des pHybrid-Replikons auf Transkriptionsebene	114
3.5.1.1 Analyse der Transkriptionseffizienz des genomischen Transkripts in voller Länge..	114
3.5.1.2 Quantifizierung der CMV-gesteuerten Transkription verglichen zur RdRp-gesteuerten Transkription	115
3.5.2 Funktionelle Studien auf Proteinebene für ASOs und siRNAs im Replikonsystem	117
3.5.2.1 Untersuchung der Hemmwirkung der Oligonukleotide im Replikonsystem	118
3.5.2.2 Dosis-Wirkungsbeziehung für die siRNAs	119
3.5.3 Quantifizierung der Inhibition genomischer und subgenomischer viraler Ziel-RNAs mittels RT-qPCR	121
3.5.4 Kombination von <i>small molecule antiviral drugs</i> mit siRNAs	124
3.5.4.1 Effekte von <i>small molecules</i> mit siRNAs auf Proteinlevel	124
3.5.4.2 Effekte von <i>small molecules</i> auf die Hemmwirkung der siRNAs – Analyse auf dem RNA-Level.....	127
3.5.4.3 Effekte von <i>small molecules</i> auf die Dosisabhängigkeit der siRNAs.....	131
3.5.4.4 Zeitabhängiger Einfluss der siRNAs auf die Hemmwirkung der <i>small molecules</i>	133
3.5.4.5 Einfluss der siRNAs auf die Hemmwirkung der <i>small molecules</i> bei Mutationen im Mpro-Gen.....	136

3.5.5 Fazit zu Studien in einem Replikon-basierten Testsystem, das SARS-CoV-1-Zielsequenzen beherbergt.....	138
3.6. Exkurs: Das West-Nil-Virus als Zielgenom für oligonukleotidbasierte Wirkstoffe.....	139
3.6.1. Sekundärstrukturvorhersage der 3'- und 5'-UTR des WNV und Definierung der lokalen Zielsequenzen	139
3.6.2 Entwurf von West-Nil-Virus-gerichteten Antisense-Oligonukleotiden.....	141
3.6.3 Fazit zum West-Nil-Virus als Ziel für oligonukleotidbasierte Wirkstoffe.....	142
4. Diskussion.....	144
4.1. Auswahl der Zielsequenzen für oligonukleotidbasierte Wirkstoffe.....	145
4.1.1 Konservierung der 5'-UTR in den mutierten Varianten von SARS-CoV-2	145
4.1.2 Definition ausgewählter Zielstrukturen.....	147
4.2. Untersuchung der Wirksamkeit der oligonukleotidbasierten Wirkstoffe in einem transienten plasmidbasierten Testsystem	149
4.2.1 Funktionelle Studien zur Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide auf Protein Ebene.....	149
4.2.2 Mechanismusbezogene Studien zu Antisense-Oligonukleotiden	151
4.2.3 Funktionelle Studien zur Wirksamkeit der siRNAs auf Protein- und RNA-Ebene.....	153
4.2.4 Kombination von oligonukleotidbasierten Wirkstoffen.....	155
4.2.5 Einfluss von Punktmutationen auf die Wirksamkeit.....	156
4.3. Untersuchung der Wirksamkeit der oligonukleotidbasierten Wirkstoffe in einem Replikon-basierten Testsystem	158
4.3.1 Quantifizierung des Transkriptionsmechanismus des Replikons	158
4.3.2 Funktionelle Studien auf Protein und RNA-Ebene.....	160
4.3.3 Die Kombination von siRNAs mit <i>small molecule antiviral drugs</i> verstärkt die Wirksamkeit der Inhibitoren	161
4.4. Anwendung der hier etablierten Methoden zur schnelleren Wirkstoffentwicklung gegen andere Viren.....	164
4.5. Einfluss des uORFs auf die Translation im Plasmidsystem	165
4.6. Fazit und Ausblick	166
5. Literaturverzeichnis.....	169
6. Anhang	197
6.1 Zusätzliche experimentelle Daten.....	197
6.2 Abkürzungsverzeichnis	221
6.3 Abbildungsverzeichnis	227
6.4 Tabellenverzeichnis	230
6.5 Danksagung	231

Zusammenfassung

Das *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) wurde erstmals im Dezember 2019 identifiziert und breitete sich seitdem global aus, sodass im März 2020 die COVID-19-Pandemie ausgerufen wurde (Niemi *et al.*, 2022). Dieses Virus trägt ein positives Einzelstrang RNA-Genom mit einer Länge von 30 kB (Campos *et al.*, 2021). Seit Beginn der Pandemie entwickelten sich in kurzer Zeit verschiedene mutierte Varianten, die teilweise Resistenzen gegen Impfstoffe und vorhandene Therapeutika besaßen. Darüber hinaus wiesen sie eine höhere Übertragbarkeit auf (Duan *et al.*, 2023; Lopez Bernal *et al.*, 2021). Als alternativen antiviralen Ansatz zu gängigen Therapeutika bieten sich oligonukleotidbasierte Wirkstoffe wie Antisense-Oligonukleotide (ASOs) und *small-interfering RNAs* (siRNAs) an. Diese sind durch ihre einzelsträngigen DNA- bzw. doppelsträngigen RNA-Moleküle mit einer Länge von 18 bis 23 Nukleotiden charakterisiert. Sie binden ihre Ziel-mRNA sequenzspezifisch mittels Watson-Crick-Paarung und können deren Translation inhibieren sowie ihre Spaltung induzieren (Crooke, 2008). Anhand verschiedener Modifikationen können diese Wirkstoffe an Stabilität und Spezifität gewinnen und sind hinsichtlich ihres einfachen Designs sowie ihrer kosten- und zeiteffizienten Entwicklung ein beliebter Ansatz zur Bekämpfung von viralen und genetischen Erkrankungen in der medizinischen Forschung (Chen *et al.*, 2018; Kashihara *et al.*, 1998).

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit dieser antivirale Ansatz verwendet, um gegen die hoch konservierte 5'-UTR von SARS-CoV-2 zielstrukturbasiert ASOs und siRNAs zu entwickeln und auf ihre Wirksamkeit zu untersuchen. Neben der Generierung potenter Wirkstoffe bestand das Ziel darin, ein System zu etablieren, mit dem Oligonukleotide effizient gegen pandemische Viren entwickelt und überprüft werden können.

Um zunächst die Konservierung der 5'-UTR zu bestätigen, wurden mittels *in-silico* Verfahren Mutationen in dieser Zielregion in den *variants of concern* (VOCs) analysiert. Die Analyse ergab, dass nur vereinzelte Mutationen vorlagen, wodurch bestätigt werden konnte, dass es sich um eine konservierte Region handelt. Im nächsten Schritt konnte daher die Sekundärstruktur dieser Zielregion mittels *in-silico* Methoden modelliert und analysiert werden, wobei auffiel, dass diese Methode zum selben Ergebnis wie experimentelle Ansätze aus der Literatur führte (Miao *et al.*, 2021). Auf Basis dieser Zielstruktur wurde ein Pool von über 200 ASOs entworfen, von denen nach Beachtung etablierter Kriterien (Kap. 3.3) 10 ASOs selektiert und für experimentelle Analysen synthetisiert wurden.

Funktionelle Studien in einem plasmidbasierten Testsystem umfassten sowohl die Untersuchung der Zytotoxizität der ASOs mittels FDA-Assay als auch ein erstes Screening, um die Wirksamkeit der ASOs mittels Dual-Luciferase-Reporter (DLR)-Assay zu vergleichen. Die effizientesten ASOs wurden hinsichtlich ihrer Dosisabhängigkeit untersucht, was zur endgültigen Selektion von zwei ASOs führte. Anhand dieser ASOs wurden siRNAs abgeleitet, die mittels etablierter Kriterien (Kap. 3.4.2) überprüft wurden. Diese konnten in HEK293T-, HeLa- und ECV304-Zellen eine potente Wirksamkeit und Dosisabhängigkeit zeigen. NCBI-

Zusammenfassung

Blast-Analysen wiesen jedoch mehrere relevante *off-target*-Effekte auf, die einer genaueren Untersuchung bedürfen. RT-qPCR-Analysen ergaben, dass die Wirksamkeit der Oligonukleotide auf RNA-Ebene geringer ausfiel. Darüber hinaus bot diese Methode erste Einblicke in den Wirkmechanismus. Zudem wurden Modifikationen in der RNase H-Erkennungssequenz untersucht, welche Hinweise der Beteiligung dieses Enzyms am Wirkmechanismus lieferte. Eine Kombination der ASOs oder siRNAs auf Proteinebene konnte die jeweilige Wirksamkeit zwar nicht verbessern, bietet jedoch die Möglichkeit für Analysen auf RNA-Ebene sowie für die Kombination von ASOs und siRNAs miteinander. Zudem wurde untersucht, wie sich die Oligonukleotide bei bestimmten Punktmutationen verhalten. Dabei fiel auf, dass die Effizienzen insbesondere bei höheren Konzentrationen beeinträchtigt waren, sodass Sequenzmodifikationen der Oligonukleotide zur Erhöhung der Komplementarität zum viralen System erforderlich sind.

Darauf basierend wurden die potenten siRNAs für anschließende Untersuchungen mit dem pHybrid-Replikon (Abb. 3.24) angepasst. RT-qPCR-Analysen ergaben, dass die Transkriptionseffizienz des Gesamtlängentranskriptes beeinträchtigt ist und der CMV-Promoter einen Großteil der Transkription des Replikons in HEK293T-Zellen steuert. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde die Wirksamkeit der siRNAs zunächst auf Protein- und anschließend auf genomischer und subgenomischer RNA-Ebene (Kap. 1.1.3) untersucht, wobei bis auf der genomischen RNA-Ebene gute Wirksamkeiten erzielt werden konnten.

Ein vielversprechender Ansatz war zudem die Kombination der siRNAs mit den *small molecule antiviral Drugs* (auch *small molecules* (L. Zhang *et al.*, 2021)). Hierbei konnte für beide Wirkstoffgruppen sowie für die Dosisabhängigkeit der siRNAs eine Verbesserung der Wirksamkeit nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte für einen Zeitraum von 96 Stunden bestätigt, jedoch nicht reproduziert werden. Auch der Einfluss von Mutationen in Mpro auf die Wirksamkeit der siRNAs und *small molecules* wurde im Replikonsystem untersucht, zeigte in diesem System jedoch keine aufschlussreichen Erkenntnisse.

Für ein besseres Verständnis des Translationsmechanismus wurde ein Exkurs durchgeführt, bei dem das Startcodon vom uORF im Plasmidsystem mutiert und der Einfluss auf die Translation mittels DLR-Assay gemessen wurde. Hierbei konnte, im Gegensatz zu Literaturdaten, keine erhöhte Translationseffizienz beobachtet werden.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Kriterien war es möglich wirksame ASOs und siRNAs gegen die 5'-UTR von SARS-CoV-2 zu entwickeln, die sowohl im Plasmid- als auch im Replikonsystem potent waren und insbesondere in Kombination mit *small molecules* eine effiziente Wirksamkeit erzielten. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den Wirkmechanismus genauer zu verstehen sowie die *off-target*-Effekte zu überprüfen, bevor die Oligonukleotide im viralen System getestet werden.

Das hier etablierte System konnte zudem beispielhaft am West-Nil-Virus angewendet werden und führte zur schnellen und effizienten Generierung von 10 potenziellen ASOs, die weitere experimentelle Untersuchungen erfordern.

Abstract

The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was first identified in December 2019 and has since spread rapidly, leading to the declaration of the COVID-19 pandemic in March 2020 (Niemi *et al.*, 2022). This virus carries a positive-sense single-stranded RNA genome with a length of 30 kB (Campos *et al.*, 2021). Several mutated variants have developed within a short period of time, since the beginning of the pandemic. Some of which were resistant to vaccines and existing therapeutics. In addition, they exhibited higher transmissibility (Duan *et al.*, 2023; Lopez Bernal *et al.*, 2021). Oligonucleotide-based agents such as antisense oligonucleotides (ASOs) and small-interfering RNAs (siRNAs) offer an alternative antiviral approach to current therapeutics. These are characterized by their single-stranded DNA or double-stranded RNA molecules with a length of 18 to 23 nucleotides, which bind their target mRNA in a sequence-specific manner by means of Watson-Crick pairing and can inhibit its translation or induce its cleavage (Crooke, 2008). These agents can be modified to gain stability and specificity and thus are a popular approach for combating viral and genetic diseases in medical research due to their simple design as well as cost- and time-efficient development (Chen *et al.*, 2018; Kashihara *et al.*, 1998).

Therefore, this antiviral approach was used in the present work to develop target structure-based ASOs and siRNAs against the highly conserved 5'-UTR of SARS-CoV-2 and to test their efficacy. The aim was to establish a system with which oligonucleotides can be efficiently developed and tested against pandemic viruses along with generating potent active substances. Initially, to confirm the conservation of the 5'-UTR, mutations in this target region in the variants of concern (VOCs) were analyzed using *in-silico* methods. The analysis revealed that only isolated mutations were present, confirming that the region is conserved. In the next step, the secondary structure of this target region could therefore be modeled and analyzed using *in-silico* methods, where it was observed that this method led to the same result as experimental approaches from the literature (Miao *et al.*, 2021). A pool of over 200 ASOs was designed based on this target structure, from which 10 ASOs were selected and synthesized for experimental analyses according to established criteria (ch. 3.3).

Functional studies in a plasmid-based test system included both the investigation of the cytotoxicity of the ASOs by FDA assay and an initial screening to compare the efficacy of the ASOs by dual luciferase reporter (DLR) assay. The most efficient ASOs were analyzed regarding their dose dependence, which led to the final selection of two ASOs. These ASOs were used to derive siRNAs, which were tested using established criteria (ch. 3.4.2). The tests showed potent efficacy and dose-dependence in HEK293T-, HeLa- and ECV304-cells. However, NCBI BLAST analyses revealed several relevant off-target effects that require further investigation. RT-qPCR analyses showed, that the efficacy of the oligonucleotides was lower at the RNA level. In addition, this method provided first insights into the mechanism of action. Subsequently, modifications in the RNase H recognition sequence were investigated,

Zusammenfassung

which provided indications of the involvement of this RNase in the mechanism of action. A combination of ASOs or siRNAs at the protein level did not improve the respective efficacy but it offers the possibility for investigations at the RNA level as well as the combination of ASOs and siRNAs with each other. Furthermore, the behavior of the oligonucleotides with certain point mutations was investigated. It was found that the efficacies were particularly impaired at higher concentrations, meaning that sequence modifications of the oligonucleotides to increase complementarity to the viral system are necessary.

Based on this revelation, the potent siRNAs were adapted for subsequent studies with the pHybrid-Replicon (Fig. 3.24). RT-qPCR analyses revealed, that the transcription efficiency of the full-length transcript is impaired and that the CMV promoter controls a major part of the transcription of the replicon in HEK293T cells. Based on the afore mentioned findings, the efficacy of siRNAs was initially investigated at the protein level and subsequently at the genomic and subgenomic RNA levels (ch. 1.1.3), with good efficacies on the protein and subgenomic RNA level.

Another promising approach was the combination of siRNAs with small molecule antiviral drugs (small molecules). This demonstrated an improved efficacy for both drug groups and for the dose-dependency of the siRNAs. This effect was confirmed for a period of 96 hours but could not be reproduced. The influence of mutations in Mpro on the efficacy of siRNAs and small molecules was also investigated in the replicon system, but that did not reveal any informative findings.

For a better understanding of the translation mechanism, an excursus was carried out in which the start codon of the uORF was mutated in the plasmid system and the influence on translation was measured using a DLR assay. In contrast to literature data, no increased translation efficiency was observed.

With the criteria established in this work, it was possible to develop effective ASOs and siRNAs against the 5'-UTR of SARS-CoV-2, which were potent in both the plasmid and replicon systems and achieved high efficacy, especially in combination with small molecules. Further studies are required to better understand the mechanism of action and to verify the off-target effects before the oligonucleotides are tested in a viral system.

The system established here was also exemplarily applied to the West Nile virus and led to the rapid and efficient generation of 10 potential ASOs, which require further experimental investigations.

1. Einleitung

1.1 SARS-CoV-2

Beim *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) handelt es sich um ein Virus, welches erstmals Ende 2019 identifiziert wurde und sich rasch zu einer Pandemie entwickelt hat. Am 11. März 2020 erklärte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die weltweite Verbreitung von SARS-CoV-2 offiziell zur Pandemie (Niemi *et al.*, 2022). Die durch das Virus verursachte Krankheit beim Menschen wird als COVID-19 (Corona Virus Disease-2019) bezeichnet. Laut Angaben der WHO haben bis März 2025 insgesamt 778 Millionen Menschen an COVID-19 gelitten, von denen 7 Millionen verstorben sind.

1.1.1 Epidemiologie und Geschichte der Coronaviren

Die Bezeichnung „Corona“ stammt aus dem Lateinischen und bedeutet Krone oder Kranz. Die Viren aus der Familie *Coronaviridae* erhielten ihren Namen aufgrund ihrer einzigartigen, kranzähnlichen Oberflächenstruktur, die durch die Spike-Proteine auf ihrer Hülle entsteht. Diese Viren haben eine sphärische Form und enthalten ein einzelsträngiges, positiv polarisiertes RNA-Genom, das als Kapsid verpackt ist (Mazhar *et al.*, 2022). Die Familie *Coronaviridae* lässt sich in die Subfamilien Torovirinae und Coronavirinae unterteilen, wobei letztere in die vier Spezies Alpha- Beta- Gamma- und Deltacoronavirus gegliedert wird (Abb. 1.1). Die Alpha- und Betacoronaviren stammen hauptsächlich von Fledermäusen und infizieren vorwiegend Säugetiere, während Gamma- und Deltacoronaviren hauptsächlich von Vögeln stammen und sowohl Vögel als auch Säugetiere infizieren können. Eine Infektion kann zu Atemwegserkrankungen, Magen-Darmbeschwerden oder systemischen Erkrankungen führen, deren klinische Ausprägung von asymptomatisch bis tödlich reichen kann (Haake *et al.*, 2020). Mit dem *Avian Infectious Bronchitis Virus* (IBV) wurde 1937 das erste Coronavirus isoliert, welches eine respiratorische Infektion in Hühnern auslöst (Ignjatovic and Sapats, 2000). Seitdem wurden weitere Coronaviren sowohl bei Säugetieren als auch bei Vögeln entdeckt. Das erste humane Alphacoronavirus, HCoV-229E, wurde 1966 in Chicago isoliert. Ein Jahr später wurde das Betacoronavirus HCoV-OC43 entdeckt. Beide Viren verursachen respiratorische Erkrankungen mit typischen Erkältungssymptomen (Mulabbi *et al.*, 2021).

Einleitung

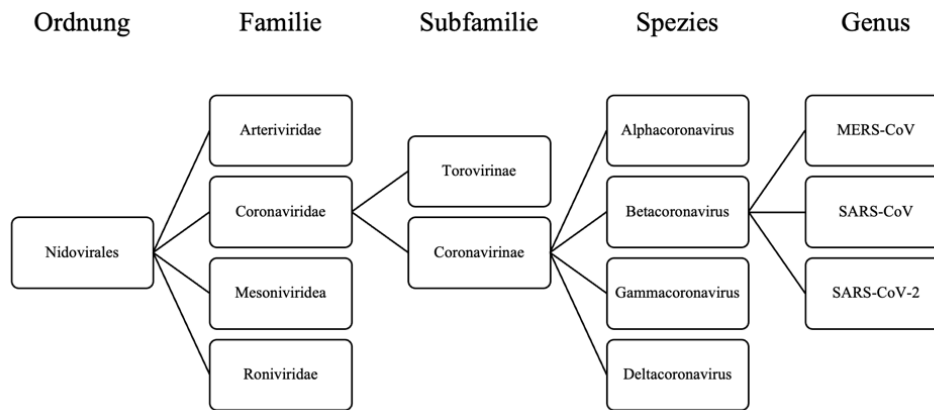


Abbildung 1.1 Taxonomie der Ordnung Nidoviridae bis zum Genus der Betacoronaviren. Nähere Spezifikation der Familie Coronaviridae und der Subfamilie Coronavirinae.

Die erste Pandemie des 21. Jahrhunderts wurde durch das SARS-CoV ausgelöst. Dieses Virus trat 2002 erstmals in China auf, breitete sich in 29 Ländern aus und infizierte über 8000 Menschen, von denen über 900 verstarben (Cherry and Krogstad, 2004). Studien haben gezeigt, dass SARS-CoV von Fledermäusen über einen oder mehrere Zwischenwirte auf den Menschen übertragen wurde. Ein weiteres Coronavirus, das durch Zoonose auf den Menschen übertragen wurde, ist das *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV). Dieses wurde erstmals im Juni 2012 in Saudi-Arabien identifiziert und verursachte eine Epidemie im mittleren Osten mit über 1000 infizierten und fast 500 Todesfällen. Auch hier identifizierten Studien Fledermäuse als natürliche Wirte für MERS-CoV, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass Kamele die direkten Überträger des Virus auf den Menschen waren (Han *et al.*, 2016).

Das zuletzt identifizierte Coronavirus ist SARS-CoV-2, welches im Dezember 2019 in Wuhan (China) isoliert wurde und sich pandemisch weltweit in nahezu allen Ländern ausgebreitet hat. Die Einführung nicht-pharmazeutischer Maßnahmen, wie das Tragen von medizinischen Masken sowie die Isolierung und Quarantäne von Infizierten, konnten die Ausbreitung verlangsamen (Hadj Hassine, 2022). Die Übertragung von COVID-19 erfolgt hauptsächlich durch direkten Kontakt mit symptomatisch oder auch asymptomatisch Infizierten, über Tröpfchen in der Atemluft oder über kontaminierte Oberflächen. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel 5 bis 14 Tage (Malik, 2020). COVID-19 äußert sich in unterschiedlichen Symptomen und Schweregraden. Die Infektion betrifft hauptsächlich den oberen respiratorischen Trakt und den Magen-Darm-Trakt und führt zu allgemeinen Erkältungssymptomen (Wevers and Van Der Hoek, 2009). In den meisten Fällen verläuft die Erkrankung asymptomatisch oder leicht. Jedoch können einige Patienten, insbesondere solche mit Vorerkrankungen oder einem Alter über 50 Jahren, eine schwere Form der Krankheit entwickeln, die zu akuter Bronchitis und Multiorganversagen führen kann (Niemi *et al.*, 2022).

Eine Herausforderung für die Behandlung von COVID-19 (Kap. 1.1.4) ist die hohe Mutationsrate des Virus, die immer wieder zur Entstehung von neuen Varianten geführt hat. Besonders bedeutsam sind hierbei die *variants of interest* (VOIs) und *variants of concern*

Einleitung

(VOCs). VOIs sind Virusvarianten mit Mutationen im Genom, welche die viralen Eigenschaften verändern. Dies umfasst eine höhere Übertragungsrate, einen veränderten Schweregrad der Erkrankung und verringerte Behandlungseffizienz. Ein VOC hingegen muss zudem eine oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllen: Zunahme der Übertragbarkeit oder nachteilige Veränderung der COVID-19-Epidemiologie; Zunahme der Virulenz oder Veränderung des klinischen Krankheitsbildes; oder die Abnahme der Wirksamkeit nicht-pharmazeutischer Maßnahmen und verfügbarer Therapeutika (Choi and Smith, 2021).

Die erste VOC wurde im September 2020 in Großbritannien isoliert und umfasste acht Mutation im Spikeprotein, welches für die Behandlung mit den verfügbaren Impfstoffen (Kap. 1.1.4.1) von großer Bedeutung ist. Hierbei handelte es sich um die Alpha-Variante (B.1.1.7), die sich innerhalb weniger Monate gegenüber der ursprünglichen Wuhan-Variante durchsetzte und sich global ausbreitete (Chaillon and Smith, 2021). Am 18. Dezember 2020 wurde die Beta-Variante (B. 1.351) entdeckt. Diese VOC trat zuerst in Südafrika auf und enthält gegenüber der Wuhan-Variante neun Mutationen im Spikeprotein. Sie weist zudem eine 50 % höhere Übertragungsrate auf (Tegally *et al.*, 2021). Fünfzehn Tage später wurde die nächste VOC entdeckt. Hierbei handelte es sich um die Gamma-Variante (P.1), die am 2. Januar 2021 aus japanischen Touristen isoliert wurde, die sich in Brasilien aufgehalten hatten. Im S-Protein ist dabei eine weitere Mutation hinzugekommen (Fujino *et al.*, 2021). Am 11. Mai 2021 wurde in Indien die Delta-Variante B.1.617.2 entdeckt, die eine Untervariante der VOI B.1.617 darstellt. Vorhandene Impfstoffe führten zu einer 3- bis 5-Fach schwächeren Immunantwort bei dieser VOC im Vergleich zur Alpha-Variante (Planas *et al.*, 2021).

Die bisher letzte VOC wurde am 9. November 2021 in Südafrika isoliert und als Omicron-Variante (B.1.1.529) bezeichnet (Torjesen, 2021). Im Vergleich zur Wuhan-Referenzsequenz weist diese über 50 Mutationen auf, von denen sich 97 % in der kodierenden Region befinden (Bansal and Kumar, 2022). Die hohe Mutationsrate, besonders im S-Protein, führte zu einer erhöhten Übertragbarkeit sowie einem höheren Risiko der Reinfektion (Shah and Woo, 2022). Die Omikron-Variante wurde in sechs Untervarianten klassifiziert, die alle als VOC betrachtet werden: BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5. Für BA.2 konnte eine höhere Infektiosität und Immunevasion als bei BA.1. oder BA.1.1 beobachtet werden. BA.5, die eine noch höhere Übertragbarkeit und Immunevasion aufweist als die vorhergehenden Varianten, konnte sich global als dominante Linie durchsetzen.

1.1.2 Aufbau des Viruspartikels

Das SARS-CoV-2 Virion, das in Abbildung 1.2 schematisch abgebildet ist, trägt ein 29903 Basen langes, einzelsträngiges RNA-Genom. Dieses Genom ist durch das Nukleokapsidprotein (N) zu einem Ribonukleoproteinkomplex, auch Kapsid genannt, verpackt (Chang *et al.*, 2014). Die sphärische Hülle des Virions besteht aus Hüllproteinen (*Envelope*, *E*), Membranproteinen (*M*) und den Spike-Proteinen (*S*). Die Membran weist eine Dicke von etwa 5 nm auf, während der Durchmesser des gesamten Virions ungefähr 91 nm beträgt (Adamczyk *et al.*, 2021).

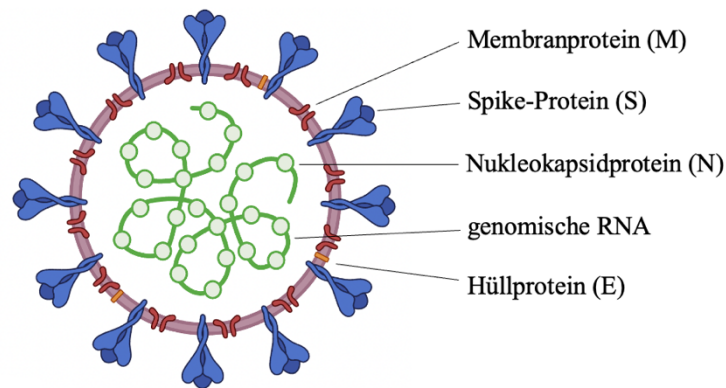


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Viruspartikels von SARS-CoV-2. Darstellung der genomischen RNA (grün) mit den Nucleokapsidproteinen (N) (hellgrün) sowie der Strukturproteine mit den Membranproteinen (M) (rot), den Spike-Proteinen (S) (blau) und den Hüllproteinen (E) (gelb).

1.1.2.1 Strukturproteine

Spike-Protein

Das 180-200 kDa große Spike-Protein (S-Protein) vermittelt die Bindung des Virus an die Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle und ermöglicht die anschließende Fusion zwischen der Virus- und der Wirtszellmembran, welches zum Eintritt des Virus in die Wirtszelle führt (Bai *et al.*, 2022). Das S-Protein ist ein Typ-I transmembranes Glykoprotein, das sich zu einem Homotrimer zusammensetzt und aus der Zellmembran herausragt (Tortorici and Veessler, 2019). Jedes Monomer setzt sich aus den zwei nicht-kovalent verbundenen Untereinheiten S1 und S2 zusammen (Abb. 1.3). Die S1-Untereinheit umfasst vier Domänen: Die N-terminale Domäne (NTD), die Rezeptorbindedomäne (RBD) und zwei C-terminale Domänen (CTD1 und CTD2). Die RBD ist für die Bindung des Virus an den *Angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2)-Rezeptor der Wirtszellen verantwortlich und stellt das Hauptziel der neutralisierenden Antikörper dar, die durch natürliche Infektionen oder Impfungen gebildet werden (Jackson *et al.*, 2022).

Die S2-Untereinheit verankert das S-Protein mit der Membran und fusioniert mit ihr. Sie ist in sieben Domänen aufgeteilt: das Fusionspeptid (FP), die *fusion-peptide proximal region* (FPPR), die *second protease cleavage site* (S2'), das *heptad-repeat 1* (HR1) und das *heptad-repeat 2* (HR2), die *central helix* (CH), der *transmembrane anchor* (TM) und dem *cytoplasmic tail* (CT) (Jackson *et al.*, 2022). Um die Fusion zwischen der Virus- und der Wirtszellmembran zu katalysieren, muss das S-Protein sowohl an der Verbindung zwischen der S1- und S2-Untereinheit als auch an S2' gespalten werden (Abb. 1.3) (Gobeil *et al.*, 2021). Die Spaltung der Untereinheiten erfolgt während der Reifung der Virionen im Golgiapparat mittels Furin an einer multibasischen Stelle (Arg-Arg-Ala-Arg) an der S1-S2 Verbindung (Jackson *et al.*, 2022). Das S1-Fragment bindet folglich an den ACE2-Rezeptor, und das S2-Fragment interagiert mit der Membran (Örd *et al.*, 2020). Die Spaltung an S2' erfolgt mittels TMPRSS2 (*transmembrane protease serine subtype 2*) auf der Zelloberfläche oder durch die Kathepsine L15,16 im

Einleitung

Endosom, wodurch eine Konformationsänderung erfolgt, die das Fusionspeptid freisetzt und die Bildung einer Fusionspore einleitet. Diese ermöglicht die Einschleusung des viralen Genoms in das Zytoplasma (Jackson *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023).

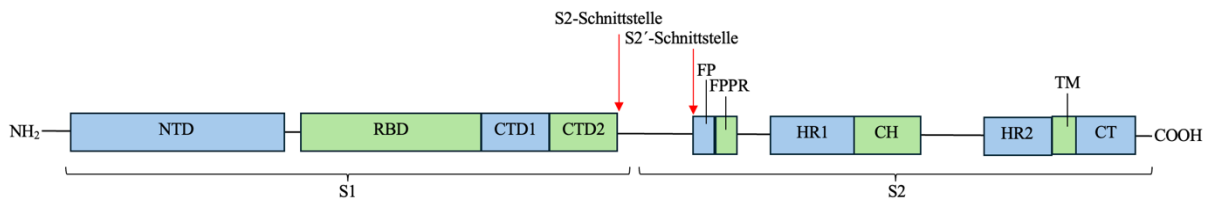


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Untereinheiten des S-Proteins. Die S1 Untereinheit besteht aus der N-terminalen Domäne (NTD), der Rezeptorbindedomäne (RBD) und zwei C-terminalen Domänen (CTD1 und CTD2). S2 unterteilt sich in das Fusionspeptid (FP), die *fusion-peptide proximal region* (FPPR), die *second protease cleavage site* (S2'), das *heptad-repeat 1* (HR1) und das *heptad-repeat 2* (HR2), die *central helix* (CH), der *transmembrane anchor* (TM) und dem *cytoplasmic tail* (CT). Die S2 und S2' Schnittstellen sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Nukleokapsid-Protein

Das N-Protein ist ein strukturell heterogenes und 419 Aminosäuren langes RNA-bindendes Protein, das sich im Inneren der viralen Hülle befindet (Schiavina *et al.*, 2021). Es stabilisiert die lange virale genomische ssRNA, indem es mit dieser einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP) bildet und spielt eine wichtige Rolle bei der Transkription und Assemblierung der Virionen (Schiavina *et al.*, 2021; Zinzula *et al.*, 2021). Neben seiner Funktion als molekulares Chaperon während der viralen RNA-Synthese ist es zusammen mit den *non-structural proteins* Nsp2-16 an der Bildung des Replikations-Transkriptions-Komplexes RTC sowie an der Bildung replizierender Organellen beteiligt, die für eine geordnete Replikation und Transkription der RNA unerlässlich sind (Wu *et al.*, 2023a).

Das N-Protein besteht aus zwei strukturellen Domänen und drei intrinsisch ungeordneten (*disordered*) Regionen (IDRs): Die N-terminale Domäne (NTD), die C-terminale Domäne (CTD), der N-Arm, die zentrale Linkerregion (LKR) und der *C-tail* (Zhou *et al.*, 2020). Die LKR-Domäne enthält eine Serin/Arginin-reiche Region, die stark phosphoryliert ist, was den nukleo-zytoplasmatischen Transport des N-Proteins beeinflusst und aufgrund der negativen Ladung die Oligomerisierung des Proteins über elektrostatische Effekte reguliert (Surjit *et al.*, 2005).

Sowohl die NTD als auch die CTD sind für die Bindung an die RNA verantwortlich, da sie positiv geladene Taschen enthalten, die hauptsächlich aus Argininresten bestehen (Bai *et al.*, 2021). In der Regel liegen die CTDs als Dimere vor und interagieren miteinander, um Oligomere zu bilden, die das Nukleinsäuregerüst umhüllen (Chen *et al.*, 2007).

Membranprotein

Das Membranprotein (M-Protein) ist ein Typ III Glykoprotein, und das am häufigsten vorkommende Strukturprotein von SARS-CoV-2 (Bai *et al.*, 2022). Es wird von der humoralen und zellulären Immunantwort als bedeutendes Immunogen erkannt (Liu *et al.*, 2010). Das 25 kDa große M-Protein besteht aus 222 Aminosäuren und umfasst eine kurze N-terminale

Einleitung

Ektodomäne gefolgt von drei transmembranen Domänen (TM 1 – 3) sowie einer großen C-terminalen Endodomäne (Z. Zhang *et al.*, 2022). Die Bildung der Virionenhülle, der Erhalt der Form und Größe sowie der Buddingprozess werden weitgehend durch M-Monomer-Wechselwirkungen bestimmt (Dolan *et al.*, 2022).

Die Synthese der M-Monomere erfolgt im endoplasmatischen Retikulum-Golgi-Interkompartiment (ERGIC), wo sie eine Plattform zur Rekrutierung anderer Strukturproteine bietet (Fehr and Perlman, 2015). Die Wechselwirkung mit den Strukturproteinen N und S ist entscheidend für die Synthese neuer Virionen. Insbesondere die Interaktion von M- und N-Proteinen ist wichtig für die korrekte Virionenbildung (Z. Zhang *et al.*, 2022). Dabei stabilisiert das M-Protein den RNP, indem seine Endodomänen unter der Hülle eine Matrix bereitstellen, an die das Nukleokapsid für den Buddingprozess binden kann (Neuman *et al.*, 2011; Schoeman and Fielding, 2019). Zudem unterstützt das M-Protein den Einbau des Spike-Proteins in die Virionenhülle, indem es dieses für den Assemblierungsprozess im ERGIC zurückhält (Mahtarin *et al.*, 2022).

Hüllprotein

Mit einer Masse von nur 8,4 kDa und einer Länge von 75 Aminosäuren ist das Hüllprotein (E-Protein, *envelope*) das kleinste Strukturprotein von SARS-CoV-2 (Zhou *et al.*, 2023). Es besteht aus einem kurzen, hydrophilen N-terminalen Abschnitt, gefolgt von einer 25 Aminosäuren umfassenden hydrophoben Transmembrandomäne (TMD), und einem langen, hydrophilen C-terminalen Abschnitt, der den größten Teil des Proteins ausmacht (Schoeman and Fielding, 2019). Das E-Protein fungiert als Viroporin, indem die TMD oligomerisiert und pentamere Protein-Lipid-Poren bildet, die den Ionentransport ermöglichen (Verdiá-Báguena *et al.*, 2012). Während des Replikationszyklus wird E in großem Ausmaß synthetisiert, wobei nur ein kleiner Anteil in der Virionenhülle eingebaut wird (Venkatagopalan *et al.*, 2015). Der Großteil des Proteins befindet sich im ERGIC, wo es an der Virionenassemblierung und dem Buddingprozess beteiligt ist (Nieto-Torres *et al.*, 2011). Zusammen mit dem M-Protein reguliert das E-Protein die N-Glykosylierung sowie die Lokalisierung der S-Proteine im cis-Golgi und verlangsamt zudem den sekretorischen Weg, um eine optimale Prozessierung der Virionen zu gewährleisten. Zudem könnte das E-Protein an der Krümmung der Membran oder der Spaltung von Vesikeln beteiligt sein (Boson *et al.*, 2021)

1.1.2.2 Genom

SARS-CoV-2 besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom von 29903 Basen mit positiver Polarität (Campos *et al.*, 2021). Diese RNA trägt am 5'-Ende eine m⁷G-Cap-Struktur und am 3'-Ende eine Poly-A-Sequenz (Park *et al.*, 2022). Das Genom kann in elf codierende und zwei nicht-codierende Regionen unterteilt werden (Abb. 1.4). Die ersten 265 Basen bilden die 5'-untranslatierte Region (UTR). Darauf folgt der erste *open reading frame* (ORF1ab), der mit 21289 Nukleotiden den größten Teil des viralen Genoms ausmacht. Anschließend folgen die Struktur- und akzessorischen Proteine S (Pos. 21563-25384), ORF3a (Pos. 25393- 26220), E

Einleitung

(Pos.26245-26472), M (Pos. 26523-27191), ORF6 (Pos. 27202-27387), ORF7a (Pos. 27394-27759), ORF7b (Pos. 27756-27887), ORF8 (Pos. 27894-28259), N (Pos. 8274-29533), ORF10 (Pos. 29558-29674) (Abb. 1.4) (Cresswell-Clay and Periwal, 2021). Das Genom endet mit der 337 Nukleotiden langen 3'-UTR (Brant *et al.*, 2021).

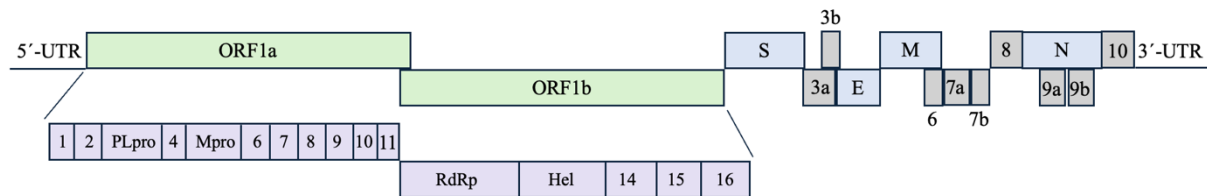


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Genomstruktur von SARS-CoV-2. Das Genom besteht aus den *open reading frames* ORF1a und ORF1b (grün), die jeweils die *non-structural proteins* Nsp1-11 und Nsp12-16 codieren (lila). Darauf folgen die vier Strukturproteine Spike (S), Envelope (E), Membran (M) und Nukleokapsid (N) (blau). Die akzessorischen Proteine sind in grau dargestellt. Das Genom wird von den untranslatierten Regionen 5'-UTR und 3'-UTR flankiert.

Das ORF1ab ist in ORF1a und ORF1b unterteilt und codiert für die Polyproteine pp1a und pp1ab (A. Wu *et al.*, 2020). Mit einer Größe von fast 500 kDa, wird pp1a nach der Translation (Kap. 1.1.3) in 11 *non-structural proteins* (Nsp) gespalten. Die Translation von ORF1b ist von einem -1 *ribosome frameshift* abhängig. Dieses führt zum Ablesen des gesamten ORF1ab, woraus das pp1ab synthetisiert wird, und durch virale Proteasen in 16 Nsp gespalten wird (Abb. 1.4) (Kim *et al.*, 2020). Für den *frameshift* ist eine *pseudoknot*-Struktur in der kurzen Nsp11-Sequenz verantwortlich. Wenn das Ribosom während der Translation von ORF1a das Stopcodon erreicht hat, kann die Bildung der *pseudoknot*-Struktur dazu führen, dass das Ribosom um eine Position in 5'-Richtung rutscht und mit der Translation von ORF1b fortfährt (Roman *et al.*, 2021). Die Wahrscheinlichkeit für die Bildung dieser *pseudoknot*-Struktur beträgt 15-20 % (Sun *et al.*, 2021). Der programmierte -1 *frameshift* während der Translation ist bei allen Coronaviren konserviert und für die Synthese der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp, auch Nsp12) sowie der Nsp 13-16 essentiell (Bhatt *et al.*, 2021).

Neben den Strukturproteinen S, E, M und N (Kap. 1.1.2.1) werden akzessorische Proteine im SARS-CoV-2-Genom kodiert. Diese Proteine sind für die Virusreplikation nicht relevant, spielen jedoch eine entscheidende Rolle bei der Beeinträchtigung des Immunsystems des Wirts (Caobi and Saeed, 2024). Dabei fungieren sie als Interferonantagonisten und blockieren die IFN-Signalkaskade. Zudem beeinflussen sie andere zelluläre Prozesse wie Autophagie, Apoptose, Regulierung der Zytokinsynthese und Mitochondrienaktivität (Zandi *et al.*, 2022).

Non-structural proteins

Die *non-structural proteins* (Nsp) der Coronaviren spielen eine entscheidende Rolle bei der viralen Proliferation. Das einzige Protein, das den Replikationskomplex von SARS-CoV-2 an die zelluläre Membran verankert ist das Nsp1. Es inhibiert zudem die Translation von

Einleitung

Wirtsproteinen, indem es mit seiner C-terminalen Domäne die 40S-ribosomale Untereinheit bindet und sie dadurch für die mRNA unzugänglich macht. Zudem induziert es eine endonukleolytische Spaltungen der Wirts mRNA, was deren Abbau zur Folge hat. Nsp1 bindet mit seiner N-terminalen Domäne an die 5'-UTR der viralen RNA. In diesem Zustand, wird das Ribosom nicht blockiert, wodurch die virale Translation nicht beeinträchtigt wird (Shi *et al.*, 2020).

Nsp2 ist zum einen an der Unterbrechung der Wirtssignalübertragung verantwortlich, indem es mit mitochondrialen Prohibitinen interagiert. Darüber hinaus aktiviert Nsp2 den INF β -Promoter durch seine NF- κ B-Regulationsdomäne und induziert die Phosphorylierung der p65-Untereinheit. Dies begünstigt NF- κ B regulierte Entzündungsvorgänge, die wesentlich zur Pathogenese der akuten COVID-19-Infektion beitragen (Lacasse *et al.*, 2023).

Mit einer molekularen Masse von über 300 kDa ist Nsp3 das größte vom viralen Genom kodierte Protein. Es handelt sich hierbei um eine *papain-like protease* (PL^{pro}), die zusammen mit der *main protease* M^{pro} an der enzymatischen Prozessierung des Polyproteins beteiligt ist (Lei *et al.*, 2018). M^{pro}, auch bekannt als Nsp5, ist eine Cysteinprotease, die für die Mehrzahl der Proteinspaltungen verantwortlich ist. Ihre Funktion ist unter den Coronaviren konserviert, was sie zu einem beliebten Ziel für Wirkstoffe macht (Scott *et al.*, 2022)

Nsp4 ist ein membranüberspannendes Protein, das den viralen RTC an modifizierten Membranen des endoplasmatischen Retikulums verankert und an der Bildung von Doppelmembranvesikeln beteiligt ist (Fung and Liu, 2018).

Für Nsp6 sind drei Hauptfunktionen bekannt: Es dimerisiert zur Bildung von Replikationsorganellen, es wirkt der angeborenen Immunreaktion des Wirts entgegen, indem es die IFN-I-Signalwege manipuliert, und es aktiviert das *NOD-like receptor* (NLR) *Family Pyrin Domain Containing 3* (NLRP3) Inflammasom, indem es die Ansäuerung von Lysosomen verhindert (Bills *et al.*, 2023).

Die *non-structural proteins* Nsp7 und Nsp8 stabilisieren Nsp12 an den Regionen für die RNA-Bindung und sind somit essentiell für die Aktivität von Nsp12 (Kirchdoerfer and Ward, 2019). Nsp12 ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase und bildet zusammen mit Nsp7 und Nsp8 sowie Nsp13-15 den RTC, wobei sie die Synthese der viralen RNA katalysiert. Daher gilt auch dieses Protein als ein beliebtes Ziel für Wirkstoffe gegen SARS-CoV-2 (Gao *et al.*, 2020). Nsp13 besitzt eine Helikaseaktivität während der Genomreplikation sowie eine 5'-Triphosphataseaktivität und ist daher zusammen mit Nsp14 und Nsp16 am mRNA-*Capping* beteiligt (James Chen *et al.*, 2020). Während Nsp16 eine Ribose 2'-O-Methyltransferase ist, handelt es sich bei Nsp14 um eine 3'-5' Exoribonuklease (ExoN), die für das *proof-reading* während der RNA-Synthese verantwortlich ist. Da die RdRp eine relativ hohe Fehlerrate aufweist ist dies essentiell, um die Integrität des großen Genoms langfristig zu gewährleisten (Manfredonia and Incarnato, 2021). Nsp10 interagiert mit Nsp14 und Nsp16 und reguliert ihre jeweiligen Aktivitäten. Wenn Nsp10 an den N-Terminus von Nsp14 bindet, ermöglicht es der

Einleitung

aktiven ExoN-Stelle, eine stabil geschlossene Konformation anzunehmen. Zudem ist Nsp10 ein allosterischer Regulator, der Nsp16 stabilisiert (Ferron *et al.*, 2018; Snijder *et al.*, 2016).

Ein weiteres Enzym, das vom viralen Genom kodiert wird, ist Nsp15. Dabei handelt es sich um eine Uracil-spezifische RNA-Endonuklease, die Coronaviren vor der angeborenen Immunabwehr abschirmt, indem es die Umgehung von dsRNA-Sensoren erleichtert, die normalerweise eine Interferon (IFN)-Reaktion vom Typ I auslösen würden. Dazu spaltet sie virale dsRNA außerhalb der Replikationskomplexe (J. Chen *et al.*, 2023).

Auch Nsp9 beeinflusst die Immunabwehr der Wirtszellen, indem es an bestimmte Regionen auf der 7SL-RNA-Komponente des Signalerkennungspartikels bindet und während der Infektion den Proteinverkehr zur Zellmembran stört, welches die Immunabwehr des Wirts unterdrückt (Banerjee *et al.*, 2020).

Das kleinste *non-structural protein* ist Nsp11. Es besteht aus nur 13 Aminosäuren und ist ein intrinsisch ungeordnetes Protein, dessen Funktion nicht vollständig geklärt ist (Gadhawe *et al.*, 2021).

5'-untranslatierte Region

Die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) ist eine hochkonservierte Struktur innerhalb der Familie *Coronaviridae* und besteht beim SARS-CoV-2 aus 265 Nukleotiden (Abb. 1.5). Dieser Bereich enthält insgesamt fünf hochstrukturierte *Stem-Loop*-Elemente, die bei den Betacoronaviren stärker konserviert sind als die kodierenden Elemente des Genoms, und stellt daher ein potenzielles Ziel für Wirkstoffe dar. Diese *Stem-Loops* bilden sich aus einem doppelsträngig ausgebildeten Stamm mit einer kurzen einzelsträngigen Schleife und haben eine wesentliche funktionelle Rolle bei der viralen RNA-Replikation und Translation sowie der Synthese subgenomischer RNA (sgRNA) (Yang and Leibowitz, 2015).

Ein essenzieller Bestandteil der 5'-UTR ist die *Leadersequenz*, ein hochkonservierter Bereich, der sich von Position 14 bis 75 erstreckt und die *Stem-Loops* SL1, SL2 und SL3 umfasst (Abb. 1.5). Die *Leadersequenz* geht jeder sgRNA voraus (Taiaroa *et al.*, 2020). SL1 spielt eine wichtige Rolle bei der viralen Translation, da es im denaturierten Zustand vorliegen muss, um eine *Cap*-abhängige Translation zu ermöglichen. Weiterhin schützt SL1 das virale Genom vor der Translationsinhibition durch Nsp1, indem es den N-Terminus von Nsp1 bindet und somit verhindert, dass es mit dem C-Terminus die 40S-ribosomale Untereinheit blockiert (Kap. 1.1.2.2) (Shi *et al.*, 2020; Vora *et al.*, 2022). Die *Stem-Loops* SL2 und SL3 sind die konserviertesten Strukturen der 5'-UTR innerhalb der Betacoronaviren (Liu *et al.*, 2007) und sind bei SARS-CoV-1 und -2 identisch (Vögele *et al.*, 2023). Studien haben gezeigt, dass SL2 essentiell für die genomische und subgenomische RNA-Synthese ist (Liu *et al.*, 2009). Der *Stem-Loop* SL3 beinhaltet die konservierte transkriptionsregulatorische Sequenz des *Leaderbereichs* (TRS-L), die an der diskontinuierlichen Transkription (Kap. 1.1.3.1) zur Synthese der sgRNA beteiligt ist (Yang and Leibowitz, 2015). Die diskontinuierliche Transkription wird darüber hinaus vom SL4 unterstützt, der als strukturelle Sperre dient, um

Einleitung

den Replikations-Transkriptions-Komplex an die richtige Stelle zu leiten (Yang *et al.*, 2011). Zudem befindet sich im SL4 das Startcodon für den *upstream open reading frame* (uORF) (Kap. 1.1.2.2), der mit einer Länge von 30 Nukleotiden bis in den SL4.5 reicht (Rangan *et al.*, 2021). SL4.5 wurde bisher nicht genauer untersucht und kommt nicht in jeder Strukturanalyse vor (Lan *et al.*, 2022).

Die größte Struktur der 5'-UTR bildet der SL5 in Form einer sogenannten *four-way-junction*. Diese ist in drei Substrukturen unterteilt: SL5a, SL5b und SL5c (Yang *et al.*, 2015). Aufgrund der Hexaloops, die durch 5'-UUUCGU-3' in SLa und SLb gekennzeichnet sind, spielt SL5 eine Rolle bei der Protein-RNA- oder RNA-RNA-Interaktion. Dieses Motiv ist bei den meisten Betacoronaviren konserviert (Chen *et al.*, 2021). Die *four-way-junction* fungiert zudem als Verpackungssignal in Coronaviren (Chen and Olsthoorn, 2010). Die 5'-UTR endet mit dem Startcodon des Nsp1, der sich im Stamm von SL5 an Position 266 befindet und von einer imperfekten Kozak-Sequenz umgeben ist (Condé *et al.*, 2022).

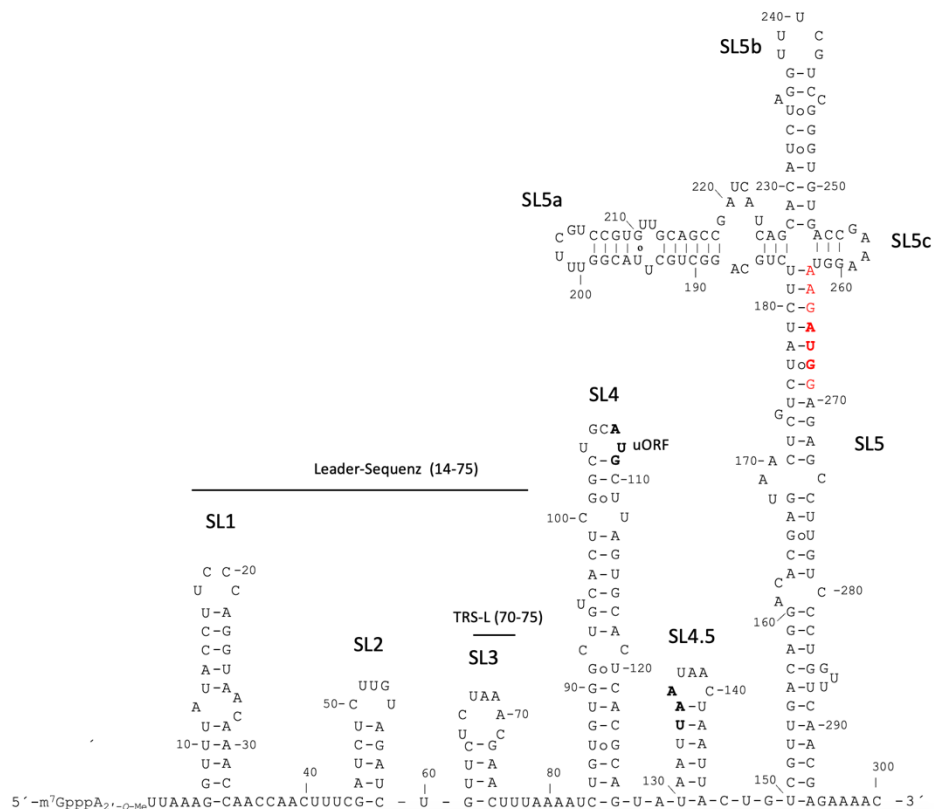


Abbildung 1.5 Sekundärstrukturvorhersage der 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2. Die Sekundärstruktur wurde mittels mfold-Software aus den ersten 300 Nukleotiden der Referenzsequenz NC_045512.2 erstellt. Das Start- und Stopcodon des uORFs sind fett und schwarz markiert. Die Kozak-Sequenz ist rot markiert, wobei das Startcodon rot und fett markiert ist. Die *Stem-Loops* sind mit „SL“ abgekürzt.

Upstream open reading frame

Der SL4 der 5'-UTR von SARS-CoV-2 enthält einen *upstream open reading frame* (uORF), welches an Position 107 beginnt und an Position 136 mit zwei aufeinanderfolgenden UAA-Stopcodons endet (Abb. 1.5). Dieser Bereich umfasst somit 30 Nukleotide und liegt im

Einleitung

Leseraster zum 134 Nukleotide stromabwärts gelegenen Startcodon von Nsp1 (Miao *et al.*, 2021). Da dieser uORF stromabwärts außerhalb der *Leadersequenz* liegt, ist er in den sgRNAs nicht vorhanden (H.-Y. Wu *et al.*, 2014).

Der uORF stellt ein cis-agierendes Element dar, und weist eine konservierte Struktur innerhalb der Betacoronaviren auf (Vögele *et al.*, 2023). Er kodiert für ein Peptid mit einer Länge von 9 Aminosäuren, dessen genaue Funktion und Existenz bislang umstritten ist (Aviner *et al.*, 2023; Condé *et al.*, 2022).

Im humanen Genom sowie in verschiedenen Viren werden die meisten uORFs translatiert und beeinflussen dadurch die Translationseffizienz der stromabwärts gelegenen ORFs, das dadurch in der Regel herunterreguliert wird (Jayaram *et al.*, 2021). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Ribosomen, die diese uORFs translatieren von der RNA dissoziieren, bevor sie die stromabwärts gelegenen ORFs erreichen (Johnstone *et al.*, 2016). Daher wird angenommen, dass der uORF von SARS-CoV-2 die Translation der viralen Proteine Nsp1-16 herunter reguliert (Vögele *et al.*, 2023).

1.1.3 Replikationszyklus

Die Infektion einer Zelle mit SARS-CoV-2 erfolgt in drei wesentlichen Schritten: Bindung des Oberflächenrezeptors ACE2, proteolytische Spaltung der S2-Untereinheit und Fusion mit der Wirtszellmembran (Endozytose). Der weitere Replikationszyklus beinhaltet die Schritte: primäre Translation, Polyproteinprozessierung, RNA-Synthese, diskontinuierliche Transkription, Translation, Assemblierung und Exozytose (Abb. 1.6). Der erste Schritt wird durch die Bindung des Spike-Proteins an den Typ-I-transmembranären Rezeptor ACE2 auf der Oberfläche von Wirtszellen gekennzeichnet (Tortorici and Velesler, 2019). ACE2-Rezeptoren treten im menschlichen Körper insbesondere auf den Epithelzellen des Darms, der Blutgefäße, des Herzens, der Lunge, des Gehirns, der Hoden und der Niere auf, welches dem Virus eine besonders hohe Infektiosität verleiht (Shirbhate *et al.*, 2021). Im zweiten Schritt steht die Spaltung von S2' (Kap. 1.1.2.1) durch die *transmembrane protease serine subtype 2* (TMPRSS2) im Vordergrund, die in Zellen des respiratorischen Traktes vorkommt. Für die S2'-Spaltung muss das Spike-Protein jedoch zunächst mit der Spaltung der S1/S2-Grenze durch Furin während des Reifungsprozesses des Virus in der Wirtszelle vorbereitet werden (Le *et al.*, 2023). Die Interaktion der S1-Untereinheit mit dem ACE2-Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung, bei der sich die S2-Untereinheit mit der Wirtszellmembran verankert und die S2'-Einheit freigelegt wird, welche dann von TMPRSS2 gespalten werden kann (Jackson *et al.*, 2022). Im letzten Schritt werden das Fusionsprotein und der *transmembrane anchor* (Kap. 1.1.2.1) durch Umstrukturierung zusammengeführt, was schließlich zur Einfügung des Fusionsproteins in die Wirtsmembran führt. Dadurch wird das virale Genom in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt, welches auch als Endozytose bezeichnet wird (Hoffmann *et al.*, 2020).

Einleitung

Im nächsten Schritt erfolgt die primäre Translation der offenen Leserahmen ORF1a und ORF1ab des viralen Genoms. Dadurch entstehen die Polyproteine pp1a und pp1ab. Letzteres ist das Produkt eines programmierten ribosomalen *frameshift* am Nsp11 (Kap. 1.1.2.2) (Puray-Chavez *et al.*, 2021). Anschließend werden die Polyproteine durch die beiden Cysteinproteasen PL^{pro} und M^{pro} proteolytisch gespalten, was zur Freisetzung der Nsps1-16 führt (Polyproteinprozessierung) (Tam *et al.*, 2023). Nsp1 wird besonders schnell freigesetzt, und inhibiert die Translation des Wirtsgenoms (Denison and Perlman, 1986). Ein wesentliches *non-structural protein* ist Nsp12, welches die RdRp bildet. Zusammen mit Nsp7 und Nsp8 sowie Nsp13-15 bilden sie den RTC, der am *bulged stem loop* (BSL) der 3'-UTR bindet und die Synthese der viralen RNA katalysiert (Gao *et al.*, 2020).

Die RNA-Replikation des Virusgenoms und die Transkription subgenomischer mRNAs (diskontinuierliche Transkription) findet in einer geschützten Mikroumgebung statt, die aus Organellen am endoplasmatischen Retikulum (ER) besteht, und durch Doppelmembranvesikel gekennzeichnet ist (Malone *et al.*, 2022). Die Replikation, ist durch die Synthese des negativ polarisierten Genoms vollständiger Länge (-gRNA) aus der genomischen RNA sowie eines Sets von acht subgenomischen-RNAs (-sgRNA) charakterisiert. Diese dienen als Vorlage für die Synthese neuer positiv polarisierter gRNAs und sgRNAs (Yan *et al.*, 2022). Die sgRNAs dienen als Vorlage für die Synthese der vier Strukturproteine S, E, M und N, die für die Assemblierung und die Exozytose der Virionen erforderlich sind. Die Strukturproteine S, E und M werden nach der Translation in das ER transportiert und bewegen sich entlang des sekretorischen Wegs in das ERGIC. Dort bildet das N-Protein mit dem Genom den Ribonukleoprotein-Komplex und vermittelt die Assemblierung der viralen RNA mit den Strukturproteinen (Malik, 2020). Die Virionen erreichen schließlich die Plasmamembran über Vesikel und werden durch Exozytose freigesetzt (Eymieux *et al.*, 2021).

Einleitung

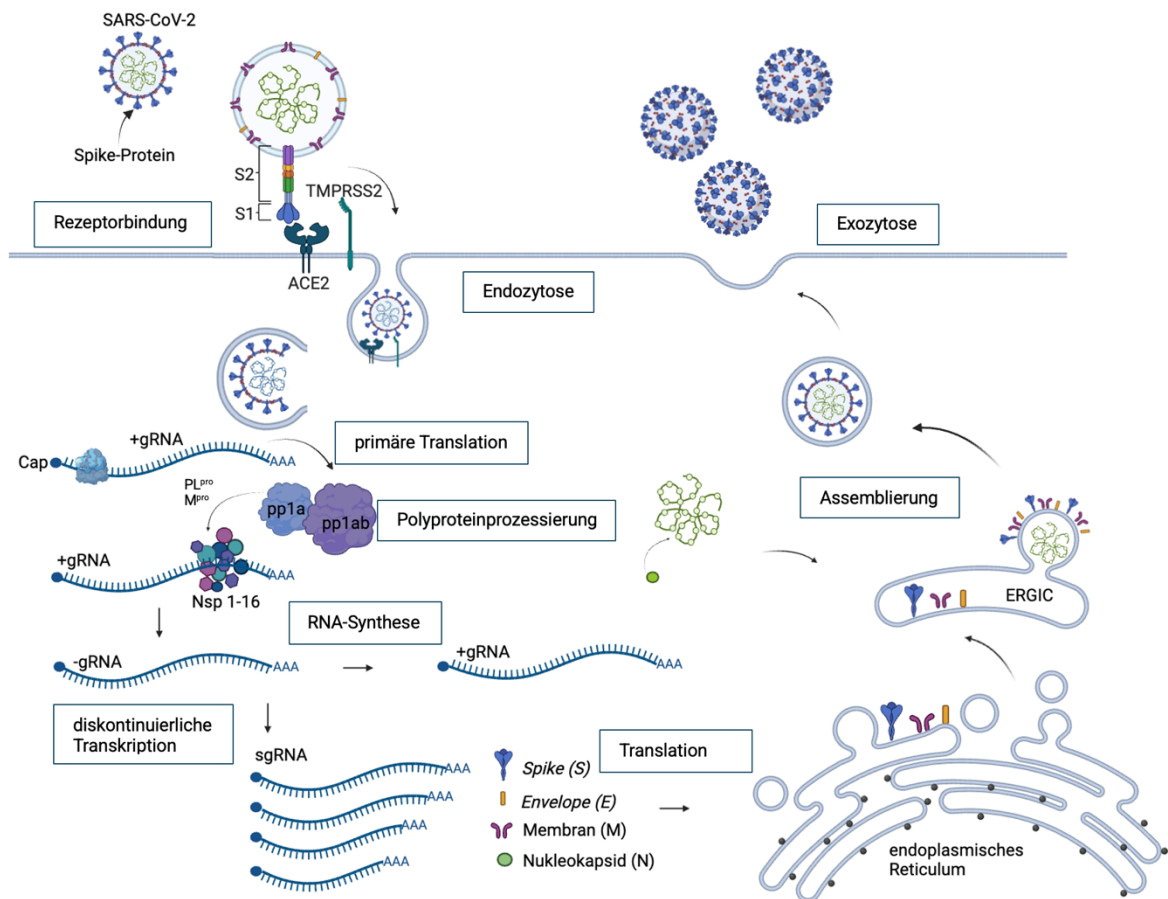


Abbildung 1.6 Replikationszyklus von SARS-CoV-2. Dargestellt ist der Replikationszyklus von SARS-CoV-2 von der Bindung des Viruspartikels an den Angiotensin-Converting-Enzyme-2 (ACE2) Rezeptor bis zur Exozytose der Virionen. S1 und S2: Untereinheiten des Spike-Proteins; +/- gRNA: positiv/ negativ polarisierte genomische-RNA; TMPRSS2: *transmembrane protease serine subtype 2*; sgRNA: subgenomische-RNA; Nsp: *non-structural proteins*; pp1a/pp1ab: Polyprotein 1a und 1ab; PL^{pro}: *papain-like protease*; M^{pro}: *Main protease*; S: Spike; E: *Envelope*; M: Membran; N: Nukleokapsid.

1.1.3.1 Subgenomische-RNA

Eine charakteristische Eigenschaft der Coronaviren ist die Synthese subgenomischer-RNA (sgRNA). Diese machen 55 % der gRNA-Kopien bzw. 36 % der gesamten viralen RNA in einem akut infizierten SARS-CoV-2-Patienten aus (Wölfel *et al.*, 2020). Die Synthese der sgRNA erfolgt simultan zur gRNA durch den RTC mittels diskontinuierlicher Transkription. Hierbei spielt die transkriptionsregulatorische Sequenz der *Leaderregion* (TRS-L) eine zentrale Rolle (Sawicki *et al.*, 2007). Diese befindet sich an Position 70 – 75 der 5'-UTR und weist die konservierte Sequenzabfolge ACGAAC, die als *core sequence* (CS) bezeichnet wird, auf (Wang *et al.*, 2021). Zusätzlich ist die TRS-B Region, wobei B für *Body* steht, involviert. Diese TRS-B ist jedem Gen, außer dem ORF1ab, vorangeschaltet und komplementär zur TRS-L (Y. Zhang *et al.*, 2021). Während der Minus-Strang-Synthese erfolgt die sogenannte *leader-to-body* Fusion, bei der die TRS-L mit der jeweiligen TRS-B basenpaart. Der RTC, der in 3'-5' Richtung repliziert, stoppt an der TRS-B. Diese Unterbrechung bewirkt, dass sich der RTC ablöst und das Template an die TRS-L verlagert (*template switching*), wo die Minus-Strang-

Einleitung

Synthese wieder aufgenommen wird (Y. Zhang *et al.*, 2021). Dadurch wird nur noch die *Leadersequenz* synthetisiert, die dann dem jeweiligen Gen vorangeschaltet ist. Aus diesen fusionierten Minus-Strängen werden positiv polarisierte sgRNAs transkribiert (Kim *et al.*, 2020).

Nach der Synthese werden die sgRNAs durch Membranporen in das Zytosol transportiert (Cortese *et al.*, 2020) und zu den Strukturproteinen sowie akzessorischen Proteinen translatiert (Manfredonia and Incarnato, 2021).

Ein wesentliches Element der sgRNA-Synthese ist das N-Protein, welches eine RNA-Chaperon-Aktivität besitzt, die das *Template-Switching* *in-vitro* antreibt und möglicherweise auch das *Template-Switching* während der Transkription des Coronavirus erleichtert (Zúñiga *et al.*, 2010). Zudem ermöglicht sie, nach Assoziation einer Helikase, die Synthese von längeren sgRNAs oder der gRNA, indem sie das Durchlesen des Templates vereinfacht (Wu *et al.*, 2009).

1.1.4 Wirkstoffe gegen SARS-CoV-2

Zur Eindämmung der COVID-19-Pandemie wurden verschiedene Maßnahmen unternommen, darunter die schnelle Entwicklung von Impfstoffen, monoklonalen Antikörpern oder *small molecule antiviral drugs*. Impfstoffe gegen SARS-CoV-2, wie mRNA-basierte und vektorbasierte Impfstoffe, sind entscheidend gewesen, um die Virusausbreitung zu reduzieren und schwere Krankheitsverläufe zu verhindern (Kap. 1.1.4.1) (Mohamed *et al.*, 2022). Für immungeschwächte Personen sind monoklonale Antikörper eine alternative Behandlungsmöglichkeit gewesen, indem sie spezifisch das Virus neutralisierten (Kap. 1.1.4.2) (Conti *et al.*, 2021). Darüber hinaus wurden *small molecule antiviral drugs* wie Remdesivir und Paxlovid entwickelt (Kap. 1.1.4.3), die die Virusreplikation hemmen und dadurch die Behandlung von COVID-19-Patienten unterstützen (Kronenberger *et al.*, 2023; Owen *et al.*, 2021).

1.1.4.1 Impfstoffe

Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 sind ein zentrales Mittel zur Eindämmung der Virusausbreitung und zur Reduzierung der Schwere der Krankheitsverläufe. Seit Beginn der Pandemie wurde weltweit intensiv an der Entwicklung von COVID-19-Impfstoffen geforscht. Bis November 2021 wurden mehr als 20 Impfstoffe zugelassen, darunter mRNA-basierte, vektorbasierte und DNA-basierte Impfstoffe sowie solche aus inaktivierten SARS-CoV-2-Partikeln, wie BIBP-CorV (Sinopharm) und CoronaVac (Sinovac Biotech) (Mohamed *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2021). Die Klasse der mRNA-Impfstoffe wurde erstmals während der COVID-19-Pandemie eingesetzt und erhielt eine Notfallzulassung durch die FDA. Zu diesen Impfstoffen gehören mRNA-1273 von Moderna und BNT162b2 von BioNTech/Pfizer (Jackson *et al.*, 2020). Der mRNA-1273 Impfstoff ist in Lipid-Nanopartikeln (LNPs) eingekapselt und kodiert für das gesamte S-Protein des Virus (Anderson *et al.*, 2020). Zwei Wochen nach der Auffrischimpfung zeigte er eine Wirksamkeit von 100 % gegen die Alpha-Variante und 96,4 % gegen die Beta-

Einleitung

Variante (Chemaitelly *et al.*, 2021). Der BNT162b2-Impfstoff verwendet ebenfalls eine mRNA, die in LNPs eingekapselt ist und für das S-Protein kodiert, jedoch wurden zwei Prolin-Aminosäuren zur Stabilisierung und Erhöhung der Immunogenität eingefügt (Polack *et al.*, 2020). Dieser Impfstoff hat eine Wirksamkeit von jeweils 94 % und 88 % gegen die Alpha- und Delta-Variante (Lopez Bernal *et al.*, 2021).

Zu den nicht-replizierenden Adenovirusvektor-basierten Impfstoffen gegen SARS-CoV-2 gehören beispielsweise AZD1222/ChAdOx1 (Oxford/AstraZeneca), JNJ-78436735/AD26.COV2.S (Janssen/Johnson & Johnson) und Sputnik V (N.F. Gamaleya) (Balakrishnan, 2020; Koch *et al.*, 2020). AZD1222 enthält das S-Protein in voller Länge, ergänzt durch eine Adjuvans-Sequenz (Gewebeplasminogenaktivator) (Van Doremalen *et al.*, 2020). Nach der Auffrischungsimpfung schützt es zu jeweils 74,5 % und 10,4 % gegen die Alpha- und Beta-Variante und zu 67 % gegen die Delta-Variante (Hadj Hassine, 2022).

Die Entwicklung von SARS-CoV-2-Impfstoffen erfolgte in einem kurzen Zeitraum von 1-2 Jahren, während ein kompletter Zyklus der Impfstoffentwicklung in der Regel 10-15 Jahre benötigt. Dies birgt das Risiko unerforschter Nebenwirkungen (Sharma *et al.*, 2020). Zu den akuten Nebenwirkungen gehören Schmerzen, Rötungen und Schwellungen an der Injektionsstelle sowie den zugehörigen Lymphknoten. Systemische Nebenwirkungen umfassen Kopfschmerzen, Unwohlsein, Gelenkschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen (Mohamed *et al.*, 2022). Eine weitere Nebenwirkung, die insbesondere mit dem BNT162b2-Impfstoff in Verbindung gebracht wird, ist die Myokarditis (Shumkova *et al.*, 2021). Langzeitfolgen konnten ebenfalls beobachtet werden. Dazu zählen chronische Kopfschmerzen, das Guillain-Barre-Syndrom, venöse Sinusthrombose, transversale Myelitis, Gesichtsnervenlähmung, Small-Fiber-Neuropathie oder neu auftretende multiple Sklerose (Finsterer, 2022).

1.1.4.2 Monoklonale Antikörper

Die Wirksamkeit von SARS-CoV-2-Impfstoffen variiert zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Studien haben gezeigt, dass immungeschwächte Patienten eine signifikant reduzierte Immunantwort auf die Impfungen aufweisen. Eine alternative Behandlungsmöglichkeit für diese Patienten ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (*monoclonal antibodies*, mAbs). (Conti *et al.*, 2021; Stadler *et al.*, 2023). Hierbei handelt es sich um monovalente Antikörper, die an das gleiche Epitop binden und von einem einzigen B-Lymphozyten produziert werden. Sie werden hauptsächlich durch Hybridom-Technologie entwickelt, bei der antigenspezifische B-Lymphozyten identifiziert werden, die für ein bestimmtes Antigen spezifische Antikörper produzieren. Diese Zellen werden mit Myelomzellen zu Hybridomazellen fusioniert (Zhang, 2012) und anschließend *in-vitro* in selektivem Medium kultiviert, um schließlich Antikörper zu isolieren (Little *et al.*, 2000).

Im Rahmen der COVID-19-Pandemie wurden mAbs gegen SARS-CoV-2 erforscht und entwickelt. Zu Beginn der Pandemie wurden IgG-mAbs gegen das Spike-Protein entweder als

Einleitung

Einzelwirkstoffe oder in Kombination eingesetzt (Focosi *et al.*, 2022; Hwang *et al.*, 2022). Diese Therapieform kann jedoch verschiedene Nebenwirkungen hervorrufen, darunter Schmerzen, Blutungen, Blutergüsse der Haut, Schmerzen, Schwellungen, thrombotische Episoden, arterielle Hypertonie, Veränderungen der Herzrhythmus, verlangsamte Knochenmarksaktivität, beeinträchtigte Nierenfunktion, Durchfall, Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen, allergische Reaktionen oder Fieber (Conti *et al.*, 2021).

Ein Beispiel für einen solchen mAb ist Sotrovimab (entwickelt von GSK und Vir Biotechnology), der an die RBD des S-Proteins bindet und das Virus neutralisiert (Cathcart *et al.*, 2021). Dieser mAb wurde im Mai 2021 von der FDA für die frühe Therapie bei Patienten mit einem Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf zugelassen. Allerdings wurde die Zulassung im April 2022 widerrufen, da sich Sotrovimab gegen die Omikron-Variante als unwirksam erwiesen hat. Auch die anderen mAbs gegen SARS-CoV-2 haben ihre Zulassung verloren und werden derzeit nicht mehr eingesetzt (Focosi *et al.*, 2022).

1.1.4.3 *Small molecule antiviral drugs*

Small molecule antiviral drugs (small molecules) werden in großem Umfang bei der Behandlung von Krankheiten eingesetzt und bieten im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern eine größere Flexibilität bei der Bindung an Zielmoleküle, eine leichtere Zellmembranpenetration sowie die Möglichkeit der oralen Verabreichung. Zudem zeichnen sich diese Wirkstoffe durch geringere Produktionskosten und hohe Stabilität aus (Lei *et al.*, 2022; Lu *et al.*, 2021). Die herkömmliche Entwicklung solcher Wirkstoffe kann Jahrzehnte andauern. Während der COVID-19-Pandemie musste der Prozess allerdings beschleunigt werden, weshalb computergestützte Programme zur Entdeckung von Arzneimitteln an Popularität und Erfolg gewonnen haben. Diese Programme nutzen „Molekulardynamiksimulationen“, um wirksame Moleküle anhand der Zielstrukturen vor ihrer Synthese vorherzusagen (Gahtori *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2018). Darüber hinaus wurden bestehende *small molecules*, die sich gegen andere virale Erkrankungen als wirksam erwiesen haben, für die Behandlung von COVID-19 wiederverwendet (Lei *et al.*, 2022).

Beliebte Zielstrukturen für *small molecules* gegen SARS-CoV-2 sind insbesondere Enzyme wie die RdRp, die *main protease*, die *papain-like protease* sowie das Spike-Protein (Lei *et al.*, 2022). Ein Wirkstoff, der die RdRp als Zielstruktur hat, ist Remdesivir (Tab 1.1). Dieser hat sich als erstes Medikament gegenüber SARS-CoV-2 als wirksam erwiesen und erhielt am 1. Mai 2020 eine Notfallzulassung von der FDA zur Behandlung von COVID-19-Patienten (Kronenberger *et al.*, 2023). Ursprünglich wurde Remdesivir zur Behandlung der Ebola-Virusinfektion entwickelt (Santoro and Carafoli, 2021). Es handelt es sich um ein von Gilead Scientific entwickeltes Nukleosidanalogen, welches mit ATP um die Inkorporation in die RNA konkurriert und die virale RdRp hemmt, wodurch die RNA-Transkription gestoppt und die virale RNA-Replikation reduziert wird (Pashaei, 2021). Remdesivir kann die Infektionsdauer

Einleitung

bei Patienten mit schwerem COVID-19 verkürzen, erhöht jedoch die Überlebensrate nicht signifikant (Grein *et al.*, 2020).

Die bisher am besten charakterisierte Zielstruktur von SARS-CoV-2 ist die *main protease*. Die Kristallstruktur wurde von mehreren Forschungsgruppen ermittelt, um molekulare Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Protein und Liganden zu gewinnen, die zur Entwicklung neuer *small molecules* beitragen (Gorbalenya *et al.*, 2000). Ein solches *small molecule* ist Nirmatrelvir von der Firma Pfizer (NMV, PF-07321332), welches als Peptidomimetikum fungiert und die Mpro inhibiert (Lamb, 2022). NMV bindet reversibel und kovalent an den katalytischen Cysteinrest (Cys145) im aktiven Zentrum der Protease (Pavan *et al.*, 2021) und zeigte eine antivirale Aktivität gegen alle VOCs (Vangeel *et al.*, 2022).

Ein weiterer Wirkstoff, der zur COVID-19 Behandlung eingesetzt wird, ist Ritonavir. Dieser ist ein potenter Inhibitor des körpereigenen Leberenzym Cytochrom CYP3A4, das an der Umwandlung von Proteaseinhibitoren wie NMV zu unwirksamen Metaboliten beteiligt ist (Shah *et al.*, 2013). Dies ermöglicht eine längere Halbwertszeit des aktiven antiviralen Metaboliten. Der am 01. März 1996 von der FDA zugelassene Wirkstoff Ritonavir wurde von Abbott Laboratories ursprünglich zur Behandlung des humanen Immundefizienzvirus (HIV) entwickelt und weist erst bei hohen Dosen Nebenwirkungen wie Übelkeit, Durchfall, Dysgeusie oder Hautausschläge auf. Daher wird er als pharmakokinetischer Verstärker in Kombination mit Proteaseinhibitoren verwendet (Beninger, 2023; Cooper *et al.*, 2003; Cozzupoli *et al.*, 2020). In Kombination mit Nirmatrelvir wird es unter dem Handelsnamen Paxlovid zur Behandlung von COVID-19 eingesetzt. Das Medikament wurde von der Firma Pfizer entwickelt (Owen *et al.*, 2021) und am 22. Dezember 2021 von der FDA für SARS-CoV-2-infizierte Hochrisikopatienten zugelassen (Lamb, 2022). Paxlovid reduzierte die Krankenhausaufenthalte und Todesfälle im Zusammenhang mit COVID-19 um 89 % (Savinkina *et al.*, 2022). Das Medikament wird oral verabreicht und kommt für fünf aufeinanderfolgende Tage im frühen Stadium der Infektion zum Einsatz (Hashemian *et al.*, 2023). Zu den Nebenwirkungen gehören Dysgeusie, Durchfall, Bluthochdruck und Myalgie (Hung *et al.*, 2022).

Tabelle 1.1 Übersicht ausgewählter *small molecules* zur Behandlung von COVID-19. Übersicht der in diesem Kapitel erwähnten *small molecules* mit ihren Zielstrukturen, dem Zulassungsdatum und Angabe des Herstellers

Wirkstoff	Zielstruktur	Zulassungsdatum	Hersteller
Remdesivir	RdRp	01.05.2020	Gilead Scientific
Nirmatrelvir	Mpro	22.12.2021	Pfizer
Ritonavir	CYP3A4	01.03.1996	Abbott Laboratories
Paxlovid	Mpro/ CYP3A4	22.12.2021	Pfizer

1.2. Strukturelle und molekulare Grundlagen der Nukleinsäurewirkstoffe

Nach *small molecules* und mAbs gehören die nukleinsäurebasierten Wirkstoffe zur drittgrößten Wirkstoffgruppe, zu der DNA- und RNA-basierte Moleküle wie Ribozyme, DNAzyme, Aptamere, micro-RNAs (miRNAs), *small-interfering* RNAs und Antisense-Oligonukleotide (ASOs) gehören (Belgrad *et al.*, 2024). Diese Wirkstoffe wurden erstmals 1998 mit der Zulassung von Fomivirsen, einem ASO zur Behandlung von Cytomegalovirus (CMV)-induzierter Retinitis, durch die FDA eingeführt (Roehr, 1998). Seitdem ist diese Wirkstoffgruppe auf mehr als 20 zugelassene Produkte, mit Hunderten von laufenden klinischen Studien weltweit, angewachsen (Belgrad *et al.*, 2024).

1981 wurden im Einzeller *Tetrahymena thermophila* RNA-Moleküle mit katalytischen Eigenschaften entdeckt, die als Ribozyme bezeichnet wurden (Cech *et al.*, 1981). Daraufhin wurden weitere katalytische RNAs in Pflanzenviren entdeckt. Dazu zählen das *Hammerhead*-Ribozym, das im *Lucerne transient streak virus* identifiziert wurde (Forster und Symons, 1987), das Haarnadel-Ribozym aus der Satelliten-RNA des *Tobacco Ringspot* Virus (Hampel *et al.*, 1990) und das Hepatitis-Delta-Ribozym aus dem Hepatitis-Delta Virus (Branch und Robertson, 1991). Diese 50–150 Nukleotide langen RNA-Moleküle können über komplementäre Sequenzen an die Ziel-mRNA durch Watson-Crick-Basenpaarung hybridisieren und diese spalten (Kashani-Sabet, 2002). Die Spaltung erfolgt durch den Angriff der 2'-Hydroxylgruppen der benachbarten Nukleotide auf die Phosphodiesterbindungen im RNA-Rückgrat, was durch die Konformationsänderung ermöglicht wird, die durch die Bindung des Ribozyms induziert wird (Doherty and Doudna, 2000).

Durch Austausch von Ribonukleotiden gegen Desoxyribonukleotide im katalytischen Zentrum des *Hammerhead*-Ribozyms wurde das erste DNAzyme entwickelt (Chartrand *et al.*, 1995). Ähnlich wie Ribozyme sind auch DNAzyme dazu in der Lage, die Ziel-mRNA über komplementäre Sequenzen zu binden und zu spalten. Da DNAzyme in der Natur nicht vorkommen, werden sie synthetisch durch SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) ausschließlich aus Desoxyribonukleotiden entwickelt, was ihre Stabilität im Vergleich zu Ribozymen erhöht (Larcher *et al.*, 2023). Vorteile von DNAzymen umfassen geringere Synthesekosten, selbstkatalytische Eigenschaften und die Fähigkeit zur mehrfachen Spaltung der Ziel-RNA über mehrere Zyklen, was niedrige Dosierungen für eine anhaltende therapeutische Wirkung ermöglichen könnte (Belter *et al.*, 2016). Trotz ihres Potenzials stehen DNAzyme vor mehreren Herausforderungen für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung; darunter begrenzte Halbwertszeit und intrazelluläre Stabilität, unzureichender Transport und Verbleib im Zielgewebe, *off-target*-Effekte, ineffiziente zelluläre Penetration sowie der Bedarf an hohen Konzentrationen endogener Cofaktoren wie Mg^{2+} und Ca^{2+} (Larcher *et al.*, 2023).

Eine weitere Klasse der nukleinsäurebasierten Wirkstoffe sind Aptamere. Diese einzelsträngigen DNA- oder RNA-Moleküle mit einer Länge von 20-100 Nukleotiden binden durch Faltung in eine dreidimensionale Konformation an Proteine und inaktivieren diese. Auch

sie werden durch das SELEX-Verfahren entwickelt (Kinghorn *et al.*, 2017). Aptamere, die auch als "chemische Antikörper" bezeichnet werden, können leicht mit einer Vielzahl von Reportern für verschiedene Anwendungen konjugiert werden. Sie dringen schnell in Gewebe ein (Sun *et al.*, 2016) und binden mit hoher Spezifität, wodurch sie zwischen Zielproteinen unterscheiden können, die ähnliche strukturelle Epitope aufweisen (Nimjee *et al.*, 2017). Im Dezember 2004 wurde *Pegaptanib* als erstes Aptamer von der FDA zugelassen (Cao *et al.*, 2023) und dient der Behandlung der Makuladegeneration. Zahlreiche andere Aptamere befinden sich im präklinischen oder klinischen Stadium (Fine *et al.*, 2005).

Eine weitere bedeutende Klasse nukleinsäurebasierter Wirkstoffe sind die *small non-coding RNAs* (sncRNAs). Diese 18-23 Nukleotide langen RNA-Moleküle kodieren nicht für Proteine, spielen jedoch eine zentrale Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, einschließlich der Genregulation, RNA-Verarbeitung und der Reaktion auf Virusinfektionen. Zu den wichtigsten sncRNAs gehören miRNAs und siRNAs (Crooke, 2008). Die miRNAs werden im Zellkern transkribiert und durch die Ribonuklease Drosha zu Haarnadel-RNAs von 70-100 Nukleotiden prozessiert (Cullen 2004). Diese Haarnadel-RNAs werden anschließend über Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert, wo sie von der Ribonuklease Dicer weiter zu reifen miRNAs geschnitten werden (Sevignani *et al.*, 2006). Etwa 3 % der Gene im menschlichen Genom besitzen komplementäre miRNAs, die entweder perfekt mit der Ziel-mRNA basenpaaren und mittels Argonaut-Proteinen zur Spaltung dieser mRNA führen, oder durch unvollständige komplementäre Bindung die Translation hemmen (Lim *et al.*, 2005).

Besonders vielversprechend unter den nukleinsäurebasierten Wirkstoffen sind jedoch ASOs und siRNAs. Hierbei handelt es sich jeweils um einzelsträngige DNA-Moleküle und doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 18-23 Nukleotiden, die beide spezifisch auf mRNAs als Zielsequenzen abzielen (Crooke, 2008).

1.2.1 mRNA als Zielsequenz für nukleinsäurebasierte Wirkstoffe

Die meisten nukleinsäurebasierten Wirkstoffe, einschließlich ASOs und siRNAs, zielen auf mRNAs ab. Das *Annealing* dieser Wirkstoffe an ihre Zielsequenzen wird hauptsächlich von der lokalen Sekundärstruktur beeinflusst (Patzel *et al.*, 1999). Als zugängliche Bereiche und damit Zielregionen auf der mRNA gelten typischerweise die längsten und hoch konservierten konsekutiv ungepaarten Sequenzelemente (Overhoff *et al.*, 2005). Solche Bereiche befinden sich zum Beispiel in Ausbuchtungen (*bulges*), Verbindungsstellen (*joint sequences*) oder terminalen Bereichen und sollten eine Länge von mindestens acht bis zehn Nukleotiden aufweisen (Far *et al.*, 2004a; Patzel *et al.*, 1997). Sequenzabschnitte, die nicht an intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind und nicht zu starren Strukturelementen wie *Tetra-Loops* oder *Stem-Loops* gehören, sind ebenfalls günstige lokale Zielsequenzen, insbesondere wenn die *Loop*-Länge mindestens 10 Nukleotide umfasst (Uhlenbeck, 1990). Weiterhin wurde gezeigt, dass ein GGA-Motiv in der Zielsequenz und damit eine komplementäre TCCC-Sequenz im ASO im Zusammenhang mit einer hohen

Einleitung

Wirksamkeit steht (Tu *et al.*, 1998). Ribopurin-reiche Abschnitte innerhalb der Zielsequenz können DNA-RNA-Heteroduplices stabilisieren und sind daher ebenfalls günstige Zielregionen (Ratmeyer *et al.*, 1994).

Lokale Zielstrukturen aus ungepaarten Bereichen, die sich mit computergestützten Analysen konsistent vorhersagen lassen und häufig in Strukturen mit der niedrigsten Enthalpie zu finden sind, werden in der Regel ausgewählt, um komplementäre Nukleinsäurewirkstoffe zu entwerfen. In Bezug auf die Duplexbildung zwischen Wirkstoff und Zielsequenz wurde gezeigt, dass sowohl kinetische als auch thermodynamische Parameter, wie die schnelle Assoziation komplementärer Nukleinsäuren, mit dem Ausmaß der Hemmung korrelieren und direkt günstige lokale Ziel-RNA-Strukturen widerspiegeln (Far *et al.*, 2001).

1.2.2 Antisense-Oligonukleotide

Im Jahr 1978 beschrieben P.C. Zamecnik and M.L. Stephenson zum ersten Mal Antisense-Oligonukleotide als spezifische Inhibitoren der Genexpression in Zellkulturexperimenten. Diese ASOs waren gegen die 35S-RNA des Rous-Sarkom-Virus gerichtet (Stephenson and Zamecnik, 1978). ASOs sind einzelsträngige DNA-Moleküle mit einer Länge von 12-28 Nukleotiden, die spezifisch an komplementäre Ziel-mRNA-Sequenzen über Watson-Crick-Basenpaarung hybridisieren (Klebe, 2009). Die Bindung an die Zielsequenz kann drei mögliche Wirkungen erzielen: Hemmung der Translation durch sterische Blockade der Ribosomen, Rekrutierung der RNase H1 zur Spaltung des DNA/RNA-Duplexes und Abbau der RNA sowie Modulation oder Inhibition des Spleißens der pre-mRNA (Garcia and Burkle, 2018).

RNase H1 ist ein Protein mit einer Masse von 32 kDa und besteht aus 286 Aminosäuren (AS) (Wu *et al.*, 1998). Es ist in drei Domänen unterteilt: die RNA-Bindungsdomäne am N-Terminus (73 AS), die konservierte katalytische Domäne am C-Terminus (151 AS) und eine Spacerregion (62 AS) (Wu *et al.*, 2001). RNase H1 spielt eine wichtige Rolle in der Genregulation sowie in der Replikation mitochondrialer DNA und liegt daher reichlich in Zellen vor (Reyes *et al.*, 2019). Sie ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden und beteiligt sich an der ASO-Aktivität, indem sie den DNA/RNA-Duplex erkennt und spaltet (Crooke, 2017). Hierbei zeigt sie eine starke Positionspräferenz und spaltet zwischen 8 und 12 Nukleotide vom 5'-RNA-3'-DNA-Terminus des Duplexes (Lima *et al.*, 2001).

Verschiedene Faktoren können die Effizienz von ASOs als Inhibitoren optimieren. Dazu gehören leichte chemische Herstellbarkeit, ausreichende *in-vivo*-Stabilität, gute Membranpermeabilität und Verteilung im Organismus, ausreichende intrazelluläre Halbwertszeit, sequenzspezifische Hybridisierung mit der mRNA, wenige *off-target*-Effekte und Nukleasestabilität (Klebe, 2009).

Die Halbwertszeit von unmodifizierten Oligonukleotiden wird in den meisten Zellen auf etwa 20 Minuten geschätzt. Durch ihr polares und mehrfach negativ geladenes Zuckerphosphatgerüst ist das Passieren durch die Zellmembran erschwert. Daher ist es sinnvoll, Oligonukleotide in eine nukleaseresistente Form zu überführen und die negative Ladung des

Einleitung

Zuckerphosphatgerüsts zu neutralisieren (Kashihara *et al.*, 1998). Um die Stabilität von Oligonukleotiden zu verbessern können die Phosphodiesterbindungen modifiziert werden, indem ein Sauerstoffatom in der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt wird. Die entstandenen Phosphorothioate (PSs) weisen eine höhere Stabilität gegenüber Nukleasen auf, sind einfacher zu synthetisieren und tragen eine schwächere negative Ladung, sodass sie membranpermeabler werden und ladungsbezogene *off-target*-Effekte reduziert werden. Diese Modifikation verringert jedoch die Komplexierungseffizienz mit der Ziel-mRNA (Gao *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995).

Zusätzlich wird der 2'-OH-Rest der Ribose häufig modifiziert, indem das Wasserstoffatom durch eine Methyl- (OMe) oder Methoxyethyl (MOE) -Gruppe ersetzt wird. Die 2'-O-Methylierung der Ribose verringert die Toxizität und erhöht die Stabilität gegen RNasen (Yoo, 2004). Die 2'-MOE Modifizierung reduziert zudem das proinflammatorische Potential der ASOs (Crooke, 2008). Eine weitere Stabilitätsverbesserung wird durch die Bildung eines zyklischen Ethers zwischen dem 2'-OH-Rest der Ribose und dem C4-Atom des Riboserings erreicht, welches zur Bildung eines *Locked Nucleic Acid* (LNA) führt (Kurreck, 2002). Der Austausch des Zuckerphosphatgerüsts durch einen Oligoglycinstrang zur Bildung von Peptidnukleinsäuren bietet eine hohe biologische Stabilität, gute Komplexierung mit der Ziel-mRNA und geringe Toxizität, jedoch eine schlechte Löslichkeit und damit ein Problem bei der zellulären Aufnahme (Klebe, 2009).

Eine häufig verwendete Form der ASOs sind Gapmere, die aus einem internen Bereich auf DNA-Basis und aus RNA-ähnlichen flankierenden Regionen bestehen, die häufig eine 2'-O-Methylierung oder LNA-Modifizierungen aufweisen. Sie binden mit hoher Affinität an ihre Zieltranskripte und sind gegen Nukleasen geschützt (Roberts *et al.*, 2020).

ASOs werden in der Regel in Liposomen verpackt und über intravenöse Injektion oder über Inhalation verabreicht (Burbano *et al.*, 2022; Mainelis *et al.*, 2013). Nach der Internalisierung durch Endozytose akkumulieren die Oligonukleotide in Endosomen und Lysosomen, von wo aus sie in das Zytoplasma und anschließend durch passive Diffusion durch die Kernporen in den Zellkern gelangen (Kashihara *et al.*, 1998).

Studien haben gezeigt, dass eine besonders hohe zelluläre Aufnahme der ASOs erreicht werden kann, wenn diese in Lipidnanopartikeln (LNPs) verpackt werden (Akinc *et al.*, 2019a). LNPs sind kugelförmige Vesikel im Nanometerbereich, die aus einem oder mehreren ionisierbaren Lipiden bestehen. Sie fusionieren mit der Zellmembran und werden über Endozytose aufgenommen (Van Meer *et al.*, 2008). Enthalten die LNPs Cholesterin, können sie *low-density lipoprotein receptor*-abhängig internalisiert werden (C. Zhang *et al.*, 2022). LNPs sind bei niedrigem pH-Wert positiv geladen, um die Bindung der Nukleinsäuren zu ermöglichen und werden bei physiologischem pH-Wert neutral, wodurch Toxizität verhindert wird. (Žak and Zangi, 2021). Zusätzlich enthalten LNPs tertiäre Amine, die bei saurem pH-Wert, wie er in Endosomen vorliegt, positiv geladen sind und zur Destabilisierung der Membran und damit zur Freilassung der ASOs führen (Akita *et al.*, 2013). Das erste LNP-Nukleinsäuretherapeutikum war Patisiran, ein siRNA-basierter Wirkstoff zur Behandlung von Transthyretin-vermittelten

Einleitung

Amyloidose, das 2018 von der FDA zugelassen wurde. Zwei Jahre später wurden die mRNA-Moleküle der Impfstoffe BNT162b2 and mRNA-1273 (Kap. 1.1.4.1) in LNPs verpackt und ebenfalls von der FDA zugelassen (Akinc *et al.*, 2019b).

Ein Beispiel zur Behandlung von genetischen Erkrankungen mit ASOs ist Eteplirsen, das als Therapeutikum von Duchenne-Muskeldystrophie eingesetzt wird (McDonald *et al.*, 2021). Auch in der Behandlung von Krebserkrankungen werden Oligonukleotide zur Eindämmung der Angiogenese oder Onkogenexpression genutzt (Charbe *et al.*, 2020). Darüber hinaus werden oligonukleotid-basierte Wirkstoffe neben der Anwendung zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Huntington (Amiri *et al.*, 2021), zur Inhibition der viralen Genexpression eingesetzt. Beispiele dafür sind der Einsatz von siRNAs gegen HIV, Hepatitis C-Virus oder akute Pandemien wie SARS-CoV-2 (Bobbin *et al.*, 2015; Braga *et al.*, 2017; Tolksdorf *et al.*, 2021)

1.2.3 *Small-interfering RNA*

Die RNA-Interferenz ist ein Prozess, bei dem die Ziel-mRNAs spezifisch gebunden und abgebaut werden, was zur Unterdrückung der Genexpression führt (Lam *et al.*, 2015). Dieser Mechanismus wurde 1998 in *Caenorhabditis elegans* als ein natürlicher Abwehrmechanismus gegen fremde Nukleinsäuren und zur Kontrolle der Genexpression entdeckt (Fire *et al.*, 1998). *Small-interfering RNAs* sind doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 18 bis 25 Nukleotiden (Yeung *et al.*, 2005). Sie bestehen aus einem *guide*-Strang (*antisense*), einem *passenger*-Strang (*sense*), einer *seed*-Region sowie jeweils 2 Nukleotid Überhangen an den 3' Enden (Alshaer *et al.*, 2021). Die *seed*-Region umfasst die Nukleotide 2 bis 8 am 5'-Ende des *guide*-Strangs und spielt eine Schlüsselrolle bei der Erkennung und Bindung der Ziel-mRNAs (Kobayashi *et al.*, 2022).

Nach der Einschleusung eines siRNA-Duplexes in eine Zelle wird dieser durch den RISC (*RNA-induced silencing complex*)-loading complex (RLC), bestehend aus dem Argonaut-Protein (AGO), der Ribonuklease Dicer und dem TAR RNA-bindenden Protein (TRBP), in das Argonaut-Protein geladen (Hammond *et al.*, 2001; MacRae *et al.*, 2008). Hierbei wird der RNA-Duplex entwunden, wobei der *guide*-Strang auf dem AGO-Protein verbleibt und der *passenger*-Strang abgebaut wird. Dies führt zur Bildung des reifen RISC (Yoda *et al.*, 2010). Welcher Strang abgebaut wird, hängt von der Nukleotidsequenz ab, wobei der siRNA-Strang, dessen 5'-Ende schwächer an den komplementären Strang gebunden ist und damit einen geringen GC-Anteil besitzt, bevorzugt in den RISC eingebaut wird (MacRae *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2003). In humanen Zellen ist Argonaut 2 (Ago2) das einzige siRNA-gesteuerte Argonautprotein, das als Mg²⁺-abhängige RNA-Endonuklease fungiert und eine einzelne Phosphodiesterbindung in der Ziel-RNA spaltet, wodurch deren Degradation eingeleitet wird (Matranga *et al.*, 2005). Der *guide*-Strang erkennt die Ziel-mRNA mit perfekter Sequenzkomplementarität, wobei die höchste Effizienz erzielt wird, wenn sich an Position 10 des *passenger*-Strangs eine Uridinbase befindet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass RISC die

Einleitung

Ziel-mRNA bevorzugt zwischen den Nukleotiden 10 und 11 spaltet, insbesondere 3' von Uridin (Friedrich and Aigner, 2022; Liu *et al.*, 2004).

Ähnlich wie ASOs sind siRNAs negativ geladene Makromoleküle, die anfällig für den Abbau durch Nukleasen sind und eine schlechte Membranpermeabilität aufweisen. Zum Schutz und zur Einschleusung der siRNA in Zellen werden siRNAs häufig modifiziert, beispielsweise durch Phosphorothioatgruppen. Weiterhin werden Trägersysteme wie Nanocarrier, Aptamere oder Antikörper entwickelt (Subhan and Torchilin, 2020). Die 2'-OH-Gruppe der Ribose, die für die siRNA-Aktivität nicht essentiell ist, bietet eine bevorzugte Stelle für Modifikationen wie 2'-OMe oder 2'-MOE (Kap. 1.2.2), welche die Bindungsaffinität sowie die Nuklease-Resistenz der siRNA erhöhen (S. Y. Wu *et al.*, 2014). Auch der Einsatz von LNA verbessert die Affinität an die Ziel-mRNA und verringert den immunostimulatorischen Effekt (Freier and Altmann, 1997; Hornung *et al.*, 2005). Da LNAs eine hohe Dosis eingekapselter siRNAs mit häufigen Verabreichungen erfordern, wurden sie weitgehend durch die N-Acetylgalactosamin (GalNAc)-Technologie ersetzt. Dabei wird ein GalNAc Trimer an die siRNA konjugiert, das den Asialoglykoprotein-Rezeptor stark bindet, welcher hauptsächlich in Leberhepatozyten vorkommt. Daher wird diese Methode vor allem bei leberbasierten Krankheiten durch subkutane Verabreichung eingesetzt.

1.3 Aufgabenstellung

Die Verwendung synthetischer Wirkstoffe wie ASOs oder siRNAs zur Regulation der Genexpression stellt einen vielversprechenden Ansatz in der medizinischen Forschung dar. Sie ermöglicht grundlegende Fortschritte in der Behandlung genetischer Erkrankungen sowie bei der Bekämpfung von Infektionen. Oligonukleotide bieten den Vorteil, sequenzspezifisch an zugängliche mRNA-Zielstrukturen zu binden und deren Expression zu beeinflussen. Aufgrund der schnellen, kosteneffizienten Entwicklung, einfachen Herstellung, breiten Anwendbarkeit und flexiblen Modifizierbarkeit dieser Wirkstoffe stellen sie ein attraktives Werkzeug im Einsatz gegen Infektionserkrankungen dar (Chen *et al.*, 2018; Kurreck, 2003). Daher wird dieser alternative antivirale Ansatz auch für die virale Infektionserkrankung SARS-CoV-2 erprobt. Das Ziel dieser Arbeit ist die zielstrukturbasierte Entwicklung von potenten oligonukleotidbasierten Wirkstoffen gegen die virale mRNA von SARS-CoV-2.

Im ersten Teil der Arbeit liegt der Fokus auf der Identifizierung der Sequenzen dieser Oligonukleotide. Dazu soll mittels *in-silico* Verfahren zunächst die Konservierung der 5'-UTR in den mutierten Varianten untersucht werden, um anschließend die Sekundärstruktur dieser Zielregion zu generieren und zu analysieren. Basierend auf diesen Analysen besteht das nächste Ziel in der Identifizierung zugänglicher Zielsequenzen und dem Design von ASOs nach etablierten Kriterien (Kap. 3.3).

Im experimentellen Teil der Arbeit wird zunächst eine Selektion der ASOs auf Proteinebene vorgenommen. Aus den effizientesten Hemmstoffen werden die ASOs ausgewählt, die eine Dosisabhängigkeit aufweisen. Auf Basis dieser ASOs werden siRNAs generiert und anhand

Einleitung

etablierter Kriterien (Kap. 3.4.2) untersucht. Weiterhin sollte der Wirkmechanismus sowohl für die ASOs als auch für die siRNAs mittels Modifikationen und RT-qPCR Analysen untersucht werden. Zudem soll die Frage nach der Wirksamkeit in Bezug auf Punktmutationen, die im viralen System immer wieder auftreten können, geklärt werden. Dazu wird die Wirksamkeit der Oligonukleotide mit der von modifizierten ASO und siRNA-Varianten verglichen.

Nach der Etablierung der Oligonukleotide im Plasmidsystem wird die Fragestellung behandelt, ob diese Oligonukleotide auch in einem viralen Replikonsystem wirksam sind. Dazu wird das pHybrid-Replikon (Abb. 6.8) eingesetzt, das neben der 5'-UTR von SARS-CoV-1 zusätzliche virale Gensequenzen, einschließlich der RdRp, enthält und dem System eine selbstreplizierende Eigenschaft verleiht (Kap. 3.5). Dieses virale Replikonsystem soll dafür zunächst auf seine Transfektionseffizienz und den Einfluss seines Promoters untersucht werden. Auf Grundlage dieser Daten kann die Wirksamkeit der Oligonukleotide anschließend auf der Protein- und RNA-Ebene analysiert werden. Ein weiteres Ziel ist es, die potenten Oligonukleotide mit *small molecules* zu kombinieren, um zu prüfen, ob dies einen positiven Einfluss auf die Hemmwirkung beider Inhibitorklassen sowie auf die Dosisabhängigkeit der Oligonukleotide hat. Weiterhin wird die Zeitabhängigkeit der Kombination sowie der Einfluss von Mutationen in Mpro auf die kombinierte Hemmwirkung untersucht.

Schließlich wird die Überprüfung, ob die in dieser Arbeit etablierten Kriterien zur effektiven Generierung von Oligonukleotiden auf andere Viren anwendbar sind, erforderlich, sodass ASOs gegen eine ausgewählte Zielregion im West-Nil-Virus entwickelt werden sollen.

Zudem wird in einem Exkurs, zum besseren Verständnis des Translationsmechanismus, der Einfluss einer Mutation im Startcodon des uORFs untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind die Firmensitze der Material- und Gerätehersteller zusammenfassend aufgeführt und werden im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr angegeben.

- A Abcr (Karlsruhe, D); Air Liquide (Düsseldorf, D); AppliChem (Darmstadt, D), August Sauter GmbH (Ebingen, D)
- B Beckman Coulter (Brea, CA, USA); Becton Dickinson (East Rutherford, NJ, USA); Binder (Hameln, D); Biometra (Göttingen, D); Biolabproducts (Bebensee, D); Bio-Rad (Hercules, CA, USA), Biozym (Hessisch-Oldendorf); BMG Labtech (Ortenber, D); Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, D)
- C Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund, D); Carl Roth (Karlsruhe, D); Chemsolute (Renningen, D)
- D DSMZ (Braunschweig, D)
- E Eppendorf (Hamburg, D); Epson (Meerbusch, D); Eurofins (Ebersberg, D); Evoqua (Günzburg, D)
- F Fackelmann (Hersbruck, D); Feather (Osaka, Japan); Forma Scientific (Marietta, GA, USA)
- G GE Healthcare (München, D); Genetic Computer Group (Oakland, CA, USA); Gerhardt (Königswinter, D); Gilson (Middleton, WI, USA); Greiner Bio-one (Frickenhausen, D); GSL Biotech LLC (Chicago, IL, USA)
- H Hartmann (Heidenheim an der Brenz, D); Heidolph Instruments (Schwabach, D); Heraeus (Hanau, D); Hettich (Tuttlingen, D)
- I IKA-Labortechnik (Staufen, D); Infors (Bottmingen, CHE); Institut für Molekulare Medizin (Lübeck, D); Integra Biosciences (Zizers, CHE)
- K Kern & Sohn (Balingen-Frommern, D); KnF Neuberger (Freiburg, D); Korff AG (Oberbipp, CHE)
- L Labortechnik Medingen (Arnsdorf, D); Liebherr (Bulle FR, CHE); Lonza (Basel, CHE)
- M Macherey-Nagel (Düren, D); Marienfeld-Superior (Lauda-Königshofen, D); Meditrade (Kiefersfelden, D); Merck (Darmstadt, D); Metabion (Planegg, D); Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA); Minerva Biolabs (Berlin, D); Molecular Bioproducts (San Diego, CA, USA); Molecular Dynamics (Caesarea, IL, USA)
- N NCBI (Rockville Pike, MD, USA); Nerbe (Winsen/Luhe, D); New England Biolabs (Frankfurt a. M., D); Nimagen (Nijmegen, NL)
- P PAN Biotech (Aidenbach, D); Phase (Lübeck, D); Pharmacia Biotech (Freiburg, D); Promega (Madison, WI, USA)
- Q Qiagen (Hilden, D); Quickpack (Renningen, D)
- R Roche (Basel, CH)

Material und Methoden

- S Sarstedt (Nürmbrecht, D); Sartorius (Göttingen, D); Schott (Mainz, D); Scotsman (Vernon Hills, IL, USA); Serva (Heidelberg, D); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Starlab (Hamburg, D); Systec (Linden, D)
- T Techne (Staffordshire, UK); Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- U University at Albany (Albany, NY, USA); University of California-Davis (Davis, CA, USA)
- V Vacuubrand (Wertheim, D); Vilber Lourmat (Eberharzell, D)
- W Whatman (Maidstone, UK), Werner Hassa GmbH (Lübeck, D)
- Z Zeiss (Jena, D)

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1 Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
ABI PRISM Genetic Analyzer 3130	Thermo Fisher Scientific
ABI PRISM 7900HT	Thermo Fisher Scientific
Agarose-Gelelektrophorese Sub-Cell® GT	Biometra
AirClean® 600 PCR-Workstation	Starlab
Autoklav V-65	Systec
Autoklav VX-95	Systec
Brutschrank Function Line	Heraeus
CLARIOstar Plus	BMG Labtech
CO ₂ -Inkubator Forma Series II Water Jacket	Thermo Fisher Scientific
Edelstahlbehälter	Carl Roth
Eismaschine Scotsman AF 100	Scotsman
Elektrophorese Netzteil Power Supply EPS 3500	Pharmacia Biotech
Elektrophorese Netzteil PowerPac 300	Bio-Rad
explosionsgeschützter Kühlschrank	Liebherr
Feinwaage ALJ 220-5 DNM	Kern & Sohn
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M (HBO 100)	Zeiss
Gefrierschrank -80°C	Forma Scientific
Gefrierschrank -G5216	Liebherr
Geldokumentation Variocam	Phase
Gelkammer Agarosegele Sub-Cell GT	Bio-Rad
Glaswaren	Schott
Heizblock Techne DRI-Block DB 2D	Werner Hassa GmbH
Heizschrank	Heraeus
Kreisschüttler KS250 basic	IKA Labortechnik
Kreisschüttler vibrax vxr basic	IKA Labortechnik
Kühlschrank GSL1801	Bosch

Material und Methoden

Kühlschrank KGE 3417	Bosch
Magnetheizrührer IKA-Combimag RCT	IKA Labortechnik
Membranpumpe	Vacuubrand
Mikroskop Axiowert 25	Zeiss
Mikrowelle	Bosch
Multikanalpipette (10-200µl)	Thermo Fisher Scientific
NALGENE Cryo 1°C Freezing Container	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior
PAA-Gelelektrophoresesystem	Biometra
PCR-Block UNO II	Biometra
pH-Meter Lab 850	Schott
Pipettensatz (10, 20, 100, 200 1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Reinstwasseranlage	Evoqua
Scanner Epson Perfection 2580 Photo	Epson
Schüttelinkubator HT	Infors
Schüttler Vibrofix VFI	IKA Labortechnik
schwenkende Plattform Polymax 1040	Heidolph Instruments
schwenkende Plattform WT 16	Biometra
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	VWR
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus
Stickstofftank GT140	Air Liquide
Thermoblock T Gradient	Biometra
Thermomix 5436	Eppendorf
Thermoshake laboshake	Gerhardt
Tischzentrifuge Combi-Spin FVL-2400	Biosan
Trockenschrank	Heraeus
Typhoon FLA 9500 GE	GE Healthcare
UV-Tisch TFX-35M	Vilber Lourmat
Vakuumpume Laboport®	KnF Neuberger
Vortex-Genie 2	Merck
Waage D-7470	August Sauter GmbH
Waage Sartorius 2354	Sartorius
Wasserbad W22	Labortechnik Medingen
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge 5702	Eppendorf
Zentrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter

Zentrifuge Universal 320

Hettich

2.1.2 Verbrauchsmaterialien**Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Hersteller
24-Well-Platte farblos	Sarstedt
96-Well-Platte weiß	Greiner Bio-one
396-Well-Platte farblos	Biolabproducts
Alufolie	Korff AG
Einmalhandschuhe Nitril	Hartmann
Einmalhandschuhe Vinyl 2000 PF	Meditrade
Einmalspritzen BD Discardit™ (10, 50 ml)	Becton Dickinson
Falcon-Röhrchen (15 ml/ 50 ml)	Greiner Bio-one
Filterpapier	Whatman
Frischhaltefolie	Quickpack
Kryo-Röhrchen 1,5 ml	Sarstedt
<i>MasterClear</i> real-time PCR Film	Eppendorf
NucleoSEQ-Säulen	Macherey-Nagel
Parafilm® M	Thermo Fisher Scientific
PCR-Röhrchen 8er-Strips, 0,2 ml	Sarstedt
Petrischalen (10 cm)	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter (10, 100, 200 1000 µl)	Nerbe
Pipettenspitzen ohne Filter (100, 200 1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen ohne Filter (10 µl)	Molecular Bioproducts
Reaktionsgefäße 1,5 ml/ 2 ml/ 5 ml	Eppendorf
Serologische Einwegpipetten	Greiner Bio-one
Skalpell	Feather
Spitzenvorsatzfilter 0,2 µM	Sartorius
Vernichtungsbeutel	Sarstedt
Zahnstoßer	Fackelmann
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
α , α , α -TRIS-(hydroxymethyl)-methylamin (TRIS)	Carl Roth
Adenosine 5' triphosphat (ATP)	Serva
Agarose	Serva
Agarose LE	Biozym
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Carl Roth
Borsäure	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA, Albumin Fraktion V)	Serva
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Chloroform	Sigma-Aldrich
Coelenterazine (nativ)	Promega
Coenzym A	Sigma-Aldrich
D-Luciferin-Natriumsalz	AppliChem
DEPC	AppliChem
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix	Thermo Fischer Scientific
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Ethanol > 99,8%	Merck
Ethanol, vergällt	Chemsolute
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Titriplex III	Sigma-Aldrich
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Formamid 99,5 %, deionisiert	Carl Roth
Geneticin (G418)	Capricorn Scientific
Glukose	Merck
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth
Glyglycin	Abcr
Harnstoff	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
Hi-Di Formamid	Thermo Fisher Scientific
Hoechst 33258	Sigma

Material und Methoden

Isopropanol	Thermo Fisher Scientific
Kaliumacetat	Carl Roth
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydroxid	Merck
Natriumiodid	Merck
<i>Passive Lysis Buffer (5x)</i>	Promega
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Poly-D-Lysin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich
<i>Qiazol Lysis Reagent</i>	Qiagen
<i>RNA-Loading Dye (2x)</i>	New England Biolabs
ROTIPHORESE [®] NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1 v/v)	Carl Roth
Salzsäure 32 %	Merck
Stains-All	Sigma-Aldrich
SYBR-Gold (10.000-fach Konzentrat in DMSO)	Thermo Fisher Scientific
Tricine	Sigma
Trypanblau	Serva
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth
Xylencyanol	Sigma-Aldrich

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die folgenden Lösungen und Puffer wurden mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Evoqua) angesetzt. Die Einstellung der pH-Werte wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Die Puffer für die Luciferase-Assays wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

Tabelle 2.4 Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Bestandteile	Menge
DNA-Ladepuffer für Agarosegele (5x, pH 8,5)	Glycerin	50 % (v/v)
	TAE	5x
	BPB	0,05 % (w/v)
	XC	0,05 % (w/v)
Elektrophoresepuffer für DNA-Agarosegele	TAE-Puffer, pH 8,5	1x
Elektrophoresepuffer für RNA-Agarosegele und PAA-Gele	TBE-Puffer, pH 8,3	1x
FDA-Gebrauchslösung	FDA in Tricine-NaCl-Puffer (pH 7,8)	40 μ M
FDA-Stocklösung	FDA in DMSO	10 mM
Firefly-Assaypuffer	Glyglycin	25 mM
	Kaliumphosphatpuffer (pH 8)	15 mM
	MgSO ₄	15 mM
	EGTA	4 mM
	ATP	2 mM
	DTT	1 mM
	Coenzym A	0,1 mM
	D-Luciferin	75 μ M
Hybridisierungspuffer (5x, pH 7,4)	Kaliumacetat	250 mM
	HEPES	75 mM
	Magnesiumacetat-Tetrahydrat	5 mM
Kaliumphosphatpuffer (pH 5,7)	K ₂ HPO ₄	65 % (v/v)
	KH ₂ PO ₄	35 % (v/v)

Material und Methoden

Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0)	KH ₂ PO ₄	53 % (v/v)
	K ₂ HPO ₄	47 % (v/v)
PAA-Lösung, denaturierend (15 %)	Acrylamid/ bis-Polyacrylamid (19:1, v/v)	15 % (v/v)
	Harnstoff	8 M
	TBE	1x
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
PAA-Lösung, nativ (15 %)	Acrylamid/ bis-Polyacrylamid (19:1, v/v)	15 % (v/v)
	TBE	1x
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
PAA-Lösung, semi-denaturierend (15 %)	Acrylamid/ bis-Polyacrylamid (19:1, v/v)	15 % (v/v)
	Harnstoff	4 M
	TBE	1x
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, 1x; pH 7,4)	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄ • H ₂ O	8 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Kaliumphosphatpuffer für TB- Medium	KH ₂ PO ₄	170 mM
	K ₂ HPO ₄	720 mM
Renilla-Assaypuffer	NaCl	1,1 M
	Kaliumphosphatpuffer (pH 5,7)	220 mM
	NaI	3 mM
	EDTA	2,2 mM
	BSA	2,9 µM
	Coelenterazine (CTZ)	1,43 µM

Material und Methoden

Stains-All Gebrauchslösung	TRIS-HCl (pH 8,8)	15 mM
	Isopropanol	25 5 (v/v)
	Formamid	5 % (v/v)
	Stains-All	0,005 % (w/v)
SYBR-Gold Gebrauchslösung	SYBR-Gold®	0,002 %
	TBE	1x
Tricine-NaCl-Puffer (pH 7,8)	NaCl	150 mM
	Tricine	10 mM
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (1x, TAE, pH 8,5)	TRIS (pH 8,5)	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	100 mM
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (10x, TBE, pH > 8)	Borsäure	890 mM
	TRIS (pH 8,3)	890 mM
	EDTA	20 mM
TRIS-EDTA-Puffer (10 x, TE, pH 7,4)	TRIS-HCl (pH 8,0)	100 mM
	EDTA	10 mM
Trypsin/EDTA Gebrauchslösung (1x)	Trypsin/ EDTA in PBS	1x

2.1.5 Enzyme

Tabelle 2.5 Enzyme.

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
EcoRI	10 U/ μ l	Thermo Fischer Scientific
HindIII	10 U/ μ l	Thermo Fischer Scientific
MluI	20 U/ μ l	New England Biolabs
NcoI	10 U/ μ l	New England Biolabs
PvuI	10 U/ μ l	Thermo Fischer Scientific
Reverse Transkriptase	200 U/ μ l	Thermo Fischer Scientific
RiboLock RNase Inhibitor	40 U/ μ l	Thermo Fischer Scientific
T4 DNA Ligase	0,4 U/ μ l	Bio-Rad
Taq-DNA-Polymerase	5 U/ μ l	New England Biolabs
TURBO DNase	2 U/ μ l	Thermo Fischer Scientific

2.1.6 Kits

Tabelle 2.6 Kits.

Bezeichnung	Hersteller
2x SYBR Select Master Mix	Thermo Fischer Scientific
BrilliantDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Nimagen
Dual Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega
ExS-Pure Enzymatic PCR Cleanup Kit	Nimagen
GeneJet Plamid-Miniprep-Kit	Thermo Fischer Scientific
High Pure PCR-Product Purification Kit	Roche
Large-Construct Kit	Qiagen
Nucleo SEQ	Macherey-Nagel
Plasmid Purification Midi Kit	Qiagen
Plasmid Purification Plus Maxi Kit	Qiagen
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fischer Scientific
Venor [®] GeM Classic	Minerva Biolabs

2.1.7 Größenmarker

Tabelle 2.7 Größenmarker.

Bezeichnung	Hersteller
Gene Ruler 100 bp Plus Ladder	Thermo Fischer Scientific
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Thermo Fischer Scientific
Gene Ruler Ultra Low Range	Thermo Fischer Scientific
RiboRuler High Range RNA-Ladder	Thermo Fischer Scientific

2.1.8 Zellkultur

2.1.8.1 Zellkulturmedien und -zusätze

Tabelle 2.8 Zellkulturmedien und -zusätze.

Bezeichnung	Hersteller
DMEM	PAN Biotech
FCS Superior	Sigma-Aldrich
Geneticin (G418)	Capricorn Scientific
Lipofectamine [®] 2000	Thermo Fischer Scientific
Medium 199 mit Earle's BSS	Lonza
Opti-Mem [®] I	Thermo Fischer Scientific
10xTrypsin/EDTA (0,5 % (v/v), 0,2 % (v/v))	PAN Biotech
Trypanblau; 0,4 %	Serva

Material und Methoden

Die 10x konzentrierte Trypsin/EDTA Lösung wurde mit 1x PBS auf eine Konzentration von 0,05 % (v/v) / 0,02 % (v/v) verdünnt, um in der Zellkultur verwendet werden zu können.

2.1.8.2 Humane Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind Adhäsionszelllinien humanen Ursprungs, die als *Monolayer* wachsen.

Tabelle 2.9 Humane Zelllinien.

Bezeichnung	Beschreibung	Bezug
ECV-304	Humane Harnblasenkarzinomzelllinie; T-24 Derivat	DSMZ (ACC 310)
HeLa	Zervixkarzinomepithel (Henrietta Lacks)	DSMZ (ACC 57)
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	DSMZ (ACC 635)
Huh7	Zelllinie eines Leberkarzinoms (T-7 Derivat)	(Schultz <i>et al.</i> , 1996)*

* Die Zellen wurden von Y. Kusov (IMM, AG Hilgenfeld) zur Verfügung gestellt

2.1.9 Bakterienkultur

2.1.9.1 Bakterienkulturmedien

Die folgenden Lösungen und Puffer wurden mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Evoqua) angesetzt und vor Gebrauch für 20 min bei 120 °C autoklaviert.

Tabelle 2.10 Bakterienkulturmedien.

Bezeichnung	Bestandteile	Menge
<i>Luria broth</i> Medium (1x, pH 7,4)	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Trypton/ Pepton aus Casein	1 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> Medium (SOC) (pH 7,0)	Glukose	20 mM
	Hefeextrakt	0,55 % (w/v)
	KCl	2,5 mM
	NaCl	10 mM
	Trypton/ Pepton aus Casein	2 % (w/v)
<i>Terrific broth</i> Medium (1x, pH 7,4)	Glycerin	0,4 % (w/v)
	Hefeextrakt	2,4 % (w/v)
	Trypton/ Pepton aus Casein	2 % (w/v)
	Phosphatpuffer* (Tab. 2.4)	10 %

* = wird direkt vor Gebrauch frisch zugesetzt.

Material und Methoden

Für die Agarplatten zur selektiven Anzucht von Bakterienstämmen wurde 1 Liter LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt und wie oben beschrieben autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium bis auf 55 °C abgekühlt und das entsprechende Antibiotikum zugeführt. Je nach Resistenzgenen in den entsprechenden Bakterienstämmen wurden Ampicillin oder Chloramphenicol jeweils in einer Konzentration von 100 µg/ml und 50 µg/ml zugegeben. Das Medium wurde anschließend in Petrischalen unter einer Sterilwerkbank gegossen. Die Platten wurden für ca. 1 h getrocknet und daraufhin bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.1.9.2 Bakterienstämme

Die unten genannten Bakterienstämme wurden bei Thermo Fischer Scientific erworben.

Tabelle 2.11 Bakterienstämme.

Bezeichnung	Genotyp
<i>E.coli</i> DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYAargF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>E.coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK λ⁻rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i>

2.1.10 Nukleinsäuren

2.1.10.1 Primer

Alle Primer wurden HPLC gereinigt von der Firma Metabion in H₂O gelöst und mit einer Endkonzentration von 100 µM bezogen. Die Konzentration wurde photometrisch überprüft (Kap. 2.2.2.2.4) und die Integrität wurde mittels analytischer PAA-Gelelektrophorese untersucht (Kap. 2.2.2.6.2). Die *forward*-Primer sind mit „fwd“ und die *reverse*-Primer sind mit „rev“ abgekürzt.

Tabelle 2.12 Primer mit den zugehörigen Sequenzen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
CMV-fwd	cgcaaatgggcggtaggcgtg	Sequenzierung
fLuc-fwd-156	accagggatttcagtcgatgt	RT-qPCR
fLuc-rev-156	gagcgacacctttaggcaga	RT-qPCR
Mpro-fwd	tcgcattcaaccaggacagac	Sequenzierung
Mpro-rev	ttgagaaaccacctgtctccatt	Sequenzierung
nLuc-fwd1	ggtggtgtaccctgtggatg	RT-qPCR
nLuc-rev1	ggccgtccgaaatagtcgat	RT-qPCR/Sequenzierung
Nsp1-rev	agccacgcactagcacgtctctaa	Sequenzierung
Nsp1-rev1	tggacgtgtgttttctcgttg	RT-qPCR
Orf1b-fwd	aacagagttgtggtttcaagtgat	RT-qPCR
Pex-fwd	tgtaagcggatgccgggag	Sequenzierung

Pex-rev	taatgcagctggcacgacagg	Sequenzierung
pNL-fwd	tggacaggccgcaataaaata	Sequenzierung
pNL-rev	tcgccgctcagaccttca	Sequenzierung
rLuc-rev	caccactgcgaccagttatc	RT-qPCR
UTR-rep-fwd	tacggtttcgctccgtggtgc	RT-qPCR
UTR-rep-fwd2	tacctaccaggaaaagccaac	RT-qPCR

2.1.10.2 Oligonukleotide

Die in diesem Kapitel aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert und mittels HPLC gereinigt. Die ASOs wurden in H₂O gelöst und mit einer Endkonzentration von 100 µM geliefert, während die siRNAs hybridisiert und lyophilisiert geliefert wurden und in DEPC-Wasser mit einer Endkonzentration von 100 µM aufgenommen wurden. Die Konzentration wurde photometrisch überprüft (Kap. 2.2.2.2.4) und die Integrität wurde mittels analytischer PAA-Gelelektrophorese untersucht (Kap. 2.2.2.6.2). Das Design, die chemische Modifikation sowie die Benennung der Oligonukleotide sind Kapitel 3.3 beschrieben.

Tabelle 2.13 Antisense-Oligonukleotide mit den zugehörigen Sequenzen. 2'-O-Methyl-Modifikationen sind unterstrichen dargestellt. Alle Verbindungen sind als Phosphorothioate modifiziert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
as19,20	<u>uggut</u> ggtttgttacc <u>uggg</u>
as20,21	<u>guugg</u> ttggtttgttacc <u>ugg</u>
as23,20	<u>aagut</u> ggttggtttg <u>tuacc</u>
as35,21	<u>uacaag</u> agatcgaaagt <u>uggu</u>
as80,20	<u>agug</u> acagccacacag <u>auuu</u>
as203,20	<u>gauc</u> ggctgcaacacgg <u>acg</u>
as203,22	<u>augat</u> cggctgcaacacgg <u>acg</u>
as220,22	<u>gaaac</u> ctagatgtgctg <u>augau</u>
as222,20	<u>gaaac</u> ctagatgtgctg <u>aug</u>
as240,20	<u>uuuc</u> ggacacacccgg <u>acga</u>
as240,20.2	<u>uuuc</u> ggacacacccgg <u>acaa</u>
as240,20m	<u>uuuc</u> ggtcacacccgg <u>acga</u>
as242,18	<u>uuuc</u> ggacacacccgg <u>ac</u>
asScr	<u>uacc</u> gctcttttgact <u>uuua</u>
asCtr1	<u>gauct</u> tagggatgtcc <u>accuc</u>
asCtr2	<u>gguc</u> agaccagtg <u>aguuc</u>

Tabelle 2.14 *Small-interfering* RNAs (siRNAs) Duplexe mit den zugehörigen Sequenzen. Die obere Sequenz entspricht jeweils dem *guide*-Strang und ist in 5'-3' Richtung angegeben. Die untere Sequenz entspricht jeweils dem *passenger*-Strang und ist in 3'-5' Richtung angegeben. Alle siRNAs sind mit einem Desoxythymidinukleotid (dTdT) Überhang am 3'-Ende modifiziert.

Bezeichnung	Sequenz
si203,20	5'-gaucggcugcaacacggacgtt-3' 3'-ttcuagccgacguugugccugc-5'
si203,20a	5'-gaucgacugcaacacggacgtt-3' 3'-ttcuagcugacguugugccugc-5'
si240,20	5'-uuucggacacacccggacgatt-3' 3'-ttaaagccugugugggccugcu-5'
si240,20a	5'-uuucggucacacccggacgatt-3' 3'-ttaaagccagugugggccugcu-5'
siCoV6	5'-uucguuuagagaacagauctt-3' 3'-ttaagcaaaucucuugucuag-5'
sisc	5'-cgaacucacuggucugacctt-3' 3'-ttgcuugagugaccagacugg-5'

2.1.10.3 Plasmide und Replikons

Die für diese Arbeit erworbenen und selbst klonierten Plasmide sind in Tabelle 2.15 aufgeführt. Der genaue Klonierungsvorgang ist in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben. Die Plasmidkarten befinden sich im Anhang.

Tabelle 2.15 Plasmide und Replikons.

Bezeichnung	Expressionsprodukt	Quelle
pDMo-circ-92R	emGFP*	vom IMM zur Verfügung gestellt
pEX-mt1	-	Eurofins
pEX-wt1	-	Eurofins
pGL3-Control	Firefly-Luciferase	Promega [U47296]
pGL4.74 [hRluc/TK]	Renilla-Luciferase	Promega [AY38230]
pHybrid-Replicon	Renilla-Luciferase	Yuri Kusov (IMM, AG Prof. Hilgenfeld)
pHybrid-Replicon_S144A	Renilla-Luciferase	Yuri Kusov (IMM, AG Prof. Hilgenfeld)
pHybrid-Replicon_Q189K	Renilla-Luciferase	Yuri Kusov (IMM, AG Prof. Hilgenfeld)
pNL1.1 [Nluc]	Nano-Luciferase	Promega [JQ437370]
pNL-TK	Nano-Luciferase	im Rahmen dieser Arbeit generiert
pNL-TK-CoV2mt	Nano-Luciferase	im Rahmen dieser Arbeit generiert
pNL-TK-CoV2wt	Nano-Luciferase	im Rahmen dieser Arbeit generiert
pUC19	-	Thermo Fischer Scientific [09137]

*Emerald Green Fluorescent Protein; in eckigen Klammern: *Accession Number*

2.1.11 Programme und Weblinks

Tabelle 2.16 Programme.

Bezeichnung	Hersteller
Applied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCR System Software SDSv2.4.1	Thermo Fischer Scientific
BLAST	NCBI
Chromas 2.6.6	Technelysium
Faltung Auswertung	Institut für Molekulare Medizin
Image Quant 5.2	Molecular Dynamics
mfold v2.3	University at Albany
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation
qPCR efficiency calculator	Thermo Fischer Scientific
Snappgene viewer 6.2.1	GSL Biotech LLC
Visual Gene Developer 1.9 Build 785	University of California-Davis
Wisconsin Package GCG v10.0	Genetic Computer Group

Tabelle 2.17 Weblinks.

Bezeichnung	Quelle
BioRender: Scientific Image and Illustration Software	https://www.biorender.com/
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
DoubleDigest Calculator	https://is.gd/yqBrNQ
Multalin	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI-Virus	https://tinyurl.com/scjupzq
OligoCalc	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
Primer design tool	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
qPCR efficiency calculator	https://tinyurl.com/2dofnpzz
The human protein atlas	https://www.proteinatlas.org/

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im CO₂-Inkubator, der eine konstante Temperatur von 37 °C, eine 5 %ige CO₂-Begasung und eine Luftfeuchtigkeit von 95 % gewährleistete, kultiviert. Die Zellen wurden spätestens ab einer Konfluenz von 80 % passagiert. Die Arbeiten mit den Zellen erfolgten bei RT unter einer Sterilwerkbank der Sicherheitsstufe I. Vor der Verwendung von Arbeitssubstanzen wie Medien und Puffern, wurden diese im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Mittels Lichtmikroskop wurde das Wachstumsverhalten, die Morphologie, die Konfluenz sowie mögliche Kontaminationen der Zellen kontrolliert. Im Abstand von 3 Monaten wurden die Zellen zudem auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Dazu wurde das PCR-basierte Venor[®]GeM Classic Kit nach Herstellerprotokoll verwendet.

2.2.1.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Als Zellkulturmodelle dienten in dieser Arbeit die Zelllinien HEK293T, ECV304, HeLa und HuhT7. Alle Zelllinien haben ein adhärentes Wachstumsverhalten. Die Zellen wurden in Medium199 (ECV304) oder in *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) mit jeweils 10 % FCS (*fetal calf serum*) kultiviert, das im Folgenden als Vollmedium bezeichnet wird. Das Medium für die HuhT7-Zellen wurde zusätzlich mit 400 µg/ml Geneticin (G418) versetzt. Für die Kultivierung wurden 25 cm², 75 cm², 175 cm² Zellkulturflaschen oder 24-Well-Platten verwendet. Alle Zelllinien wurden aus 1 ml kryokonservierten Aliquots mit 10⁶ Zellen in Kultur genommen (Kap. 2.2.1.2).

Für das Passagieren der Zellen wurde zunächst deren Morphologie, Adhärenz, Homogenität, Konfluenz und die Sterilität des Nährmediums lichtmikroskopisch kontrolliert. Das Medium wurde daraufhin in ein 15 ml oder 50 ml PPN-Röhrchen dekantiert. Die Zellen wurden dann mit sterilem 1x PBS gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA benetzt und abgelöst. Dafür wurden sie für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche wurde der Ablösevorgang zusätzlich unterstützt. Mittels Lichtmikroskop wurde das Ablösen vom Flaschenboden überprüft und schließlich mit dem vorher aufgefangenen Medium, welches mit FCS supplementiert war, gestoppt. Die Zellen wurden in dem Medium aufgenommen und in ein PPN-Röhrchen überführt. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 200x g für 4 min. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet im entsprechenden Vollmedium resuspendiert und aufgenommen.

Zur weiteren Kultivierung wurde frisches Vollmedium in der Zellkulturflasche vorgelegt und die Zellen in der entsprechenden Verdünnung hinzugefügt. Je nach Wachstumsverhalten der Zelllinie wurde dieser Vorgang alle zwei bis drei Tage ab einer Konfluenz von 80 % wiederholt. Bei den ECV304- sowie HuhT7-Zellen wurde nach 20 Passagen eine neue Kryokultur verwendet. Die HeLa- und HEK293T-Zellen konnten für etwa 40 bis 60 Passagen kultiviert werden.

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen und Inkulturnahme

Für die dauerhafte Lagerung der Säugerzellen wurden diese während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und ausgezählt. Aliquots aus 10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium wurden in Kryoröhrchen mit 2 ml Volumen erstellt. Das Einfriermedium setzte sich aus dem entsprechenden Zellkulturmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO zusammen. Zum Einfrieren der Zellen wurde der NALGENE *Cryo 1°C Freezing Container* verwendet, welcher vorher mit Isopropanol befüllt wurde. Die Kryoröhrchen wurden in diesem Container bis zu einer Woche bei -80 °C gelagert. Dies gewährleistete eine schonende und kontinuierliche Temperaturreduktion von 1 °C pro Minute. Daraufhin wurden die Zellen für die langfristige Konservierung in einen Flüssigstickstofftank überführt.

Für die Wiederaufnahme der Zellen aus der Langzeitlagerung wurden die Kryo-Röhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche mit 12 ml vorbereitetem Vollmedium aufgenommen und unter den in Kapitel 2.2.1.1 genannten Bedingungen kultiviert. Nach einem Tag wurde das DMSO-haltige Medium durch frisches Vollmedium ersetzt.

2.2.1.3 Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmung

Unter Einsatz des Farbstoffs Trypanblau erfolgte die quantitative Bestimmung der Zellzahl sowie die Bewertung der Zellvitalität. Trypanblau kann ausschließlich durch die Membranen geschädigter Zellen penetrieren und diese blau anfärben. Zur Färbung mit Trypanblau wurden die Zellen bei $200\times$ für 4 min zentrifugiert, in Vollmedium aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde $10\text{ }\mu\text{l}$ der Suspension mit $10\text{ }\mu\text{l}$ des Farbstoffs gemischt und daraus $10\text{ }\mu\text{l}$ in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter Verwendung eines Lichtmikroskops wurden die nicht-angefärbten, vitalen Zellen in vier Großquadranten ausgezählt und der Mittelwert ermittelt. Für die Berechnung der Gesamtzellzahl wurde die folgende Formel herangezogen:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert} \cdot 10.000 \cdot 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \cdot \text{Gesamtvolumen}$$

2.2.1.4 Transfektion von Zellen mit Oligonukleotiden

Die Transfektionsversuche wurden in 24-Well-Platten durchgeführt, in die 24 Stunden zuvor die Zellen ausgesät worden waren. Die HEK293T-, HeLa-, ECV304- und HuhT7-Zellen wurden dazu mit 160.000, 180.000, 120.000 und 70.000 Zellen pro Well ausgesät, um am Versuchstag eine Konfluenz von 80-90 % zu erreichen. Für die 96-stündigen Versuche mit HuhT7-Zellen (Kap. 3.5.4.4) wurden nur 20.000 Zellen pro Well ausgesät, um ein starkes Überwachsen der Zellen zu verhindern. Aufgrund der schwächeren Adhärenz von HEK293T-Zellen wurden die Platten vor dem Aussäen mit Poly-D-Lysin-Hydrobromid (PDL) beschichtet. Hierzu wurde PDL in PBS auf eine Konzentration von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ verdünnt und $200\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung wurde in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde die Lösung abgenommen und das Well mit $500\text{ }\mu\text{l}$ PBS gewaschen. Anschließend wurde die Platte für 1 h bei RT unter der Sterilwerkbank getrocknet.

Material und Methoden

Die Transfektion wurde, wenn nicht anders beschrieben, jeweils in Dreifachansätzen durchgeführt. Die Plasmide und Oligonukleotide wurden zunächst in den entsprechenden Konzentrationen in Opti-Mem[®] I aufgenommen (Kap. 3.4). Lipofectamin2000 wurde ebenfalls erst in Opti-Mem[®] I verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde es zu den Nukleinsäuregemischen im Verhältnis 2:1 (bzw. 4:1 für HuhT7-Zellen) hinzugegeben. Der Transfektionsansatz wurde dann (zur Micellenbildung) für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit Opti-Mem[®] I gewaschen, welches zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt wurde. Da die Komplexbildung für eine bessere Effizienz in einem verringerten Volumen von 50 µl stattgefunden hatte, wurde nach Ende der Inkubationszeit der Transfektionsansatz mit Opti-Mem[®] I auf 750 µl aufgefüllt. Zu den Zellen wurde jeweils 200 µl des Transfektionsansatzes pipettiert und die Platte leicht geschwenkt. Die Transfektion fand für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank statt. Nach 4 h wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und die Zellen einmal mit dem jeweiligen Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 1 ml Vollmedium für den entsprechenden Versuchszeitraum im Brutschrank kultiviert.

Die Behandlung von HEK293T- sowie HuhT7-Zellen mit *small molecules* erfolgte auf dieselbe Weise wie oben beschrieben. Nach der 4-stündigen Transfektion wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und 1 ml DMEM mit 10 % FCS und 0,1 % DMSO zugegeben. Die *small molecules* wurden in 0,1 % DMSO gelagert und in den entsprechenden Konzentrationen dem Medium zugesetzt (Kap. 3.5).

2.2.1.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um die Transfektionseffizienz in den Zellen zu untersuchen, wurden diese zunächst, wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben, in 24-Well-Platten ausgesät. Als Positivkontrolle für die Transfektion wurde das Plasmid pDMo-circ-92R verwendet, da es das *emerald Green Fluorescent Protein* (emGFP) exprimiert, dessen Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie nachverfolgt werden kann. Die Transfektion wurde, wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben, durchgeführt. Nach 48 h wurde in jedes Well 2,5 µg Hoechst 33258 zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert, um die Zellkerne aller Zellen anzufärben. Unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200M wurden die Zellen zunächst mit der Phasenkontrasteinstellung auf ihre Morphologie und Konfluenz überprüft. Die Zellkerne wurden mittels 49 Filter (blau) detektiert, während die erfolgreich transfizierten Zellen mit dem 38HE Filter (grün) erfasst wurden. Die Bilder der beiden Kanäle wurden überlagert und die Anzahl der transfizierten Zellen wurde im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen ausgezählt.

Tabelle 2.18 Verwendete Filtersätze des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200M (HBO 100). Bezeichnung der Filter mit der Wellenlänge der Anregungs- und Emissionsfilter sowie des Strahlenteilers in Nanometer. FT: Strahlenteiler; BP: Bandpassfilter.

Bezeichnung	Anregungsfilter	Emissionsfilter	Strahlenteiler
49	G 365	BP 445/50	FT 395
38HE	BP 470/40	BP 535/50	FT 495

2.2.1.6 Zellernte

Nach der Transfektion der Zelllinien und ihrer anschließenden Kultivierung im Brutschrank wurden die Zellen für verschiedene Zwecke wie RNA-Isolationen, Vitalitätsmessungen und Duale Luciferase Reporter-Assays verwendet. Dazu war es erforderlich, dass die Zellen zuerst geerntet wurden. In diesem Kapitel wurden die Erntemethoden für die verschiedenen Verfahren erläutert.

2.2.1.6.1 Zellernte für RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus Zellen, die in 24-Well-Platten kultiviert wurden, erfolgte zunächst das Entfernen des Kultivierungsmediums durch Absaugen. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 500 µl 1x PBS gewaschen, welches zuvor auf 37 °C erwärmt wurde. Nach dem Waschen wurde den Zellen jeweils 500 µl Qiazol Reagenz zugegeben, welches zu einer Lyse der Zellen führte und die Freisetzung von RNA sowie anderen zellulären Bestandteilen ermöglichte. Das denaturierende Qiazol setzt RNA aus den Ribosomen frei, stabilisierte sie durch das enthaltene Phenol und Guanidiniumthiocyanat und verhindert so den Abbau durch Ribonukleasen. Die lysierten und abgelösten Zellen wurden mehrmals resuspendiert und jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zelllyse von 5 min wurde die homogene Zellsuspension bis zur RNA-Isolation (Kap. 2.2.2.2) bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverwendet.

2.2.1.6.2 Zellernte für Vitalitätsmessung

Zur Vitalitätsmessung wurden HEK293T-Zellen, wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben, in 24-Well-Platten ausgesät und mit Antisense-Oligonukleotiden sowie Plasmiden transfiziert. Dies geschah in fünffacher Ausführung, wobei drei Ansätze für das Duale Luciferase Reporter-Assay verwendet wurden und zwei Ansätze zur Vitalitätsmessung. Nach einer 48-stündigen Kultivierung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit vorgewärmten (37 °C) 1x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit jeweils 100 µl vorgewärmten (37 °C) 1x Trypsin/EDTA behandelt und für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mittels Lichtmikroskop überprüft. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl eiskühlem 1x PBS mit 10 % FCS behandelt, um den Ablösevorgang zu stoppen. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Resuspendieren vom Plattenboden gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Eis überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 4 min bei

200x g und 4 °C. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 500 µl eisgekühltem 1x PBS gewaschen. Dazu wurde eine weitere Zentrifugation für 4 min mit 200x g bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 100 µl Tricine/NaCl-Puffer resuspendiert und auf Eis gehalten. Darauf folgte die Vitalitätsmessung der transfizierten HEK293T-Zellen, wie in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben.

2.2.1.6.3 Zellernte für Duale Luciferase Reporter-Assay

Um das Duale Luciferase Reporter (DLR)-Assay durchzuführen, mussten zunächst die Zellen lysiert und die Luciferase freigesetzt werden. Dazu wurde nach der entsprechenden Kultivierungszeit das Medium aus den 24-Well-Platten abgesaugt und die Zellen mit 500 µl vorgewärmten (37 °C) 1x PBS gewaschen. Der 5x *Passive Lysis Buffer* wurde mit autoklaviertem Wasser zu 1x Puffer verdünnt und, nach Absaugen des PBS, jeweils 100 µl zu den Wells pipettiert. Zur Lyse wurde die Platte für 20 min bei RT auf der schwenkenden Plattform WT 16 mit Alufolie abgedeckt inkubiert. Die Lysate wurden direkt im DLR-Assay, wie in Kapitel 2.2.1.7 beschrieben, eingesetzt.

2.2.1.7 Dualer Luciferase Reporter-Assay

Für die Untersuchung der Firefly- und Renilla bzw. Nano-Luciferase-Expression in humanen Zellen wurde der Duale Luciferase Reporter-Assay angewandt. Dieses Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Erfassung und Quantifizierung der Biolumineszenz zweier Reportergene in einem einzigen Ansatz. Die Firefly-Luciferase ist ein monomeres Reporterprotein mit einer Molekülmasse von 61 kDa. Sie katalysiert die Oxidation des Substrats D-Luciferin in Anwesenheit von ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin. Dabei wird Mg^{2+} verbraucht, und es entstehen zusätzlich AMP, CO_2 und Diphosphat (PP_i). Das daraus resultierende emittierte Licht hat eine Emissionswellenlänge von 560 nm (Conti *et al.*, 1996).

Die Renilla-Luciferase ist ein monomeres Reporterprotein mit einer Molekülmasse von 36 kDa. Sie katalysiert unter Verbrauch von Sauerstoff die Umwandlung von Coelenterazine zu Coelenteramid, wobei CO_2 als Nebenprodukt entsteht. Das dabei freigesetzte Licht hat eine Emissionswellenlänge von 480 nm (Schenkmyerova *et al.*, 2023). In diesem Experiment wurde die Firefly-Luciferase aus dem Kontrollvektor pGL3-Control exprimiert, während in den Reporterkonstrukten entweder die Nano-Luciferase (in pNL-TK-CoV2wt und pNL-TK-CoV2mt) oder die Renilla-Luciferase (im pHybrid-Replikon) kodiert war. Die Nano-Luciferase ist ein 19 kDa großes Reporterprotein, welches das Substrat Furimazine in Anwesenheit von Sauerstoff zu Furimamide oxidieren kann, wobei CO_2 freigesetzt wird. Das emittierte Licht hat dabei eine Emissionswellenlänge von 460 nm. Im Gegensatz zu den anderen beiden Luciferasen ist die Nano-Luciferase für längere Zeit in den Zellen stabil und das Biolumineszenzsignal bleibt für bis zu zwei Stunden konstant (England *et al.*, 2016).

Durch das im Assaypuffer der Renilla- und Nano-Luciferase (Kap. 2.1.4) enthaltene EDTA wird das Mg^{2+} , das für die Firefly-Reaktion benötigt wird, komplexiert, sodass nur die

Material und Methoden

Biolumineszenz der Renilla- oder Nano-Luciferase gemessen werden kann und das Firefly-Signal gleichzeitig *gequencht* wird. Dies ermöglicht die Messung beider Luciferasen im selben Reaktionsansatz im Luminometer (Wen *et al.*, 2001).

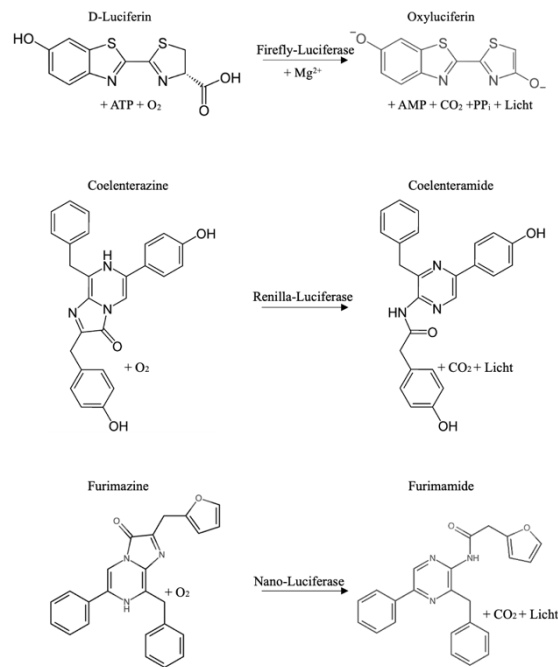


Abbildung 2.1 Biolumineszenzreaktion der Firefly-, Renilla und Nano-Luciferase. D-Luciferin wird mit der Firefly-Luciferase bei Anwesenheit von Magnesium zu Oxyluciferin umgewandelt und emittiert dabei Licht mit einem Maximum von 560 nm. Coelenterazine wird von der Renilla-Luciferase zu Coelenteramide umgewandelt unter Emission von Licht mit einem Maximum bei 480 nm. Das Substrat Furimazine wird von der Nano-Luciferase zu Furimamide unter Emission von Licht der Wellenlänge 460 nm umgewandelt.

Zur Durchführung des DLR-Assays wurden zunächst jeweils 30 μ l der Lysate aus Kapitel 2.2.1.6.3 entnommen und in doppelter Ausführung in weiße 96-Well-Platten überführt und mit Alufolie abgedeckt auf Eis gehalten. Die Renilla- und Firefly-Assaypuffer wurden, gemäß den Angaben in Kapitel 2.1.4, frisch hergestellt, wobei der Renilla-Assaypuffer auch für die Nano-Luciferase verwendet wurde. Das Substrat Coelenterazine (CTZ) wurde in mit HCl angesäuertem Ethanol gelöst und in Aliquots mit einer Konzentration von 150 μ M bei -80 °C gelagert. Sowohl das CTZ als auch das D-Luciferin und ATP wurden kurz vor der Messung zugegeben, da die Substrate lichtempfindlich sind und ATP bei RT instabil ist (Chen and Xia, 2021). Die Puffer wurden je nach Assay in 15 ml oder 50 ml PPN-Röhrchen hergestellt und vor Licht geschützt auf Eis gehalten. Die Messungen erfolgten mit dem CLARIOstar Plus *plate reader*. Dazu wurde zunächst eine Vorspülung der Pumpen mit jeweils mit 1,5 ml autoklaviertem Wasser und 1,5 ml Luft gefolgt von jeweils 1 ml der Assaypuffer durchgeführt. Der Verstärkungsfaktor für das Lumineszenzsignal wurde auf 3500x eingestellt und das Pumpvolumen wurde auf 100 μ l festgelegt. Während der Messung der Lumineszenzsignale wurde zuerst 100 μ l des Firefly-Assaypuffers in ein Well pipettiert und das Signal über 12 Sekunden gemessen. Danach wurde 100 μ l des Renilla-Assaypuffers hinzugegeben, was zu

Material und Methoden

einem *Quenching* des Fireflysignals führte. Auch dieses Signal wurde über 12 Sekunden gemessen. Nach Abschluss der Messungen wurden die Pumpen mit 2,5 ml Ethanol, 1,5 ml autoklaviertem Wasser und 1,5 ml Luft gespült. Die relative Renilla- oder Nano-Luciferaseaktivität wurde aus den Mittelwerten der Sechsfachbestimmungen und Normierung mit den Firefly-Luciferasewerten berechnet.

2.2.1.8 Vitalitätstest

Fluoresceindiacetat (FDA) ist ein Vitalfarbstoff, welcher durch die Zellmembran permeieren kann und in Zellen mit aktivem Stoffwechsel durch intrazelluläre Esterasen zu Fluorescein umgewandelt wird. Das Fluorescein emittiert ein Fluoreszenzsignal, das in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gemessen wird und linear mit der Vitalität der Zellen korreliert. Mit Hilfe dieses Farbstoffs wurde die Vitalität der HEK293T-Zellen untersucht, die mit verschiedenen ASOs transfiziert wurden. Dadurch sollte eine mögliche Zytotoxizität der im weiteren Verlauf verwendeten ASOs ausgeschlossen werden.

Für den FDA-Assay wurden jeweils 25 µl der in 100 µl Tricin/NaCl aufgenommenen Zellpellets (Kap. 2.2.1.6.2) in Zweifachbestimmung in eine weiße 96-Well-Platte auf Eis überführt. Anschließend wurde jedem Well 25 µl der gekühlten FDA-Gebrauchslösung zugegeben und die Platte wurde bis zur Fluoreszenzmessung auf Eis gehalten. Die Messung wurde im CLARIOstar Plus durchgeführt, wobei für jedes Well die Fluoreszenz in RFU bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm erfasst wurde. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der Proben und die Standardabweichungen berechnet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 DEPC-Behandlung von Wasser

Alle RNA-bezogenen Arbeiten wurden unter Verwendung von RNase-freiem Wasser durchgeführt. Zur Inaktivierung von Ribonukleasen wurde entionisiertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) auf eine Endkonzentration von 0,1 % (v/v) versetzt und über Nacht bei RT auf einem Magnetrührer behandelt. Anschließend wurde das Wasser in 500 ml Schottflaschen abgefüllt und das DEPC durch zweimaliges Autoklavieren für jeweils 20 min bei 120 °C vor Gebrauch inaktiviert.

2.2.2.2 RNA-Isolation

2.2.2.2.1 RNA-Isolation aus Säugerzellen

Die Isolation von Gesamtzell-RNA aus einem Protein-Nukleinsäure-Gemisch erfolgte nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion. Die homogenisierten Zelllysate aus Kapitel 2.2.1.6.1 wurden zunächst mit 100 µl Chloroform behandelt. Die Ansätze wurden für 15 sek gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben für 15 min bei 12.000x g und 4 °C zentrifugiert, was zur Bildung von drei Phasen führte. In der oberen,

Material und Methoden

wässrigen Phase akkumulierte die Gesamtzell-RNA, während die Interphase die zelluläre DNA enthielt, und die untere organische Phase Proteine, Lipide und weitere Zellbestandteile umfasste. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Zum abgenommenen Überstand wurde ein äquivalentes Volumen an 100 % Isopropanol zugegeben und die Probe gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 12.000x g und 4 °C. Dabei wurde die RNA durch Aussalzen präzipitiert und setzte sich als Pellet am Gefäßboden ab. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zum Entfernen von Salzen mit 1 ml 75 % Ethanol p. a. gewaschen. Dazu wurde es kurz gemischt und anschließend für 5 min bei 7.500x g und 4 °C zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand entfernt und das Pellet unter einem Abzug mit geöffnetem Gefäßdeckel für 15 min getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und die Konzentration sowie die Reinheit spektralphotometrisch mittels NanoDrop (Kap. 2.2.2.2.4) überprüft. Nach erfolgreicher Reinheitsprüfung und Isolierung ausreichender Mengen an Nukleinsäure wurde mit der DNA-Hydrolyse (Kap. 2.2.2.2.2) fortgefahren.

2.2.2.2.2 DNA-Hydrolyse

Verunreinigungen mit Plasmidresten oder anderen DNA-Fragmenten können die Ergebnisse einer RT-qPCR beeinträchtigen und zu verfälschten Daten führen. Daher wurde nach der RNA-Isolation (Kap. 2.2.2.2.1) eine DNA-Hydrolyse durchgeführt. Hierbei wurde Turbo-DNase eingesetzt, ein Enzym, das spezifisch DNA abbauen kann. Für einen Ansatz mit maximal 10 µg RNA wurde 2 U Turbo-DNase hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit 1x Turbo-DNase Puffer versetzt und auf 50 µl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt und vermischt. Je nach Menge der isolierten RNA wurden die Ansätze entsprechend hochskaliert. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden weitere 2 U Turbo-DNase hinzugefügt und erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss folgte eine Phenol-Chloroform Extraktion, um die RNA von übrig gebliebenen organischen Substanzen zu trennen.

2.2.2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Nach der Isolation und DNA-Hydrolyse erfolgte anschließend die Extraktion der RNA mittels Phenol-Chloroform. Dafür wurden die Proben auf 150 µl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt und mit 150 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Die Anwesenheit von Isoamylalkohol trägt zur Hemmung von DNasen bei, verhindert Aufschäumen und unterstützt den Extraktionsprozess. Die Proben wurden zunächst für 5 min auf einem Schüttler gemischt und anschließend für 5 min bei 12.000x g und 4 °C zentrifugiert, wodurch zwei Phasen entstanden. Die obere, wässrige Phase, die die Gesamtzell-RNA enthielt, wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Chloroform versetzt. Die Proben wurden für 2 min auf einem Schüttler gemischt und anschließend für 2 min bei 12.000x g und 4 °C zentrifugiert. Erneut wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und

Material und Methoden

in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachfolgend wurden die Proben mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat (pH 4,8) sowie mit 2,5x Volumen eisgekühltem absolutem Ethanol versetzt. Das Natriumacetat neutralisiert die Ladung der RNA und fördert deren Präzipitation. Die Proben wurden gemischt und für 30 min bei -80 °C inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation für 30 min bei 12.000x g und 4 °C. Die Zentrifugation pelletiert die präzipitierte RNA auf den Gefäßboden. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, um Phenolrückstände zu entfernen. Dazu wurden die Proben gemischt und für 15 min bei 12.000x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und das Pellet wurde zum Trocknen mit geöffnetem Gefäßdeckel unter einem Abzug platziert. Nach 15 min wurde das Pellet in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und die Konzentration sowie die Reinheit spektralphotometrisch mittels NanoDrop (Kap. 2.2.2.2.4) überprüft. Zudem wurde die Integrität der isolierten RNA mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Kap. 2.2.2.6.1). Nach erfolgreicher Reinheits- und Integritätsprüfung sowie Isolierung ausreichender Mengen an Nukleinsäure wurde mit der reversen Transkription (Kap. 2.2.2.4) fortgefahren.

2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von aufgereinigten Nukleinsäureproben wurde unter Verwendung des NanoDrop ND-1000 Spektrometers durchgeführt. Nach der Initialisierung des Geräts mit entionisiertem Wasser wurde zunächst ein Nullwert mit dem Lösungsmittel ermittelt. Dafür wurde 1 µl des Lösungsmittels auf den Probenhalter aufgetragen und die Absorption bei 260 nm gemessen, da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge haben. Anschließend wurden die Absorptionen der Proben auf dieselbe Weise gemessen. Die Konzentrationsmessungen wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Für DNA-Proben und RNA-Proben wurde jeweils die Einstellung „DNA-50“ oder „RNA-40“ am Gerät verwendet. Neben der Konzentration wurde auch die Reinheit der Proben untersucht, indem zusätzliche Messungen bei 280 nm und 230 nm durchgeführt und die Quotienten aus den Absorptionen $A_{260/A280}$ und $A_{260/A230}$ errechnet wurden. Der Quotient $A_{260/280}$ liegt für reine DNA-Proben im Bereich von 1,8-2,0 und für reine RNA-Proben bei 1,9-2,1. Ein Wert unterhalb dieser Bereichsangaben weist auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin. Das Verhältnis $A_{260/230}$ liegt bei reinen Nukleinsäureproben zwischen 2,0 und 2,2. Ein Wert kleiner als 1,8 deutet auf Verunreinigungen mit organischen Verbindungen wie z.B. Phenol, chaotrope Salze, Guanidiniumthiocyanat oder weiteren aromatische Substanzen hin, die bei 230 nm ihr Absorptionsmaximum haben.

Auf Basis des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde dann mit der NanoDrop-Software die Konzentration (c) der Nukleinsäurelösung über die Absorption bei 260 nm berechnet:

$$A_{260} = \varepsilon \cdot c \cdot d \leftrightarrow c = \frac{A_{260}}{\varepsilon \cdot b}$$

mit A = Absorption, ε = molarer Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$) und b = Weglänge (cm).

Der molare Extinktionskoeffizient wurde dabei näherungsweise bestimmt, wobei eine A_{260} von 1 entweder 50 $\mu\text{g/ml}$ für dsDNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ für ssDNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ für RNA entspricht. Die Weglänge betrug für alle Proben 1 cm.

2.2.2.4 Hybridisierung von siRNA

Zur Hybridisierung der siRNA siRLuc-Duplex wurden äquimolare Mengen der *guide*- und *passenger*-Stränge in 1x Annealingpuffer (Kap. 2.1.4) gemischt. Die Probe wurde zunächst für 2 min bei 90 °C denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde die Probe zur Hybridisierung für 1 h bei 37 °C inkubiert und nachfolgend auf Eis gestellt. Um zu überprüfen, ob die Hybridisierung erfolgreich war, wurde die Probe mittels nativer PAA-Gelelektrophorese (2.2.2.7.2.1) analysiert.

2.2.2.5 Reverse Transkription

Die, wie in Kapitel 2.2.2.2 beschriebene, isolierte zelluläre RNA wurde für die Verwendung in der RT-qPCR mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Bei der cDNA handelt es sich um eine einzelsträngige DNA, die komplementär zu den zellulären RNA-Sequenzen ist. Dieser Schritt war notwendig, da die Taq-Polymerase, die für die PCR zum Einsatz kam, nur DNA-Sequenzen amplifizieren kann. Darüber hinaus sind DNA-Sequenzen stabiler als RNA und weniger anfälliger für den Abbau durch Nukleasen. Nach gelelektrophoretischer Überprüfung der Integrität und Reinheit der RNA-Proben, wurden jeweils 2 μg zusammen mit 100 pmol *random Hexamer Primern* in 12 μl Gesamtvolumen zunächst für 5 min bei 65 °C denaturiert. Diese Primer bestehen aus zufälligen Anordnungen von sechs Nukleotiden, wodurch sie an verschiedene Stellen der zellulären RNA binden können und sicherstellen, dass ein Großteil davon in cDNA umgeschrieben wird. Nach der Denaturierung wurden die Proben bis zur cDNA-Synthese auf Eis gehalten. Die Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit dem *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*, wobei jeweils 2 μg der denaturierten RNA verwendet wurde. Für jede RNA-Probe wurde sowohl ein Ansatz mit reverser Transkriptase (RT) als auch ein Ansatz ohne RT (noRT) hergestellt. Daher konnte in der noRT-Probe keine cDNA synthetisiert werden. Diese diente als Kontrolle für die Detektion unverdauter DNA-Fragmente in der RT-qPCR. Die Zusammensetzung der Ansätze für die reverse Transkription ist in Tabelle 2.19 zusammengefasst.

Tabelle 2.19 Zusammensetzung der Ansätze für die cDNA-Synthese. Für die noRT-Proben wurde die reverse Transkriptase durch 1µl DEPC-behandeltem Wasser ersetzt. Die Synthese ist für einen Ansatz angegeben.

Reagenz	Menge
zelluläre RNA	2 µg
5x Reaction Buffer	1x
RiboLock RNase Inhibitor	20 U
dNTP-Mix	20 pmol
RevertAid M-MuLV RT	200 U

Nachdem die RT- und noRT-Proben, wie in Tabelle 2.19 angegeben, zusammengesetzt wurden, konnte die Reaktion im *Thermocycler* gestartet werden. Dazu wurde das in Tabelle 2.20 beschriebene Programm angewendet.

Tabelle 2.20 Programm der reversen Transkription im Thermoblock T Gradient.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Primer-Annealing	25	5
Reverse Transkription	65	60
Inaktivierung der reversen Transkriptase	70	5

Unter der Annahme einer vollständigen Umsetzung von RNA in cDNA betrug die Endkonzentration der cDNA-Proben 100 ng/µl. Für die RT-qPCR Versuche wurde die Proben auf 2,5 ng/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR) ist im Vergleich zur konventionellen PCR eine Methode, bei der die Amplifikation von Transkripten in Echtzeit beobachtet und quantifiziert werden kann. Für die RT-qPCR-Analysen, bei denen ein entsprechendes Plasmid zur Verfügung stand, wurden Standardkurven erstellt, um die Effizienz der Primerpaare zu ermitteln und gleichzeitig die Quantität der Amplifikate abzuleiten. Zur Erstellung der Standardkurven wurden zunächst Konzentrationsreihen der entsprechenden Plasmide hergestellt, die eine Bandbreite von $2,5 \cdot 10^5$ bis $2,5 \cdot 10^1$ Kopien/µl abdeckten. Die Gebrauchslösung der cDNA-Proben hatte eine Konzentration von 2,5 ng/µl und wurde ebenso wie die Plasmide mit einem Volumen von 4 µl in der RT-qPCR eingesetzt, sodass 10 ng der Proben in Vierfachbestimmung in 384-Well-Platten überführt wurden. Die Standardkurven erstreckten sich über einen Bereich von 10^6 - 10^2 Kopien/Well.

Für den Mastermix wurden jeweils 100 pmol der entsprechenden *forward*- und *reverse*-Primer sowie 1x *SYBR Select Master Mix* zusammengemischt. Davon wurde zu jeder vorgelegten Probe 6 µl pipettiert, sodass ein Endvolumen von 10 µl pro Well erreicht wurde. Um

Kontaminationen und die Bildung von Primerdimeren auszuschließen, wurden zusätzlich *non-template controls* (NTCs) mitgeführt, die aus 4 µl entionisiertem Wasser und 6 µl Mastermix zusammengesetzt waren. Die Platten wurden schließlich mit einer Klebefolie versiegelt und für 1 min bei 300x g und RT zentrifugiert, bevor sie in den *Thermocycler* ABI PRISM 7900HT eingefahren wurde. Mithilfe der Software *Applied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCR System Software SDSv2.4.1*, die im Nachhinein auch zur Auswertung der Daten diente, wurde das Programm der RT-qPCR eingestellt und gestartet. Das verwendete Programm ist in Tabelle 2.21 aufgeführt.

Tabelle 2.21 Programm der quantitativen Echtzeit-PCR im *Thermocycler* ABI PRISM 7900HT.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek]	Zyklen
Aktivierung der UDG*	50	120	1
Aktivierung der Polymerase	95	120	1
Denaturierung	95	15	40
Hybridisierung und Elongation	60	60	
Dissoziationskurve	95	15	1
	60	15	
	95	15	

*Uracil-DNA-Glykosidase

Das Programm für die RT-qPCR ist auf die Komponenten, aus denen sich der SYBR-Select Master Mix zusammensetzt, angepasst. Dieser enthält unter anderem den SYBR™ GreenER™ Farbstoff, AmpliTaq™ DNA-Polymerase, dNTPs mit einer dUTP/dTTP-Mischung und hitzelabile Uracil-DNA-Glykosidase (UDG). Im ersten Schritt der Reaktion wird UDG bei 50 °C aktiviert, welches die Freisetzung von Uracil aus Uracil-enthaltender einzel- und doppelsträngiger DNA wie z.B. Kontaminationen aus vorherigen PCRs katalysiert und deren Reamplifikation verhindert. Uracil-haltige DNA entsteht durch zufälliges Austauschen von dTTP durch dUTP während der RT-qPCR (Pierce and Wangh, 2004). Im nächsten Schritt wird die AmpliTaq™ DNA-Polymerase bei 95 °C aktiviert, gefolgt von einem 40-zykligen Schritt in dem die DNA bei 95 °C denaturiert wird, die Primer bei 60 °C hybridisieren und mittels dNTPs und Polymerase die Elongation erfolgt. In dieser Zeit interkaliert der SYBR™ GreenER™ Farbstoff in die kleine Furche der DNA, welches zu einem 1000x verstärkten Fluoreszenzsignal führt. Das detektierte Signal ist dabei proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Im letzten Schritt wird eine Dissoziationskurve erstellt, welche die Änderung des Fluoreszenzsignals mit der Temperatur beschreibt und den spezifischen Schmelzpunkt T_m für die jeweiligen PCR-Produkte angibt, gleichzeitig aber auch ein Reinheitsmarker ist. Wenn ein Amplifikat mehr als ein lokales Maximum in der Dissoziationskurve aufweist, handelt es sich um unspezifische Nebenprodukte. Maxima im kleinen Temperaturbereich deuten auf Primerdimere hin. Zur Erstellung der Schmelzkurve wurde die Temperatur zunächst auf 95 °C

erhöht, wodurch die Doppelstränge denaturiert wurden. Anschließend wurde die Temperatur auf 60 °C gesenkt und erneut auf 95 °C erhöht, welches zu einer erneuten Denaturierung der Doppelstränge und zur Dissoziation des Farbstoffs führte. Dieser Prozess verursachte eine langsame Abnahme des Fluoreszenzsignals, die erfasst wurde. Die Steigung dieser Kurve wurde dann in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Zur Auswertung der Daten wurde zunächst die Effizienz der Standardkurven errechnet. Die Standardkurve setzt sich aus dem *Cycle Threshold* (C_t)-Wert der Proben in Abhängigkeit des dekadischen Logarithmus der Kopienzahl zusammen. Um die Effizienz (E) zu berechnen, wurde die Steigung (m) der Kurve ermittelt und die folgende Formel verwendet.

$$E = 10^{-\frac{1}{m}}$$

Eine Effizienz von 100 % zeigt an, dass sich die Amplifikate mit jedem Zyklus verdoppeln. Werte zwischen 90 % und 110 % werden daher als ideal angesehen. Effizienzen außerhalb dieser Bereiche weisen auf eine unzureichende Primerspezifität oder nicht-lineare Amplifikation hin.

Den Proben wurden mithilfe der Standardkurven und der C_t -Werte entsprechende Quantitäten zugeordnet. Der C_t -Wert ist der Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem *Threshold* und gibt daher die Zykluszahl an, bei der für eine Probe die exponentielle Fluoreszenzzunahme beginnt. Ein hoher C_t -Wert bedeutet, dass wenige PCR-Produkte vorhanden sind, während ein niedriger C_t -Wert auf eine höhere Templatemenge hinweist. Neben dem *Threshold* ist die *Baseline* ein weiterer wichtiger Parameter. Diese entspricht dem Rauschsignal in den ersten 3-15 Zyklen, in denen die PCR-Produkte noch keinen erkennbaren Fluoreszenzanstieg zeigen. Dieser Wert wird kleiner, wenn große Mengen an Template eingesetzt werden.

Sowohl Baseline als auch Threshold müssen abhängig vom Verlauf der RT-qPCR manuell eingestellt werden, da sie einen entscheidenden Einfluss auf die Bestimmung der C_t -Werte haben. Für Amplifikate, für die keine Standardkurve erstellt werden konnte, wurde der C_t -Wert zur Errechnung des relativen Expressionsniveaus (E) herangezogen, was für die Vergleichbarkeit für alle Proben des entsprechenden RT-qPCR-Versuchs durchgeführt wurde.

$$E = 2^{40-C_t}$$

Um die Länge und die spezifische Bildung von Amplifikaten zusätzlich zur Schmelzkurve zu überprüfen, wurde das gesamte Volumen der PCR-Produkte (10 µl) auf analytische Agarose-Gele aufgetragen (Kap. 2.2.2.6.1).

2.2.2.7 Elektrophoretische Auftrennung und Detektion von Nukleinsäuren

2.2.2.7.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Nukleinsäuren basierend auf ihrer Größe und Ladung durchgeführt. Sie diente zur Integritätsprüfung und Quantifizierung von Produkten der zellulären RNA-Isolation (Kap. 2.2.2.2), der Restriktionsanalyse von Plasmiden (Kap. 2.2.3.1.1) und Produkten der konventionellen oder quantitativen Echtzeit-PCR (Kap. 2.2.2.5). Zusätzlich wurden PCR-Produkte mit Agarose-

Gelen getrennt, um spezifische Banden auszuschneiden und aufzureinigen (Kap. 2.2.3.1.2). Tabelle 2.22 bietet eine Übersicht über den benötigten Agaroseanteil für die optimale Auftrennung von Nukleinsäuren bestimmter Längen.

Tabelle 2.22 Prozentigkeit der Agarosegele in Abhängigkeit der Nukleinsäurelänge.

Agaroseanteil [%]	optimale Nukleinsäurelänge [bps]
0,5	1.000-30.000
1	500-10.000
2	50-2.000
3	10-1.000

Für die Herstellung von Agarosegelen zur Überprüfung von DNA wurde zunächst 50 ml 1x TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose vermischt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. 10 mg/ml Ethidiumbromid wurde im Gelschlitten unter einem Abzug vorgelegt und anschließend wurde die Agaroselösung hineingegossen und gemischt. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es in eine horizontale Gelkammer, die mit 1x TAE-Puffer gefüllt war, gelegt und mit Proben beladen, die in 5x DNA-Ladepuffer (Kap. 2.1.4) gelöst waren. Zusätzlich wurden passende Größenmarker (Kap. 2.1.7) aufgetragen. Die Probenauftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei einer Spannung von 60–90 V für 40–80 min. Die Gelbanden wurden unter UV-Licht detektiert und fotografisch erfasst. Die Herstellung der Gele zur Überprüfung von isolierter zellulärer RNA erfolgte nach einem ähnlichen Schema wie oben beschrieben, wobei der Gelschlitten, der Kamm sowie die Gelkammer vor der Nutzung für 15 min mit 3 % H₂O₂ inkubiert und anschließend mit DEPC-behandeltem Wasser gespült wurden. Zudem wurden die RNA-Proben in *2x RNA-Loading Dye* (Tab. 2.3) aufgenommen. Die zelluläre RNA lässt sich mittels Agarose-Gelelektrophorese in drei Banden aufteilen. Dabei werden die ribosomalen RNA-Formen 28S-, 18S- und 5S-rRNA sichtbar. Die ribosomale RNA ist mit 80 % in der Zelle am häufigsten vertreten im Vergleich zur mRNA (5 %) oder tRNA (15 %) (Graw and Hennig, 2010). Die 28S- und 18S-rRNA weisen auf Agarose-Gelen eine Größe von etwa 5 kb und 2 kb auf und liegen im Verhältnis 2:1 vor. Die 5S-rRNA liegt in einer deutlich geringeren Menge vor und hat eine Größe von ungefähr 0,12 kb.

2.2.2.7.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde zur Untersuchung der Integrität und Quantifizierung von Primern und Oligonukleotiden eingesetzt. Dieser Ansatz ermöglicht die Trennung von Nukleinsäuren basierend auf ihrer Größe und Ladung in einem vertikalen Gel. Dabei wurde unterschieden zwischen nativen und semi-denaturierenden Gelen. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet.

2.2.2.7.2.1 Analytische native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Unter nativen Bedingungen bleiben die Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren intakt, weshalb die native PAGE dazu geeignet ist, doppelsträngige siRNAs zu untersuchen. Hierfür wurde zunächst eine 15 %-ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1 v/v) in 1x TBE-Puffer angesetzt, welche mit 0,1 % APS sowie 0,1 % TEMED zum Start und zur Katalyse der radikalischen Polymerisierung versetzt wurde. Die Lösung wurde in die mit Chloroform gereinigte Gelkammer gegossen und unter einem Abzug für 30 min polymerisiert. Vor dem Probenauftrag fand zum gleichmäßigen Verteilen der Salze im Gel ein Vorlauf für 30 min bei einer Stromstärke von 20 mA im Kühlraum (4 °C) statt. Die siRNA-Proben wurden in 50 % Glycerin gemischt und mit einem entsprechenden Größenmarker und einem Laufmarker zusammen auf das Gel aufgetragen. Zunächst wurde ein Einlauf für 15 min bei 12 mA und 4 °C gestartet. Anschließend wurde die Stromstärke wieder auf 20 mA erhöht und der Gellauf für ungefähr 1-1,5 h fortgeführt. Im Anschluss wurde das Gel mittels Stains-All oder Sybr-Gold gefärbt und detektiert (Kap.2.2.2.7.3).

2.2.2.7.2.2 Analytische semi-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die semi-denaturierende PAGE wurde durchgeführt, um Primerpaare, einzelsträngige ASOs oder Transfektionsansätze mit Oligonukleotiden zu überprüfen. Hierbei dienten die nativen Bedingungen im Probenpuffer und die Elektrophorese bei niedriger Spannung dem Erhalt von stabilen Isoformen. Die Denaturierung instabiler Sekundärstrukturen wurde ausschließlich durch den Zusatz von Harnstoff zum Gel erreicht, was zu präzisen Bandenmustern führte. Im Gegensatz zur nativen PAGE wurde für die semi-denaturierende PAGE 4 M Harnstoff eingesetzt. Dieser wurde zur 15 %-igen Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1 v/v) in 1x TBE-Puffer zugegeben und unter Wärmezufuhr auf einem Magnetrührer gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mittels eines 0,2 µm Filters filtriert, bevor 0,1 % APS und 0,1 % TEMED hinzugefügt wurden. Der Gellauf erfolgte, wie in Kapitel 2.2.2.7.2.1, bei Raumtemperatur.

2.2.2.7.3 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Stains-All und Sybr-Gold

Je nach aufgetragener Menge an Nukleinsäuren wurde eine Färbung entweder mit Stains-All oder Sybr-Gold durchgeführt. Große Mengen an Nukleinsäuren, wie beispielsweise Primerpaare oder Oligonukleotide, die jeweils mit 2 µg aufgetragen wurden, konnten durch Stains-All nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Gele über Nacht in einer frisch angesetzten Stains-All Gebrauchslösung (Tab. 2.1.4) inkubiert und anschließend für ungefähr 2 h im Tageslicht entfärbt. Aufgrund unterschiedlicher chemischer Interaktionen färbt der Farbstoff RNA violett, DNA blau und Proteine rot an. Zur Detektion wurde ein *Epson Perfection 2580 Photoscanner* verwendet.

Sybr-Gold ist mit einer Nachweisgrenze von 25 pg im Gegensatz zu Stains-All, das eine Nachweisgrenze von 3 ng für DNA und 90 ng für RNA aufweist, deutlich sensitiver. Daher

wurde Sybr-Gold für geringere Mengen an Nukleinsäuren eingesetzt, wie sie zum Beispiel in Transfektionsansätzen vorhanden waren. Dazu wurde das Gel für 10 min in die Sybr-Gold Gebrauchslösung (Tab. 2.1.4) gelegt und geschwenkt. Anschließend wurde das Gel für weitere 10 min in entionisiertem Wasser gewaschen und mittels Typhoon FLA 9500 GE detektiert. Die Auswertung des Gels erfolgte anschließend mithilfe der *Image Quant* Software.

2.2.3 Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1 Klonierung von DNA-Fragmenten in kompetente Bakterienzellen

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (Tab. 2.15) wurden über Klonierung in kompetenten DH5 α -Bakterien generiert. Zunächst wurden ein Restriktionsverdau der Inserts und Zielvektoren vorgenommen (Kap. 2.2.3.1.1), und die Produkte über Gelextraktion (Kap. 2.2.3.1.2) aufgereinigt. Die aufgereinigten Produkte wurden in die entsprechenden Plasmide ligiert (Kap. 2.2.3.1.3) und die Ligationsprodukte wurden anschließend in kompetente Bakterien transformiert (Kap. 2.2.3.1.4). Daraufhin erfolgte eine Plasmidpräparation (Kap. 2.2.3.2) und eine Überprüfung der Inserts mittels Kolonie-PCR (Kap. 2.2.3.3). Anschließend wurden ausgewählte Klone in größerem Ausmaß isoliert und mittels Restriktionsanalyse (Kap. 2.2.3.1.1) sowie Sanger Sequenzierung (Kap. 2.2.3.4) analysiert.

2.2.3.1.1 Analytischer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Klonierung von DNA-Fragmenten (*Inserts*) in einen Zielvektor erforderte die Erzeugung von überhängenden palindromischen Enden (*sticky ends*). Dies ermöglicht während des Ligationsprozesses das Auffinden und Basenpaaren der komplementären Enden. Für den analytischen Restriktionsverdau wurden unterschiedliche Restriktionsenzyme (Tab. 2.5) eingesetzt, die spezifische Sequenzmotive in doppelsträngiger DNA erkennen und hydrolysieren können. Hierzu wurde 1 μ g eines Plasmids in entsprechendem 1x Restriktionspuffer gelöst und je nach Sequenzkontext mit 10 U eines adäquaten Enzyms versetzt. Für einen Doppelverdau mit unterschiedlichen Sequenzmotiven wurden zwei Enzyme zeitgleich verwendet. Die Reaktion wurde in 20 μ l entionisiertem Wasser angesetzt und für 15-30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis gehalten, um unspezifische Hydrolysen zu vermeiden. Der analytische Restriktionsverdau diente auch dazu, die Integrität von Plasmiden nach einer Plasmidpräparation anhand ihrer Größe zu untersuchen. Hierfür wurden lediglich 100 ng der entsprechenden Plasmide eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden in beiden Fällen mit einem passenden Größenmarker auf einem analytischen Agarose-Gel aufgetragen und ggf. zur weiteren Verwendung aus dem Gel extrahiert (Kap. 2.2.3.1.2).

2.2.3.1.2 DNA-Isolation aus Agarose-Gelen

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden wurden zunächst sowohl die Inserts als auch die Zielvektoren einem Restriktionsverdau (Kap. 2.2.3.1.1) unterzogen. Anschließend wurde der Ansatz mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese, wie in Kapitel 2.2.2.6.1

beschrieben, untersucht und aus dem Gel aufgereinigt. Hierzu wurden die DNA-Banden zunächst auf einem UV-Tisch mittels Skalpells ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde die Belichtungszeit so kurz wie möglich gehalten, um DNA-Schäden durch das UV-Licht zu vermeiden. Die Aufreinigung der Nukleinsäure aus dem Gel erfolgte gemäß Herstellerangaben unter Verwendung des *High Pure PCR-Product Purification Kits*. Die Elution der Nukleinsäuren aus dem Gel erfolgte in 50 µl - 100 µl Elutionspuffer. Die Reinheit und Konzentration der Produkte wurde mittels NanoDrop-Messung überprüft, und das aufgereinigte Produkt wurde für Klonierungsversuche (Kap. 2.2.3.1) verwendet.

2.2.3.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Verwendung der T4 Ligase wurden zueinander kompatible *Inserts* und Zielvektoren nach einem vorangegangenen Restriktionsverdau und einer Gel-Aufreinigung miteinander verknüpft, wodurch ein Gen von Interesse in einen transformierbaren Vektor eingefügt wurde. Zur Bestimmung der benötigten *Insertmenge* wurde die folgende Formel verwendet, wobei das Verhältnis zwischen *Insert* und Vektor 6:1 betrug und 50 ng der Zielvektoren eingesetzt wurde.

$$\text{Insertmasse [ng]} = 3 \times \left(\frac{\text{Insertlänge [bp]}}{\text{Vektorlänge [bp]}} \right) \times \text{Vektormasse [ng]}$$

Die Ligationsreaktion wurde durch Zugabe von 1 U Ligase zu 50 ng des Zielvektors und der adäquaten *Insertmenge* in 1x Ligationspuffer durchgeführt. Die Reaktion fand in einem Volumen von 20 µl für 45 min bei RT statt. Anschließend wurde das erhaltene Produkt direkt zur Transformation in kompetente Bakterienzellen verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.3.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen

Die Transformation von Plasmid-DNA wurde in chemisch kompetente *E.coli* DH5α-Zellen durchgeführt. Zunächst wurden die Bakterien für 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 10-50 ng des Ligationsansatzes (Kap. 2.2.3.1.3) hinzugefügt und durch Schnippen gemischt, bevor sie für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt, indem der Transformationsansatz für 30 sek bei 42 °C inkubiert und dann für 5 min auf Eis gestellt wurde. Durch diesen plötzlichen Temperaturwechsel entsteht ein Druckunterschied, der zur Bildung von Poren in der Zellmembran führt. *Supercoil*-DNA kann dann durch diese Poren in die Zellen migrieren. Zur Regeneration wurden die Zellen anschließend in 950 µl SOC-Medium (Tab. 2.10) aufgenommen und für 1 h bei 250 rpm und 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Danach wurde 100 µl und 150 µl der transformierten Bakterien jeweils auf Agar-Platten, die zuvor auf 37 °C vorgewärmt wurden und 100 mg/ml Ampicillin enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf den Platten gezählt, mit einem sterilen Zahnstocher jeweils 8-10 Kolonien gepickt und in ein Röhrchen mit 3 ml LB-Medium und 100 mg/ml Ampicillin überführt, sowie eine Kontrollplatte für den

Kolonie-Screen (Kap. 2.2.3.3) angeimpft. Das Röhrchen wurde für 6-9 h bei 140 rpm und 37 °C inkubiert und nachfolgend für eine Plasmidpräparation verwendet (Kap. 2.2.3.3).

2.2.3.1.5 Herstellung von Glycerinkulturen zur Konservierung ausgewählter Bakterienstämme

Erfolgreich transformierte Bakterienkulturen wurden zur Langzeitkonservierung in Glycerin bei -80 °C gelagert. Hierzu wurde aus den erzeugten DH5 α -Übernachtskulturen gemäß Kapitel 2.2.3.1.4 500 μ l entnommen und mit 500 μ l 87 % Glycerin in einem Kryoröhrchen versetzt, bevor sie eingefroren wurden. Für DH10B-Stämme wurde aus der Übernachtskultur gemäß Kapitel 2.2.3.2.4 1 ml in ein Kryoröhrchen überführt und bei 13.500x g für 3 min und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für die Lagerung bei -80 °C in 100 μ l 40 % Glycerin aufgenommen.

2.2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 α wurden, abhängig von der benötigten Quantität, verschiedene Präparationsmethoden angewendet. Dazu gehörten die Mini- Midi- und Maxipräparation. Zur Isolation des pHybrid-Replikons aus *E. coli* DH10B wurde die *Large-Construct* Präparation durchgeführt. Alle verwendeten Qiagen Kits zur DNA-Isolation funktionieren nach dem Ionenaustauschprinzip, bei dem die DNA selektiv an die Ionenaustauschermatrix gebunden wird, während Verunreinigungen nicht oder schwächer gebunden und durch nachfolgende Waschschrte entfernt werden. Nach jeder Präparation wurde die Konzentration sowie die Reinheit spektralphotometrisch mittels NanoDrop (Kap. 2.2.2.2.4) überprüft.

2.2.3.2.1 Minipräparation

Die Minipräparation stellt ein schnelles Verfahren zur Isolation von Plasmid-DNA dar und wurde bei Plasmiden mit einer Größe kleiner als 10 kb stets als erster Schritt durchgeführt, um die erfolgreiche Klonierung des Inserts in den Zielvektor mittels Restriktionsverdau und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.6.1) zu überprüfen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde bei Bedarf eine Midi- oder Maxipräparation durchgeführt. Die Minipräparation wurde aus 3 ml Flüssigkultur (Kap. 2.2.3.1.4) unter Verwendung des *GeneJet Plasmid-Miniprep-Kits* gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Dabei kamen Silikasäulen zum Einsatz, welche die DNA selektiv binden können.

2.2.3.2.2 Midipräparation

Nach erfolgreicher Qualitätskontrolle mittels Minipräparation wurde eine Midipräparation unter Verwendung des *Plasmid Purification Midi Kit* durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht die Isolierung von bis zu 200 μ g Plasmid-DNA. Hierzu wurde aus der Flüssigkultur (Kap. 2.2.3.1.4) 1 ml entnommen und in eine 100 ml Flüssigkultur überführt. Diese wurde für

6-9 h bei 100 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Flüssigkultur in der Midipräparation gemäß Herstellerprotokoll verarbeitet. Nach der Fällung mittels Isopropanol wurde das DNA-Pellet in 50 µl entionisiertem Wasser aufgenommen. Zur Verifizierung der DNA-Sequenz wurde eine Sanger-Sequenzierung (Kap. 2.2.3.4) durchgeführt.

2.2.3.2.3 Maxipräparation

Um mehr als 200 µg Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Maxipräparation mittels *Plasmid Purification Plus Maxi Kit* durchgeführt. Die Bakterien wurden in einer Flüssigkultur, wie in Kapitel 2.2.3.2.2 angegeben, angesetzt und gemäß Herstellerprotokoll vollständig für die Präparation eingesetzt. Zur Verifizierung der DNA-Sequenz wurde eine Sanger-Sequenzierung (Kap. 2.2.3.4) durchgeführt.

2.2.3.2.4 Large-Construct Präparation

Für die Isolation des pHybrid-Replicons aus *E. coli* DH10B wurde die *Large-Construct* Präparation unter Verwendung des *Large-Construct Kits* gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden *low-copy* DNA-Konstrukte mit einer Größe von mehr als 10 kb aus Bakterien isoliert. Im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit verwendeten Plasmiden enthält das pHybrid-Replicon ein Chloramphenicol (Cam) Resistenzgen, sodass die Agarplatten sowie die Flüssigkulturen mit einer Konzentration von 50 µg/ml dieses Antibiotikums versetzt waren. Die gefrorene Glycerinkultur, bereitgestellt von der AG Hilgenfeld, wurde mit einer sterilen Öse angekratzt, auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf der Platte gezählt, mit einem sterilen Zahnstocher jeweils 2 Kolonien gepickt und in ein Röhrchen mit 3,6 ml TB-Medium mit 10 % Phosphatpuffer und 50 µg/ml Cam überführt. Das Röhrchen wurde für 24 h bei 170 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 2 ml entnommen und in eine 250 ml Flüssigkultur überführt. Diese wurde für 24 h bei 150 rpm und 37 °C inkubiert. Schließlich wurde, nach Herstellung einer Glycerinkultur (Kap. 2.2.3.1.5), die Flüssigkultur gemäß dem Herstellerprotokoll für die *Large-Construct*-Präparation verarbeitet. Die Integrität des Konstrukts wurde mittels Restriktionsverdau und anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Beispiel: Abb. 6.10). Darüber hinaus wurden einzelne Sequenzabschnitte mittels Sequenzierung (Kap. 2.2.3.4) verifiziert.

2.2.3.3 Kolonie-PCR

Die transformierten Kolonien, die für eine Plasmidpräparation vorgesehen waren, wurden vorher mittels Kolonie-PCR überprüft. Dabei wurden für das *Insert* spezifische Primerpaare eingesetzt, um zu überprüfen, ob der Zielvektor das *Insert* erfolgreich aufgenommen hat. Hierzu wurde zunächst ein Mastermix gemäß der folgenden Tabelle vorbereitet, wobei jeweils 10 µl in ein PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt wurde.

Tabelle 2.23 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine Kolonie-PCR.

Reagenz	Menge
dNTPs	10 mM
<i>forward</i> - und <i>reverse</i> -Primer	je 200 nM
Taq Reaktionspuffer	1 x
Taq DNA Polymerase	1 U

Von der Kontrollplatte wurden die entsprechenden Klone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in das Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das folgende Programm im Thermoblock gestartet.

Tabelle 2.24 Programm der Kolonie-PCR im Thermoblock T Gradient.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek]	Zyklen
Aufschluss der Zellen und Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	15	30
Hybridisierung	*	45	
Elongation	68	60	
Finale Elongation	68	300	1

* Die *Annealing*-Temperatur der Primer wurde für jeden Lauf individuell eingestellt.

Das PCR-Produkt wurde im Anschluss mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.6.1) überprüft.

2.2.3.4 Sequenzierung von DNA

Die aus Bakterien isolierten und aufgereinigten Plasmide wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Dieses Verfahren umfasst neben dNTPs auch Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs), die während der Reaktion zufällig eingebaut werden und aufgrund ihres fehlenden 3'-Hydroxylrestes zu Kettenabbrüchen führen. Dadurch entstehen PCR-Produkte unterschiedlicher Längen. Die vier verschiedenen ddNTPs sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um sie bei unterschiedlichen Wellenlängen zu detektieren und zu unterscheiden. Zu diesem Zweck verwendet der *ABI PRISM Genetic Analyzer 3130*, in dem die Sequenzierung durchgeführt wurde, Glaskapillaren mit einer Gelmatrix, in der der Sequenzierungsansatz der Länge nach aufgetrennt wird.

Im Gegensatz zu kleinen Plasmiden musste für die Sequenzierung des pHybrid-Replicons der zu sequenzierende Bereich zuerst mittels konventioneller PCR amplifiziert werden. Die Reaktion wurde mit 50 ng DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl angesetzt. Die Zusammensetzung der Reagenzien sowie das PCR-Programm entsprachen der Kolonie-PCR

(Tab. 2.23 und Tab. 2.24). Allerdings wurde die Zeit der initialen Denaturierung auf 30 sek begrenzt, da keine Zellen aufgeschlossen werden mussten. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.6.1) überprüft.

Um das PCR-Produkt vor der Sequenzierung von störenden Faktoren wie überschüssigen Primern und dNTPs zu reinigen, wurde ein Exonuklease-Verdau mit dem *ExS-Pure Enzymatic PCR Cleanup Kit* gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden dNTPs dephosphoryliert und einzelsträngige DNA abgebaut. Der gesamte Ansatz wurde für die Sequenzierungsreaktion verwendet, die mit dem *BrilliantDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* in einem Reaktionsvolumen von 20 µl gemäß den Angaben in Tabelle 2.25 angesetzt und mit dem in Tabelle 2.26 aufgeführten Programm gestartet wurde. Dabei wurde entweder ein *forward*- oder ein *reverse*-Primer in jedem Reaktionsansatz eingesetzt.

Tabelle 2.25 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine Sequenzierungs-PCR.

Reagenz	Konzentration
<i>BrilliantDye[®] Reaction mix</i>	1 µl
<i>forward</i> - oder <i>reverse</i> -Primer	200 nM
DNA	1 µg
Sequenzierungspuffer	1 x

Tabelle 2.26 Programm der Sequenzierungs-PCR im Thermoblock T Gradient.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek]	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	180	1
Denaturierung	98	10	25
Hybridisierung	60	90	
Elongation	50	90	
Finale Elongation	50	60	1

Nach Abschluss der Reaktion wurde das entstandene Produkt mittels Nucleo SEQ-Kit nach Herstellerprotokoll gereinigt, um das PCR-Produkt von überschüssigen Primern, Salzen oder dNTPs zu reinigen. Zum Eluat wurde 20 µl Hydroxylamin-Dihydrochlorid (Hi-Di) Formamide zugegeben. Dieser Schritt bewirkt die Denaturierung der DNA-Stränge und macht sie für die Sequenzierung zugänglich. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min bei 90 °C inkubiert und direkt auf Eis gestellt oder bei -20 °C gelagert. Die Injektion der Proben in das Kapillarelektrophorese-System und die anschließende Sequenzierung wurde von der AG Hiort durchgeführt. Im Anschluss wurden die Daten mittels Chromas-Software analysiert.

3. Ergebnisse

Für die Behandlung viraler Erreger wie SARS-CoV-2 bietet der Einsatz von oligonukleotidbasierten Wirkstoffen ein vielversprechendes und bislang wenig erforschtes Therapiefeld. Dazu zählen beispielsweise Antisense-Oligonukleotide (ASOs) und *small-interfering RNAs* (siRNAs). Diese Wirkstoffe binden spezifisch durch Watson-Crick-Basenpaarung an die Ziel-mRNA. Im Gegensatz dazu erfordern Wirkstoffe wie *small molecule antiviral drugs* oder monoklonale Antikörper (mAb) die Erkennung der komplexen räumlichen Struktur spezifischer Proteine. Zudem sind viele Krankheiten mit *small molecules* und mAb nicht behandelbar, da nicht immer ein Zielmolekül mit hoher Aktivität, Affinität und Spezifität identifiziert werden kann. Nukleinsäurebasierte Wirkstoffe können hingegen jedes zugängliche Gen bzw. jede RNA-Sequenz als Ziel anvisieren, indem lediglich geeignete Nukleotidsequenzen entlang der Ziel-mRNA ausgewählt werden. Dies führt zu einer verkürzten Forschungs- und Entwicklungszeit sowie einem breiteren therapeutischen Anwendungsspektrum (Hu *et al.*, 2020).

Oligonukleotidbasierte Wirkstoffe haben bereits vielversprechende Ergebnisse in klinischen und präklinischen Studien gezeigt, in denen sie für die Behandlung von genetischen Erkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen, Krebs, genetischen Fehlfunktionen, Herz-Kreislaufkrankungen sowie viraler Infektionen eingesetzt wurden (Goleij *et al.*, 2024). Hinsichtlich der Behandlung von SARS-CoV-2 haben Studien in viralen Assays gezeigt, dass das Virus durch siRNAs sowie ASOs, die gegen die 5'-UTR gerichtet sind, signifikant gehemmt werden kann (Tolksdorf *et al.*, 2021; Vora *et al.*, 2022).

Daher wurde zu Beginn dieser Arbeit die 5'-UTR-Sequenz des SARS-CoV-2 als Zielregion ausgewählt (Abb. 3.1), da diese hochkonservierte Struktur eine vielversprechende Angriffsregion für die oligonukleotidbasierten Wirkstoffe bietet. Die 5'-UTR-Sequenzen der verschiedenen SARS-CoV-2 Subtypen wurden zunächst mittels Alignments auf Mutationen untersucht (Abb. 6.1). Basierend auf diesen Daten wurde die Sekundärstruktur analysiert und lokale Zielsequenzen *in-silico* ausgewählt (Kap. 3.2, Abb. 3.1). Entlang dieser Zielregionen wurden die Antisense-Oligonukleotide (Tab. 3.2) sowie die *small-interfering RNAs* (Tab. 3.6) generiert und unter Verwendung etablierter Kriterien selektiert (Kap. 3.3). Um die hemmende Wirkung zu untersuchen, wurde ein Reporter-gen konstruiert (Abb. 3.5), das die 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2 stromaufwärts des Nano-Luciferasegens enthält. Dieses Reporter-gen wurde in Kombination mit den Wirkstoffen in Dualen Luciferase-Reporterassays analysiert (Kap. 3.4). Die entsprechenden Hemmstudien wurden durch transiente Transfektion in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Nach einem ersten Vergleich der Hemmstoffe und der Untersuchung von Zytotoxizität, wurden die potentesten Hemmstoffe für dosisabhängige Studien ausgewählt (Kap. 3.4.1.2). Weiterhin wurde die Hemmwirkung auf RNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR ermittelt (Kap. 3.4.1.6). Zudem wurden mechanismusbezogene Studien durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Hemmung auf einem RNase H-Mechanismus

basiert (Kap. 3.4.1.4). Für einen möglicherweise stärkeren Hemmeffekt wurden die ASOs zudem kombiniert (Kap. 3.4.1.5).

Zusätzlich wurden siRNAs anhand etablierter Kriterien *in-silico* designet und wie die ASOs zunächst in unterschiedlichen Konzentrationen miteinander verglichen (Kap. 3.4.2.1). Anschließend wurden dosisabhängige Versuche durchgeführt und die Hemmwirkung sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene quantifiziert (Kap. 3.4.2.2. und 3.4.2.5). Auch die siRNAs wurden für einen potenziell stärkeren Hemmeffekt kombiniert (Kap. 3.4.2.3).

Ein Exkurs dieser Arbeit umfasst die Untersuchung des *upstream open reading frames* (Kap. 3.4.3). Dabei wurde das Startcodon des uORFs mutiert und die Auswirkungen auf die Translation mittels DLR-Assay analysiert.

Um zu untersuchen, ob die Hemmstoffe auch in einem virusähnlichen System wirksam sind, wurden Hemmstudien in einem reporterergenbasierten System durchgeführt (Kap. 3.5). Hierbei wurden die Wirkstoffe in einem selbstreplizierenden System eines SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2-Hybriden analysiert (Kap. 3.5.2). Zusätzlich wurde die Hemmwirkung in Kombination mit bereits etablierten *small molecules* sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene untersucht (Kap. 3.5.4).

Ein weiterer Exkurs dieser Arbeit ist der *in-silico*-Ansatz zum Design von ASOs für das West-Nil-Virus (WNV) (Kap. 3.6). Mithilfe des in dieser Arbeit etablierten Systems wurden ASOs generiert, die gegen lokale Zielstrukturen in der 3'- und 5'-UTR des WNVs gerichtet sind.

3.1. Sequenzvergleich der 5'-UTRs der SARS-CoV-2 Subtypen

Die 5'-UTR (Abb. 3.1) wurde als Zielregion für diese Arbeit ausgewählt, da sie innerhalb der Familie der Betacoronaviren hochkonserviert ist und ihr mit bestimmten RNA-Sekundärstrukturen eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben wird (Miao *et al.*, 2021; Sakuraba *et al.*, 2022). Diese Sekundärstrukturen umfassen die *Stem-Loops* SL1-SL5 (Rangan *et al.*, 2021). In Kombination mit dem Nsp1 ist SL1 für die Degradation der Wirts-mRNA verantwortlich und spielt eine entscheidende Rolle bei der Replikation des viralen Genoms (Sakuraba *et al.*, 2022). SL3 enthält das TRS-L, welches mit dem TRS-B basenpaart und durch diskontinuierliche Transkription subgenomische RNA generiert. Daher ist die strukturelle Integrität von SL3, in Kombination mit SL2, für den viralen Transkriptionsmechanismus unerlässlich. SL4 enthält das uORF, das in Coronaviren für ein kurzes Polypeptid codiert, welches an der Regulation der Translation beteiligt sein soll, indem es die Translationseffizienz verringert. Das Fehlen des SL4 würde in Coronaviren zum Einstellen der Translation führen (Condé *et al.*, 2022; Rangan *et al.*, 2021). SL5 bildet eine *four-way junction*, die sowohl in Alpha- als auch in Betacoronaviren konserviert ist und in SL5a, SL5b und SL5c unterteilt wird. Für SL5 konnte eine Beteiligung an der viralen Replikation sowie am Verpacken der Viroide nachgewiesen werden (Manfredonia and Incarnato, 2021; Miao *et al.*, 2021).

Ergebnisse

Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass eine Inhibition der 5'-UTR bei SARS-CoV-1 (Alignment der 5'-UTR von SARS-CoV-1 und -2 in Abb. 3.26) zur Hemmung der viralen Genexpression der Proteine S, E, M und N geführt hat (Li *et al.*, 2005).

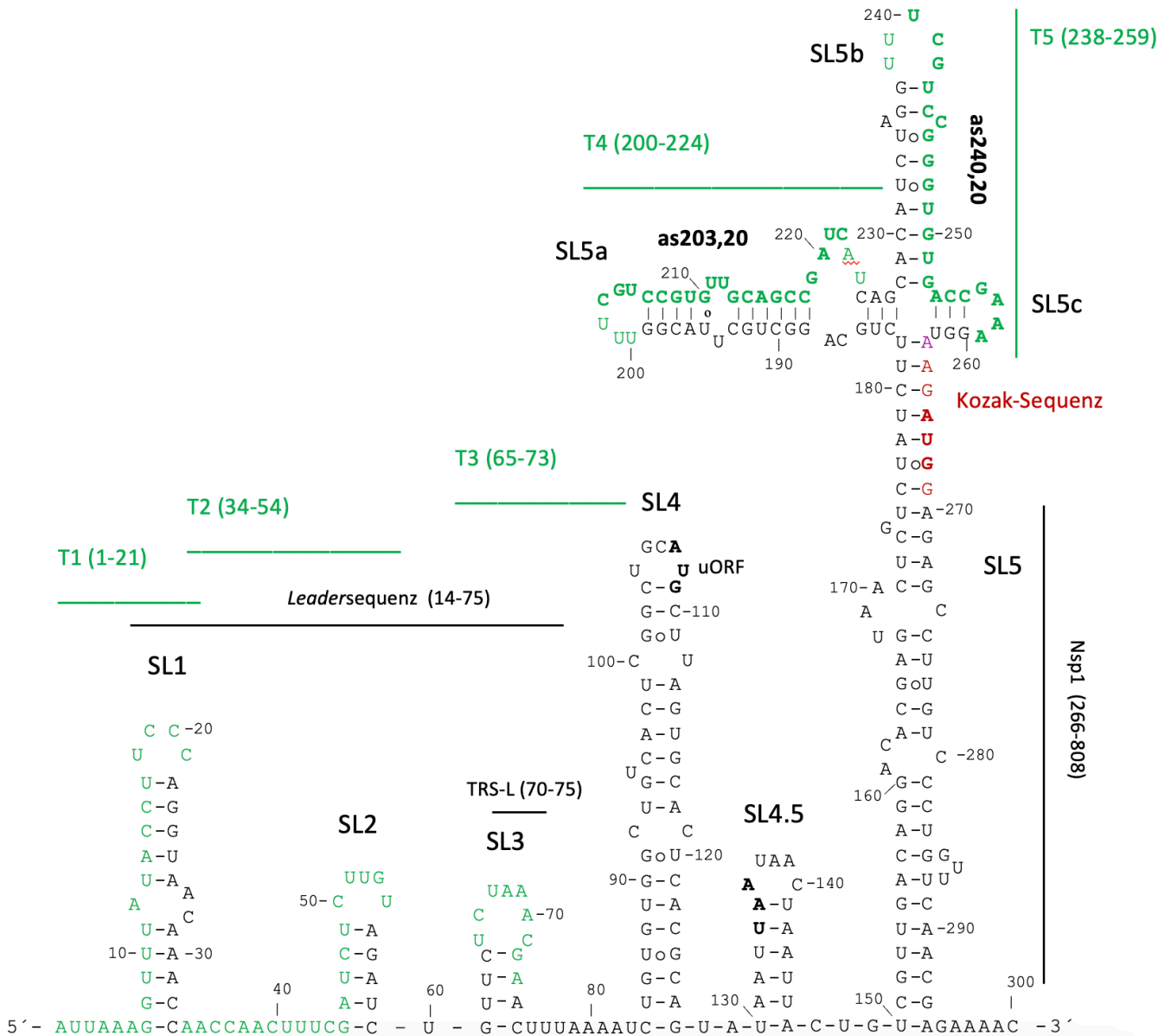


Abbildung 3.1 Sekundärstrukturvorhersage der 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2 und Zielgene.

Die Sekundärstruktur wurde mittels mfold-Software aus den ersten 300 Nukleotiden der Referenzsequenz NC_045512.2 erstellt. Die Zielgene (T1-5) sind in der Sequenz grün markiert. Das Start- und Stopcodon des uORFs ist jeweils fett markiert. Die Kozak-Sequenz ist rot markiert, wobei das Startcodon fett markiert ist. Die Stem-Loops sind mit „SL“ abgekürzt. Nsp1: *non-structural protein 1*. Die Position der ASOs as203 und as240 ist innerhalb der entsprechenden Zielsequenz dick markiert (Kap. 3.3).

Ergebnisse

Früh in der Pandemie wurde das Auftreten verschiedener Mutationen, hauptsächlich in der Spike-Protein-Region, festgestellt. Der erste besorgniserregende Subtyp war B.1.1.7, der erstmals im September 2020 in Großbritannien identifiziert wurde (Choi and Smith, 2021). In der Folge traten weitere Varianten auf, weshalb am 31. Mai 2021 ein neues Benennungssystem zur Klassifizierung von SARS-CoV-2-Subtypen eingeführt wurde. Dieses zielte darauf ab die Überwachung von Infektionen, die Infektionskontrolle und den Austausch von Forschungsdaten zu viraler Genomik und Epidemiologie zu verbessern. Die Subtypen wurden als *variants of interest* (VOI) oder *variants of concern* (VOC) kategorisiert.

Ein VOI zeichnet sich durch spezifische genetische Marker aus, welche die virale Übertragung, Diagnose, Behandlung oder Reaktion auf Impfungen beeinflussen können und möglicherweise verstärkte Maßnahmen im öffentlichen Gesundheitswesen erfordern. Ein VOC hingegen ist gekennzeichnet durch erhöhte Übertragbarkeit, schwerere Krankheitsmanifestation, einen erheblichen Rückgang der Immunantwort im Vergleich zur vorherigen Infektion oder Impfung, verringerte Wirksamkeit von Behandlungen oder verminderte diagnostische Nachweisbarkeit (Parums, 2021). Die VOIs und VOCs wurden nach einem neuen pathogenen-Linien-Nomenklatorsystem klassifiziert. Dieses wurde mit der massenhaften Isolation und Veröffentlichung von SARS-CoV-2-Sequenzen 2021 als *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak* (Pango)-Nomenklatorsystem eingeführt. Hierbei handelt es sich um ein automatisiertes und skalierbares System zur Bestimmung von Virenstämmen aus großen genomischen Datensätzen (McBroome *et al.*, 2024).

Unter Verwendung der NCBI-Virusdatenbank wurden in dieser Arbeit mehrere Abgleiche durchgeführt, um Mutationen in der 5'-UTR-Sequenz der VOCs von SARS-CoV-2 zu identifizieren (Tab. 3.1). Als Referenzsequenz diente das Wuhan-Hu-1 Isolat NC_045512.2 aus der NCBI-Datenbank, welches am 18. Juli 2020 hinzugefügt wurde und aus 29903 Basenpaaren besteht. Die Sequenz stammt von einem Marktarbeiter in Wuhan (China), der im Dezember 2019 aufgrund von COVID-19 Symptomen im Krankenhaus stationär aufgenommen wurde. Die RNA-Sequenzierung seiner Speichelprobe führte zur Identifizierung der Sequenz, die seitdem als allgemeine Referenzsequenz für SARS-CoV-2 verwendet wird (F. Wu *et al.*, 2020). Aus der NCBI-Virus-Datenbank (SARS-CoV-2 *Data Hub*), in die bisher 9,1 Mio. Sequenzen hochgeladen wurden (Stand März 2025), wurden mehrere Sequenzen der VOCs entnommen und mit der Referenzsequenz verglichen. Mutationen, die in mehr als einer Sequenzprobe vorkamen, wurden in Tabelle 3.1 aufgenommen und der Einfluss dieser Mutationen auf die Sekundärstruktur untersucht. Zur Vorhersage der Sekundärstrukturen der Zielsequenzen wurde die Software mfold Version 2.3 verwendet (Zuker, 2003), die in der Software Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG) integriert ist. Die Sekundärstrukturen der mutierten Varianten wurden mit der Sekundärstruktur der Referenzsequenz verglichen. Ein Alignment der Primärsequenzen der VOCs sowie die Sekundärstrukturen der 5'-UTRs befinden sich im Anhang (Abb. 6.1 und 6.2).

Tabelle 3.1 Liste der VOCs mit den Mutationen in der 5'-UTR-Sequenz. Mittels Alignment der Primärsequenzen der 5'-UTRs der VOCs wurden die Mutationen bezogen auf die Referenzsequenz NC_045512.2 identifiziert und in der dritten Spalte zusammengefasst. Sowohl die WHO-Bezeichnung als auch die Pango-Linie sind in der Tabelle aufgeführt.

WHO-Bezeichnung	Pango-Linie	Mutation
Alpha	B.1.1.7	C241U
Beta	B.1.351	C241U, G174U
Gamma	P.1	C241U
Delta	B.1.617.2	C241U, G210U
Omikron	B.1.1.529	C241U
BA.1	B.1.1.529.1	C241U, C21U
BA.1.1	B.1.1.529.1.1	C241U, C21U
BA.2	B.1.1.529.2	C241U, C44U
BA.3	B.1.1.529.3	C241U
BA.4	B.1.1.529.4	C241U, C44U
BA.5	B.1.1.529.5	C241U, C44U, G101A

Die Tabelle 3.1 zeigt, dass die 5'-UTR eine konservierte Region im viralen Genom darstellt. Die C241U-Mutation, die früh in der Evolution von SARS-CoV-2 aufgetreten ist, bleibt bei allen Varianten konsistent (Abb. 6.2 B). Diese Mutation befindet sich im SL5b und beeinflusst die Sekundärstruktur nicht, da sie in einer *Loop*region auftritt. Dieser *Loop* enthält keine Adenin-Basen, wodurch die hinzugekommene Uracil-Base die Struktur nicht verändert. Die neuesten VOCs zeigen insbesondere eine zusätzliche Mutation in der hoch konservierten *Leader*sequenz (Pos. 14-75) (Mohammadi-Dehcheshmeh *et al.*, 2021) an Position 44 (C→U) (Abb. 6.2 F, G). Auch diese Mutation hat keinen Einfluss auf die ermittelte und energetisch günstigste Sekundärstruktur, da sie sich in einem ungepaarten Bereich befindet, der als *Pseudoknot* 1 (PK1) bezeichnet wird (Miao *et al.*, 2021). SL2 folgt auf diesen Bereich und enthält in 5'-Richtung ein einzelnes ungepaartes Uracil-Nukleotid, welches nach mfold-Analysen mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit eine Bindung mit der mutierten Base eingehen würde. Die Mutationen G174U in B.1.351, G210U in B.1.617.2 und C21U in BA.1 und BA.1.1 konnten sich nicht etablieren und verschwanden in den nachfolgenden Varianten, wobei G210U die *Bulge*-Struktur im SL5 an Position 211-213 um eine Base vergrößert hat (Position 210-213), da die vorher bestehende nicht-kanonische G-U Verbindung aufgelöst wurde (Abb. 6.2 D). Dies hatte keinen weiteren Effekt auf die Ausbildung des SL5a. Die Mutationen G174U und C21U hatten keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur (Abb. 6.2 C, E).

Die Mutation G101A, die neu in der Variante BA.5 aufgetreten ist, bietet einen Vorteil für die Stabilität des *Stem-Loop* 4 (SL4), da sie die G-U-Basenpaarung in eine stabilere A-U-Basenpaarung umwandelt (Abb. 6.2, G).

Laut WHO (Stand 04.2025) sind alle bisher bekannten VOCs deeskaliert und keine weiteren sind hinzugekommen.

3.2. Sekundärstrukturvorhersage der SARS-CoV-2 5'-UTR und Definierung der lokalen Zielsequenzen

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, wurde die 2D-Sekundärstruktur der 5'-UTR von SARS-CoV-2 mithilfe der mfold-Software (2D-fold) vorhergesagt. Hierfür wurde die Referenzsequenz des Wuhan-Hu-1 Isolats (NC_045512.2) aus der NCBI-Datenbank verwendet. Der Algorithmus generiert die energetisch günstigsten Konformationen und gibt diese mit den entsprechenden Gibbs-Freien-Energieänderungen (ΔG -Werten) aus. Die mfold-Software erstellt dabei unter anderem sogenannte *Squiggles*-Dateien, die verschiedene Faltungsmuster bei unterschiedlichen ΔG -Werten darstellen. Das Faltungsmuster mit dem geringsten ΔG -Wert gilt als energetisch günstigsten und somit als das wahrscheinlichste (Will and Jabbari, 2016). Die energetisch günstigste Sekundärstrukturvorhersage der 5'-UTR von SARS-CoV-2 wurde auf diese Weise systematisch *in-silico* erzeugt und in Abbildung 3.1 dargestellt. Diese entspricht den experimentellen Ergebnissen der Studie von Miao *et al.*, in der die Sekundärstruktur mittels strukturellem *probing* mit RNase V1 ermittelt wurde (Miao *et al.*, 2021).

Die vorhergesagte Zielstruktur umfasst alle funktionellen *Stem-Loops* SL 1, SL2, SL3, SL4, SL4.5 und SL5, wobei SL5 in SL5a, SL5b und SL5c unterteilt ist. Die *Leader*sequenz erstreckt sich von Position 14 bis 75 und ist jeder subgenomischen RNA vorangeschaltet. Sie beinhaltet die TRS-L-Sequenz, die in Position 70–75 liegt und für die diskontinuierliche Transkription und somit die Generierung der sgRNAs essentiell ist (Pandey and Verma, 2021).

Zwischen SL1 und SL2 befindet sich ein Bereich aus 11 konsekutiv ungepaarten Nukleotiden (Pos. 34-44). Auch der Bereich zwischen SL3 und SL4 umfasst eine Sequenz aus acht ungepaarten Nukleotiden (Pos. 76-83). Die Positionen 34-40 und 75-80 können die *Pseudoknot*-Strukturen PK1 und PK2 ausbilden, die die Zugänglichkeit beeinträchtigen könnten (Miao *et al.*, 2021).

Das uORF beginnt an Position 107 in der *Loop*region des SL4 und endet an Position 136 mit dem Stopcodon UAA im *Loop* des SL4.5.

Im Bereich des Startcodons (Pos. 266-268) befindet sich eine imperfekte Kozak-Sequenz mit den Basen AAGAUGG (Kozak, 1987), die nach Condé *et al.*, trotz Vorhandensein des uORFs zu einer gesteigerten Translationseffizienz führen kann (Condé *et al.*, 2022). In 5'-Richtung des Startcodons liegt die Sequenz, die für das Nsp1, das erste Gen des *open readingframes* ORF1a, codiert (Abb. 3.1). Die ersten 25 Nukleotide dieser Sequenz sind essenziell für das Ausbilden der Stammstruktur des SL5.

Anhand dieser Sekundärstrukturvorhersage wurden die Zielregionen T1 bis T5 definiert (Abb. 3.1). Diese Regionen umfassen mindestens fünf aufeinanderfolgende ungepaarte Nukleotide, um die Bindung und das Einfädeln von Oligonukleotiden zu ermöglichen (Far *et al.*, 2004).

Die Zielsequenz T1 liegt in Position 1 bis 21. Dieser Bereich ist für Oligonukleotide mit sechs ungepaarten Nukleotiden am 5'-Ende und einer vier Nukleotide langen *Loop*region ab Position

Ergebnisse

18 im SL1 3'-Ende zugänglich. T2 befindet sich an Position 34-54 innerhalb der *Leader*sequenz und umfasst 11 konsekutiv ungepaarte Nukleotide im 5'-Bereich sowie die *Loop*sequenz des SL2 (Position 50-54) im 3'-Bereich, wobei die 5'-PK1-Struktur die Zugänglichkeit beeinträchtigen könnte. Bei dieser Zielstruktur handelt es sich um einen Bereich, der auch in sgRNAs vorkommt. Die Zielsequenz T3 liegt an Position 65-83 und beginnt im SL3 mit einer sieben Nukleotid langen *Loop*sequenz, gefolgt von acht ungepaarten Nukleotiden ab Position 76, deren Zugänglichkeit durch PK2 beeinträchtigt sein könnte.

Die Zielsequenz T4 befindet sich im SL5, beginnt an Position 200 in der *Loop*region von SL5a und erstreckt sich bis Position 224. Dieser Bereich enthält sechs ungepaarte Nukleotide in der *Loop*region von SL5a und einen *Bulge* mit sechs ungepaarten Nukleotiden (Position 219-224), was zwei mögliche Einfädelungsstellen bietet. Die letzte Zielsequenz T5 befindet sich im Bereich 238-259. Sie beginnt im *Loop* von SL5b, welcher fünf Nukleotiden umfasst, und endet im *Loop* von SL5c mit vier konsekutiv ungepaarten Nukleotiden.

Zur Analyse der Zielstrukturen wurde zusätzlich das Faltungspotenzial für jedes Nukleotid der 5'-UTR einschließlich des Startcodons mit 268 Nukleotiden berechnet. Der 3'-Bereich des Nsp1 wurde für diese Analyse nicht einbezogen, da dieser bei Verwendung der 5'-UTR zur Klonierung in den pNL-TK-CoV2wt-Vektor nicht von Bedeutung war (Abb. 3.5). Die entsprechende mfold-2D-Struktur für die 268 Nukleotid lange Sequenz der 5'-UTR befindet sich im Anhang (Abb. 6.3). Diese zeigt, dass sich der SL5 aufgrund der fehlenden Nsp1-Sequenz nicht vollständig ausbilden konnte. Alle weiteren *Stem-Loops* einschließlich SL5a-c blieben erhalten, sodass die Zielstrukturen für Antisense-Oligonukleotide weiterhin zugänglich waren. Zusätzlich kamen zwischen SL4.5 und SL5a zwei weitere *Stem-Loops* hinzu.

Das Faltungspotenzial der 5'-UTR aus der Referenzsequenz von SARS-CoV-2 wurde mithilfe der Software *Visual Gene Developer* errechnet, und stellt die Gibbs-Freie-Energiewertänderung für jedes Nukleotid innerhalb einer spezifischen Struktur dar. Im Folgenden wird das Faltungspotenzial, dargestellt durch ΔG an jeder Position in kJ/mol, für die oben genannte Struktur analysiert, wobei Fensterlängen von 30, 50 und 100 Nukleotiden und eine Schrittlänge von 1 gewählt wurden. Diese feingliedrige Einstellung ermöglicht es für jedes Nukleotid der Zielsequenz die freie Energie der möglichen Strukturen in diesem Fenster Schritt für Schritt zu berechnen. Diese Analyse beinhaltet die Berechnung des lokalen Faltungspotenzials (LFP) und die Evaluierung von sekundären RNA-Strukturen mit niedrigem ΔG , um zugängliche Zielstrukturen zu identifizieren (Will and Jabbari, 2016). Die LFP-Berechnung basiert auf der Ermittlung der minimalen ΔG von Sekundärstrukturen an einer gegebenen Sequenzposition innerhalb eines definierten Fensters. Subregionen mit einem hohen ΔG -Wert und damit einem niedrigen LFP deuten auf ungepaarte Bereiche hin, was sie zu geeigneten Zielen für Wirkstoffe macht (Sczakiel *et al.*, 1993). Das Faltungspotenzial wurde in Abbildung 3.2 dargestellt.

Ergebnisse

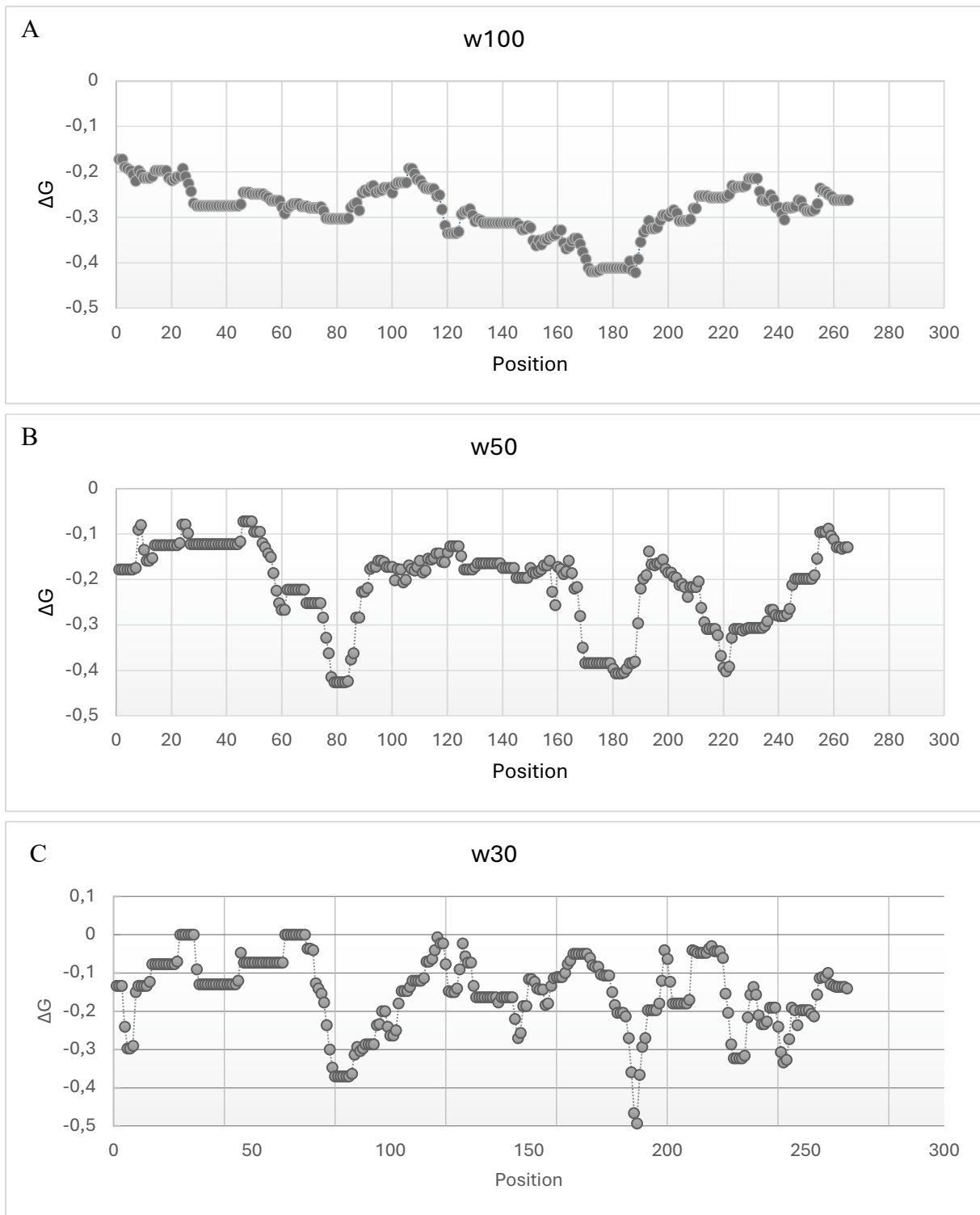


Abbildung 3.2 Faltungspotenzial der 5'-UTR von SARS-CoV-2. Das Faltungspotenzial der 5'-UTR von SARS-CoV-2 wurde mittels *Visual Gene Developer 1.9 Build 785 Software* errechnet und mit Microsoft Excel dargestellt. Die Änderung der Gibbs-Freien-Energie ΔG wurde für jede Position der Sequenz aufgetragen. Die Fensterweite (w) beträgt 100 nts (A), 50 nts (B) und 30 nts (C).

Für Abbildung 3.2 A wurde ein Fenster von 100 Nukleotiden gewählt, um einen ersten Überblick zu erhalten. Das Diagramm zeigt die ΔG für das Faltungsmuster, aufgetragen gegen die Sequenzposition. In Abbildung 3.2 A konnte der geringste Wert mit etwa -0,42 kJ/mol bei

Position 171-185 ermittelt werden. Dieser Bereich befindet sich im neu generierten *Stem-Loop* zwischen SL4.5 und SL5a und weist auf ein besonders hohes Bildungspotenzial dieser Struktur hin (Sczakiel, 1997).

Eine detailliertere Analyse war durch die Bestimmung kleinerer Fenster möglich. Mit einer Fenstergröße von 50 Nukleotiden blieb das lokale Minimum im Bereich 171-185 Nukleotide mit einem minimalen Wert von -0,41 kJ/mol erhalten (Abb. 3.2 B). Zusätzlich traten weitere Minima auf. Diese lagen mit -4,3 kJ/mol an Position 79-83 im PK2 sowie an Position 221 mit -4,0 kJ/mol im SL5a. Die hohe Stabilität des SL5 machte die Zielsequenz zu einem vielversprechenden Angriffspunkt für Oligonukleotide.

Um eine detailliertere Faltungsanalyse von kürzeren Abschnitten der 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2 durchzuführen, wurde zusätzlich eine Fenstergröße von 30 nts eingestellt (Abb. 3.2 C). Das größte Minimum befand sich an Position 189 im SL5a (Abb. 3.1) mit einem ΔG von -0,49 kJ/mol. Ein weiteres Minimum des SL5a, das in den SL5b reicht, liegt an Position 223-228 mit -0,32 kJ/mol. Dieses weist auf eine besonders gut konservierte Faltung in dieser Region hin, die die Zielregion T4 beinhaltet. Weiterhin befindet sich mit einem ΔG -Wert von -0,29 kJ/mol ein Minimum an Position 4-7 sowie an Position 79-86 mit einem minimalen ΔG -Wert von -0,37 kJ/mol. Dieses Minimum umfasst die Zielstruktur T1 und den PK2 sowie die ersten Nukleotide des SL4. Das nächste Minimum liegt an Position 146-147 mit -0,27 kJ/mol im SL4.5 sowie an Position 241-244 mit -0,33 kJ/mol und beinhaltet die *Loop*struktur des SL5b. Die Positionen 24-29 und 62-69 hatten mit 0 kJ/mol die höchsten ΔG -Werte. Sie liegen im 5'-Bereich des SL1 sowie im SL3, das die Zielregion T3 beinhaltet.

3.3. Entwurf von SARS-CoV-2 gerichteten Oligonukleotiden

Das Design von Antisense-Oligonukleotiden (ASOs), die auf den 5'-untranslatierten Bereich von SARS-CoV-2 abzielen, basiert primär auf der vorhergesagten Sekundärstruktur der Ziel-mRNA, welche mithilfe der Software mfold Version 2.3 (Zuker, 2003) erstellt wurde. Anhand dieser Struktur wurden lokal günstige Sekundärstrukturen, wie terminale und interne Schleifen, Sequenzen und Ausbuchtungen von fünf oder mehr aufeinanderfolgenden ungepaarten Nukleotiden identifiziert (Far *et al.*, 2005; Kretschmer-Kazemi Far *et al.*, 2001).

In Abbildung 3.3 ist der Prozess von der Analyse der Sekundärstruktur bis zur Synthese des Oligonukleotids dargestellt. Bei der Generierung der ASOs wurden etablierte Kriterien, wie sie zuvor von Far *et al.* beschrieben wurden, berücksichtigt. Dazu gehört, dass die Länge des Oligonukleotids mindestens 18 bis maximal 23 Nukleotide umfasst. Zudem wurden spezifische Charakteristika der ASOs wie Schmelztemperaturen (T_m) im Bereich von 50 °C bis 65 °C sowie eine minimale Anzahl von CpG-Motiven berücksichtigt. Das Faltungspotenzial für intramolekulare Haarnadelstrukturen und Selbstdimerisierung wurde mithilfe des *Oligonucleotides Properties Calculator* untersucht. Ebenso wurde darauf geachtet, die Bildung stabiler G-Quartett-Komplexe zu vermeiden. Des Weiteren wurden C-reiche Abschnitte in den Oligonukleotiden bevorzugt, die mit hoher biologischer Aktivität assoziiert sind (Chen and Ho, 2023; Far *et al.*, 2004b).

Basierend auf diesen Kriterien wurden zehn ASOs aus einem Pool von über 200 Entwürfen ausgewählt und von Metabion synthetisiert. Zur Vermeidung schwerwiegender *off-target*-Ereignisse wurde zusätzlich eine NCBI-BLAST-Analyse durchgeführt.

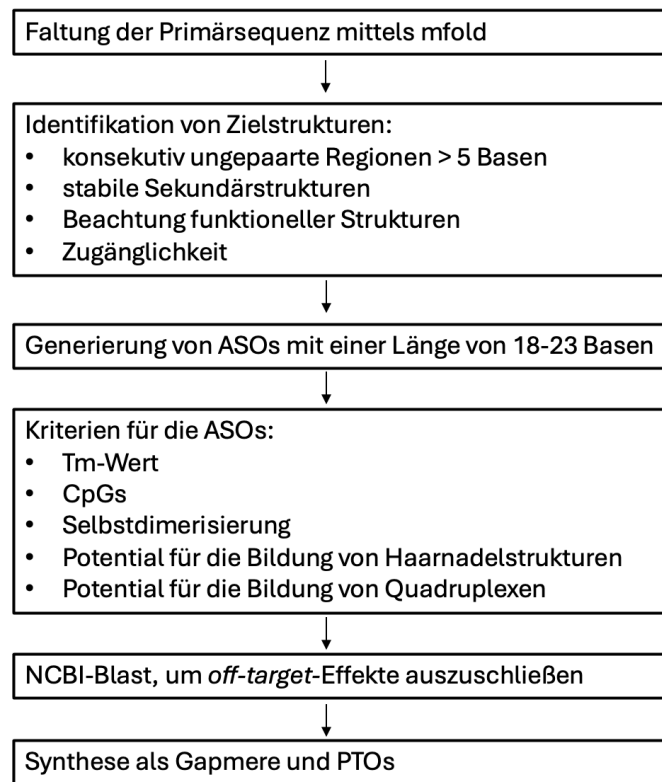


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Designs der Antisense-Oligonukleotide. Die chronologische Abfolge für das Design der ASOs von der Faltung der Primärsequenz bis zur Synthese ist hier in einem Flusschema dargestellt.

ASOs haben die Eigenschaft, stabile DNA-RNA-Hybridstrukturen zu bilden. Um jedoch als einzelsträngige DNA zur Zielsequenz zu gelangen, ohne von Nukleasen abgebaut zu werden, benötigen sie Modifikationen.

Die Oligonukleotide wurden daher als vollständige Phosphorothioate (PTOs) synthetisiert. Hierbei wurde an jeder Phosphatgruppe des Oligorückgrats ein nicht-bindendes Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt. Dies verbessert die Stabilität gegenüber Nuklease-induzierter Degradation, da PTOs von diesen nicht erkannt werden (Østergaard *et al.*, 2020). Die PTO-Modifizierung beeinträchtigt weder die Thermostabilität noch die Fähigkeit, von RNase H erkannt zu werden. Zudem verlängert die Modifikation die Bioverfügbarkeit und erhöht die Lipophilie, was die zelluläre Aufnahme verbessert (Genna *et al.*, 2023). Weiterhin erhöht die Modifikation die Affinität zur Zielsequenz und verbessert die zelluläre Aufnahme (Crooke *et al.*, 2020). Darüber hinaus wurden die ASOs als Gpmere synthetisiert. Dafür wurden sie mit jeweils vier Ribonukleotiden flankiert, die jeweils eine 2'-O-Methylierung (2'OMe) an der Ribose aufweisen. Diese Modifizierung verbessert die Bindung an die Zielsequenz, schützt die ASOs vor Degradation in der Zelle und stimuliert den RNase H-Mechanismus (Dhuri *et al.*, 2020) (Crooke *et al.*, 2021). Die verbesserte Affinität zur Zielsequenz geht mit weniger *off-*

target-Effekten einher (Dhuri *et al.*, 2020). Zudem reduziert die 2'-OMe-Modifizierung das proinflammatorische Potenzial der ASOs und verringert die Immunogenität (Crooke *et al.*, 2021).

Die zehn ausgewählten ASO-Kandidaten sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Die Benennung erfolgte nach folgendem Schema: Die Abkürzung „as“ kennzeichnet ein Antisense-Oligonukleotid. Die erste Zahl gibt die Position der ersten Base des ASOs auf der Zielsequenz an, während die zweite Zahl die Länge des ASOs angibt. Beispielsweise hat das ASO as19,20 eine Länge von 20 Nukleotiden und bindet die Zielsequenz von Position 19 bis 38 (Abb. 3.1). Zusätzlich zu den zehn ASOs wurden Negativkontrollen verwendet, um unspezifische Effekte auszuschließen. Die *scramble*-Kontrolle asScr ist eine zufällig generierte ASO-Sequenz mit denselben chemischen Modifikationen wie die verwendeten ASOs. Die weiteren Kontrollen, asCtr1 und asCtr2, besitzen ebenfalls dieselben chemischen Modifikationen, während die Sequenzen gegen Ago1 und 3 gerichtet sind. Sie wurden vom Institut für Molekulare Medizin zur Verfügung gestellt. Alle drei Kontrollen sind für das System verwendbar, da sie nach Alignment-Analysen keine Komplementarität zum Testsystem aufwiesen.

Tabelle 3.2 Bezeichnung und Sequenz der ersten 10 ausgewählten ASOs. Als Kontrollen wurden asScr, asCtr1 und asCtr2 verwendet. Die entsprechenden Sequenzen sind von 5'→3' angegeben. Bei unterstrichenen Bereichen handelt es sich um 2'-O-Methylierungen. Bei allen ASOs handelt es sich um Gapmere, wobei alle Internukleotid-Verknüpfungen Phosphorothioat-modifiziert sind.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
as19,20	<u>uggut</u> ggtttgttacc <u>uggg</u>
as20,21	<u>guugg</u> ttggtttgttacc <u>ugg</u>
as23,20	<u>aagut</u> ggttggttt <u>gtuacc</u>
as35,21	<u>uacaag</u> agatcgaa <u>agtuggu</u>
as80,20	<u>agugac</u> agccacacag <u>auuu</u>
as203,20	<u>gaucgg</u> ctgcaacac <u>ggacg</u>
as203,22	<u>augat</u> cggctgcaacac <u>ggacg</u>
as220,22	<u>gaaac</u> ctagatgtgct <u>gaugau</u>
as222,20	<u>gaaac</u> ctagatgtgct <u>gaug</u>
as240,20	<u>uuucg</u> gacacacc <u>ggacga</u>
asScr	<u>uaccg</u> ctctttt <u>gactuuu</u>
asCtr1	<u>gauct</u> tagggatgtcc <u>accuc</u>
asCtr2	<u>gguc</u> agaccagt <u>gaguuc</u>

Um *off-target*-Effekte zu vermeiden, wurde ein NCBI-Nukleotid-BLAST auf der NCBI-Website durchgeführt (Tab. 3.3). Dafür wurden mRNAs aus der Standarddatenbank mit der Einstellung „homo sapiens (taxid: 9606)“ durchsucht. Der Algorithmus „megablast“ wurde ausgewählt, um eine hohe Spezifität zu gewährleisten. Die maximale Anzahl der ausgegebenen

Ergebnisse

Zielsequenzen wurde auf 5000 eingestellt, alle weiteren Parameter blieben bei den Standardeinstellungen.

Ab einer Länge von 15 Nukleotiden können *off-target*-Effekte funktionelle Bereiche darstellen, wobei entweder die Zielsequenz mittels RNase H gespalten werden kann oder die Translation blockiert wird (Crooke *et al.*, 2020). Die Gensequenzen, zu denen die ASOs mit 15 oder mehr Nukleotiden konsekutiv komplementär sind, wurden in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Bei den ASOs as240,20m, as240,20.2 und as242,18 handelt es sich um mutierte Formen von as240, die in Kapitel 3.4.2.4 eingesetzt und näher besprochen werden. Die *off-target*-Effekte für die ASOs, die im späteren Verlauf der Arbeit relevant wurden, sind in Kapitel 3.4.1.3 detaillierter aufgeführt.

Tabelle 3.3 NCBI-BLAST-Analyse der ASOs. Für alle in dieser Arbeit verwendeten ASOs wurde eine BLAST-Analyse gegen humane mRNA-Sequenzen durchgeführt. Alle *off-target*-Effekte mit einer Länge von mehr als 15 konsekutiv aufeinanderfolgenden Nukleotiden wurden aufgeführt. Die entsprechenden Sequenzen sind von 5'→3' angegeben. Bei unterstrichenen Bereichen handelt es sich um 2'-O-Methylierungen. Bei allen ASOs handelt es sich um Gapmere, wobei alle Internukleotid-Verknüpfungen Phosphorothioat-modifiziert sind.

ASO	Sequenz (5'→3')	Anzahl der „ <i>off-targets</i> “	Länge [nts]
as19,20	<u>uggutgg</u> tttgttacc <u>uggg</u>	1	15
		2	16
		9	17
as20,21	<u>guuggttgg</u> tttgttacc <u>cugg</u>	14	15
		5	16
		1	17
as23,20	<u>aagutgg</u> ttggtttgt <u>uacc</u>	11	15
		8	16
as35,21	<u>uacaag</u> agatcgaaagt <u>uggu</u>	11	15
		3	16
as80,20	<u>agug</u> acagccacacag <u>auuu</u>	12	15
		7	16
		1	17
		1	18
as203,20	<u>gaucgg</u> ctgcaacac <u>ggacg</u>	5	15
		1	19
as203,22	<u>augat</u> cggctgcaacac <u>ggacg</u>	1	16
		1	17
		1	20

Ergebnisse

as220,22	<u>gaaacctagatgtgctgaugau</u>	1	15
		5	16
		1	20
as222,20	<u>gaaacctagatgtgctgaug</u>	4	15
		4	16
as240,20	<u>uuucggacacaccccgacga</u>	1	15
		1	17
as240,20m	<u>uuucggtcacaccccgacga</u>	0	-
as240,20.2	<u>uuucggacacacccggacaa</u>	3	15
		1	16
as242,18	<u>uuucggacacacccggac</u>	2	15

3.4. Hemmstudien in einem plasmidbasierten Testsystem mit SARS-CoV-2 Zielsequenzen

Die Wirksamkeit der *in-silico* generierten ASOs wurde zunächst in dem folgenden Testsystem untersucht. Das System beinhaltet das Plasmid pNL-TK-CoV2wt mit einer rekombinanten Expressionskassette, die den HSV-TK-Promotor (*human thymidine kinase gene promoter*), die 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2 und das Nano-Luciferasegen umfasst.

Die Nano-Luciferase war ursprünglich im Vektor pNL1.1[Nluc] (Promega) codiert. In diesen Vektor wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und NcoI die von Metabion synthetisierte 5'-UTR stromaufwärts des Luciferasegens eingefügt. Anschließend wurde der HSV-TK-Promoter, der mithilfe der Enzyme KpnI und HindIII aus dem Vektor pGL4.74 [hRluc] entnommen wurde, stromaufwärts der 5'-UTR eingefügt. Der entstandene Vektor wurde als pNL-TK-CoV2wt bezeichnet (Abb. 6.4). Am 3'-Ende des 5'-UTRs ist eine optimale Kozak-Sequenz (ACCATGG) entstanden, nachdem dieses Ende zur Klonierung mit einer NcoI-Restriktionstelle (CCATGG) modifiziert wurde, was eine Steigerung der Translationseffizienz zur Folge haben könnte (Abb. 3.5). Die ursprüngliche Translationsstartstelle in SARS-CoV-2 ist AAGAUGG. Aufgrund der Generierung der NcoI-Schnittstelle ist jedoch zusätzlich eine interne KnpI-Schnittstelle in der 5'-UTR entstanden, die eine ordnungsgemäße Klonierung verhindert hätte. Dieses Problem wurde durch einen Basenaustausch an Position 262 (T→A) behoben. Um die ursprüngliche Sekundärstruktur nicht zu verändern, wurde ein weiterer Basenaustausch an Position 253 vorgenommen (A→T), sodass die Basenpaarung zwischen den Nukleotiden an den Positionen 253 und 262 ermöglicht werden kann (die modifizierte 5'-UTR-Sequenzabfolge aus pNL-TK-CoV2wt befindet sich im Anhang, Abb. 6.5 A).

Die mfold-Analyse der 5'-UTR im entstandenen pNL-TK-CoV2wt-Vektor (Plasmidkarte befindet sich im Anhang, Abb. 6.4) zeigte, dass die ursprüngliche Struktur von SL5 aufgrund des Fehlens der Nsp1-Sequenz, die durch das Nano-Luciferasegen ersetzt wurde, nicht gebildet wurde. Stattdessen erzeugt das Luciferasegen eigene *Stem-Loops* (Abb. 3.5). Die *Stem-Loops* SL5a, b und c sind in diesem System konserviert und repräsentieren die hier relevanten

Ergebnisse

Zielstrukturen. Darüber hinaus entstand ein zusätzlicher *Stem-Loop* zwischen SL4.5 und SL5a, der in der unmodifizierten viralen Struktur nicht vorhanden ist (Abb. 3.1). Auch die IRES-ähnliche (*internal ribosome entry site*) Struktur ist in unserem Testsystem nicht vorhanden, da ihre Bildung von der Anwesenheit der Nsp1-Sequenz abhängt. Die anderen sekundären Strukturen bleiben jedoch im Vergleich zur viralen Struktur unverändert.

Das Testsystem basiert auf dem Luciferasesignal, das in den Zellen akkumuliert und gemessen wird. Eine potenzielle Fehlerquelle ist die Zellzahl, die nach Transfektion und Waschvorgängen in den Wells variieren kann. Um diese Fehlerquelle auszugleichen und zudem sicherzustellen, dass die Zellen vital sind und Luciferasen exprimieren, wurde das Signal der Nano-Luciferase gegen eine Kontrolle normalisiert. Die Kontrolle für das Testsystem ist das pGL3-Control-Plasmid, das die Firefly-Luciferase kodiert. Dem Firefly-Luciferasegen ist ein SV40-Promoter vorgeschaltet, der im Vergleich zum HSV-TK-Promoter eine stärkere Expression ermöglicht (Toktay *et al.*, 2022). Dies kompensiert das schwächere Signal der Firefly-Luciferase im Vergleich zur Nano-Luciferase. In HEK293-Zellen agiert der SV40-Promoter besonders effizient, da er in Kombination im dem T-Antigen zu einer erhöhten Transkriptionseffizienz führt (Gruda *et al.*, 1993).

Weiterhin ist das Testsystem dadurch charakterisiert, dass alle Versuche in 24-Well-Platten durchgeführt wurden. Die Plasmide pGL3-Control und pNL-TK-CoV2wt wurden zusammen mit definierten Konzentrationen an Oligonukleotiden co-transfiziert. Nach 48 h wurde der DLR-Assay durchgeführt. Zur Datenanalyse wurde zunächst der Mittelwert aus den Hintergrunddaten berechnet und von den anderen Werten abgezogen. Der Hintergrundwert stammt aus Wells mit untransfizierten Zellen. Jede Probe wurde, wenn nicht anders beschrieben, in dreifacher Bestimmung ($n = 3$) transfiziert. Aus jedem dieser drei Replikate wurde jeweils $2 \times 30 \mu\text{l}$ des Lysats im Luciferase-Assay eingesetzt. Die Mittelwerte der Nano-Luciferasesignale wurden gebildet und anschließend mit den Mittelwerten der Firefly-Luciferasesignale normalisiert. Aus diesen Mittelwerten wurde die Standardabweichung berechnet und in Form von Fehlerbalken in den entsprechenden Diagrammen dieses Kapitels angegeben.



Abbildung 3.4 Schematisches Transfektionsprotokoll für das vorliegende Testsystem. Zeitliches Modell der Transfektion vom Zeitpunkt 0 h – 48 h. Transfektion der Plasmide und Oligonukleotide zum Zeitpunkt 0 h. Waschen der Zellen und Zugabe von DMEM 10 % FCS zum Zeitpunkt 4 h und Zellyse sowie DLR-Assay zum Zeitpunkt 48 h.

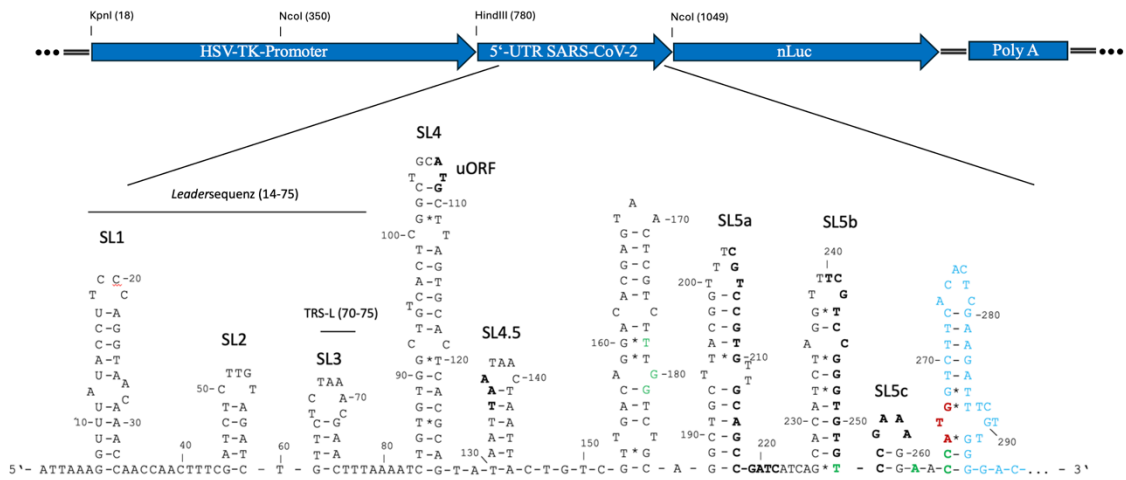


Abbildung 3.5 Ausschnitt aus dem pNL-TK-CoV2wt-Vektor und vergrößerte 5'-UTR. Abgebildet ist die rekombinante Expressionskassette bestehend aus dem HSV-TK-Promotor, der modifizierten 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2, dem Nano-Luciferasegen und dem Poly A-Signal. Die Sekundärstruktur der 5'-UTR im Vektor wurde mittels mfold-Software generiert. Zusätzlich sind die ersten 29 Nukleotide des Nano-Luciferasegens dargestellt. Die Zielregionen, an denen die Oligonukleotide as203 und as240 binden, sind fett hervorgehoben. Zudem ist das Start- und Stopcodon des uORFs fett markiert. Grün: ausgetauschte Nukleotide, rot, fett: Startcodon, blau: Nano-Luciferasegen. Vollständige Plasmidkarte befindet sich im Anhang (Abb. 6.4).

3.4.1 Funktionelle Studien zur Untersuchung der Antisense-Oligonukleotide

3.4.1.1 Überprüfung der Wirksamkeit der ASOs bei konstanter Konzentration

Studien haben gezeigt, dass ASOs trotz chemischer Modifikationen wie PTOs oder Gapmeren in hohen Dosen zytotoxisch wirken können (Jason *et al.*, 2004). Um eine potenzielle Zytotoxizität der ASOs auszuschließen, wurde zunächst ein Fluorescein-Diacetat (FDA)-Assay durchgeführt. FDA ist ein bipolares Molekül, das die Zellmembran penetrieren kann. Mittels Esterasen werden die Acetat-Seitenketten in Gegenwart von H₂O abgespalten und zu Essigsäure umgewandelt, wodurch das zuvor farblose FDA in Fluorescein umgewandelt wird. Metabolisch aktive Zellen mit intakten Zellmembranen können dann unter Anregung mit Licht (485 nm) analysiert werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der vitalen Zellen. Für den Assay wurden die ASOs mit einer Konzentration von 10 nM verwendet und mit pNL-TK-CoV2wt sowie pGL3-Control co-transfiziert. Die Fluoreszenz wurde anschließend mit dem *Clariostar Plate Reader* gemessen und im Vergleich zur Leerkontrolle (-), in der keine ASOs eingesetzt wurden, bewertet. Die Leerkontrolle sollte zeigen, dass die Plasmide bei den eingesetzten Konzentrationen nicht zytotoxisch wirken. Der Hintergrundwert, bei dem untransfizierte Zellen verwendet wurden, wies die höchste Viabilität auf. Der Einsatz der Plasmide in der Leerkontrolle verringerte die Viabilität um 15 %. Die getesteten ASOs waren as19,20, as20,21, as23,20, as35,21, as80,20, as203,20, as203,22, as220,22, as222,20, as240,20, asScr, asCtr1 und asCtr2. Die Verringerung der Fluoreszenzsignale betrug jeweils 25 %, 40 %, 54 %, 57 %, 27 %, 24 %, 26 %, 0 %, 12 %, 0 %, 39 %, 37 % und 14 % bezogen auf die Leerkontrolle. Die geringste Zellviabilität wurde für

Ergebnisse

as35,21 gemessen, mit einer Verringerung der Fluoreszenz um 57 %. Auch as23,20 senkte die Viabilität um 54 % (Abb. 3.6).

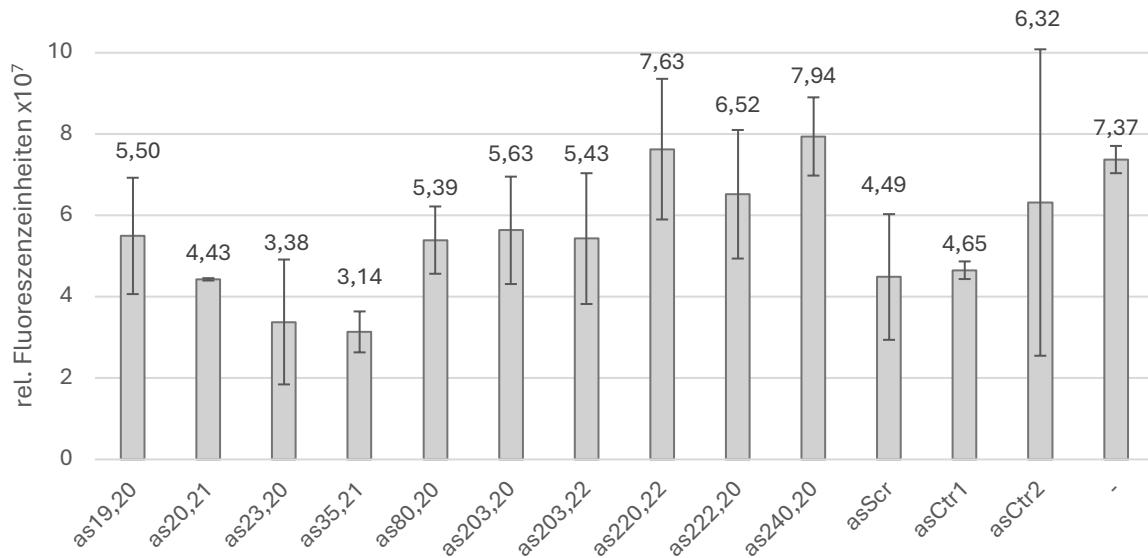


Abbildung 3.6 Vitalitätsmessung von HEK293T-Zellen nach Behandlung mit ASOs. Die ASOs wurden mit einer Konzentration von 10 nM in HEK293T-Zellen transfiziert und die Viabilität mittels FDA-Assay im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem bestimmt. Die Präparation der Ansätze sowie die Messung im Fluorometer erfolgten wie in Abschnitt 2.2.1.8 beschrieben. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Fluoreszenzmessung.

Alle ASOs bis auf as35,21 und as23,20 verringerten die Viabilität um weniger als 50 %. Für den nächsten Versuch wurden alle ASOs verwendet (Abb. 3.7), bevor die potentesten selektiert wurden.

Die *silencing*-Aktivität der ASOs wurde mittels Dual-Reporter-Assays ermittelt. In einem ersten Screening wurde die Hemmung der Luciferaseaktivität durch die zehn ausgewählten ASOs im Vergleich zu den Negativkontrollen analysiert. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit den Vektoren pNL-TK-CoV2wt, pGL3-Control sowie 100 nM des entsprechenden ASO co-transfiziert. Nach der Zelllyse wurde der DLR-Assay durchgeführt, wobei das Nano-Luciferasesignal mit dem Firefly-Luciferasesignal normalisiert wurde. Als Negativkontrollen wurden asScr, asCtr1 und asCtr2 verwendet. Diese sollten eine Fehlinterpretation der Ergebnisse aufgrund von unspezifischer Hemmaktivität durch Zugabe von ASOs verhindern. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Oligonukleotide in die Messung aufgenommen, um den Einfluss der Negativkontrollen auf das Testsystem zu zeigen und das unbehandelte Signal der Nano- und Firefly-Luciferase zu bestimmen. Aus den normalisierten Werten der biologischen Replikate wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 3.7).

Zur Quantifizierung der Messergebnisse wurde zunächst der Mittelwert der Negativkontrollen asScr, asCtr1 und asCtr2 berechnet, der bei 0,107 lag. Werte, die signifikant kleiner waren als dieser Mittelwert, wiesen nach diesem Testsystem eine Hemmwirkung auf. Mit einem

Ergebnisse

Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ wurde ein einseitiger vereinfachter t-Test durchgeführt. Dafür wurden die folgenden Formeln verwendet:

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad t = \frac{\bar{x} - \mu}{s(\bar{x})}$$

wobei n die Anzahl der Stichprobenwerte und s die Standardabweichung über alle Werte von n darstellt. Der Standardfehler des Mittelwertes ist $s(\bar{x})$. Der t-Wert errechnet sich aus dem Mittelwert, von dem der jeweilige Referenzwert abgezogen wird und wird durch den Standardfehler des Mittelwerts geteilt. Der Freiheitsgrad errechnet sich als $df = n - 1$.

In diesem Fall ergab sich für ein Signifikanzniveau von 5 % und $df = 9$ ein Grenzwert von 2,262. Wenn der errechnete t-Wert größer als 2,262 oder kleiner als -2,262 war, handelte es sich um eine signifikante Hemmwirkung bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen.

Der Test zeigte für die ASOs as35,21, as203,20, as220,22, as222,20 und as240,20 eine signifikante Hemmwirkung. Bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen wiesen as35,21, as203,20 und as222,20 eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 60 % auf. As220,22 und as240,20 zeigten einen etwas größeren Hemmeffekt mit 65 % bzw. 64 %. Diese fünf ASOs wurden für weitere Studien ausgewählt. Auch as35,21 wurde aufgrund der hohen Hemmwirkung, trotz erhöhter Zytotoxizität (Abb. 3.6), zunächst für weitere Studien in Betracht gezogen.

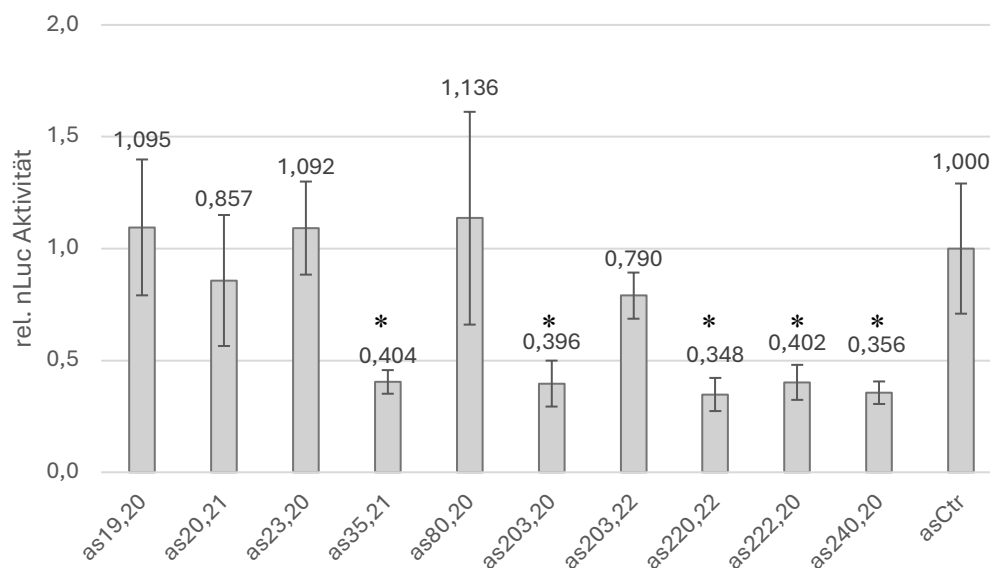


Abbildung 3.7 Vergleich der Hemmwirkung ausgewählter ASOs. Die ASOs wurden mit einer Konzentration von 100 nM in HEK293T-Zellen transfiziert. Die inhibierenden Effekte wurden mittels DLR-Assay im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem verglichen. Dabei wurde das Signal des Nano-Luciferasegens auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. Die Werte der Kontrollen asScr, asCtrl1 und asCtrl2 wurden zu asCtr zusammengefasst. Alle Werte wurden auf asCtr normiert. Die ASOs, die eine inhibierende Wirkung zeigten, sind as35,21, as203,20, as220,20, as222,20 und as240,20. Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test angewendet mit $\alpha = 5\%$; * = Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

3.4.1.2 Dosis-Wirkungsbeziehung

Die Untersuchung von ASOs umfasst die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven zur Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC_{50}), um einen direkten Vergleich der Experimente zu ermöglichen. Zusätzlich kann durch die Überwachung der Viabilität der Zellen während eines Titrationsverlaufs ein Fenster für die sichere Nutzung der ASOs festgelegt werden (Gagnon and Corey, 2019). Der IC_{50} ist ein Maß für die Konzentration eines Arzneimittels oder einer Verbindung, die erforderlich ist, um einen biochemischen Prozess um 50 % bezogen auf die maximal mögliche Hemmung (I_{max}) zu inhibieren (Ugwu and Conradie, 2023).

Im verfeinerten Screening wurden Dosis-Wirkungskurven (DW-Kurven) in HEK293T-Zellen erstellt, um die inhibierende Wirkung in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der ausgewählten ASOs zu bewerten. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 0 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 100 nM und 300 nM (Abb. 3.8). Bei den unten genannten IC_{50} handelt es sich um aus den Graphen geschätzte Werte.

Um die IC_{50} zu bestimmen, wurde am Graphen die relative Luciferaseaktivität bei 0 nM und am I_{max} bestimmt und der Mittelwert gebildet. Dieser Wert entspricht der halbmaximalen Hemmung der relativen Luciferaseaktivität. Nun wurde am Graphen die Konzentration abgelesen, bei dem dieser Wert erreicht war und als IC_{50} angegeben.

Die ASOs as35,21, as220,22 und as222,20 haben keine dosisabhängige Hemmung gezeigt (Abb. 6.6). Bei niedrigen Konzentrationen führte die Zugabe dieser ASOs zu einem leichten Anstieg der relativen Luciferaseaktivität, während im höheren Konzentrationsbereich starke Schwankungen beobachtet werden konnten, die im Allgemeinen einen Anstieg der relativen Luciferaseaktivität zeigten. Daher wurden diese ASOs für weitere Untersuchungen ausgeschlossen.

Der inhibierende Effekt der ASOs as203,20 (as203) und as240,20 (as240) konnte durch DW-Kurven reproduziert werden, weshalb sie für weitere Studien ausgewählt wurden (Abb. 3.8). Die Dosis-Wirkungskurven wurden dreimal in HEK293T-Zellen wiederholt, wobei sich ein durchschnittlicher IC_{50} von 16 nM für as203 und 23 nM für as240 ergab. Die durchschnittlichen I_{max} (maximale Hemmung) -Werte betragen jeweils 89 % und 94 %. In Abbildung 3.8 sind exemplarisch jeweils zwei DW-Kurven abgebildet. Alle weiteren DW-Kurven befinden sich im Anhang (Abb. 6.7). In Abbildung 3.8 A führte die Zugabe des ASOs as203 zunächst zu einem Anstieg der relativen Luciferaseaktivität um bis zu 40 %. Bei einer Konzentration von 10 nM wurde ein steiler Abfall der relativen Luciferaseaktivität auf einen Hemmwert von 76 % ermittelt, wonach sich die Kurve dem I_{max} von 97 % bei 300 nM angenähert hat. Der IC_{50} lag bei 8 nM (Abb. 3.8 A). In Abbildung 3.8 B wurde bei Zugabe von 1 nM des Wirkstoffes eine Zunahme der relativen Luciferaseaktivität um lediglich 10 % beobachtet. Danach nahm die relative Luciferaseaktivität kontinuierlich ab und näherte sich ab 100 nM asymptotisch der maximalen Hemmung von 79 % an. Der IC_{50} betrug 10 nM. In Abbildung 3.8 C führte die Zugabe von 1 nM as240 zu einem Anstieg der relativen Luciferaseaktivität um 34 %. Im

Ergebnisse

Gegensatz dazu wurde in Abbildung 3.8 D kein Anstieg durch Zugabe des Wirkstoffes gemessen. In beiden Fällen sank die relative Luciferaseaktivität fast linear und näherte sich ab einer Konzentration von 30 nM asymptotisch der maximalen Hemmung von jeweils 96 % an. Der IC_{50} für as240 lag bei 25 nM (Abb. 3.8 C) und 15 nM (Abb. 3.8 D).

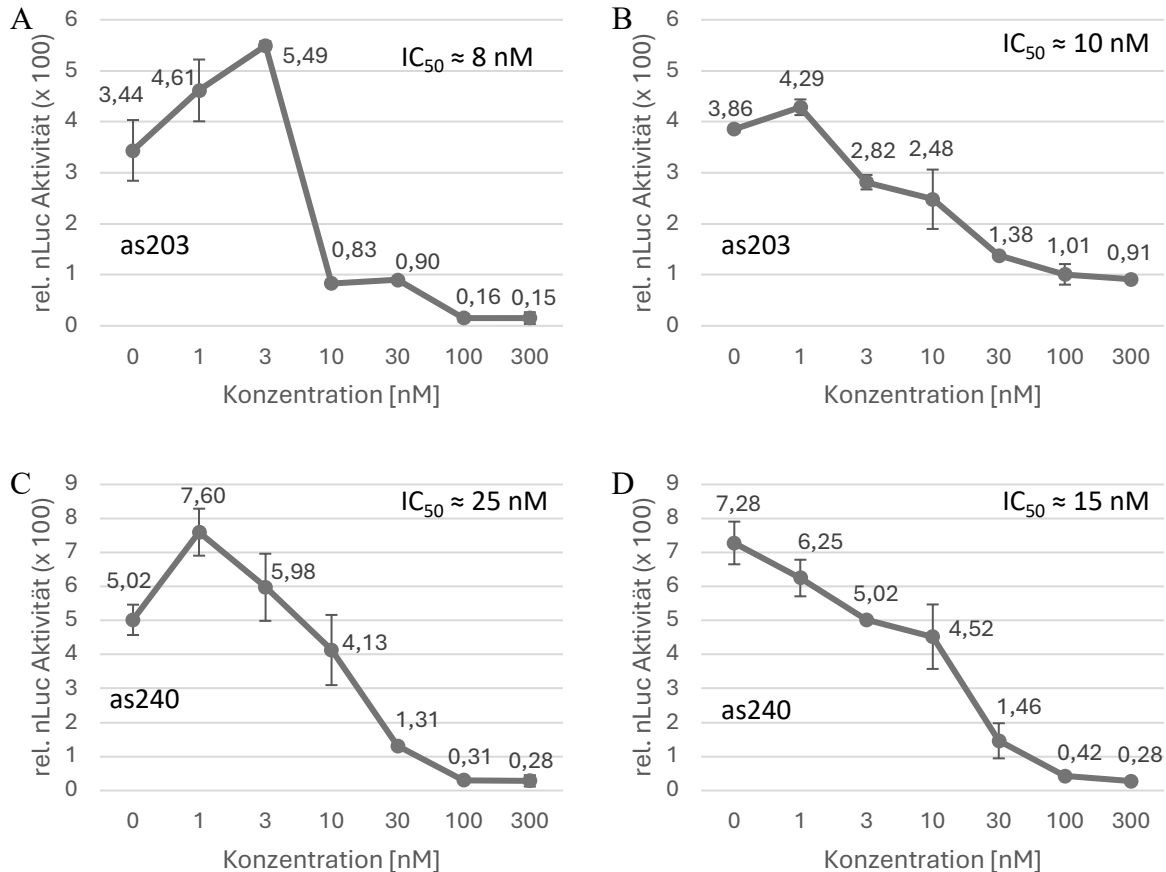


Abbildung 3.8 Dosis-Wirkungskurven für die ausgewählten ASOs in HEK293T-Zellen. Die DW-Kurven wurden im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 300 nM mittels DLR-Assay im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem gemessen. Das Signal des Nano-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. A), B) Die DW-Kurven für as203 wiesen einen I_{max} von 97 % und 79 % sowie einen IC_{50} von 8 nM und 10 nM auf. C), D) As240 zeigte einen durchschnittlichen I_{max} von je 96 % sowie einen IC_{50} von 25 nM und 15 nM. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Das Experiment hat gezeigt, dass es sich bei as203 und as240 um wirksame ASOs handelt, die eine reproduzierbare DW-Beziehung aufweisen.

3.4.1.3 Detaillierte BLAST-Analyse für as203 und as240

Anhand des Vitalitätstests, des ersten DLR-Assay *Screens* und der Dosis-Wirkungskurven wurden die ASOs as203 und as240 für weitere Studien ausgewählt. Daher war es relevant, potenzielle *off-target*-Effekte gegen humane mRNA-Sequenzen, die in Kapitel 3.3 für alle zehn ASO-Kandidaten zusammengefasst wurden, detaillierter zu untersuchen. Tabelle 3.4 listet die

Ergebnisse

Gene auf, die gegen as203 und as240 *off-target*-Effekte aufweisen; einschließlich der betroffenen Sequenzbereiche der ASOs.

Tabelle 3.4 NCBI-BLAST-Analyse der ASOs as203 und as240. Für die wirksamen ASOs as203 und as240 wurde eine detaillierte BLAST-Analyse gegen humane mRNA-Sequenzen durchgeführt. Alle *off-target*-Effekte mit einer Länge von mehr als 15 konsekutiv aufeinanderfolgenden Nukleotiden wurden mit den entsprechenden Genen aufgeführt. Die zugehörigen Sequenzbereiche sind von 5'→3' angegeben. Bei allen ASOs handelt es sich um Gapmere, wobei alle Internukleotid-Verknüpfungen Phosphorothioat-modifiziert sind und die ersten und letzten vier Nukleotide 2'-O-methyliert sind. Die unterstrichenen Bereiche sind am *off-target*-Effekt involviert.

ASO	Sequenzbereich (5'→3')	Gen	Länge [nts]
as203	<u>gatcggctgcaacacggacg</u>	SENP3	15
	<u>gatcggctgcaacacggacg</u>	COA7	
	<u>gatcggctgcaacacggacg</u>	MYO5B	
	<u>gatcggctgcaacacggacg</u>	PRKAR1B	
	<u>gatcggctgcaacacggacg</u>	ACTR3C	
	<u>gatcggctgcaacacggacg</u>	SNORD126	19
as240	<u>tttcggacacacccggacga</u>	TMEM114	15
	<u>tttcggacacacccggacga</u>	SNAP91	17

Mittels NCBI-BLAST-Analyse wurden für as203 sechs relevante *off-target*-Effekte identifiziert. Einer davon umfasst 19 Nukleotide und richtet sich gegen das Gen SNORD126 (*Small Nucleolar RNA, C/D Box 126*). Die anderen fünf besitzen eine Länge von 15 Nukleotiden und richten sich gegen die Gene SENP3 (*SUMO specific peptidase 3*), COA7 (*Cytochrome c oxidase assembly factor 7*), MYO5B (*Myosin VB*), PRKAR1B (*Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit beta*) und ACTR3C (*Actin related protein 3C*).

As240 wies lediglich zwei *off-target*-Effekte auf, die mindestens 15 Nukleotide lang sind und konsekutiv mit der Zielsequenz basenpaaren. Diese betreffen die Gene TMEM114 (*Transmembrane Protein 114*) und SNAP91 (*Synaptosome associated protein 91*) mit Längen von 15 und 17 Nukleotiden.

3.4.1.4 Mechanismusbezogene Studien (RNase H-Effekt)

Antisense-Oligonukleotide werden als einzelsträngige DNA-Nukleotidsequenzen in Zellen eingeschleust, um ihre Zielsequenz zu finden und zu binden. Dabei gibt es drei mögliche Mechanismen, durch die die Translation der Ziel-mRNA gehemmt werden kann. Im ersten Fall erfolgt eine sterische Blockade, bei der die Bildung eines DNA-RNA-Duplexes die Bindung von Ribosomen und anderen Translationsfaktoren verhindert. Im zweiten Fall agieren ASOs, die auf Sequenzen innerhalb der prä-mRNA abzielen und das Spleißen beeinflussen, um die Produktion gewünschter Isoformen zu erhöhen. Diese ASOs (einschließlich LNA, 2'-modifizierte Oligonukleotide oder ungeladene Analoga wie Peptidnukleinsäure- oder

Ergebnisse

Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomere) wirken RNase H unabhängig. Der dritte Mechanismus, der durch Gpmere hauptsächlich initiiert wird, involviert die RNase H. (Watts and Corey, 2012). Hierbei wird die RNase H zum DNA-RNA Duplex rekrutiert und spaltet diesen, was zum Abbau der mRNA und damit zur Hemmung der Translation führt. Die menschliche RNase H1 zeigt eine starke Positionspräferenz und spaltet zwischen 8 und 12 Nukleotiden vom 5'-RNA-3'-DNA-Terminus des Duplexes (Lima *et al.*, 2001).

Um zu analysieren, ob der inhibierende Effekt der ASOs durch einen RNase H-Mechanismus vermittelt wird, wurden modifizierte Antisense-Oligonukleotide generiert, die die RNase H Bindung oder die Spaltung verhindern sollen. Diese Konstrukte, nämlich as203Hc und as240Hc, besitzen dieselbe Sequenz und Chemie wie as203 und as240 mit Ausnahme der Position der 2'-O-Methylierung. In den modifizierten Konstrukten wurde die Methylierung an den Positionen 3, 4, 9, 10, 11, 12, 17 und 18 vom 5'-Ende eingeführt. Diese Modifikation sollte verhindern, dass das Duplex von der RNase H erkannt werden kann, was zu einer gesteigerten Translationseffizienz im Vergleich zu as203 und as240 behandelten Proben führen sollte.

Des Weiteren wurden die ASOs as203Hm und as240Hm mit Punktmutationen an den Positionen 10 und 11 generiert. Diese Mutationen, eine A-zu-U-Substitution an Position 10 und eine C-zu-A-Substitution an Position 11, führen zu einer unvollständigen Basenpaarung im DNA-RNA-Duplex. Dieser entstehende *Bulge* sollte verhindern, dass die RNase H den Duplex erkennt und spaltet.

Tabelle 3.5 Modifikation der ASOs zur Untersuchung des RNase H-Effekts. Bei allen ASOs handelt es sich um Gpmere, wobei alle Internukleotid-Verknüpfungen Phosphorothioat-modifiziert sind und die unterstrichenen Nukleotide 2'-O-methyliert sind. Die erzeugten Punktmutationen sind rot und fett markiert. Die Sequenzen sind von 5'→3' angegeben. Hm: mutierte Variante, Hc: veränderte Position der 2'-O-Methylierung.

ASO	Sequenz (5'→3')
as203	<u>gat</u> <u>cgg</u> <u>ctg</u> <u>caac</u> <u>acgg</u> <u>acg</u>
as203Hm	<u>gat</u> <u>cgg</u> <u>ctg</u> au <u>acac</u> <u>ggacg</u>
as203Hc	<u>gat</u> <u>cgg</u> <u>ctg</u> <u>caac</u> <u>acgg</u> <u>acg</u>
as240	<u>ttt</u> <u>cgg</u> <u>acac</u> <u>accc</u> <u>ggac</u> <u>gca</u>
as240Hm	<u>ttt</u> <u>cgg</u> <u>aca</u> au <u>ccc</u> <u>ggac</u> <u>gca</u>
as240Hc	<u>ttt</u> <u>cgg</u> <u>acac</u> <u>accc</u> <u>ggac</u> <u>gca</u>

An zwei unterschiedlichen Versuchstagen wurde ein DLR-Assay unter Verwendung von HEK293T-Zellen im Testsystem durchgeführt, in dem 50 nM der ASOs zum Einsatz kamen. Hierbei wurde die relative Luciferaseaktivität nach Behandlung von as203 mit der von as203Hc und as203Hm verglichen. Weiterhin wurde die relative Luciferaseaktivität nach Behandlung mit as240 mit der von as240Hc und as240Hm verglichen. Zudem wurde asScr als Negativkontrolle und zum Normieren verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass die ASOs as203Hm und as203Hc in Bezug auf asScr keinen inhibierenden Effekt aufweisen (Abb. 3.9).

Ergebnisse

Nach Einsatz von as203 hingegen konnte eine Hemmung um 50 % beobachtet werden, was auf eine Beteiligung der RNase H an der inhibierenden Aktivität von as203 hindeutete. Im Fall von as240Hc wies die fehlende inhibierende Wirkung aufgrund einer chemischen Blockierung der RNase H-Bindungsstelle ebenfalls auf einen RNase H-Mechanismus hin. Die Mutation in as240Hm hingegen führte zu einem signifikanten inhibierenden Effekt. Dieser betrug jedoch nur 35 %. Die Hemmung der relativen Luciferaseaktivität nach as240 Behandlung war im Vergleich dazu mit 66 % fast doppelt so groß.

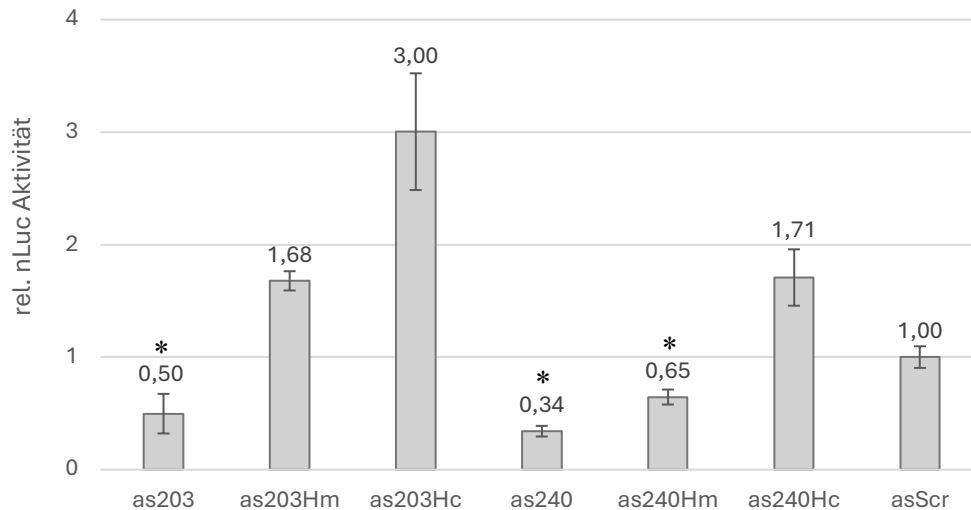


Abbildung 3.9 Untersuchung der RNase H-Aktivität. Vergleich der ASOs mit Oligonukleotiden, die in der RNase H-Spaltstelle mutiert sind (Hm) oder ihre Spaltstelle durch 2'-O-Methylierung blockiert ist (Hc). Die ASOs wurden mit einer Konzentration von 50 nM in HEK293T-Zellen transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem und das Signal des Nano-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. Die Ergebnisse aus zwei Versuchstagen wurden hier zusammengeführt und auf asScr normiert. Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test angewendet mit $\alpha = 5\%$; * = Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Mit diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass für as203 und as240 ein RNase H-Effekt vorliegt.

3.4.1.5 Einfluss einer Kombination der ASOs auf die Hemmwirkung

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die ASOs as203 und as240 dosisabhängig wirken und dass der inhibitorische Effekt der ASOs auf einem RNase H-Mechanismus basiert. Daraus hat sich die Fragestellung ergeben, ob ein kombinierter Einsatz von ASOs, die auf zwei unterschiedliche Zielsequenzen abzielen, zu einer verstärkten Hemmung führen kann. Die Kombination von oligonukleotidbasierten Therapeutika, die auf dasselbe Transkript abzielen, wurde in der Vergangenheit bereits untersucht und hat klinische Vorteile erwiesen (Yogev *et al.*, 2022).

Ergebnisse

In diesem Kapitel wurde für das vorliegende Testsystem die Kombination der ASOs as203 und as240 analysiert (Abb. 3.10). Dazu wurde unter Verwendung von HEK293T-Zellen 40 nM der ASOs eingesetzt und ein DLR-Assay durchgeführt. Die Werte wurden auf asScr normiert. Der Einsatz von as203 einzeln führte zu einer Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 32 % bezogen auf asScr. Wurde as240 als Hemmstoff eingesetzt, konnte eine Hemmung um 53 % gemessen werden. Eine gleichwertige Kombination der beiden Wirkstoffe mit einer Konzentration von insgesamt 40 nM zeigte eine Hemmwirkung von 38 %. Die Kombination der beiden ASOs führte im Vergleich zum Einsatz von as203 einzeln zu einer verstärkten Hemmung um 6 %. Im Vergleich zur Wirkung von as240 einzeln wurde die Hemmung bei Kombination mit as203 um 15 % verringert. Für diese Messwerte wurde mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ ein einseitiger vereinfachter t-Test durchgeführt.

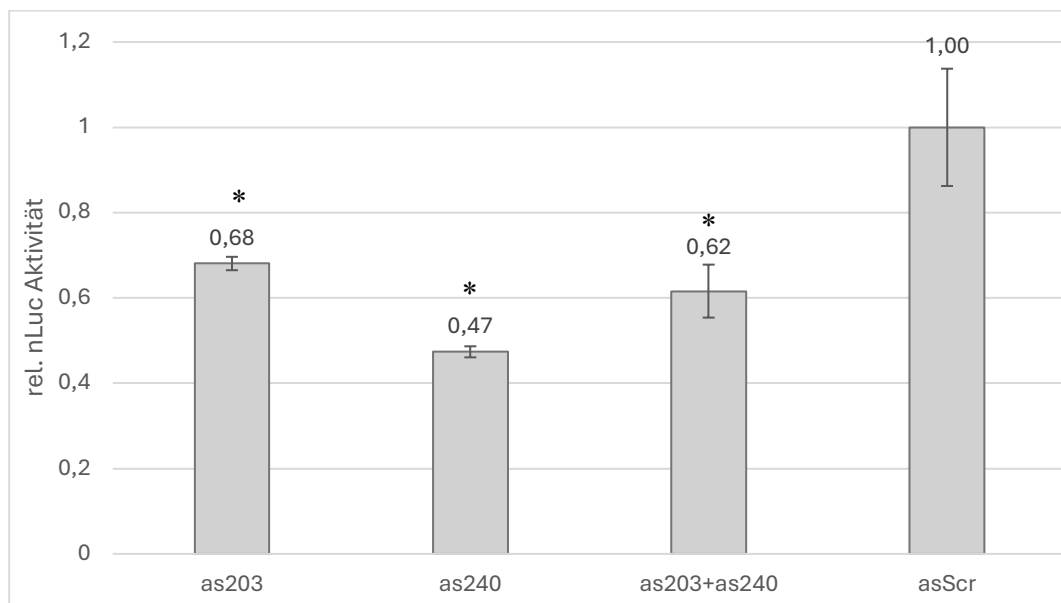


Abbildung 3.10 Kombination der ASOs as203 und as240. Die ASOs as203 und as240 wurden einzeln und in Kombination bei 40 nM in HEK293T-Zellen transfiziert und in Bezug auf asScr verglichen. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem und das Signal des Nano-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. Die Werte wurden auf asScr normiert. Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test mit $\alpha = 5\%$ angewandt. *= Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Die Kombination der beiden Wirkstoffe im Vergleich zu den Wirkstoffen einzeln zeigte keinen signifikanten Verbesserungseffekt für as203, jedoch eine signifikante Verringerung der Hemmung für as240. Daher wurde die Kombination für weitere Experimente als nicht sinnvoll erachtet.

3.4.1.6 Hemmstudien auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass eine Inhibition des Testsystems mittels ASOs auf Translationsebene möglich ist. Um den Mechanismus genauer zu verstehen, fanden Hemmstudien auf RNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR (RT-qPCR) statt. Die RT-

Ergebnisse

qPCR-Analysen wurden parallel zu den DLR-Assays durchgeführt und boten Einblicke darin, in welchem Verhältnis die mRNA-Quantitäten zu den gebildeten Proteinen stehen. Zudem konnte gezeigt werden, ob die ASOs die Degradation der mRNA initiieren. Für die RT-qPCR-Analysen wurden zunächst HEK293T-Zellen im Testsystem unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Oligonukleotide transfiziert. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, fand die Transfektion für die RNA-Isolation und den DLR-Assay zeitgleich statt. Nachdem die Integrität der isolierten zellulären RNAs mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese untersucht wurde, fand eine cDNA-Synthese mit *random* Primern statt (Kap. 2.2.2.4).

Für die RT-qPCR-Analyse wurden zwei Primerpaare verwendet: fLuc-fwd-156 (5'-accagggatttcagtcgatg-3') und fLuc-rev-156 (5'-gagcgacacctttaggcaga-3'), die an Position 752-908 des pGL3-Control-Vektors auf dem Firefly-Luciferasegen binden und ein 156 nts langes Amplifikat bilden; sowie nLuc-fwd1 (5'-ggcgggtaccctgtggatg-3') und nLuc-rev1 (5'-ggccgtccgaaatagtcgat-3'), die an Position 537-641 des pNL-TK-CoV2wt-Vektors auf dem Nano-Luciferasegen binden und ein 105 nts langes Amplifikat erzeugen. Um die Effizienz der Primerpaare zu erfassen und die genaue Kopienzahl der Proben zu quantifizieren, wurden Standardreihen mit bekannten Plasmidmengen für jedes Transkript erzeugt. Diese umfassten 10^6 bis 10^2 Kopien. Primereffizienzen im Bereich 90 % – 110 % waren zur Quantifikation geeignet. Um die Spezifität der Amplifikate zu überprüfen, wurde am Ende des PCR-Laufs ein Schritt zur Erzeugung von Schmelzkurven durchgeführt (Kap. 2.2.2.5). Dazu wurde die Temperatur schrittweise bis auf 95 °C erhöht und die Fluoreszenz gemessen. Die doppelsträngige DNA denaturiert dabei und gibt den *Sybr-Green*-Farbstoff frei. Um die Schmelzkurve zu erhalten, wurde die Änderung der Steigung dieser Kurve als Funktion zur Temperatur aufgetragen, deren Maximum die Schmelztemperatur des spezifischen Amplikons wiedergibt, wobei für ein sauberes Assay genau ein Maximum erwartet wird. Mehrere Maxima sind ein Indiz für unspezifische Nebenprodukte wie z.B. Primerdimere (Prada-Arismendy and Castellanos, 2011). Die Schmelztemperatur ist abhängig von der Länge der Sequenz und der Basenzusammensetzung. Neben der Schmelzkurve wurde zur Untersuchung der Reinheit eine analytische Agarose-Gelelektrophorese der RT-qPCR Produkte stichprobenartig durchgeführt (Kap. 2.2.2.6.1). Dabei wurde untersucht, ob die entsprechenden Amplifikate entstehen und die erwartete Größe haben. Das Primerpaar fLuc-fwd-156 und fLuc-rev-156 zeigte eine Effizienz von 98 % und eine Schmelztemperatur von 81,3 °C. Für das Primerpaar nLuc-fwd1 und nLuc-rev1 wurde eine Effizienz von 95 % und eine Schmelztemperatur von 81,8°C ermittelt. Die Schmelzkurven bestätigten die Spezifität der Primerpaare für ihre jeweiligen Transkripte.

In der RT-qPCR-Analyse (Abb. 3.11 B) wurde die durchschnittliche Menge der mRNA des Nano-Luciferasegens auf die Menge der mRNA des Firefly-Luciferasegens normalisiert. Die Hemmung auf RNA-Ebene wurde sowohl bei 50 nM als auch bei 100 nM der ASOs as203 und as240 im Testsystem analysiert. Dabei wurde die relative Kopienzahl der mRNA auf die der Kontrolle asScr normiert.

Ergebnisse

Zum Vergleich wurde in Abbildung 3.11 A das zugehörige Luciferase-Assay aufgeführt. Für as203 und as240 konnte auf Proteinebene eine Hemmwirkung von 74 % und 66 % bei einer Konzentration von 50 nM ermittelt werden und eine Hemmung um jeweils 82 % bei einer Konzentration von 100 nM.

Die Hemmung auf RNA-Ebene war schwächer ausgeprägt als die auf Proteinebene beobachtete Hemmung (Abb. 3.11 B). Die RT-qPCR-Ergebnisse hatten bei 50 nM für as203 und as240 eine Reduktion der relativen mRNA-Kopienzahl um 35 % und 38 % gezeigt. Mit einer Konzentration von 100 nM wurde für as203 und as240 eine Hemmwirkung von jeweils 52 % und 41 % auf die relative mRNA-Kopienzahl ermittelt. Wie auf der Proteinebene ist auch auf der RNA-Ebene die Hemmwirkung mit 100 nM ASO stärker ausgeprägt als mit 50 nM ASO.

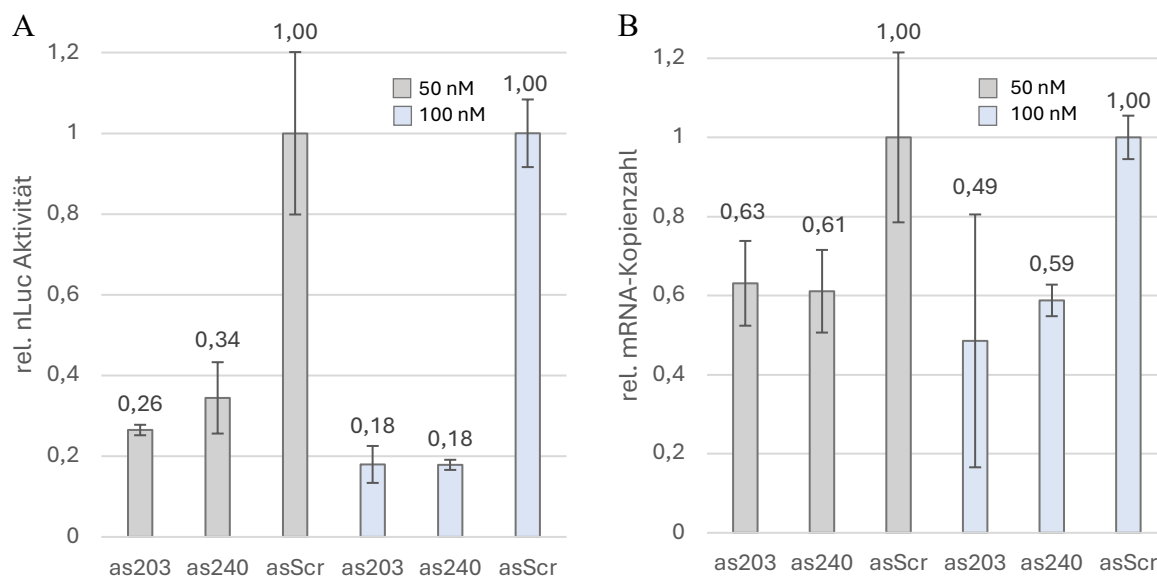


Abbildung 3.11 Messung der Hemmaktivität auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene. Die ASOs as203 und as240 wurden mit 50 nM (grau) und 100 nM (blau) in HEK293T-Zellen im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert und in Bezug auf asScr normiert. A) Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Nano-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. B) 10 ng cDNA wurde in Vierfachbestimmung mittels RT-qPCR quantifiziert und die mRNA-Kopienzahl des nLuc-Transkriptes mit der mRNA-Kopienzahl des fLuc-Transkriptes normalisiert. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung bzw. vier technischen Replikaten aus der RT-qPCR-Messung.

Um Zelllinienabhängigkeiten zu vermeiden, wurde die Hemmwirkung der ASOs in einem weiteren Luciferase-Assay unter Verwendung von HeLa-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen im Testsystem mit den ASOs as203, as240 und asScr in Konzentrationen von 50 nM und 100 nM transfiziert und die Ergebnisse gegen asScr normiert (Abb. 3.12). Auf Proteinebene war bei einer Konzentration von 50 nM eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 66 % und 67 % für as203 und as240 zu beobachten (Abb. 3.12 A). Bei einer Konzentration von 100 nM konnte eine Hemmwirkung von 80 % und 83 % für as203 und as240 ermittelt werden. Um den Hemmeffekt auf der RNA-Ebene zu analysieren, wurde unter Verwendung der oben genannten Primer parallel zum DLR-Assay eine RT-qPCR durchgeführt (Abb. 3.12 B). Diese

Ergebnisse

hat für as203 behandelte Proben keine Hemmwirkung bezogen auf asScr ergeben. Bei Proben, die mit as240 behandelt wurden, war das mRNA-Level um 7 % verringert. Eine Konzentration von 100 nM führte zu 8 % Hemmung nach Einsatz von as203 und mit 84 % zu einer deutlich höheren Hemmung durch as240.

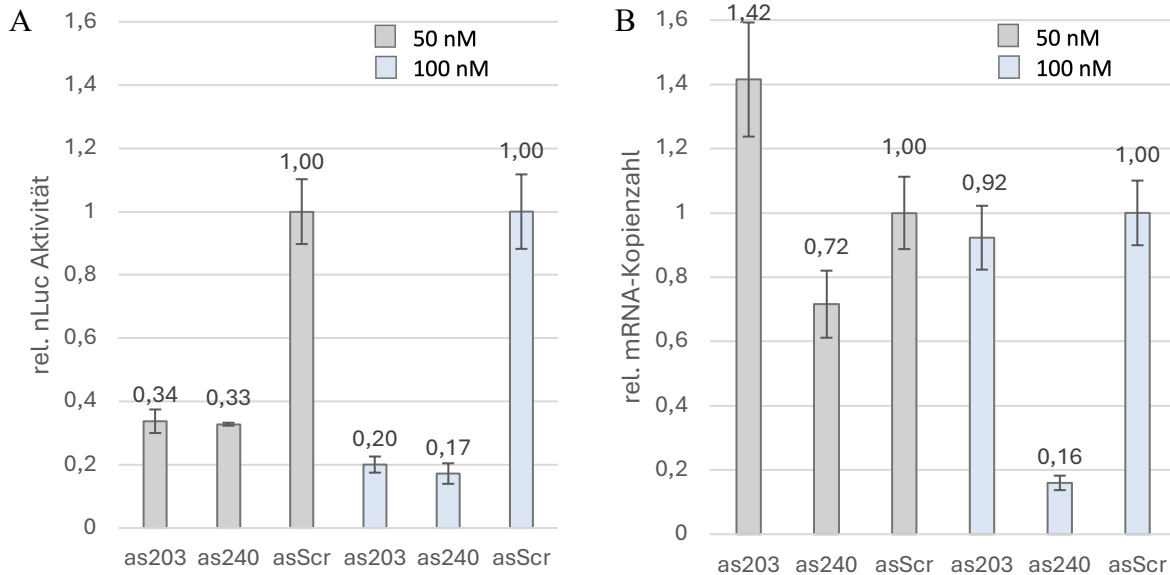


Abbildung 3.12 Messung der Hemmaktivität auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene. Die ASOs as203 und as240 wurden mit 50 nM (grau) und 100 nM (blau) in HeLa-Zellen im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert und gegen asScr normiert. A) Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Nano-Luciferasegens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. B) 10 ng cDNA wurde in Vierfachbestimmung mittels RT-qPCR quantifiziert und die mRNA-Kopienzahl des nLuc-Transkriptes mit der mRNA-Kopienzahl des fLuc-Transkriptes normalisiert. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung bzw. vier technischen Replikaten aus der RT-qPCR-Messung.

In diesem Abschnitt wurde mittels RT-qPCR der Hemmmechanismus auf RNA-Ebene untersucht, wobei sowohl in HEK293T- als auch in HeLa-Zellen gezeigt wurde, dass die Hemmwirkung auf Proteinebene stärker ausgeprägt ist als auf RNA-Ebene.

3.4.2 Bestimmung von *small-interfering* RNAs als Inhibitoren gegen SARS-CoV-2 Zielsequenzen und funktionelle Studien

Auf Grundlage der beiden potentesten ASOs as203 und as240 wurden siRNAs entwickelt. Der Vorteil von siRNAs liegt in ihrer typischerweise höheren Effizienz und Spezifität bei der Hemmung von Zielgenen und in ihrer geringeren Zytotoxizität (Lauffer *et al.*, 2024; Vicentini *et al.*, 2013).

Beim Entwurf von siRNAs gibt es etablierte Kriterien zu beachten, die zu effizienteren siRNAs führen können. Dazu gehören unter anderem Motive wie beispielsweise 5'-AA(N19)TT, 5'-AA(N21) oder 5'-NA(N21) auf der Zielsequenz, mit einem Guanidin-Cytosin (GC)-Gehalt von weniger als 50 %, was die Funktion des RISC-Komplexes erleichtern soll (Fakhr *et al.*, 2016). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Zielregionen, mit mindestens vier konsekutiv ungepaarten

Ergebnisse

Nukleotiden am 5'- oder 3'-Ende der siRNA zugänglicher sind als solche, mit ungepaarten Nukleotide in der Mitte einer Sequenz (Gredell *et al.*, 2008). Die Länge der siRNAs kann zwischen 19 und 29 Nukleotiden variieren, wobei längere siRNAs häufiger zu unspezifischen Bindungen in Säugerzellen führen und eine Immunreaktion auslösen können. Kürzere siRNAs werden daher bevorzugt, und weisen hinsichtlich der Hemmwirkung keinen Unterschied auf (Fakhr *et al.*, 2016). Ein weiterer wichtiger Parameter für die Effizienz ist der GC-Gehalt in der siRNA-Sequenz. Ein niedriger GC-Gehalt kann zu unspezifischer und schwacher Bindung führen, während ein zu hoher GC-Gehalt die Trennung des *passenger*-Strangs vom *guide*-Strang stören kann (Ishizuka *et al.*, 2002). Ein vorteilhafter Bereich für den GC-Gehalt liegt bei etwa 36 % - 52 % (Reynolds *et al.*, 2004). Darüber hinaus sollte sich der siRNA-Duplex ordnungsgemäß bilden können, ohne die Möglichkeit für Sekundärstrukturen zu bieten, die die Effizienz beeinträchtigen würden. Daher müssen die Sequenzen auf interne Wiederholungen und Palindrome untersucht werden (Fakhr *et al.*, 2016). Neben dem GC-Gehalt ist auch der AU-Gehalt wichtig für die Effizienz der siRNA. Studien haben gezeigt, dass mindestens vier von sieben Nukleotiden am 5'-Ende des *antisense*-Strangs aus A- oder U-Nukleotiden bestehen sollten. Dies führt zu einer verringerten Stabilität am 5'-Ende und ermöglicht ein einfaches Entwinden des Duplexes und den Eintritt in den RISC-Komplex (Fakhr *et al.*, 2016). SiRNA-Sequenzen, die GGGG oder CCCC enthalten, sollten vermieden werden, da sie die Wahrscheinlichkeit für G-Quadruplex- oder Haarnadelstrukturen erhöhen (Hardin *et al.*, 1992). Basierend auf den bisher effizientesten ASOs wurden die Sequenzen der siRNAs abgeleitet und mit einem Desoxythymidindinukleotid (dTdT)-Überhang am 3'-Ende modifiziert (Tab. 3.6). Diese Modifikation ist historisch abgeleitet (Elbashir *et al.*, 2001).

Die Sequenzen von *sisc*, *si203*, *si240* und *siCoV6* sind in Tabelle 3.6 aufgelistet, wobei es sich bei *sisc* (*scramble*-Kontrolle) um eine zufällig generierte siRNA-Sequenz mit denselben chemischen Modifikationen wie die verwendeten siRNAs handelt. *SiCoV6* ist eine von Tolksdorf *et al.* generierte siRNA, die auf die 5'-UTR von SARS-CoV-2 abzielt. Sie bindet an Position 54, ist 19 Nukleotide lang und besitzt zusätzlich einen TT-Überhang am 3'-Ende. Tolksdorf *et al.* konnte in DLR-Assays mit HeLa-Zellen eine Inhibition von etwa 90 % durch *siCoV6* zeigen. Weiterhin hat sie sich in viralen Assays als wirksam gegenüber SARS-CoV-2 erwiesen. Daher wurde diese siRNA zunächst als Positivkontrolle verwendet (Tolksdorf *et al.*, 2021).

Die Benennung der siRNAs folgt demselben Prinzip wie die Benennung der ASOs (Kap. 3.3). Dabei kennzeichnet das Präfix „si“, dass es sich um eine siRNA handelt. Die Ziffer vor dem Komma gibt die Position der siRNA auf der Zielsequenz an und die Ziffer hinter dem Komma gibt die Länge der siRNA an, wobei der TT-Überhang nicht berücksichtigt wird. Da alle in dieser Arbeit generierten siRNAs 20 Nukleotide lang sind, wird im Folgenden zur Kürze diese Angabe weggelassen.

Tabelle 3.6 Bezeichnung und Sequenzen der siRNAs. Sisc (*scramble* Kontrolle) wurde als Kontrolle verwendet. Die entsprechenden Sequenzen sind von 5'→3' (*guide*) und 3'→5' (*passenger*) angegeben. Alle siRNAs enthalten einen 3'-Desoxythymidindinukleotid (dTdT)-Überhang.

Bezeichnung	Sequenz
si203	5'-gaucggcugcaacacggacgtt-3' 3'-ttcuagccgacguugugccugc-5'
si240	5'- uuucggacacacccggacgatt-3' 3'- ttaaagccugugugggcccugcu -5'
siCoV6	5'- uucguuuagagaacagauctt-3' 3'- ttaagcaaaucucuugucuag-5'
sisc	5'-cgaacucacuggucugacctt-3' 3'-ttgcuugagugaccagacugg-5'

Wie der *guide*-Strang kann auch der *passenger*-Strang von siRNAs biologisch aktiv sein (Wei *et al.*, 2009). Daher wurde, analog zu den ASOs (Kap. 3.4.1.3) ein Nukleotid-BLAST mittels NCBI-Datenbank durchgeführt und in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Hierbei steht -g für *guide*-Strang und -p für *passenger*-Strang. Da die siRNA-Sequenzen von den ASO-Sequenzen abgeleitet wurden, enthält der *guide*-Strang unter anderem dieselben *off-target*-Sequenzen wie die entsprechenden ASOs, die in Tabelle 3.4 zusammengefasst sind. Diese wurden daher nicht erneut in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7 NCBI-BLAST-Analyse der verwendeten siRNAs. Für die siRNAs si203 und si240 sowie si203a und si240a wurde eine detaillierte BLAST-Analyse gegen humane mRNA-Sequenzen durchgeführt. Alle *off-target*-Effekte mit einer Länge von mehr als 15 konsekutiv aufeinanderfolgenden Nukleotiden wurden mit den entsprechenden Genen aufgeführt. Die zugehörigen Sequenzen sind von 5'→3' angegeben. Die unterstrichenen Bereiche sind am *off-target*-Effekt involviert. g: *guide*-Strang; p: *passenger*-Strang.

siRNA	Sequenz (5'→3')	Gen	Länge [nt]
si203-g	-	-	-
si203-p	<u>cguccguguugcagccgauctt</u>	SMG9	16
	<u>cguccguguugcagccgauctt</u>	VWF	17
	<u>cguccguguugcagccgauctt</u>	LOC128966702	17
	<u>cguccguguugcagccgauctt</u>	CLSTN3	17
si240-g	-	-	-
si240-p	<u>ucguccggguguguccgaaatt</u>	MTHFSD	15
	<u>ucguccggguguguccgaaatt</u>	MARCHF4	16
	<u>ucguccggguguguccgaaatt</u>	BRSK2	17
si203a-g	<u>gaucgacugcaacacggacgtt</u>	NARS1	16
si203a-p	<u>cguccguguugcagucgauctt</u>	IQCB1	17

Ergebnisse

si240a-g	-	-	-
si240a-p	-	-	-
si240.2-g	uuucggacacaccccgacaatt	MON1B	16
si240.2-p	-	-	-

Der Nukleotid-BLAST hat ergeben, dass trotz des Desoxythymidindinukleotids die *guide*-Stränge der siRNAs si203 und si240 keine weiteren *off-target*-Effekte aufweisen, die mindestens 15 Nukleotide lang sind und vollständig basenpaaren. Die *passenger*-Stränge hingegen haben in beiden Fällen solche *off-target*-Effekte aufgewiesen. Si203-p hat einen *off-target*-Effekt mit einer Länge von 16 Nukleotide gegen das Gen SMG9 (*nonsense mediated mRNA decay factor*) aufgewiesen. Zudem wurden drei *off-target*-Effekte mit einer Länge von 17 Nukleotiden gegen die Gene VWF (Von-Willebrand-Faktor), LOC128966702 (*Paraneoplastic Antigen-Like Protein 6A*) und CLSTN3 (Calsyntenin 3) identifiziert. Der Nukleotid-BLAST von si240-p hat drei relevante *off-target*-Effekte mit einer Länge von 15, 16 und 17 Nukleotide ergeben. Diese richteten sich gegen die Gene MTHFSD (*Methenyltetrahydrofolate synthetase domain*), MARCHF4 (*Membrane associated ring-CH-type finger 4*) und BRSK2 (*Brain selective serine/threonine kinase 2*). Si203a und si240a sind siRNAs die gegen die 5'-UTR von SARS-CoV-1 gerichtet sind (Kap. 3.5). Für si240a konnten keine *off-target*-Effekte gefunden werden, die mindestens 15 Nukleotide lang und vollständig komplementär sind. Si203a-g und si203-p haben jeweils einen *off-target*-Effekt mit einer Länge von 16 und 17 Nukleotiden gegen die Gene NARS1 (*Asparaginyl-tRNA synthetase 1*) und IQCB1 (*IQ motif containing B1*) aufgewiesen. Die siRNA si240.2 ist abgeleitet von as240.2 (Tab. 3.6) und enthält im Vergleich zu si240 eine Punktmutation an Position 19 (G→A). Diese siRNA zeigte für die *guide*-Sequenz einen *off-target*-Effekt gegen das Gen MON1B (*Monensin-sensitive 1 homolog B*) mit einer Länge von 16 Nukleotiden.

3.4.2.1 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs

Die Effizienz der siRNAs wurde zunächst in HEK293T-Zellen (Abb. 3.13 A) untersucht, da diese Zelllinie als Standardzelllinie in dieser Arbeit verwendet wurde. Um Zelllinienabhängigkeiten auszuschließen, wurden die Versuche in ECV304-Zellen (Abb. 3.13 B) wiederholt. Zusätzlich wurden HeLa-Zellen verwendet, um die siRNAs ordnungsgemäß mit siCoV6 zu vergleichen (Abb. 3.14).

Für den Versuch in HEK293T- und ECV304-Zellen wurden im Testsystem 40 nM und 0,1 nM der siRNAs si203, si240, siCoV6 eingesetzt und *sisc* als Negativkontrolle und zum Normieren herangezogen. Der DLR-Assay hat gezeigt, dass si203 und si240 bei 40 nM eine Hemmwirkung von 94 % bzw. 91 % in HEK293T-Zellen und 97 % bzw. 95 % in ECV304-Zellen aufweisen, was auf eine ähnliche Hemmstärke der beiden siRNAs hindeutete. Die Positivkontrolle siCoV6 zeigte in HEK293T-Zellen eine Hemmwirkung von nur 42 % und in ECV304-Zellen eine Hemmwirkung von 33 % bezogen auf *sisc*. Bei einer Konzentration von

Ergebnisse

0,1 nM zeigte si240 keine Hemmung in HEK293T-Zellen, während siCoV6 die relative Luciferaseaktivität um nur 1 % und si203 um 44 % senkte. In ECV304-Zellen konnte für siCoV6 bei 0,1 nM keine Hemmung festgestellt werden, während si203 und si240 jeweils eine Hemmwirkung von 7 % und 23 % aufwiesen.

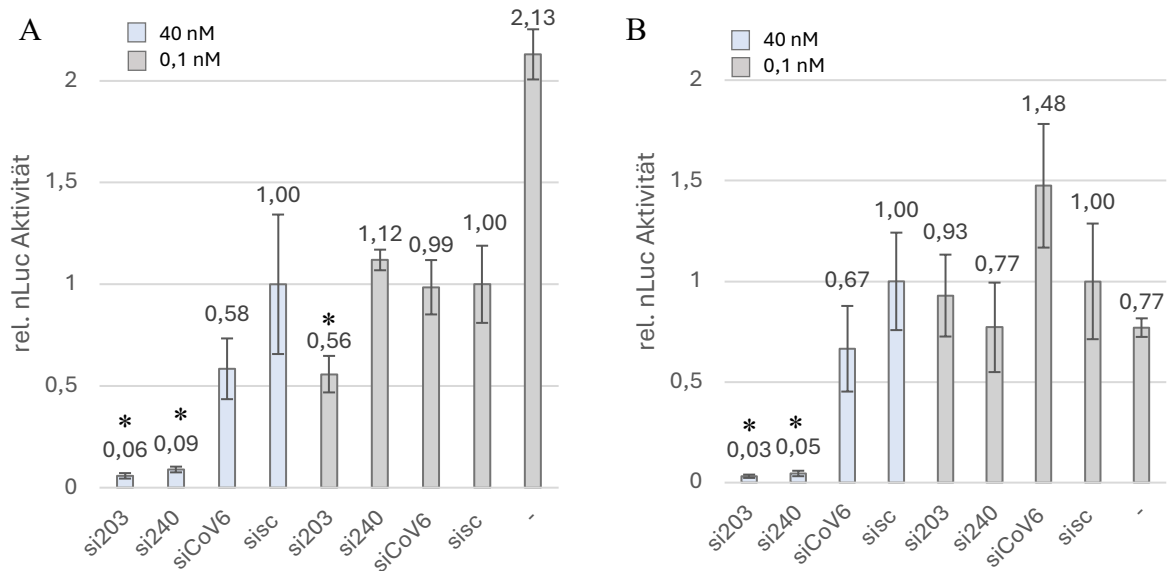


Abbildung 3.13 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs auf Proteinebene in HEK293T- und ECV304-Zellen. Die siRNAs wurden mit einer Konzentration von 40 nM (blau) und 0,1 nM (grau) in HEK293T-Zellen (A) und ECV304-Zellen (B) im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay. Das Signal des Nano-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen sisc normiert. „-“: Probe ohne siRNA. Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test angewendet mit $\alpha = 5\%$; * = Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Da bei einer Konzentration von 0,1 nM kaum Hemmung festgestellt werden konnte, wurde für den Vergleich der siRNAs in HeLa-Zellen eine Konzentration von 40 nM eingesetzt. Dieser Vergleich wurde zweimal durchgeführt und in Abbildung 3.14 zusammengefasst. Auch hier zeigten sich ähnliche Hemmstärken für si203 und si240, mit Reduktionen der relativen Luciferaseaktivität um 93 % für si203 und 95 % für si240. Für siCoV6 wurde eine Hemmung um 55 % identifiziert.

Ergebnisse

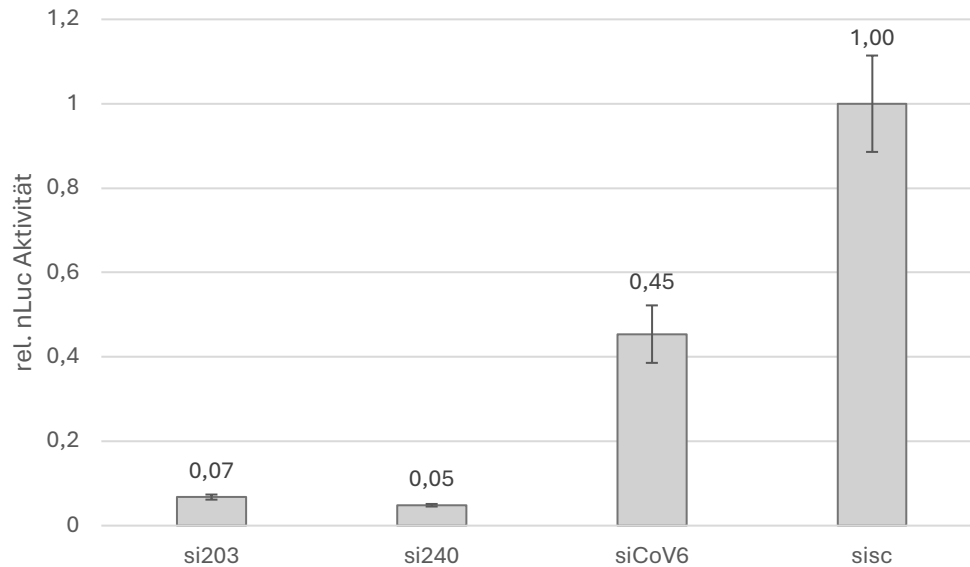


Abbildung 3.14 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs auf Proteinebene in HeLa-Zellen. Die siRNAs wurden zwei Mal mit einer Konzentration von 40 nM in HeLa-Zellen im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay. Das Signal des Nano-Luciferasesignals wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen sisc normiert. „-“: Probe ohne siRNA. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Dieses Experiment zeigte, dass siCoV6 in diesem Testsystem eine geringere Hemmstärke aufweist als im Originalversuch (Tolksdorf *et al.*, 2021). Si203 und si240 haben sich in allen drei Zelllinien als effiziente und zuverlässige Hemmstoffe erwiesen und wurden daher in dosisabhängigen Experimenten weiter untersucht.

3.4.2.2 Dosis-Wirkungsbeziehung

Wie bei den ASOs wurde auch für die siRNAs in einem verfeinerten *Screening* die dosisabhängige Hemmung untersucht, um die inhibierende Wirkung in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der ausgewählten siRNAs zu bewerten. Dazu wurden die siRNAs si203 und si240 in das pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert. Die Hemmung wurde in einem kleineren Konzentrationsbereich gemessen, da die siRNAs schon bei geringen Mengen eine hohe Wirksamkeit gezeigt haben. Es wurden Konzentrationen von 0,1 nM bis 100 nM eingesetzt. Um Zellabhängigkeiten auszuschließen, wurden die Messungen sowohl in HEK293T-Zellen (Abb. 3.15) als auch in ECV304-Zellen (Abb. 3.16) durchgeführt. Die Messung in den HEK293T-Zellen wurde zweimal durchgeführt. Bei den unten genannten IC_{50} handelt es sich um Schätzwerte.

Si203 zeigte im ersten Graphen (Abb. 3.15 A) eine steile Absenkung der relativen Luciferaseaktivität um 76 % bei 0,3 nM. Die Hemmung näherte sich dann kontinuierlich dem I_{max} von 96 % bei 30 nM an, wobei die relative Luciferaseaktivität bei 100 nM um 2,6 % anstieg. Es ließ sich ein $IC_{50} < 0,3$ nM ermitteln. Daher wurde in der zweiten Messung (Abb. 3.15 B) der Messwert 0,1 nM hinzugenommen. Hier war der Verlauf des Graphen flacher. Der IC_{50} lag zwischen 0,3 nM und 1 nM, wobei die Zugabe von nur 0,1 nM si203 zunächst zu einem

Ergebnisse

Anstieg der relativen Luciferaseaktivität um 16 % führte. Die maximale Hemmung konnte reproduziert werden und betrug auch hier 96 % bezogen auf die Leerkontrolle (-), die keine siRNAs enthält. Ab einer Konzentration von 3 nM näherte sich der Graph asymptotisch der x-Achse an, wobei der I_{\max} bei 30 nM erreicht wurde.

Auch für si240 konnte die dosisabhängige Hemmung in HEK293T-Zellen reproduziert werden und wies in beiden Messungen einen I_{\max} von 94 % und 96 % sowie einen IC_{50} zwischen 0,3 nM und 1 nM auf (Abb. 3.15 C und D). In Abbildung 3.15 C führt die Zugabe der siRNA zu einer kontinuierlichen Absenkung der relativen Luciferaseaktivität, bis der I_{\max} bei 30 nM erreicht wurde. Bei einer Konzentration von 100 nM nahm die Hemmwirkung um 0,9 % ab. Der Verlauf des Graphen in Abbildung 3.15 D, der mit einer Konzentration von 0,1 nM begann, war flacher, führte jedoch auch zu einer kontinuierlichen Abnahme der relativen Luciferaseaktivität bis zum Erreichen des I_{\max} von 96 % bei einer Konzentration von 30 nM. Bei 100 nM nahm die Hemmwirkung um 1 % ab.

Es konnte gezeigt werden, dass für beide siRNAs eine dosisabhängige und reproduzierbare Hemmung in HEK293T-Zellen vorlag.

Ergebnisse

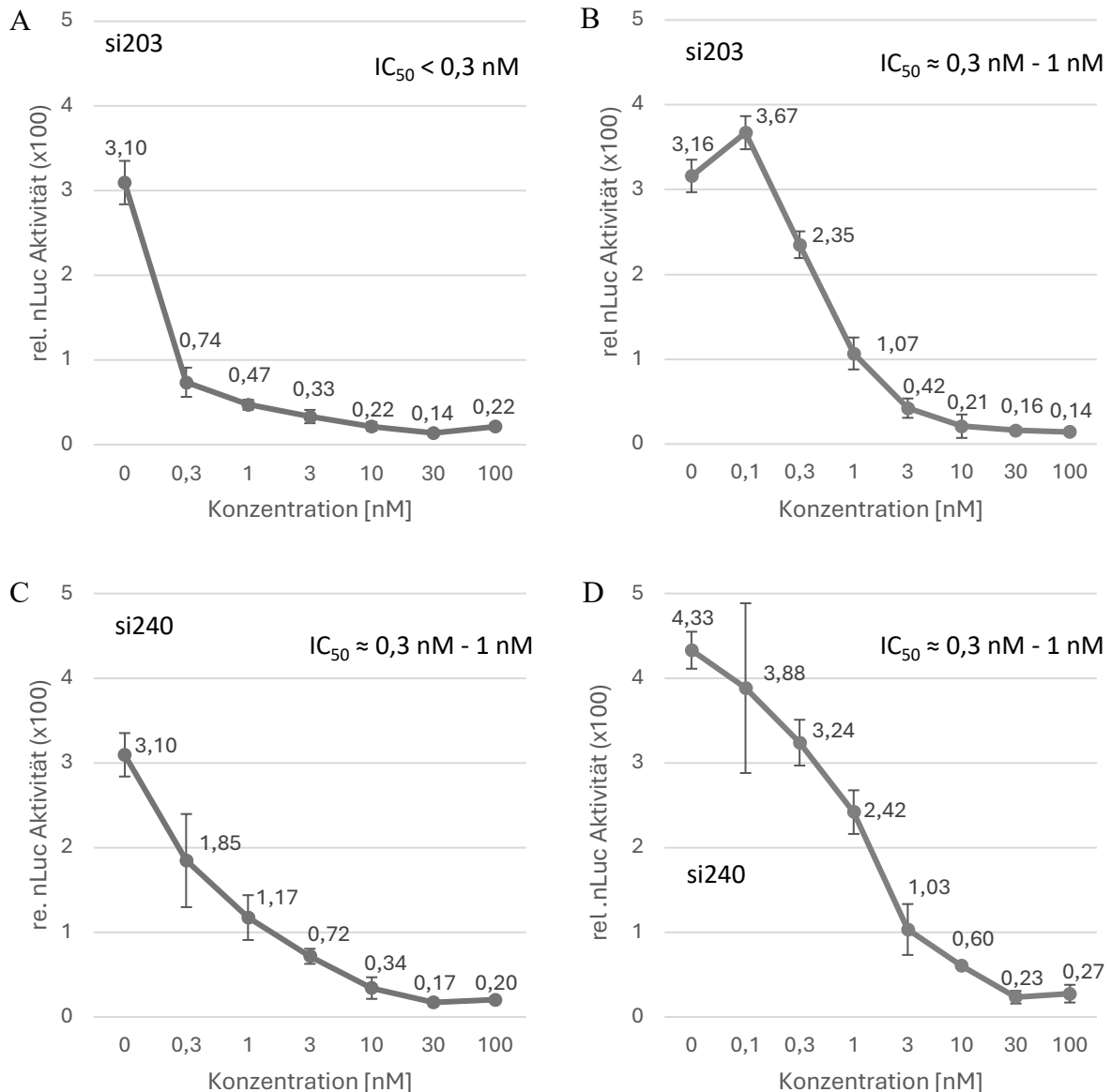


Abbildung 3.15 Dosis-Wirkungskurven für die ausgewählten siRNAs in HEK293T-Zellen. Die DW-Kurven wurden im Konzentrationsbereich von 0,3 nM oder 0,1 nM bis 100 nM mittels DLR-Assay in HEK293T-Zellen im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem gemessen. Das Signal des Nano-Luciferasesignals wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. A) DW-Kurve für si203 mit I_{max} von 96 % und $IC_{50} < 0,3 \text{ nM}$. B) DW-Kurve für si203 mit I_{max} von 96 % und IC_{50} von 0,3 nM - 1 nM. C) DW-Kurve für si240 mit I_{max} von 94 % und IC_{50} von 0,3 nM-1 nM. D) DW-Kurve für si240 mit I_{max} von 96 % und IC_{50} von 0,3 nM-1 nM. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Im Vergleich zu den DW-Kurven, die in HEK293T-Zellen generiert wurden, lagen bei den DW-Kurven in den ECV-304 Zellen größere Schwankungen im Bereich von 0,3 nM-100 nM vor (Abb. 3.16). Die Hemmung bei 0,3 nM lag für si203 bei 70 % (Abb. 3.16 A) und für si240 bei 76 % (Abb. 3.16 B) und der IC_{50} lag für beide siRNAs in einem Bereich $< 0,3 \text{ nM}$. Die maximale Hemmung war mit 88 % für si203 (Abb. 3.16 A) und 92 % für si240 (Abb. 3.16 B) geringer als in HEK293T-Zellen. Die Lumineszenz stieg ab einer Konzentration von 100 nM

Ergebnisse

um 21 % für si203 und um 9% für si240 an. Nach einer Konzentration von 0,3 nM verliefen die Graphen parallel zur x-Achse mit einer Schwankung zu den angrenzenden Werten von bis zu 22 % für si203 und 16 % für si240.

In allen drei Zelllinien konnte die Wirksamkeit der siRNAs reproduziert werden. Eine stetige dosisabhängige Wirkung konnte allerdings nur in den HEK293T-Zellen nachgewiesen werden.

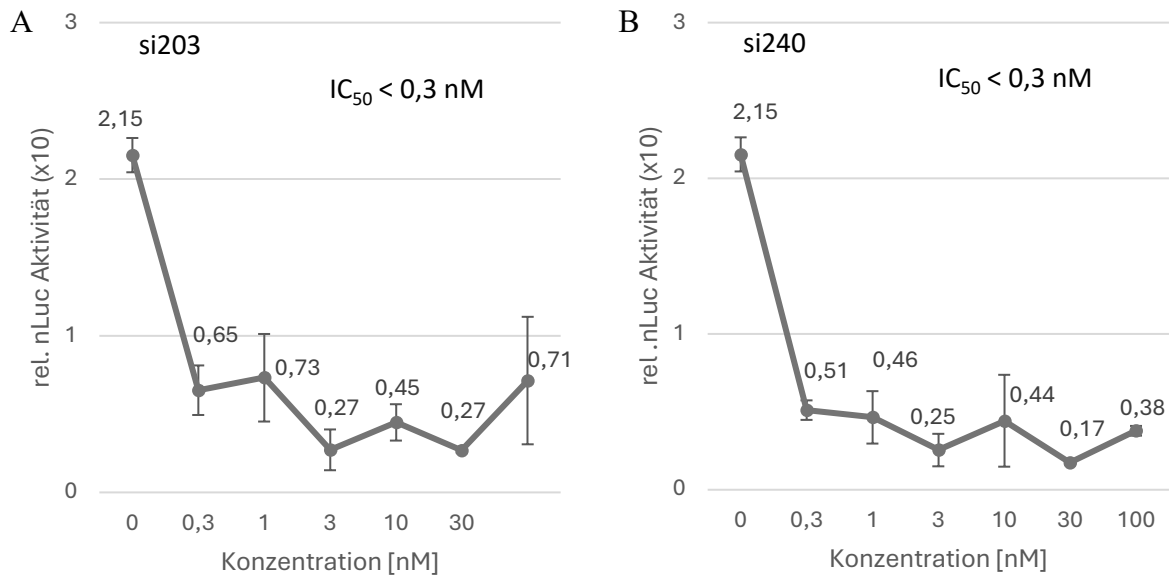


Abbildung 3.16 Dosis-Wirkungskurven für die ausgewählten siRNAs in ECV-Zellen. Die DW-Kurven wurden im Konzentrationsbereich von 0,3 nM bis 100 nM mittels DLR-Assay in ECV-Zellen im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem gemessen. Das Signal des Nano-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. A) DW-Kurve für si203 mit I_{max} von 88 % und $IC_{50} < 0,3 \text{ nM}$. B) DW-Kurve für si240 mit I_{max} von 92 % und $IC_{50} < 0,3 \text{ nM}$. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

3.4.2.3 Kombination der siRNAs

Nachdem die Wirksamkeit der siRNAs und ihre dosisabhängige Wirkung bestätigt wurde, ist im nächsten Schritt die Kombination der siRNAs im vorliegenden Testsystem erfolgt. Studien haben gezeigt, dass eine Kombination von zwei bis drei siRNAs, die unterschiedliche Zielgene binden, zu einem synergistischen inhibitorischen Effekt führen kann (Sriram *et al.*, 2013).

Basierend auf diesen Studien wurden hier die siRNAs si203 und si240 kombiniert. Die siRNAs wurden zunächst einzeln mit einer Konzentration von 0,6 nM in HEK293T-Zellen transfiziert und mittels DLR-Assay untersucht. Die Konzentration von 0,6 nM wurde anhand der zuvor ermittelten DW-Kurven (Abb. 3.15) festgelegt, da bei dieser Konzentration eine sichere Hemmwirkung erwartet werden konnte, die maximale Hemmung von bis zu 96 % jedoch erst bei 30 nM erreicht wurde. Die Negativkontrolle *sisc* wurde mit derselben Konzentration eingesetzt und zum Normieren verwendet. Der Einsatz von 0,6 nM siRNA zeigte sowohl bei si203 als auch bei si240 eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 85 %. Zusätzlich wurden die beiden siRNAs in Kombination mit einer Endkonzentration von 0,6 nM transfiziert. Auch hier betrug die Hemmwirkung genau 85 % bezogen auf *sisc*.

Ergebnisse

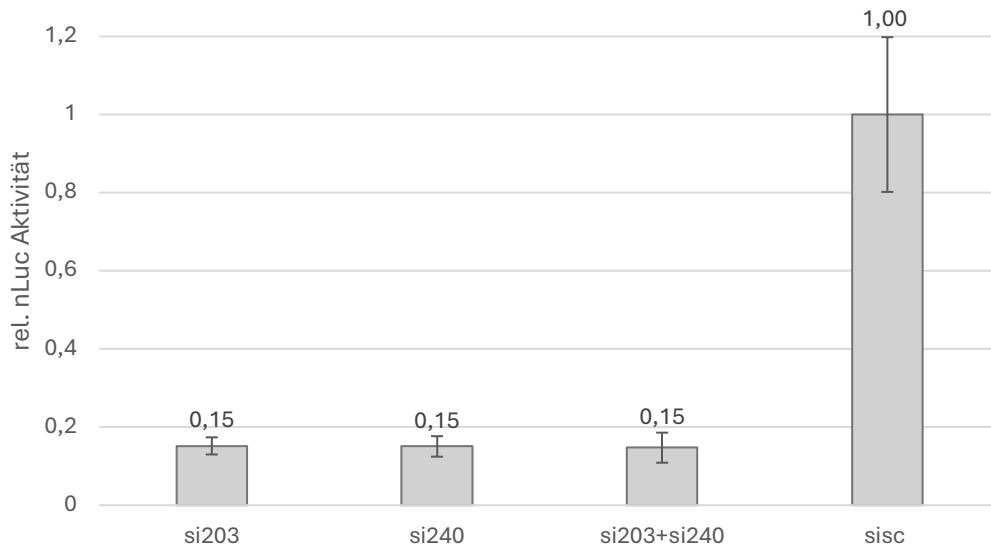


Abbildung 3.17 Kombination der siRNAs si203 und si240. Die siRNAs si203 und si240 wurden einzeln und in Kombination bei 0,6 nM in HEK293T-Zellen im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert und in Bezug auf sisc verglichen. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay. Das Luciferasesignal des Nano-Luciferasegens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und zusätzlich gegen sisc normiert. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Das Experiment zeigte, dass eine Kombination der siRNAs in diesem Testsystem die Hemmaktivität nicht verändert.

3.4.2.4 Einfluss einer Punktmutation auf die Hemmung der siRNAs sowie ASOs

Die hohe Mutationsrate von SARS-CoV-2 führte zu einem raschen Auftreten neuer Virusvarianten, die sich weltweit schnell ausgebreitet haben. Die lange Dauer der Pandemie und die kontinuierliche interindividuelle Übertragbarkeit haben diesen Prozess begünstigt (Hattab *et al.*, 2024). Alignments der 5'-UTR der SARS-CoV-2-Referenzsequenz mit den mutierten VOCs (Kap. 6.1) haben gezeigt, dass diese Region innerhalb des Genus hoch konserviert ist und nur selten mutiert. Eine Ausnahme bildet die Punktmutation C241U im SL5, die als Zielregion der hier relevanten siRNAs gilt, und sich seit der Alphavariante etabliert hat. Das Alignment von SARS-CoV-2 mit SARS-CoV-1 (Abb. 3.26) wies mehrere Mutationen im Bereich der 5'-UTR, insbesondere in den hier relevanten Zielsequenzen, auf. Dies lässt vermuten, dass die 5'-UTR in zukünftigen Coronaviren weitere Mutationen aufweisen wird. Daher ist es von großer Bedeutung den Einfluss von Punktmutationen in der Zielsequenz auf die Wirksamkeit der oligonukleotidbasierten Wirkstoffe zu untersuchen.

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, wurde das vorliegende Testsystem durch Einfügen von Restriktionsschnittstellen modifiziert. Durch Generierung der NcoI-Schnittstelle am 3'-Ende des 5'-UTRs ist eine KpnI-Schnittstelle entstanden, die durch Basenaustausch an Position 262 (T→A) entfernt wurde. Um die Bildung der Sekundärstruktur nicht zu beeinflussen, wurde die Punktmutation T253A eingefügt. Dadurch weist das Testsystem in der Zielsequenz von as240

Ergebnisse

im Vergleich zur SARS-CoV-2-Referenzsequenz eine Mutation auf, sodass as240 nicht vollständig komplementär zur Referenzsequenz ist. Der Einfluss dieser Punktmutation wurde für den Einsatz in weiteren Studien diesbezüglich untersucht. Ein Vorteil beim Einsatz von siRNAs und ASOs ist, dass sie mit wenig Arbeitsaufwand an Mutationen angepasst werden können. Um zu untersuchen, wie as240 bei der Referenzsequenz, die im Vergleich zum Testsystem an Position 253 die Base A enthält, wirken würde, wurde an Position 7 des ASOs ein Basenaustausch A→T eingeführt (Tab. 3.8). Das neu generierte ASO wurde as240,20m genannt, wobei das „m“ die mutierte Variante bezeichnet. Die Mutation C241T, die sich seit Auftreten der Alphavariante etabliert hat, ist mit as240 nicht abgedeckt, da sich dieses ASO gegen die Referenzsequenz von SARS-CoV-2 richtet. Um diese Mutation zu untersuchen, wurden die Oligonukleotide si240,20.2 und as240,20.2 generiert, die im Folgenden als si240.2 und as240.2 bezeichnet werden. Diese weisen einen Basenaustausch von G zu A an Position 2 auf, wodurch sie komplementär zu den mutierten Varianten von SARS-CoV-2 sind, aber eine Fehlpaarung zu pNL-TK-CoV2wt aufweisen. Eine weitere Möglichkeit diese Mutation zu umgehen, wäre eine Verkürzung des Oligonukleotids am 3'-Ende. Daher wurde zusätzlich das ASO as242,18 generiert (abgekürzt as242). Dieses ist nur 18 Nukleotide lang und bindet auf der Zielsequenz erst ab Position 242. Durch die Verkürzung ist die mutierte Position für die Duplexbildung nicht relevant.

Tabelle 3.8 Mutierte Varianten von as240 und si240. Angegeben sind die Bezeichnung sowie die Sequenzen in 5'→3' Richtung von as240 und si240 mit den verwendeten mutierten Varianten. Bei allen ASOs handelt es sich um Gapmere, wobei alle Internukleotid-Verknüpfungen Phosphorothioat-modifiziert sind und die unterstrichenen Nukleotide 2'-O-methyliert sind. Die erzeugten Punktmutationen sind rot und fett markiert. m: Mutation; g: *guide*-Strang.

Bezeichnung	Abkürzung	Sequenz 5'→3'
as240,20	as240	<u>uuucggacacaccccgga</u> <u>cga</u>
as240,20m	as240m	<u>uuucgg</u> t <u>cacaccccgga</u> <u>cga</u>
as240,20.2	as240.2	<u>uuucggacacaccccgga</u> aa
as242,18	as242	<u>uuucggacacacccggac</u>
si240,20g	si240	uuucggacacaccccgga <u>cga</u> <u>t</u>
si240,20.2g	si240.2	uuucggacacaccccgga a <u>t</u>

Die Hemmung wurde im vorliegenden Testsystem mittels DLR-Assay analysiert, indem 10 nM, 50 nM und 100 nM der ASOs und siRNAs eingesetzt wurden. Die Hemmwirkungen wurden in Bezug auf die entsprechenden Negativkontrollen normiert und miteinander verglichen.

In einem ersten Experiment wurden die ASOs as240 und as240m miteinander verglichen, um den Einfluss der Punktmutation T253A zu untersuchen (Abb. 3.18).

Die Analyse der ASOs hat gezeigt, dass bei einer Konzentration von 10 nM die Hemmaktivität von as240m mit 66 % um 7 % schwächer war als die von as240 bezogen auf die Aktivität von

Ergebnisse

asScr. Bei einer Konzentration von 50 nM war die Hemmaktivität von as240m mit 60 % um 14 % verringert verglichen zu as240. Für eine Konzentration von 100 nM war die Hemmaktivität von as240m, im Gegensatz zu der von as240, mit 79 % um 11 % verringert. Das Ergebnis zeigt, dass die Punktmutation in as240 zu einer leicht verringerten Hemmaktivität führte, die ab einer Konzentration von 100 nM signifikant war.

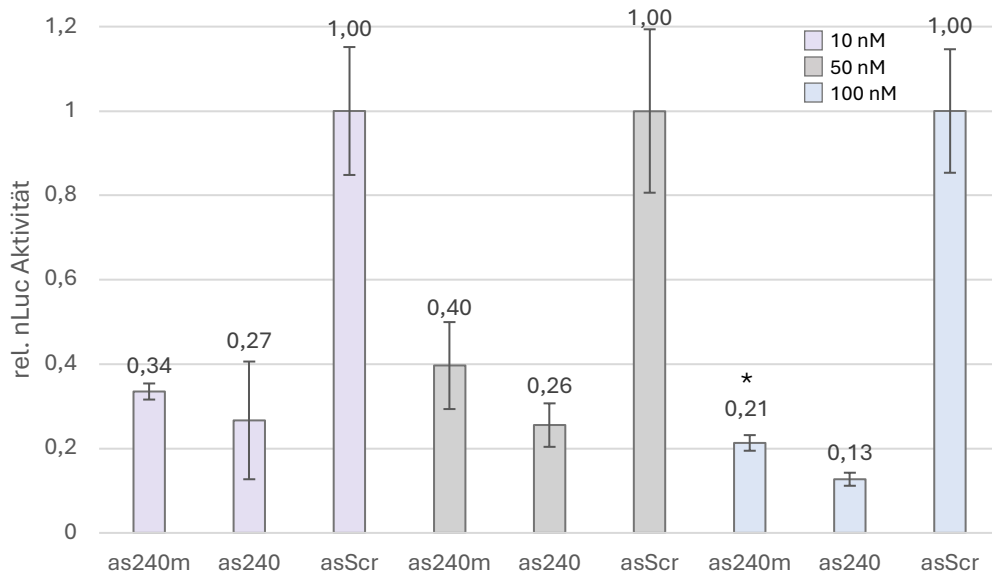


Abbildung 3.18 Einfluss einer Punktmutation auf die Wirksamkeit von as240 auf Proteinebene in HEK293T-Zellen. Die ASOs as240 und as240m (A7T) wurden mit einer Konzentration von 10 nM (lila), 50 nM (grau) und 100 nM (blau) in HEK293T-Zellen im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Nano-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. Die Werte wurden gegen asScr normiert. Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test angewendet mit $\alpha = 5\%$; * = Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Im nächsten Experiment wurden die siRNAs si240 und si240.2 sowie die ASOs as240, as240.2 und as242 jeweils miteinander verglichen (Abb. 3.19). Hierbei wurde der Einfluss der Punktmutation C241T untersucht.

Si240.2 zeigte die Wirksamkeit von si240 gegenüber den mutierten Varianten an. Der Vergleich von si240 und si240.2 mit einer siRNA-Konzentration von 10 nM hat gezeigt, dass die Hemmwirkung von si240.2 um nur 1 % schwächer war als die von si240 bezogen auf die Aktivität von sisc (Abb. 3.19 A). Bei einer Konzentration von 50 nM und 100 nM hatte si240.2 eine schwächere Hemmwirkung von jeweils 3 % gegenüber si240. Dieser Versuch hat gezeigt, dass die Punktmutation in Bezug auf si240 zu einer abgeschwächten Hemmung geführt hat. Der Unterschied betrug je nach eingesetzter Konzentration nur 1 % - 3 %, und war erst bei einer Konzentration von 100 nM signifikant.

As240, as240.2 und as242 wurden ebenfalls mit 10 nM, 50 nM und 100 nM im vorliegenden Testsystem untersucht. Bei der Konzentration von 10 nM waren die Unterschiede in der Hemmung am größten. As242 wirkte um 15 % und as240.2 signifikant um 31 % schwächer im Vergleich zu as240. Der Unterschied wurde geringer bei höheren Konzentrationen, sodass bei

Ergebnisse

einem Einsatz von 50 nM die Hemmwirkung des verkürzten ASO as242 um nur 2 % geringer war als die von as240. Der Unterschied von as240.2 zu as240 war allerdings größer. Hier führte die Punktmutation zu einer signifikant geringeren Hemmung um 34 %. Bei einer Konzentration von 100 nM wiesen as240 und as242 eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 82 % und 83 % auf. Die Hemmung durch as240.2 war mit 56 % um 26 % signifikant geringer als die Hemmwirkung von as240.

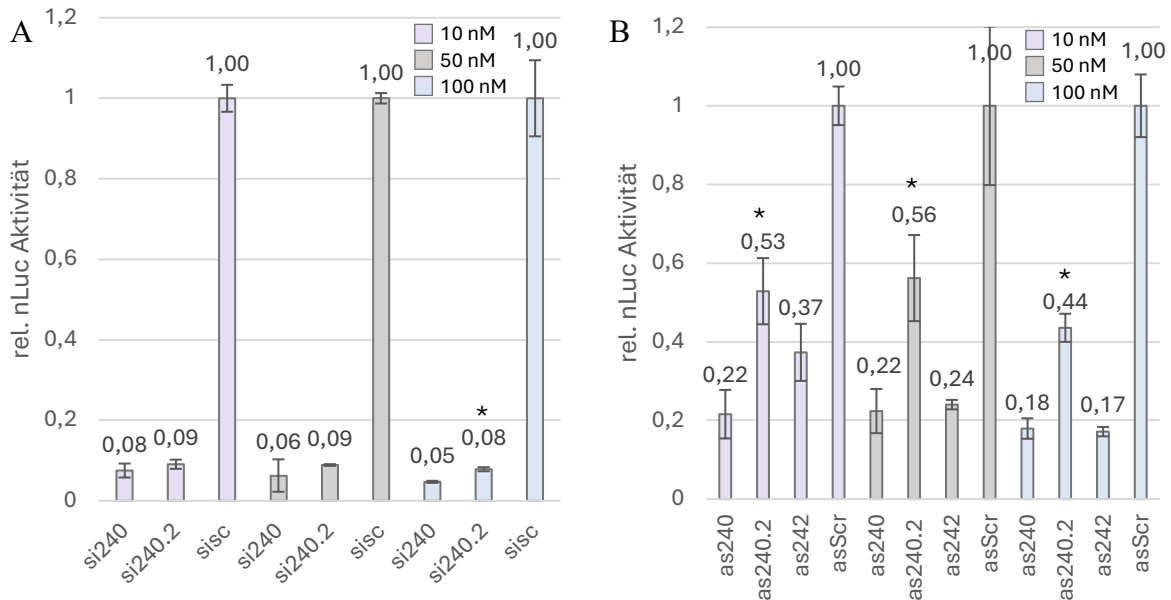


Abbildung 3.19 Einfluss von Punktmutationen auf die Wirksamkeit von si240 und as240 auf Proteinebene in HEK293T-Zellen. A) Die siRNAs si240 und si240.2 (G19A) wurden mit 10 nM (lila), 50 nM (grau) und 100 nM (blau) transfiziert. B) Weiterhin wurden die ASOs as240, as240m (A7T), as240.2 (G19A) und as242 nach demselben Schema eingesetzt. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem und das Signal des Nano-Luciferasesignals wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. Die Werte wurden gegen siSc bzw. asScr normiert. Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test angewendet mit $\alpha = 5\%$; * = Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Das Experiment hat gezeigt, dass für den Einsatz von geringen Konzentrationen an ASOs eine Komplementarität von 100 % gegeben sein muss, da ansonsten die Hemmwirkung beeinträchtigt wird. Im Fall einer Punktmutation in der Zielsequenz wäre eine Modifikation der ASOs in Form eines Basenaustauschs erforderlich, um als Wirkstoff in Betracht gezogen zu werden. Für si240 wurde in diesem Beispiel die Hemmwirkung durch die Mutation kaum beeinflusst.

3.4.2.5 Inhibitionsstudien auf der RNA-Ebene

In Kapitel 3.4.2.1 spiegeln die Experimente mittels DLR-Assay die Hemmwirkung der siRNAs im vorliegenden Testsystem auf Proteinebene wider. Für das Verständnis des Mechanismus ist es entscheidend die mRNA-Expression zu betrachten. Dazu wurden, gemäß Kapitel 3.4.1.6 für die ASOs, quantitative Echtzeit-PCR-Analysen genutzt. Die RT-qPCR-Analysen wurden parallel zu den DLR-Assays durchgeführt und boten Einblicke darüber, in welchem Verhältnis

Ergebnisse

die mRNA-Quantitäten zu den gebildeten Proteinen stehen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, ob der Einsatz der siRNAs zu einer Degradation der mRNA führt. Da die meisten Experimente dieses Abschnitts in HEK293T-Zellen durchgeführt wurden, wurden diese auch für die RT-qPCR-Experimente verwendet. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf Protein- und RNA-Ebene zu gewährleisten, wurde die Transfektion in 2x 24-Well-Platten durchgeführt. Eine Platte wurde im DLR-Assay verwendet, während die andere zur RNA-Isolation genutzt wurde. Die Integrität der zellulären RNAs wurde mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese untersucht, und für die cDNA-Synthese wurden *random* Primer verwendet (Kap. 2.2.2.4).

Die Primer, die für die RT-qPCR verwendet wurden, sind in Kapitel 3.4.1.6 beschrieben: Das Primerpaar fLuc-fwd-156 und fLuc-rev-156 mit einer Amplikonlänge von 156 Nukleotiden sowie nLuc-fwd1 und nLuc-rev1 mit einer Amplikonlänge von 105 Nukleotiden. Zur Quantifizierung der Kopienzahl wurden Standardreihen im Bereich von 10^2 bis 10^6 Kopien erstellt. Zudem wurden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikate zu überprüfen. Anhand vorheriger Experimente wurde für das Primerpaar fLuc-fwd-156 und fLuc-rev-156 eine Schmelztemperatur von $81,3\text{ }^\circ\text{C}$ erwartet, während für das Primerpaar nLuc-fwd1 und nLuc-rev1 eine Schmelztemperatur von $81,8\text{ }^\circ\text{C}$ erwartet wurde. Eine analytische Agarose-Gelelektrophorese der RT-qPCR-Produkte wurde stichprobenartig zur Untersuchung der Reinheit durchgeführt (Kap. 2.2.2.6.1). In der RT-qPCR-Analyse wurde die durchschnittliche Menge der mRNA aus dem Nano-Luciferasegen auf die Menge der mRNA des Firefly-Luciferasegens normalisiert. Abbildung 3.20 zeigt ein Luciferase-Assay und eine RT-qPCR-Analyse, die parallel durchgeführt wurden. Dafür wurden im Testsystem HEK293T-Zellen mit 40 nM der siRNAs si203 und si240 transfiziert. Zusätzlich wurde die *sisc*-Kontrolle mitgeführt und zum Normieren der Werte verwendet. Der DLR-Assay zeigte für si203 eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 91% bezogen auf *sisc*. Für si240 wurde eine Hemmwirkung von 10% ermittelt. Die RT-qPCR-Analyse hat ergeben, dass die relative mRNA-Kopienzahl jeweils um 52% und 64% nach Einsatz von si203 und si240 verringert wurde.

Daher konnte aus diesem Experiment geschlossen werden, dass die Hemmwirkung auf RNA-Ebene schwächer ausgeprägt war als auf Proteinebene.

Ergebnisse

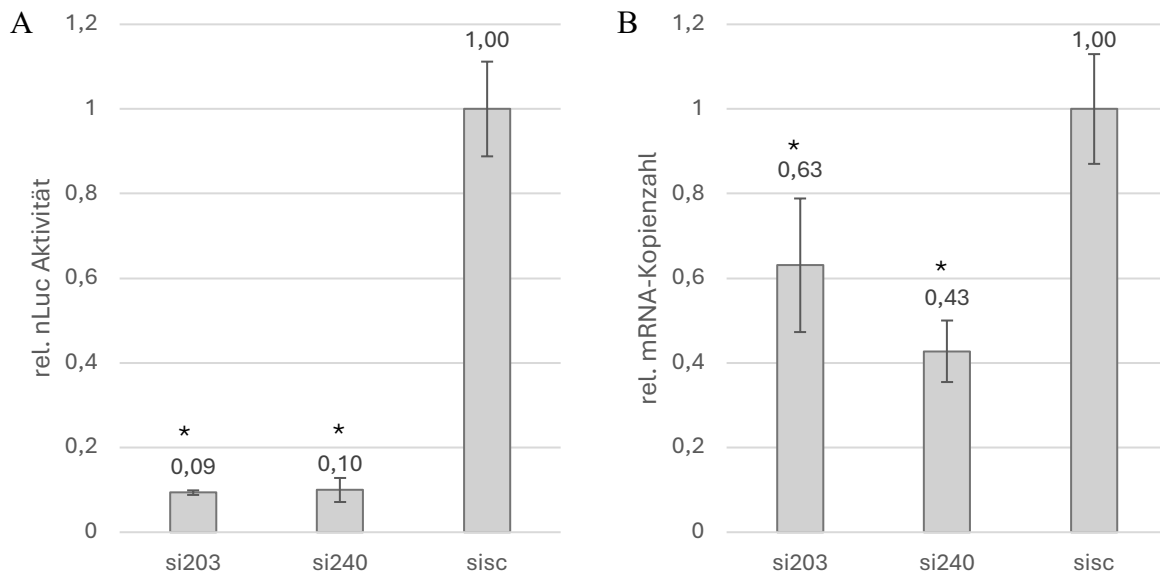


Abbildung 3.20 Messung der Hemmaktivität der siRNAs auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene in HEK293T-Zellen. Die siRNAs si203 und si240 wurden mit einer Konzentration von 40 nM in HEK293T-Zellen im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert und in Bezug auf sisc normiert. A) Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Nano-Luciferasesignals wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. B) 10 ng cDNA wurde in Vierfachbestimmung mittels RT-qPCR quantifiziert und die mRNA-Kopienzahl des nLuc-Transkriptes mit der mRNA-Kopienzahl des fLuc-Transkriptes normalisiert. Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test angewendet mit $\alpha = 5\%$; * = Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung bzw. vier technischen Replikaten aus der RT-qPCR-Messung.

Um eine Zellabhängigkeit auszuschließen, erfolgten weitere Messungen in HeLa-Zellen. Im ersten Experiment (Abb. 3.21) wurde siCoV6 in die Messung mit einbezogen, da diese siRNA in HeLa-Zellen etabliert war. Für die Messung wurden 40 nM der siRNAs si203, si240, siCoV6 und sisc in das pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert. Das Luciferase-Assay in Abbildung 3.21 A wies durch den Einsatz von si203 und si240 eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um jeweils 93 % und 90 % bezogen auf sisc auf. Für siCoV6 ließ sich eine Hemmwirkung von 57 % ermitteln. In der entsprechenden RT-qPCR konnte für die siRNAs si203 und si240 eine Reduktion der relativen Transkriptmenge um 43 % und 76 % bezogen auf sisc ermittelt werden. Der Einsatz von siCoV6 führte zur Reduktion der nLuc-Transkriptmenge um 25 %. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Hemmwirkung der siRNAs auf dem RNA-Level im Vergleich zum Proteinlevel verringert ist, wobei siCoV6 die geringste Hemmwirkung aufwies.

Ergebnisse

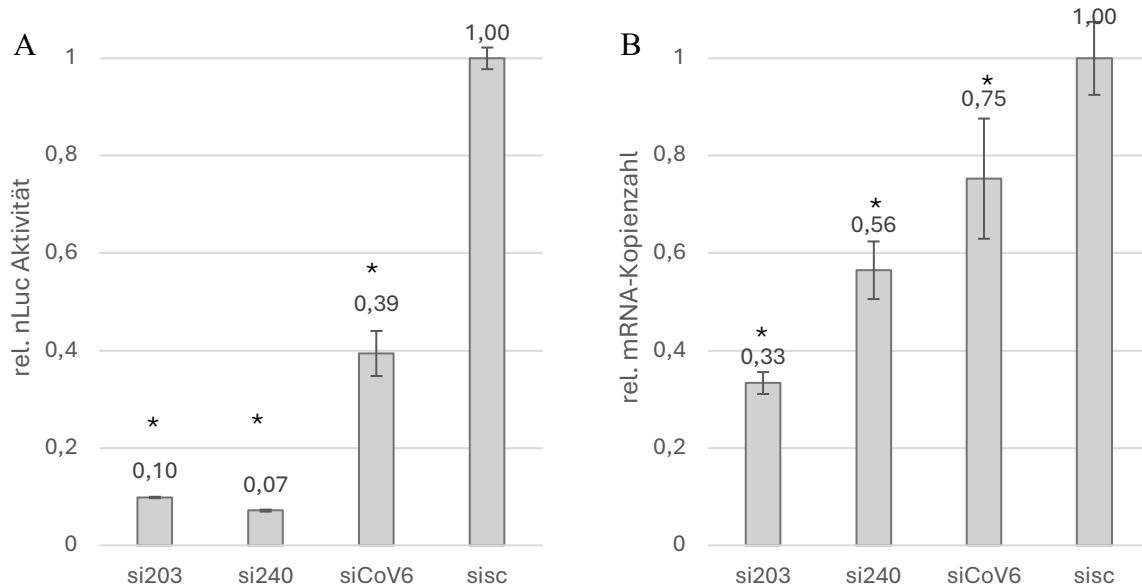


Abbildung 3.21 Messung der Hemmaktivität der siRNAs auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene in HeLa. Die siRNAs si203, si240 und siCoV6 wurden mit einer Konzentration von 40 nM in HeLa-Zellen im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem transfiziert und in Bezug auf sisc normiert. A) Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Nano-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. B) 10 ng cDNA wurde in Vierfachbestimmung mittels RT-qPCR quantifiziert und die mRNA Kopienzahl des nLuc-Transkriptes mit der mRNA Kopienzahl des fLuc-Transkriptes normalisiert (rechts). Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test angewendet mit $\alpha = 5\%$; * = Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung bzw. vier technischen Replikaten aus der RT-qPCR-Messung.

Sowohl in HEK293T- als auch in HeLa-Zellen konnte mittels RT-qPCR-Analyse und DLR-Assay gezeigt werden, dass die Hemmwirkung auf Proteinebene stärker ausgeprägt ist als auf RNA-Ebene.

3.4.3 Exkurs: Mutation des uORFs und der Einfluss auf den Translationsmechanismus

Eine weitere Eigenschaft der 5'-UTR ist das Vorhandensein eines *upstream open reading frames* (uORFs), das sowohl in eukaryotischen Zellen als auch in Viren der Familie Coronaviridae, Flaviviridae, Filoviridae und anderen vorkommen kann (Fang *et al.*, 2022; Lefèvre *et al.*, 2017). Bei SARS-CoV-2 beginnt der uORF an Position 107 mit dem Startcodon AUG und endet mit dem Stopcodon UAA an Position 136 (Abb. 3.22), wodurch es für ein Peptid aus neun Aminosäuren kodiert. Die genaue Funktion des uORFs in SARS-CoV-2 ist derzeit noch nicht vollständig erforscht. Es ist jedoch bekannt, dass uORFs als cis-wirkende Elemente fungieren können, welche die Translationseffizienz der genomischen RNA verringern. Dies geschieht, indem die Ribosomen am Startcodon des uORFs binden und nach Translation des uORFs von der RNA dissoziieren, ohne den zweiten Translationsstartpunkt zu erreichen (Li *et al.*, 2014).

Ergebnisse

Basierend darauf ergab sich die Hypothese, dass eine Mutation des uORFs zu einer Erhöhung der Translationseffizienz führen kann. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde daher mit der Untersuchung dieser Fragestellung im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 begonnen.

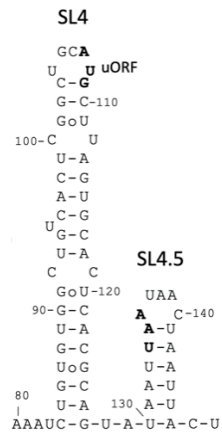


Abbildung 3.22 Ausschnitt aus der Sekundärstrukturvorhersage der 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2. Dieser Ausschnitt zeigt die Sequenzabfolge des uORFs. Das Start- und Stopcodon des uORFs sind fett markiert. Die *Stem-Loops* sind mit „SL“ abgekürzt.

Um die Fragestellung zu untersuchen, wurde zunächst ein Plasmid generiert, welches ein mutiertes uORF-Startcodon enthält, wodurch die Bindung durch Ribosomen verhindert und die Translation des *downstream* ORFs nicht beeinflusst wird. Dieses Plasmid, bezeichnet als pNL-TK-CoV2mt (mt), weist im Vergleich zu pNL-TK-CoV2wt (wt) folgende Punktmutationen auf: T104A, A107T, T108A. Die Mutation an Position 104 trägt dazu bei, dass die *Loop*struktur trotz der eingefügten Mutationen unverändert bleibt. Die anderen beiden Mutationen ändern das Startcodon ATG zu TAG (die modifizierte 5'-UTR-Sequenz befindet sich im Anhang, Abb. 6.5 B).

Anschließend wurden die Plasmide in Konzentrationen von 0 bis 100 ng in das vorliegende Testsystem transfiziert und die nLuc-Expression mittels DLR-Assay gemessen (Abb. 3.23). Dieser Versuch wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. In Abbildung 3.23 A verliefen die Konzentrationskurven von wt nahezu parallel zu mt, mit einer nicht signifikanten Abweichung von 28 % bei einer Konzentration von 75 ng. In Abbildung 3.23 B war ein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven erst ab einer Konzentration von 75 ng zu beobachten; davor verliefen sie nahezu identisch. Der Unterschied zwischen wt und mt betrug 83 % bei 75 ng und 61 % bei 100 ng, wobei die Werte des wt-Plasmids stets oberhalb der mt-Kurve lagen.

Ergebnisse

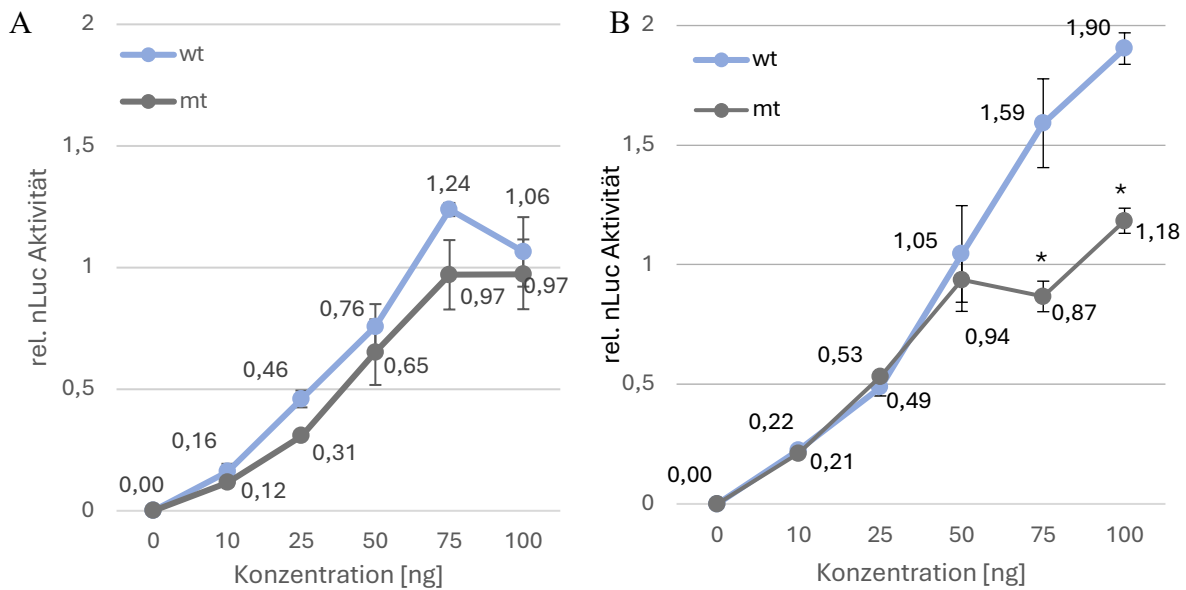


Abbildung 3.23 Konzentrationsreihe zur Ermittlung der Translationseffizienz in HEK293T-Zellen. Die Konzentrationsreihen wurden im Bereich von 0 ng bis 100 ng mittels DLR-Assay gemessen und das Signal des Nano-Luciferasegens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. Das Signal des Nano-Luciferasegens entstammt den Plasmiden pNL-TK-CoV2wt (wt: blau) und pNL-TK-CoV2mt (mt: grau). Der Versuch wurde zwei Mal durchgeführt. Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test angewendet mit $\alpha = 5\%$; * = Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass die Mutation im uORF in diesem Testsystem nicht zu einer erhöhten Translationseffizienz führt, sondern bei hohen Konzentrationen zum Teil signifikant verringert. Dies widerlegt die initiale Arbeitshypothese dieses Abschnitts, sodass die Untersuchung des uORF nicht weitergeführt wurde.

3.4.4 Fazit zu Hemmstudien in einem plasmidbasierten Testsystem mit SARS-CoV-2 Zielsequenzen

In diesem Kapitel wurden ASOs und siRNAs untersucht, die gegen die 5'-UTR von SARS-CoV-2 gerichtet sind. Zunächst wurden zehn ausgewählte ASOs in einem ersten *Screening* mittels DLR-Assay in HEK293-Zellen miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass die ASOs as35,21, as203,20, as220,22, as222,20 und as240,20 die höchste Wirksamkeit zeigen. Diese ASOs wurden für weitere Studien in Betracht gezogen.

Die dosisabhängige Wirksamkeit dieser ASOs wurde durch Erstellen von DW-Kurven untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass nur as203 und as240 eine dosisabhängige Wirksamkeit aufweisen. Diese ASOs wurden für mechanismusbezogene Studien verwendet. Durch gezielte Mutationen in der RNase H-Erkennungssequenz der ASOs konnte gezeigt werden, dass der Wirkmechanismus in beiden Fällen über RNase H-Aktivität erfolgt. Um eine potenziell höhere Wirksamkeit gegenüber mutierten Varianten zu ermöglichen, wurden die ASOs im Testsystem bei 40 nM miteinander kombiniert. Die Kombination hat jedoch nicht zu einer erhöhten Wirksamkeit der ASOs geführt und wurde daher nicht näher untersucht. Zur

Ergebnisse

weiteren Aufklärung des Mechanismus wurden Hemmstudien auf RNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR (RT-qPCR) durchgeführt. Diese haben sowohl in HEK239T- als auch in HeLa-Zellen gezeigt, dass die Hemmaktivität auf der Proteinebene ausgeprägter ist als auf der RNA-Ebene.

Zur Entwicklung der siRNAs wurden etablierte Kriterien angewendet, um möglichst wirksame und effiziente siRNAs zu generieren. In einem ersten Versuch wurden die siRNAs si203 und si240 mit siCoV6 verglichen. Diese Versuche wurden in HEK293T-, ECV304- und HeLa-Zellen durchgeführt, wobei eine effiziente Wirksamkeit der siRNAs in allen drei Zellsystemen bestätigt wurde. Basierend darauf wurden DW-Kurven erstellt, um die dosisabhängige Wirksamkeit der beiden siRNAs zu untersuchen. Dabei konnte für beide siRNAs eine dosisabhängige Wirksamkeit festgestellt werden. Im nächsten Schritt wurde die Kombination der siRNAs im Testsystem mittels DLR-Assay untersucht, um festzustellen, ob der inhibitorische Effekt verstärkt werden kann. Die Kombination hat jedoch nicht zu einer Verstärkung des inhibitorischen Effekts geführt.

Da alle VOCs von SARS-CoV-2 die Punktmutation C241T aufweisen, welche sich in der Zielregion von as240 bzw. si240 befindet, wurde untersucht, wie sich die Punktmutation auf die Hemmwirkung dieser Wirkstoffe auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Modifikation von as240 in Form eines Basenaustauschs erforderlich wäre, um im viralen System ihre volle Wirksamkeit zu entfalten, da Punktmutationen die Wirksamkeit konzentrationsabhängig verringert haben. Für si240 wurde festgestellt, dass die Hemmwirkung durch die Mutation nur wenig beeinflusst wird.

Zur Aufklärung des Mechanismus der siRNAs wurde auch hier die mRNA-Expression mittels RT-qPCR untersucht, wobei sowohl in HEK293T- als auch in HeLa-Zellen gezeigt wurde, dass die Wirkung der siRNAs auf Proteinebene höher ist als auf RNA-Ebene.

3.5. Studien in einem Replikon-basierten Testsystem das SARS-CoV-1 und -2 Zielsequenzen beherbergt

In diesem Abschnitt der Arbeit lag der Fokus darauf, die bisher verwendeten Hemmstoffe in einem Replikon-basierten System einzusetzen. Dieses System bietet den Vorteil, dass es näher an der viralen Replikation liegt und neben der 5'-UTR weitere virale Einheiten enthält. Zusätzlich ist es in der Lage subgenomische RNA zu produzieren. Das pHybrid-Replikon (Plasmidkarte befindet sich im Anhang, Abb. 6.8) wurde freundlicherweise von der AG-Hilgenfeld zur Verfügung gestellt. Für die Transkription der Zielstrukturen mittels zelleigener Polymerasen enthält es eine regulatorische Sequenz, die einen CMV-Promoter codiert. Daran anschließend befindet sich die 5'-UTR aus SARS-CoV-1 (Pos. 219 - 482) sowie die gesamte Sequenz des ORF1ab (SARS coronavirus Urbani; AY278741.1). Lediglich die Sequenz im Nsp5 wurde durch die entsprechende Sequenz aus SARS-CoV-2 ausgetauscht, weshalb es als Hybridreplikon bezeichnet wird. Um das Replikon für Luciferase-Assays zu verwenden, enthält es eine Renilla-Luciferase-Sequenz die 3' an den ORF1ab anknüpft. Da das N-Protein aufgrund seiner Chaperonaktivität eine entscheidende Rolle für die Generierung der sgRNA spielt (Cong *et al.*, 2020), ist es mit seiner TRS-N 3' zur rLuc-Sequenz geschaltet. Daran anschließend folgt die 3'-UTR, die als Replikationsstartstelle für die RdRp dient, welche aus Nsp12 kodiert wird (Zhao *et al.*, 2020). Zudem enthält das Replikon 3' an die 3'-UTR geknüpft eine synthetische Poly A-Sequenz, eine Hepatitis Deltaribozym-Sequenz, ein *bovine growth hormone* (BGH) Poly A-Signal, eine LacZ- α -Sequenz, und die Sequenz des pBelo-Bac11-Vektors (Abb. 6.8). Bei pBelo-Bac11 (*accession number* U51113) handelt es sich um ein Klonierungsplamid, in das die Bestandteile des pHybrid-Vektors kloniert wurden. Es ist 7507 Nukleotide lang und enthält ein Chloramphenicol-Resistenzgen.

Die Hemmstudien in diesem Testsystem wurden mit dem pHybrid-Replikon als Zielplasmid und pGL3-Control als Normierungsvektor durchgeführt. Die Plasmide wurden zusammen mit den Oligonukleotiden in HuhT7-Zellen, die in 24-Well-Platten ausgesät waren, co-transfiziert. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung transfiziert. Anschließend wurde nach 48 h, wie in Kapitel 2.2.1.7 beschrieben, ein DLR-Assay durchgeführt.

Ergebnisse

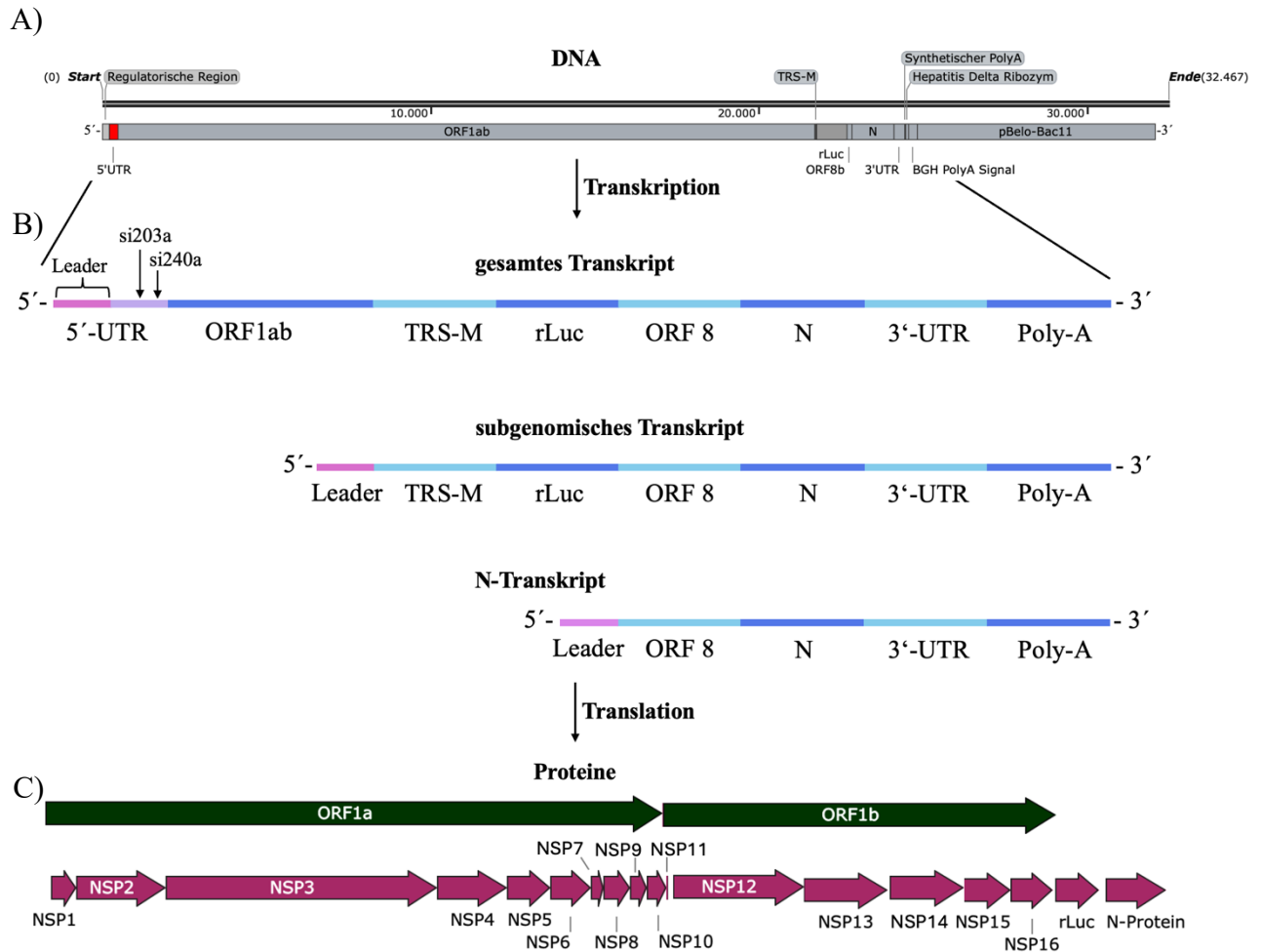


Abbildung 3.24 Schematische Darstellung vom pHybrid-Replikon mit allen Transkripten und synthetisierten Proteinen. A) Plasmidkarte mit Darstellung der Genabschnitte des 32.467 bps langen Replikons (grau), rot: 5'-UTR. B) Darstellung des gesamten-, subgenomischen- und N-Transkriptes sowie Markierung der Bindestellen für si203a und si240a. Lila: 5'-UTR, rosa: Leadersequenz, blau/hellblau: weitere Sequenzabschnitte C) Translatierte Proteine aus dem pHybrid-Replikon mit allen Nsps sowie rLuc und N-Protein.

Den Hemmstudien ging eine mfold-Analyse der Zielstruktur aus dem pHybrid-Replikon voraus. Dabei wurde untersucht, ob das Faltungsmuster dem der SARS-CoV-2-Referenzsequenz (NC_045512.2) entspricht, was gewährleistet, dass die Zielsequenzen für die oligonukleotidbasierten Hemmstoffe weiterhin zugänglich sind (Abb. 3.25). Diese Analyse hat gezeigt, dass die Faltungsmuster nahezu identisch sind und die Zielstrukturen im Bereich von 203 bis 260 Nukleotiden zugänglich sind. Alle *Stem-Loops*, bis auf SL4.5, sind in den 5'-UTRs der beiden Sequenzen intakt. Anstelle von SL4.5 weist die SARS-CoV-1 Sekundärstruktur an Position 125-148 eine ungepaarte Region aus 24 aufeinanderfolgenden Nukleotiden auf (Abb. 3.25 B). Weiterhin unterschieden sich die Strukturen an ihren *Bulges*, im Stamm von SL1 und SL5. Diese strukturellen Veränderungen sind auf Unterschiede in den Sequenzen zurückzuführen, die sich im Alignment der 5'-UTR von SARS-CoV-1 und -2 gezeigt haben (Abb. 3.26).

Ergebnisse

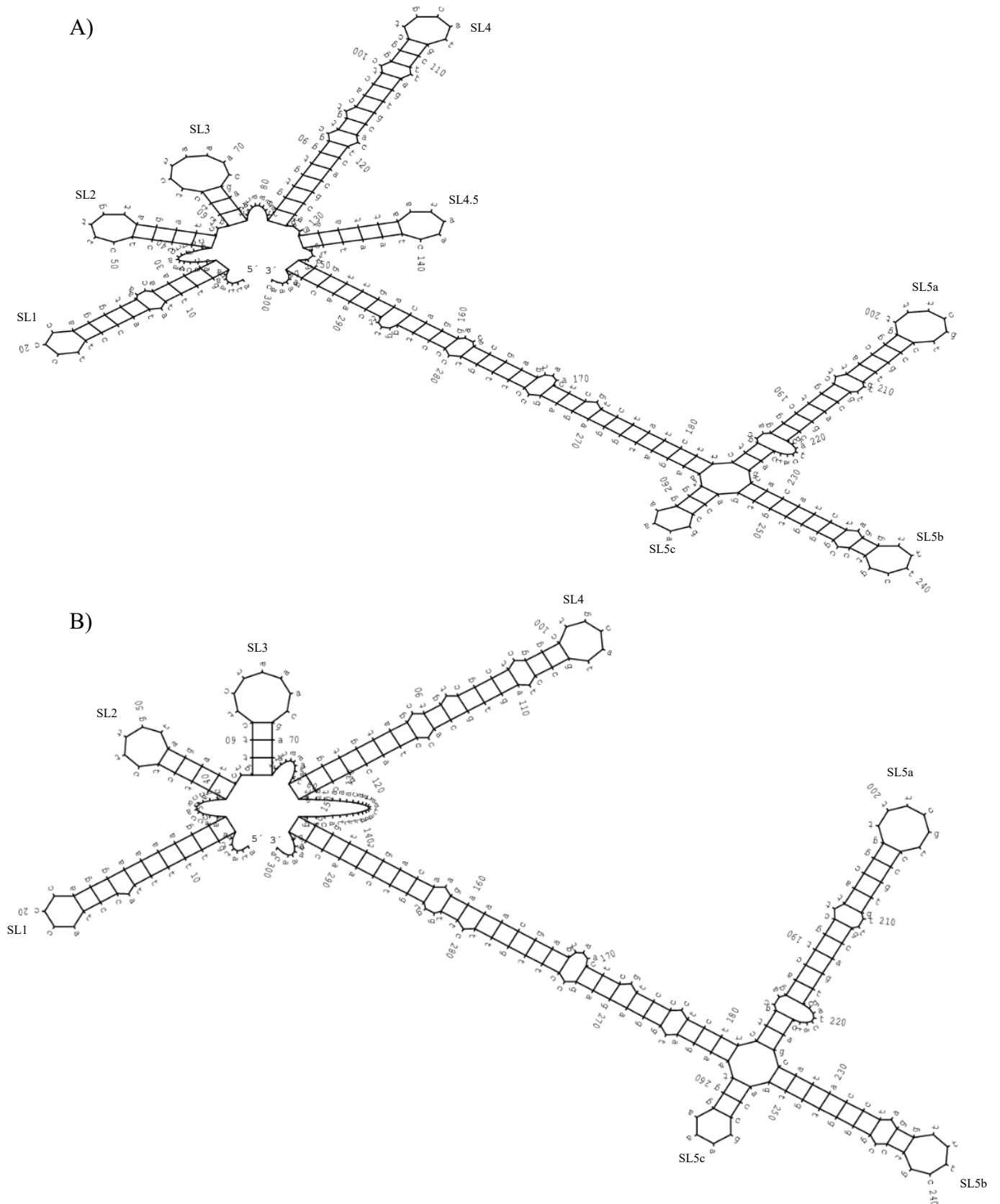


Abbildung 3.25 Sekundärstrukturmodelle der 5'-UTR von SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2. Mittels mfold Berechnungen wurden die Sekundärstrukturen der 5'-UTRs ermittelt und miteinander verglichen. A) Sekundärstruktur der ersten 300 Nukleotide der SARS-CoV-2-Referenzsequenz (NC_045512.2) ($\Delta G = -91$ kcal/mol). B) Sekundärstruktur der ersten 300 Nukleotide der SARS-CoV-1-Sequenz aus dem pHybrid-Replikon ($\Delta G = -87,9$ kcal/mol).

Ergebnisse

Um die Integrität der Sequenzen und die Bindung der Hemmstoffe zu gewährleisten, wurde eine Sequenzierung der 5'-UTR aus dem pHybrid-Replikon durchgeführt.

Für die Sequenzierung wurden die Primer CMV-fwd: 5'-cgcaaatgggcggttagcggtg-3' (Pos. 154-174) und Nsp1-rev: 5'-agccacgcactagcagctctctaa-3' (Pos. 550-573) verwendet. Das Ergebnis wurde mit der SARS-CoV-1-Referenzsequenz (SARS Coronavirus Urbani; AY278741.1) abgeglichen und wies keine relevanten Mutationen für die Wirkstoffe auf.

Darüber hinaus wurde *in-silico* untersucht, welche Transkripte aus dem pHybrid-Replikon entstehen (Abb. 3.24 B). Durch die vollständige Transkription, die im ersten Schritt vom CMV-Promoter gesteuert wird, entsteht das gesamte Transkript, das die *Leader*sequenz und die vollständige 5'-UTR enthält. Diese entsteht zudem mittels RdRp, die zunächst aus dem Positivstrang einen Negativstrang synthetisiert. Dieser wird dann wieder in eine +ssRNA umgewandelt, die eine Translation ermöglicht und als Template für weitere Replikationsschritte dient. An diese +ssRNA können die siRNAs si203 und si240 binden. Das subgenomsiche Transkript enthält die Zielsequenzen der siRNAs nicht. Es beginnt aufgrund der diskontinuierlichen Transkription mittels RdRp mit der TRS-M-Sequenz, die im 5'-Bereich die *Leader*sequenz enthält. Zusätzlich entsteht aufgrund der TRS-N das N-Transkript. Im Gegensatz zu den anderen beiden Transkripten enthält sie keine rLuc-Sequenz und ist für die weiteren Analysen nicht relevant (Abb. 3.24 B).

Ein Alignment der 5'-UTR von SARS-CoV-1, die im pHybrid-Replikon codiert ist, und der Referenzsequenz der 5'-UTR von SARS-CoV-2 (Abb. 3.26) hat ergeben, dass dieser Bereich nicht vollständig identisch ist. Das Alignment wies zwar im Zielbereich von si240 keine Mutation auf, im Zielbereich von si203 hingegen lag die Mutation T219C vor. Zudem lagen noch einige Mutationen in der *Leader*sequenz vor. Diese beeinflussen das Faltungsmuster jedoch kaum (Abb. 3.25).

Die siRNAs mussten für weitere Analysen so angepasst werden, dass sie zu den Zielsequenzen auf dem pHybrid-Replikon vollständig komplementär sind (Tab. 3.9). Si240 wurde angepasst, indem die Mutation A7U, die aufgrund der Modifikationen an der Zielstruktur im pNL-TK-CoV2wt-Testsystem (T253A) eingefügt wurde, rückgängig gemacht wurde (U7A). Damit ist si240a vollständig komplementär zur SARS-CoV-1- und SARS-CoV-2-Referenzsequenz. Um die Mutation T219C auszugleichen, wurde für si203a an Position 15 die Base Guanin zu Adenin ausgetauscht. Damit ist si203a vollständig komplementär zu SARS-CoV-1, jedoch nicht mehr zur SARS-CoV-2-Referenzsequenz.

Ergebnisse

	10	20	30	40	50	60
SARS-CoV-1	ATATTAGGTTTTTACCTACCCAGGAAA--AGCCAACCAACCT-CGATCTCTTGTAGATCT					
SARS-CoV-2	ATTAAAGGTTTATACCTTCCCAGGTAACAAACCAACCAACTTTCGATCTCTTGTAGATCT					
	70	80	90	100	110	120
SARS-CoV-1	GTTCTCTAAACGAACCTTAAATCTGTGTAGCTGTCGCTCGGCTGCATGCCTAGTGCACC					
SARS-CoV-2	GTTCTCTAAACGAACCTTAAATCTGTGTGGCTGTCACTCGGCTGCATGCTTAGTGCACCT					
	130	140	150	160	170	180
SARS-CoV-1	TACGCAGTATAACAATAATAAATTTACTGTCGTTGACAAGAAACGAGTAACTCGTCCC					
SARS-CoV-2	CACGCAGTATAATTAATAACTAATT--ACTGTCGTTGACAGGACACGAGTAACTCGTCTA					
	190	200	210	220	230	240
SARS-CoV-1	TCTTCTGCAGACTGCTTACGGT <u>TTCGTCCGTGTTGCAGTCGA</u> TCATCAGCATACTAGGT					
SARS-CoV-2	TCTTCTGCAGGCTGCTTACGGT <u>TTCGTCCGTGTTGCAGCCGA</u> TCATCAGCACATCTAGGT					
	250	260	270			
SARS-CoV-1	<u>TTCGTCCGGGTGTGACCGA</u> AAAGGTAAGATG					
SARS-CoV-2	<u>TTCGTCCGGGTGTGACCGA</u> AAAGGTAAGATG					

Abbildung 3.26 Darstellung des Alignments der ersten 270 Nukleotide aus der SARS-CoV-1-Sequenz des pHybrid-Replikons und der Referenzsequenz (NC_045512.2) von SARS-CoV-2. Die Positionen der siRNAs si203 (Pos. 203-222) und si240 (Pos. 240-259) sind fett gekennzeichnet und unterstrichen. Rot: Basenaustausch, „-“ fehlende Nukleotide.

Tabelle 3.9 Anpassung der siRNAs si203 und si240 an das Replikonsystem. Angegeben sind die Bezeichnungen sowie die Sequenzen der *guide*-Stränge in 5' → 3'-Richtung von si203 und si240 mit den angepassten Varianten si203a und si240a. Si203a und si240a sind vollständig komplementär zur SARS-CoV-1-Zielssequenz. Rot, fett: ausgetauschte Nukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
si203	gaucggcugcaacacggacgtt
si203a	gaucg a cugcaacacggacgtt
si240	uuucggacacacccggacgatt
si240a	uuucgg u cacacccggacgatt

3.5.1 Analyse des pHybrid-Replikons auf Transkriptionsebene

Das pHybrid-Replikonsystem ähnelt dem viralen System von SARS-CoV-2, da es mit dem vollständigen ORF1ab alle Nsps kodiert und zusätzlich das N-Protein und die 3'-UTR umfasst. Somit enthält es alle erforderlichen Elemente für eine eigenständige Replikation des Genoms und stellt zudem ein subgenomisches Transkript her (Abb. 3.24 B). Lediglich die Strukturproteine E, S und M fehlen, um vollständige und infektiöse Virionen zu produzieren. Aufgrund dieser Vielzahl an Genen stellt das Replikon mit einer Länge von 32 kb eine Herausforderung für die Transkription dar. Darüber hinaus ist der CMV-Promoter in der regulatorischen Sequenz codiert, was die Transkriptionseigenschaften des Systems im Vergleich zum viralen System verändert.

In diesem Kapitel wird die Transkription des Replikonsystems unter Berücksichtigung der genannten Aspekte analysiert.

3.5.1.1 Analyse der Transkriptionseffizienz des genomischen Transkripts in voller Länge

In diesem Kapitel wird die Transkriptionseffizienz im pHybrid-Replikon mittels RT-qPCR untersucht. Hierbei wird analysiert, in welchem Ausmaß das genomische Transkript bis zum Renilla-Luciferasegen (Pos. 21.754) transkribiert wird und mit welchem Anteil die Polymerase abbricht, bevor sie das Luciferasegen erreicht.

Zu diesem Zweck wurden zwei Amplikons auf dem Replikon mittels RT-qPCR miteinander verglichen. Für das erste Amplikon wurde das Primerpaar UTR-rep-fwd (5'-tacggttcgctccgtgttc-3') und NSP1-rev-1 (5'-tggacgtgtgtttctcgttg-3') ausgewählt. Dieses bindet an Position 412-526 auf der 5'-UTR (beginnt an Position 219 auf dem Replikon) und reicht bis in das Nsp1 mit einer Länge von 115 Nukleotiden. Für das zweite Amplikon wurde das Primerpaar ORF1b-fwd (5'-aacagagtgtggtttcaagtgat-3') und rLuc-rev (5'-caccactgcgaccagttatc-3') ausgewählt. Dieses bindet an Position 21.662-21.816 am 3'-Ende des ORF1b und reicht bis in das rLuc-Gen mit einer Länge von 154 Nukleotiden.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurde genomische RNA aus transfizierten HEK293T-Zellen isoliert, wobei in einem Fall nur das pHybrid-Replikon mit pGL3-Control transfiziert

Ergebnisse

wurde und im anderen Fall 30 nM sisc co-transfiziert wurde, um einen Einfluss der siRNAs auszuschließen. Nach erfolgreicher RNA-Isolation und cDNA-Synthese mittels *random* Primern (Kap. 2.2.2.2) wurde die RT-qPCR mit den Proben und den oben genannten Primern durchgeführt. Die Quantität der pHybrid-Transkripte wurde für die beiden Amplikons graphisch aufgetragen (Abb. 3.27). Anhand der mRNA-Kopienzahl wurde für den Fall ohne siRNA (-) festgestellt, dass das Amplikon im ORF1b zu 24 % weniger vorliegt als das Amplikon im 5'-UTR-Bereich. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist dieses Ergebnis nicht signifikant. In Gegenwart von sisc ist der Unterschied signifikant und beträgt 40 %.

Das Ergebnis zeigt, dass die Transkriptionseffizienz mit der Länge des Transkripts abnimmt, wenn siRNA involviert ist und das Luciferasegen, das sich in 3'-Richtung von ORF1b befindet, seltener transkribiert wird als die 5'-UTR.

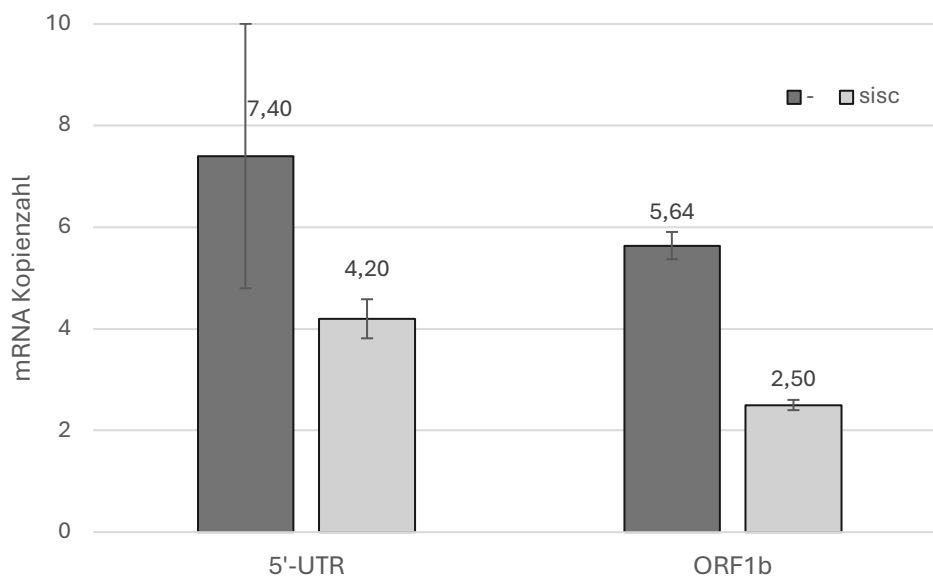


Abbildung 3.27 Transkriptionseffizienz des Gesamtlängentranskriptes. Das pHybrid-Replikon wurde in HEK293T-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde jeweils 30 nM sisc co-transfiziert. 10 ng cDNA wurde in Vierfachbestimmung mittels RT-qPCR quantifiziert und die Transkriptionseffizienz mit Primerpaaren für die 5'-UTR sowie für das ORF1b ermittelt. „-“: Probe ohne siRNA. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von vier technischen Replikaten aus der RT-qPCR-Messung.

3.5.1.2 Quantifizierung der CMV-gesteuerten Transkription verglichen zur RdRp-gesteuerten Transkription

Der CMV-Promoter (*human CMV major immediate-early promoter*) ist ein Promoter des humanen Zytomegalievirus, der sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* zur Expression von Genen genutzt wird. Er gilt als stabiler, konstitutiver und ubiquitärer Promotor für die Genexpression (Bäck *et al.*, 2019). Die Effizienz dieses Promoters ist zelltypabhängig und führt beispielsweise in HEK293T-Zellen zu einer vergleichsweise hohen Genexpression im Vergleich zu anderen Promotoren (Qin *et al.*, 2010).

Um den Einfluss des CMV-Promotors auf die Transkription des pHybrid-Replikons in HuhT7-Zellen zu untersuchen, wurde eine Quantifizierung mittels RT-qPCR durchgeführt. Dazu

Ergebnisse

wurden zunächst HuhT7-Zellen mit dem pHybrid-Replikon sowie pGL3-Control transfiziert. Durch die Isolierung mehrerer biologischer Replikate konnten sowohl unspezifische cDNA-Synthesen mit randomisierten Primern als auch spezifische cDNA-Synthesen durchgeführt werden. Dies wurde für zwei Proben durchgeführt: die Leerkontrolle, in der nur das pHybrid-Replikon und pGL3-Control transfiziert wurden, sowie die Probe mit 1 nM si240a, um den Effekt in Kombination mit einer siRNA zu untersuchen. Die spezifische cDNA-Synthese wurde mit dem Primer UTR-rep-fwd2 (5'-tacctaccaggaaaagccaac-3') durchgeführt, der an Position 231-252 der 5'-UTR bindet. Dieser Primer bindet an die -ssRNA, die nur über die RdRp synthetisiert wird. Der Vorteil dieses Primers ist, dass er sowohl an genomische als auch subgenomische RNA binden kann, sodass in der RT-qPCR aus beiden Transkripten Amplikons detektiert werden konnten. Für die RT-qPCR-Analyse wurde der Primer UTR-rep-fwd2 in Kombination mit rLuc-rev (5'-caccactgcgaccagttatc-3') zur Detektion der sgRNA und in Kombination mit Nsp1-rev-1 (5'-tggacgtgtgtttctcggtg-3') zur Detektion der gRNA verwendet. Das Primerpaar UTR-rep-fwd2 und rLuc-rev zur Detektion der sgRNA bindet an Position 231-21.815 und bildet ein 138 nts langes Amplikon. Das Primerpaar UTR-rep-fwd2 und Nsp1-rev-1 bindet an Position 231-526 und bildet ein 296 nts langes Amplikon. Zur Quantifizierung der Transkripte wurden mit den entsprechenden Primerpaaren Standardkurven im Bereich von 10^2 bis 10^6 Kopien mit dem pHybrid-Replikon erstellt. Zudem wurden Dissoziationskurven erstellt und die PCR-Produkte mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.6.1) auf ihre Integrität überprüft. Mithilfe der Standardkurven wurden die Quantitäten der Amplifikate ermittelt und in Abbildung 3.28 dargestellt. Die blauen Balken in Abbildung 3.28 A zeigen die Quantität der gesamten gRNA-Transkripte, die mittels CMV- und RdRp-gerichteter Transkription entstanden sind (in Abb. 3.28 mit „CMV“ abgekürzt). Die grauen Balken geben die Menge der gRNA-Transkripte mit negativer Polarität wieder, die nur von der RdRp transkribiert wurden (im Abb. 3.28 mit „RdRp“ abgekürzt). Es wurde ermittelt, dass von diesen RdRp-Transkripten in Bezug auf die Gesamtmenge an Transkripten nur 11 % vorlagen. Der Einsatz von si240a führte zu einer Kopienzahl, die 85 % geringer war bezogen auf die Leerkontrolle (-) für die gesamten Transkripte und zu einer um 79 % geringeren Kopienzahl bezogen auf die Leerkontrolle für die RdRp-gerichteten Transkripte.

Für die sgRNA-Transkripte konnten ähnliche Werte ermittelt werden. Während die von der RdRp generierten sgRNA-Transkripte nur zu 14 % vorlagen im Vergleich zu der Gesamtzahl an sgRNA-Transkripten, lag die Verringerung der Kopienzahl durch si240 für die Gesamtzahl an sgRNA-Transkripten bei 90 % und für die RdRp generierten sgRNA-Transkripte bei 84 %. Das Verhältnis von gRNA zu sgRNA lag bei 20:1 im Fall der gesamten Transkripte und bei 15:1 im Fall der RdRp-gerichteten Transkripte.

Ergebnisse

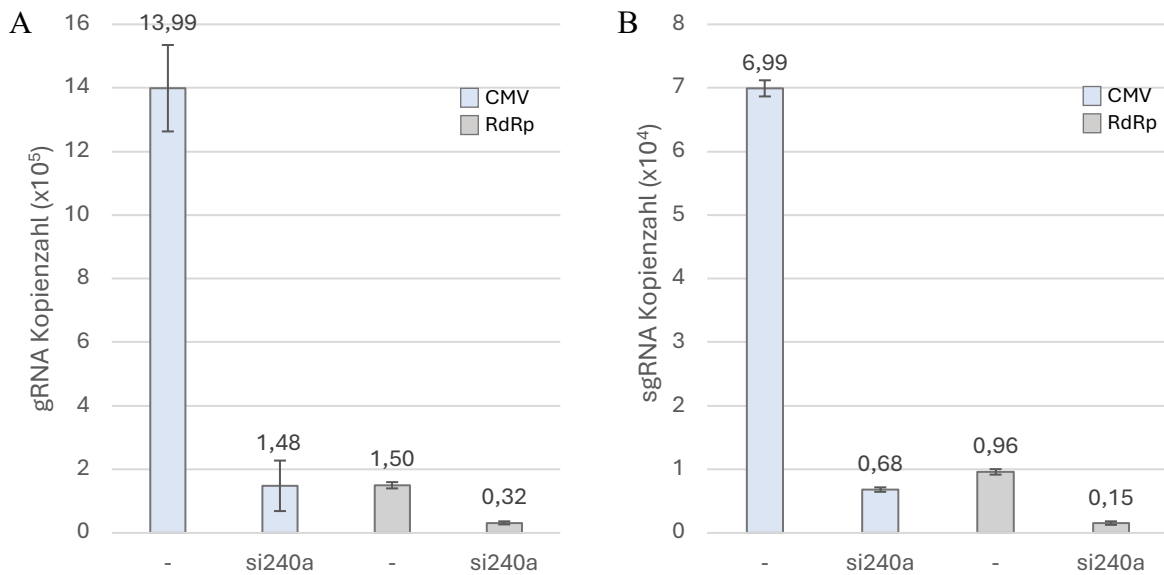


Abbildung 3.28 CMV-gesteuerte Transkription verglichen zur RdRp-gesteuerten Transkription.

Das pHybrid-Replikon wurde in HuhT7-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde jeweils 1 nM si240a co-transfiziert. Die cDNA-Synthese wurde zum einen mit *random* Primern vollzogen (blau) und zum anderen mit Primern, die die -ssRNA amplifizieren, welche nur über die RdRp synthetisiert wird (grau). 10 ng cDNA wurde in Vierfachbestimmung mittels RT-qPCR quantifiziert und die Transfektionseffizienz mit Primerpaaren für das genomische (A) und subgenomische Transkript (B) ermittelt. „-“: Probe ohne siRNA. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von vier technischen Replikaten aus der RT-qPCR-Messung.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Beteiligung des CMV-Promoters zu einer 90 % gesteigerten Transkription des genomisches Transkriptes führte. Das Verhältnis zwischen gRNA und sgRNA unterschied sich um 25 % und war größer, wenn der CMV-Promoter beteiligt war. Der Hemmeffekt durch die siRNA war sowohl auf Ebene der gRNA als auch auf Ebene der sgRNA für die RdRp-gerichtete Transkription um genau 6 % geringer als für die CMV-gerichtete Transkription.

3.5.2 Funktionelle Studien auf Proteinebene für ASOs und siRNAs im Replikonsystem

In Kapitel 3.4 wurde die Hemmwirkung der gegen die 5'-UTR gerichteten oligonukleotidbasierten Wirkstoffe im Vektorsystem untersucht, indem zunächst die Aktivität der Nano-Luciferase im DLR-Assay nach Zugabe der Wirkstoffe analysiert wurde. Um den Mechanismus genauer zu verstehen, wurden neben Untersuchungen zum RNase H-Mechanismus RT-qPCR-Analysen durchgeführt und die Hemmwirkung auf der RNA-Ebene betrachtet. In diesem Kapitel wurden diese Analysemethoden auf das pHybrid-Replikonsystem angewendet, um zu untersuchen, ob die Hemmwirkungen in einem komplexeren und der viralen Replikation näheren System reproduziert werden können. Der Schwerpunkt der Analysen lag auf der Hemmwirkung der siRNAs, da sich diese in den bisherigen Analysen im Vergleich zu den ASOs als potenter und zuverlässiger erwiesen haben.

3.5.2.1 Untersuchung der Hemmwirkung der Oligonukleotide im Replikonsystem

Zunächst wurde untersucht, ob die siRNAs im pHybrid-Replikonsystem wirksam sind. Dazu wurden HEK293T-Zellen verwendet, die in dieser Arbeit als Standardzelllinie eingesetzt wurden und somit die meisten Referenzdaten lieferten. Mit einer Konzentration von 30 nM wurden si240a, si203a, siCoV6 und siRLuc-Duplex (siRLuc) mit sisc verglichen und auf diese Kontrolle normiert. Die siRNA siRLuc-Duplex (5'-aaaaacatgcagaaaatgctg-3') wurde kommerziell bei Dharmacon Reagents erworben und dient als Maßstab für die Funktionalität des siRNA-Mechanismus in diesem System. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt und in Abbildung 3.29 zusammengeführt. Die Integrität der siRNAs wurde mithilfe einer analytischen PAA-Gelelektrophorese überprüft (Kap. 2.2.2.6.2). Abbildung 3.29 zeigt für si240a und siCoV6 eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um jeweils 98 % und 99 % im Vergleich zu sisc. Für si203a lag die Hemmung bei 94 %.

Die geringste Hemmwirkung um 69 % wurde bei siRLuc gemessen. Dieser Wert war mit Literaturwerten vergleichbar (Elbashir *et al.*, 2001).

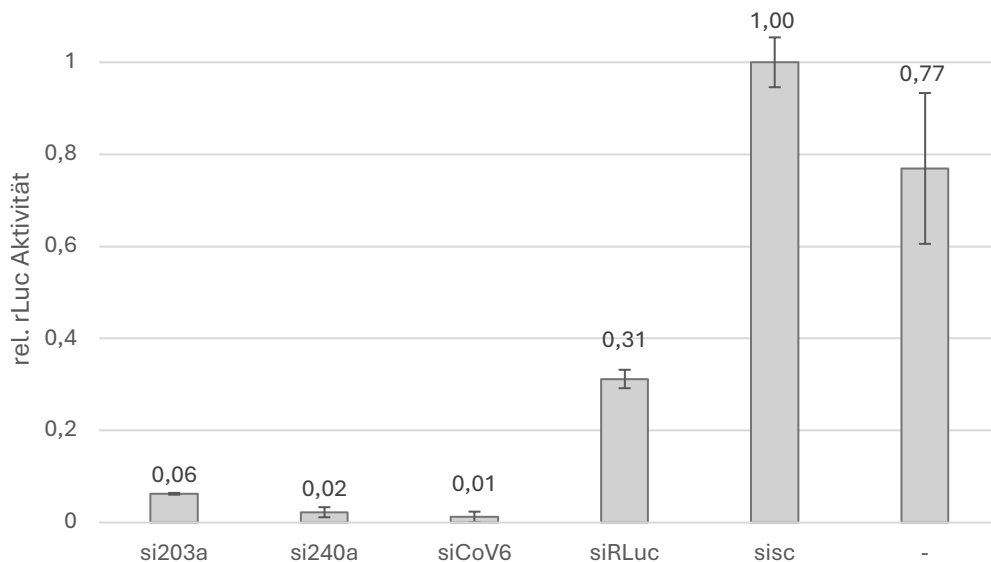


Abbildung 3.29 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs auf Proteinebene in HEK293T-Zellen. Die siRNAs wurden zwei Mal mit einer Konzentration von 30 nM in HEK293T-Zellen im pHybrid-Replikonsystem transfiziert. Die Ergebnisse aus zwei Versuchstagen wurden hier zusammengeführt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich siRLuc und sisc transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Renilla-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. „-“: Probe ohne siRNA. Alle Werte wurden gegen sisc normiert. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Für das vorliegende Testsystem konnte gezeigt werden, dass eine siRNA-Aktivität sowie die Reproduktion der Wirksamkeit der siRNAs möglich ist. Anders als im Kapitel 4.2, zeigte siCoV6 eine vergleichbare Hemmaktivität wie si203a und si240a. Daher wurden die Hemmwirkung der siRNAs in diesem System in den folgenden Kapiteln genauer untersucht.

Weiterhin wurde die Wirksamkeit der ASOs sowie der RNase H-Mechanismus in diesem System untersucht. Dazu wurden die ASOs as240m, as240Hc und asCoV6 mit einer

Ergebnisse

Konzentration von 50 nM eingesetzt, sowie asScr als Negativkontrolle und zum Normieren verwendet. As240Hc enthält im Vergleich zu as240, wie in Kapitel 3.4.1.4 beschrieben, eine 2'-OMe-Modifizierung in der RNase H-Erkennungsregion sowie die Fehlpaarung zu SARS-CoV-1 an Position 7 vom 5'-Ende des ASOs (A•A). As240m enthält die Mutation A7T, sodass sie vollständig komplementär zu SARS-CoV-1 ist. Die Messung hat ergeben, dass as240m in Bezug auf asScr die relative Luciferaseaktivität um 95 % gehemmt hat. Der Einsatz von as240Hc und siCoV6 zeigte eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um jeweils 42 % und 49 % in Bezug zu asScr, jedoch zeigte as240Hc in Bezug zur Leerkontrolle (-) keine Hemmwirkung.

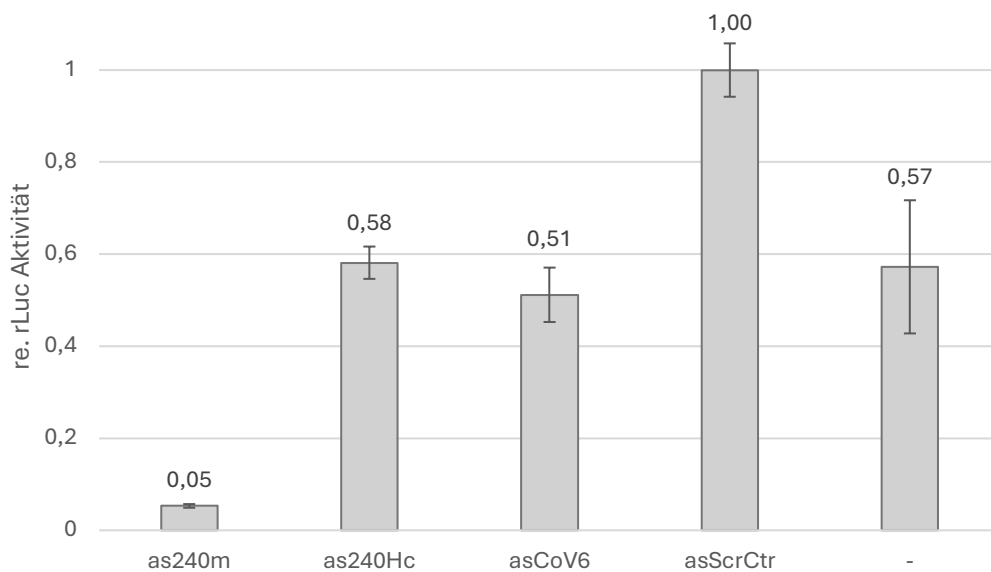


Abbildung 3.30 Vergleich der Wirksamkeit der ASOs auf Proteinebene in HEK293T-Zellen. Die ASOs wurden mit einer Konzentration von 50 nM in HEK293T-Zellen in das pHybrid-Replikonsystem transfiziert. Zur Kontrolle wurden asScr und as240Hc transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Renilla-Luciferasesegens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normiert. „-“: Probe ohne siRNA. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass der RNase H-Mechanismus in diesem System funktional ist. Zudem ist asCoV6 als ASO weniger wirksam als in siRNA-Form.

Für die nachfolgenden Studien wurden nur noch die siRNAs als Wirkstoffe herangezogen, da sich diese in den vorherigen Studien im Plasmidsystem als insgesamt wirksamer erwiesen haben (Kap. 3.4).

3.5.2.2 Dosis-Wirkungsbeziehung für die siRNAs

Wie in Kapitel 3.4.2.2 beschrieben, wurde die dosisabhängige Wirksamkeit der siRNAs auch im Replikonsystem untersucht. Dazu wurden si203a und si240a in einem Konzentrationsbereich von 0,3 nM bis 100 nM in das Testsystem transfiziert. HEK293T-Zellen wurden mit dem pHybrid-Replikon, pGL3-Control und der entsprechenden siRNA co-transfiziert und nach 48 h, wie in Kapitel 2.2.1.7 beschrieben, mittels DLR-Assay quantifiziert.

Ergebnisse

Die Integrität und Konzentration der siRNAs wurde durch analytische PAA-Elektrophorese überprüft (Kap. 2.2.2.6.2). Bei den folgenden IC_{50} handelt es sich um geschätzte Werte.

Die Untersuchungen haben für si203a eine I_{max} von 95 % und einen $IC_{50} < 0,3$ nM gezeigt. Für si240a hat sich eine I_{max} von 99 % und ein $IC_{50} < 0,3$ nM ergeben. Beide DW-Kurven haben einen steilen Abfall zwischen 0 nM und 0,3 nM zu einem Hemmwert von 70 % (Abb.3.31 A) und 85 % (Abb. 3.31 B) aufgewiesen, wobei sich ab jeweils 1 nM die Hemmung asymptotisch dem I_{max} -Wert angenähert hat.

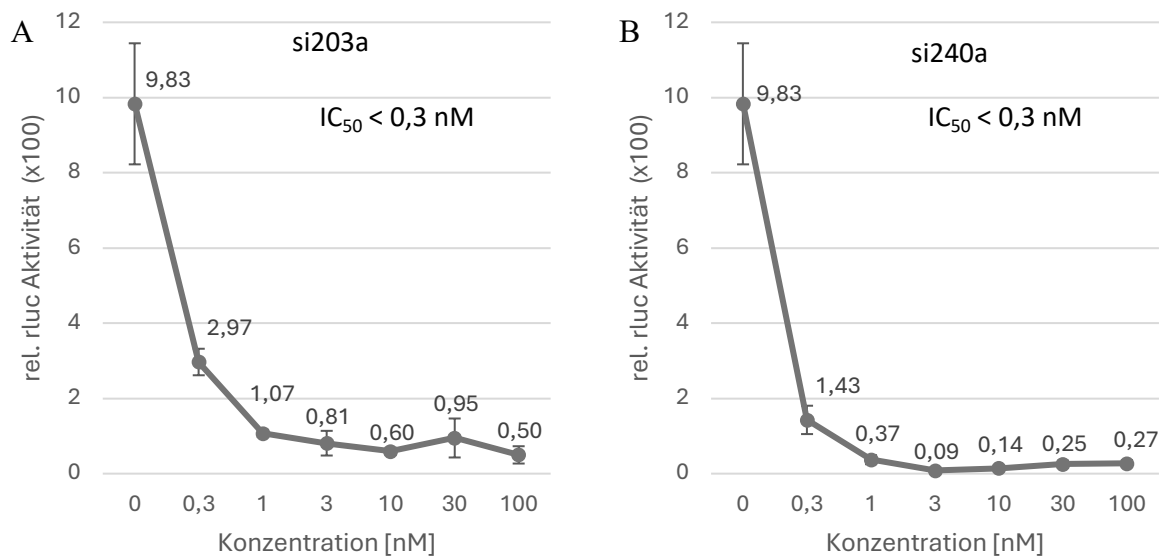


Abbildung 3.31 Dosis-Wirkungskurven für die ausgewählten siRNAs in HEK293T-Zellen. Die DW-Kurven wurden im Konzentrationsbereich von 0,3 nM bis 100 nM mittels DLR-Assay im pHybrid-Replikonsystem gemessen. Das Signal des Renilla-Luciferasesignals wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. A) DW-Kurve für si203a mit I_{max} von 95 % und $IC_{50} < 0,3$ nM. B) DW-Kurve für si240a mit I_{max} von 99 % und $IC_{50} < 0,3$ nM. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Nachdem die Wirksamkeit der Hemmstoffe in diesem System mittels HEK293T-Zellen nachgewiesen wurde, ist ein Umstieg in HuhT7-Zellen erfolgt, da in späteren Kapiteln die *small molecule antiviral drugs* zum Einsatz kamen, die zuvor in HuhT7-Zellen etabliert wurden. Dies gewährleistete die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Zwei exemplarische DW-Kurven für si240a und si203a sind in Abbildung 3.32 dargestellt. Die Dosis-Wirkungskurven in den HuhT7-Zellen wurden analog zu denen in HEK293T-Zellen erstellt.

Für si203a wurde im Konzentrationsbereich von 0,03 nM bis 3 nM eine I_{max} von 81 % und ein IC_{50} von 0,3 nM ermittelt (Abb. 3.32 A). Die Zugabe von siRNA führte zunächst zu einer kontinuierlichen und fast linearen Abnahme der relativen Luciferaseaktivität bis zu einer Konzentration von 0,3 nM mit einer Hemmwirkung um 59 %. Die Kurve näherte sich dann dem I_{max} an, der bei 3 nM erreicht wurde. Für si240a wurde im Konzentrationsbereich von 0,03 nM bis 100 nM eine I_{max} von 87 % und ein IC_{50} von 0,03 nM ermittelt (Abb. 3.32 B). Zwischen 0 nM und 0,03 nM war ein steiler Abfall der relativen Lumineszenz auf einen

Ergebnisse

Hemmwert von 51 % zu beobachten. Die Hemmkurve näherte sich ab 0,03 nM stetig dem I_{\max} an, wobei ein Ausreißer bei 1 nM identifiziert werden konnte, bei dem die Hemmung der relativen Luciferaseaktivität nur 17 % betrug. Der I_{\max} von 87 % war bei 3 nM erreicht. Weitere DW-Kurven für si240a und si203a im Konzentrationsbereich bis 100 nM befinden sich im Anhang (Abb. 6.11).

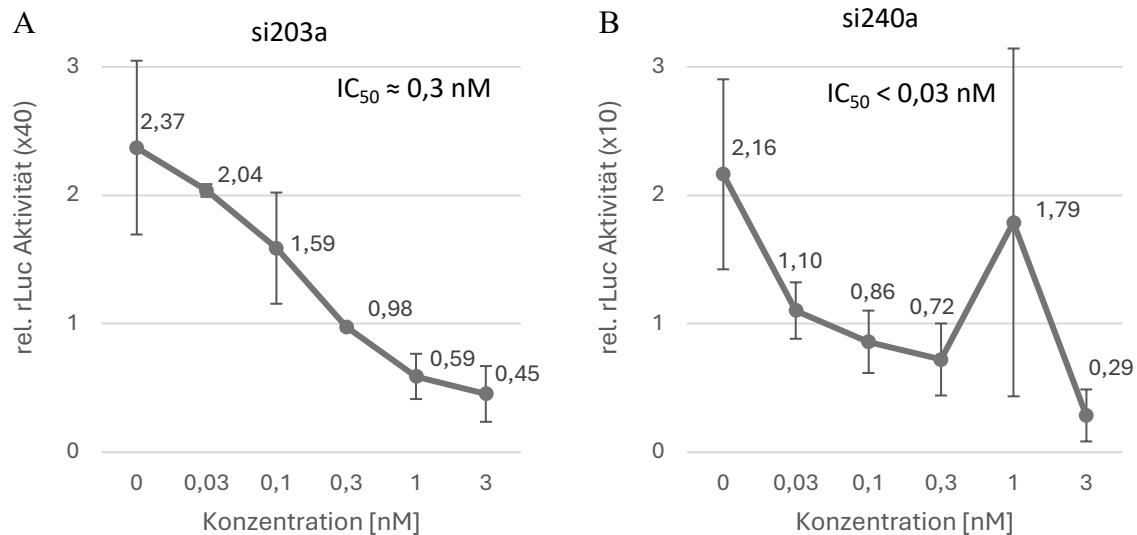


Abbildung 3.32 Dosis-Wirkungskurven für si203a und si240a in HuhT7-Zellen. Die DW-Kurven wurden im Konzentrationsbereich von 0,03 nM bis 3 nM mittels DLR-Assay im pHybrid-Replikonsystem gemessen. Das Signal des Renilla-Luciferasesignals wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. A) DW-Kurve für si203a mit I_{\max} von 81 % und IC_{50} von 0,3 nM. B) DW-Kurve für si240a mit I_{\max} von 87 % und $IC_{50} < 0,03$ nM. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass auch in diesem System eine dosisabhängige Wirkung der siRNAs vorliegt. Im Vergleich zu si240a zeigte si203a jedoch im Durchschnitt eine schwächere dosisabhängige Wirkung sowohl in Bezug auf die I_{\max} -Werte als auch in Bezug auf die IC_{50} .

3.5.3 Quantifizierung der Inhibition genomischer und subgenomischer viraler Ziel-RNAs mittels RT-qPCR

Die DLR-Assays wurden eingesetzt, um die Inhibierung der relativen Luciferaseaktivität des Replikonsystems auf Proteinebene durch oligonukleotidbasierte Wirkstoffe zu untersuchen. Aufgrund der Existenz von zwei verschiedenen Transkripten im System, die beide die Renilla-Luciferase exprimieren können - nämlich die genomische RNA und die subgenomische RNA - ist es im Luciferase-Assay nicht möglich die Signale der jeweiligen Transkripte zuzuordnen. Daher wurden RT-qPCR-Studien durchgeführt, um Amplikons aus der genomischen und subgenomischen RNA zu quantifizieren. Für das Experiment wurden HEK293T-Zellen mit dem pHybrid-Replikon und pGL3-Control transfiziert. Zusätzlich wurden einige Proben mit siRNAs co-transfiziert, wobei eine Konzentration von 30 nM eingesetzt wurde. Um die

Ergebnisse

Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf Protein- und RNA-Ebene zu gewährleisten und die Proteinexpression direkt mit der RNA-Expression in Beziehung zu setzen, wurde die Transfektion in 2x24-Well-Platten durchgeführt, wobei ein Ansatz im DLR-Assay eingesetzt wurde, während der andere Ansatz zur RNA-Isolation verwendet wurde. Die Integrität der zellulären RNAs wurde mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese untersucht und für die cDNA-Synthese wurden *random* Primer verwendet.

Zur Normalisierung wurde, wie in Kapitel 3.4.1.6 beschrieben, die Quantität des mRNA-Transkriptes aus pGL3-Control verwendet. Die Transkripte aus dem pHybrid-Replikon wurden mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren analysiert. Um die Quantität des Gesamtlängentranskriptes (gRNA) zu erfassen, wurden die Primer im *upstream* Bereich der 5'-UTR und im Nsp1-Gen platziert. Diese Primerpaare waren UTR-rep-fwd (5'-tacggttcgctccgtgtgc-3') und NSP1-rev-1 (5'-tggacgtgtgtttctcgttg-3'). Die Primer umfassen Position 412 bis 526 und bilden ein 115 nts langes Amplikon das spezifisch für das genomische Transkript ist. Das zweite Amplikon konnte nur aus dem subgenomischen Transkript gebildet werden, da es mit dem *forward*-Primer in der *Leader*sequenz bindet und mit dem *reverse*-Primer in der Renilla-Luciferasesequenz. Diese Primer, genannt UTR-rep-fwd2 (5'-tacctaccaggaaaagccaac-3') und rLuc-rev (5'-caccactgcggaccagttatc-3') umfassen Position 231 bis 21.815 und bilden ein 138 nts langes Amplikon. Die Quantitäten wurden mit der Formel $2^{(40 - ct)}$ berechnet, wobei ct für den *Cycle Threshold* steht.

Weiterhin wurden Schmelzkurven erstellt, um zu untersuchen, ob die richtigen Amplifikate gebildet wurden. Aus vorherigen Experimenten wurde für das Primerpaar fLuc-fwd-156 und fLuc-rev-156 eine Schmelztemperatur von 81,3 °C erwartet. Für das Primerpaar UTR-rep-fwd und Nsp1-rev1 wurde eine Schmelztemperatur von 82,5 °C bestimmt und das Primerpaar UTR-rep-fwd2 und rLuc-rev1 wies eine Schmelztemperatur von 78,5 °C auf. Zudem wurde zur Untersuchung der Reinheit eine analytische Agarose-Elektrophorese der RT-qPCR Produkte stichprobenartig durchgeführt. Weiterhin wurde mittels UTR-rep-fwd2 und rLuc-rev eine Sanger-Sequenzierung von den entstandenen sgRNA-PCR-Produkten durchgeführt, um deren Bildung und Integrität zu überprüfen (Abb. 6.12).

Abbildung 3.33 zeigt die Ergebnisse eines Luciferase-Assays und die RT-qPCR-Analyse der genomischen und subgenomischen Transkripte. Die RT-qPCR wurde mit zwei biologischen Replikaten an unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführt und die Ergebnisse in jeweils einem Graphen zusammengefasst (Abb. 3.33 B und C). Die Kontrolle *sisc* wurde für alle Ergebnisse in Abbildung 3.33 zum Normieren verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass der graphische Verlauf der Quantitäten der normalisierten sgRNA-Transkripte dem Verlauf der Luciferase-Expression entspricht, was darauf hindeutet, dass hauptsächlich die sgRNA das Luciferasesignal erzeugt. Im Luciferase-Assay (Abb. 3.33 A) wies si240a eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 98 % bezogen auf *sisc* auf. Die Hemmung von si203a betrug 94 %. Die Zugabe von siCoV6 führte zu einer Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 99 %, während siRLuc eine Hemmung um 69 % erzeugte.

Ergebnisse

Die RT-qPCR-Ergebnisse zur gRNA zeigten, dass der Einsatz von si240a zu einer Hemmung der relativen gRNA-Kopienzahl um 58 % führte. Für Proben, die mit si203a behandelt wurden, konnte eine Hemmung um 30 % ermittelt werden. SiCoV6 zeigte mit 64 % die stärkste Hemmwirkung und siRLuc wies keine Hemmung auf.

Im Fall der subgenomischen Transkripte zeigte si240a eine Hemmung der relativen sgRNA-Kopienzahl um 98 % an. Für si203a konnte eine Hemmung der relativen sgRNA-Kopienzahl um 89 % ermittelt werden. Die Hemmung nach Behandlung mit siCoV6 betrug mehr als 99 % und siRLuc erzeugte eine Hemmung um 80 %.

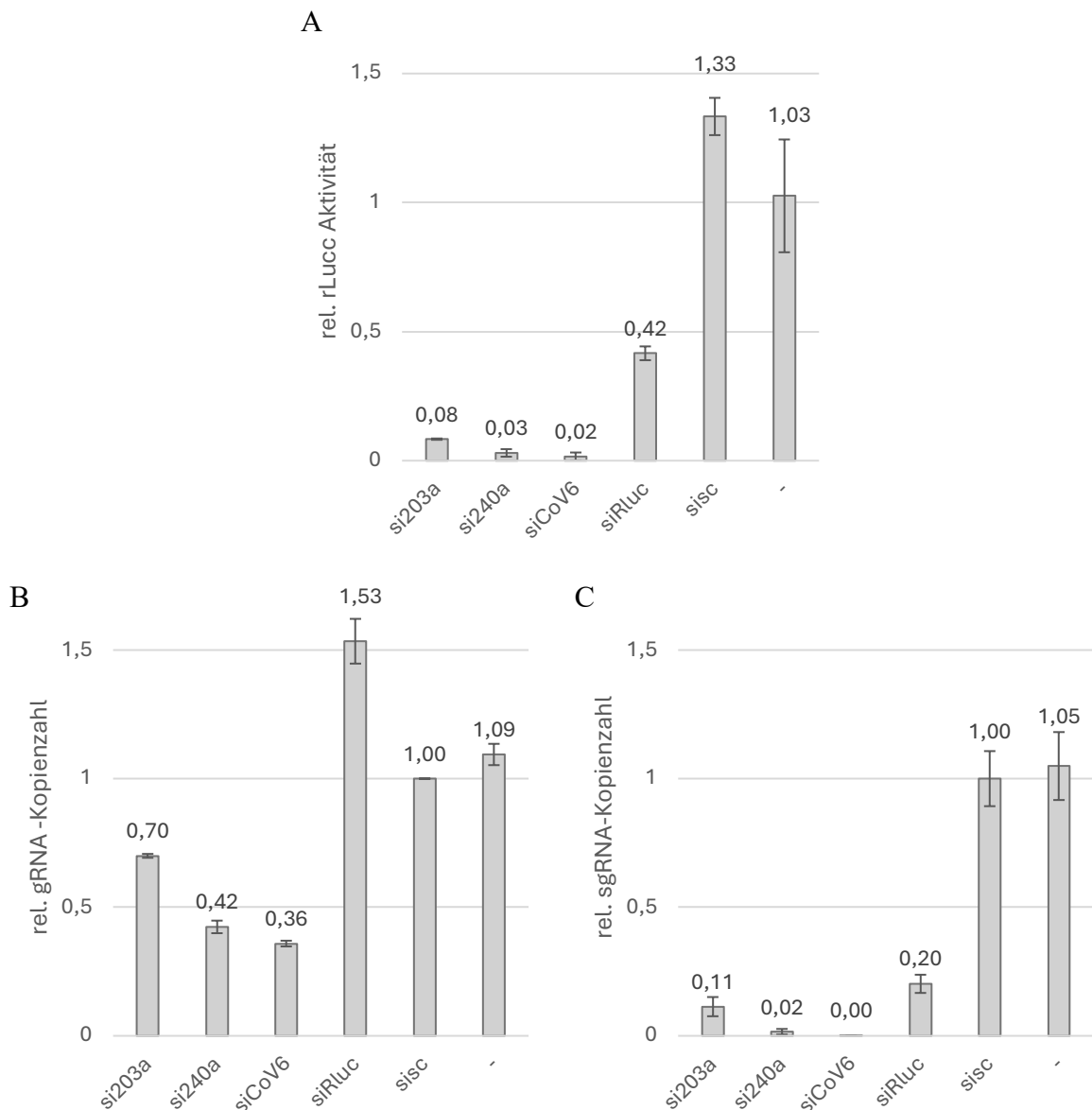


Abbildung 3.33 Messung der Hemmaktivität der siRNAs auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene. Die siRNAs wurden mit einer Konzentration von 30 nM in HEK293T-Zellen im pHybrid-Replikonsystem transfiziert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich siRLuc und sisc transfiziert und sisc zum Normieren verwendet. A) Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Renilla-Luciferasesegens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. B), C) 10 ng cDNA wurde zwei Mal in Vierfachbestimmung mittels RT-qPCR quantifiziert und die mRNA-Kopienzahl des rLuc-Transkriptes mit der mRNA-Kopienzahl des fLuc-Transkriptes normalisiert. Die Ergebnisse aus zwei

Ergebnisse

Versuchstagen wurden jeweils in einem Graphen zusammengefasst. B) Expression der genomischen Transkripte. C) Expression der subgenomischen Transkripte. „-“: Probe ohne siRNA. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von vier technischen Replikaten aus der RT-qPCR-Messung.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die siRNA-gerichtete Hemmung im Replikonsystem in HEK293T-Zellen sowohl auf der Proteinebene als auch auf der RNA-Ebene stattfindet. Der Verlauf der Graphen aus den DLR-Assays stimmt mit dem Verlauf der Quantitäten der sgRNA überein. Die Hemmung der gRNA fällt im Vergleich dazu schwächer aus.

3.5.4 Kombination von *small molecule antiviral drugs* mit siRNAs

Coronaviren, einschließlich SARS-CoV-2, zeichnen sich durch ein einzelsträngiges positiv polarisiertes RNA-Genom aus. Sobald dieses Genom in eine Wirtszelle eingeschleust wird, initiiert es die Translation durch zelleigene Mechanismen und bildet die zwei Polyproteine pp1a und pp1ab, die jeweils aus dem ORF1a und ORF1ab abgeleitet sind (Kap. 1.1.2.2). Zur Freisetzung der Nsp1-16, von denen Nsp2-16 für die Bildung des RTC verantwortlich sind, müssen diese Polyproteine mittels zweier virusspezifischer Cysteinproteasen proteolytisch gespalten werden (Tam *et al.*, 2023). Eine dieser Proteasen ist die *main protease* Mpro, die auch als 3CLpro bezeichnet wird (Kap. 1.1.2.2). Da diese Protease für die proteolytische Verarbeitung der meisten Polyproteinspaltstellen verantwortlich ist, gilt sie als geeignetes Ziel für Medikamente zur Eindämmung der Replikation von Coronaviren und damit der Produktion von Virionen (V'kovski *et al.*, 2021).

In diesem Kapitel wird die Kombination der siRNAs si240a und si203a mit den gegen Mpro gerichteten *small molecules* Nirmatrelvir, Ensitrelvir und 13b-K vorgestellt, die freundlicherweise von der AG Hilgenfeld zur Verfügung gestellt wurden. Diese *small molecules* sind mit ihren IC₅₀ in Tabelle 3.10 zusammengefasst. Die entsprechenden DW-Kurven befinden sich im Anhang (Abb. 6.13).

Tabelle 3.10 Wirkstoffbezeichnung und zugehörige IC₅₀. Bezeichnung der verwendeten *small molecules* und die zugehörigen IC₅₀ in Nanomolar (nM).

Wirkstoff	IC ₅₀ [nM]
Nirmatrelvir (NMV)	140
Ensitrelvir (ENS)	25
13b-K	1750

3.5.4.1 Effekte von *small molecules* mit siRNAs auf Proteinlevel

Zunächst wurden die Hemmwirkungen der siRNAs mit den Hemmwirkungen der *small molecules* in HuhT7-Zellen verglichen. Dazu wurden die Hemmstoffe mit ihren jeweiligen IC₅₀ Konzentrationen im Testsystem eingesetzt. Für die siRNAs in Vorversuchen ein IC₅₀ < 1 nM

Ergebnisse

ermittelt, sodass 1 nM der siRNAs verwendet wurde (Abb. 6.11). Die IC_{50} der *small molecules* wurden in früheren Arbeiten von der AG Hilgenfeld in HuhT7-Zellen ermittelt (Tab. 3.10, Abb. 6.13). Dazu wurden die IC_{50} -Werte aus drei unabhängigen DW-Kurven mithilfe der Software SigmaPlot (Grafiti LLC) errechnet.

Nirmatrelvir (NMV) wurde mit einer Konzentration von 140 nM, Ensitrelvir (ENS) mit einer Konzentration von 25 nM und 13b-K mit einer Konzentration von 1,75 μ M eingesetzt. Die Negativkontrolle für die siRNAs war sisc und für die *small molecules* war die Negativkontrolle die Leerprobe (-), in der nur pHybrid-Replikon und pGL3-Control transfiziert wurden. Diese Leerprobe wurde zudem, für einen besseren Vergleich der Werte, zum Normieren verwendet. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten wurde das Medium zur Beendigung der Transfektion mit 0,1 % DMSO versetzt, um optimale Bedingungen für die *small molecules* zu gewährleisten (Liu *et al.*, 2022).

Im DLR-Assay (Abb. 3.34) zeigte si203a im Vergleich zu sisc eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 63 %, während si240a eine Hemmung um nur 52 % aufwies. In Bezug auf die Leerprobe lagen die Hemmwerte von si203a und si240a bei jeweils 86 % und 81 %. NMV sowie 13b-K wiesen mit 84 % und 82 % ähnliche Hemmwirkungen auf, wobei ENS eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um nur 63 % zeigte.

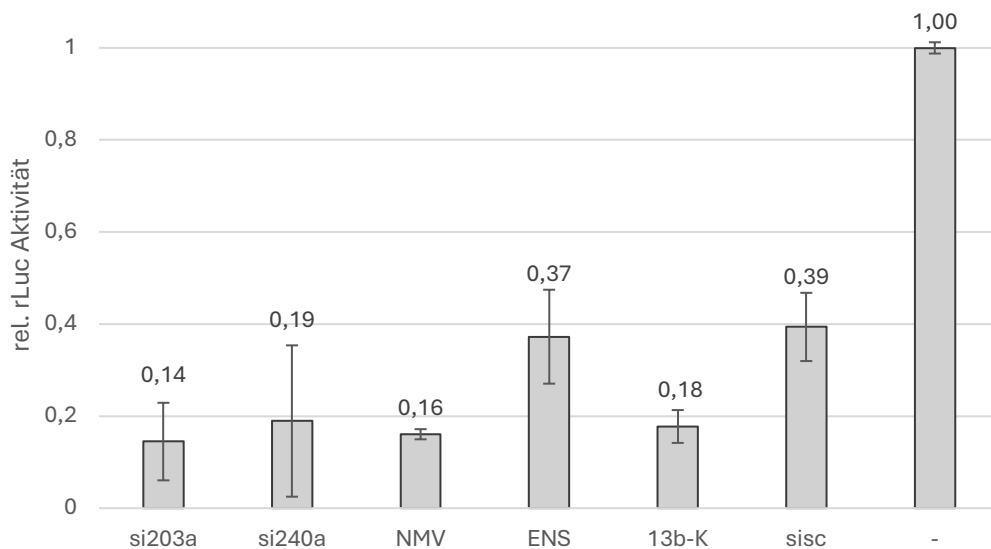


Abbildung 3.34 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs und *small molecules* auf Proteinebene in HuhT7-Zellen. Die Wirkstoffe NMV (140 nM), ENS (25 nM) und 13b-K (1,75 μ M) sowie si203a (1 nM) und si240a (1 nM) wurden in HuhT7-Zellen im pHybrid-Replikonsystem transfiziert. Zur Kontrolle der siRNAs wurde sisc (1 nM) transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Renilla-Luciferasesignals wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. „-“: Probe ohne siRNA, wurde zum Normieren aller Werte verwendet. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im nächsten Schritt eine Kombination der Wirkstoffe durchgeführt (Abb. 3.35). Die siRNAs wurden zunächst mit 1 nM im Testsystem, wie zuvor beschrieben, transfiziert. Zusätzlich wurden Wells, die siRNAs enthielten, sowie Wells, die

Ergebnisse

diese nicht enthielten, mit den *small molecules* behandelt. Diese wurden mit den IC₅₀ eingesetzt. Zur Kontrolle der Wirksamkeit der siRNAs wurden diese zunächst in Bezug auf sisc untersucht. Weiterhin wurde die Hemmung der *small molecules* einzeln in Bezug auf die Leerkontrolle (-), die zum Normieren aller Werte verwendet wurde, erfasst. Darüber hinaus wurde die Hemmwirkung der *small molecules* und der siRNAs in Kombination, im Vergleich zur Hemmung der Wirkstoffe einzeln, bezogen auf die Leerkontrolle untersucht. Dieses Experiment wurde zweimal mittels DLR-Assay durchgeführt und in Abbildung 3.35 zusammengefasst.

Im Vergleich zu sisc wies si203a eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 46 % auf, während si240a in diesem Experiment mit 81 % eine stärkere Hemmwirkung zeigte. In Bezug auf die Leerkontrolle betrug die Hemmwirkung von si203a und si240a jeweils 68 % und 89 %. NMV führte einzeln zu einer Hemmwirkung von 74 %. Die Zugabe von si203a führte zu einer Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 95 %, während die Zugabe von si240a eine Hemmung um 99 % ergab. ENS behandelte Proben zeigten einzeln eine Hemmwirkung von 41 %. Der Einsatz von si203a verstärkte den Effekt um 43 % zu einem Hemmwert von 84 % und die Zugabe von si240a verstärkte den Effekt um 55 % zu einem Hemmwert von 96 %. Proben, die mit 13b-K behandelt wurden, zeigten einzeln eine Hemmung um 46 %. Die Zugabe von si203a führte zu einer Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 84 %, während die Kombination mit si240a zu einer Hemmung um 96 % führte. Das Experiment hat gezeigt, dass die Zugabe von 1 nM siRNA zum *small molecule* die Hemmwirkung signifikant verstärkt. Auch die Hemmwirkung der siRNAs wurde durch die Zugabe der *small molecules* signifikant verstärkt, jedoch in einem geringeren Ausmaß.

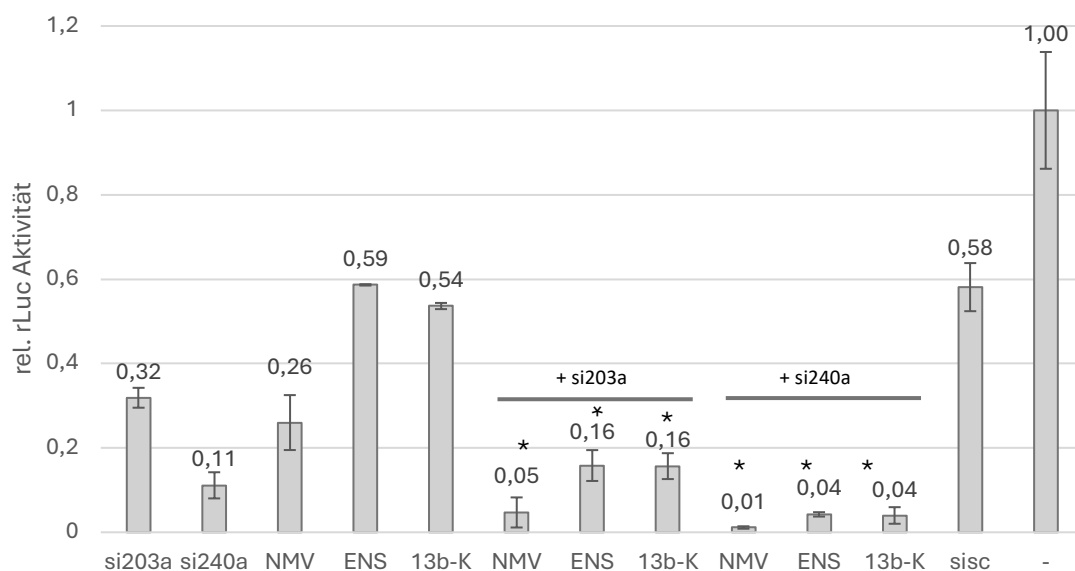


Abbildung 3.35 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs und *small molecules* einzeln und in Kombination auf Proteinebene in HuhT7-Zellen. Die Wirkstoffe NMV (140 nM), ENS (25 nM) und 13b-K (1,75 μ M) sowie si203a (1 nM) und si240a (1 nM) wurden zwei Mal in HuhT7-Zellen jeweils einzeln und in Kombination im pHybrid-Replikonsystem transfiziert und in einem Graphen zusammengeführt. Zur Kontrolle der siRNAs wurde sisc (1 nM) transfiziert. Die Messung erfolgte

Ergebnisse

mittels DLR-Assay und das Signal des Renilla-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. „-“: Probe ohne siRNA wurde zum Normieren aller Werte verwendet. Zur Auswertung wurde ein vereinfachter, einseitiger t-Test angewendet mit $\alpha = 5\%$; * = Signifikanz. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

3.5.4.2 Effekte von *small molecules* auf die Hemmwirkung der siRNAs – Analyse auf dem RNA-Level

In Kapitel 3.5.4.1 wurde die Kombination der siRNAs mit den *small molecules* untersucht, wobei die Hemmwirkung mittels DLR-Assay erfasst wurde. Dieser Assay misst die Expression der Luciferasesignale zwischen den verschiedenen Proben und ermöglicht somit die Analyse des Einflusses der Hemmstoffe auf Proteinebene. Bereits in Kapitel 3.4.2.5 konnte mittels HEK293T-Zellen gezeigt werden, dass eine Hemmwirkung mit den siRNAs auch auf RNA-Ebene möglich ist. In dem vorliegenden Kapitel wurde untersucht, wie sich die Kombination der Wirkstoffe auf der RNA-Ebene auswirkt. Diese Analyse erfolgte mittels RT-qPCR. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf Protein- und RNA-Ebene zu gewährleisten, wurde die Transfektion, die für den DLR-Assay in Kapitel 3.5.4.1 in Abbildung 3.35 verwendet wurde, in doppeltem Ansatz durchgeführt. Ein Ansatz wurde im DLR-Assay eingesetzt, während der andere Ansatz zur RNA-Isolation verwendet wurde. Die Integrität der zellulären RNAs wurde mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese untersucht und für die cDNA-Synthese wurden *random* Primer verwendet. Der zugehörige DLR-Assay ist für die Übersichtlichkeit nochmals in Abbildung 3.36 A aufgeführt.

Mittels RT-qPCR wurde untersucht, wie sich die Hemmstoffe auf die Quantität des genomischen Transkriptes im Vergleich zum subgenomischen Transkript auswirken. Die Quantität der gRNA und der sgRNA wurde jeweils mit der Quantität des mRNA-Transkriptes des pGL3-Control Vektors, wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben, normalisiert, um den Einfluss der Transfektionseffizienz und der Zellmenge auszuschließen.

Die Transkripte aus dem pHybrid-Replikon wurden mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren analysiert. Um die Quantität des Gesamtlängentranskriptes (gRNA) zu erfassen, wurden die Primer in den *upstream* Bereich der 5'-UTR und im Nsp1-Gen positioniert. Diese sind UTR-rep-fwd (5'-tacggttcgctccgtgttg-3') und NSP1-rev-1 (5'-tggacgtgtgtttctcgttg-3'). Die Primer binden von Position 412 bis 526 und bilden ein 115 nts langes Amplikon.

Das zweite Amplikon kann nur an das subgenomische Transkript binden, da es mit dem *forward*-Primer in der *Leadersequenz* und mit dem *reverse*-Primer in der Renilla-Luciferasesequenz bindet: UTR-rep-fwd2 (5'-tacctaccaggaaaagccaac-3') und rLuc-rev (5'-caccactgcccagcagttatc-3'). Die Primer binden von Position 231 bis 21.815 und bilden ein 138 nts langes Amplikon. Die Quantitäten wurden mit der Formel $2^{(40 - ct)}$ berechnet.

Weiterhin wurden Schmelzkurven erstellt, um zu untersuchen, ob die richtigen Amplifikate gebildet wurden. Aus früheren Experimenten konnte für das Primerpaar fLuc-fwd-156 und fLuc-rev-156 eine Schmelztemperatur von 81,3 °C erwartet werden. Für das Primerpaar UTR-

Ergebnisse

rep-fwd und Nsp1-rev1 wurde eine Schmelztemperatur von 82,5 °C gemessen. Das Primerpaar UTR-rep-fwd2 und rluc-rev1 wies eine Schmelztemperatur von 78,5 °C auf. Zudem wurde zur Untersuchung der Reinheit eine analytische Agarose-Gelelektrophorese der RT-qPCR Produkte stichprobenartig durchgeführt. In den Abbildungen 3.36 B und C sind die normalisierten Quantitäten der gRNA und sgRNA dargestellt. Für die Proben 13b-K und NMV+si203 konnten keine Werte erfasst werden. Daher wurde die RNA für diese Proben erneut nach dem gleichen Prinzip isoliert und die RT-qPCR-Analyse wiederholt, wobei für die Wiederholung von 13b-K die Proben für NMV und ENS zum Vergleich mitgeführt wurden. Auch für die Wiederholung von NMV+si203 wurden die Proben mit den einzelnen Wirkstoffen zum Vergleich mitgeführt. Diese Daten sind im Anhang in Abbildung 6.14 A-D dargestellt. Alle Werte in Abbildung 3.36 wurden zur Vereinfachung gegen die entsprechende Leerprobe (-) normiert. Die Abbildungen zeigen die Hemmwirkung der siRNAs si203a und si240a, die mit einer Konzentration von 1 nM verwendet wurden, sowie die der *small molecules*, welche mit 140 nM (NMV), 25 nM (ENS) und 1,75 µM (13b-K) eingesetzt wurden. Die Wirkstoffe wurden einzeln und in Kombination untersucht. Für die gRNA konnte mit si203a und si240a eine Abnahme der relativen Kopienzahl um 63 % und 77 % bezogen auf sisc ermittelt werden. In Abbildung 6.14 C war die Hemmung von si203a stärker ausgeprägt und betrug 86 %. Für die sgRNA betrug die Hemmwirkung bei Verwendung von si203a und si240a 60 % bzw. 80 % bezogen auf sisc. Abbildung 6.14 D wies für si203a eine Hemmung um 92 % auf. Es wurde festgestellt, dass die hemmende Wirkung von si240a bezogen auf sisc auf RNA-Ebene derjenigen auf Proteinebene entspricht (81 %). Die Hemmung durch si203a war auf der RNA-Ebene deutlich verstärkt bezogen auf sisc (46 % auf Proteinebene) und im direkten Vergleich schwächer als die Hemmung durch si240a. Im Folgenden wurde die Leerkontrolle (-) als Referenz verwendet. Für die gRNA zeigten si203a und si240a eine Hemmwirkung von 73 % und 83 %, während die Hemmung für die sgRNA bei 70 % und 85 % lag (Abb. 3.36 B und C). Auch die *small molecules* NMV, ENS und 13b-K wurden zunächst einzeln untersucht. NMV zeigte Hemmungen der relativen Kopienzahl um 73 % (3.36 B), 65 % und 71 % (Abb. 6.14 A und C) für das genomische Transkript und mit 70 % (3.36 C), 64 % und 82 % (Abb. 6.14 B und D) für das subgenomische Transkript den stärksten Hemmeffekt. ENS-behandelte Proben wiesen für die gRNA eine Hemmung um 26 % (3.36 B) und 10 % (Abb. 6.14 A), sowie eine Hemmung um 43 % (3.36 C) und 30 % (Abb. 6.14 B) für die sgRNA auf. Bei 13b-K behandelten Proben konnte eine Hemmwirkung von 24 % für die gRNA und 47 % für die sgRNA beobachtet werden (Abb. 6.14 A und B). Die Hemmwirkungen im DLR-Assay betrugen jeweils 75 %, 53 % und 63 % für NMV-, ENS- und 13b-K-behandelte Proben (Abb. 3.36 A). Bezüglich NMV waren keine nennenswerten Unterschiede feststellbar. Bei ENS und 13b-K war die Hemmwirkung auf RNA-Ebene schwächer als auf Proteinebene, wobei das subgenomische Transkript stärker gehemmt wurde als das genomische Transkript. In Kombination mit si203a zeigten NMV-, ENS- und 13b-K-behandelte Proben eine Hemmwirkung von 95 % (Abb. 6.14 C), 93 % und 80 % (Abb. 3.36 B) für die gRNA und 98 % (Abb. 6.14 D), 95 % und 82 % (3.36 C) für die sgRNA. Während die Hemmwirkung auf RNA-

Ergebnisse

Ebene im Vergleich zur Proteinebene für NMV und 13b-K ähnlich waren, war sie für ENS deutlich höher. Die Hemmwirkungen auf der Proteinebene lagen bei 95 %, 84 % und 84 % bei NMV, ENS und 13b-K in Kombination mit si203a (Abb. 3.36 A).

In Kombination mit si240a wiesen NMV-, ENS- und 13b-K-behandelte Proben eine Hemmung um 91 %, 97 % und 88 % (Abb. 3.36 B) für die gRNA und 91 %, 98 % und 86 % (Abb. 3.36 C) für die sgRNA auf. Die Hemmwirkungen auf der Proteinebene lagen bei 99 %, 96 % und 96 % bei NMV, ENS und 13b-K in Kombination mit si240a (Abb. 3.36 A). Sie waren damit besonders für NMV und 13-K auf Proteinebene deutlich höher.

Das Experiment zeigt, dass der Verlauf der Graphen, die durch den DLR-Assay erstellt wurden, denen ähneln, die mittels RT-qPCR erstellt wurden. Die *small molecules* einzeln wirkten auf Ebene der sgRNA stärker als auf Ebene der gRNA. Eine Kombination der Wirkstoffe führte auch auf der RNA-Ebene zu einem deutlich größeren Hemmeffekt. Dabei war kein nennenswerter Unterschied zwischen den genomischen und subgenomischen Transkripten festzustellen.

Ergebnisse

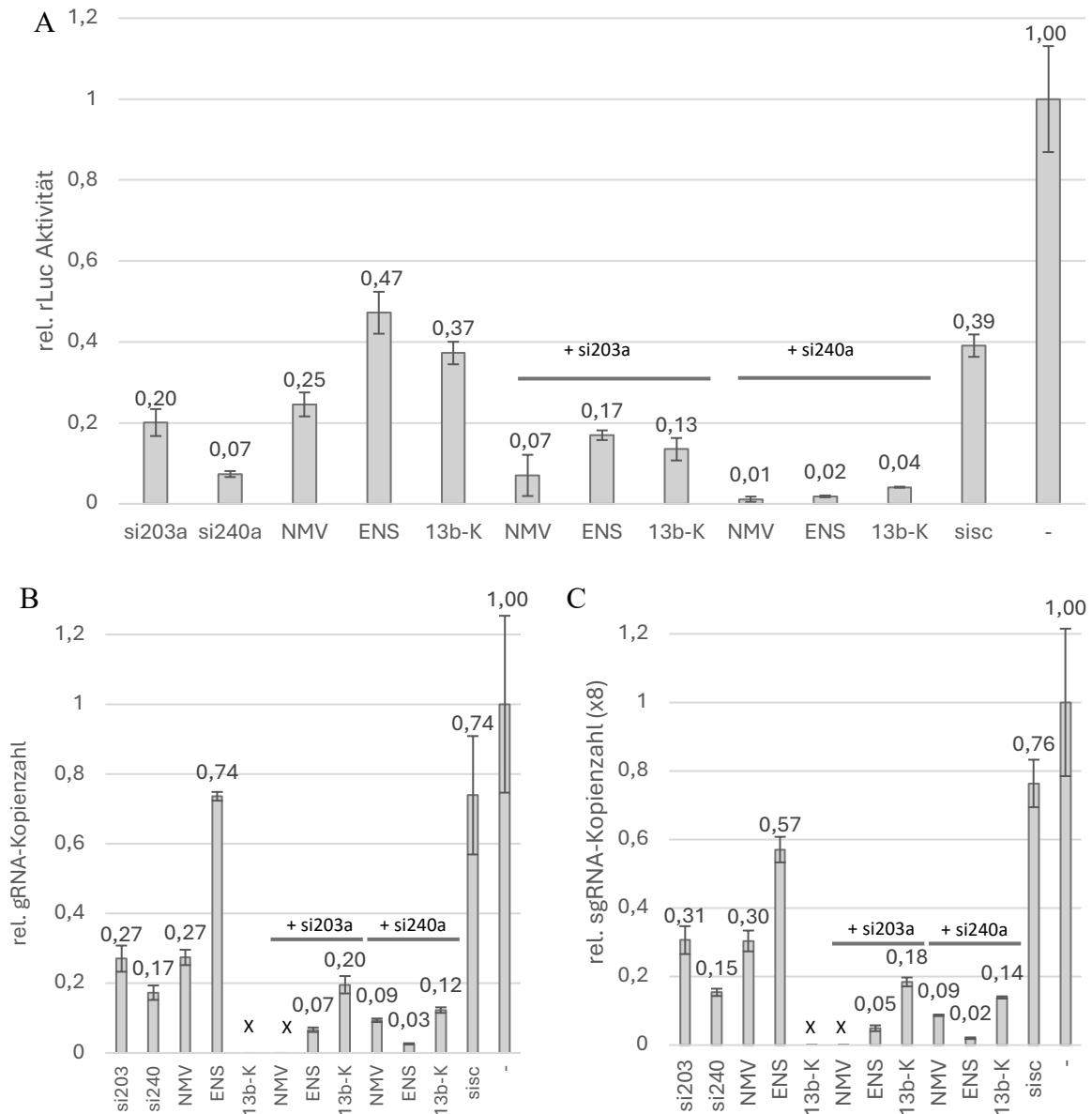


Abbildung 3.36 Messung der Hemmaktivität der siRNAs in Kombination mit den *small molecules* auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene. A) Die Wirkstoffe Nirmatrelvir (NMV), Ensitrelvir (ENS) und 13b-K sowie si203a und si240a wurden mit den IC₅₀ von 140 nM, 25 nM, 1,75 µM und jeweils 1 nM einzeln und in Kombination in HuhT7-Zellen im pHybrid-Replikonsystem transfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich sisc transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Renilla-Luciferasesignals wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normiert. B), C) 10 ng cDNA wurde zwei Mal in Vierfachbestimmung mittels RT-qPCR quantifiziert und die mRNA-Kopienzahl des rLuc-Transkriptes mit der mRNA-Kopienzahl des fLuc-Transkriptes normalisiert. B) Expression der genomischen Transkripte. C) Expression der subgenomischen Transkripte. „-“: Probe ohne siRNA, die zum Normieren der Daten verwendet wurde; X: Daten befinden sich im Anhang (Abb. 6.14). Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung bzw. vier technischen Replikaten aus der RT-qPCR-Messung.

3.5.4.3 Effekte von *small molecules* auf die Dosisabhängigkeit der siRNAs

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von *small molecules* zu einer Verstärkung des inhibitorischen Effekts der siRNAs beiträgt. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Dosis-Wirkungsbeziehung der siRNAs durch den Einsatz von *small molecules* verstärkt werden kann. Der Wirkstoff 13b-K wurde für die nachfolgenden Experimente nicht weiterverwendet, da er trotz hoher Konzentration in den vorherigen Experimenten einen schwächeren und schwer reproduzierbaren Hemmeffekt gezeigt hat. Bei den folgenden IC_{50} handelt es sich um geschätzte Werte.

Für einen direkten Vergleich der Einflüsse der beiden Inhibitoren NMV und ENS auf die Dosisabhängigkeit von si240a wurden drei DW-Kurven im Bereich von 0,03 nM – 3 nM zeitgleich erstellt (Abb. 3.37). Aus vorherigen Experimenten war bekannt, dass die Hemmwirkung von si240a ab einer Konzentration von 3 nM nicht weiter zunimmt, sodass Konzentrationen >3 nM nicht einbezogen wurden. Die DW-Kurven in Abbildung 3.37 zeigten, dass die Zugabe von NMV die maximale Inhibition I_{max} von 89 % auf 99 % steigerte und den IC_{50} von 0,1 nM auf 0,03 nM verbesserte. Die Zugabe von ENS hatte keinen Einfluss auf den I_{max} . Der IC_{50} hingegen wurde von 0,1 nM auf 0,3 nM erhöht. Es fiel zudem auf, dass der Graph einen Ausreißerwert bei 1 nM mit einer Abweichung vom Kurvenverlauf um +23 % aufwies, wenn si240a einzeln eingesetzt wurde. Abgesehen davon verlief die DW-Kurve im Bereich von 0,03 bis 0,3 nM fast linear bis zu einer Hemmung um 79 % und näherte sich dann dem I_{max} von 89 % an. Die Zugabe von NMV einzeln führte zu einer Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 19 %. Bis auf einen Ausreißer bei 0,1 nM, der um +65 % vom Kurvenverlauf abwich, verlief die Hemmung bis zur Konzentration von 1 nM fast linear. Die Zugabe von ENS führte bei einer Konzentration von 0 nM siRNA direkt zu einem Anstieg der relativen Luciferaseaktivität um 129 % und sank bei 0,03 nM siRNA Konzentration auf einen Hemmwert von 6 % bezogen auf die Leerkontrolle. Eine Konzentrationszunahme auf 0,1 nM siRNA führte zu einem Hemmwert von 10 %. Danach nahm die Hemmung bis 1 nM fast linear zu, bis der I_{max} von 89 % erreicht wurde. Bei den Graphen si240a+NMV und si240a+ENS war eine Zunahme der relativen Luciferaseaktivität um jeweils 8 % und 4 % bei einer siRNA Konzentration von 3 nM zu beobachten.

Die Ausreißerwerte verdeutlichen die Fehleranfälligkeit des zellkulturbasierten-Testsystems. Neben Schwankungen in der Zellanzahl und der Transfektionseffizienz können zudem Fehler durch mögliche Präzipitation der *small molecules* sowie deren Adhäsion an Kunststoffoberflächen entstehen, was die Reproduzierbarkeit der Messungen beeinträchtigt (Dey *et al.*, 2022).

Die Ergebnisse zeigen, dass die dosisabhängige Wirkung von si240a durch Zugabe von NMV und ENS deutlich verstärkt wurde.

Ergebnisse

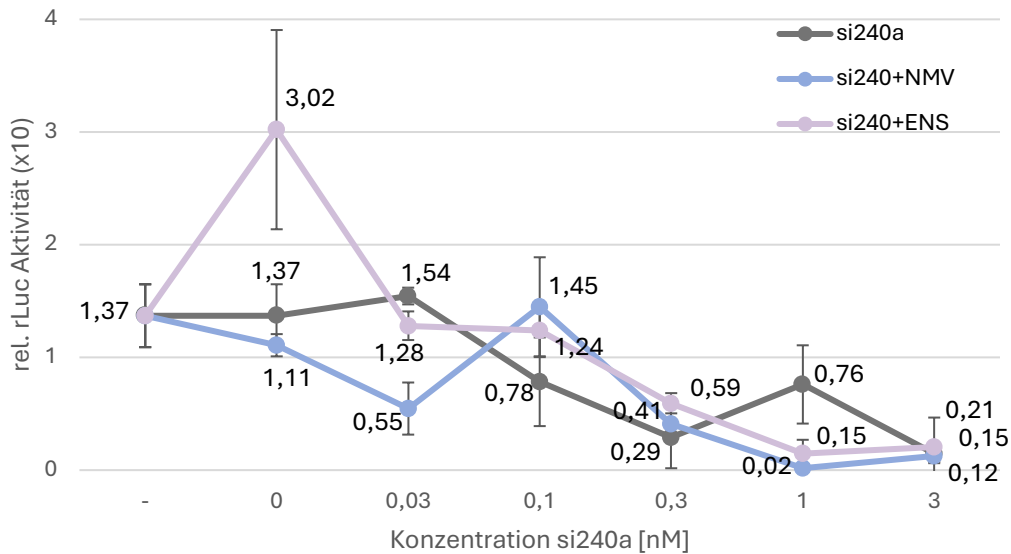


Abbildung 3.37 Dosis-Wirkungskurven für si240a in HuhT7-Zellen in Kombination mit NMV und ENS. Die DW-Kurven wurden für si240a im Konzentrationsbereich von 0,03 nM bis 3 nM in HuhT7-Zellen mittels DLR-Assay im pHybrid-Replikonsystem gemessen. Das Signal des Renilla-Luciferasegens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. Die *small molecules* NMV und ENS wurden mit den IC_{50} von 140 nM und 25 nM eingesetzt. Grau: DW-Kurve für si240a mit I_{max} von 89 % und IC_{50} von 0,1 nM. Blau: DW-Kurve für si240a+NMV mit I_{max} von 99 % und IC_{50} von 0,03 nM. Lila: DW-Kurve für si240a+ENS mit I_{max} von 89 % und IC_{50} von 0,3 nM. „-“: Probe ohne siRNA. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Auch für si203a wurde der Einfluss der *small molecules* im direkten Vergleich analysiert, indem drei DW-Kurven zeitgleich erstellt wurden, die in Abbildung 3.38 dargestellt sind. Die DW-Kurve für si203a einzeln zeigte eine maximale Inhibition von 81 % und ein IC_{50} von 0,1 nM-0,3 nM. Die Hemmung nahm nach Zugabe von si203a kontinuierlich bis zu einer Konzentration von 3 nM zu, bis sie 81 % betrug. Bei einer Konzentration von 10 nM stieg die relative Luciferaseaktivität um 11 % an. Durch die Zugabe von NMV sank die relative Luciferaseaktivität zunächst um 63 % bei 0 nM siRNA. Bis zu einer Konzentration von 1 nM sank die relative Lumineszenz kontinuierlich, sodass der I_{max} von 90 % erreicht wurde. Der IC_{50} lag bei < 0,03 nM. Ab einer Konzentration von 1 nM verlief der Graph parallel zur x-Achse. Auch die Zugabe von ENS senkte die relative Luciferaseaktivität um genau 63 % bei 0 nM siRNA. Bei Zugabe von 0,03 nM siRNA stieg die relative Luciferaseaktivität um 36 % an und sank dann fast linear auf den I_{max} von 86 %, der bei 1 nM erreicht wurde. Im Bereich von 1 nM-10 nM sank die Hemmwirkung um 7 %. Der IC_{50} lag bei 0,1 nM.

Die Analyse der Dosis-Wirkungskurven mit si203a hat gezeigt, dass die Zugabe der *small molecules* die dosisabhängige Hemmung verstärkt, wobei der Effekt mit NMV deutlich stärker ausgeprägt ist. Daten zur Reproduktion der DW-Kurven von si203a und si240a in Kombination mit den *small molecules* befinden sich im Anhang (Tab. 6.1)

Ergebnisse

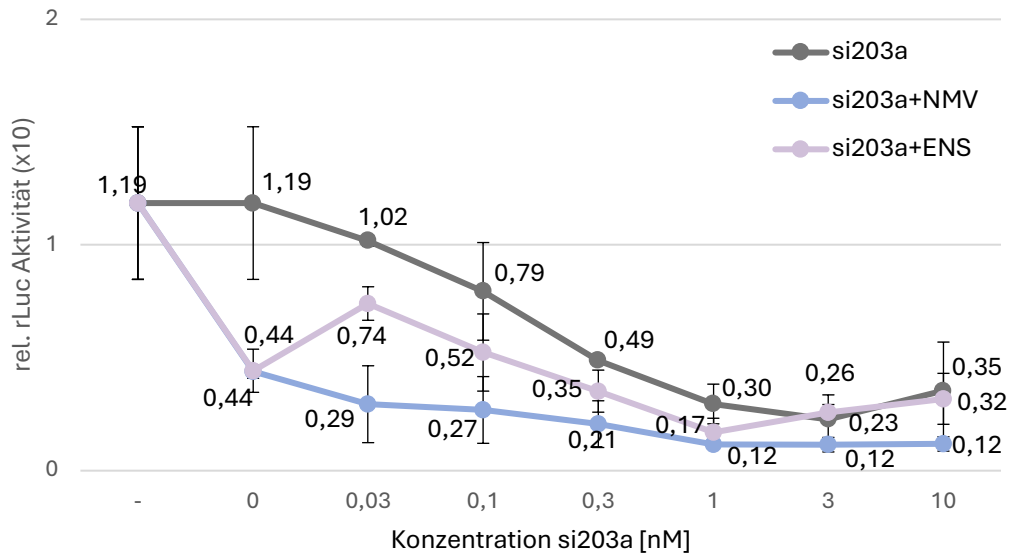


Abbildung 3.38 Dosis-Wirkungskurven für si203a in HuhT7-Zellen in Kombination mit NMV und ENS. Die DW-Kurven wurden für si203a im Konzentrationsbereich von 0,03 nM bis 10 nM in HuhT7-Zellen mittels DLR-Assay im pHybrid-Replikonsystem gemessen. Das Signal des Renilla-Luciferasegens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. Die *small molecules* NMV und ENS wurden mit den IC_{50} von 140 nM und 25 nM eingesetzt. Grau: DW-Kurve für si203a mit I_{max} von 81 % und IC_{50} von 0,1 nM-0,3 nM. Blau: DW-Kurve für si203a+NMV mit I_{max} von 90 % und $IC_{50} < 0,03$ nM. Lila: DW-Kurve für si203a+ENS mit I_{max} von 86 % und IC_{50} von 0,1 nM. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

3.5.4.4 Zeitabhängiger Einfluss der siRNAs auf die Hemmwirkung der *small molecules*

In bisherigen Experimenten hat die Kombination von *small molecules* mit siRNAs zu einer verstärkten Hemmwirkung beider Wirkstoffklassen geführt. Dieser Effekt konnte sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene nach 48 h nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob die Hemmwirkung zeitabhängig ist, wurde die Kombination der Wirkstoffklassen über einen Zeitraum von 48 h bis 96 h in 24 h-Intervallen untersucht. Der 24 h-Wert wurde ausgeschlossen, da die Luciferase-Expression weitgehend im Hintergrundrauschen lag. Die siRNAs si203a und si240a wurden zusammen mit dem pHybrid-Replikon und pGL3-Control im Replikon-Testsystem drei Mal in 24-Well-Platten co-transfiziert und die entsprechenden Wells mit den *small molecules* behandelt. Die Leerkontrolle (-), die nur Plasmide enthielt, sowie sisc dienten als Referenzpunkte, wobei sisc als Wirkungskontrolle für die siRNAs fungierte und die Leerkontrolle zum Normieren der Werte verwendet wurde. Nach 48 h, 72 h und 96 h wurde jeweils ein DLR-Assay durchgeführt. Die siRNAs si203a und si240a wurden, wie in den vorherigen Kapiteln, in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt. Auch die eingesetzten Konzentrationen von NMV und ENS blieben mit 140 nM und 25 nM unverändert. In Abbildung 3.39 ist die Hemmung durch die Wirkstoffe zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h dargestellt. Die Werte wurden auf den Wert der Leerkontrolle (-) normiert, der auf 1 gesetzt wurde. Abbildung 3.39 A zeigt die Hemmwirkung der siRNAs si203a und si240a sowie NMV einzeln und in Kombination. Nach 48 h lag die Hemmwirkung von si203a und si240a bezogen

Ergebnisse

auf *sisc* bei jeweils 89 % und 75 %, während sie nach 72 h gesunken ist und bei 66 % und 50 % lag. Nach 96 h betrug die Hemmwirkung von si203a und si240a bezogen auf *sisc* jeweils 47 % und 42 %. Bezogen auf die Leerkontrolle betrug die Hemmung der relativen Luciferaseaktivität nach Behandlung mit si203a und si240a 88 % bzw. 74 %, während die Inhibition durch NMV 66 % betrug. Die Kombination von NMV mit si203a und si240a führte zu einer Hemmwirkung um 98 % und 99 %. Nach 72 h sank die Effizienz der Wirkstoffe si203a, si240a und NMV. Die Hemmung lag bei 70 %, 55 % und 53 %. Auch die Kombination von NMV mit si203a zeigte eine Hemmung um nur 73 %, während die Inhibition durch NMV mit si240a unverändert im Vergleich zum 48 h-Wert blieb. Nach 96 h waren die Aktivitäten unter Einfluss der einzelnen Wirkstoffe fast angeglichen, wobei si203a, si240a und NMV Hemmwirkungen von 61 %, 58 % und 57 % zeigten. Die Kombination von NMV mit si203a und si240a führte zu Hemmungen von jeweils 79 % und 96 %. Die Kombination von NMV mit si240a zeigte somit im Vergleich zu den einzelnen Wirkstoffen auch nach 96 h eine stabile Hemmwirkung.

In Abbildung 3.39 B wurde das Experiment mit ENS durchgeführt. In Bezug auf die Leerkontrolle wiesen die siRNAs si203a und si240a Hemmungen der relativen Luciferaseaktivität um 74 % bzw. 94 % nach 48 h, 79 % bzw. 94 % nach 72 h und 50 % bzw. 75 % nach 96 h auf. Hierbei wies si240a im Vergleich zu Abbildung 3.39 A eine stärkere Hemmwirkung als si203a auf. In Bezug auf *sisc* zeigte si203a nach 48 h und 96 h keine Hemmung, während die Hemmung nach 72 h bei 80 % lag. Si240a hingegen zeigte eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 72 %, 94 % und 47 % nach 48 h, 72 h, und 96 h in Bezug auf *sisc*. Auch die Hemmwirkung von ENS nahm im Zeitverlauf ab. Nach 48 h, 72 h und 96 h betrug die Hemmung von ENS jeweils 56 %, 41 % und 26 %. Die Kombination von ENS mit si240a zeigte im Zeitverlauf einen deutlich größeren Hemmeffekt als die Kombination mit si203a. Die Hemmwirkung von ENS mit si240a, betrug nach 48 h und 72 h jeweils 94 % und sank nach 96 h auf 83 %, während die Hemmwirkung von ENS mit si203a nach 48 h, 72 h und 96 h jeweils 83 %, 50 % und 62 % betrug. In jedem Fall hemmte die Kombination der Wirkstoffe stärker als ENS einzeln. Da die Kombination von NMV und ENS mit si240a deutlich effizienter war als die Kombination mit si203a, wurde der Versuch mit si240a wiederholt (Abb. C). In diesem Versuch konnte nach 96 h für die einzelnen Wirkstoffe keine Hemmung nachgewiesen werden. Der kombinierte Einsatz von NMV und ENS mit si240a führte nach 96 h zu Hemmwirkungen von 22 % und 12 %. Für die Zeitpunkte 48 h und 72 h wies die si240a behandelte Probe eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 85 % und 92 % bezogen auf die Leerkontrolle auf und eine Hemmung um 63 % und 84 % bezogen auf *sisc*, wobei beobachtet werden konnte, dass die Hemmwirkung mit der Zeit zugenommen hatte. Die Hemmung nach NMV-Behandlung betrug für beide Zeitpunkte 61 %. ENS zeigte nach 48 h keine Hemmwirkung auf. Nach 72 h wurde eine Hemmung um 11 % beobachtet. Die Hemmwirkung der Wirkstoffe in Kombination sank im Zeitraum von 48 h zu 72 h. Während die Hemmwirkung von NMV und ENS in Kombination mit si240a nach 48 h 95 % und 87 % betrug, lag sie nach 72 h bei 80 % und 60 %.

Ergebnisse

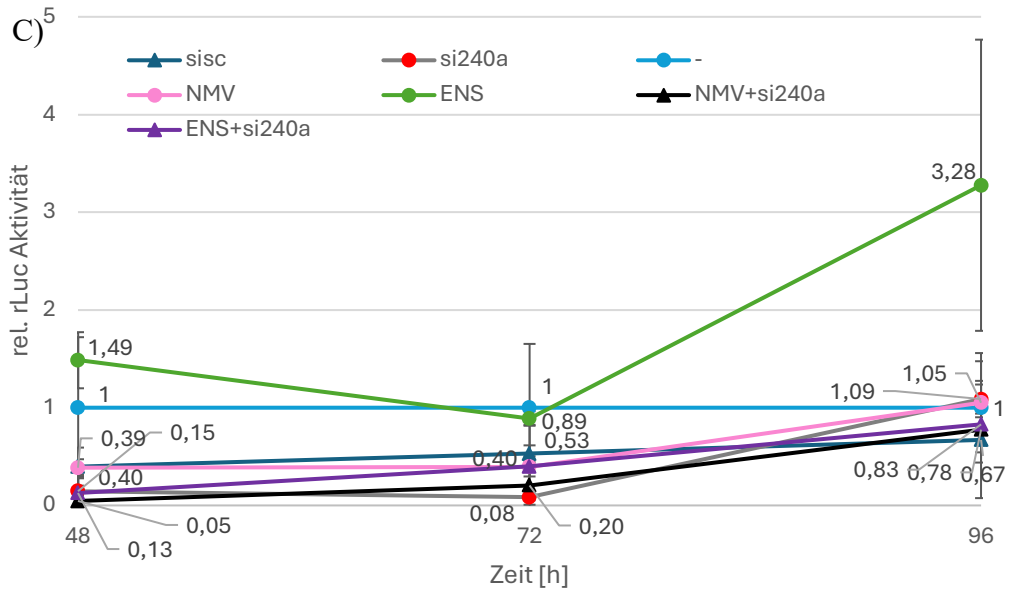
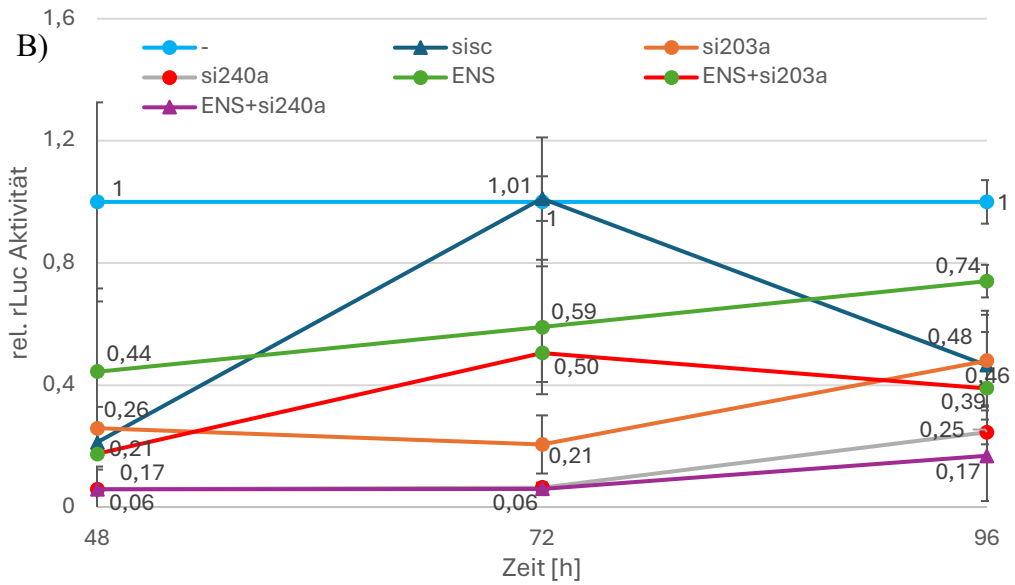
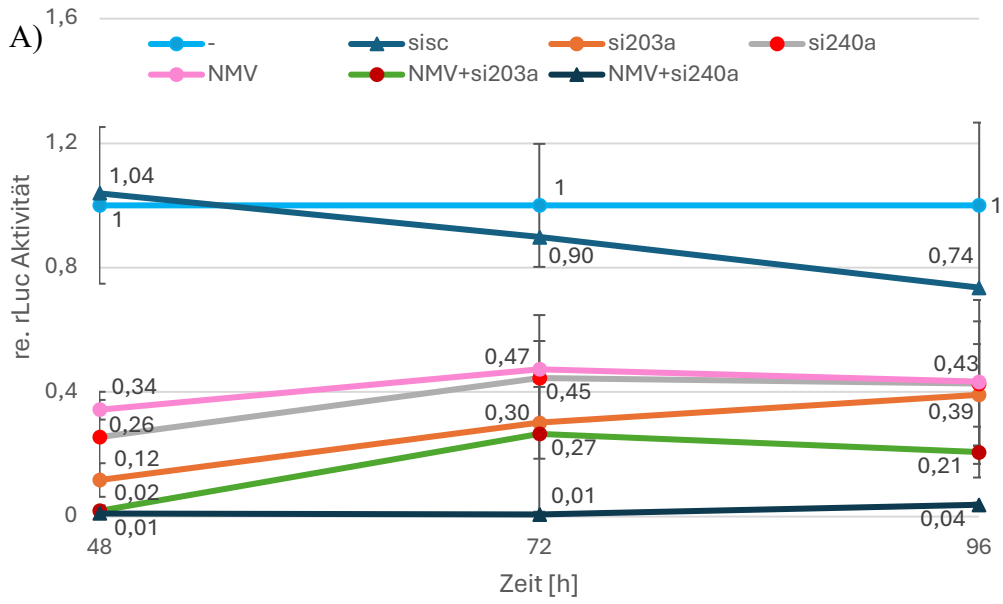


Abbildung 3.39 Zeitabhängige Hemmung von si203a und si240a in Kombination mit NMV und ENS in HuhT7-Zellen. Die Werte wurden über einen Zeitraum von 96 h im 24 h Intervall mittels DLR-Assay erhoben. Das Signal des Renilla-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Zeit in Stunden aufgetragen. Die *small molecules* wurden mit den IC₅₀ (NMV: 140 nM; ENS: 25 nM) und die siRNAs mit 1 nM in HuhT7-Zellen im pHybrid-Replikonsystem transfiziert. A) Kombination der siRNAs mit NMV. B) Kombination der siRNAs mit ENS. C) Kombination von si240a mit NMV und ENS. Das zugehörige Balkendiagramm befindet sich im Anhang (Abb. 6.16). Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Das Experiment hat gezeigt, dass eine Kombination der Wirkstoffe über einen längeren Zeitraum zu einer höheren Hemmwirkung führte, als der Einsatz der Wirkstoffe einzeln, wobei die Kombination der *small molecules* mit si240a eine höhere und langfristige Hemmwirkung aufwies als die Kombination mit si203a. Dieser Effekt konnte für den 96 h Wert allerdings nicht reproduziert werden.

3.5.4.5 Einfluss der siRNAs auf die Hemmwirkung der *small molecules* bei Mutationen im Mpro-Gen

Nirmatrelvir und Ensitrelvir sind hoch potente Wirkstoffe, die gezielt die *main protease* von SARS-CoV-2 hemmen. Aufgrund der schnellen Ausbreitung des Virus und seiner hohen Mutationsrate besteht jedoch ein erhebliches Risiko für die Entwicklung von Resistenzen. Studien haben gezeigt, dass Punktmutationen in der Mpro-Sequenz, die bereits in den VOCs etabliert sind, die Wirksamkeit von Nirmatrelvir (NMV) und Ensitrelvir (ENS) beeinträchtigen können (Duan *et al.*, 2023; Noske *et al.*, 2023).

Um den Einfluss von Punktmutationen auf die Wirksamkeit von NMV und ENS im vorliegenden Testsystem zu untersuchen, wurden von der AG Hilgenfeld die Replikons pHybrid-Replikon_S144A und pHybrid-Replikon_Q189K bereitgestellt. Im pHybrid-Replikon_S144A wurde die Base Thymin an Position 10.632 durch Guanin ersetzt, wodurch das Triplet TCA (kodierend für Serin) in GCA (kodierend für Alanin) umgewandelt wurde. Dieser Aminosäureaustausch erfolgte an Position 144 der Mpro-Proteinsequenz. Im pHybrid-Replikon_Q189K wurde an Position 10.767 Cytosin durch Adenin ersetzt, wodurch das Triplet CAA (kodierend für Glutamin) in AAA (kodierend für Lysin) umgewandelt wurde, was die Aminosäure an Position 189 der Mpro-Proteinsequenz veränderte (modifizierte Mpro-Abschnitte befinden sich im Anhang, Abb. 6.9).

In dem folgenden Experiment wurde analysiert, ob die Hemmwirkung von NMV und ENS in mutierten Replikonsystemen im Vergleich zum Wildtypsystem abgeschwächt ist und ob die Kombination mit der siRNA si240a, die in vorherigen Versuchen in Kombination mit den *small molecules* wirksamer war als si203a, die verringerte Hemmwirkung ausgleichen kann. Dazu wurden pHybrid-Replikon (wt), pHybrid-Replikon_S144A (S144A) und pHybrid-Replikon_Q189K (Q189K) jeweils mit pGL3-Control im Testsystem co-transfiziert und mit si240a sowie NMV oder ENS einzeln und in Kombination behandelt.

Ergebnisse

Die Experimente, die mittels DLR-Assay an zwei unabhängigen Versuchstagen durchgeführt wurden, sind in Abbildung 3.40 zusammengefasst. Die Ergebnisse wurden gegen die entsprechende Leerkontrolle (-) normiert, die nur Plasmide ohne Wirkstoffe enthielt.

In Bezug auf die *scramble* Kontrolle zeigte si240a bei wt eine Hemmung der relativen Luciferaseaktivität um 94 %, während sie bei S144A und Q189K jeweils 89 % und 87 % Hemmung verursachte. Im Vergleich zur Leerkontrolle hemmte si240a einzeln die relative Luciferaseaktivität um 92 % bei wt und 88 % bzw. 79 % bei S144A und Q189K. Die Wirkstoffe NMV und ENS einzeln hemmten die relative Luciferaseaktivität um 60 % und 11 % bei wt, um 56 % und 14 % bei S144A sowie um 87 % und 49 % bei Q189K. Die Kombination von si240a mit NMV führte zur stärksten Hemmung mit 97 % bei wt und 94 % bzw. 98 % bei S144A und Q189K, während die Kombination von si240a mit ENS zu einer Hemmwirkung von 91 % bei wt und 88 % bzw. 87 % bei S144A und Q189K führte.

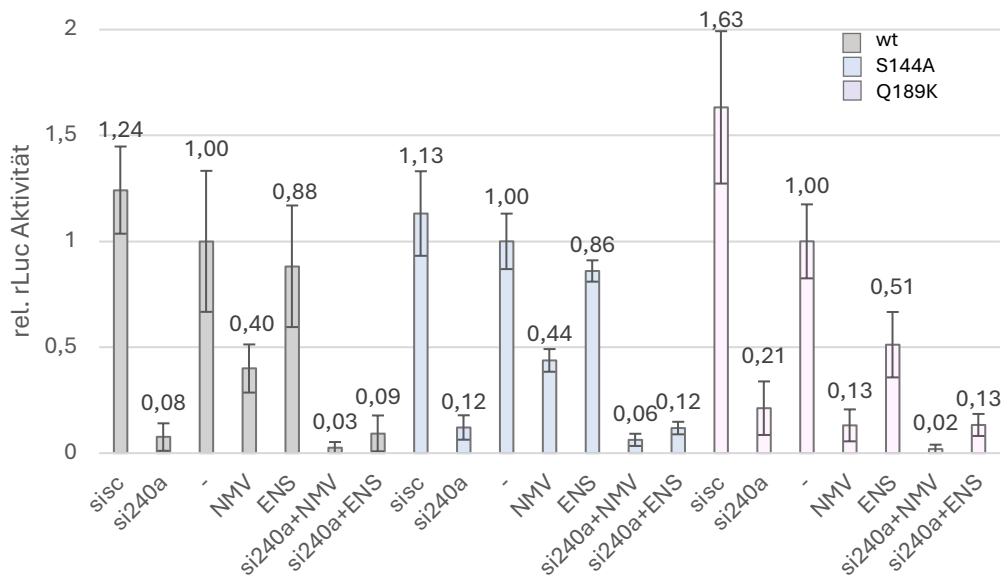


Abbildung 3.40 Vergleich der Wirksamkeit von si240a, NMV und ENS einzeln und in Kombination auf Proteinebene in HuhT7-Zellen. Die Wirkstoffe si240a, Nirmatrelvir (NMV) und Ensitrelvir (ENS) wurden mit 1 nM, 140 nM und 25 nM (IC₅₀) in HuhT7-Zellen jeweils einzeln und in Kombination transfiziert. Zur Kontrolle der siRNA wurde *sisc* transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay und das Signal des Renilla-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert. Zudem wurden die Werte aus zwei Versuchstagen zusammengefasst und gegen die Leerkontrolle (-) normiert. Grau: pHybrid-Replikon (wt), blau: pHybrid-Replikon_S144A (S144A), rosa: pHybrid-Replikon_Q189K (Q189K). Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass die Kombination der Wirkstoffe die Hemmwirkung in allen drei Fällen verstärkt. Die Verwendung der Replikons mit Punktmutationen in Mpro ist in diesem System jedoch nicht relevant, da die Wirkung von NMV und ENS durch die Mutationen nicht negativ beeinflusst wurde.

3.5.5 Fazit zu Studien in einem Replikon-basierten Testsystem, das SARS-CoV-1-Zielsequenzen beherbergt

Nachdem die oligonukleotidbasierten Wirkstoffe in einem plasmidbasierten System untersucht wurden, erfolgte ihre Anwendung in einem Replikon-basierten System. Dieses bietet den Vorteil, näher an der viralen Replikation zu sein und neben der 5'-UTR von SARS-CoV-1 zusätzliche virale Einheiten zu enthalten sowie subgenomische RNA zu erzeugen. Durch *in-silico*-Analysen wurden die Sekundärstrukturen der 5'-UTRs der beiden Testsysteme verglichen und die siRNAs entsprechend angepasst, um eine vollständige Komplementarität mit der 5'-UTR des Replikons zu erreichen (si203a und si240a). In einem ersten Experiment wurde die Wirksamkeit der siRNAs bei einer Konzentration von 30 nM im Vergleich zu siRluc und siCoV6 mittels DLR-Assay in diesem System untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die siRNAs die Expression der Renilla-Luciferase erfolgreich supprimieren können. Weiterhin wurde, wie im vorherigen Kapitel mit dem Einsatz von as240,20Hc am Beispiel von as240m gezeigt, dass ASOs in diesem System wirksam sind und durch einen RNase H-Mechanismus aktiv werden. Darüber hinaus wurde mittels DW-Kurven deutlich, dass die siRNAs in diesem System sowohl in HEK293T- als auch in HuhT7-Zellen eine dosisabhängige Wirksamkeit aufweisen. Mittels RT-qPCR-Analyse wurde die Transkriptionseffizienz des pHybrid-Replikons untersucht. Diese hat ergeben, dass es während der Transkription der gesamten gRNA zu Abbrüchen kommt und Transkripte im Bereich der 5'-UTR zu 24 % häufiger vorliegen als Transkripte mit der rLuc-Sequenz. Zudem wurde mittels RT-qPCR untersucht in welchem Anteil der CMV-Promoter im Vergleich zur RdRp an der Transkription beteiligt ist. Diese Untersuchung hat ergeben, dass nur 11 % der Transkripte von der RdRp allein synthetisiert werden. Um den Hemmmechanismus besser zu verstehen, wurde eine RT-qPCR-Analyse durchgeführt, bei der die Hemmwirkung der siRNAs auf das genomische und subgenomische Transkript im Vergleich zur Hemmung auf der Proteinebene in HEK293T-Zellen untersucht wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Hemmwirkung bezogen auf die sgRNA vergleichbar war mit der Hemmung auf Proteinebene, während die Hemmwirkung bezogen auf die gRNA schwächer ausgeprägt war.

Im nächsten Schritt wurden die siRNAs mit den *small molecules* NMV, ENS und 13b-K kombiniert. Hierbei wurde die Nutzung zweier unterschiedliche Hemmmechanismen zugleich erprobt, um Resistenzen effizienter entgegenzuwirken. Die Kombination der Wirkstoffe wurde zunächst auf Proteinebene untersucht, wobei 1 nM der siRNAs und die IC₅₀ der *small molecules* verwendet wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass eine signifikant höhere Hemmwirkung erzielt werden konnte, wenn die Wirkstoffe kombiniert werden. Daraufhin wurde untersucht, ob die *small molecules* NMV und ENS einen Einfluss auf die dosisabhängige Hemmung der siRNAs haben, wobei ein positiver Einfluss bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wurde der kombinatorische Effekt der Wirkstoffe auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR untersucht. Das Experiment ergab, dass der Verlauf der Graphen, die durch den DLR-Assay erstellt wurden, denen ähnelten, die mittels RT-qPCR generiert wurden. Die *small molecules* einzeln wirkten auf Ebene der sgRNA stärker als auf Ebene der gRNA. Eine Kombination der Wirkstoffe führte

auch auf der RNA-Ebene zu einem deutlich größeren Hemmeffekt, wobei kein nennenswerter Unterschied zwischen den genomischen und subgenomischen Transkripten festzustellen war. Weiterhin wurde die Kombination der Wirkstoffe in einem zeitabhängigen Versuch von 48 h bis 96 h untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass die Kombination von NMV und ENS mit den siRNAs eine längere und stabilere Hemmwirkung im Vergleich zur Hemmwirkung der *small molecules* einzeln aufwies. Zudem zeigte si240a einen stärkeren kombinatorischen Effekt als si203a. Schließlich wurde si240a mit NMV und ENS in den mutierten Replikonsystemen S144A und Q189K eingesetzt. Auch hier führte eine Kombination der Wirkstoffe in allen Fällen zu einem verstärkten Hemmeffekt, wobei die Wirkung der *small molecules* bezogen auf die mutierte Mpro nicht beeinträchtigt war.

3.6. Exkurs: Das West-Nil-Virus als Zielgenom für oligonukleotidbasierte Wirkstoffe

Für diesen Abschnitt wurden basierend auf den Ergebnissen der bisherigen Arbeiten potenzielle ASOs für die hoch konservierte und funktionell bedeutsame 3'- und 5'-UTR des West-Nil-Virus *in-silico* generiert (Huston *et al.*, 2024). Dieses Kapitel soll am Beispiel des WNV verdeutlichen, dass, mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Methoden, für jedes Virus in kurzer Zeit und mit geringem Ressourcenverbrauch eine Vielzahl potenziell wirksamer Oligonukleotide generiert und im Labor getestet werden können.

3.6.1. Sekundärstrukturvorhersage der 3'- und 5'-UTR des WNV und Definierung der lokalen Zielsequenzen

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, erfolgte zunächst die Faltung der Zielregion mithilfe der mfold-Software (Abb. 3.41). Dabei konnten drei *Stem-Loops* im 5'-UTR und zwei *Stem-Loops* in der 3'-UTR identifiziert werden. Am 5'-Ende des Genoms befindet sich eine 7-Methylguanodin-Modifikation. Des Weiteren liegt eine *upstream AUG region* (UAR) im zweiten *Stem-Loop* (Pos. 82-95) vor. Auf das Startcodon folgt unmittelbar die *downstream AUG region 1* (DAR1) (Pos. 100-103). Die 5'-DAR2 befindet sich an Position 109-113. Schließlich erstreckt sich im Bereich von Position 135 bis 146 die 5'-CS (*conserved region*), die komplementär zur 3'-CS ist, die sich an Position 10927-10938 befindet. Im ersten *Stem-Loop* der 3'-UTR befindet sich die 3'-DAR1 an Position 10946-10950, die komplementär zur 5'-DAR1 ist. An Position 10954-10966 liegt die 3'-UAR, die komplementär zur 5'-UAR ist. Die Basen der komplementären Bereiche der 3'- und 5'-UTR paaren während des Translationsstarts jeweils miteinander und sind für die virale Vermehrung essenziell. Daher kommen besonders diese Regionen als Zielsequenzen für eine antivirale Therapie infrage (Deas *et al.*, 2005).

Ergebnisse

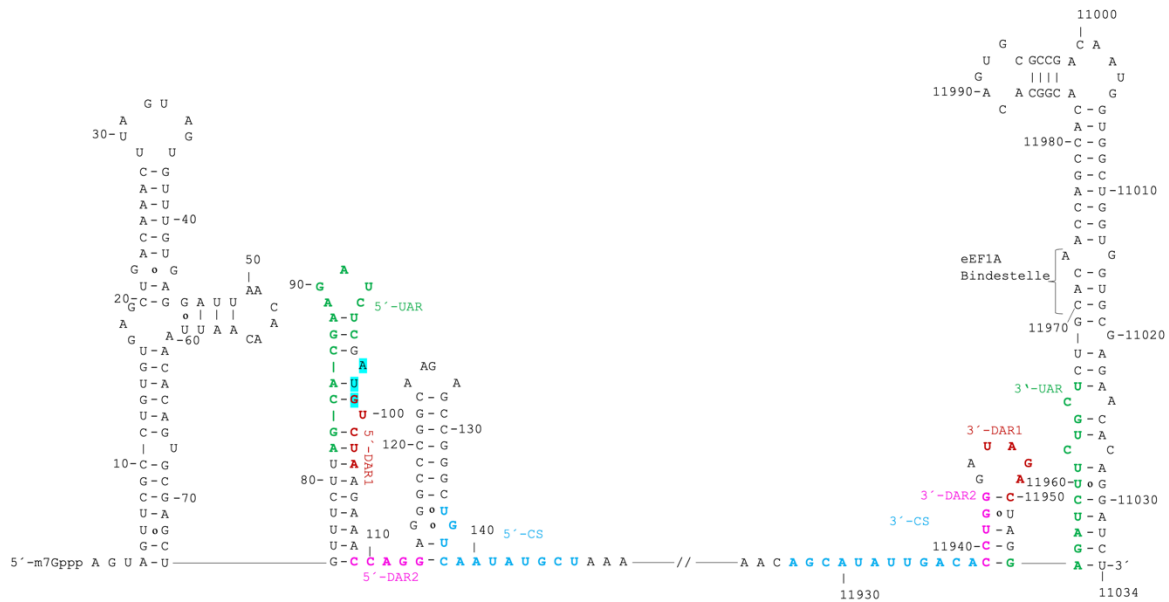


Abbildung 3.41 Sekundärstrukturvorhersage der 5'- und 3'-UTR-Sequenz des West-Nil-Virus.

Die Sekundärstruktur wurde mittels mfold-Software aus den ersten 149 und den letzten 114 Nukleotiden der Referenzsequenz NC_009942 erstellt. Funktionell relevante Bereiche sind farblich markiert. Komplementäre Bereiche der 5'- und 3'-UTR sind in denselben Farben gekennzeichnet. Das Startcodon ist blau hinterlegt. UAR: upstream AUG region, CS: core sequence, DAR: downstream AUG region, eEF1A: eukaryotic elongation factor 1A.

Anhand der Kriterien aus Kapitel 3.3 zur Definierung von Zielsequenzen wurden in Abbildung 3.42 zwölf Zielsequenzen (T1-T12) ausgewählt und markiert. Die erste Zielsequenz T1 erstreckt sich von Position 1 bis 20. Dabei weisen sowohl der 5'- als auch der 3'-Bereich der Zielsequenz vier bzw. drei ungepaarte Nukleotidsequenzen auf, die eine Einfädung der ASOs begünstigen können. Die Zielsequenz T2 umfasst den Bereich von Position 17 bis 39 und enthält am 5'-Ende drei konsekutiv ungepaarte Nukleotide sowie einen *Loop* im Bereich von Position 29-36 bestehend aus sieben konsekutiv ungepaarten Nukleotiden. Zielsequenz T3 beginnt mit diesem *Loop* und reicht bis Position 55. An Position 50-55 befindet sich ein *Loop* aus sechs konsekutiv ungepaarten Nukleotiden. Mit diesem *Loop* beginnt die Zielsequenz T4 an Position 50 und reicht bis Position 71. In dieser Zielsequenz bietet nur der *Loop* am 5'-Ende eine Möglichkeit zum Einfädeln von ASOs. Zielsequenz T5 beginnt in der 5'-UAR mit einem *Loop* aus fünf konsekutiv ungepaarten Nukleotiden an Position 89 und umfasst das Startcodon sowie die 5'-DAR1 und die 5'-DAR2 endend an Position 112 mit einer Sequenz aus drei ungepaarten Nukleotiden. Zielsequenz T6 beginnt an Position 119 und umfasst auch die 5'-DAR2 endend an Position 131 und erstreckt sich über eine *Loop*sequenz aus 4 konsekutiv ungepaarten Nukleotiden. Die Zielsequenz T7 reicht von Position 124 bis 149 und umfasst die 5'-CS, gefolgt von acht konsekutiv ungepaarten Nukleotiden ab Position 139, auf die drei ungepaarte Adeninbasen folgen. Fünf weitere Zielregionen befinden sich in der 3'-UTR. Zielsequenz T8 erstreckt sich von Position 10924-10949 und umfasst die 3'-CS sowie die 3'-DAR1 und 3'-DAR2. Der 5'-Bereich der Zielsequenz beginnt mit einer Folge aus 15 konsekutiv ungepaarten Nukleotiden und endet mit einer *Loop*sequenz aus sechs konsekutiv ungepaarten

Ergebnisse

Nukleotiden. Damit ist diese Zielsequenz optimal zugänglich für ASOs. Die Zielsequenz T9 beginnt mit der genannten *Loop*sequenz an Position 10944 und umfasst die 3'-DAR1, endend an Position 10965 im 3'-UAR. Zielsequenz T10 beginnt an Position 10973 und reicht bis in die *eukaryotic elongation factor 1A* (eEF1A) Bindestelle. Es endet mit einer *Loop*sequenz aus sieben konsekutiv ungepaarten Nukleotiden an Position 10993. Mit dieser Sequenz startet die Zielsequenz T11 an Position 10982 und endet in der benachbarten *Loop*struktur an Position 11005, bestehend aus sechs konsekutiv ungepaarten Nukleotiden. Sie bildet den Startpunkt für Zielsequenz T12, die an Position 11000 beginnt und an Position 11012 endet (Abb. 3.42).

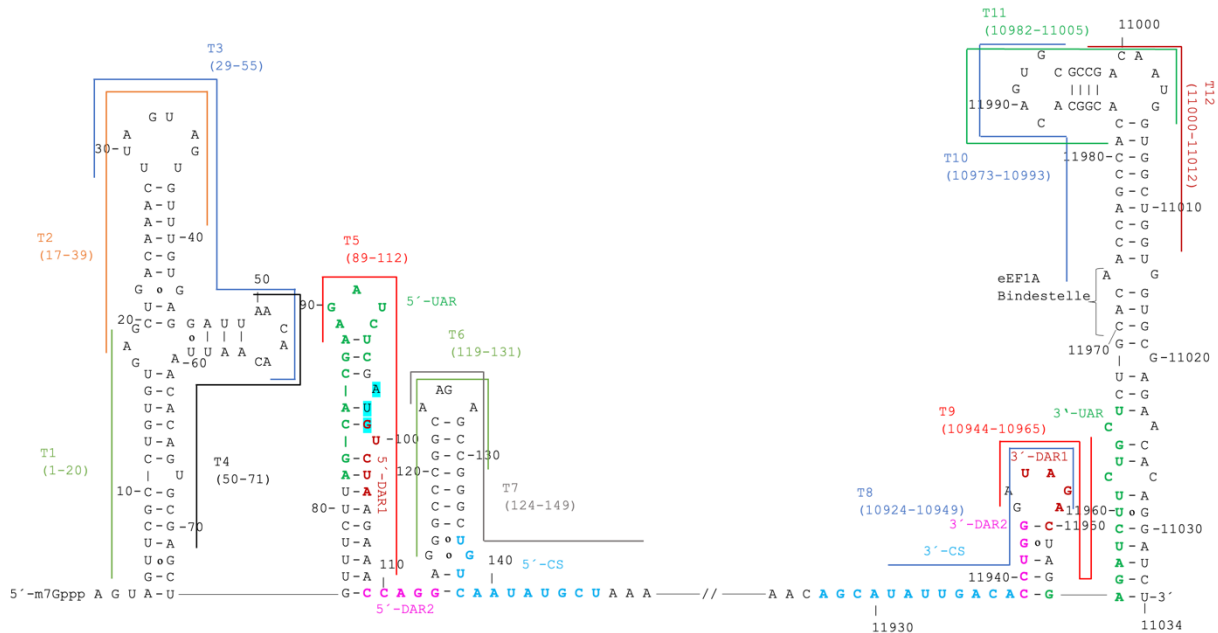


Abbildung 3.42 Sekundärstrukturvorhersage der 5'- und 3'-UTR-Sequenz des West-Nil-Virus und Zielgene. Die Sekundärstruktur wurde mittels mfold-Software aus den ersten 149 und den letzten 114 Nukleotiden der Referenzsequenz NC_009942 erstellt. Die Zielgene sind mit T1-T12 bezeichnet und farblich markiert. Komplementäre Bereiche der 5'- und 3'-UTR sind in denselben Farben markiert. Das Startcodon ist blau hinterlegt. UAR: upstream AUG region, CS: core sequence, DAR: downstream AUG region, eEF1A: eukaryotic elongation factor 1A.

3.6.2 Entwurf von West-Nil-Virus-gerichteten Antisense-Oligonukleotiden

Der Entwurf der ASOs gegen die zwölf ausgewählten Zielsequenzen erfolgte anhand des Kriterienschemas in Kapitel 3.3. Dabei wurden gegen jede Zielregion Oligonukleotide mit einer Länge von 18 bis 22 Nukleotiden erstellt, wodurch zunächst insgesamt 221 mögliche Oligonukleotide identifiziert wurden. Diese wurden einem ersten Selektionsverfahren unterzogen, bei dem alle ASOs aussortiert wurden, die einen T_m -Wert kleiner als 55 °C und größer als 65 °C aufwiesen. Zudem wurden alle ASOs ausgeschlossen, die mehr als ein CpG-Motiv besaßen, um pro-inflammatorische Reaktionen zu vermeiden (Senn *et al.*, 2005). Das Potenzial für intramolekulare Faltungen, die zu Haarnadelstrukturen führen, sowie die Selbstdimerisierung sollte möglichst niedrig sein und wurde mit dem *Oligonucleotides Properties Calculator* untersucht. Ebenso wurde das Potenzial zur Bildung stabiler G-Quartett-

Komplexe analysiert, und alle ASOs, die solche Sekundärstrukturen bilden konnten, wurden ausgeschlossen. Nach diesem ersten Screening blieben 91 ASOs übrig. Ein weiterer Selektionsschritt wurde mittels NCBI-BLAST durchgeführt, um mögliche *off-target*-Effekte zu analysieren. Dabei wurden alle ASOs aussortiert, die in der BLAST-Analyse einen *off-target*-Effekt auswiesen, bei dem 15 oder mehr konsekutiv aufeinanderfolgende Basen komplementär zu einer kodierenden mRNA-Sequenz aus dem menschlichen Genom waren. Nach dieser Selektion waren zehn ASOs verblieben, die in der Tabelle 3.11 zusammengefasst wurden. Die Benennung erfolgte nach demselben Prinzip wie bei den ASOs, die gegen SARS-CoV-2 gerichtet sind (Kap. 3.3), wobei die erste Ziffer die Position im Genom widerspiegelt und die zweite Ziffer die Länge des ASOs angibt. Die Abkürzung „as“ weist darauf hin, dass es sich um ein Antisense-Oligonukleotid handelt. Das ASO as14,21 beginnt in Zielsequenz T1 und reicht bis in die Zielsequenz T2 hinein, wobei die *Loop*struktur in T2 eine optimale Möglichkeit zum Einfädeln in die Zielsequenz bietet. Alle anderen ASOs binden in Zielsequenz T7, wobei über die 5'-CS eine optimale Bindungsmöglichkeit geboten wird. Die Bindung an diese Sequenz blockiert die Zirkularisierung des Genoms und verhindert möglicherweise die Translationsfähigkeit des Virus.

Tabelle 3.11 Bezeichnungen und Sequenzen der entworfenen ASO-Kandidaten gegen die 5'- und 3'-UTR des WNV. Die ausgewählten ASO-Sequenzen sind von 5'→3' angegeben.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
as14,21	tactaagttgtcagctcaca
as125,21	gcatattgacagcccggctct
as125,22	agcatattgacagcccggctct
as126,21	agcatattgacagcccggctc
as126,22	tagcatattgacagcccggctc
as127,18	catattgacagcccggct
as127,19	gcatattgacagcccggct
as128,21	ttagcatattgacagcccggc
as128,22	ttagcatattgacagcccggc
as129,21	ttagcatattgacagcccgg

3.6.3 Fazit zum West-Nil-Virus als Ziel für oligonukleotidbasierte Wirkstoffe

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass es mithilfe einfacher *in-silico*-Studien möglich ist, oligonukleotidbasierte Wirkstoffe gegen ein virales Genom zu entwickeln. Nach der Analyse der Sekundärstruktur mit der mfold-Software konnten die Zielsequenzen des ausgewählten Genombereichs anhand der in Kapitel 3.3 beschriebenen Kriterien identifiziert werden. Für diese Zielsequenzen wurden alle potenziellen ASOs generiert. Aus einer großen Anzahl potenzieller ASOs wurden die geeignetsten mithilfe der Kriterien aus Kapitel 3.3 ausgewählt. Der NCBI-BLAST schloss mögliche *off-target*-Effekte mit dem menschlichen Genom aus,

Ergebnisse

sodass alle verbliebenen ASOs als geeignete Wirkstoffe gegen das WNV in Betracht gezogen wurden. Im nächsten Schritt müssen die ASOs für eine bessere Stabilität und Spezifität chemisch modifiziert werden und könnten dann für *in-vivo*-Versuche eingesetzt werden.

4. Diskussion

Oligonukleotidbasierte Wirkstoffe sind ein zunehmender und vielversprechender Bereich der Arzneimittelentwicklung zur Behandlung einer Vielzahl von genspezifischen Erkrankungen. Ihre einfache Produktion und Modifizierbarkeit liefert grundlegende Vorteile im Vergleich zu bisher bestehenden Methoden wie Impfstoffe, monoklonale Antikörper oder *small molecules*. So wurden nach der Zulassung von Fomirvirsen im Jahr 1998 15 weitere ASOs von der FDA für die klinische Anwendung zur Behandlung von Erkrankungen der Netzhaut, des Blutes, der Muskeln, der Nerven und des Herzens zugelassen. Viele weitere befinden sich in klinischen und präklinischen Studien (Collotta *et al.*, 2023). Ein Beispiel für ein klinisch angewendetes ASO ist Nusinersen. Es wird bei der Behandlung von spinaler Muskelatrophie eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine seltene autosomal rezessive Erkrankung, die durch Muskelschwund und -schwäche aufgrund der Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark und Hirnstamm infolge von Deletionen oder Mutationen im *Survival Motor Neuron* SMN1-Gen gekennzeichnet ist (Hoy, 2017). Nusinersen ist ein 2'-MOE modifiziertes ASO, welches das Spleißen der SMN2-prä-mRNA modifiziert, indem es an eine Spleißstelle innerhalb von Intron 7 bindet, was zu einem Einschluss von Exon 7 in das prä-mRNA-Transkript und folglich zu einer erhöhten Produktion von funktionellem SMN-Protein in voller Länge führt (Acsadi *et al.*, 2021). Der Wirkstoff wurde im Dezember 2016 von der FDA zugelassen (Chiriboga, 2017) und wird als intrathekale Injektion verabreicht (Cordts *et al.*, 2020).

Zudem wurden seit 2018 sechs siRNA-basierte Wirkstoffe entwickelt und von der FDA zugelassen: Patisiran, Givosiran, Lumasiran, Inclisiran, Vutrisiran und Nedosiran. Viele weitere siRNAs befinden sich in verschiedenen klinischen Studien (An, 2024; Syed, 2023). Patisiran wurde als erster siRNA-basierter Wirkstoff im August 2018 zugelassen und dient der Behandlung der hereditären Transthyretin-Amyloidose. Hierbei handelt es sich um eine vererbare, lebensbedrohliche Erkrankung, die durch die Ablagerung von abnormalem Transthyretin-Protein verursacht wird. Mit der siRNA ALN-18328, die in LNPs eingebaut wurde, wird die hepatische Transthyretin-Proteinsynthese gehemmt (Debacker *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022).

Basierend auf der erfolgreichen Entwicklung von ASOs und siRNAs gegen genspezifische Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten hat sich die Frage ergeben, ob diese Wirkstoffklasse auch zur Bekämpfung von Pandemien wirksam eingesetzt werden kann. Im Rahmen der COVID-19-Pandemie haben verschiedene Forscherteams ASOs und siRNAs als alternativen antiviralen Ansatz entwickelt, die gezielt gegen die mRNA des SARS-CoV-2-Virus gerichtet sind. So hatte die Gruppe von Tolksdorf *et al.* die potente siRNA siCoV6 entwickelt, die sich gegen die *Leadersequenz* der 5'-UTR richtet und in viralen Studien eine zuverlässige Unterdrückung der Virionenbildung gezeigt hat (Tolksdorf *et al.*, 2021). Die Gruppe Idris *et al.* konnte für siRNAs, die gegen die 5'-UTR oder die Helikase von SARS-CoV-2 gerichtet sind, in Mausmodellen eine signifikante Verringerung von Viruspartikeln in der Lunge nachweisen (Idris *et al.*, 2021). Auch ASOs gegen SARS-CoV-2 wurden in unterschiedlichen Studien

untersucht. Ein Beispiel dafür ist die Entwicklung von Gapmeren durch Dhorne-Pollet *et al.*, die gegen die 5'-UTR, das ORF1ab und das N-Protein gerichtet sind, wobei sich in viralen Assays *in-vitro* gezeigt hatte, dass alle ASOs den viralen Titer signifikant reduzierten (Dhorne-Pollet *et al.*, 2022).

Im Kontext dieser Arbeit wurden ASOs und siRNAs gegen die 5'-UTR von SARS-CoV-2 zielstrukturbasiert entwickelt und untersucht. Dazu wurde zunächst die 5'-UTR aufgrund der im Vergleich zum restlichen Genom hohen Konservierung und der wesentlichen funktionellen Rolle bei der viralen RNA-Replikation und Translation sowie der Synthese von sgRNA innerhalb des SARS-CoV-2 Genus ausgewählt (Yang and Leibowitz, 2015). Die 5'-UTR wurde anhand von Alignments und Faltungen der Primärsequenz von VOCs analysiert und Zielstrukturen mittels zusätzlicher Faltungspotenzialanalysen ermittelt, wobei die Etablierung einzelner Mutationen in der Zielregion eine Herausforderung darstellte, die in Kapitel 4.2.5 diskutiert wird. Nach der ersten Auswahl der ASOs und siRNAs wurden durch funktionelle Studien die wirksamsten (as203, as240, si203 und si240) selektiert und ihre Wirkmechanismen untersucht, wobei diese nicht vollständig geklärt werden konnten und in den Kapiteln 4.2.2 und 4.2.3 ausführlich erörtert werden. Die Wirksamkeit der Oligonukleotide wurde in einem Replikon-basierten System bestätigt, wobei grundlegende Unterschiede im Vergleich zum Plasmidsystem, vor allem auf der RNA-Ebene, beobachtet werden konnten. Darüber hinaus verstärkte die Kombination der siRNAs mit *small molecules* die Wirksamkeit der jeweiligen Inhibitoren in unterschiedlichem Ausmaß (Kap. 3.5.4). Zusätzlich konnte in einem Exkurs gezeigt werden, dass die Mutation des uORFs keine Verstärkung der Translationseffizienz hervorruft. Dieser Punkt steht in Konflikt mit Literaturdaten und müsste, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, weiter untersucht werden.

Der etablierte Ansatz zur *in-silico* Generierung von oligonukleotidbasierten Wirkstoffen konnten zudem angewendet werden, um ASOs gegen ausgewählte Zielregionen im WNV zu generieren.

4.1. Auswahl der Zielsequenzen für oligonukleotidbasierte Wirkstoffe

4.1.1 Konservierung der 5'-UTR in den mutierten Varianten von SARS-CoV-2

RNA-Viren besitzen häufig eine höhere Mutationsrate im Vergleich zu DNA-Viren. Die Genomgröße von SARS-CoV-2 mit über 30 kb und die geringe Genauigkeit der RdRp sind die Gründe für die hohe Mutationsrate bei der Anpassung an neue menschliche Wirte und Wirtszellen (Pachetti *et al.*, 2020). Seit dem Auftreten von SARS-CoV-2 sind kontinuierlich neue Varianten entstanden, von denen einige zu bedeutenden epidemischen Stämmen geworden sind, die als VOCs definiert werden. Im Vergleich zum ursprünglichen Wildtyp (Wuhan-Hu-1-Referenzsequenz) haben die VOCs im gesamten kodierenden Genom, insbesondere im Spike-Protein, zahlreiche Mutationen akkumuliert, die ihre Übertragbarkeit und Fähigkeit zur „Immunevasion“ erhöhen (Tian *et al.*, 2022). Im Bereich der konservierten 5'-UTR hingegen wurden nur wenige Mutationen identifiziert. Ein Alignment der 5'-UTR von SARS-CoV-1 mit

Diskussion

SARS-CoV-2 (Abb. 3.26) zeigte eine Übereinstimmung von 91 %, während die Gesamthomologie zwischen den Genomen der beiden Stämme auf RNA-Sequenzebene bei nur 79,6 % liegt (Abdolmaleki *et al.*, 2022).

Die meisten Basenänderungen in den VOCs umfassten die Substitution von C zu U oder G zu A. Ein Hotspot für Mutationen im SARS-CoV-2 Genom wurde für Cytosin- oder Guaninbasen entdeckt, die ein direktes *upstream* UUU-Trinukleotidmotiv besaßen (Mishra *et al.*, 2020). Die erste Mutation in der 5'-UTR, C241U in der Alpha-Variante, wurde im hexameren *Loop* des SL5b anschließend an das UUU-Trinukleotidmotiv gefunden (Abb. 3.1). Diese Mutation hat sich manifestiert und konnte in jedem weiteren VOC identifiziert werden. Es wird vermutet, dass sie sich auf die virale Verpackung und den Titer auswirkt (Mishra *et al.*, 2020). Sie hat keine Auswirkung auf die Faltung und Sekundärstruktur der 5'-UTR, führt aber zu einem *mismatch* (imperfekte Watson-Crick Paarung) mit as240 und si240 (Kap. 3.4.2.4). Im gesamten Genom der Alpha-Variante konnten insgesamt 21 weitere Mutationen gefunden werden, wobei neun davon im Spike-Protein identifiziert wurden (Parra-Lucares *et al.*, 2022).

Zwei weitere Mutationen in den VOCs, die mittels Alignment von einer Vielzahl isolierter Sequenzen in der NCBI-Datenbank identifiziert wurden, waren G174U in der Beta-Variante und G210U in der Delta-Variante (Tab. 3.1; Abb. 6.2 C, D). G174U verschiebt die *Bulge*-Struktur von Position 174 zu 175. Die Uridinbase paart mit der Adeninbase auf der gegenüberliegenden Seite im SL5 an Position 270. In der Delta-Variante löst die Mutation G210U die Wobblepaarung zwischen G und U auf, wodurch sich die *Bulge*-Struktur um eine Base erweitert. Dadurch wird dieser Bereich für as203 und si203 zugänglicher. Jedoch wird auch ein *mismatch* zu den Oligonukleotiden erzeugt. Beide Mutationen wurden in den nachfolgenden Varianten nicht wiedergefunden und galten daher als irrelevant für weitere Untersuchungen.

Die Omikron-Varianten BA.1 und BA.1.1 wiesen neben C241U auch die Mutation C21U auf, die im tetrameren *Loop* des SL1 lokalisiert war und zu keiner Veränderung der Sekundärstruktur führte (Abb. 6.2 E). Da sich die Mutation in der Nsp1-Erkennungsregion befindet, könnte sie die Interaktion zwischen SL1 und Nsp1 an dieser Stelle beeinflussen (Sakuraba *et al.*, 2022). Da sich auch diese Mutation in den nachfolgenden Varianten nicht manifestiert hatte, wurde sie bei der Erstellung der ASOs und siRNAs nicht weiter berücksichtigt. In der BA.2-Variante wurde neben C241U die Mutation C44U gefunden (Abb. 6.2 F). Hierbei folgt die Cytosinbase erneut direkt einem UUU-Motiv. Die Mutation befindet sich in der PK1-Struktur und beeinflusst die Sekundärstruktur nicht. Sie ist in BA.4 und BA.5 erhalten geblieben. In der BA.5-Variante ist zudem die Mutation G101A hinzugekommen (Abb. 6.2 G). Diese befindet sich im Stamm des SL4 und wandelt die Wobblepaarung mit dem gegenüberliegenden Uridin an Position 111 zu einer Watson-Crick-Verbindung um. Diese verleiht dem Stamm eine höhere Stabilität (Cleaves, 2014). Auffällig war, dass es sich bei den meisten Mutationen in der 5'-UTR sowie im gesamten Genom von SARS-CoV-2 um C zu U Mutationen handelte. Diese werden im Wirt insbesondere durch die Aktivität von

Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like (APOBEC) Proteinen angetrieben, die eine hohe Anzahl von C→U-Mutationen erzeugen (Lamb *et al.*, 2024).

Vorteilhafte Mutationen sind selten, und nachteilige Mutationen werden durch natürliche Selektion wieder beseitigt. Daher gehört die Mehrheit der Mutationen, die sich im Genom ansammeln, zur Klasse der neutralen Mutationen (Tenailon and Matic, 2020). Während die Mutationen in der 5'-UTR keinen näher untersuchten Einfluss auf die Virologie von SARS-CoV-2 zeigten, trugen die zahlreichen Mutationen im S-Protein zur einer erhöhten Infektiosität bei. Die Delta-Variante umfasste bereits neun Mutationen im S-Protein, darunter D614G, L452R, die die Stabilität des RBD-ACE2 Komplexes erhöhten, sowie P681R, welches die Spaltung der Spike-Protein Untereinheiten optimierte (Jiahui Chen *et al.*, 2020; Teng *et al.*, 2021). Die Omicron-Variante, die nur eine Mutation in der 5'-UTR trug, hatte insgesamt über 50 Mutationen im gesamten Genom und 32 Mutationen im Spike-Protein erworben (Tian *et al.*, 2022), die ihre Übertragbarkeit und Immunevasion verbesserten. (Zhou *et al.*, 2022).

Die Wirksamkeit der Impfstoffe wurde durch diese Mutationen beeinträchtigt. Während BNT162b2 mit der zweiten Auffrischimpfung für die Alpha-Variante sowie Delta-Variante eine Wirksamkeit von 86 % nach 14 Tagen aufwies, lag dieser Wert bei nur 25 % - 50 % bei der Omikron-Variante (Zhou *et al.*, 2022). Erst eine dritte Auffrischimpfung konnte die Wirksamkeit auf bis zu 73 % erhöhen (Chenchula *et al.*, 2022).

Die Analysen der 5'-UTRs der VOCs haben gezeigt, dass diese Region im Vergleich zum gesamten Genom konserviert bleibt, sodass sie eine gute Zielregion für oligonukleotidbasierte Wirkstoffe darstellt. Im zeitlichen Verlauf konnten sich C241U und C44U manifestieren, wobei beide in einem Hotspot für Mutationen liegen. Die Auswirkung der Mutationen auf die Virusverbreitung erfordert jedoch weitere Untersuchungen.

4.1.2 Definition ausgewählter Zielstrukturen

Die Wirksamkeit von Oligonukleotiden hängt maßgeblich von den lokalen Strukturen der Ziel-RNA, den chemischen Eigenschaften und Sequenzen der Oligonukleotide sowie den Merkmalen des relevanten biologischen Systems ab, einschließlich der metabolischen Eigenschaften der Ziel-RNA und des Genprodukts (Far *et al.*, 2001). Daher steht das zielstrukturbasierte Design von Oligonukleotiden hier im Vordergrund. Eine experimentelle Methode zur Ermittlung der Sekundärstruktur ist das strukturelle *probing* mittels RNase V1; einem Enzym, das die RNA an doppelsträngigen oder stark strukturierten Bereichen spaltet. Die resultierenden Fragmente werden mittels PAGE analysiert (Miao *et al.*, 2021). Dieses Verfahren ist zwar arbeits-, zeit- und kostenintensiv, jedoch äußerst präzise und zuverlässig. Zudem berücksichtigt es die biologische Umgebung der RNA.

Eine alternative Herangehensweise ist die Bestimmung der Sekundärstruktur mittels *in-silico* Verfahren. Dabei kann beispielsweise ein Faltungsprogramm wie die mfold-Software verwendet werden, das unter Berücksichtigung thermodynamischer Parameter die stabilste Struktur berechnet (Zuker, 2003).

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser zielstrukturbasierte Ansatz zur Definition der Zielregionen angewendet. Basierend auf der ermittelten Sekundärstruktur wurden zugängliche Zielregionen ausgewählt und anhand in dieser Arbeit etablierten Kriterien Oligonukleotide entworfen, die anschließend experimentell untersucht wurden. Der Nachteil des *in-silico*-Ansatzes zur Generierung der Sekundärstruktur liegt in der begrenzten Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Vorhersagen für RNA sowie dem Mangel an mechanistischen Einblicken in die strukturellen Voraussetzungen für eine effiziente Bindung mit potenziellen Wirkstoffen. (Sczakiel, 2000). Daher wurde auf das Wissen zur Struktur-Funktionsbeziehung von Oligonukleotiden zurückgegriffen (Kap. 3.3).

Das *in-silico* Verfahren zur Generierung von Oligonukleotiden im Hochdurchsatz wurde durch umfangreiche *in-vivo* Analysen unterstützt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Basensequenz der Oligonukleotide nach erster Bestimmung nicht weiter verändert wird. Dies ist wichtig, da die Struktur-Funktions-Beziehung von Oligonukleotiden nicht trivial ist; wenige Basenaustausche können effiziente Oligonukleotide in ineffiziente umwandeln (Milner *et al.*, 1997; Patzel *et al.*, 1999). Weiterhin ermöglicht dieser Ansatz die Identifizierung einer großen Anzahl relevanter lokaler Zielstrukturen entlang einer bestimmten Ziel-RNA-Sequenz, die auf ihre Eignung als günstige Eintrittsstellen für Antisense-Stränge analysiert werden. Somit können alle möglichen Antisense-Spezies definiert werden und nach solchen gesucht werden, die bestimmte Kriterien erfüllen, welche mit einer erhöhten Wirksamkeit in Zusammenhang stehen (Far *et al.*, 2001). Der *in-silico*-Ansatz ist zudem kosteneffizienter, zeitsparender und automatisierbar, wodurch er immer mehr an Bedeutung gewinnt (Sczakiel, 2000).

Der zielstrukturbasierte Ansatz ermöglicht die Identifizierung stabiler Bereiche wie *Loop*-Sequenzen, die eine erhöhte Zugänglichkeit und Effizienz versprechen, was die Bedeutung der Struktur der Ziel-mRNA für die Antisense-Aktivität unterstreicht (Szabat *et al.*, 2020; Vickers, 2000).

Es gibt jedoch auch die Möglichkeit, die nukleotidbasierten Wirkstoffe durch die Analyse der *annealing*-Temperatur des Oligonukleotid-Zielsequenz-Duplex oder durch die Betrachtung der kinetischen Zugänglichkeit zu bestimmen, um die Basis für die Wirkstofffindung zu bilden. Letzteres beruht auf der Annahme, dass Zielsequenz und Oligonukleotid zunächst einen basenunspezifischen Prä-Komplex bilden, der durch einige basenspezifische Interaktionen zu einem thermodynamisch stabilen Duplex führt. Die Initiierung der Duplexbildung ist zielstrukturabhängig, weshalb geeignete Zielstrukturen identifiziert werden müssen (Sczakiel and Far, 2002). Eine weitere Methode, die von Milner *et al.* verwendet wurde, ist die Verwendung eines Oligonukleotid-Arrays, um das Hybridisierungspotenzial jedes Oligonukleotids zu seiner Zielsequenz zu untersuchen. Dazu werden radioaktiv-markierte Oligonukleotide auf der Oberfläche einer Glasplatte immobilisiert, um das Maß der Bildung von Heteroduplexen zwischen den Oligonukleotiden und der Ziel-mRNA zu detektieren (Milner *et al.*, 1997). Mit dieser Methode werden zwar häufig die Oligonukleotide mit der höchsten Affinität für das Ziel identifiziert, jedoch wird die Sekundärstruktur der Zielregion nicht berücksichtigt (Vickers, 2000).

Alternativ können Oligonukleotide mittels Design-Tools generiert werden, ohne lokale Zielstrukturen zu definieren. Auch diese *in-silico* Methode ist zeit- und kostensparend und ermöglicht eine hohe Effizienz. Sie ist jedoch in ihrer Flexibilität eingeschränkt, da Nutzer wenig Kontrolle über individuelle Anpassungen haben und von vorgefertigten Algorithmen abhängig sind (Tolstrup, 2003).

Der zielstrukturbasierte *in-silico* Ansatz mittels mFold-Software hat in der vorliegenden Arbeit die Generierung der Sekundärstruktur der 5'-UTR von SARS-CoV-2 ermöglicht (Abb. 3.1). Die Berechnungen wurden durch die thermodynamischen Untersuchungen der Faltungspotenziale unterstützt (Abb. 3.2). Anhand dieser Sekundärstrukturvorhersage wurden die Zielregionen T1 bis T5 definiert (Abb. 3.1), die als Grundlage für das Design der Oligonukleotide dienen. Diese Regionen umfassen mindestens 5 aufeinanderfolgende ungepaarte Nukleotide, um die Bindung und das Einfädern der Oligonukleotide zu ermöglichen (Far *et al.*, 2004). Die mittels mfold-Software generierte und thermodynamisch stabilste Sekundärstruktur (Abb. 3.1 und 5.3) stimmt vollständig mit der experimentell durch Sekundärstruktur-*Probing* erstellten Struktur von Miao *et al.* überein, was die Genauigkeit beider Ansätze unterstützt (Miao *et al.*, 2021).

4.2. Untersuchung der Wirksamkeit der oligonukleotidbasierten Wirkstoffe in einem transienten plasmidbasierten Testsystem

4.2.1 Funktionelle Studien zur Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide auf Protein Ebene

Der in dieser Arbeit verwendete Luciferase-Reportergen Assay beruht auf dem Vektor pNL1.1 [Nluc] (Promega). Dem Nano-Luciferasegen wurde der HSV-TK Promotor gefolgt von der leicht modifizierten SARS-CoV-2 5'-UTR-Sequenz vorgeschaltet (Abb. 6.4, 6.5). Der HSV-TK Promoter ist vergleichsweise schwach und wurde daher in Kombination mit der hocheffizienten Nano-Luciferase im Testsystem eingesetzt (Toktay *et al.*, 2022). Die Nano-Luciferase wurde als Reportergen für das Testsystem gewählt, da sie im Vergleich zu den gängigen Luciferasen wie der Firefly- oder der Renilla-Luciferase viele Vorteile bietet. Sie ist die derzeit neueste kommerziell erhältliche Luciferase mit einem Molekulargewicht von 19,1 kDa. Als gut lösliches, monomeres, stabiles und ATP-unabhängiges Enzym kann sich die Nano-Luciferase aufgrund ihrer intrazellulären Stabilität aktiv in Zellen anreichern. Daher sendet sie in Kombination mit dem Substrat Furimazin ein besonders hohes und über mehr als 2 Stunden stabiles Signal aus (England *et al.*, 2016). Studien haben gezeigt, dass diese Luciferase auch mit dem kostengünstigeren Substrat CTZ im Vergleich zu anderen Luciferasen ein hohes und stabiles Signal aussendet (Inouye *et al.*, 2015). Daher wurde die Nano-Luciferase in diesem System mit dem kostengünstigeren Substrat CTZ verwendet.

Als interne Kontrolle und Normalisierungsvektor im DLR-Assay wurde das pGL3-Control Plasmid, das die Firefly-Luciferase kodiert, herangezogen (Kap. 3.4).

Die zehn *in-silico* generierten ASOs wurden in einem ersten Screening mittels FDA-Assay und DLR-Assay miteinander verglichen. Kein ASO verringerte die Vitalität in Bezug auf asScr

Diskussion

signifikant, sodass alle für weitere Studien in Betracht gezogen wurden (Abb. 3.6). Alle eingesetzten ASOs waren als vollständige PTOs modifiziert und wurden als Gapmere synthetisiert (Tab. 3.2). Daher haben sie sich nur in Sequenz und Länge unterschieden. Die nicht-signifikanten Reduktionen der Viabilität einiger ASOs könnten somit auf ihre *off-target*-Effekte (Tab. 3.3) zurückzuführen sein (Crooke, 2008). Mittels DLR-Assay wurden fünf ASOs identifiziert, die bei einer Konzentration von 100 nM die relative Luciferaseaktivität im Vergleich zum Kontroll-Oligo asScr signifikant verringern (Abb. 3.7). Vier dieser fünf wirksamen ASOs richteten sich gegen SL5, welches auf eine besonders hohe Zugänglichkeit dieser Region hinweisen könnte.

Der nächste Schritt bestand in der Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehung der ausgewählten ASOs (Kap. 3.4.1.2). Diese Analyse stellt die eingesetzte Menge eines Wirkstoffes in Relation zu seiner Gesamtwirkung dar, und untersucht die maximale Hemmwirkung (I_{\max}) sowie die Konzentration, bei der die halbmaximale Wirkung (IC_{50}) erreicht wird. Solche Kurven nehmen in der Regel einen sigmoidalen Verlauf an (Kilcoyne *et al.*, 2013). Zudem wurden mikroskopische Beobachtungen einbezogen, um den Einfluss der ASOs auf die Vitalität der Zellen zu beurteilen. Nach dem ersten *Screening* mittels DLR-Assay (Abb. 3.7) führte die Analyse der DW-Kurven zu einer weiteren Selektion der ASOs. Nur as203 und as240 zeigten eine dosisabhängige Hemmung der relativen Luciferaseaktivität (Abb. 3.8) und wurden daher für weiterführende Experimente ausgewählt. In Abbildung 3.8 A-C sowie Abbildung 6.7 führte der Einsatz von as203 und as240 zunächst zu einem Anstieg der relativen Luciferaseaktivität. Geringe Mengen von ASOs können einen positiven Feedback Mechanismus aktivieren, welcher die Genexpression erhöht, sodass erst ab hohen Menge eine wirksame Verringerung der Genexpression erreicht werden kann (Ramesh and Krishnan, 2023).

Für die beiden ausgewählten ASOs wurden detaillierte NCBI-Blast-Analysen durchgeführt, um die *off-target*-Effekte genauer zu untersuchen (Tab. 3.4). Dabei ist entscheidend, dass Duplexe ab einer Länge von 15 Nukleotiden funktionelle *off-target*-Bereiche darstellen können, die von der RNase H erkannt werden oder die Translation blockieren. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit der *off-target*-Effekte mit der Länge der Duplexe (Crooke *et al.*, 2020).

Das ASO as203 umfasst fünf *off-targets* mit 15 Nukleotiden, welche die Gene SENP3, COA7, MYO5B, PRKAR1B und ACTR3C betreffen. SENP3 ist ein Redox-Sensor, der an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ist (Hu *et al.*, 1998), während COA7 als Cytochrom C Oxidase eine entscheidende Rolle in der mitochondrialen Zellatmung spielt (Formosa *et al.*, 2022). MYO5B kodiert für ein Fibronectin Transportprotein (Sakai *et al.*, 2022) und PRKAR1B ist an der cAMP-Signalübertragung in Zellen beteiligt (Bloyd *et al.*, 2021). ACTR3C ist ein wenig erforschtes Aktin-bezogenes Protein, das möglicherweise die Metastasierung von Lungenadenokarzinomen unterdrückt. (Jones *et al.*, 2017). Die längste *off-target*-Sequenz mit 19 Nukleotiden betrifft SNORD126, dessen Funktion bisher unerforscht ist, aber als onkogene ncRNA bei hepatozellulärem und kolorektalem Krebs bekannt ist (Qian *et al.*, 2020).

Die *off-target*-Effekte für as240 mit einer Länge von 15 und 17 Nukleotiden beschränken sich auf TMEM114 und SNAP91. TMEM kodiert für ein Glykoprotein, das für die Augenentwicklung wichtig ist, während SNAP91 als Adaptin beim Proteintransport in Neuronen eine Rolle spielt (Maher *et al.*, 2011; Siino *et al.*, 2018). Der sichere Einsatz dieser ASOs für klinischen Studien erfordert weitere Untersuchungen der *off-target*-Effekte.

4.2.2 Mechanismusbezogene Studien zu Antisense-Oligonukleotiden

Um die Interpretierbarkeit und das Verständnis der Ergebnisse zu den bisherigen funktionellen Studien zu erweitern, wurden die Mechanismen untersucht, die der Wirkung der ASOs zugrunde liegen. ASOs wirken über drei mögliche Wege: sterischen Blockade der Translation, Modulation des Spleißens und den RNase H Mechanismus, der hauptsächlich Gapmere betrifft, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (Watts and Corey, 2012). Bereits die Bindung der ASOs an die 5'-UTR von SARS-CoV-2 würde ausreichen, um die Translation zu inhibieren, da die Ribosomen aufgrund der Cap-abhängigen Translation blockiert werden (Vora *et al.*, 2022). Eine potenzielle IRES-gesteuerte Translation ist in dem vorliegenden Testsystem unwahrscheinlich, da die *four-way-junction* des SL5 aufgrund der fehlenden Nsp1-Sequenz (Abb. 3.5) nicht gebildet werden kann (Slobodin *et al.*, 2022).

Da die ASOs in dieser Arbeit als Gapmere synthetisiert wurden, wurde zunächst untersucht, ob die beobachtete Hemmung der Luciferaseaktivität auf einem RNase H-Mechanismus beruht. In Eukaryoten ist besonders die RNase H1 dafür bekannt, RNA-DNA-Duplexe zu erkennen und zu spalten (Crooke, 2008), wobei ihre Hauptaufgabe das Entfernen von Primern im Folgestrang während der DNA-Replikation ist (Bambara *et al.*, 1997). Die RNase H fungiert als Endonuklease und spaltet spezifisch RNA in RNA-DNA-Duplexen, wobei sie zweiwertige Kationen benötigt und Produkte mit 5'-Phosphat- oder 3'-Hydroxytermini erzeugt (Wu *et al.*, 1999). In Bezug auf ASOs spaltet die RNase H1 bevorzugt im Bereich 8-12 Nukleotide 3' vom 5'-RNA-3'-DNA-Terminus eines RNA-DNA-Duplexes, unabhängig davon, ob 5'- oder 3'-RNA- oder DNA-Überhänge vorhanden sind. Der Prozess der Positionsauswahl und der spezifischen Spaltung eines bestimmten Dinukleotids ist komplex und wird von der Sequenz beeinflusst. Studien von Wu *et al.* deuten darauf hin, dass das Enzym eine starke Positionspräferenz für GU-Dinukleotide aufweist (Wu *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist für die Aktivität der RNase H die Anwesenheit einer *minor groove* in der Ziel-mRNA, an der keine 2'-O-Me-Modifizierung vorliegt, notwendig. Sowohl 2'-O-Me als auch PTO-Modifizierungen verringern die Aktivität der RNase H, sind jedoch erforderlich für eine verbesserte Stabilität und Spezifität der ASOs (Crooke, 2008; Wu *et al.*, 1999). Daher ist es für die Effizienz der ASOs von Vorteil Modifikationen im Bereich von 8-12 Nukleotiden vom 3'-Ende gering zu halten und zusätzlich eine Komplementarität zu einer GU-Sequenz aufzuweisen (Lima *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1999). Abbildung 4.1 stellt die nach der obigen Definition potenziellen Spaltstellen der ASOs as203 und as240 mit Pfeilen dar.

Diskussion



Abbildung 4.1 Potenzielle Spaltstellen der ASOs as203 und as240 mittels RNase H. Die potenziellen Spaltstellen der ASOs durch die RNase H sind mit Pfeilen dargestellt. Obere Sequenz: Ziel-mRNA, untere Sequenz: ASO, unterstrichen: 2'O-Me-Modifizierung.

Um zu untersuchen, ob die ASOs nach dem RNase H-Mechanismus wirken können, wurden chemische Modifikationen und Punktmutationen an der RNase H-Erkennungsregion vorgenommen (Tab. 3.5), welche die Erkennung durch die RNase H beeinträchtigen sollten. Ein DLR-Assay (Abb. 3.9) ergab, dass die 2'O-Me-Modifizierungen in der RNase H-Bindestelle die Hemmung der relativen Luciferaseaktivität im Vergleich zu asScr verhinderten. Auch durch die A-zu-U-Substitution an Position 10 und C-zu-A-Substitution an Position 11 wurde für as203Hm eine Hemmwirkung verhindert. Bei as240Hm war eine signifikante Hemmwirkung vorhanden, die jedoch mit 35 % deutlich geringer war als die Hemmwirkung von as240 mit 66 %. Diese Experimente zeigten, dass die ASOs as203 und as240 die Translation der Ziel-mRNA mittels RNase H-Mechanismus hemmen, und dass bei as240 durch die oben genannten Mutationen in der RNase H-Bindestelle die Hemmwirkung nicht vollständig ausbleibt.

Nach Spaltung der RNA durch die RNase H erfolgt in der Regel ein Abbau der Fragmente durch Exonukleasen (Batista-Duharte *et al.*, 2020). Daher wurde einem nächsten Schritt mittels RT-qPCR untersucht, in welchem Verhältnis das Lumineszenzsignal der gebildeten Nanoluciferase zur verbliebenen und akkumulierten mRNA-Kopienzahl steht. Dazu wurde ein Amplifikat im 5'-Bereich von nLuc ausgewählt. Der Versuch wurde bei 50 nM und 100 nM sowohl in HEK239T- als auch in HeLa-Zellen durchgeführt (Abb. 3.11 und Abb. 3.12).

Die Ergebnisse zeigten, dass auf der Proteinebene keine signifikante Zelltypabhängigkeit für die relative nLuc Aktivität besteht, während auf der RNA-Ebene Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen beobachtet werden konnten. Die Reduktion der nLuc-mRNA Akkumulation in den HEK293T-Zellen war unter Zugabe der beiden ASOs as203 oder as240 deutlich schwächer als deren Hemmung der Luciferaseaktivität, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen as203 und as240 vorlagen. In HeLa-Zellen hingegen wurde unter Einfluss von 100 nM as240 die Akkumulation der nLuc-mRNA signifikant reduziert und entsprach dem Verhältnis der Luciferaseaktivität, während as203 in dieser Zelllinie keine signifikante Reduktion der mRNA-Akkumulation hervorrief.

Es wurde bisher bestätigt, dass die RNase H an der Wirksamkeit der ASOs beteiligt ist. Die hohe nLuc-mRNA Akkumulation trotz Einsatz von as203 und as240 kann mit verschiedenen Faktoren zusammenhängen. Zum einen wurde experimentell nicht bestätigt, dass die RNase H tatsächlich eine Spaltung der Ziel-mRNA durchführt, welche die Degradation der Fragmente

einleiten würde (Batista-Duharte *et al.*, 2020). Die bloße Bindung der RNase H an die Zielsequenz könnte die Translation der Nanoluciferase blockieren, jedoch weiterhin die Detektion der mRNA im nLuc-Bereich ermöglichen (El Boujnouni *et al.*, 2023). Um diese Frage zu klären, wäre es notwendig ein Primerpaar zu finden, das die ASO-Bindestellen umfasst. In dieser Arbeit wurde eine Reihe von Primerpaaren in diesem Bereich untersucht, die sich jedoch alle in der Amplifikation als ineffizient erwiesen hatten.

Wenn die RNase H die Ziel-mRNA spaltet, kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass die Degradation beeinträchtigt ist. Diese Theorie wird durch den hohen Faltungsgrad der 5' UTR und der nLuc-Sequenz (Abb. 6.15) gestützt. Stark gefaltete und verzweigte RNA-Sekundärstrukturen sind stabil und schlecht zugänglich für Exonukleasen (Whipple *et al.*, 2011).

Daher sind weitere Studien erforderlich, um den genauen Wirkmechanismus der ASOs detaillierter zu entschlüsseln.

4.2.3 Funktionelle Studien zur Wirksamkeit der siRNAs auf Protein- und RNA-Ebene

Ein Vorteil der Verwendung von ASOs zur Inhibition der Genexpression liegt in ihrer einfachen Anwendung, da sie durch verschiedene chemische Modifikationen (Kap. 1.1.2) besonders stabile Formen annehmen können (Crooke, 2008). Der Einsatz von siRNAs hingegen verspricht eine höhere Effizienz und langfristige Hemmung (Varley and Desaulniers, 2021) sowie ein geringeres Potenzial für *off-target*-Effekte, da sie nur bei vollständiger Komplementarität wirksam werden (Petri and Meister, 2013). Daher wurde auch der Einsatz von siRNAs in den Hemmstudien berücksichtigt. Das Design der siRNAs folgte etablierten Kriterien, die in Kapitel 3.4.2 ausführlich beschrieben sind, nachdem die Sequenzen von den wirksamsten ASOs as203 und as240 abgeleitet wurden. Diese wurden als si203 und si240 bezeichnet.

Alle in dieser Arbeit verwendeten siRNAs waren mit einem 3'-TT-Überhang modifiziert (Elbashir *et al.*, 2001). Dies ist aufgrund der Länge mit dem Risiko weiterer *off-target*-Effekte verbunden. Zudem kann auch der *passenger*-Strang in den RISC eingebaut werden, sodass auch diese *off-target*-Effekte berücksichtigt werden mussten (Wei *et al.*, 2009). Daher wurde eine detaillierte NCBI-BLAST-Analyse durchgeführt (Tab. 3.7), um gravierende *off-target*-Effekte auszuschließen.

Die Analysen sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst. Bei si240.2 handelt es sich um eine mutierte Variante, die in Kapitel 4.2.5 genauer behandelt wurde. Die siRNAs si203a und si240a sind in Kapitel 4.3 relevant und richten sich gegen die 5'-UTR von SARS-CoV-1. Für si203-g und si240-g wurden trotz TT-Überhang keine relevanten *off-target*-Effekte identifiziert. Die entsprechenden *passenger*-Stränge wiesen hingegen jeweils drei *off-target*-Effekte mit mehr als 15 konsekutiv aufeinanderfolgenden Nukleotiden auf. Mit einer Länge von 16 Nukleotiden ist si203-p gegen SMG9 gerichtet. Dieses Gen ist am *nonsense*-vermittelten Abbau von mRNAs mit vorzeitigem Stopcodon beteiligt (Yamashita *et al.*, 2009). Mit einer Länge von 17 Nukleotiden richtet sich si203-p gegen die Gene VWF, LOC128966702 und CLSTN3. Der

Diskussion

VWF ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Hämostase, Blutkoagulation an Wunden und der Zelladhäsion (Xiang and Hwa, 2016). Die Funktion des Lokus LOC128966702 ist hingegen nicht bekannt, während es sich bei CLSTN3 um ein postsynaptisches Adhäsionsmolekül handelt, das an präsynaptische Neurexine bindet, um die Bildung von Synapsen zu vermitteln (Lu *et al.*, 2014). Die siRNA si240-p richtet sich mit einer Übereinstimmung von 15, 16 und 17 Nukleotiden gegen die Gene MTHFSD, MARCHF4 und BRSK2. Bei MTHFSD handelt es sich um ein RNA-Bindeprotein in Motorneuronen (MacNair *et al.*, 2016). MARCHF4 ist eine E3 Ubiquitin-Protein Ligase, das Ubiquitin an Zielsubstrate anfügt und damit die Degradation dieser einleitet. Seine Substrate sind hauptsächlich MHC-I and CD4 (Wang *et al.*, 2022). BRSK2 ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die eine Schlüsselrolle bei der Polarisierung von Neuronen, der Axonogenese, dem Verlauf des Zellzyklus und der Insulinsekretion spielt (Xu *et al.*, 2023). Mit einer Länge von jeweils 16 und 17 konsekutiv aufeinanderfolgenden Nukleotiden zeigten auch si203a-g und si203a-p *off-target*-Effekte gegen die Gene NARS1 und IQCB1. NARS1 katalysiert die Bindung von Asparagin an tRNA und spielt eine wesentliche Rolle bei der Proteinsynthese sowie Entwicklung der Großhirnrinde, indem es für die ordnungsgemäße Proliferation der radialen Gliazellen steuert (Manole *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). IQCB1 ist hauptsächlich an der Ziliengenese beteiligt (Kruczek *et al.*, 2022). Für si240a konnten keine relevanten *off-target*-Effekte identifiziert werden, während si240.2-g eines mit einer Länge von 16 Nukleotiden gegen das Gen MON1B aufweist, welches bisher nur als Onkogen beim Darmkrebs bekannt ist (Jiang *et al.*, 2018).

Da besonders die *seed*-Region, welche die Nukleotide 2 bis 8 vom 5'-Ende des *guide*-Strangs umfasst, an der Erkennung der Zielregion verantwortlich ist, sind besonders solche *off-target*-Bereiche von Bedeutung (Jackson *et al.*, 2006). *Off-target*-Effekte, die jeweils die gesamte *seed*-Region umfassen, richten sich gegen die Gene SMG9, LOC128966702 und MARCHF4. Die Analysen haben ergeben, dass einige bedeutungsvolle *off-target*-Effekte vorliegen, die vor dem klinischen Einsatz der siRNAs eingehendere Untersuchungen erfordern.

Die synthetisierten siRNAs wurden in einem DLR-Assay auf ihre Effizienzen überprüft (Kap. 3.4.2.1), die mittels DW-Analyse bestätigt wurden (Kap. 3.4.2.2). Zudem wurde der Mechanismus mittels RT-qPCR analysiert (Kap. 3.4.2.5). Als Positivkontrolle wurde die siRNA siCoV6 herangezogen, welche gegen die 5'-UTR von SARS-CoV-2 gerichtet ist und sich in Studien von Tolksdorf *et al.* sowohl im Zell- als auch im viralen System als wirksam erwiesen hat (Tolksdorf *et al.*, 2021).

Um Zelllinienabhängigkeiten auszuschließen, wurden die siRNAs auf Proteinebene in verschiedenen Zelllinien verglichen. Bis auf si203 in HEK293T-Zellen führte der Einsatz von 0,1 nM siRNA in HEK293T- und ECV304-Zellen zu keinem signifikanten Hemmeffekt. Bei einer Konzentration von 40 nM konnte jedoch eine starke Hemmwirkung von si203 und si240 beobachtet werden, die größer als die der Positivkontrolle siCoV6 war (Abb. 3.13). Da siCoV6 in HeLa-Zellen etabliert wurde, erfolgte ein weiterer Versuch in dieser Zelllinie (Abb. 3.14). Auch hier lag die Hemmwirkung von si203 und si240 deutlich über der von siCoV6. Diese

hemmte die relative Luciferaseaktivität um nur 55 %, während sie über 80 % Hemmwirkung im Originalversuch zeigte (Tolksdorf *et al.*, 2021). Daher konnte die Hemmwirkung von siCoV6 trotz Einsatz von HeLa-Zellen nicht reproduziert werden. Eine mögliche Ursache könnte daher die Verwendung unterschiedlicher Reportersysteme sein. Die siRNAs si203 und si240 wirkten in dem in dieser Arbeit etablierten Testsystem unabhängig von der Zelllinie und dem Reportersystem deutlich stärker.

Im nächsten Schritt wurde die dosisabhängige Wirkung dieser siRNAs in HEK293T-Zellen untersucht (Abb. 3.15). Die Dosis-Wirkungskurven haben für si203 und si240 jeweils IC_{50} bis maximal 1 nM und I_{max} -Werte von 94 %-96 % ergeben, die auf eine effizientere Wirksamkeit als die der ASOs hindeuten. Die Werte waren in ECV304-Zellen reproduzierbar und zeigten keine Zellabhängigkeit (Abb. 3.16). Zudem wurde sowohl in HEK293T- als auch in HeLa-Zellen die Hemmwirkung auf der RNA-Ebene mit der auf der Proteinebene verglichen. Dazu wurde ein Amplikon im 5'-Bereich der Nanoluciferase untersucht und zeigte, ähnlich wie bei den ASOs, in beiden Zelllinien eine schwächere Hemmwirkung auf RNA-Ebene. Dies konnte auch für siCoV6, die in den HeLa-Zellen mitgetestet wurde, gezeigt werden (Abb. 3.20 und Abb. 3.21).

In der Regel wird eine siRNA nach dem Einschleusen in die Zelle durch den RISC in das Argonaut-Protein geladen und bildet nach dem Abbau des *passenger*-Strangs den reifen RISC-Komplex (MacRae *et al.*, 2008). Der *guide*-Strang erkennt die Ziel-mRNA mit perfekter Sequenzkomplementarität und der RISC spaltet bevorzugt zwischen den Nukleoiden 10 und 11, wobei die höchste Effizienz erzielt wird, wenn sich an Position 10 der mRNA eine Uridinbase befindet (Friedrich and Aigner, 2022; Liu *et al.*, 2004).

Die Hemmung der Translation mit über 90 % kann an der Bindung durch den RISC-Komplex an die Ziel-RNA und der einhergehenden sterischen Blockade liegen. Die hohe Kopienzahl der nLuc-mRNA legt nahe, dass eventuell keine Spaltung durch den RISC stattfindet, obwohl alle eingesetzten siRNAs, bis auf sisc, an Position 10 des *passenger* Strangs eine Uridinbase enthalten und dem RISC damit eine optimale Spaltstelle bieten. Es ist jedoch möglich, dass eine Spaltung stattfindet, der Degradationsprozess der mRNA allerdings beeinträchtigt ist, da die Sekundärstruktur einen hohen Faltungsgrad und folglich eine schlechte Zugänglichkeit für Nukleasen hat (Whipple *et al.*, 2011).

4.2.4 Kombination von oligonukleotidbasierten Wirkstoffen

Bei der Anwendung von oligonukleotidbasierten Wirkstoffen könnte es vorteilhaft sein, nicht nur einzelne ASO oder siRNAs zu verabreichen, sondern einen Cocktail aus mehreren Oligonukleotiden zu verwenden. Diese Hypothese stützt sich auf verschiedenen Studien, die gezeigt haben, dass die Kombination von oligonukleotidbasierten Therapeutika, die auf dasselbe Transkript abzielen, klinische Vorteile bieten kann. Beispielsweise hat eine Kombination von siRNAs, die auf verschiedene Gene von SARS-CoV-2 abzielen, eine verringerte Resistenz und eine höhere Wirksamkeit gegenüber mutierten Varianten erwiesen

(Yogev *et al.*, 2022). Tierstudien haben ebenfalls gezeigt, dass die Kombination von zwei verschiedenen siRNAs, die unterschiedliche Zielregionen im Hepatitis-B-Virus angreifen, zu einer stärkeren Hemmung der Antigenexpression und der viralen Replikation geführt hat, obwohl die Endkonzentration, der für die Therapie verwendeten siRNAs dieselbe blieb. (Li *et al.*, 2014). Bei der Behandlung von Duchenne-Muskeldystrophie konnte eine Kombination von ASOs eine größere Anzahl von Patienten behandeln als die Verwendung einzelner ASOs (Lim *et al.*, 2022). Zudem können ASOs mit unterschiedlichen chemischen Modifikationen eingesetzt werden, um die Schwächen der jeweils anderen auszugleichen, wie beispielsweise bei der Kombination von ASOs der ersten und zweiten Generation (Penchovsky *et al.*, 2024). Yanagidaira *et al.* konnte jedoch auch zeigen, dass Kombinationen von ASO die Hemmung der einzelnen Komponenten negativ beeinflussen können, unabhängig davon, in welchem Abstand die Zielsequenzen der jeweiligen ASOs zueinander lagen (Yanagidaira *et al.*, 2023).

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels DLR-Assay untersucht, ob eine Kombination von ASOs oder siRNAs bei denselben Konzentrationen zu einer verbesserten Wirksamkeit im Vergleich zur Wirksamkeit der einzelnen Komponenten führt. In Abbildung 3.10 ist die Kombination der ASOs as203 und as240 dargestellt. Diese führte zu keinem signifikanten Effekt für as203, während die Wirkung von as240 signifikant verringert wurde. Die Kombination der siRNAs si203 mit si240 ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Die einzelnen Komponenten zeigten dieselbe Hemmwirkung und die Kombination veränderte diese nicht.

Beide Ergebnisse haben gezeigt, dass die Hemmwirkung durch die Kombination der ASOs oder siRNAs nicht verbessert werden konnte. Die Blockierung der Translation ist hier unabhängig davon, ob die Oligonukleotide bei gleichbleibender Konzentration an derselben oder an unterschiedlichen Stellen im Transkript binden. Lediglich as240 wurde durch die ineffizientere Wirkung von as203 negativ beeinflusst.

In weiterführenden Versuchen könnte die kombinierte Hemmwirkung auf der RNA-Ebene untersucht werden, um zu zeigen, ob möglicherweise unterschiedliche Spaltstellen die RNA zugänglicher machen, welches zu einer erhöhten Degradation der mRNA-Transkripte führen. Weiterhin wäre es möglich, eine Kombination der ASOs mit den siRNAs zu untersuchen. Dabei kämen zwei unterschiedlichen Mechanismen zum Einsatz, die sich ergänzen könnten (Lauffer *et al.*, 2024). Studien von Hemmings-Mieszczyk *et al.* haben bereits belegt, dass eine solche Kombination einen positiven Effekt auf die Hemmwirkung der einzelnen Komponenten haben kann (Hemmings-Mieszczyk, 2003).

4.2.5 Einfluss von Punktmutationen auf die Wirksamkeit

Die Kombination der oligonukleotidbasierten Wirkstoffe führte nicht zu einem verbesserten Hemmeffekt und kann somit keinen zusätzlichen Vorteil gegenüber Mutationen bieten. Daher wurde im nächsten Abschnitt der Einfluss von Punktmutationen auf die ASOs und siRNAs untersucht.

Diskussion

Es wird angenommen, dass Oligonukleotide in der Regel die höchste Effizienz aufweisen, wenn sie vollständig komplementär zu ihrer Zielregion sind (Bennett and Swayze, 2010). Studien von Watt *et al.*, zur Wirksamkeit von ASOs, haben gezeigt, dass ihre Aktivität mit einer zunehmenden Anzahl an Fehlpaarungen abnimmt (Watt *et al.*, 2020). Darüber hinaus kann schon eine einzige Fehlpaarung eine signifikante Abnahme der Wirksamkeit erzielen, während ab mehr als zwei Fehlpaarungen die Aktivität vollständig ausbleiben kann (Monia *et al.*, 1996). Besonders interne Fehlpaarungen wirken sich gravierender auf die Effizienz aus als solche in flankierenden Regionen. (Watt *et al.*, 2020).

Ähnlich verhält es sich bei siRNAs, wie durch Studien belegt wurde. Hier nimmt die Wirksamkeit mit zunehmender Anzahl von Mutationen ebenfalls ab, sodass bereits eine einzige Fehlpaarung genügen kann, um die Stabilität der Interaktion zwischen siRNA und Ziel-mRNA zu beeinträchtigen. (Ameres *et al.*, 2007). Der Grad der Beeinträchtigung hängt dabei von der Position der Fehlpaarung ab. Insbesondere in der *seed*-Region, die für die Erkennung der Ziel-mRNA entscheidend ist, sollten Fehlpaarungen vermieden werden (Jackson *et al.*, 2006). Die Position der Fehlpaarungen kann in folgende Kategorien eingeordnet werden: Hohe Toleranz bei Fehlpaarungen an Position 1, 2, 18 oder 19, welche die Wirksamkeit nicht beeinträchtigen; geringe Toleranz bei Fehlpaarungen an Position 5-11, die zur Aufhebung der siRNA-Aktivität führen; mittlere Toleranz für die verbleibenden Positionen (Du *et al.*, 2005). Weiterhin variiert die Toleranz gegenüber verschiedenen Fehlpaarungen, wobei A-C und G-U am besten und A-G am wenigsten in Bezug auf die siRNA-Ziel-mRNA-Interaktion toleriert werden.

Die in dieser Arbeit als effizient identifizierten Oligonukleotide binden an den Positionen 203-222 und 240-259. Obwohl die 5'-UTR von SARS-CoV-2 hoch konserviert ist, haben Analysen gezeigt, dass in diesen Regionen spontane Mutationen wiederholt auftreten und verloren gehen können (Kap. 3.1). Bestimmte Mutationen, wie die C241U-Mutation, können sich jedoch in allen VOCs durchsetzen und etablieren (Amicone *et al.*, 2022; Mishra *et al.*, 2020). Die Mutation C241U befindet sich in einer für diese Arbeit relevanten Zielregion (Abb. 6.2 B).

Um die Auswirkung von Punktmutationen in der Zielregion von as240 und si240 genauer zu untersuchen, wurden verschiedene modifizierte ASOs generiert, die in Kapitel 3.4.2.4 detailliert beschrieben wurden. Zunächst wurde die Punktmutation T253A untersucht, die das Testsystem von der Referenzsequenz unterscheidet (Kap. 3.4). Diese Mutation führt zu einer Fehlpaarung von as240 und si240-g zur Referenzsequenz an der siebten Base vom 5'-Ende aus. Die Mutation würde zu einem A-A *mismatch* führen. Da in der mRNA des Testsystems an dieser Stelle ein U eingebaut war, lag im Experiment mit as240 eine repräsentative T-U Paarung vor. Aus Abbildung 3.18 wurde ersichtlich, dass die Punktmutation in as240m bei niedrigen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Wirksamkeit im Vergleich zu as240 hatte, jedoch ab einer Konzentration von 100 nM signifikant wurde. Für eine effiziente Wirksamkeit im viralen System wäre daher ein Basenaustausch erforderlich.

Abbildung 3.19 veranschaulicht den Einfluss der Punktmutation C241U auf as240 und si240. Da sich an Position 19 von as240 und si240-g vom 5'-Ende aus jeweils eine Guaninbase befindet, würde dieses mit einer Uridinbase in den VOCs fehlpaaren. Die Guaninbase wurde

für as240.2 und si240.2 zu einem Adenin mutiert, sodass diese Fehlpaarung durch A-C repräsentiert wurde. In Bezug auf die siRNA konnte auch hier bei einer Konzentration von 100 nM eine signifikante Reduktion der Wirksamkeit bestätigt werden, die bei as240.2 mit allen Konzentrationen auftrat. Die Wirksamkeit des verkürzten ASOs as242 hingegen war nicht signifikant verringert. Es ist vorteilhaft, dass diese Mutation nicht in der *seed*-Region von si240 liegt und zudem eine A-C- bzw. eine G-U-Paarung im VOC vorliegt. Dies könnte erklären, weshalb die siRNA bei niedrigen Konzentrationen gegenüber dieser Fehlpaarung tolerant ist. Obwohl die Fehlpaarung im flankierenden Bereich liegt und laut Literatur tolerierbar sein sollte, reichte sie aus, um die Wirksamkeit des ASOs signifikant zu verringern. Daher müsste für die Anwendung des ASOs die Base an Position 19 entweder angepasst oder um zwei Basenpaare verkürzt werden.

4.3. Untersuchung der Wirksamkeit der oligonukleotidbasierten Wirkstoffe in einem Replikon-basierten Testsystem

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die oligonukleotidbasierten Wirkstoffe mithilfe eines transienten plasmidbasierten Testsystems untersucht. Diese Untersuchungen ermöglichten erste Einblicke in die Potenz und den Wirkmechanismus der Oligonukleotide sowie deren Interaktion mit der Ziel-mRNA. Im nächsten Schritt wurde ein Replikon-basiertes Testsystem gewählt, welches auch die Translation, Replikation und Erstellung von subgenomischer RNA von Teilen des Virus mit einem Luciferasereporter koppelt und somit den Effekt von Wirkstoffen auf die Vermehrung von SARS-CoV-2 in einem virusnahen Kontext präziser beschreiben kann.

Replikons sind selbstamplifizierende rekombinante Moleküle, die Proteine exprimieren, die für ihre eigene Replikation ausreichen, jedoch keine infektiösen Virionen produzieren, da ihnen Strukturproteine wie das S- oder M-Protein fehlen. Replikons können in Zellen persistieren und werden während der Zellteilung weitergegeben (Hannemann, 2020). Die fehlende Infektiosität bietet im Vergleich zu viralen Assays den Vorteil, unter einfachen Sicherheitsbedingungen arbeiten zu können. Daher wurde das Konzept der Verwendung autonom replizierender RNAs (Replikon-RNAs) in einer Reihe von Virussystemen erforscht und hat zur Entwicklung und Untersuchung antiviraler Wirkstoffe beigetragen (Hertzog *et al.*, 2004).

Ein weiterer Vorteil des Replikonsystems bestand darin, dass die Sekundärstrukturen der 5'-UTR aufgrund der Anwesenheit der Nsp1-Sequenz weitgehend unverändert blieben (Abb. 3.25). Im Gegensatz zum Plasmidsystem blieb der SL5 mit der IRES-ähnlichen *four-way-junction* erhalten, sodass die Wirksamkeit der Oligonukleotide auch an dieser Sekundärstruktur getestet werden konnte.

4.3.1 Quantifizierung des Transkriptionsmechanismus des Replikons

Das in dieser Arbeit eingesetzte Replikonsystem, genannt pHybrid-Replikon, wird durch den CMV-Promoter reguliert und umfasst alle Nsps sowie das N-Protein von SARS-CoV-1, wobei die Nsp5-Sequenz von SARS-CoV-2 abgeleitet ist. Dem ORF1ab ist die Renilla-Luciferase nachgeschaltet (Abb. 3.24). Diese Luciferase ist sowohl im gesamten Transkript als auch im

Diskussion

subgenomischen Transkript vorhanden, sodass Translationsprodukte beider Transkripte mittels DLR-Assay nachgewiesen werden können. Das Replikon spiegelt ein autarkes System wieder, da es das N-Protein enthält, welches als Chaperon die virale RNA-Synthese unterstützt und zudem mit den Nsps 2-16 den für die Replikation notwendigen RTC bildet (Kirchdoerfer and Ward, 2019; Wu *et al.*, 2023b). Das hauptsächlich aus SARS-CoV-1-Sequenzen bestehende System konnte für diese Arbeit verwendet werden, da beide Viren zur selben Spezies (Betacoronavirus) gehören und die 5'-UTR-Sequenzen zu 91 % übereinstimmen (Abdolmaleki *et al.*, 2022). Darüber hinaus ähneln sich die Viren in ihrer Genomzusammensetzung sowie der Funktion ihres Replikationsmechanismus. Die grundlegendsten Unterschiede bestehen in der Rezeptorbindung und dem Einschleusen des Genoms in die Zelle, wobei diese Aspekte für das vorliegende System nicht relevant sind (Rossi *et al.*, 2020).

Hauptverantwortlich für die Transkription von SARS-CoV-1 und -2 ist die virale RdRp, ein hoch prozessives Enzym mit einer Rate von 100 Nukleotiden pro Sekunde (Campagnola *et al.*, 2015). Das 32 kb lange Genom stellt jedoch eine Herausforderung für die Polymerase dar, da bei dieser Länge die Wahrscheinlichkeit für Fehler und Störungen steigt, was zum Abbruch der Transkription führen kann, sodass 3' gelegene Bereiche seltener transkribiert werden (Muniz *et al.*, 2021). Im Replikon trägt zusätzlich der in der regulatorischen Domäne gelegene CMV-Promoter zur Transkription der positiv-Strang mRNAs bei. Dies geschieht in einigen Zelllinien, wie z.B. HEK293T-Zellen, mit vergleichsweise hoher Effizienz (Qin *et al.*, 2010).

In diesem Abschnitt wurde mittels RT-qPCR untersucht, mit welchem Anteil die Transkription des Gesamtlängentranskripts vorzeitig terminiert. Zudem wurde der Einfluss des CMV-Promoters auf die Transkription in HEK293T-Zellen beurteilt. Abbildung 3.27 hatte gezeigt, dass unter Einfluss von *sisc* das Transkript im 5'-UTR signifikant häufiger gebildet wird als das Transkript im 3'-Bereich des ORF1b. Dies bestätigt, dass das Gesamtlängentranskript und damit die Renilla-Luciferase nicht bei jedem Transkriptionszyklus gebildet wird und die Transkription vorzeitig terminiert, während Transkripte in der 5'-UTR mittels RT-qPCR verhältnismäßig häufiger detektiert werden. Dieses Verständnis ist entscheidend für den Vergleich der Genexpression auf Protein- und RNA-Ebene (Kap. 3.5.2 und 3.5.3). Weiterhin führte der Einsatz von *sisc* zu einer Verringerung der Genexpression, was darauf hinweist, dass die Anwesenheit von siRNAs die Genexpression beeinflusst, weshalb *sisc* als Negativkontrolle notwendig war (Lim *et al.*, 2020).

Zur Quantifizierung der CMV-getriebenen Transkription wurden zwei Amplikons verglichen (Abb. 3.28), von denen eines die gesamten Transkripte und das andere die Negativstrangsynthese mittels RdRp wiedergab. Das Experiment ergab, dass die Negativstrangsynthese mittels RdRp nur 11 % der gesamten Transkription ausmacht. Daraus ließ sich schließen, dass die RdRp an etwa 22 % der Synthese des Gesamtlängentranskriptes beteiligt ist, während etwa 78 % der Transkription CMV-gesteuert ist (Kim *et al.*, 2020). Dies erklärt die besonders hohe Kopienzahl der gRNA-Transkripte. Unter dem Einfluss einer siRNA

veränderte sich dieses Verhältnis, wobei der CMV-getriebene Anteil sank, was darauf hindeuten kann, dass die siRNA die Effizienz des Promoters negativ beeinflusst.

Die negativ polarisierten RNA-Transkripte dienen auch der Synthese von sgRNA. Diese machen 55 % der gRNA-Kopien bzw. 36 % der gesamten viralen RNA in einem akut infizierten SARS-CoV-2-Patienten aus (Wölfel *et al.*, 2020). Die Synthese dieser Transkripte erfolgt durch die diskontinuierliche Transkription (Kap. 1.1.3.1). Auch hier lagen ähnliche Verhältnisse zwischen Positiv- und Negativstrang-Transkripten vor. Das Verhältnis von gRNA zu sgRNA lag bei 20:1 im Fall der gesamten Transkripte und bei 15:1 im Fall der RdRp-gerichteten Transkripte. Der vergleichsweise geringe Anteil an sgRNA-Transkripten könnte dadurch erklärt werden, dass nur eine Position für die diskontinuierliche Transkription vorlag (TRS-M), während im viralen System zehn verschiedene existieren, sodass sie dort häufiger synthetisiert werden (Alexandersen *et al.*, 2020).

4.3.2 Funktionelle Studien auf Protein und RNA-Ebene

Im Plasmidsystem (Kap. 3.4) wurde die Wirksamkeit der ASOs und siRNAs auf der RNA- und Proteinebene untersucht. Dabei zeigte sich, dass siRNAs potenter und zuverlässiger wirken, sodass der Schwerpunkt der Untersuchungen im Replikonsystem auf dem Einsatz der siRNAs lag. Da die 5'-UTR im pHybrid-Replikon von SARS-CoV-1 abgeleitet ist, wurde zunächst eine vergleichende Faltungsanalyse (Abb. 3.25) sowie ein Alignment der 5'-UTRs von SARS-CoV-1 und -2 durchgeführt (Abb. 3.26). Diese Analysen ergaben, dass die Zielsequenzen weiterhin zugänglich waren, jedoch zeigten si203 und si240 keine vollständige Komplementarität zur SARS-CoV-1-Zielstruktur. Daher wurden die siRNA-Sequenzen entsprechend angepasst (Tab. 3.9).

In einem ersten Screening wurden die Effekte von si203a, si240a und siCoV6 in HEK293T-Zellen mittels DLR-Assay verglichen (Abb. 3.29). Dabei wiesen alle drei siRNAs eine Hemmwirkung von mehr als 90 % auf. In Kapitel 3.4.2.1 konnte für siCoV6 trotz angepasster Versuchsbedingungen die Hemmwirkung nach Tolksdorf *et al.* nicht reproduziert werden. Im vorliegenden System wies diese siRNA jedoch die stärkste Hemmwirkung auf. Dies deutet darauf hin, dass die Zugänglichkeit der Zielsequenz im Plasmidsystem beeinträchtigt gewesen sein könnte, weshalb die wirksamen Oligonukleotide nur gegen den SL5 gerichtet waren (Abb.3.7). Zudem könnte die Anwesenheit der sgRNA, die auch die Renilla-Luciferase exprimiert und nicht von si203a und si240a, jedoch von siCoV6 targetiert wird, eine Rolle spielen.

In Abbildung 3.30 wurde der RNase H-Mechanismus im Replikonsystem mittels as240m, das in Kapitel 3.4.2.4 zu Untersuchung des Einflusses von Punktmutationen eingesetzt wurde, untersucht. Dieses ASO ist komplementär zu SARS-CoV-1. Es konnte bestätigt werden, dass ASOs in diesem System mittels RNase H agieren können. Darüber hinaus zeigte sich, dass ein ASO gegen die Zielsequenz von siCoV6 deutlich weniger potent ist als die entsprechende

siRNA, was erneut verdeutlicht, dass siRNAs im Allgemeinen potenter sind als ASOs (Singh *et al.*, 2011).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die siRNAs im Replikonsystem eine dosisabhängige Wirksamkeit aufweisen. In HEK293T-Zellen zeigte sich bereits bei niedrigen Konzentrationen ein starker Hemmeffekt, der bei höheren Konzentrationen konstant blieb (Abb. 3.31). Diese Experimente wurden im kleineren Konzentrationsbereich in HuHT7-Zellen wiederholt (Abb. 3.32). In dieser Zelllinie war die Hemmwirkung jedoch schwächer ausgeprägt und stieg ab 3 nM wieder an (Abb. 6.11). In beiden Fällen konnte eine dosisabhängige Wirkung nachgewiesen werden, deren Ausmaß jedoch Zellabhängig war. Ein möglicher Störfaktor, der in diesem System hinzugekommen war, könnte das N-Protein sein. Es wurde nachgewiesen, dass dieses Protein durch seine RNA-Bindungsfähigkeit als viraler Inhibitor von RNAi in Wirtszellen dient (Wu *et al.*, 2023b). Dieser Effekt könnte in HuHT7-Zellen stärker ausgeprägt sein und so die verringerte Wirksamkeit erklären.

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen wurde die Wirksamkeit der siRNAs auf RNA-Ebene untersucht. Auch dieser Versuch wurde zunächst in HEK293T-Zellen durchgeführt (Abb. 3.33). Es wurde beobachtet, dass die Hemmwirkung der sgRNA der auf Proteinebene entspricht, während die Hemmung der gRNA deutlich schwächer ausfiel. In Kapitel 3.5.1 wurde bereits erläutert, dass das hier verwendete Amplikon im 5'-UTR Bereich einerseits vergleichsweise häufig transkribiert wird und andererseits aufgrund der CMV-gerichteten Transkription die Kopienzahl der gRNA besonders hoch ist. Auch für siCoV6, dass die sgRNA fast vollständig unterdrückte, war es bei der eingesetzten Konzentration von 30 nM nicht möglich, die hohe Kopienzahl an gRNA-Transkripten zu mehr als 64 % zu unterdrücken. Im viralen Assay hingegen konnte Tolksdorf *et al.* mit siCoV6 eine Inhibition der viralen Replikation von über 99 % zeigen, sodass dieses Experiment im viralen Assay wiederholt werden müsste.

4.3.3 Die Kombination von siRNAs mit *small molecule antiviral drugs* verstärkt die Wirksamkeit der Inhibitoren

Seit der Entdeckung von Coronaviren wird intensiv an der Entwicklung von Wirkstoffen geforscht, die die Aktivität und Vermehrung dieser Viren eindämmen. Ein Fokus liegt hierbei auf den *small molecules*, die unter anderem spezifisch gegen die *main protease* Mpro gerichtet sind, welche für die proteolytische Verarbeitung der meisten Polyproteinspaltstellen entscheidend ist und die Replikation einleitet (V'kovski *et al.*, 2021). Ein bereits zugelassener Wirkstoff in diesem Bereich ist Paxlovid, eine Kombination aus Ritonavir und Nirmatrelvir, der die Mpro aus SARS-CoV-1 und -2 bindet und inhibiert (Reina and Iglesias, 2022). Neben NMV wurden in dieser Arbeit die *small molecules* 13b-K und ENS eingesetzt. Letzteres ist ein *small molecule*, das reversibel und nicht-kovalent an Mpro bindet und eine Spaltung im aktiven Zentrum auslöst, wodurch das Protein inaktiviert wird (McCarthy, 2022). NMV und 13b-K sind Peptidomimetika, die beide eine kovalente Bindung an den katalytischen Cysteinrest Cys145

Diskussion

der Mpro reversibel eingehen und dadurch die katalytische Aktivität blockieren (Akinosoglou *et al.*, 2022; Cooper *et al.*, 2022).

Eine wesentliche Herausforderung bei der Entwicklung solcher Wirkstoffe ist das Risiko der Resistenzentwicklung. Die aufwendige Entwicklung dieser *small molecules* macht die Anpassung an auftretende Resistenzen zeit- und kostenintensiv. Eine potenzielle Lösung hierfür könnte die Kombination mit siRNAs darstellen. Durch die gleichzeitige Anwendung zweier unterschiedlicher Hemmmechanismen und die einfache Modifizierbarkeit der siRNAs kann Resistenzen effizienter entgegengewirkt werden (Xiao *et al.*, 2017). Weiterhin kann die Kombination von Oligonukleotiden mit bestehenden Wirkstoffen deren Wirksamkeit potenziell steigern (Sabnis, 2021).

Der Replikon-basierte DLR-Assay bietet die Möglichkeit die hemmende Wirkung von gegen Mpro gerichteten Peptidomimetika zusammen mit der hemmenden Wirkung von siRNAs im selben Assay zu untersuchen. Die *small molecules* NMV, ENS und 13b-K wurden mit ihren individuellen IC₅₀ Konzentrationen, die von der AG Hilgenfeld bestimmt wurden (Tab. 3.10), sowie die siRNAs si203 und si240 bei einer Konzentration von 1 nM miteinander verglichen, wobei sisc als interne Kontrolle für die siRNAs diente. Abgesehen von ENS wiesen die *small molecules* und siRNAs ähnliche Hemmwirkungen auf (Abb. 3.34). ENS zeigte bei der eingesetzten Konzentration eine geringere Hemmaktivität, die dennoch über 50 % lag. Daher wurden diese Konzentrationen für die weitere Studien beibehalten, und im nächsten Schritt der Einfluss der Kombination der Wirkstoffe auf die Hemmung untersucht. Jüngste Studien haben gezeigt, dass die Kombination von siRNAs mit anderen Wirkstoffklassen vielversprechende Ergebnisse liefern kann. Insbesondere in der Krebstherapie bietet die Kombination von siRNAs, die Onkogene herunterregulieren, mit Chemotherapeutika einen vielversprechenden Ansatz (Kumar *et al.*, 2022). Eine Studie von Katuwal *et al.* zeigte, dass der Einsatz von siRNAs in Kombination mit einem Chemotherapeutikum die Wirksamkeit der Therapie verbessern kann (Katuwal *et al.*, 2023). Auch in der virologischen Anwendung hat die Kombination von siRNAs mit *small molecules* erste Erfolge gezeigt. Insbesondere in klinischen Studien gegen Hepatitis B konnte der Virustiter signifikant reduziert werden (Sabnis, 2021).

Eine Kombination der drei Wirkstoffe mit den siRNAs zeigte, dass sowohl die Wirksamkeit der siRNAs als auch die der *small molecules* durch die Kombination der jeweiligen Wirkstoffe signifikant verbessert wurde, wobei der größte Effekt bei der Kombination von NMV mit si240a beobachtet wurde (Abb. 3.35). Anschließend wurde die Kombination der Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Akkumulation genomischer und subgenomischer RNA untersucht (Abb. 3.36). Es zeigte sich, dass die Wirkung auf RNA-Ebene sowohl für die gRNA als auch für die sgRNA ähnlich wie auf der Proteinebene war, wobei auffiel, dass die Hemmwirkung von 13b-K trotz hoher Konzentration am geringsten ausfiel, weshalb dieser Wirkstoff für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde. Zudem war die Hemmwirkung von ENS auf RNA-Ebene signifikant geringer als auf Proteinebene, jedoch zeigte die Kombination mit si240a eine um 6 % (gRNA) und 7 % (sgRNA) signifikant stärkere Hemmung als die Kombination von si240a mit NMV. In Kapitel 3.5.3 wurde die Aktivität der

Diskussion

siRNAs mit dem pHybrid-Replikon auf RNA-Ebene in HEK293T-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zu HuHT7-Zellen die Hemmwirkung auf gRNA-Ebene nicht mit der Hemmwirkung auf sgRNA-Ebene oder der auf Proteinebene übereinstimmte. Dies könnte auf die Aktivität des CMV-Promoters zurückgeführt werden, der nachgewiesen in HEK293T-Zellen eine vergleichsweise hohe Effizienz aufweist (Qin *et al.*, 2010), während dieser Effekt in HuHT7-Zellen nicht beobachtet werden konnte. Durch das Ausbleiben der hohen CMV-Aktivität erscheint die HuHT7-Zelllinie geeigneter und repräsentativ für Studien zum pHybrid-Replikon.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von NMV und ENS bei gleichbleibender Konzentration auf die Dosisabhängigkeit der siRNAs untersucht (Abb. 3.37, 3.38 und Tab. 6.1). Hierbei führte die Zugabe von NMV für beide siRNAs zu einer reproduzierbaren Verbesserung der IC_{50} (um bis zu einer logarithmischen Stufe) und I_{max} -Werte (um bis zu 23 %), während die Verbesserung durch ENS für si203a nicht reproduzierbar war und bei si240a schlechter abschnitt als NMV.

Die höhere Effizienz durch die Kombination der Wirkstoffe konnte sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene beobachtet werden. Die Bindung der *small molecules* an Mpro zu Beginn des Replikationszyklus führt zu einer verminderten Anzahl an RdRp, da deren Prozessierung eingeschränkt wird (Zhao *et al.*, 2022). Die folglich reduzierte Menge an genomischen Transkripten kann von den siRNAs gebunden werden und verhindert deren Translation (inklusive der Bildung der RdRp) und reduziert somit auch die Bildung von sgRNA. Lediglich die bereits gebildeten sgRNAs können nicht mehr inhibiert werden (Alexandersen *et al.*, 2020), da ihnen aufgrund der diskontinuierlichen Transkription die Bindungsstellen für die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs si203 und si240 fehlen. Zum besseren Verständnis des Mechanismus, könnte der Versuch mit einer siRNA, die in der *Leaderregion* (Pos. 14-75) bindet, wiederholt werden.

Um die Wirksamkeit der der siRNAs mit NMV und ENS einzeln und in Kombination in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen, wurde die Hemmwirkung auf Proteinebene über einen Zeitraum von 48 h bis 96 h in 24 h-Intervallen analysiert (Kap. 3.5.4.4).

Der Einbau der siRNAs in den RISC (Kap. 1.2.3) erhöht ihre Resistenz gegenüber dem Abbau durch Nukleasen, was die Halbwertszeit verlängert, sodass diese mehrere Tage umfassen kann (Bartlett, 2006). Der Wirkstoff NMV kann im lebenden Organismus bis zu 6 h stabil sein, während ENS eine Halbwertszeit von bis zu 59 h aufweisen kann (W. Chen *et al.*, 2023; Shimizu *et al.*, 2023), wobei keine entsprechenden Daten zu Zellkultursystemen vorliegen. Daher wurde in einem Experiment (Abb. 3.39) untersucht, über welchen Zeitraum die Wirkstoffe eine konsistente und stabile Hemmwirkung aufweisen, oder ob diese im Verlauf abnimmt. Darüber hinaus war es von Interesse, ob eine kombinierte Anwendung der Wirkstoffe die Dauer der Hemmwirkung verlängern kann.

Erste Versuche zeigten, dass die Hemmwirkung der Inhibitoren über die Zeit abnahm, während eine Kombination diesen Prozess verlangsamen konnte. Besonders die Kombination von si240a mit NMV und ENS führte zu einer effizienten Hemmwirkung über 96 h. Diese Wirkung konnte für den Zeitpunkt 96 h nach Transfektion jedoch nicht reproduziert werden (Abb. 3.39 C).

Trotz der hohen Potenz von NMV und ENS besteht aufgrund der schnellen Ausbreitung von SARS-CoV-2 und seiner hohen Mutationsrate ein erhebliches Risiko für die Entwicklung von Resistenzen. Studien haben gezeigt, dass Punktmutationen in der Mpro-Sequenz, die bereits in den VOCs etabliert sind, die Wirksamkeit von NMV und ENS beeinträchtigen können. Insbesondere die Punktmutationen G143S, Q189K und S144A sind dafür bekannt die Wirksamkeit von NMV zu verringern (Duan *et al.*, 2023; Havranek *et al.*, 2023). Während Q189K keine verminderte Hemmwirkung bei ENS verursacht, führen die Mutationen S144A, M49I, G143S und R188S zu einer reduzierten Wirksamkeit (Moghadas *et al.*, 2023; Noske *et al.*, 2023). In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit der siRNAs und *small molecules* mit pHybrid-Replikons, die entweder die Mutation S144A oder Q189K tragen, untersucht (Abb. 3.40). Es zeigte sich, dass die in den Studien beobachtete, reduzierte Hemmwirkung in den vorliegenden mutierten Replikonsystemen nicht reproduziert werden konnten. Daher sind diese Ergebnisse nicht mit den Literaturdaten vergleichbar. Die Enzym-Assays von Noske *et al.* fanden *in-vitro* statt, während Moghadasi *et al.* ein Plasmid-Reporterassay in 293T-Zellen anwendete, sodass für weitere Versuche, die Bedingungen an die Literatur angepasst werden müssten.

Zudem konnte beobachtet werden, dass die Genexpression im Allgemeinen durch die Mutation S144A erhöht war (Abb. 6.17), was darauf hindeutet, dass diese Mutation die Effizienz der Protease im Replikon steigert. Studien konnten jedoch zeigen, dass diese Mutation die Replikationseffizienz verringert (Costacurta *et al.*, 2023).

Die Ergebnisse haben insgesamt gezeigt, dass die Kombination der Wirkstoffe die Hemmwirkungen signifikant verbessert, und insbesondere die Kombination von NMV mit si240a eine starke Hemmung bewirkt. Da jedoch die Konzentration von ENS niedrig war, könnten weitere Versuche mit höheren Konzentrationen durchgeführt werden, um möglicherweise ähnliche Ergebnisse wie für NMV zu erzielen. Dies geht einher mit der Anwendung bei Patienten, bei denen für die erstmalige Einnahme 300 mg Nirmatrelvir in Kombination mit 100 mg Ritonavir empfohlen wird oder 375 mg beim Einsatz von Ensitrelvir (Lamb, 2022; Yotsuyanagi *et al.*, 2024).

4.4. Anwendung der hier etablierten Methoden zur schnelleren Wirkstoffentwicklung gegen andere Viren

Das West-Nil-Virus (WNV) gehört zur Familie der Flaviviridae, die wie Coronaviren durch ein positiv polarisiertes, einzelsträngiges RNA-Genom charakterisiert ist. In den letzten Jahrzehnten haben Flaviviren mehrfach unerwartete Epidemien in menschlichen Populationen ausgelöst, darunter das Dengue-Virus, das West-Nil-Virus und das Zika-Virus (Diamond, 2009). Flaviviren sind weltweit verbreitet und infizieren jährlich bis zu 400 Millionen Menschen. Eine Infektion kann zu Hepatitis, vaskulärem Schocksyndrom, Enzephalitis, akuter Lähmung, angeborener Missbildungen und fötalem Tod führen (Pierson and Diamond, 2020). Im Gegensatz zu anderen Flaviviren wurde gegen das WNV bisher kein Impfstoff entwickelt.

Es gibt jedoch einige Ansätze zur Therapie mit oligonukleotidbasierten Wirkstoffen, von denen sich noch keiner in der klinischen Phase befindet (Deas *et al.*, 2005).

Die 3'-UTR des WNV enthält hochkonservierte Strukturen und ist an der Bildung subgenomischer Flavivirus-RNA (sfRNA) beteiligt. Diese Strukturen helfen dem Virus, sich der Immunantwort des Wirtes zu entziehen und beeinflussen somit die virale Pathogenese (Slonchak and Khromykh, 2018). Es wurde gezeigt, dass sowohl die 3'-UTR als auch die 5'-UTR für die virale Replikation und die Immunmodulation von Bedeutung sind. Beide Regionen enthalten *conserved sequences*, die für die Zyklisierung des Genoms und damit für die Initiierung der RNA-Synthese unerlässlich sind (Huston *et al.*, 2024). Aus diesem Grund wurden diese beiden Regionen als Zielsequenzen für die Entwicklung oligonukleotidbasierter Wirkstoffe ausgewählt.

Für diese Zielregion wurde zunächst die Sekundärstruktur mittels mfold-Analyse vorhergesagt und anhand der in Kapitel 3.2 etablierten Kriterien zwölf Zielregionen (T1-T12) definiert (Abb. 3.42). Anschließend erfolgte der Entwurf der ASOs gegen diese ausgewählten Zielsequenzen anhand der Kriterien in Kapitel 3.3 (Tab. 3.11). Alternativ hätte auch die Entwicklung von siRNAs nach den Kriterien aus Kapitel 3.4.2 erfolgen können. Aus einem Pool von über 200 initial generierten ASOs wurden nach Anwendung weiterer Kriterien 91 ausgewählt, deren Anzahl nach NCBI-BLAST-Analyse auf zehn reduziert wurde. Diese ausgewählten ASO-Sequenzen wiesen keine relevanten *off-target*-Effekte gegen das kodierende Genom des Menschen auf.

Bis auf as14,21 sind alle ASOs gegen die Zielregion T7 gerichtet. Die Blockierung der hoch konservierten 5'-CS könnte die Zyklisierung des Genoms und damit die Replikation verhindern (Basu and Brinton, 2011). Im nächsten Schritt müssten die ASOs synthetisiert, chemisch modifiziert und anschließend auf ihre Wirksamkeit, beispielsweise in einem einfachen Plasmidsystem, untersucht werden. Aus diesem Kapitel geht hervor, dass anhand der in dieser Arbeit etablierten Kriterien oligonukleotidbasierte Wirkstoffe für verschiedene Viren mit einfachen Mitteln entworfen werden können und daher einen vielversprechenden Ansatz zur Bekämpfung von Pandemien bieten. Die einfache und schnelle Synthese sowie Modifizierbarkeit ermöglicht zudem eine rasche Reaktion auf mutierte Virusvarianten (Karaki *et al.*, 2019).

4.5. Einfluss des uORFs auf die Translation im Plasmidsystem

Die 5'-UTR vieler viraler Genome umfasst einen uORF, der als cis-regulierendes Element die Translation des *downstream* ORFs reguliert und in den meisten Fällen hemmt. Die Hemmung erfolgt indem das Ribosom beim Scannen der mRNA am Stopcodon dieses uORFs zum Stehen kommt und vom Genom dissoziiert (Akulich *et al.*, 2019). Der uORF von SARS-CoV-2 hat die Besonderheit, das unmittelbar 3' des Stopcodons ein weiteres Stopcodon folgt, sodass die Wahrscheinlichkeit für die Dissoziation des Ribosoms vom Genom erhöht wird.

Diskussion

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Hemmung der Genexpression durch die oligonukleotidbasierten Wirkstoffe lag, war es sinnvoll den oben genannten Mechanismus besser zu verstehen.

Das Startcodon des uORFs liegt in der *Loopregion* von SL4 (Abb. 3.22). Dieser *Stem-Loop* wurde im MHV (*Mouse Hepatitis Virus*), das als Betacoronavirus große Ähnlichkeiten zum Genom von SARS-CoV-2 aufweist, intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der SL4 eine wesentliche Rolle bei der Transkription des Genoms sowie bei der Produktion von sgRNAs spielt (Rangan *et al.*, 2021). Weiterhin wurde durch Studien belegt, dass der uORF tatsächlich erkannt und translatiert wird, wobei ein Peptid aus neun Aminosäuren entsteht, dessen Funktion jedoch noch unklar ist. Zudem konnte durch Mutationen im Startcodon (AUG zu UAA) und Deletion des Stopcodons des uORFs die Translationseffizienz des *downstream* ORFs erhöht werden (Condé *et al.*, 2022). Aus diesen Gründen wurden in Kapitel 3.4.3 erste Experimente durchgeführt, um den Einfluss des uORFs auf die Genexpression zu untersuchen. Aus Abbildung 3.23 kann entnommen werden, dass die Mutation im Startcodon die Translationseffizienz nicht erhöhte, sondern bei hohen Konzentrationen zum Teil signifikant verringerte (Abb. 3.23 B). Diese Ergebnisse stehen in Konflikt mit den Beobachtungen von Condé *et al.*, die eine leichte Erhöhung der Genexpression durch die Mutationen im Start- und Stopcodon des uORFs beobachten konnten, wobei in diesem Fall zusätzlich das Stopcodon mutiert war (Condé *et al.*, 2022). Zum Translationsprozess ist bereits bekannt, dass sowohl die 5'-Cap-Struktur als auch der eukaryotische Initiationsfaktor 4F (eIF4F)-Komplex, bestehend aus eIF4E, eIF4G und eIF4A, erforderlich sind, um diesen zu initiieren (Korneeva *et al.*, 2023). Dieser Cap-abhängige Mechanismus legt nahe, dass das Ribosom die gesamte 5'-UTR abscannen muss, um das Startcodon des *downstream* ORFs zu erreichen. Eine Veränderung der Translationseffizienz durch Mutationen im uORF könnte diesen Mechanismus bestätigen. Alternativ könnte auch die Abwesenheit des Peptids, das aus dem uORF translatiert wird, zu den beobachteten Effekten führen. Um diesen Mechanismus weiter zu untersuchen, könnte das Replikonsystem herangezogen werden, wobei sowohl das Start- als auch das Stopcodon mutiert werden sollten, um eine Dissoziation des Ribosoms vor Erreichen des *downstream* ORFs zu verhindern. Darüber hinaus könnte in diesem System der Einfluss auf die Transkription der sgRNAs untersucht werden, die durch Veränderungen im SL4 potenziell beeinflusst wird.

4.6. Fazit und Ausblick

In Rahmen dieser Arbeit wurden Kriterien zum zielstrukturbasierten Design von oligonukleotidbasierten Wirkstoffen etabliert und anhand dieser Kriterien spezifische ASOs und siRNAs gegen die 5'-UTR von SARS-CoV-2 entwickelt.

In-silico-Analysen zeigten, dass die 5'-UTR von SARS-CoV-2 auch in den VOCs im Vergleich zum gesamten Genom hoch konserviert ist und sich bisher nur die Varianten C241U und C44U manifestieren konnten, wobei die genauen Auswirkungen dieser Varianten auf die Pathogenität des Virus weiteren Untersuchungen bedürfen. Nach einer detaillierten Analyse der

Diskussion

Sekundärstruktur konnten Zielsequenzen identifiziert werden und gegen diese spezifische ASOs und siRNAs entworfen werden. Die Wirksamkeit der ASOs wurde zunächst in einem plasmidbasierten Reporter-gen-Assay verglichen und hinsichtlich ihrer Dosisabhängigkeit untersucht. Dabei wurden die wirksamsten ASOs selektiert und anhand ihrer Sequenzen siRNAs abgeleitet, die sich nach funktionellen Studien auf Proteinebene ebenfalls als wirksam erwiesen haben. Die Wirkung der ASOs und siRNAs fiel auf der RNA-Ebene schwächer aus. Daher muss in zukünftigen Studien geklärt werden, ob trotz RNase H-Mechanismus für die ASOs und der optimalen RISC-Erkennungsstelle der siRNAs nach Bindung an die Zielregion eine Spaltung dieser Region erfolgt, oder ob der Nuklease-gerichtete Abbau der mRNAs beeinträchtigt wird, wodurch die mRNA in den Zellen akkumulieren könnte.

Eine Kombination der ASOs sowie siRNAs auf Proteinebene hatte nicht zu einer Verbesserung der Hemmwirkung beigetragen, wobei nun die Reproduktion auf RNA-Ebene notwendig ist, um diesen Effekt zu bestätigen. Weiterhin wäre die Kombination der beiden Wirkstoffklassen miteinander sinnvoll, um aufschlussreiche Ergebnisse zum Mechanismus zu liefern. Die Kombination der ASOs mit den siRNAs und damit die Kombination des RNase H-Mechanismus mit dem RISC-Mechanismus, könnte zudem zu einer Verstärkung der Hemmwirkung führen (Hemmings-Mieszczyk, 2003). Die Untersuchung des Einflusses von Punktmutationen in der Zielregion auf die Wirksamkeit der Oligonukleotide zeigte, dass die Wirksamkeit durch die Punktmutationen vor allem bei höheren Konzentrationen beeinträchtigt wurde und die Oligonukleotidsequenzen für die Anwendung im viralen System an die entsprechenden Zielregionen angepasst werden sollten. Darüber hinaus erfordert der sichere Einsatz der Oligonukleotide eine eingehendere Untersuchung der *off-target*-Effekte.

Vor dem Einsatz der Oligonukleotide im Replikonsystem wurde mittels RT-qPCR die Transkriptionseffizienz sowie der Einfluss des CMV-Promoters analysiert. Basierend auf den Erkenntnissen wurde die Wirksamkeit der siRNAs im Replikonsystem auf Proteinebene sowie deren Dosisabhängigkeit bestätigt. Auf RNA-Ebene wurde beobachtet, dass zelllinienabhängige Unterschiede in der gRNA-Expression vorlagen, die auf eine Zelllinien-spezifische CMV-Promoter-Effizienz zurückzuführen waren.

Die Kombination der siRNAs mit *small molecules* zeigte insgesamt eine Verbesserung der Hemmwirkung für beide Wirkstoffklassen, wobei der Effekt von NMV in Kombination mit si240a am größten war. Da der verwendete IC₅₀ von ENS im Vergleich zu NMV niedriger ist, wäre es sinnvoll, die Experimente mit ENS bei einer Konzentration von 140 µM (entsprechend dem IC₅₀ von NMV) zu reproduzieren. Dies würde ermöglichen, zu untersuchen, ob die hemmende Wirkung in Kombination mit den siRNAs vergleichbare oder möglicherweise stärkere Effekte im Vergleich zur Anwendung von NMV erzielt.

Die verringerte Hemmwirkung der *small molecules* auf die mutierten Mpro-Varianten konnte in dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht gezeigt werden, weshalb hierfür eine Reproduktion des Experimentes in einem an die Versuche von Duan *et al.* und Noske *et al.* angepassten Testsystem erforderlich wäre (Duan *et al.*, 2023; Noske *et al.*, 2023).

Diskussion

Schließlich wurden die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse am Beispiel des WNV angewendet und mit wenig Zeit- und Ressourcenaufwand mittels *in-silico* Methoden 10 ASOs gegen die 3'- und 5'-UTR dieses Virus entwickelt. In zukünftigen Studien könnten anhand der vorliegenden Daten zunächst Hemmstudien in einem plasmidbasierten Testsystem durchgeführt werden, indem die Hemmung der 10 ASOs *in-vitro* auf Protein- und RNA-Ebene untersucht werden könnte. Wirksame ASOs könnten weiterführend im viralen System untersucht werden.

In einem Exkurs wurde festgestellt, dass eine Mutation im Startcodon des uORFs die Translationseffizienz von SARS-CoV-2 nicht verstärkte. Um diesen Mechanismus genauer zu verstehen, müsste das Testsystem an das von Condé *et al.* angepasst werden und zusätzlich das Stopcodon mutiert werden (Condé *et al.*, 2022). Zudem wäre es sinnvoll die Expression der sgRNA zu berücksichtigen, die durch den SL4 potenziell beeinflusst wird.

Zusammenfassend ist es in dieser Arbeit gelungen mithilfe eines zielstrukturbasierten Ansatzes wirksame ASOs und siRNAs zu entwickeln, welche gezielt Sequenzbereiche der 5'-UTR von SARS-CoV-2 binden und dabei die Genexpression im plasmidbasierten sowie Replikonbasierten Testsystem hemmen. Im nächsten Schritt ist eine Untersuchung der Hemmwirkung in einem viralen System erforderlich, das sowohl den Einfluss aller viraler Faktoren als auch die Verpackung von Virionen berücksichtigt. Bei Nachweis einer potenten Wirksamkeit könnten diese Hemmstoffe in Tiermodellen oder klinischen Studien eingesetzt werden.

5. Literaturverzeichnis

Abdolmaleki, G., Taheri, M.A., Paridehpour, S., Mohammadi, N.M., Tabatabaei, Y.A., Mousavi, T., Amin, M., 2022. A comparison between SARS-CoV-1 and SARS-CoV2: an update on current COVID-19 vaccines. *DARU J Pharm Sci* 30, 379–406. <https://doi.org/10.1007/s40199-022-00446-8>

Acsadi, G., Crawford, T.O., Müller-Felber, W., Shieh, P.B., Richardson, R., Natarajan, N., Castro, D., Ramirez-Schrempp, D., Gambino, G., Sun, P., Farwell, W., 2021. Safety and efficacy of nusinersen in spinal muscular atrophy: The EMBRACE study. *Muscle and Nerve* 63, 668–677. <https://doi.org/10.1002/mus.27187>

Adamczyk, Z., Batys, P., Barbasz, J., 2021. SARS-CoV-2 virion physicochemical characteristics pertinent to abiotic substrate attachment. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 55, 101466. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101466>

Akinc, A., Maier, M.A., Manoharan, M., Fitzgerald, K., Jayaraman, M., Barros, S., Ansell, S., Du, X., Hope, M.J., Madden, T.D., Mui, B.L., Semple, S.C., Tam, Y.K., Ciufolini, M., Witzigmann, D., Kulkarni, J.A., Van Der Meel, R., Cullis, P.R., 2019a. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat. Nanotechnol.* 14, 1084–1087. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-yc>

Akinc, A., Maier, M.A., Manoharan, M., Fitzgerald, K., Jayaraman, M., Barros, S., Ansell, S., Du, X., Hope, M.J., Madden, T.D., Mui, B.L., Semple, S.C., Tam, Y.K., Ciufolini, M., Witzigmann, D., Kulkarni, J.A., Van Der Meel, R., Cullis, P.R., 2019b. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat. Nanotechnol.* 14, 1084–1087. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>

Akinosoglou, K., Schinas, G., Gogos, C., 2022. Oral Antiviral Treatment for COVID-19: A Comprehensive Review on Nirmatrelvir/Ritonavir. *Viruses* 14, 2540. <https://doi.org/10.3390/v14112540>

Akita, H., Ishiba, R., Hatakeyama, H., Tanaka, H., Sato, Y., Tange, K., Arai, M., Kubo, K., Harashima, H., 2013. A Neutral Envelope-Type Nanoparticle Containing pH-Responsive and SS-Cleavable Lipid-Like Material as a Carrier for Plasmid DNA. *Adv Healthcare Materials* 2, 1120–1125. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200431>

Akulich, K.A., Sinitcyn, P.G., Makeeva, D.S., Andreev, D.E., Terenin, I.M., Anisimova, A.S., Shatsky, I.N., Dmitriev, S.E., 2019. A novel uORF-based regulatory mechanism controls translation of the human MDM2 and eIF2D mRNAs during stress. *Biochimie* 157, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.005>

Alexandersen, S., Chamings, A., Bhatta, T.R., 2020. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat Commun* 11, 6059. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19883-7>

Alshaer, W., Zureigat, H., Al Karaki, A., Al-Kadash, A., Gharaibeh, L., Hatmal, M.M., Aljabali, A.A.A., Awidi, A., 2021. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *European Journal of Pharmacology* 905, 174178. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174178>

Ameres, S.L., Martinez, J., Schroeder, R., 2007. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell* 130, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.037>

Amicone, M., Borges, V., Alves, M.J., Isidro, J., Zé-Zé, L., Duarte, S., Vieira, L., Guiomar, R., Gomes, J.P., Gordo, I., 2022. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental

evolution. *Evolution, Medicine, and Public Health* 10, 142–155. <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>

Amiri, A., Barreto, G., Sathyapalan, T., Sahebkar, A., 2021. siRNA Therapeutics: Future Promise for Neurodegenerative Diseases. *Curr Neuropharmacol* 19, 1896–1911. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210402104054>

An, G., 2024. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of GalNAc-Conjugated siRNAs. *The Journal of Clinical Pharma* 64, 45–57. <https://doi.org/10.1002/jcph.2337>

Anderson, E.J., Roupahel, N.G., Widge, A.T., Jackson, L.A., Roberts, P.C., Makhene, M., Chappell, J.D., Denison, M.R., Stevens, L.J., Pruijssers, A.J., McDermott, A.B., Flach, B., Lin, B.C., Doria-Rose, N.A., O'Dell, S., Schmidt, S.D., Corbett, K.S., Swanson, P.A., Padilla, M., Neuzil, K.M., Bennett, H., Leav, B., Makowski, M., Albert, J., Cross, K., Edara, V.V., Floyd, K., Suthar, M.S., Martinez, D.R., Baric, R., Buchanan, W., Luke, C.J., Phadke, V.K., Rostad, C.A., Ledgerwood, J.E., Graham, B.S., Beigel, J.H., 2020. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med* 383, 2427–2438. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028436>

Aviner, R., Lidsky, P.V., Xiao, Y., Tasseto, M., Zhang, L., McAlpine, P.L., Elias, J., Frydman, J., Andino, R., 2023. SARS-CoV-2 Nsp1 regulates translation start site fidelity to promote infection. *bioRxiv* 2023.07.05.547902. <https://doi.org/10.1101/2023.07.05.547902>

Bäck, S., Dossat, A., Parkkinen, I., Koivula, P., Airavaara, M., Richie, C.T., Chen, Y.-H., Wang, Y., Harvey, B.K., 2019. Neuronal Activation Stimulates Cytomegalovirus Promoter-Driven Transgene Expression. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 14, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.06.006>

Bai, C., Zhong, Q., Gao, G.F., 2022. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Sci. China Life Sci.* 65, 280–294. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>

Bai, Z., Cao, Y., Liu, W., Li, J., 2021. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses* 13, 1115. <https://doi.org/10.3390/v13061115>

Balakrishnan, V.S., 2020. The arrival of Sputnik V. *The Lancet Infectious Diseases* 20, 1128. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30709-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30709-X)

Bambara, R.A., Murante, R.S., Henricksen, L.A., 1997. Enzymes and reactions at the eukaryotic DNA replication fork. *J Biol Chem* 272, 4647–4650. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.4647>

Banerjee, A.K., Blanco, M.R., Bruce, E.A., Honson, D.D., Chen, L.M., Chow, A., Bhat, P., Ollikainen, N., Quinodoz, S.A., Loney, C., Thai, J., Miller, Z.D., Lin, A.E., Schmidt, M.M., Stewart, D.G., Goldfarb, D., De Lorenzo, G., Rihn, S.J., Voorhees, R.M., Botten, J.W., Majumdar, D., Guttman, M., 2020. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell* 183, 1325–1339.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.004>

Bansal, K., Kumar, S., 2022. Mutational cascade of SARS-CoV-2 leading to evolution and emergence of omicron variant. *Virus Research* 315, 198765. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198765>

Bartlett, D.W., 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Research* 34, 322–333. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj439>

Basu, M., Brinton, M.A., 2011. West Nile virus (WNV) genome RNAs with up to three adjacent mutations that disrupt long distance 5'-3' cyclization sequence basepairs are viable. *Virology* 412, 220–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.008>

Batista-Duharte, A., Sendra, L., Herrero, M., Téllez-Martínez, D., Carlos, I., Aliño, S., 2020. Progress

Literaturverzeichnis

in the Use of Antisense Oligonucleotides for Vaccine Improvement. *Biomolecules* 10, 316. <https://doi.org/10.3390/biom10020316>

Belgrad, J., Fakih, H.H., Khvorova, A., 2024. Nucleic Acid Therapeutics: Successes, Milestones, and Upcoming Innovation. *Nucleic Acid Therapeutics* 34, 52–72. <https://doi.org/10.1089/nat.2023.0068>

Belter, A., Rolle, K., Piwecka, M., Fedoruk-Wyszomirska, A., Naskręt-Barciszewska, M.Z., Barciszewski, J., 2016. Inhibition of miR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids. *Sci Rep* 6, 24516. <https://doi.org/10.1038/srep24516>

Beninger, P., 2023. Drug-drug Interactions: An Overlooked Dimension of the COVID-19 Pandemic. *Clin Ther* 45, 387–388. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2023.04.008>

Bennett, C.F., Swayze, E.E., 2010. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 259–293. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654>

Bhatt, P.R., Scaiola, A., Loughran, G., Leibundgut, M., Kratzel, A., Meurs, R., Dreos, R., O'Connor, K.M., McMillan, A., Bode, J.W., Thiel, V., Gatfield, D., Atkins, J.F., Ban, N., 2021. Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science* 372, 1306–1313. <https://doi.org/10.1126/science.abf3546>

Bills, C., Xie, X., Shi, P.-Y., 2023. The multiple roles of nsp6 in the molecular pathogenesis of SARS-CoV-2. *Antiviral Res* 213, 105590. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105590>

Bloyd, M., Settas, N., Faucz, F.R., Sinaii, N., Bathon, K., Iben, J., Coon, S., Caprio, S., Stratakis, C.A., London, E., 2021. The PRKAR1B p.R115K Variant is Associated with Lipoprotein Profile in African American Youth with Metabolic Challenges. *Journal of the Endocrine Society* 5, bvab071. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvab071>

Bobbin, M.L., Burnett, J.C., Rossi, J.J., 2015. RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection. *Genome Med* 7, 50. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0174-y>

Boson, B., Legros, V., Zhou, B., Siret, E., Mathieu, C., Cosset, F.-L., Lavillette, D., Denolly, S., 2021. The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. *J Biol Chem* 296, 100111. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016175>

Braga, A.C.S., Carneiro, B.M., Batista, M.N., Akinaga, M.M., Rahal, P., 2017. Inhibition of hepatitis C virus using siRNA targeted to the virus and Hsp90. *Cell Stress Chaperones* 22, 113–122. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0747-8>

Brant, A.C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., Zheng, Z.-M., 2021. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci* 11, 136. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>

Burbano, L.E., Li, M., Jancovski, N., Jafar-Nejad, P., Richards, K., Sedo, A., Soriano, A., Rollo, B., Jia, L., Gazina, E.V., Piltz, S., Adikusuma, F., Thomas, P.Q., Kopsidas, H., Rigo, F., Reid, C.A., Maljevic, S., Petrou, S., 2022. Antisense oligonucleotide therapy for KCNT1 encephalopathy. *JCI Insight* 7, e146090. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.146090>

Campagnola, G., McDonald, S., Beaucourt, S., Vignuzzi, M., Peersen, O.B., 2015. Structure-function relationships underlying the replication fidelity of viral RNA-dependent RNA polymerases. *J Virol* 89, 275–286. <https://doi.org/10.1128/JVI.01574-14>

Campos, J.H.C., Maricato, J.T., Braconi, C.T., Antoneli, F., Janini, L.M.R., Briones, M.R.S., 2021.

Direct RNA Sequencing Reveals SARS-CoV-2 m6A Sites and Possible Differential DRACH Motif Methylation among Variants. *Viruses* 13, 2108. <https://doi.org/10.3390/v13112108>

Cao, Y., Langer, R., Ferrara, N., 2023. Targeting angiogenesis in oncology, ophthalmology and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 22, 476–495. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00671-z>

Caobi, A., Saeed, M., 2024. Upping the ante: enhanced expression of interferon-antagonizing ORF6 and ORF9b proteins by SARS-CoV-2 variants of concern. *Current Opinion in Microbiology* 79, 102454. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102454>

Cathcart, A.L., Havenar-Daughton, C., Lempp, F.A., Ma, D., Schmid, M.A., Agostini, M.L., Guarino, B., Di Iulio, J., Rosen, L.E., Tucker, H., Dillen, J., Subramanian, S., Sloan, B., Bianchi, S., Pinto, D., Saliba, C., Culap, K., Wojcechowskyj, J.A., Noack, J., Zhou, J., Kaiser, H., Lee, S., Farhat, N., Chase, A., Montiel-Ruiz, M., Dellota, E., Park, A., Spreafico, R., Sahakyan, A., Lauron, E.J., Czudnochowski, N., Cameroni, E., Ledoux, S., Kawaoka, Y., Werts, A., Colas, C., Soriaga, L., Telenti, A., Purcell, L.A., Hwang, S., Snell, G., Virgin, H.W., Corti, D., Hebner, C.M., 2021. The dual function monoclonal antibodies VIR-7831 and VIR-7832 demonstrate potent in vitro and in vivo activity against SARS-CoV-2. <https://doi.org/10.1101/2021.03.09.434607>

Cech, T.R., Zaugg, A.J., Grabowski, P.J., 1981. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27, 487–496. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90390-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90390-1)

Chaillon, A., Smith, D.M., 2021. Phylogenetic Analyses of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) B.1.1.7 Lineage Suggest a Single Origin Followed by Multiple Exportation Events Versus Convergent Evolution. *Clinical Infectious Diseases* 73, 2314–2317. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab265>

Chang, C., Hou, M.-H., Chang, C.-F., Hsiao, C.-D., Huang, T., 2014. The SARS coronavirus nucleocapsid protein – Forms and functions. *Antiviral Research* 103, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.12.009>

Charbe, N.B., Amnerkar, N.D., Ramesh, B., Tambuwala, M.M., Bakshi, H.A., Aljabali, A.A.A., Khadse, S.C., Satheeshkumar, R., Satija, S., Metha, M., Chellappan, D.K., Shrivastava, G., Gupta, G., Negi, P., Dua, K., Zacconi, F.C., 2020. Small interfering RNA for cancer treatment: overcoming hurdles in delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 10, 2075–2109. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.005>

Chartrand, P., Harvey, S.C., Ferbeyre, G., Usman, N., Cedergren, R., 1995. An oligodeoxyribonucleotide that supports catalytic activity in the hammerhead ribozyme domain. *Nucleic Acids Res* 23, 4092–4096. <https://doi.org/10.1093/nar/23.20.4092>

Chemaitelly, H., Yassine, H.M., Benslimane, F.M., Al Khatib, H.A., Tang, P., Hasan, M.R., Malek, J.A., Coyle, P., Ayoub, H.H., Al Kanaani, Z., Al Kuwari, E., Jeremijenko, A., Kaleeckal, A.H., Latif, A.N., Shaik, R.M., Abdul Rahim, H.F., Nasrallah, G.K., Al Kuwari, M.G., Al Romaihi, H.E., Al-Thani, M.H., Al Khal, A., Butt, A.A., Bertollini, R., Abu-Raddad, L.J., 2021. mRNA-1273 COVID-19 vaccine effectiveness against the B.1.1.7 and B.1.351 variants and severe COVID-19 disease in Qatar. *Nat Med* 27, 1614–1621. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01446-y>

Chen, C.-Y., Chang, C., Chang, Y.-W., Sue, S.-C., Bai, H.-I., Riang, L., Hsiao, C.-D., Huang, T., 2007. Structure of the SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein RNA-binding Dimerization Domain Suggests a Mechanism for Helical Packaging of Viral RNA. *Journal of Molecular Biology* 368, 1075–1086. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.069>

Chen, E.S., Ho, E.S., 2023. In-silico study of antisense oligonucleotide antibiotics. *PeerJ* 11, e16343. <https://doi.org/10.7717/peerj.16343>

Literaturverzeichnis

- Chen, J., Farraj, R.A., Limonta, D., Tabatabaei Dakhili, S.A., Kerek, E.M., Bhattacharya, A., Reformat, F.M., Mabrouk, O.M., Brigant, B., Pfeifer, T.A., McDermott, M.T., Ussher, J.R., Hobman, T.C., Glover, J.N.M., Hubbard, B.P., 2023. Reversible and irreversible inhibitors of coronavirus Nsp15 endoribonuclease. *J Biol Chem* 299, 105341. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105341>
- Chen, James, Malone, B., Llewellyn, E., Grasso, M., Shelton, P.M.M., Olinares, P.D.B., Maruthi, K., Eng, E.T., Vatandaslar, H., Chait, B.T., Kapoor, T.M., Darst, S.A., Campbell, E.A., 2020. Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex. *Cell* 182, 1560-1573.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.033>
- Chen, Jiahui, Wang, R., Wang, M., Wei, G.-W., 2020. Mutations Strengthened SARS-CoV-2 Infectivity. *Journal of Molecular Biology* 432, 5212–5226. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.009>
- Chen, S.-C., Olsthoorn, R.C.L., 2010. Group-specific structural features of the 5'-proximal sequences of coronavirus genomic RNAs. *Virology* 401, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.007>
- Chen, S.-C., Olsthoorn, R.C.L., Yu, C.-H., 2021. Structural phylogenetic analysis reveals lineage-specific RNA repetitive structural motifs in all coronaviruses and associated variations in SARS-CoV-2. *Virus Evol* 7, veab021. <https://doi.org/10.1093/ve/veab021>
- Chen, W., Liang, B., Wu, X., Li, L., Wang, C., Xing, D., 2023. Advances and challenges in using nirmatrelvir and its derivatives against SARS-CoV-2 infection. *J Pharm Anal* 13, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.10.005>
- Chen, X., Mangala, L.S., Rodriguez-Aguayo, C., Kong, X., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., 2018. RNA interference-based therapy and its delivery systems. *Cancer Metastasis Rev* 37, 107–124. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9717-6>
- Chen, Y., Xia, S., 2021. Determination of the stability of plasma ATP in vitro. *Am J Blood Res* 11, 96–99.
- Chenchula, S., Karunakaran, P., Sharma, S., Chavan, M., 2022. Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A systematic review. *J Med Virol* 94, 2969–2976. <https://doi.org/10.1002/jmv.27697>
- Cherry, J.D., Krogstad, P., 2004. SARS: The First Pandemic of the 21st Century. *Pediatr Res* 56, 1–5. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000129184.87042.FC>
- Chiriboga, C.A., 2017. Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Review of Neurotherapeutics* 17, 955–962. <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1364159>
- Choi, J.Y., Smith, D.M., 2021. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J* 62, 961. <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.11.961>
- Cleaves, H.J., 2014. Wobble Pair, in: Amils, R., Gargaud, M., Cernicharo Quintanilla, J., Cleaves, H.J., Irvine, W.M., Pinti, D., Viso, M. (Eds.), *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–1. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27833-4_5248-1
- Collotta, D., Bertocchi, I., Chiapello, E., Collino, M., 2023. Antisense oligonucleotides: a novel Frontier in pharmacological strategy. *Front. Pharmacol.* 14, 1304342. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1304342>
- Condé, L., Allatif, O., Ohlmann, T., De Breyne, S., 2022. Translation of SARS-CoV-2 gRNA Is Extremely Efficient and Competitive despite a High Degree of Secondary Structures and the Presence of an uORF. *Viruses* 14, 1505. <https://doi.org/10.3390/v14071505>
- Cong, Y., Ulasli, M., Schepers, H., Mauthe, M., V'kovski, P., Kriegenburg, F., Thiel, V., De Haan,

- C.A.M., Reggiori, F., 2020. Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle. *J Virol* 94, e01925-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01925-19>
- Conti, E., Franks, N.P., Brick, P., 1996. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* 4, 287–298. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00033-0)
- Conti, P., Pregliasco, F.E., Calvisi, V., Caraffa, A., Gallenga, C.E., Kritas, S.K., Ronconi, G., 2021. Monoclonal antibody therapy in COVID-19. *J Biol Regul Homeost Agents* 35, 423–427. https://doi.org/10.23812/Conti_Edit_35_2_1
- Cooper, C.L., Van Heeswijk, R.P.G., Gallicano, K., Cameron, D.W., 2003. A Review of Low-Dose Ritonavir in Protease Inhibitor Combination Therapy. *Clinical Infectious Diseases* 36, 1585–1592. <https://doi.org/10.1086/375233>
- Cooper, M.S., Zhang, L., Ibrahim, M., Zhang, K., Sun, X., Röske, J., Göhl, M., Brönstrup, M., Cowell, J.K., Sauerhering, L., Becker, S., Vangeel, L., Jochmans, D., Neyts, J., Rox, K., Marsh, G.P., Maple, H.J., Hilgenfeld, R., 2022. Diastereomeric Resolution Yields Highly Potent Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease. *J. Med. Chem.* 65, 13328–13342. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01131>
- Cordts, I., Lingor, P., Friedrich, B., Pernpeintner, V., Zimmer, C., Deschauer, M., Maegerlein, C., 2020. Intrathecal nusinersen administration in adult spinal muscular atrophy patients with complex spinal anatomy. *Ther Adv Neurol Disord* 13, 1756286419887616. <https://doi.org/10.1177/1756286419887616>
- Cortese, M., Lee, J.-Y., Cerikan, B., Neufeldt, C.J., Oorschot, V.M.J., Köhrer, S., Hennies, J., Schieber, N.L., Ronchi, P., Mizzon, G., Romero-Brey, I., Santarella-Mellwig, R., Schorb, M., Boermel, M., Mocaer, K., Beckwith, M.S., Templin, R.M., Gross, V., Pape, C., Tischer, C., Frankish, J., Horvat, N.K., Laketa, V., Stanifer, M., Boulant, S., Ruggieri, A., Chatel-Chaix, L., Schwab, Y., Bartenschlager, R., 2020. Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host Microbe* 28, 853-866.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.11.003>
- Costacurta, F., Dodaro, A., Bante, D., Schöppe, H., Sprenger, B., Moghadasi, S.A., Fleischmann, J., Pavan, M., Bassani, D., Menin, S., Rauch, S., Krismer, L., Sauerwein, A., Heberle, A., Rabensteiner, T., Ho, J., Harris, R.S., Stefan, E., Schneider, R., Kaserer, T., Moro, S., von Laer, D., Heilmann, E., 2023. A comprehensive study of SARS-CoV-2 main protease (Mpro) inhibitor-resistant mutants selected in a VSV-based system. *bioRxiv* 2023.09.22.558628. <https://doi.org/10.1101/2023.09.22.558628>
- Cozzupoli, G.M., Savastano, M.C., Falsini, B., Savastano, A., Rizzo, S., 2020. Possible Retinal Impairment Secondary to Ritonavir Use in SARS-CoV-2 Patients: A Narrative Systematic Review. *J Ophthalmol* 2020, 5350494. <https://doi.org/10.1155/2020/5350494>
- Cresswell-Clay, E., Periwal, V., 2021. Genome-wide covariation in SARS-CoV-2. *Mathematical Biosciences* 341, 108678. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2021.108678>
- Crooke, S.T., 2017. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics* 27, 70–77. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0656>
- Crooke, S.T. (Ed.), 2008. *Antisense drug technology: principles, strategies, and applications*, 2nd ed. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Crooke, S.T., Baker, B.F., Crooke, R.M., Liang, X., 2021. Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat Rev Drug Discov* 20, 427–453. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00162-z>
- Crooke, S.T., Vickers, T.A., Liang, X., 2020. Phosphorothioate modified oligonucleotide–protein interactions. *Nucleic Acids Research* 48, 5235–5253. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa299>

- Deas, T.S., Binduga-Gajewska, I., Tilgner, M., Ren, P., Stein, D.A., Moulton, H.M., Iversen, P.L., Kauffman, E.B., Kramer, L.D., Shi, P.-Y., 2005. Inhibition of Flavivirus Infections by Antisense Oligomers Specifically Suppressing Viral Translation and RNA Replication. *J Virol* 79, 4599–4609. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.8.4599-4609.2005>
- Debacker, A.J., Voutila, J., Catley, M., Blakey, D., Habib, N., 2020. Delivery of Oligonucleotides to the Liver with GalNAc: From Research to Registered Therapeutic Drug. *Mol Ther* 28, 1759–1771. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.06.015>
- Denison, M.R., Perlman, S., 1986. Translation and processing of mouse hepatitis virus virion RNA in a cell-free system. *J Virol* 60, 12–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.60.1.12-18.1986>
- Dey, D., Nunes-Alves, A., Wade, R.C., Schreiber, G., 2022. Diffusion of small molecule drugs is affected by surface interactions and crowder proteins. *iScience* 25, 105088. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105088>
- Dhorne-Pollet, S., Fitzpatrick, C., Da Costa, B., Bourgon, C., Eléouët, J.-F., Meunier, N., Burzio, V.A., Delmas, B., Barrey, E., 2022. Antisense oligonucleotides targeting ORF1b block replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Front Microbiol* 13, 915202. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.915202>
- Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Pham, H., Gupta, A., Vikram, A., Bahal, R., 2020. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *JCM* 9, 2004. <https://doi.org/10.3390/jcm9062004>
- Diamond, M., S., 2009. The host immunologic response to West Nile encephalitis virus. *Front Biosci* Volume, 3024. <https://doi.org/10.2741/3432>
- Doherty, E.A., Doudna, J.A., 2000. Ribozyme Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 597–615. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.597>
- Dolan, K.A., Dutta, M., Kern, D.M., Kotecha, A., Voth, G.A., Brohawn, S.G., 2022. Structure of SARS-CoV-2 M protein in lipid nanodiscs. *eLife* 11, e81702. <https://doi.org/10.7554/eLife.81702>
- Duan, Y., Zhou, H., Liu, Xiang, Iketani, S., Lin, M., Zhang, X., Bian, Q., Wang, H., Sun, H., Hong, S.J., Culbertson, B., Mohri, H., Luck, M.I., Zhu, Y., Liu, Xiaoce, Lu, Y., Yang, X., Yang, K., Sabo, Y., Chavez, A., Goff, S.P., Rao, Z., Ho, D.D., Yang, H., 2023. Molecular mechanisms of SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. *Nature* 622, 376–382. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06609-0>
- El Boujnouni, N., van der Bent, M.L., Willemsse, M., 't Hoen, P.A.C., Brock, R., Wansink, D.G., 2023. Block or degrade? Balancing on- and off-target effects of antisense strategies against transcripts with expanded triplet repeats in DM1. *Mol Ther Nucleic Acids* 32, 622–636. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.04.010>
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498. <https://doi.org/10.1038/35078107>
- England, C.G., Ehlerding, E.B., Cai, W., 2016. NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjugate Chem.* 27, 1175–1187. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00112>
- Eymieux, S., Uzbekov, R., Rouillé, Y., Blanchard, E., Hourieux, C., Dubuisson, J., Belouzard, S., Roingard, P., 2021. Secretory Vesicles Are the Principal Means of SARS-CoV-2 Egress. *Cells* 10, 2047. <https://doi.org/10.3390/cells10082047>

- Fakhr, E., Zare, F., Teimoori-Toolabi, L., 2016. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Ther* 23, 73–82. <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.4>
- Fang, J., Pietzsch, C., Tsapralis, G., Crynen, G., Cho, K.F., Ting, A.Y., Bukreyev, A., De La Torre, J.C., Saphire, E.O., 2022. Functional interactomes of the Ebola virus polymerase identified by proximity proteomics in the context of viral replication. *Cell Reports* 38, 110544. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110544>
- Far, R.K., Nedbal, W., Sczakiel, G., 2001. Concepts to automate the theoretical design of effective antisense oligonucleotides. *Bioinformatics* 17, 1058–1061. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.11.1058>
- Far, R.K.-K., Leppert, J., Frank, K., Sczakiel, G., 2005. Technical Improvements in the Computational Target Search for Antisense Oligonucleotides. *Oligonucleotides* 15, 223–233. <https://doi.org/10.1089/oli.2005.15.223>
- Far, R.K.-K., Warnecke, J.M., Sczakiel, G., 2004a. Considerations on the Design of Antisense Oligonucleotides, in: Gewirtz, A.M. (Ed.), *Nucleic Acid Therapeutics in Cancer*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 143–154. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-777-2_11
- Far, R.K.-K., Warnecke, J.M., Sczakiel, G., 2004b. Considerations on the Design of Antisense Oligonucleotides, in: Gewirtz, A.M. (Ed.), *Nucleic Acid Therapeutics in Cancer*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 143–154. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-777-2_11
- Fehr, A.R., Perlman, S., 2015. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 1282, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Ferron, F., Subissi, L., Silveira De Morais, A.T., Le, N.T.T., Sevajol, M., Gluais, L., Decroly, E., Vonnrhein, C., Bricogne, G., Canard, B., Imbert, I., 2018. Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E162–E171. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718806115>
- Fine, S.L., Martin, D.F., Kirkpatrick, P., 2005. Pegaptanib sodium. *Nat Rev Drug Discov* 4, 187–188. <https://doi.org/10.1038/nrd1677>
- Finsterer, J., 2022. Neurological side effects of SARS-CoV-2 vaccinations. *Acta Neurol Scand* 145, 5–9. <https://doi.org/10.1111/ane.13550>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Focosi, D., McConnell, S., Casadevall, A., Cappello, E., Valdiserra, G., Tuccori, M., 2022. Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis* 22, e311–e326. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00311-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00311-5)
- Formosa, L.E., Maghool, S., Sharpe, A.J., Reljic, B., Muellner-Wong, L., Stroud, D.A., Ryan, M.T., Maher, M.J., 2022. Mitochondrial COA7 is a heme-binding protein with disulfide reductase activity, which acts in the early stages of complex IV assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, e2110357119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110357119>
- Freier, S.M., Altmann, K.H., 1997. The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucleic Acids Res* 25, 4429–4443. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4429>
- Friedrich, M., Aigner, A., 2022. Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives.

BioDrugs 36, 549–571. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00549-3>

Fujino, T., Nomoto, H., Kutsuna, S., Ujiie, M., Suzuki, T., Sato, R., Fujimoto, T., Kuroda, M., Wakita, T., Ohmagari, N., 2021. Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 27. <https://doi.org/10.3201/eid2704.210138>

Fung, T.S., Liu, D.X., 2018. Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function. *Future Virol* 13, 405–430. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0008>

Gadhve, K., Kumar, P., Kumar, A., Bhardwaj, T., Garg, N., Giri, R., 2021. Conformational dynamics of 13 amino acids long NSP11 of SARS-CoV-2 under membrane mimetics and different solvent conditions. *Microb Pathog* 158, 105041. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105041>

Gagnon, K.T., Corey, D.R., 2019. Guidelines for Experiments Using Antisense Oligonucleotides and Double-Stranded RNAs. *Nucleic Acid Therapeutics* 29, 116–122. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0772>

Gahtori, J., Pant, S., Srivastava, H.K., 2020. Modeling antimalarial and antihuman African trypanosomiasis compounds: a ligand- and structure-based approaches. *Mol Divers* 24, 1107–1124. <https://doi.org/10.1007/s11030-019-10015-y>

Gao, W.Y., Han, F.S., Storm, C., Egan, W., Cheng, Y.C., 1992. Phosphorothioate oligonucleotides are inhibitors of human DNA polymerases and RNase H: implications for antisense technology. *Mol Pharmacol* 41, 223–229.

Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T., Sun, Q., Ming, Z., Zhang, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T., Hua, T., Zhang, B., Yang, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Xu, W., Guddat, L.W., Wang, Q., Lou, Z., Rao, Z., 2020. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science* 368, 779–782. <https://doi.org/10.1126/science.abb7498>

Garcia, R., Burkle, J., 2018. New and Future Parenteral Therapies for the Management of Lipid Disorders. *Archives of Medical Research* 49, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.01.001>

Genna, V., Iglesias-Fernández, J., Reyes-Fraile, L., Villegas, N., Guckian, K., Seth, P., Wan, B., Cabrero, C., Terrazas, M., Brun-Heath, I., González, C., Sciabola, S., Villalobos, A., Orozco, M., 2023. Controlled sulfur-based engineering confers mouldability to phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 51, 4713–4725. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad309>

Gewirtz, A.M., 2004. *Nucleic acid therapeutics in cancer*. Humana Press, Totowa, N.J.

Gobeil, S.M.-C., Janowska, K., McDowell, S., Mansouri, K., Parks, R., Manne, K., Stalls, V., Kopp, M.F., Henderson, R., Edwards, R.J., Haynes, B.F., Acharya, P., 2021. D614G Mutation Alters SARS-CoV-2 Spike Conformation and Enhances Protease Cleavage at the S1/S2 Junction. *Cell Reports* 34, 108630. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108630>

Goleij, P., Babamohamadi, M., Rezaee, A., Sanaye, P.M., Tabari, M.A.K., Sadreddini, S., Arefnezhad, R., Motedayyen, H., 2024. Types of RNA therapeutics, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 41–63. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.12.022>

Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Ziebuhr, J., 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *Journal of General Virology* 81, 853–879. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-4-853>

Graw, J., Hennig, W., 2010. *Genetik*, 5., vollständig überarbeitete Auflage. ed, Springer-Lehrbuch. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.

Gredell, J.A., Berger, A.K., Walton, S.P., 2008. Impact of target mRNA structure on siRNA silencing efficiency: A large-scale study. *Biotech & Bioengineering* 100, 744–755.

<https://doi.org/10.1002/bit.21798>

Grein, J., Ohmagari, N., Shin, D., Diaz, G., Asperges, E., Castagna, A., Feldt, T., Green, G., Green, M.L., Lescure, F.-X., Nicastrì, E., Oda, R., Yo, K., Quiros-Roldan, E., Studemeister, A., Redinski, J., Ahmed, S., Bernett, J., Chelliah, D., Chen, D., Chihara, S., Cohen, S.H., Cunningham, J., D'Arminio Monforte, A., Ismail, S., Kato, H., Lapadula, G., L'Her, E., Maeno, T., Majumder, S., Massari, M., Mora-Rillo, M., Mutoh, Y., Nguyen, D., Verweij, E., Zoufaly, A., Osinusi, A.O., DeZure, A., Zhao, Y., Zhong, L., Chokkalingam, A., Elboudwarej, E., Telep, L., Timbs, L., Henne, I., Sellers, S., Cao, H., Tan, S.K., Winterbourne, L., Desai, P., Mera, R., Gaggar, A., Myers, R.P., Brainard, D.M., Childs, R., Flanigan, T., 2020. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med* 382, 2327–2336. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007016>

Gruda, M.C., Zabolotny, J.M., Xiao, J.H., Davidson, I., Alwine, J.C., 1993. Transcriptional Activation by Simian Virus 40 Large T Antigen: Interactions with Multiple Components of the Transcription Complex. *Molecular and Cellular Biology* 13, 961–969. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.2.961-969.1993>

Haake, C., Cook, S., Pusterla, N., Murphy, B., 2020. Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. *Viruses* 12, 1023. <https://doi.org/10.3390/v12091023>

Hadj Hassine, I., 2022. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. *Reviews in Medical Virology* 32, e2313. <https://doi.org/10.1002/rmv.2313>

Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J., 2001. Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science* 293, 1146–1150. <https://doi.org/10.1126/science.1064023>

Han, H.-J., Yu, H., Yu, X.-J., 2016. Evidence for zoonotic origins of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of General Virology* 97, 274–280. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000342>

Hannemann, H., 2020. Viral replicons as valuable tools for drug discovery. *Drug Discov Today* 25, 1026–1033. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.03.010>

Hardin, C.C., Watson, T., Corregan, M., Bailey, C., 1992. Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry* 31, 833–841. <https://doi.org/10.1021/bi00118a028>

Hashemian, S.M.R., Sheida, A., Taghizadieh, M., Memar, M.Y., Hamblin, M.R., Bannazadeh Baghi, H., Sadri Nahand, J., Asemi, Z., Mirzaei, H., 2023. Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir): A new approach to Covid-19 therapy? *Biomed Pharmacother* 162, 114367. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114367>

Hattab, D., Amer, M.F.A., Al-Alami, Z.M., Bakhtiar, A., 2024. SARS-CoV-2 journey: from alpha variant to omicron and its sub-variants. *Infection*. <https://doi.org/10.1007/s15010-024-02223-y>

Havranek, B., Demissie, R., Lee, H., Lan, S., Zhang, H., Sarafianos, S., Ayitou, A.J.-L., Islam, S.M., 2023. Discovery of Nirmatrelvir Resistance Mutations in SARS-CoV-2 3CLpro: A Computational-Experimental Approach. *J Chem Inf Model* 63, 7180–7188. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01269>

Hemmings-Mieszczak, M., 2003. Independent combinatorial effect of antisense oligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinant Rat P2X3 receptor. *Nucleic Acids Research* 31, 2117–2126. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg322>

Hertzog, T., Scandella, E., Schelle, B., Ziebuhr, J., Siddell, S.G., Ludewig, B., Thiel, V., 2004. Rapid identification of coronavirus replicase inhibitors using a selectable replicon RNA. *Journal of General Virology* 85, 1717–1725. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80044-0>

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Pöhlmann, S., 2020. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein

of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell* 78, 779-784.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>

Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougères, A., Endres, S., Hartmann, G., 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11, 263–270. <https://doi.org/10.1038/nm1191>

Hoy, S.M., 2017. Nusinersen: First Global Approval. *Drugs* 77, 473–479. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0711-7>

Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., Liang, X.-J., 2020. Therapeutic siRNA: state of the art. *Sig Transduct Target Ther* 5, 101. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>

Hu, Z.B., Minden, M.D., McCulloch, E.A., 1998. Phosphorylation of BCL-2 after exposure of human leukemic cells to retinoic acid. *Blood* 92, 1768–1775.

Hung, Y.-P., Lee, J.-C., Chiu, C.-W., Lee, C.-C., Tsai, P.-J., Hsu, I.-L., Ko, W.-C., 2022. Oral Nirmatrelvir/Ritonavir Therapy for COVID-19: The Dawn in the Dark? *Antibiotics (Basel)* 11, 220. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020220>

Huston, N.C., Tsao, L.H., Brackney, D.E., Pyle, A.M., 2024. The West Nile virus genome harbors essential riboregulatory elements with conserved and host-specific functional roles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 121, e2312080121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2312080121>

Hwang, Y.-C., Lu, R.-M., Su, S.-C., Chiang, P.-Y., Ko, S.-H., Ke, F.-Y., Liang, K.-H., Hsieh, T.-Y., Wu, H.-C., 2022. Monoclonal antibodies for COVID-19 therapy and SARS-CoV-2 detection. *J Biomed Sci* 29, 1. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00784-w>

Idris, A., Davis, A., Supramaniam, A., Acharya, D., Kelly, G., Tayyar, Y., West, N., Zhang, P., McMillan, C.L.D., Soemardy, C., Ray, R., O’Meally, D., Scott, T.A., McMillan, N.A.J., Morris, K.V., 2021. A SARS-CoV-2 targeted siRNA-nanoparticle therapy for COVID-19. *Molecular Therapy* 29, 2219–2226. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.05.004>

Ignjatovic, J., Sapats, S., 2000. Avian infectious bronchitis virus: -EN- -FR- -ES-. *Rev. Sci. Tech. OIE* 19, 493–508. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1228>

Inouye, S., Sahara-Miura, Y., Sato, J., Suzuki, T., 2015. Codon optimization of genes for efficient protein expression in mammalian cells by selection of only preferred human codons. *Protein Expression and Purification* 109, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.02.002>

Ishizuka, A., Siomi, M.C., Siomi, H., 2002. A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* 16, 2497–2508. <https://doi.org/10.1101/gad.1022002>

Jackson, A.L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B.N., Cleary, M., Lim, L., Linsley, P.S., 2006. Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12, 1179–1187. <https://doi.org/10.1261/rna.25706>

Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B., Choe, H., 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>

Jackson, L.A., Anderson, E.J., Roupheal, N.G., Roberts, P.C., Makhene, M., Coler, R.N., McCullough, M.P., Chappell, J.D., Denison, M.R., Stevens, L.J., Pruijssers, A.J., McDermott, A., Flach, B., Doria-Rose, N.A., Corbett, K.S., Morabito, K.M., O’Dell, S., Schmidt, S.D., Swanson, P.A., Padilla, M., Mascola, J.R., Neuzil, K.M., Bennett, H., Sun, W., Peters, E., Makowski, M., Albert, J., Cross, K., Buchanan, W., Pikaart-Tautges, R., Ledgerwood, J.E., Graham, B.S., Beigel, J.H., mRNA-1273 Study Group, 2020. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med* 383, 1920–

Literaturverzeichnis

1931. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022483>

Jason, T.L.H., Koropatnick, J., Berg, R.W., 2004. Toxicology of antisense therapeutics. *Toxicology and Applied Pharmacology* 201, 66–83. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.04.017>

Jayaram, D.R., Frost, S., Argov, C., Liju, V.B., Anto, N.P., Muraleedharan, A., Ben-Ari, A., Sinay, R., Smoly, I., Novoplansky, O., Isakov, N., Toiber, D., Keasar, C., Elkabets, M., Yeger-Lotem, E., Livneh, E., 2021. Unraveling the hidden role of a uORF-encoded peptide as a kinase inhibitor of PKCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2018899118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018899118>

Jiang, L., Qian, J., Yang, Y., Fan, Y., 2018. Knockdown of MON1B Exerts Anti-Tumor Effects in Colon Cancer In Vitro. *Med Sci Monit* 24, 7710–7718. <https://doi.org/10.12659/MSM.911002>

Johnstone, T.G., Bazzini, A.A., Giraldez, A.J., 2016. Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J* 35, 706–723. <https://doi.org/10.15252/embj.201592759>

Jones, L.R., Greene, J., Chen, K.M., Divine, G., Chitale, D., Shah, V., Datta, I., Worsham, M.J., 2017. Biological significance of genome-wide DNA methylation profiles in keloids. *The Laryngoscope* 127, 70–78. <https://doi.org/10.1002/lary.26063>

Karaki, S., Paris, C., Rocchi, P., 2019. Antisense Oligonucleotides, A Novel Developing Targeting Therapy, in: Sharad, S., Kapur, S. (Eds.), *Antisense Therapy*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82105>

Kashani-Sabet, M., 2002. Ribozyme Therapeutics. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 7, 76–78. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.19642.x>

Kashihara, N., Maeshima, Y., Makino, H., 1998. Antisense Oligonucleotides. *Nephron Exp Nephrol* 6, 84–88. <https://doi.org/10.1159/000020509>

Katuwal, N.B., Kang, M.S., Ghosh, M., Hong, S.D., Jeong, Y.G., Park, S.M., Kim, S.-G., Sohn, J., Kim, T.H., Moon, Y.W., 2023. Targeting PEG10 as a novel therapeutic approach to overcome CDK4/6 inhibitor resistance in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 42, 325. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02903-x>

Kilcoyne, A., Ambery, P., O'Connor, D. (Eds.), 2013. Dose–response relationship, in: *Pharmaceutical Medicine*. Oxford University Press, pp. 132–135. <https://doi.org/10.1093/med/9780199609147.003.0041>

Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J.W., Kim, V.N., Chang, H., 2020. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 181, 914–921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>

Kinghorn, A.B., Fraser, L.A., Lang, S., Shiu, S.C.-C., Tanner, J.A., 2017. Aptamer Bioinformatics. *Int J Mol Sci* 18, 2516. <https://doi.org/10.3390/ijms18122516>

Kirchdoerfer, R.N., Ward, A.B., 2019. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun* 10, 2342. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10280-3>

Klebe, G., 2009. *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, 2. Aufl. ed. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg.

Kobayashi, Y., Fukuhara, D., Akase, D., Aida, M., Ui-Tei, K., 2022. siRNA Seed Region Is Divided into Two Functionally Different Domains in RNA Interference in Response to 2'-OMe Modifications. *ACS Omega* 7, 2398–2410. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06455>

Koch, T., Dahlke, C., Fathi, A., Kupke, A., Krähling, V., Okba, N.M.A., Halwe, S., Rohde, C., Eickmann, M., Volz, A., Hestekamp, T., Jambrecina, A., Borregaard, S., Ly, M.L., Zinser, M.E.,

Literaturverzeichnis

- Bartels, E., Poetsch, J.S.H., Neumann, R., Fux, R., Schmiedel, S., Lohse, A.W., Haagmans, B.L., Sutter, G., Becker, S., Addo, M.M., 2020. Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* 20, 827–838. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30248-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30248-6)
- Korneeva, N., Khalil, M.I., Ghosh, I., Fan, R., Arnold, T., De Benedetti, A., 2023. SARS-CoV-2 viral protein Nsp2 stimulates translation under normal and hypoxic conditions. *Virology* 20, 55. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02021-2>
- Kozak, M., 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15, 8125–8148. <https://doi.org/10.1093/nar/15.20.8125>
- Kretschmer-Kazemi Far, R., Nedbal, W., Sczakiel, G., 2001. Concepts to automate the theoretical design of effective antisense oligonucleotides. *Bioinformatics* 17, 1058–1061. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.11.1058>
- Kronenberger, T., Laufer, S.A., Pillaiyar, T., 2023. COVID-19 therapeutics: Small-molecule drug development targeting SARS-CoV-2 main protease. *Drug Discov Today* 28, 103579. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103579>
- Kruczek, K., Qu, Z., Welby, E., Shimada, H., Hiriyanna, S., English, M.A., Zein, W.M., Brooks, B.P., Swaroop, A., 2022. In vitro modeling and rescue of ciliopathy associated with IQCB1/NPHP5 mutations using patient-derived cells. *Stem Cell Reports* 17, 2172–2186. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.08.006>
- Kurreck, J., 2003. Antisense technologies: Improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry* 270, 1628–1644. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x>
- Kurreck, J., 2002. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Research* 30, 1911–1918. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.1911>
- Lacasse, É., Gudimard, L., Dubuc, I., Gravel, A., Allaëys, I., Boilard, É., Flamand, L., 2023. SARS-CoV-2 Nsp2 Contributes to Inflammation by Activating NF-κB. *Viruses* 15, 334. <https://doi.org/10.3390/v15020334>
- Lam, J.K.W., Chow, M.Y.T., Zhang, Y., Leung, S.W.S., 2015. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 4, e252. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>
- Lamb, K.D., Luka, M.M., Saathoff, M., Orton, R.J., Phan, M.V.T., Cotten, M., Yuan, K., Robertson, D.L., 2024. Mutational signature dynamics indicate SARS-CoV-2's evolutionary capacity is driven by host antiviral molecules. *PLoS Comput Biol* 20, e1011795. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011795>
- Lamb, Y.N., 2022. Nirmatrelvir Plus Ritonavir: First Approval. *Drugs* 82, 585–591. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01692-5>
- Lan, T.C.T., Allan, M.F., Malsick, L.E., Woo, J.Z., Zhu, C., Zhang, F., Khandwala, S., Nyeo, S.S.Y., Sun, Y., Guo, J.U., Bathe, M., Näär, A., Griffiths, A., Rouskin, S., 2022. Secondary structural ensembles of the SARS-CoV-2 RNA genome in infected cells. *Nat Commun* 13, 1128. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28603-2>
- Larcher, L.M., Pitout, I.L., Keegan, N.P., Veedu, R.N., Fletcher, S., 2023. DNazymes: Expanding the Potential of Nucleic Acid Therapeutics. *Nucleic Acid Therapeutics* 33, 178–192. <https://doi.org/10.1089/nat.2022.0066>
- Laufer, M.C., Van Roon-Mom, W., Aartsma-Rus, A., N = 1 Collaborative, 2024. Possibilities and

- limitations of antisense oligonucleotide therapies for the treatment of monogenic disorders. *Commun Med* 4, 6. <https://doi.org/10.1038/s43856-023-00419-1>
- Le, K., Kannappan, S., Kim, T., Lee, J.H., Lee, H.-R., Kim, K.K., 2023. Structural understanding of SARS-CoV-2 virus entry to host cells. *Front. Mol. Biosci.* 10, 1288686. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1288686>
- Lefèvre, C., Cook, G.M., Dinan, A.M., Torii, S., Stewart, H., Gibbons, G., Nicholson, A.S., Echavarría-Consuegra, L., Meredith, L.W., Lulla, V., Kenyon, J.C., Goodfellow, I., Deane, J.E., Graham, S.C., Lakatos, A., Lambrechts, L., Brierley, I., Irigoyen, N., 2017. Zika viruses encode multiple upstream open reading frames in the 5' viral region with a role in neurotropism (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/112904>
- Lei, J., Kusov, Y., Hilgenfeld, R., 2018. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res* 149, 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.11.001>
- Lei, S., Chen, X., Wu, J., Duan, X., Men, K., 2022. Small molecules in the treatment of COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* 7, 387. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01249-8>
- Li, G., Fu, L., Jiang, J., Ping, Y., Huang, Y., Wang, Y., 2014. siRNA Combinations Mediate Greater Suppression of Hepatitis B virus Replication in Mice. *Cell Biochem Biophys* 69, 641–647. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-9846-2>
- Li, T., Zhang, Y., Fu, L., Yu, C., Li, X., Li, Y., Zhang, X., Rong, Z., Wang, Y., Ning, H., Liang, R., Chen, W., Babiuk, L.A., Chang, Z., 2005. siRNA targeting the Leader sequence of SARS-CoV inhibits virus replication. *Gene Ther* 12, 751–761. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302479>
- Li, Xinyu, Yuan, H., Li, Xiaozhen, Wang, H., 2023. Spike protein mediated membrane fusion during SARS-CoV-2 infection. *Journal of Medical Virology* 95, e28212. <https://doi.org/10.1002/jmv.28212>
- Lim, K.H., Han, Z., Jeon, H.Y., Kach, J., Jing, E., Weyn-Vanhentenryck, S., Downs, M., Corriero, A., Oh, R., Scharner, J., Venkatesh, A., Ji, S., Liau, G., Ticho, B., Nash, H., Aznarez, I., 2020. Antisense oligonucleotide modulation of non-productive alternative splicing upregulates gene expression. *Nat Commun* 11, 3501. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17093-9>
- Lim, K.R.Q., Woo, S., Melo, D., Huang, Y., Dzierlega, K., Shah, M.N.A., Aslesh, T., Roshmi, R.R., Echigoya, Y., Maruyama, R., Moulton, H.M., Yokota, T., 2022. Development of DG9 peptide-conjugated single- and multi-exon skipping therapies for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2112546119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112546119>
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., Johnson, J.M., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773. <https://doi.org/10.1038/nature03315>
- Lima, W.F., Wu, H., Crooke, S.T., 2001. Human RNases H, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 430–440. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)41168-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)41168-2)
- Little, M., Kipriyanov, S.M., Le Gall, F., Moldenhauer, G., 2000. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today* 21, 364–370. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(00\)01668-6](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(00)01668-6)
- Liu, H., Iketani, S., Zask, A., Khanizeman, N., Bednarova, E., Forouhar, F., Fowler, B., Hong, S.J., Mohri, H., Nair, M.S., Huang, Y., Tay, N.E.S., Lee, S., Karan, C., Resnick, S.J., Quinn, C., Li, W., Shion, H., Xia, X., Daniels, J.D., Bartolo-Cruz, M., Farina, M., Rajbhandari, P., Jurtschenko, C., Lauber, M.A., McDonald, T., Stokes, M.E., Hurst, B.L., Rovis, T., Chavez, A., Ho, D.D., Stockwell, B.R., 2022. Development of optimized drug-like small molecule inhibitors of the SARS-CoV-2 3CL protease for treatment of COVID-19. *Nat Commun* 13, 1891. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29413-2>

Literaturverzeichnis

- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J., 2004. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
- Liu, J., Sun, Y., Qi, J., Chu, F., Wu, H., Gao, F., Li, T., Yan, J., Gao, G.F., 2010. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J Infect Dis* 202, 1171–1180. <https://doi.org/10.1086/656315>
- Liu, P., Li, L., Keane, S.C., Yang, D., Leibowitz, J.L., Giedroc, D.P., 2009. Mouse Hepatitis Virus Stem-Loop 2 Adopts a uYNMG(U)a-Like Tetraloop Structure That Is Highly Functionally Tolerant of Base Substitutions. *J Virol* 83, 12084–12093. <https://doi.org/10.1128/JVI.00915-09>
- Liu, P., Li, L., Millership, J.J., Kang, H., Leibowitz, J.L., Giedroc, D.P., 2007. A U-turn motif-containing stem-loop in the coronavirus 5' untranslated region plays a functional role in replication. *RNA* 13, 763–780. <https://doi.org/10.1261/rna.261807>
- Liu, X., Shi, D., Zhou, S., Liu, Hongli, Liu, Huanxiang, Yao, X., 2018. Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 13, 23–37. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1403419>
- Lopez Bernal, J., Andrews, N., Gower, C., Gallagher, E., Simmons, R., Thelwall, S., Stowe, J., Tessier, E., Groves, N., Dabrera, G., Myers, R., Campbell, C.N.J., Amirthalingam, G., Edmunds, M., Zambon, M., Brown, K.E., Hopkins, S., Chand, M., Ramsay, M., 2021. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med* 385, 585–594. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2108891>
- Lu, L., Su, S., Yang, H., Jiang, S., 2021. Antivirals with common targets against highly pathogenic viruses. *Cell* 184, 1604–1620. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.013>
- Lu, Z., Wang, Y., Chen, F., Tong, H., Reddy, M.V.V.V.S., Luo, L., Seshadrinathan, S., Zhang, L., Holthausen, L.M.F., Craig, A.M., Ren, G., Rudenko, G., 2014. Calsyntenin-3 molecular architecture and interaction with neuexin 1 α . *J Biol Chem* 289, 34530–34542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.606806>
- MacNair, L., Xiao, S., Miletic, D., Ghani, M., Julien, J.-P., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, E., Robertson, J., 2016. MTHFSD and DDX58 are novel RNA-binding proteins abnormally regulated in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 139, 86–100. <https://doi.org/10.1093/brain/awv308>
- MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., Doudna, J.A., 2008. *In vitro* reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 512–517. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710869105>
- Maher, G.J., Hilton, E.N., Urquhart, J.E., Davidson, A.E., Spencer, H.L., Black, G.C., Manson, F.D., 2011. The cataract-associated protein TMEM114, and TMEM235, are glycosylated transmembrane proteins that are distinct from claudin family members. *FEBS Letters* 585, 2187–2192. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.060>
- Mahtarin, R., Islam, S., Islam, Md.J., Ullah, M.O., Ali, M.A., Halim, M.A., 2022. Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 40, 4725–4738. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1861983>
- Mainelis, G., Seshadri, S., Garbuzenko, O.B., Han, T., Wang, Z., Minko, T., 2013. Characterization and application of a nose-only exposure chamber for inhalation delivery of liposomal drugs and nucleic acids to mice. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 26, 345–354. <https://doi.org/10.1089/jamp.2011-0966>

- Malik, Y.A., 2020. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol* 42, 3–11.
- Malone, B., Urakova, N., Snijder, E.J., Campbell, E.A., 2022. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 21–39. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00432-z>
- Manfredonia, I., Incarnato, D., 2021. Structure and regulation of coronavirus genomes: state-of-the-art and novel insights from SARS-CoV-2 studies. *Biochemical Society Transactions* 49, 341–352. <https://doi.org/10.1042/BST20200670>
- Manole, A., Efthymiou, S., O’Connor, E., Mendes, M.I., Jennings, M., Maroofian, R., Davagnanam, I., Mankad, K., Lopez, M.R., Salpietro, V., Harripaul, R., Badalato, L., Walia, J., Francklyn, C.S., Athanasiou-Fragkouli, A., Sullivan, R., Desai, S., Baranano, K., Zafar, F., Rana, N., Ilyas, M., Horga, A., Kara, M., Mattioli, F., Goldenberg, A., Griffin, H., Piton, A., Henderson, L.B., Kara, B., Aslanger, A.D., Raaphorst, J., Pfundt, R., Portier, R., Shinawi, M., Kirby, A., Christensen, K.M., Wang, L., Rosti, R.O., Paracha, S.A., Sarwar, M.T., Jenkins, D., SYNAPS Study Group, Ahmed, J., Santoni, F.A., Ranza, E., Iwaszkiewicz, J., Cytrynbaum, C., Weksberg, R., Wentzensen, I.M., Guillen Sacoto, M.J., Si, Y., Telegrafi, A., Andrews, M.V., Baldrige, D., Gabriel, H., Mohr, J., Oehl-Jaschkowitz, B., Debard, S., Senger, B., Fischer, F., van Ravenwaaij, C., Fock, A.J.M., Stevens, S.J.C., Bähler, J., Nasar, A., Mantovani, J.F., Manzur, A., Sarkozy, A., Smith, D.E.C., Salomons, G.S., Ahmed, Z.M., Riazuddin, Shaikh, Riazuddin, Saima, Usmani, M.A., Seibt, A., Ansar, M., Antonarakis, S.E., Vincent, J.B., Ayub, M., Grimm, M., Jelsig, A.M., Hjortshøj, T.D., Karstensen, H.G., Hummel, M., Haack, T.B., Jamshidi, Y., Distelmaier, F., Horvath, R., Gleeson, J.G., Becker, H., Mandel, J.-L., Koolen, D.A., Houlden, H., 2020. De Novo and Bi-allelic Pathogenic Variants in NARS1 Cause Neurodevelopmental Delay Due to Toxic Gain-of-Function and Partial Loss-of-Function Effects. *Am J Hum Genet* 107, 311–324. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.06.016>
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., Zamore, P.D., 2005. Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. *Cell* 123, 607–620. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.044>
- Mazhar, M.W., Raza, A., Shaheen, T., Zubair, M., Mahmood, J., Tahir, H., Saif, S., Mazhar, F., 2022. Detection of SARS-CoV-2 by using real-time PCR nasopharyngeal swabs in suspected patients and their clinical medication. *Sensors International* 3, 100148. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100148>
- McBroome, J., De Bernardi Schneider, A., Roemer, C., Wolfinger, M.T., Hinrichs, A.S., O’Toole, A.N., Ruis, C., Turakhia, Y., Rambaut, A., Corbett-Detig, R., 2024. A framework for automated scalable designation of viral pathogen lineages from genomic data. *Nat Microbiol* 9, 550–560. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01587-5>
- McCarthy, M.W., 2022. Ensitrelvir as a potential treatment for COVID-19. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 23, 1995–1998. <https://doi.org/10.1080/14656566.2022.2146493>
- McDonald, C.M., Shieh, P.B., Abdel-Hamid, H.Z., Connolly, A.M., Cifaloni, E., Wagner, K.R., Goemans, N., Mercuri, E., Khan, N., Koenig, E., Malhotra, J., Zhang, W., Han, B., Mendell, J.R., the Italian DMD Telethon Registry Study Group, Leuven NMRC Registry Investigators, CINRG Duchenne Natural History Investigators, and PROMOVI Trial Clinical Investigators, 2021. Open-Label Evaluation of Eteplirsen in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 51 Skipping: PROMOVI Trial. *J Neuromuscul Dis* 8, 989–1001. <https://doi.org/10.3233/JND-210643>
- Miao, Z., Tidu, A., Eriani, G., Martin, F., 2021. Secondary structure of the SARS-CoV-2 5’-UTR. *RNA Biology* 18, 447–456. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1814556>
- Milner, N., Mir, K.U., Southern, E.M., 1997. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 15, 537–541. <https://doi.org/10.1038/nbt0697-537>
- Mishra, A., Pandey, A.K., Gupta, P., Pradhan, P., Dhamija, S., Gomes, J., Kundu, B., Vivekanandan,

Literaturverzeichnis

- P., Menon, M.B., 2020. Mutation landscape of SARS-CoV-2 reveals five mutually exclusive clusters of leading and trailing single nucleotide substitutions. <https://doi.org/10.1101/2020.05.07.082768>
- Moghadasi, S.A., Biswas, R.G., Harki, D.A., Harris, R.S., 2023. Rapid resistance profiling of SARS-CoV-2 protease inhibitors. *npj Antimicrob Resist* 1, 9. <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00009-0>
- Mohamed, K., Rzymiski, P., Islam, M.S., Makuku, R., Mushtaq, A., Khan, A., Ivanovska, M., Makka, S.A., Hashem, F., Marquez, L., Cseprekal, O., Filgueiras, I.S., Fonseca, D.L.M., Mickael, E., Ling, I., Arero, A.G., Cuschieri, S., Minakova, K., Rodríguez-Román, E., Abarikwu, S.O., Faten, A., Grancini, G., Cabral-Marques, O., Rezaei, N., 2022. COVID-19 vaccinations: The unknowns, challenges, and hopes. *Journal of Medical Virology* 94, 1336–1349. <https://doi.org/10.1002/jmv.27487>
- Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Moghbeli, S.M., Rahimirad, S., Alanazi, I.O., Shehri, Z.S.A., Ebrahimie, E., 2021. A Transcription Regulatory Sequence in the 5' Untranslated Region of SARS-CoV-2 Is Vital for Virus Replication with an Altered Evolutionary Pattern against Human Inhibitory MicroRNAs. *Cells* 10, 319. <https://doi.org/10.3390/cells10020319>
- Monia, B.P., Sasmor, H., Johnston, J.F., Freier, S.M., Lesnik, E.A., Muller, M., Geiger, T., Altmann, K.H., Moser, H., Fabbro, D., 1996. Sequence-specific antitumor activity of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide targeted to human C-raf kinase supports an antisense mechanism of action in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15481–15484. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15481>
- Mulabbi, E.N., Tweyongyere, R., Byarugaba, D.K., 2021. The history of the emergence and transmission of human coronaviruses. *Onderstepoort j. vet. res.* 88. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v88i1.1872>
- Muniz, L., Nicolas, E., Trouche, D., 2021. RNA polymerase II speed: a key player in controlling and adapting transcriptome composition. *The EMBO Journal* 40, e105740. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105740>
- Neuman, B.W., Kiss, G., Kunding, A.H., Bhella, D., Baksh, M.F., Connelly, S., Droese, B., Klaus, J.P., Makino, S., Sawicki, S.G., Siddell, S.G., Stamou, D.G., Wilson, I.A., Kuhn, P., Buchmeier, M.J., 2011. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology* 174, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>
- Niemi, M.E.K., Daly, M.J., Ganna, A., 2022. The human genetic epidemiology of COVID-19. *Nat Rev Genet* 23, 533–546. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00478-5>
- Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Álvarez, E., Jiménez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Llorente, M., Kremer, L., Shuo, S., Enjuanes, L., 2011. Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* 415, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.029>
- Nimjee, S.M., White, R.R., Becker, R.C., Sullenger, B.A., 2017. Aptamers as Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 57, 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>
- Noske, G.D., De Souza Silva, E., De Godoy, M.O., Dolci, I., Fernandes, R.S., Guido, R.V.C., Sjö, P., Oliva, G., Godoy, A.S., 2023. Structural basis of nirmatrelvir and ensitrelvir activity against naturally occurring polymorphisms of the SARS-CoV-2 main protease. *Journal of Biological Chemistry* 299, 103004. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103004>
- Örd, M., Faustova, I., Loog, M., 2020. The sequence at Spike S1/S2 site enables cleavage by furin and phospho-regulation in SARS-CoV2 but not in SARS-CoV1 or MERS-CoV. *Sci Rep* 10, 16944. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74101-0>
- Østergaard, M.E., De Hoyos, C.L., Wan, W.B., Shen, W., Low, A., Berdeja, A., Vasquez, G., Murray,

Literaturverzeichnis

S., Migawa, M.T., Liang, X., Swayze, E.E., Crooke, S.T., Seth, P.P., 2020. Understanding the effect of controlling phosphorothioate chirality in the DNA gap on the potency and safety of gapmer antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 48, 1691–1700. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa031>

Overhoff, M., Alken, M., Far, R.K.-K., Lemaitre, M., Lebleu, B., Sczakiel, G., Robbins, I., 2005. Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: A Systematic Global Analysis. *Journal of Molecular Biology* 348, 871–881. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.012>

Owen, D.R., Allerton, C.M.N., Anderson, A.S., Aschenbrenner, L., Avery, M., Berritt, S., Boras, B., Cardin, R.D., Carlo, A., Coffman, K.J., Dantonio, A., Di, L., Eng, H., Ferre, R., Gajiwala, K.S., Gibson, S.A., Greasley, S.E., Hurst, B.L., Kadar, E.P., Kalgutkar, A.S., Lee, J.C., Lee, J., Liu, W., Mason, S.W., Noell, S., Novak, J.J., Obach, R.S., Ogilvie, K., Patel, N.C., Pettersson, M., Rai, D.K., Reese, M.R., Sammons, M.F., Sathish, J.G., Singh, R.S.P., Steppan, C.M., Stewart, A.E., Tuttle, J.B., Updyke, L., Verhoest, P.R., Wei, L., Yang, Q., Zhu, Y., 2021. An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science* 374, 1586–1593. <https://doi.org/10.1126/science.abl4784>

Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., Masciovecchio, C., Angeletti, S., Ciccozzi, M., Gallo, R.C., Zella, D., Ippodrino, R., 2020. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med* 18, 179. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>

Pandey, A.K., Verma, S., 2021. An in silico analysis of effective siRNAs against COVID-19 by targeting the leader sequence of SARS-CoV-2. *Adv Cell Gene Ther* 4. <https://doi.org/10.1002/acg2.107>

Park, G.J., Osinski, A., Hernandez, G., Eitson, J.L., Majumdar, A., Tonelli, M., Henzler-Wildman, K., Pawłowski, K., Chen, Z., Li, Y., Schoggins, J.W., Tagliabracci, V.S., 2022. The mechanism of RNA capping by SARS-CoV-2. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05185-z>

Parra-Lucare, A., Segura, P., Rojas, V., Pumarino, C., Saint-Pierre, G., Toro, L., 2022. Emergence of SARS-CoV-2 Variants in the World: How Could This Happen? *Life (Basel)* 12, 194. <https://doi.org/10.3390/life12020194>

Parums, D.V., 2021. Editorial: Revised World Health Organization (WHO) Terminology for Variants of Concern and Variants of Interest of SARS-CoV-2. *Med Sci Monit* 27. <https://doi.org/10.12659/MSM.933622>

Pashaei, Y., 2021. Analytical methods for the determination of remdesivir as a promising antiviral candidate drug for the COVID-19 pandemic. *Drug Discov Ther* 14, 273–281. <https://doi.org/10.5582/ddt.2020.03097>

Patzel, V., Steidl, U., Kronenwett, R., Haas, R., Sczakiel, G., 1999. A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic Acids Research* 27, 4328–4334. <https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4328>

Patzel, V., Zu Putlitz, J., Wieland, S., Blum, H.E., Sczakiel, G., 1997. Theoretical and Experimental Selection Parameters for HBV-Directed Antisense RNA Are Related to Increased RNA-RNA Annealing. *Biological Chemistry* 378, 539–544. <https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.6.539>

Pavan, M., Bolcato, G., Bassani, D., Sturlese, M., Moro, S., 2021. Supervised Molecular Dynamics (SuMD) Insights into the mechanism of action of SARS-CoV-2 main protease inhibitor PF-07321332. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36, 1645–1649. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1954919>

Penchovsky, R., Georgieva, A.V., Dyakova, V., Traykovska, M., Pavlova, N., 2024. Antisense and Functional Nucleic Acids in Rational Drug Development. *Antibiotics* 13, 221. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13030221>

Literaturverzeichnis

- Petri, S., Meister, G., 2013. siRNA Design Principles and Off-Target Effects, in: Moll, J., Colombo, R. (Eds.), Target Identification and Validation in Drug Discovery, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 59–71. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-311-4_4
- Pierce, K.E., Wangh, L.J., 2004. Effectiveness and limitations of uracil-DNA glycosylases in sensitive real-time PCR assays. *BioTechniques* 36, 44–48. <https://doi.org/10.2144/04361BM04>
- Pierson, T.C., Diamond, M.S., 2020. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* 5, 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Planas, D., Veyer, D., Baidaliuk, A., Staropoli, I., Guivel-Benhassine, F., Rajah, M.M., Planchais, C., Porrot, F., Robillard, N., Puech, J., Prot, M., Gallais, F., Gantner, P., Velay, A., Le Guen, J., Kassis-Chikhani, N., Edriss, D., Belec, L., Seve, A., Courtellemont, L., Péré, H., Hocqueloux, L., Fafi-Kremer, S., Prazuck, T., Mouquet, H., Bruel, T., Simon-Lorière, E., Rey, F.A., Schwartz, O., 2021. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature* 596, 276–280. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>
- Polack, F.P., Thomas, S.J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J.L., Pérez Marc, G., Moreira, E.D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K.A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W.V., Cooper, D., Frenck, R.W., Hammitt, L.L., Türeci, Ö., Nell, H., Schaefer, A., Ünal, S., Tresnan, D.B., Mather, S., Dormitzer, P.R., Şahin, U., Jansen, K.U., Gruber, W.C., C4591001 Clinical Trial Group, 2020. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 383, 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
- Prada-Arismendy, J., Castellanos, J.E., 2011. Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Medica* 243–258. <https://doi.org/10.25100/cm.v42i2.778>
- Puray-Chavez, M., Lee, N., Tenneti, K., Wang, Y., Vuong, H.R., Liu, Y., Horani, A., Huang, T., Gunsten, S.P., Case, J.B., Yang, W., Diamond, M.S., Brody, S.L., Dougherty, J., Kutluay, S.B., 2021. The translational landscape of SARS-CoV-2 and infected cells. *bioRxiv* 2020.11.03.367516. <https://doi.org/10.1101/2020.11.03.367516>
- Qian, X., Xu, C., Wu, B., Tang, H., Zhao, P., Qi, Z., 2020. SNORD126 Promotes Hepatitis C Virus Infection by Upregulating Claudin-1 via Activation of PI3K-AKT Signaling Pathway. *Front. Microbiol.* 11, 565590. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.565590>
- Qin, J.Y., Zhang, L., Clift, K.L., Hular, I., Xiang, A.P., Ren, B.-Z., Lahn, B.T., 2010. Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS ONE* 5, e10611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010611>
- Ramesh, V., Krishnan, J., 2023. A unified approach to dissecting biphasic responses in cell signaling. *eLife* 12, e86520. <https://doi.org/10.7554/eLife.86520>
- Rangan, R., Watkins, A.M., Chacon, J., Kretsch, R., Kladwang, W., Zheludev, I.N., Townley, J., Rynge, M., Thain, G., Das, R., 2021. *De novo* 3D models of SARS-CoV-2 RNA elements from consensus experimental secondary structures. *Nucleic Acids Research* 49, 3092–3108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab119>
- Ratmeyer, L., Vinayak, R., Zhong, Y.Y., Zon, G., Wilson, W.D., 1994. Sequence Specific Thermodynamic and Structural Properties for DNA.cntdot.RNA Duplexes. *Biochemistry* 33, 5298–5304. <https://doi.org/10.1021/bi00183a037>
- Reina, J., Iglesias, C., 2022. Nirmatrelvir plus ritonavir (Paxlovid) a potent SARS-CoV-2 3CLpro protease inhibitor combination. *Rev Esp Quimioter* 35, 236–240. <https://doi.org/10.37201/req/002.2022>

Literaturverzeichnis

- Reyes, A., Rusecka, J., Tońska, K., Zeviani, M., 2019. RNase H1 Regulates Mitochondrial Transcription and Translation via the Degradation of 7S RNA. *Front Genet* 10, 1393. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01393>
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., Khvorova, A., 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326–330. <https://doi.org/10.1038/nbt936>
- Roberts, T.C., Langer, R., Wood, M.J.A., 2020. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 19, 673–694. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
- Roehr, B., 1998. Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 4, 14–16.
- Roman, C., Lewicka, A., Koirala, D., Li, N.-S., Piccirilli, J.A., 2021. The SARS-CoV-2 Programmed -1 Ribosomal Frameshifting Element Crystal Structure Solved to 2.09 Å Using Chaperone-Assisted RNA Crystallography. *ACS Chem Biol* 16, 1469–1481. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00324>
- Rossi, G.A., Sacco, O., Mancino, E., Cristiani, L., Midulla, F., 2020. Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases. *Infection* 48, 665–669. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01486-5>
- Sabnis, R.W., 2021. Combination Therapy of RNA Interference and Small Molecules for Treating Hepatitis B Virus Infection. *ACS Med. Chem. Lett.* 12, 858–859. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00103>
- Sakai, T., Choo, Y.-Y., Sato, O., Ikebe, R., Jeffers, A., Idell, S., Tucker, T., Ikebe, M., 2022. Myo5b Transports Fibronectin-Containing Vesicles and Facilitates FN1 Secretion from Human Pleural Mesothelial Cells. *Int J Mol Sci* 23, 4823. <https://doi.org/10.3390/ijms23094823>
- Sakuraba, S., Xie, Q., Kasahara, K., Iwakiri, J., Kono, H., 2022. Extended ensemble simulations of a SARS-CoV-2 nsp1–5′-UTR complex. *PLoS Comput Biol* 18, e1009804. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009804>
- Santoro, M.G., Carafoli, E., 2021. Remdesivir: From Ebola to COVID-19. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 538, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.043>
- Savinkina, A., Paltiel, A.D., Ross, J.S., Gonsalves, G., 2022. Population-Level Strategies for Nirmatrelvir/Ritonavir Prescribing-A Cost-effectiveness Analysis. *Open Forum Infect Dis* 9, ofac637. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac637>
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., Siddell, S.G., 2007. A Contemporary View of Coronavirus Transcription. *J Virol* 81, 20–29. <https://doi.org/10.1128/JVI.01358-06>
- Schenkmyerova, A., Toul, M., Pluskal, D., Baatallah, R., Gagnot, G., Pinto, G.P., Santana, V.T., Stuchla, M., Neugebauer, P., Chaiyen, P., Damborsky, J., Bednar, D., Janin, Y.L., Prokop, Z., Marek, M., 2023. Catalytic mechanism for Renilla-type luciferases. *Nat Catal* 6, 23–38. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00895-z>
- Schiavina, M., Pontoriero, L., Uversky, V.N., Felli, I.C., Pierattelli, R., 2021. The highly flexible disordered regions of the SARS-CoV-2 nucleocapsid N protein within the 1–248 residue construct: sequence-specific resonance assignments through NMR. *Biomolecular NMR Assignments* 15, 219–227. <https://doi.org/10.1007/s12104-021-10009-8>
- Schoeman, D., Fielding, B.C., 2019. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol J* 16, 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
- Schultz, D.E., Honda, M., Whetter, L.E., McKnight, K.L., Lemon, S.M., 1996. Mutations within the 5′ nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation

Literaturverzeichnis

in cultured African green monkey kidney cells. *J Virol* 70, 1041–1049. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.2.1041-1049.1996>

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D., 2003. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 115, 199–208. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1)

Scott, B.M., Lacasse, V., Blom, D.G., Tonner, P.D., Blom, N.S., 2022. Predicted coronavirus Nsp5 protease cleavage sites in the human proteome. *BMC Genom Data* 23, 25. <https://doi.org/10.1186/s12863-022-01044-y>

Sczakiel, G., 2000. Theoretical and Experimental Approaches to Design Effective Antisense Oligonucleotides. *Front Biosci* 5, d194. <https://doi.org/10.2741/Sczakiel>

Sczakiel, G., 1997. The Design of Antisense RNA. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 7, 439–444. <https://doi.org/10.1089/oli.1.1997.7.439>

Sczakiel, G., Far, R.K.-K., 2002. The role of target accessibility for antisense inhibition. *Curr Opin Mol Ther* 4, 149–153.

Sczakiel, G., Homann, M., Rittner, K., 1993. Computer-Aided Search for Effective Antisense RNA Target Sequences of the Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antisense Research and Development* 3, 45–52. <https://doi.org/10.1089/ard.1993.3.45>

Senn, J.J., Burel, S., Henry, S.P., 2005. Non-CpG-Containing Antisense 2'-Methoxyethyl Oligonucleotides Activate a Proinflammatory Response Independent of Toll-Like Receptor 9 or Myeloid Differentiation Factor 88. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 972–979. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084004>

Sevignani, C., Calin, G.A., Siracusa, L.D., Croce, C.M., 2006. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 17, 189–202. <https://doi.org/10.1007/s00335-005-0066-3>

Shah, B.M., Schafer, J.J., Priano, J., Squires, K.E., 2013. Cobicistat: a new boost for the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy* 33, 1107–1116. <https://doi.org/10.1002/phar.1237>

Shah, M., Woo, H.G., 2022. Omicron: A Heavily Mutated SARS-CoV-2 Variant Exhibits Stronger Binding to ACE2 and Potently Escapes Approved COVID-19 Therapeutic Antibodies. *Front. Immunol.* 12, 830527. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.830527>

Sharma, O., Sultan, A.A., Ding, H., Triggler, C.R., 2020. A Review of the Progress and Challenges of Developing a Vaccine for COVID-19. *Front Immunol* 11, 585354. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585354>

Shi, M., Wang, L., Fontana, P., Vora, S., Zhang, Y., Fu, T.-M., Lieberman, J., Wu, H., 2020. SARS-CoV-2 Nsp1 suppresses host but not viral translation through a bipartite mechanism (preprint). *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.18.302901>

Shimizu, R., Sonoyama, T., Fukuhara, T., Kuwata, A., Matsuo, Y., Kubota, R., 2023. A Phase 1 Study of Ensitrelvir Fumaric Acid Tablets Evaluating the Safety, Pharmacokinetics and Food Effect in Healthy Adult Populations. *Clin Drug Investig* 43, 785–797. <https://doi.org/10.1007/s40261-023-01309-z>

Shirbhate, E., Pandey, J., Patel, V.K., Kamal, M., Jawaid, T., Gorain, B., Kesharwani, P., Rajak, H., 2021. Understanding the role of ACE-2 receptor in pathogenesis of COVID-19 disease: a potential approach for therapeutic intervention. *Pharmacol Rep* 73, 1539–1550. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00303-6>

Literaturverzeichnis

- Shumkova, M., Vassilev, D., Karamfiloff, K., Ivanova, R., Stoyanova, K., Yaneva-Sirakova, T., Gil, R.J., 2021. Acute myocarditis associated with the Pfizer/BioNTech vaccine. *Kardiol Pol* 79, 1282–1283. <https://doi.org/10.33963/KP.a2021.0095>
- Siino, V., Amato, A., Di Salvo, F., Caldara, G.F., Filogamo, M., James, P., Vasto, S., 2018. Impact of diet-induced obesity on the mouse brain phosphoproteome. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 58, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.015>
- Singh, S., Narang, A.S., Mahato, R.I., 2011. Subcellular Fate and Off-Target Effects of siRNA, shRNA, and miRNA. *Pharm Res* 28, 2996–3015. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0608-1>
- Slobodin, B., Sehwat, U., Lev, A., Hayat, D., Zuckerman, B., Fraticelli, D., Ogran, A., Ben-Shmuel, A., Bar-David, E., Levy, H., Ulitsky, I., Dikstein, R., 2022. Cap-independent translation and a precisely located RNA sequence enable SARS-CoV-2 to control host translation and escape anti-viral response. *Nucleic Acids Research* 50, 8080–8092. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac615>
- Slonchak, A., Khromykh, A.A., 2018. Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research. *Antiviral Res* 159, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.006>
- Snijder, E.J., Decroly, E., Ziebuhr, J., 2016. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv Virus Res* 96, 59–126. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.008>
- Sriram, S., Robinson, P., Pi, L., Lewin, A.S., Schultz, G., 2013. Triple Combination of siRNAs Targeting TGF β 1, TGF β R2, and CTGF Enhances Reduction of Collagen I and Smooth Muscle Actin in Corneal Fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 8214. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12758>
- Stadler, E., Burgess, M.T., Schlub, T.E., Khan, S.R., Chai, K.L., McQuilten, Z.K., Wood, E.M., Polizzotto, M.N., Kent, S.J., Cromer, D., Davenport, M.P., Khoury, D.S., 2023. Monoclonal antibody levels and protection from COVID-19. *Nat Commun* 14, 4545. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40204-1>
- Stephenson, M.L., Zamecnik, P.C., 1978. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 285–288. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.285>
- Subhan, M.A., Torchilin, V., 2020. siRNA based drug design, quality, delivery and clinical translation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 29, 102239. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102239>
- Sun, H., Tan, W., Zu, Y., 2016. Aptamers: versatile molecular recognition probes for cancer detection. *Analyst* 141, 403–415. <https://doi.org/10.1039/C5AN01995H>
- Sun, Y., Abriola, L., Niederer, R.O., Pedersen, S.F., Alfajaro, M.M., Silva Monteiro, V., Wilen, C.B., Ho, Y.-C., Gilbert, W.V., Surovtseva, Y.V., Lindenbach, B.D., Guo, J.U., 2021. Restriction of SARS-CoV-2 replication by targeting programmed –1 ribosomal frameshifting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2023051118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023051118>
- Surjit, M., Kumar, R., Mishra, R.N., Reddy, M.K., Chow, V.T.K., Lal, S.K., 2005. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *J Virol* 79, 11476–11486. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11476-11486.2005>
- Syed, Y.Y., 2023. Nedosiran: First Approval. *Drugs* 83, 1729–1733. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01976-4>

Literaturverzeichnis

- Szabat, M., Lorent, D., Czapik, T., Tomaszewska, M., Kierzek, E., Kierzek, R., 2020. RNA Secondary Structure as a First Step for Rational Design of the Oligonucleotides towards Inhibition of Influenza A Virus Replication. *Pathogens* 9, 925. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110925>
- Taiaroa, G., Rawlinson, D., Featherstone, L., Pitt, M., Caly, L., Druce, J., Purcell, D., Harty, L., Tran, T., Roberts, J., Scott, N., Catton, M., Williamson, D., Coin, L., Duchene, S., 2020. Direct RNA sequencing and early evolution of SARS-CoV-2 (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.05.976167>
- Tam, D., Lorenzo-Leal, A.C., Hernández, L.R., Bach, H., 2023. Targeting SARS-CoV-2 Non-Structural Proteins. *Int J Mol Sci* 24, 13002. <https://doi.org/10.3390/ijms241613002>
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E.J., Msomi, N., Mlisana, K., Von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A.J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., Preiser, W., Petruccione, F., Sigal, A., Hardie, D., Marais, G., Hsiao, N., Korsman, S., Davies, M.-A., Tyers, L., Mudau, I., York, D., Maslo, C., Goedhals, D., Abrahams, S., Laguda-Akingba, O., Alisoltani-Dehkordi, A., Godzik, A., Wibmer, C.K., Sewell, B.T., Lourenço, J., Alcantara, L.C.J., Kosakovsky Pond, S.L., Weaver, S., Martin, D., Lessells, R.J., Bhiman, J.N., Williamson, C., De Oliveira, T., 2021. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 592, 438–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>
- Tenaillon, O., Matic, I., 2020. The Impact of Neutral Mutations on Genome Evolvability. *Current Biology* 30, R527–R534. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.056>
- Teng, S., Sobitan, A., Rhoades, R., Liu, D., Tang, Q., 2021. Systemic effects of missense mutations on SARS-CoV-2 spike glycoprotein stability and receptor-binding affinity. *Briefings in Bioinformatics* 22, 1239–1253. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa233>
- Tian, D., Sun, Y., Xu, H., Ye, Q., 2022. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol* 94, 2376–2383. <https://doi.org/10.1002/jmv.27643>
- Toktay, Y., Dayanc, B., Senturk, S., 2022. Engineering and validation of a dual luciferase reporter system for quantitative and systematic assessment of regulatory sequences in Chinese hamster ovary cells. *Sci Rep* 12, 6050. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09887-2>
- Tolksdorf, B., Nie, C., Niemeyer, D., Röhrs, V., Berg, J., Lauster, D., Adler, J.M., Haag, R., Trimpert, J., Käufer, B., Drosten, C., Kurreck, J., 2021. Inhibition of SARS-CoV-2 Replication by a Small Interfering RNA Targeting the Leader Sequence. *Viruses* 13, 2030. <https://doi.org/10.3390/v13102030>
- Tolstrup, N., 2003. OligoDesign: optimal design of LNA (locked nucleic acid) oligonucleotide capture probes for gene expression profiling. *Nucleic Acids Research* 31, 3758–3762. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg580>
- Torjesen, I., 2021. Covid-19: Omicron may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. *BMJ* n2943. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2943>
- Tortorici, M.A., Veesler, D., 2019. Structural insights into coronavirus entry, in: *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 93–116. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.08.002>
- Tu, G., Cao, Q., Zhou, F., Israel, Y., 1998. Tetranucleotide GGGA Motif in Primary RNA Transcripts. *Journal of Biological Chemistry* 273, 25125–25131. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25125>
- Ugwu, D.I., Conradie, J., 2023. Anticancer properties of complexes derived from bidentate ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* 246, 112268. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112268>
- Uhlenbeck, O.C., 1990. Tetraloops and RNA folding. *Nature* 346, 613–614.

<https://doi.org/10.1038/346613a0>

Van Doremalen, N., Lambe, T., Spencer, A., Belij-Rammerstorfer, S., Purushotham, J.N., Port, J.R., Avanzato, V., Bushmaker, T., Flaxman, A., Ulaszewska, M., Feldmann, F., Allen, E.R., Sharpe, H., Schulz, J., Holbrook, M., Okumura, A., Meade-White, K., Pérez-Pérez, L., Bissett, C., Gilbride, C., Williamson, B.N., Rosenke, R., Long, D., Ishwarbhai, A., Kailath, R., Rose, L., Morris, S., Powers, C., Lovaglio, J., Hanley, P.W., Scott, D., Saturday, G., De Wit, E., Gilbert, S.C., Munster, V.J., 2020. ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. <https://doi.org/10.1101/2020.05.13.093195>

Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>

Vangeel, L., Chiu, W., De Jonghe, S., Maes, P., Slechten, B., Raymenants, J., André, E., Leyssen, P., Neyts, J., Jochmans, D., 2022. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Research* 198, 105252. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105252>

Varley, A.J., Desaulniers, J.-P., 2021. Chemical strategies for strand selection in short-interfering RNAs. *RSC Adv.* 11, 2415–2426. <https://doi.org/10.1039/D0RA07747J>

Venkatagopalan, P., Daskalova, S.M., Lopez, L.A., Dolezal, K.A., Hogue, B.G., 2015. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology* 478, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.005>

Verdiá-Báguena, C., Nieto-Torres, J.L., Alcaraz, A., DeDiego, M.L., Torres, J., Aguilella, V.M., Enjuanes, L., 2012. Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally involved membrane lipids. *Virology* 432, 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.07.005>

Vicentini, F.T.M.D.C., Borgheti-Cardoso, L.N., Depieri, L.V., De Macedo Mano, D., Abelha, T.F., Petrilli, R., Bentley, M.V.L.B., 2013. Delivery Systems and Local Administration Routes for Therapeutic siRNA. *Pharm Res* 30, 915–931. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-0971-1>

Vickers, T.A., 2000. Effects of RNA secondary structure on cellular antisense activity. *Nucleic Acids Research* 28, 1340–1347. <https://doi.org/10.1093/nar/28.6.1340>

V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V., 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19, 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>

Vögele, J., Hymon, D., Martins, J., Ferner, J., Jonker, H.R.A., Hargrove, A.E., Weigand, J.E., Wacker, A., Schwalbe, H., Wöhnert, J., Duchardt-Ferner, E., 2023. High-resolution structure of stem-loop 4 from the 5'-UTR of SARS-CoV-2 solved by solution state NMR. *Nucleic Acids Res* 51, 11318–11331. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad762>

Vora, S.M., Fontana, P., Mao, T., Leger, V., Zhang, Y., Fu, T.-M., Lieberman, J., Gehrke, L., Shi, M., Wang, L., Iwasaki, A., Wu, H., 2022. Targeting stem-loop 1 of the SARS-CoV-2 5' UTR to suppress viral translation and Nsp1 evasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2117198119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117198119>

Wang, C., Long, Q., Fu, Q., Xu, Q., Fu, D., Li, Y., Gao, L., Guo, J., Zhang, X., Lam, E.W.-F., Campisi, J., Sun, Y., 2022. Targeting epiregulin in the treatment-damaged tumor microenvironment restrains therapeutic resistance. *Oncogene* 41, 4941–4959. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02476-7>

Wang, L., Li, Z., Sievert, D., Smith, D.E.C., Mendes, M.I., Chen, D.Y., Stanley, V., Ghosh, S., Wang, Y., Kara, M., Aslanger, A.D., Rosti, R.O., Houlden, H., Salomons, G.S., Gleeson, J.G., 2020. Loss of

Literaturverzeichnis

- NARS1 impairs progenitor proliferation in cortical brain organoids and leads to microcephaly. *Nat Commun* 11, 4038. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17454-4>
- Wang, S., Lee, R.J., Cauchon, G., Gorenstein, D.G., Low, P.S., 1995. Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cells with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3318–3322. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3318>
- Wang, X., Zhao, Y., Yan, F., Wang, T., Sun, W., Feng, N., Wang, W., Wang, H., He, H., Yang, S., Xia, X., Gao, Y., 2021. Viral and Host Transcriptomes in SARS-CoV-2-Infected Human Lung Cells. *J Virol* 95, e0060021. <https://doi.org/10.1128/JVI.00600-21>
- Watt, A.T., Swayze, G., Swayze, E.E., Freier, S.M., 2020. Likelihood of Nonspecific Activity of Gapmer Antisense Oligonucleotides Is Associated with Relative Hybridization Free Energy. *Nucleic Acid Ther* 30, 215–228. <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0847>
- Watts, J.K., Corey, D.R., 2012. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *J. Pathol.* 226, 365–379. <https://doi.org/10.1002/path.2993>
- Wei, J.-X., Yang, J., Sun, J.-F., Jia, L.-T., Zhang, Y., Zhang, H.-Z., Li, X., Meng, Y.-L., Yao, L.-B., Yang, A.-G., 2009. Both Strands of siRNA Have Potential to Guide Posttranscriptional Gene Silencing in Mammalian Cells. *PLoS ONE* 4, e5382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005382>
- Wen, G., Paul Voroney, R., Schoenau, J.J., Yamamoto, T., Chikushi, J., 2001. Assessment of ionic quenching on soil ATP bioluminescence reaction. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00104-8)
- Wevers, B.A., Van Der Hoek, L., 2009. Recently Discovered Human Coronaviruses. *Clinics in Laboratory Medicine* 29, 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.07.007>
- Whipple, J.M., Lane, E.A., Chernyakov, I., D’Silva, S., Phizicky, E.M., 2011. The yeast rapid tRNA decay pathway primarily monitors the structural integrity of the acceptor and T-stems of mature tRNA. *Genes Dev* 25, 1173–1184. <https://doi.org/10.1101/gad.2050711>
- Will, S., Jabbari, H., 2016. Sparse RNA folding revisited: space-efficient minimum free energy structure prediction. *Algorithms Mol Biol* 11, 7. <https://doi.org/10.1186/s13015-016-0071-y>
- Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M.A., Niemeyer, D., Jones, T.C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C., Wendtner, C., 2020. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581, 465–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., Jiang, T., 2020. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe* 27, 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
- Wu, C.-H., Yeh, S.-H., Tsay, Y.-G., Shieh, Y.-H., Kao, C.-L., Chen, Y.-S., Wang, S.-H., Kuo, T.-J., Chen, D.-S., Chen, P.-J., 2009. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates the Phosphorylation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Protein and Viral Replication. *Journal of Biological Chemistry* 284, 5229–5239. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805747200>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E.C., Zhang, Y.-Z., 2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>

Literaturverzeichnis

- Wu, H., Lima, W.F., Crooke, S.T., 2001. Investigating the Structure of Human RNase H1 by Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 276, 23547–23553. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009676200>
- Wu, H., Lima, W.F., Crooke, S.T., 1999. Properties of Cloned and Expressed Human RNase H1. *Journal of Biological Chemistry* 274, 28270–28278. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28270>
- Wu, H., Lima, W.F., Crooke, S.T., 1998. Molecular Cloning and Expression of cDNA for Human RNase H. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 8, 53–61. <https://doi.org/10.1089/oli.1.1998.8.53>
- Wu, H.-Y., Guan, B.-J., Su, Y.-P., Fan, Y.-H., Brian, D.A., 2014. Reselection of a genomic upstream open reading frame in mouse hepatitis coronavirus 5′-untranslated-region mutants. *J Virol* 88, 846–858. <https://doi.org/10.1128/JVI.02831-13>
- Wu, S.Y., Yang, X., Gharpure, K.M., Hatakeyama, H., Egli, M., McGuire, M.H., Nagaraja, A.S., Miyake, T.M., Rupaimoole, R., Pecot, C.V., Taylor, M., Pradeep, S., Sierant, M., Rodriguez-Aguayo, C., Choi, H.J., Previs, R.A., Armaiz-Pena, G.N., Huang, L., Martinez, C., Hassell, T., Ivan, C., Sehgal, V., Singhania, R., Han, H.-D., Su, C., Kim, J.H., Dalton, H.J., Kovvali, C., Keyomarsi, K., McMillan, N.A.J., Overwijk, W.W., Liu, J., Lee, J.-S., Baggerly, K.A., Lopez-Berestein, G., Ram, P.T., Nawrot, B., Sood, A.K., 2014. 2′-OMe-phosphorodithioate-modified siRNAs show increased loading into the RISC complex and enhanced anti-tumour activity. *Nat Commun* 5, 3459. <https://doi.org/10.1038/ncomms4459>
- Wu, W., Cheng, Y., Zhou, H., Sun, C., Zhang, S., 2023a. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Virol J* 20, 6. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-01968-6>
- Wu, W., Cheng, Y., Zhou, H., Sun, C., Zhang, S., 2023b. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Virology Journal* 20, 6. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-01968-6>
- Xia, S., Zhang, Y., Wang, Y., Wang, Hui, Yang, Yunkai, Gao, G.F., Tan, W., Wu, G., Xu, M., Lou, Z., Huang, W., Xu, W., Huang, B., Wang, Huijuan, Wang, Wei, Zhang, W., Li, N., Xie, Z., Ding, L., You, W., Zhao, Y., Yang, Xuqin, Liu, Y., Wang, Q., Huang, L., Yang, Yongli, Xu, G., Luo, B., Wang, Wenling, Liu, P., Guo, W., Yang, Xiaoming, 2021. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 21, 39–51. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30831-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30831-8)
- Xiang, Y., Hwa, J., 2016. Regulation of VWF expression, and secretion in health and disease. *Curr Opin Hematol* 23, 288–293. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000230>
- Xiao, B., Ma, L., Merlin, D., 2017. Nanoparticle-mediated co-delivery of chemotherapeutic agent and siRNA for combination cancer therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery* 14, 65–73. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1205583>
- Xu, R., Wang, Kaiyuan, Yao, Z., Zhang, Yan, Jin, L., Pang, J., Zhou, Y., Wang, Kai, Liu, D., Zhang, Yaqin, Sun, P., Wang, F., Chang, X., Liu, T., Wang, S., Zhang, Yalin, Lin, S., Hu, C., Zhu, Y., Han, X., 2023. BRSK2 in pancreatic β cells promotes hyperinsulinemia-coupled insulin resistance and its genetic variants are associated with human type 2 diabetes. *J Mol Cell Biol* 15, mjad033. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjad033>
- Yamashita, A., Izumi, N., Kashima, I., Ohnishi, T., Saari, B., Katsuhata, Y., Muramatsu, R., Morita, T., Iwamatsu, A., Hachiya, T., Kurata, R., Hirano, H., Anderson, P., Ohno, S., 2009. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 23, 1091–1105.

<https://doi.org/10.1101/gad.1767209>

Yan, W., Zheng, Y., Zeng, X., He, B., Cheng, W., 2022. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Sig Transduct Target Ther* 7, 26. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00884-5>

Yanagidaira, M., Yoshioka, K., Nagata, T., Nakao, S., Miyata, K., Yokota, T., 2023. Effects of combinations of gapmer antisense oligonucleotides on the target reduction. *Mol Biol Rep* 50, 3539–3546. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08224-0>

Yang, D., Leibowitz, J.L., 2015. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Res* 206, 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.025>

Yang, D., Liu, P., Giedroc, D.P., Leibowitz, J., 2011. Mouse hepatitis virus stem-loop 4 functions as a spacer element required to drive subgenomic RNA synthesis. *J Virol* 85, 9199–9209. <https://doi.org/10.1128/JVI.05092-11>

Yang, D., Liu, P., Wudeck, E.V., Giedroc, D.P., Leibowitz, J.L., 2015. SHAPE analysis of the RNA secondary structure of the Mouse Hepatitis Virus 5' untranslated region and N-terminal nsp1 coding sequences. *Virology* 475, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.11.001>

Yeung, M.L., Bennasser, Y., Le, S.Y., Jeang, K.T., 2005. siRNA, miRNA and HIV: promises and challenges. *Cell Res* 15, 935–946. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290371>

Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., Tomari, Y., 2010. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 17, 17–23. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1733>

Yogev, O., Weissbrod, O., Battistoni, G., Bressan, D., Naamti, A., Falcicatori, I., Berkyurek, A.C., Rasnic, R., Hosmillo, M., Ilan, S., Grossman, I., McCormick, L., Honeycutt, C.C., Johnston, T., Gagne, M., Douek, D.C., Goodfellow, I., Hannon, G.J., Erlich, Y., 2022. Genome wide screen of RNAi molecules against SARS-CoV-2 creates a broadly potent prophylaxis (preprint). *Genomics*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.12.488010>

Yoo, B.H., 2004. 2'-O-methyl-modified phosphorothioate antisense oligonucleotides have reduced non-specific effects in vitro. *Nucleic Acids Research* 32, 2008–2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh516>

Yotsuyanagi, H., Ohmagari, N., Doi, Y., Yamato, M., Bac, N.H., Cha, B.K., Imamura, T., Sonoyama, T., Ichihashi, G., Sanaki, T., Tsuge, Y., Uehara, T., Mukae, H., 2024. Efficacy and Safety of 5-Day Oral Ensitrelvir for Patients With Mild to Moderate COVID-19: The SCORPIO-SR Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 7, e2354991. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.54991>

Žak, M.M., Zangi, L., 2021. Lipid Nanoparticles for Organ-Specific mRNA Therapeutic Delivery. *Pharmaceutics* 13, 1675. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101675>

Zandi, M., Shafaati, M., Kalantar-Neyestanaki, D., Pourghadamyari, H., Fani, M., Soltani, S., Kaleji, H., Abbasi, S., 2022. The role of SARS-CoV-2 accessory proteins in immune evasion. *Biomed Pharmacother* 156, 113889. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113889>

Zhang, C., 2012. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol* 901, 117–135. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-931-0_7

Zhang, C., Ma, Y., Zhang, J., Kuo, J.C.-T., Zhang, Z., Xie, H., Zhu, J., Liu, T., 2022. Modification of Lipid-Based Nanoparticles: An Efficient Delivery System for Nucleic Acid-Based Immunotherapy. *Molecules* 27, 1943. <https://doi.org/10.3390/molecules27061943>

Zhang, L., Howland, M., Hilgenfeld, R., Anderson, M.O., Eagon, S., 2021. Identification of non-covalent SARS-CoV-2 main protease inhibitors by a virtual screen of commercially available drug-like

Literaturverzeichnis

compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 41, 127990. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127990>

Zhang, Y., Huang, K., Xie, D., Lau, J.Y., Shen, W., Li, P., Wang, D., Zou, Z., Shi, S., Ren, H., Wang, Y., Mao, Y., Jin, M., Kudla, G., Zhao, Z., 2021. In vivo structure and dynamics of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Nat Commun* 12, 5695. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25999-1>

Zhang, Z., Nomura, N., Muramoto, Y., Ekimoto, T., Uemura, T., Liu, K., Yui, M., Kono, N., Aoki, J., Ikeguchi, M., Noda, T., Iwata, S., Ohto, U., Shimizu, T., 2022. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun* 13, 4399. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32019-3>

Zhao, J., Qiu, J., Aryal, S., Hackett, J., Wang, J., 2020. The RNA Architecture of the SARS-CoV-2 3'-Untranslated Region. *Viruses* 12, 1473. <https://doi.org/10.3390/v12121473>

Zhao, Y., Zhu, Y., Liu, X., Jin, Z., Duan, Y., Zhang, Q., Wu, C., Feng, L., Du, X., Zhao, J., Shao, M., Zhang, B., Yang, X., Wu, L., Ji, X., Guddat, L.W., Yang, K., Rao, Z., Yang, H., 2022. Structural basis for replicase polyprotein cleavage and substrate specificity of main protease from SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, e2117142119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117142119>

Zhou, R., Zeng, R., von Brunn, A., Lei, J., 2020. Structural characterization of the C-terminal domain of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Molecular Biomedicine* 1, 2. <https://doi.org/10.1186/s43556-020-00001-4>

Zhou, S., Lv, P., Li, M., Chen, Z., Xin, H., Reilly, S., Zhang, X., 2023. SARS-CoV-2 E protein: Pathogenesis and potential therapeutic development. *Biomed Pharmacother* 159, 114242. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114242>

Zhou, Z., Zhu, Y., Chu, M., 2022. Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants. *Front Immunol* 13, 898192. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.898192>

Zinzula, L., Basquin, J., Bohn, S., Beck, F., Klumpe, S., Pfeifer, G., Nagy, I., Bracher, A., Hartl, F.U., Baumeister, W., 2021. High-resolution structure and biophysical characterization of the nucleocapsid phosphoprotein dimerization domain from the Covid-19 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 538, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.131>

Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31, 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

Zúñiga, S., Cruz, J.L.G., Sola, I., Mateos-Gómez, P.A., Palacio, L., Enjuanes, L., 2010. Coronavirus Nucleocapsid Protein Facilitates Template Switching and Is Required for Efficient Transcription. *J Virol* 84, 2169–2175. <https://doi.org/10.1128/JVI.02011-09>

6. Anhang

6.1 Zusätzliche experimentelle Daten

Alignment und Faltungsanalyse der VOCs

Eine Sequenzabstimmung der in Tabelle 3.1 aufgeführten *variants of concern* (VOCs) wurde gegen die Referenzsequenz des Wuhan-Hu-1 Isolats NC_045512.2 durchgeführt und in Abbildung 6.1 dargestellt. Mutierte Nukleotide sind rot und fett markiert, während die entsprechenden Nukleotide der Referenzsequenz grün und fett hervorgehoben sind. Die Sequenzen der VOCs wurden der NCBI-Datenbank entnommen und tragen folgende *accession numbers*: Alpha: MW490632; Beta: OL369931; Gamma: OU398841; Delta: OK586172; Omikron: OW900554; BA.1: OP550471; BA.1.1: ON315997; BA.2: OP795858; BA.3: OW898431; BA. 4: OQ157130; BA.5: OQ074127.

Die in Abbildung 6.1 aufgeführten Sequenzen der VOCs wurden verwendet, um mittels der mfold-Software die Sekundärstrukturen der 5'-UTRs zu berechnen und mögliche Unzugänglichkeiten aufgrund von Mutationen zu identifizieren. Die errechneten Strukturen sind in Abbildung 6.2 dargestellt. VOCs mit identischen Primärsequenzen wurden in einer Abbildung zusammengefasst und Mutationen in Bezug auf die Referenzsequenz in rot hervorgehoben.

	10	20	30	40	50	60
Ref.	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	C AGGUAACAAACCAACCAACUUU	C GAUCUCUUGUAGAUCU			
Alpha	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	CAGGUAACAAACCAACCAACUUU	C	GAUCUCUUGUAGAUCU		
Beta	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	CAGGUAACAAACCAACCAACUUU	C	GAUCUCUUGUAGAUCU		
Gamma	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	CAGGUAACAAACCAACCAACUUU	C	GAUCUCUUGUAGAUCU		
Delta	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	CAGGUAACAAACCAACCAACUUU	C	GAUCUCUUGUAGAUCU		
Omikron	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	CAGGUAACAAACCAACCAACUUU	C	GAUCUCUUGUAGAUCU		
BA.1.1	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	U AGGUAACAAACCAACCAACUUU	C	GAUCUCUUGUAGAUCU		
BA.1	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	U AGGUAACAAACCAACCAACUUU	C	GAUCUCUUGUAGAUCU		
BA.2	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	CAGGUAACAAACCAACCAACUUU	U	GAUCUCUUGUAGAUCU		
BA.3	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	CAGGUAACAAACCAACCAACUUU	C	GAUCUCUUGUAGAUCU		
BA.4	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	CAGGUAACAAACCAACCAACUUU	U	GAUCUCUUGUAGAUCU		
BA.5	AUUAAAAGGUUUUAUACCUUCC	CAGGUAACAAACCAACCAACUUU	U	GAUCUCUUGUAGAUCU		

Anhang

	70	80	90	100	110	120
Ref.	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
Alpha	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
Beta	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
Gamma	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
Delta	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
Omikron	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
BA.1	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
BA.1.1	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
BA.2	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
BA.3	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
BA.4	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	GGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			
BA.5	GUUCUCUAAACGAACUUUAAAAUCUGUGUGGCUGUCACUC	AGCUGCAUGC	UUAGUGCACU			

	130	140	150	160	170	180
Ref.	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
Alpha	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
Beta	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	UUCUAUC				
Gamma	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
Delta	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
Omikron	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
BA.1	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
BA.1.1	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
BA.2	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
BA.3	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
BA.4	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				
BA.5	CACGCAGUAUAAUAAUAACUAAUACUGUCGUUGACAGGACACGAGUAACUC	GUUCUAUC				

Anhang

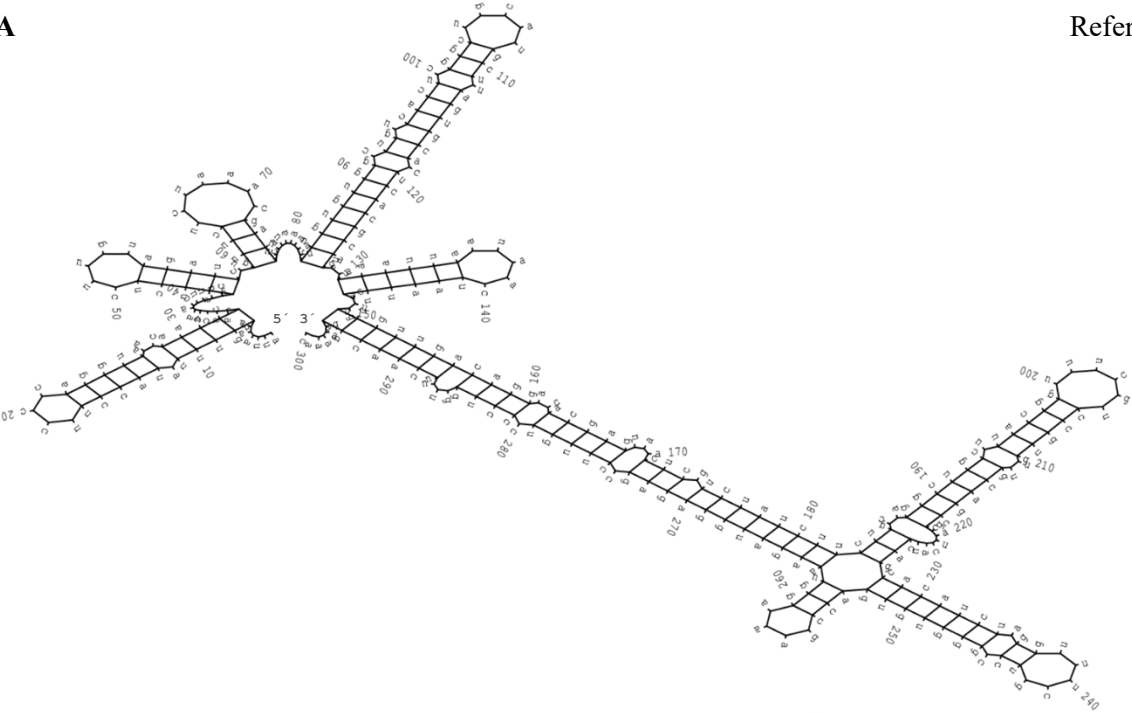
	190	200	210	220	230	240
Ref.	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	G UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
Alpha	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
Beta	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
Gamma	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
Delta	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	U UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
Omikron	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
BA.1	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
BA.1.1	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
BA.2	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
BA.3	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
BA.4	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				
BA.5	UUCUGCAGGCUGCUUACGGUUUCGUCCGU	UUGCAGCCGAUCAUCAGCACAUUCUAGGUUU				

	250	260
Ref.	C GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
Alpha	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
Beta	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
Gamma	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
Delta	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
Omikron	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
BA.1	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
BA.1.1	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
BA.2	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
BA.3	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
BA.4	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	
BA.5	U GUCCGGGUGUGACCGAAAGGUAAGAUG	

Abbildung 6.1 Alignment der 5'-UTRs der VOCs von SARS-CoV-2. Darstellung des Alignments der ersten 268 Nukleotide der *variants of concern* (VOCs) von SARS-CoV-2 mit der Referenzsequenz (NC_045512.2) von SARS-CoV-2. Rot, fett: *mismatches*; grün, fett: betroffene Bereiche in der Referenzsequenz (Ref.); Subvarianten der Omikronlinie: BA.1-BA.5.

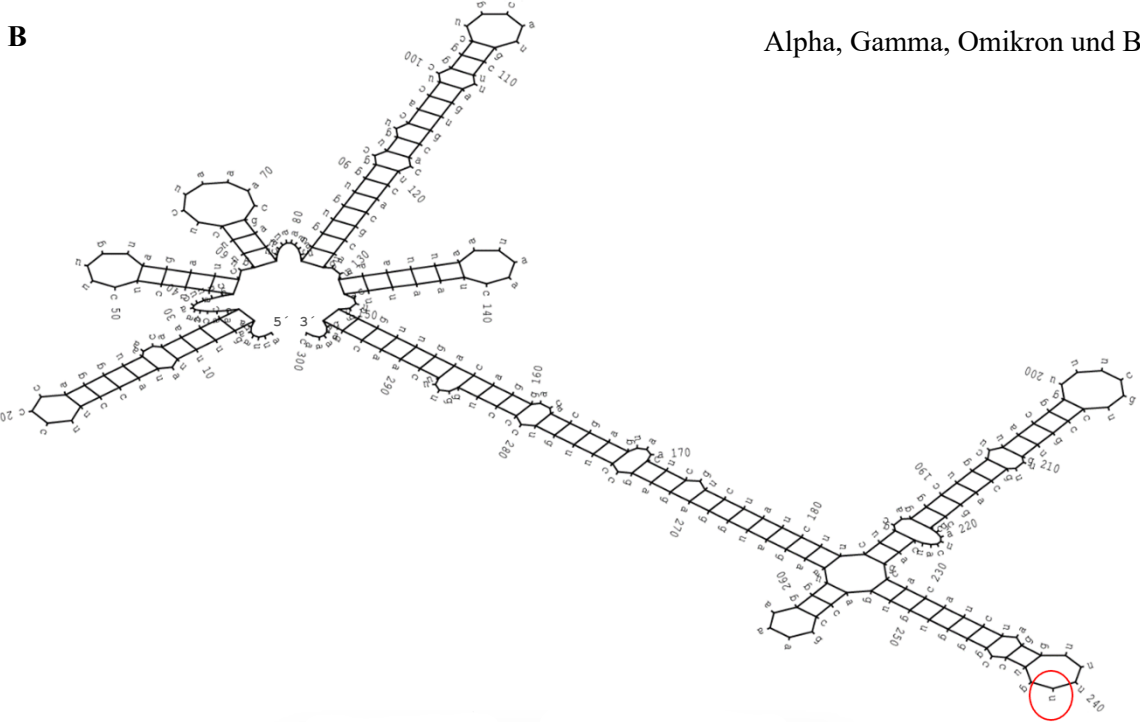
A

Referenz



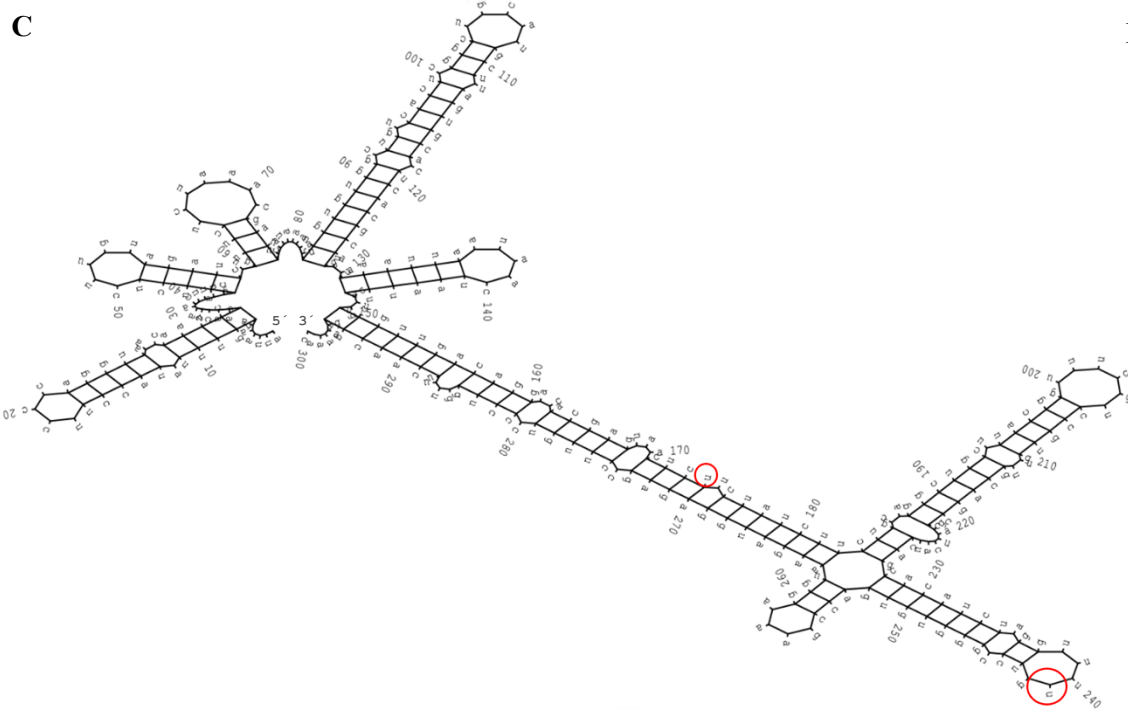
B

Alpha, Gamma, Omikron und BA.3



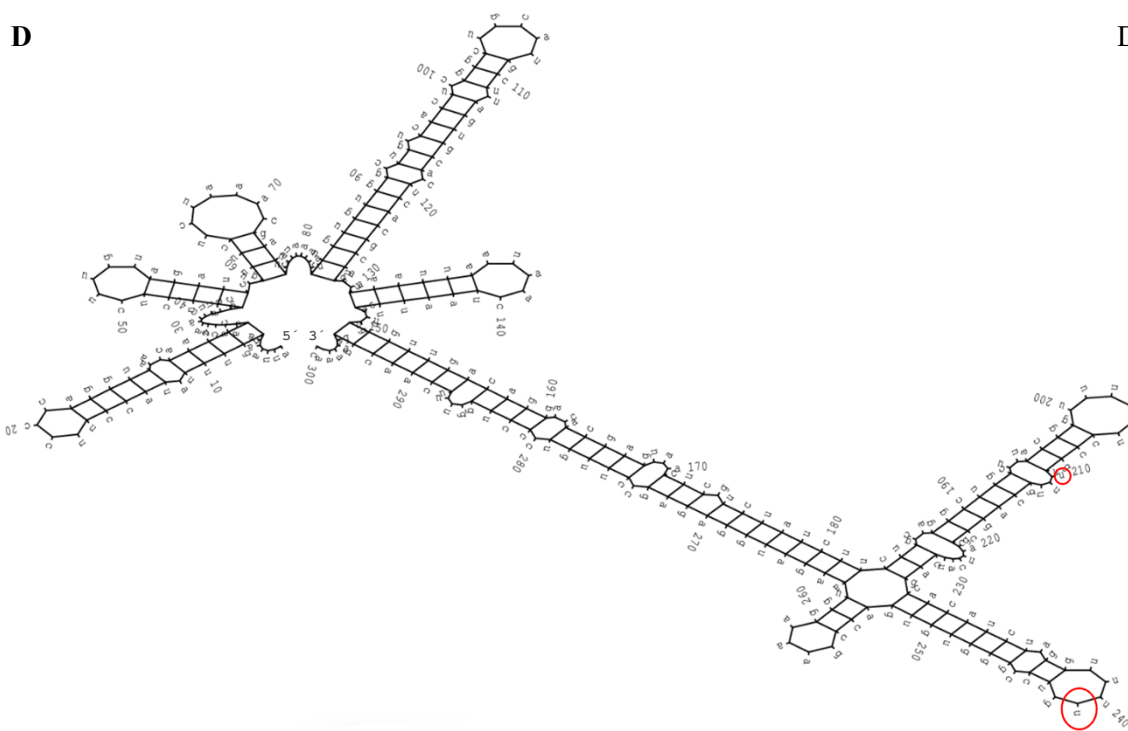
C

Beta



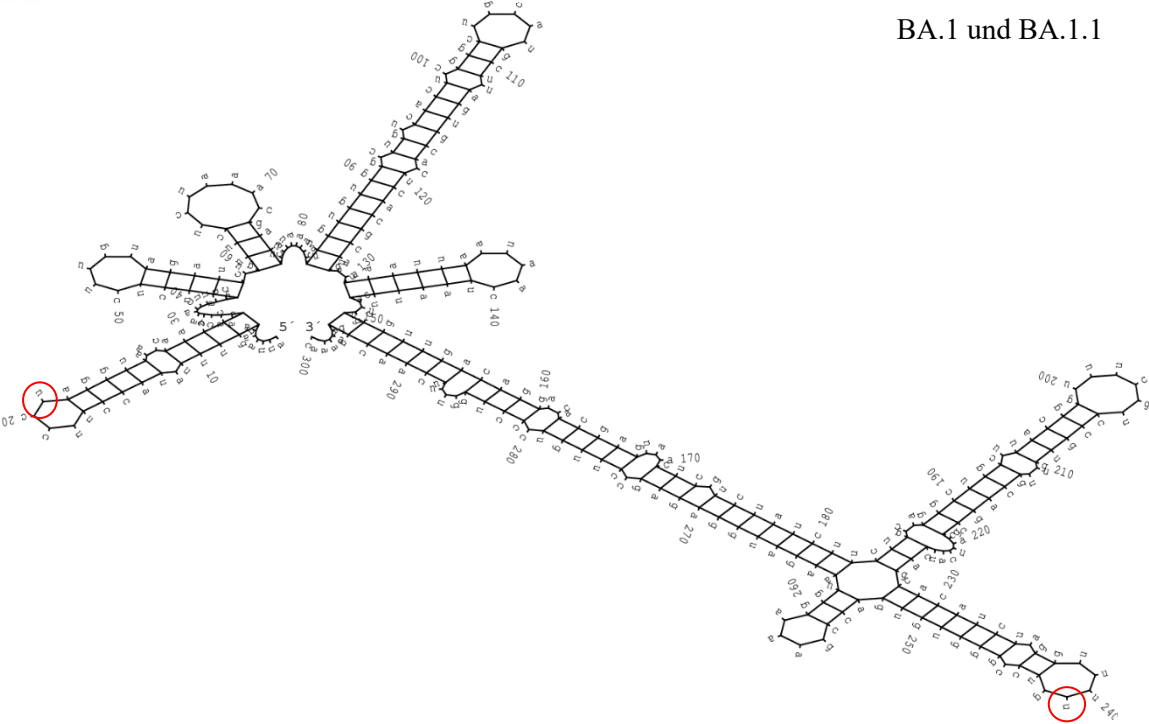
D

Delta



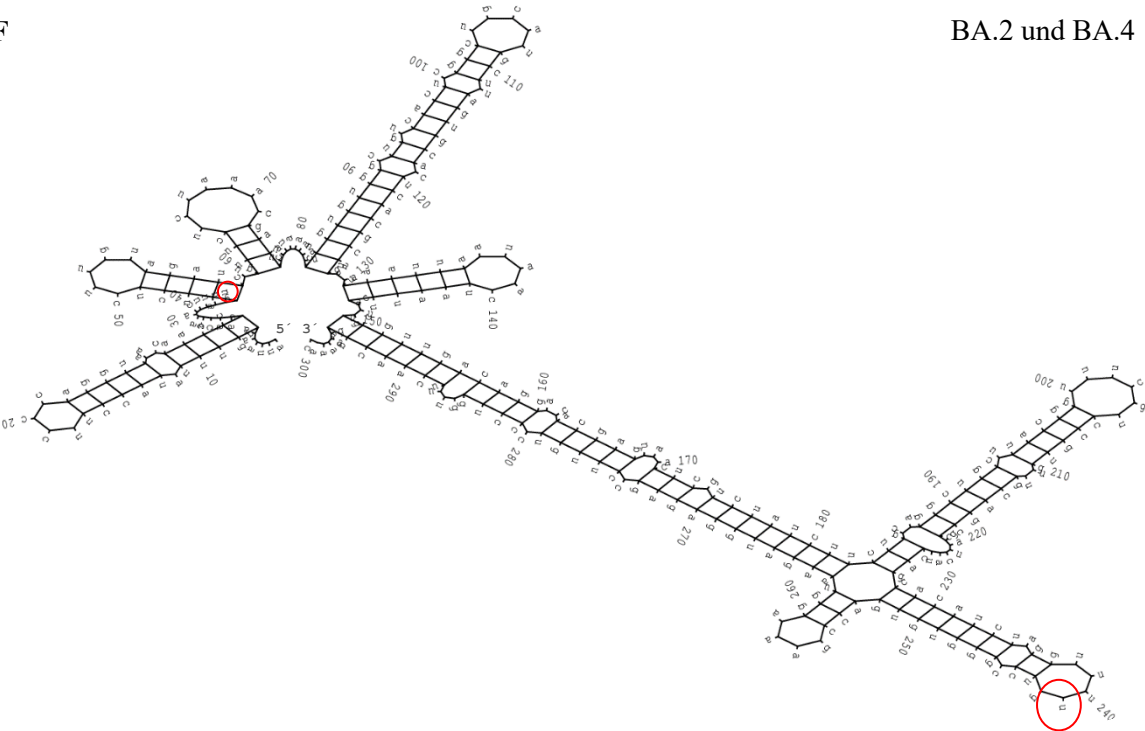
E

BA.1 und BA.1.1



F

BA.2 und BA.4



G

BA.5



Abbildung 6.2 Sekundärstrukturen der 5'-UTR der VOCs von SARS-CoV-2. Die Berechnungen der Sekundärstrukturen der 5'-UTRs wurden mittels mfold durchgeführt und miteinander verglichen. Die stabilsten Strukturen wurden abgebildet. Varianten mit denselben Mutationen wurden in einer Abbildung zusammengefasst. A) Sekundärstruktur der ersten 300 Nukleotide der SARS-CoV-2-Referenzsequenz. ($\Delta G = -78,1$ kcal/mol); B) Alpha, Gamma, Omikron und BA.3 ($\Delta G = -78,1$ kcal/mol); C) Beta ($\Delta G = -75,2$ kcal/mol); D) Delta ($\Delta G = -76,6$ kcal/mol); E) BA.1, BA.1.1 ($\Delta G = -78,0$ kcal/mol); F) BA.2 und BA.4 ($\Delta G = -77,8$ kcal/mol); G) BA.5 ($\Delta G = -77,6$ kcal/mol). Mutierte Nukleotide in Bezug auf die Referenzsequenz sind rot eingekreist.

Sekundärstruktur der 5'-UTR von SARS-CoV-2 zur Berechnung des Faltungspotenzials

Die Werte der Faltungspotenzialanalyse in Kapitel 3.2 beziehen sich auf die Sekundärstruktur in Abbildung 6.3. Hierbei wurden nur die ersten 268 Nukleotide der Referenzsequenz Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2) in die Faltung einbezogen, da nur dieser Bereich für die späteren Analysen kloniert wurde.

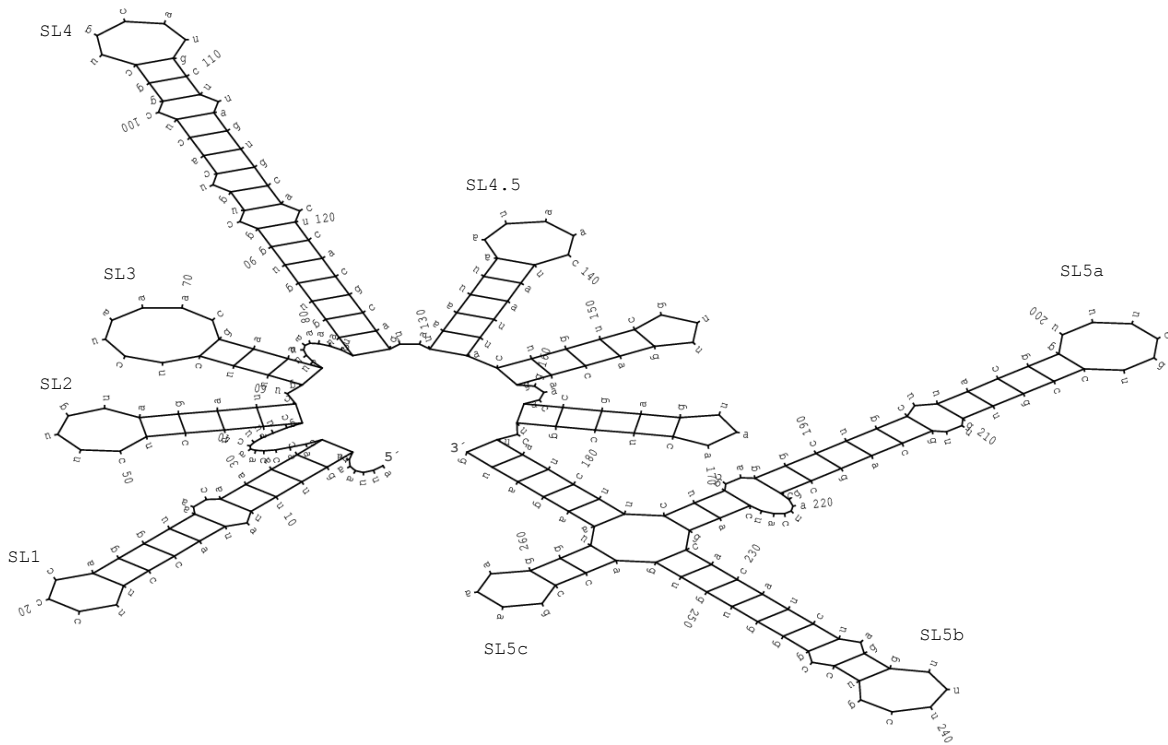


Abbildung 6.3 Sekundärstruktur der 5'-UTR (Pos. 1-268) von SARS-CoV-2. Die Berechnung der Sekundärstruktur der 5'-UTR wurde mittels mfold durchgeführt. Die ersten 268 Nukleotide der SARS-CoV-2-Referenzsequenz wurden verwendet ($\Delta G = -78,1$ kcal/mol).

pNL-TK-CoV2wt und pNL-TK-CoV2mt

Die Plasmide pNL-TK-CoV2wt und pNL-TK-CoV2mt wurden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, generiert. Die relevanten Restriktionsschnittstellen für diese Arbeit sind in der Plasmidkarte (Abb. 6.4) dargestellt. In Abbildung 6.5 ist die jeweilige 5'-UTR-Sequenz mit den entsprechenden Modifikationen gegenüber der Referenzsequenz (grün) sowie den Mutationen im uORF von pNL-TK-CoV2mt (rot) angegeben. Zudem sind Restriktionsschnittstellen zum Klonieren dieser Fragmente abgebildet, wobei die erste Restriktionsschnittstelle nicht in die Nummerierung einbezogen wurde, sodass die Nummerierung mit der Sekundärstruktur des klonierten Fragments in Abbildung 3.5 vergleichbar ist.

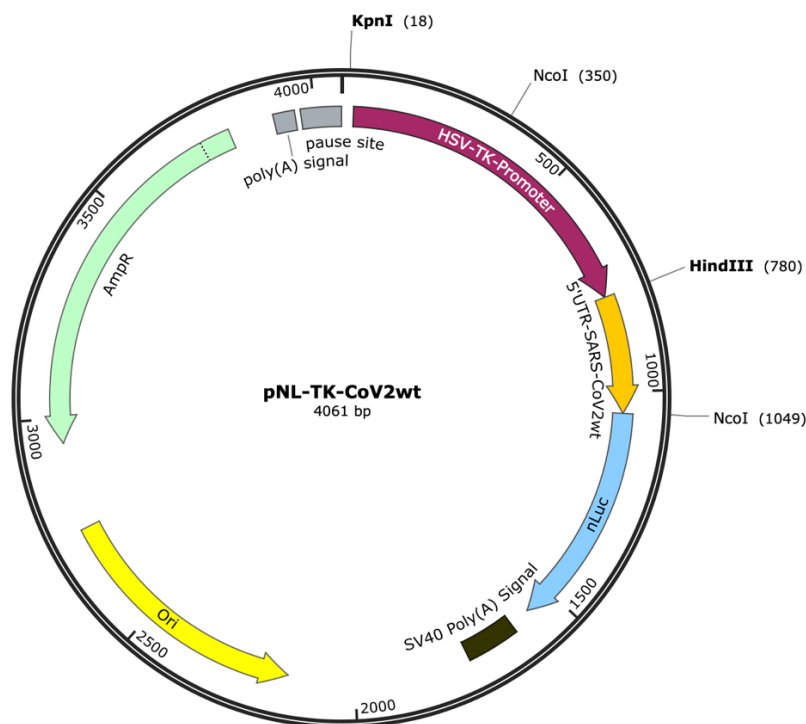


Abbildung 6.4 Vektorkarte des pNL-TK-CoV2wt Vektors. Abgebildet ist die rekombinante Expressionskassette bestehend aus dem HSV-TK-Promotor, der modifizierten 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2, dem Nano-Luciferasegen und dem Poly A-Signal. Zusätzlich enthält das Plasmid eine Ampicillinresistenz (AmpR) und einen *origin of replication* (Ori).

Anhang

A

```
          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
aagctttattaaagggtttataccttcccaggtaacaaaccaaccaactttcgatctctttagatctgttc
      70      80      90     100     110     120     130
          |      |      |      |      |      |
tctaaacgaactttaaaatctgtgtggctgtcactcggctgcaatgcttagtgcaactcacgcagtataatt
     140     150     160     170     180     190     200
          |      |      |      |      |      |
aataactaattactgtcgttgacaggacacgagtaactcgtctttggtctgcaggctgcttacggtttcg
     210     220     230     240     250     260
          |      |      |      |      |      |
tccgtgttgcagccgatcatcagcacatctagggtttcgtccgggtgtgtccgaaaggaaccatgg
```

B

```
          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
aagctttattaaagggtttataccttcccaggtaacaaaccaaccaactttcgatctctttagatctgttc
      70      80      90     100     110     120     130
          |      |      |      |      |      |
tctaaacgaactttaaaatctgtgtggctgtcactcggcagctagcttagtgcaactcacgcagtataatt
     140     150     160     170     180     190     200
          |      |      |      |      |      |
aataactaattactgtcgttgacaggacacgagtaactcgtctttggtctgcaggctgcttacggtttcg
     210     220     230     240     250     260
          |      |      |      |      |      |
tccgtgttgcagccgatcatcagcacatctagggtttcgtccgggtgtgtccgaaaggaaccatgg
```

Abbildung 6.5 Modifizierte 5'-UTR-Sequenzen aus pNL-TK-CoV2wt und -mt. Abgebildet sind die 5'-UTR-Sequenzen, die in den Vektoren pNL-TK-CoV2wt (A) und pNL-TK-CoV2mt (B) enthalten sind. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen: blau für HindIII und rot für NcoI. Grün,fett: Modifikationen bezogen auf die Referenzsequenz von SARS-CoV-2; rot, fett: Mutationen in pNL-TK-CoV2mt in Bezug auf pNL-TK-CoV2wt. Die Nummerierung schließt die erste Restriktionsstelle nicht mit ein.

Dosis-Wirkungskurven der ASOs

Für die ausgewählten ASOs aus Abbildung 3.7, die eine signifikante Hemmwirkung aufwiesen, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Die ASOs as35,21, as220,22 und as222,20 haben keine dosisabhängige Hemmwirkung gezeigt. Während die maximale Hemmung für as35,21 und as220,22 bei 100 nM 1 % und 25 % betrug, konnte für as222,20 keine Hemmung in Bezug auf den 0 nM Wert beobachtet werden. Die DW-Kurven für as203 und as240 hingegen, die in Kapitel 3.4.1.2 genauer beschrieben wurden, wiesen dosisabhängige Wirkungen auf und wurden für weitere Studien eingesetzt.

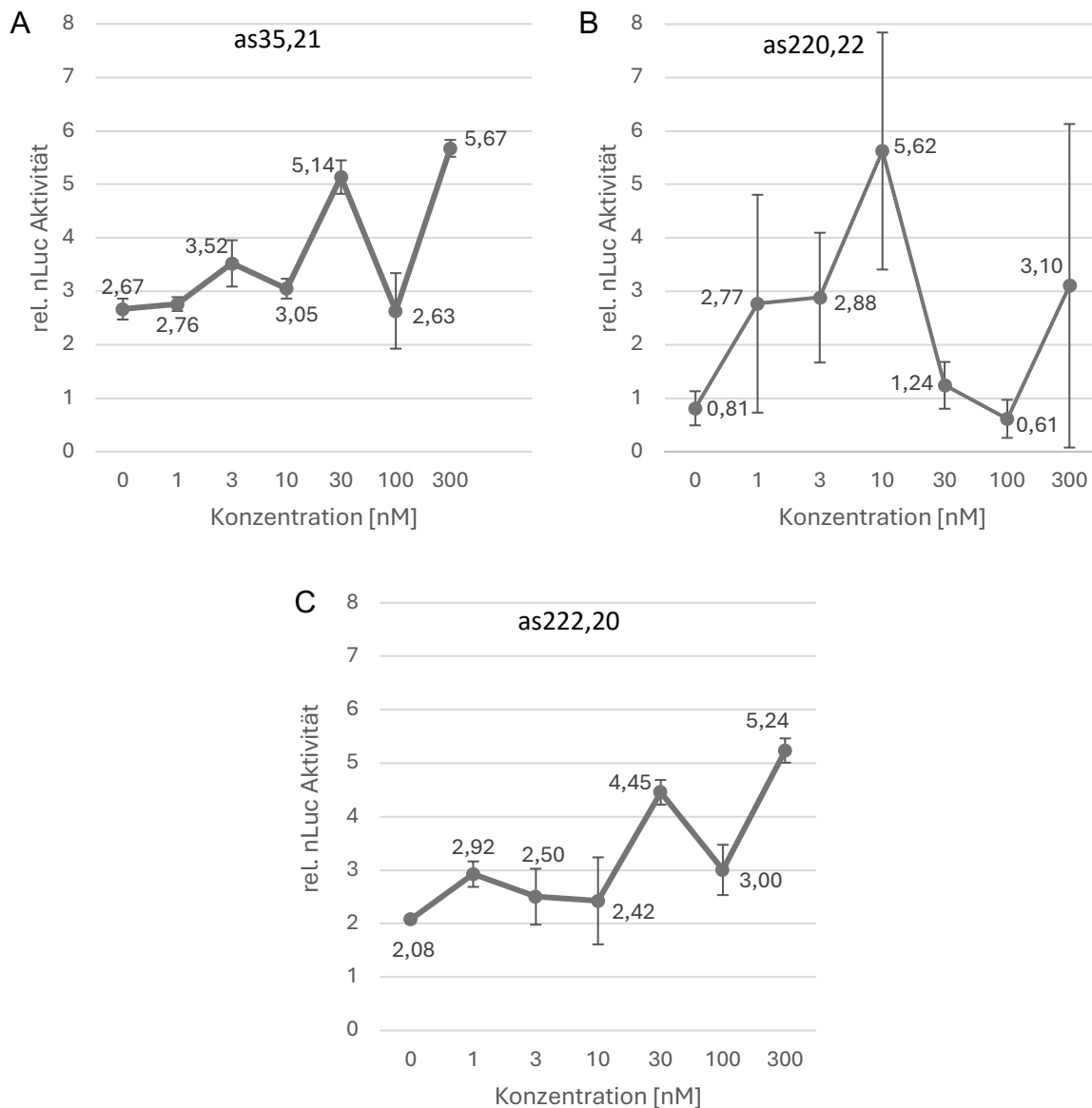


Abbildung 6.6 Dosis-Wirkungskurven für as35,21, as220,22 und as222,20 in HEK293T-Zellen. Die DW-Kurven wurden im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 300 nM mittels DLR-Assay gemessen. Das Signal des Nano-Luciferasegens aus pNL-TK-CoV2wt wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. A) DW-Kurve für as35,21 B) DW-Kurve für as220,22 C) DW-Kurve für as222,20. Es konnte keine Hemmwirkung nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Abbildung 6.7 zeigt eine Reproduktion der Dosis-Wirkungskurven für as203 und as240 im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 300 nM. Die Kurven wurden in HEK293T-Zellen im Testsystem mit pNL-TK-CoV2wt erstellt. In Abbildung 6.7 A führte die Zugabe von as203 zu einem Anstieg der relativen Luciferaseaktivität um 23 %. Erst bei 30 nM begann eine Abnahme der relativen Luciferaseaktivität, mit einer Hemmwirkung von 86 % bei 100 nM. Diese nahm mit einer Konzentration von 300 nM weiter zu und betrug 92 %. Der IC_{50} lag bei 30 nM. In Abbildung 6.7 B führte die Zugabe des ASOs as240 zunächst zu einem Anstieg der relativen Luciferaseaktivität um bis zu 62 %. Nach Erreichen von 10 nM folgte ein starker Abfall der Aktivität, mit einer Hemmwirkung von 80 % bei 100 nM. Der I_{max} von 90 % war bei 300 nM erreicht. Der IC_{50} betrug ebenfalls 30 nM (Abb. 6.7 B)

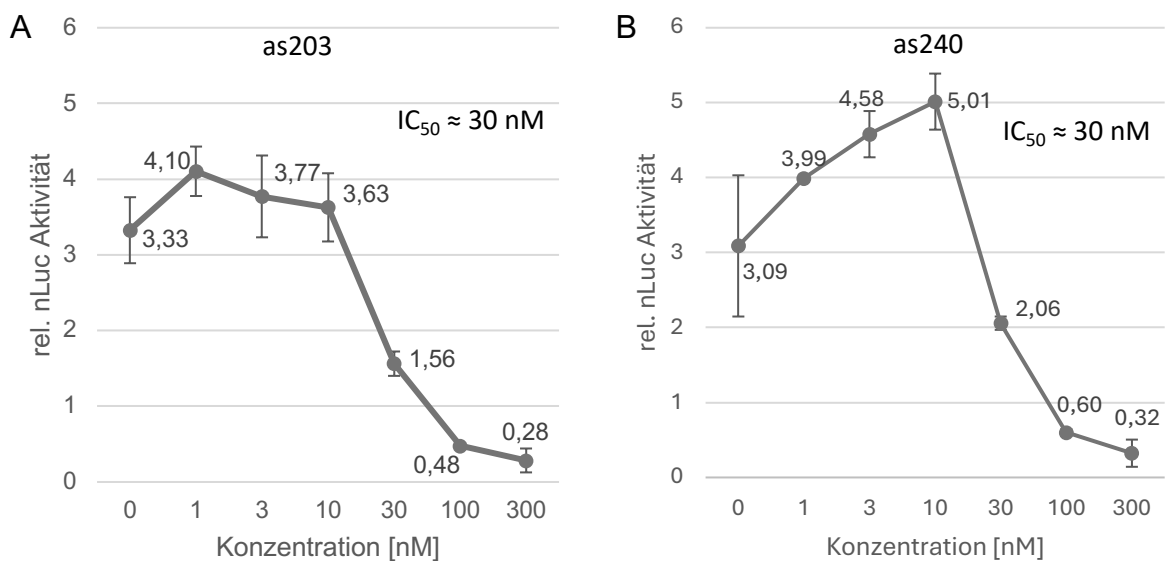


Abbildung 6.7 Dosis-Wirkungskurven für as203 und as240 in HEK293T-Zellen. Die DW-Kurven wurden im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 300 nM (A) bzw. 0,1 bis 100 nM mittels DLR-Assay gemessen. Das Signal des Nano-Luciferasesgens aus pNL-TK-CoV2wt wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. A) DW-Kurve für as203 mit einem durchschnittlichen I_{max} von 91 % und einem IC_{50} von 30 nM. B) DW-Kurve für as240 mit einem durchschnittlichen I_{max} von 90 % und einem IC_{50} von 30 nM. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

pHybrid-Replikon und mutierte Varianten

Das pHybrid-Replikon mit einer Länge von 32.467 bp ist in Abbildung 6.8 zusammen mit den relevanten Restriktionsschnittstellen für diese Arbeit dargestellt. Dieses Replikon sowie die mutierten Varianten pHybrid-Replikon_S144A und pHybrid-Replikon_Q189K wurden von der AG Hilgenfeld zur Verfügung gestellt und unterscheiden sich jeweils nur durch eine Punktmutation in der Mpro-Sequenz. Die jeweiligen Mpro-Sequenzen mit den zugehörigen Aminosäuren sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Die mutierten Basen und die zugehörigen Aminosäuren sind in rot markiert, während die betroffenen Basen und Aminosäuren in der Referenzsequenz (pHybrid-Replikon) grün hervorgehoben sind.

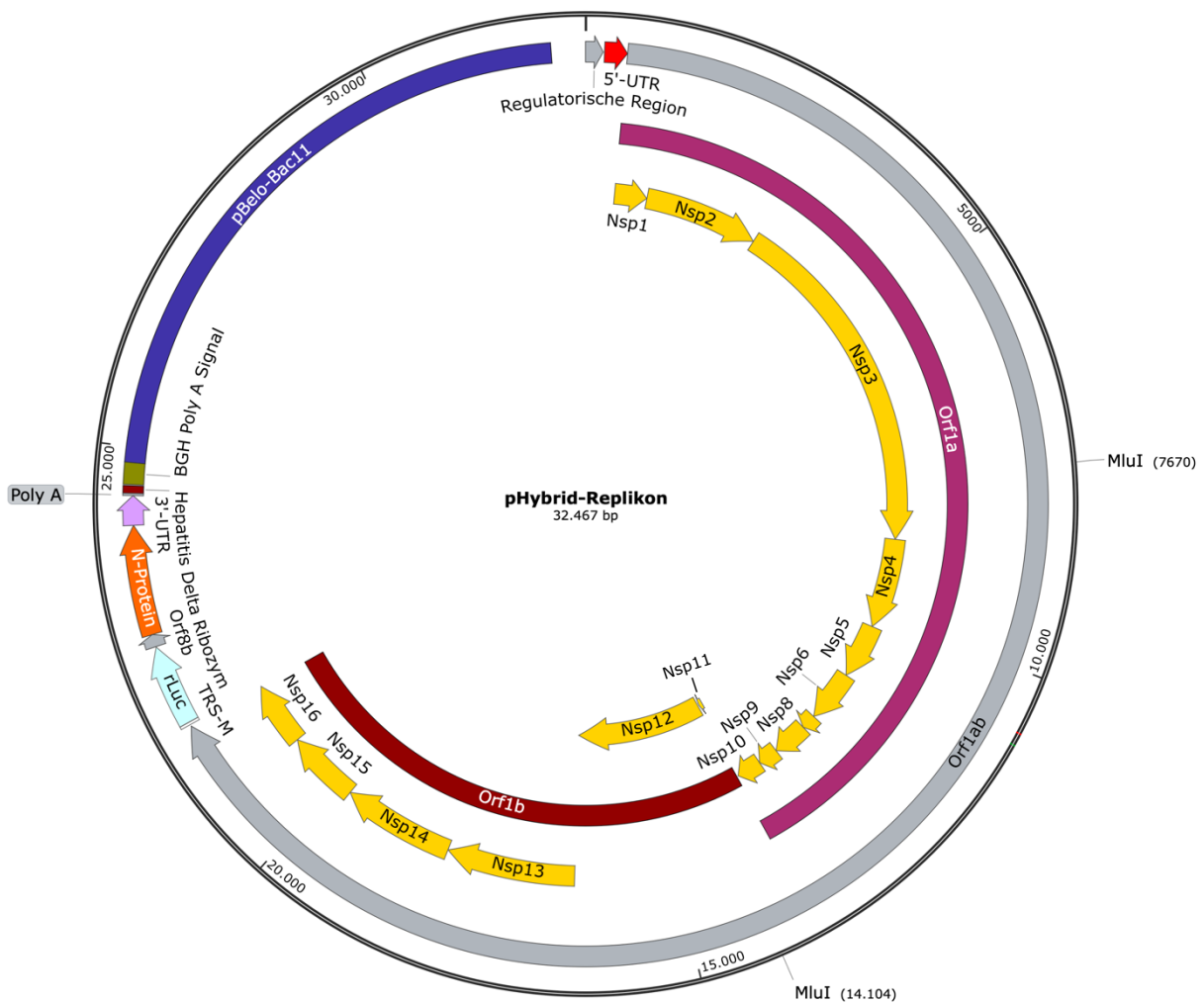


Abbildung 6.8 Vektorkarte des pHybrid-Replikons. Abgebildet sind die Bestandteile des pHybrid-Replikons beginnend mit der regulatorischen Region (enthält den CMV-Promoter), der 5'-UTR (*untranslated region*) und dem ORF1ab (*open reading frame 1ab*) des SARS-CoV-1 mit den *non-structural proteins* (Nsps) 1-16. Darauf folgen die Abschnitte TRS-M (*transcription regulatory sequence M*), Renillaluciferase (rLuc), ORF8b, N (Nukelokapsid)-Protein, 3'-UTR, eine synthetische Poly A-Sequenz, Hepatitis Delta Ribozym, BGH (*bovine growth hormone*)-Poly A Signal und pBelo-Bac11.

A

10.620	10.630	10.640
...TTC CTT AAT GGT T CA TGT GGT AGT GTT...		
F L N G S C G S V		
...TTC CTT AAT GGT G CA TGT GGT AGT GTT...		
F L N G A C G S V		

B

10.760	10.670	10.780
...TTT GTT GAC AGG C AA ACA GCA CAA GCA...		
... F V D R Q T A Q A		
...TTT GTT GAC AGG A AA ACA GCA CAA GCA...		
F V D R K T A Q A		

Abbildung 6.9 Ausschnitte aus der Mpro-Sequenz des pHybrid-Replikons und Vergleich mit den mutierten Varianten. Ausschnitte aus der Mpro-Sequenz und zugehörige Aminosäureabfolge. Die obere Sequenz ist jeweils dem pHybrid-Replikon entnommen. A) Sequenz aus pHybrid-Replikon_S144A. B) Sequenz aus pHybrid-Replikon_Q189K. Die mutierte Base sowie die zugehörige Aminosäure ist in rot und fett markiert. Das entsprechende Äquivalent im pHybrid-Replikon ist jeweils in grün und fett markiert.

Restriktionsanalyse von pHybrid-Replikon

Zur Überprüfung der DNA-Präparation von Plasmiden und Replikons wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt, das anschließend mittels Gelelektrophorese analysiert wurde. Abbildung 6.10 zeigt exemplarisch den Restriktionsverdau von zwei pHybrid-Replikon Klonen (Klon 1 und 2), die zeitgleich mit dem *Large-Construct* Kit (Kap. 2.2.3.3) aus *E.coli* DH10b isoliert wurden. Dabei wurde das Restriktionsenzym MluI (NEB) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Restriktionsschnittstellen liegen im ORF1ab (Abb. 6.8) und führen zur Bildung von zwei linearen Fragmenten der Größe 6434 bp und 26033 bp, die im 0,5 %-igen Agarosegel detektiert wurden.

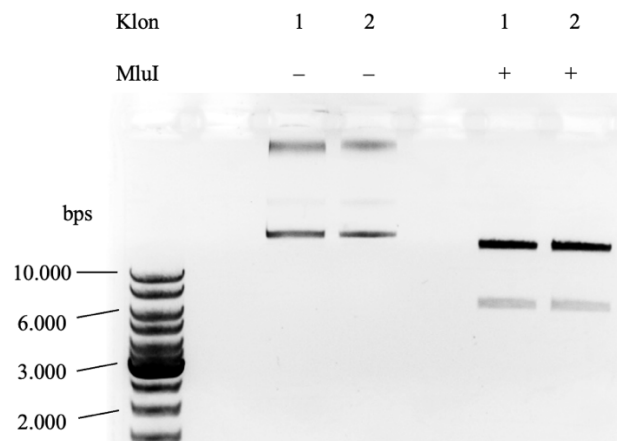


Abbildung 6.10 Gelelektrophoretische Überprüfung des Restriktionsverdaus von pHybrid-Replikon. Beispielhafte Abbildung zur Überprüfung eines Restriktionsverdaus des pHybrid-Replikons mittels MluI. 0,5 % Agarose, 1 mg/ml Ethidiumbromid unter Verwendung von 1x TAE als Laufpuffer und 5x DNA-Ladepuffer (Tab. 2.4). Marker: Gene Ruler DNA Ladder Mix (1,5 µg).

Dosis-Wirkungskurven für si203a und si240a

Abbildung 6.11 zeigt eine Reproduktion der Dosis-Wirkungskurven für si203a und si240a im Bereich von 1 nM bis 100 nM im Replikonsystem. In Abbildung 6.11 A führte die Zugabe von 1 nM si203a zu einer Abnahme der relativen Luciferaseaktivität um 57 % wobei mit 3 nM ein I_{\max} von 68 % erreicht wurde.

Die Zugabe von 1 nM si240a (Abb. 6.11 B) resultierte in einer steilen Abnahme der relativen Luciferaseaktivität um 83 % mit einem I_{\max} von 92 % bei 3 nM. Der IC_{50} für beide siRNAs lag unter 1 nM.

Konzentrationen über 3 nM zeigten keine zusätzliche Hemmwirkung. Stattdessen stieg die relative Luciferaseaktivität in beiden Fällen an, sodass für weitere DW-Kurven mit si203a und si240a (Abb. 3.32) Wertebereiche unter 10 nM gewählt wurden.

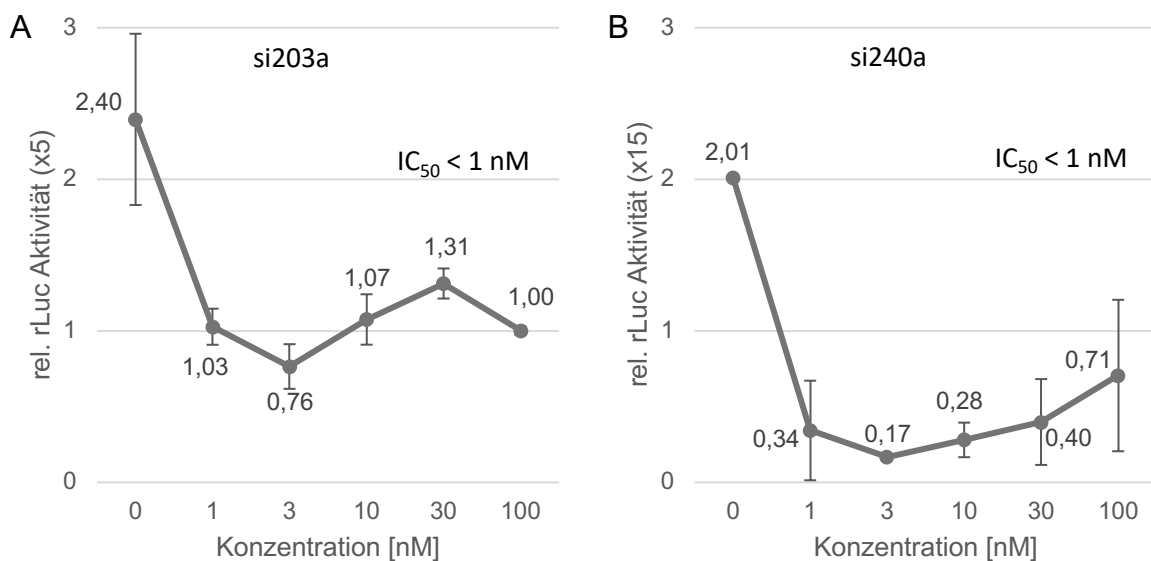


Abbildung 6.11 Dosis-Wirkungskurven für si203a und si240a in HuhT7-Zellen. Die DW-Kurven wurden im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 nM mittels DLR-Assay gemessen. Das Signal des Nano-Luciferasegens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Konzentration in Nanomolar aufgetragen. A) DW-Kurve für si203a mit einem durchschnittlichen I_{\max} von 68 % und einem $IC_{50} < 1$ nM. B) DW-Kurve für si240a mit einem durchschnittlichen I_{\max} von 92 % und einem $IC_{50} < 1$ nM. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Sequenzierung des subgenomischen Transkriptes

Um die Entstehung und Integrität des subgenomischen Transkriptes aus dem pHybrid-Replikon zu überprüfen, wurde eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt (Abb. 6.12). Hierfür wurden die Primer UTR-rep-fwd2 (A) und rLuc-rev (B) verwendet, die zuvor in der RT-qPCR-Analyse (Kap. 3.5.4.2) eingesetzt wurden. Das Primerpaar bindet von Position 231 bis 21.815 im pHybrid-Replikon und umfasst die *Leader*sequenz sowie die rLuc-Sequenz mit einem 138 nts langen Amplikon. Das Amplikon kann nur entstehen, wenn die *Leader*sequenz durch diskontinuierliche Transkription an die rLuc-Sequenz angehängt wird. Mutationen sind in rot und fett markiert, die entsprechenden Basen in der Referenzsequenz sind grün und fett hervorgehoben. Die Sequenzierung ergab, dass die diskontinuierliche Transkription des pHybrid-Replikons stattfindet, da die Fusionierung der *Leader*sequenz an die rLuc-Sequenz nachgewiesen werden konnte. Es wurde lediglich eine Mutation in der rLuc-Sequenz (G→A) gefunden.

A		10	20	30	40	50	60
Ref.	TACCTACCCAGGAAAAGCCAACCAACCTCGATCTCTTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAAC						
sg_fwd	-----ATCAACTCTTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAAC						
		70	80	90	100	110	120
Ref.	TAACTATTATTATACCATGGCTTCGAAAGTTTATGATCCAGAACAAAGGAAACGGATGAT						
sg_fwd	TAACTATTATTATACCATGGCTTCGAAAGTTTATGATCCAGAACAAAGGAAACGGATGAT						
		130	140				
Ref.	AACTGGTCCGCAGTGGTG-----						
sg_fwd	AACTGGTCCGCAGTGGTGAATTT						

Anhang

B	10	20	30	40	50	60
Ref.	----TACCTACCCAGGAAAAGCCAACCAACCTCGATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAAC					
sg_rev	GGCTTACCTACCCAGGAAAAGCCAACCAACCTCGATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAAC					
	70	80	90	100	110	120
Ref.	GAACTAACTATTATTATACCATGGCTTCGAAAGTTTATGATCCAGAACAAGGGAAACGGA					
sg_rev	GAACTAACTATTATTATACCATGGCTTCGAAAGTTTATGATCCAGAACCACACCTA---					
	130	140				
Ref.	TGATAACTGGTCCGCAGTGGTG					
sg_rev	-----					

Abbildung 6.12 Alignment des subgenomisches Transkripts aus pHybrid-Replikon. Alignment der sequenzierten sgRNA nach Amplifikation mittels RT-qPCR mit der Referenzsequenz aus dem Replikon. Zum Sequenzieren wurden die Primer UTR-rep-fwd2 (A) und rLuc-rev (B) verwendet. Rot, fett: *mismatches*; grün, fett: betroffene Bereiche in der Referenzsequenz (Ref.); schwarz, fett: Startcodon der Renilla-Luciferase.

DW-Kurven der *small molecule antiviral drugs*

Die in dieser Arbeit verwendeten *small molecules* Nirmatrelvir, Ensitrelvir und 13b-K wurden von der AG Hilgenfeld zur Verfügung gestellt. Die AG Hilgenfeld hatte zuvor die Dosis-Wirkungsbeziehung dieser Wirkstoffe im pHybrid-Replikonsystem untersucht und IC_{50} ermittelt. Die entsprechenden Kurven wurden ebenfalls zur Verfügung gestellt und sind in Abbildung 6.13 unmodifiziert dargestellt. Die *small molecules* wurden mit den entsprechenden IC_{50} , die in Tabelle 3.10 zusammengefasst sind, verwendet, wobei sich der Wert für 13b-K (1,75 μM) als Mittelwert der IC_{50} in Abbildung 6.13 C und D zusammensetzt.

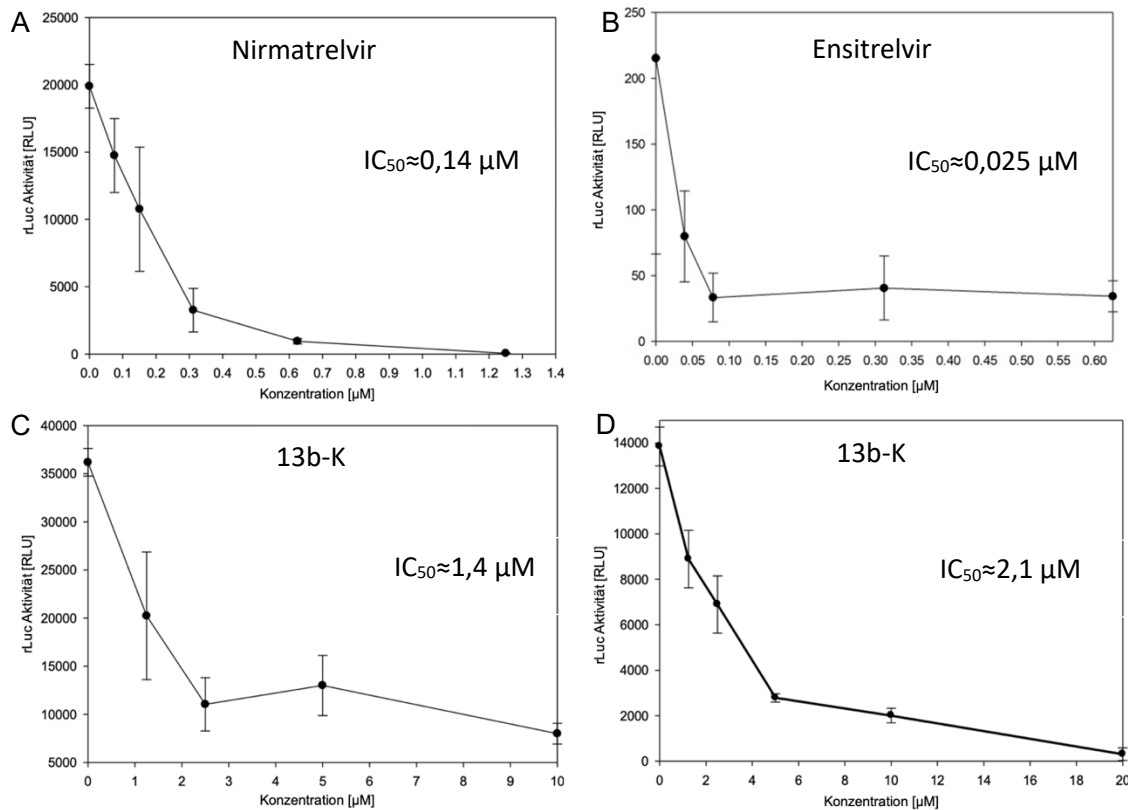


Abbildung 6.13 Dosis-Wirkungskurven der *small molecule antiviral drugs*. Für die *small molecules* Nirmatrelvir (A), Ensitrelvir (B) und 13b-K (C-D) wurden mittels DLR-Assay Dosis-Wirkungskurven im pHybrid-Replikonsystem erstellt und die Renilla-Luciferaseaktivität gegen die Konzentration in Mikromolar aufgetragen. Die IC_{50} betragen für Nirmatrelvir 0,14 μM , für Ensitrelvir 0,025 μM und für 13b-K 1,4 μM (C) und 2,1 μM (D). RLU: *relative light units*.

Kombination der Wirkstoffe

Die DW-Kurven für si203a und si240a in Kombination mit den Wirkstoffen Nirmatrelvir und Ensitrelvir wurden im pHybrid-Replikonsystem reproduziert und in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Hierbei sind die I_{\max} sowie IC_{50} für die entsprechenden Kombinationen angegeben. Es wurde gezeigt, dass der Einsatz von NMV den I_{\max} und IC_{50} für beide siRNAs verbessert. Die IC_{50} für si203a und si240a einzeln lagen bei jeweils 1 nM, während die Zugabe von NMV diese auf 0,03 nM verbesserte. Der I_{\max} erhöhte sich für si203a von 67 % auf 90 % und für si240a von 79 % zu 91 %. Die Kombination von ENS mit si203a zeigte keine dosisabhängige Hemmung, während die Kombination von ENS mit si240a den I_{\max} um 12 % verbesserte und den IC_{50} von 0,1 nM zu 0,03 nM senkte.

Tabelle 6.1 Tabellarische Darstellung der I_{\max} und IC_{50} von si203a und si240a in Kombination mit *small molecules*. Angegeben sind I_{\max} in Prozent und IC_{50} in Nanomolar, die anhand von DW-Kurven für si203a und si240a einzeln und in Kombination mit *small molecules* ermittelt wurden. Die Kurven wurden mit DLR-Assays im pHybrid-Replikonsystem erstellt.

siRNA	<i>small molecule</i>	I_{\max} [%]	IC_{50} [nM]
si203a	-	67	0,1
	Nirmatrelvir	90	0,03
	Ensitrelvir	32	-
si240a	-	78	0,1
	Nirmatrelvir	91	0,03
	Ensitrelvir	90	0,03

In Kapitel 3.5.4.2 wurde die Hemmwirkung der siRNAs si203a und si240a sowohl einzeln als auch in Kombination mit den *small molecules* im pHybrid-Replikonsystem auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR-Analyse untersucht. Für die Proben 13b-K und NMV+si203 konnten keine Werte erfasst werden. Daher wurde die RNA für diese Proben erneut nach dem gleichen Prinzip isoliert und die RT-qPCR-Analyse wiederholt. Bei der Wiederholung für 13b-K wurden die Werte für NMV und ENS zum Vergleich mitgeführt, während bei der Wiederholung der Proben NMV+si203 in Kombination die Proben mit den Wirkstoffen einzeln zum Vergleich mitgeführt wurden. Diese sind in Abbildung 6.14 dargestellt.

Anhang

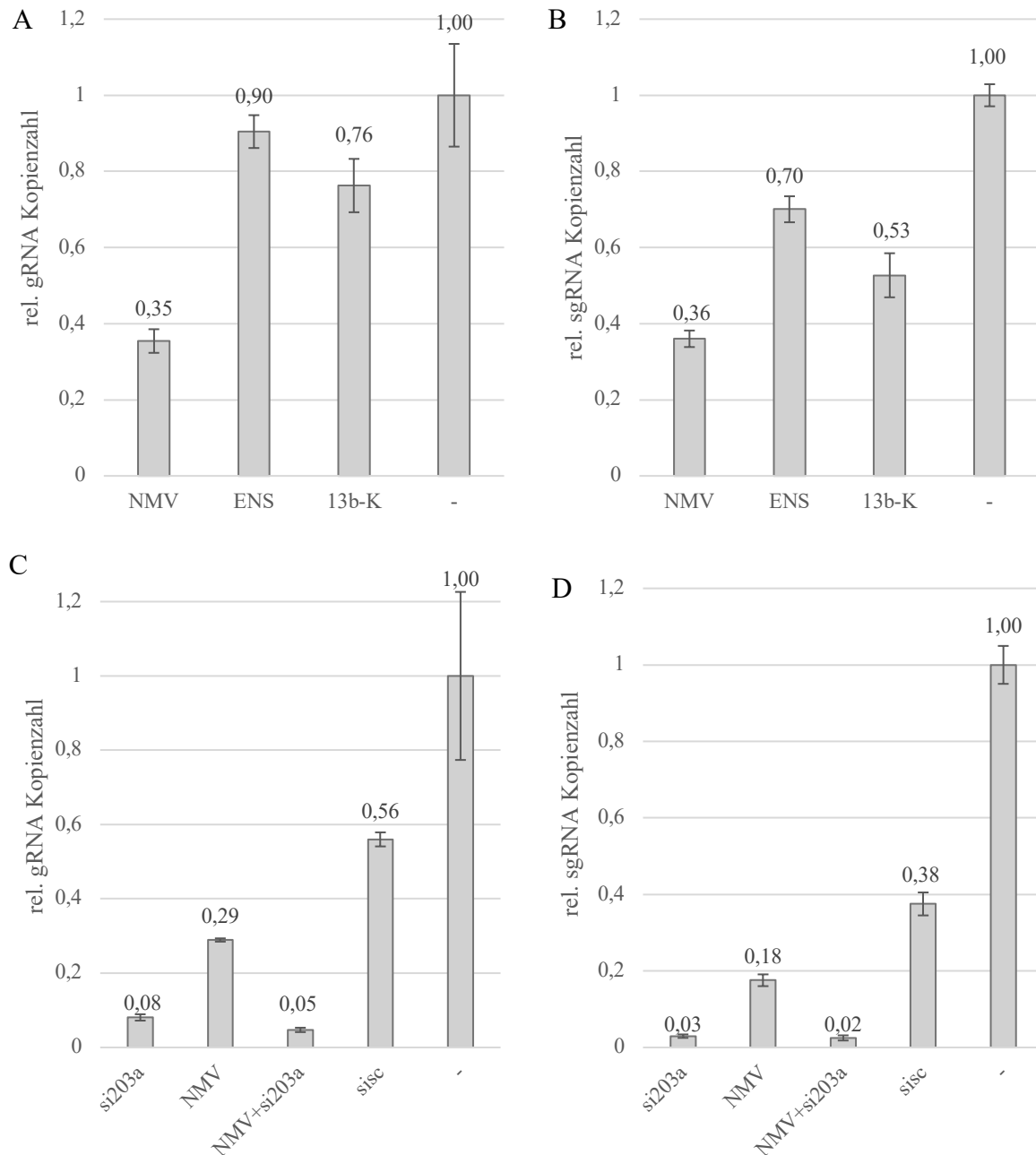


Abbildung 6.14 Nachtrag zur Messung der Hemmaktivität der siRNAs in Kombination mit den *small molecules* auf RNA-Ebene. Die Wirkstoffe Nirmatrelvir (NMV), Ensitrelvir (ENS) und 13b-K wurden mit den IC_{50} von 140 nM, 25 nM, 1,75 μ M im Replikonsystem in HuhT7-Zellen transfiziert (A, B). Die Wirkstoffe si203a und Nirmatrelvir (NMV) wurden einzeln und in Kombination mit den IC_{50} von 1 nM und 140 nM in HuhT7-Zellen transfiziert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich sisc transfiziert (C, D). 10 ng cDNA wurde zwei Mal in Vierfachbestimmung mittels RT-qPCR quantifiziert und die mRNA Kopienzahl (2^{40-ct}) des rLuc-Transkriptes mit der mRNA Kopienzahl des fLuc-Transkriptes normalisiert. „-“: Probe ohne siRNA, die zum Normieren der Daten verwendet wurde. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von vier technischen Replikaten aus der RT-qPCR-Analyse.

Sekundärstruktur der 5'-UTR mit der nLuc-Sequenz aus pNL-TK-CoV2wt

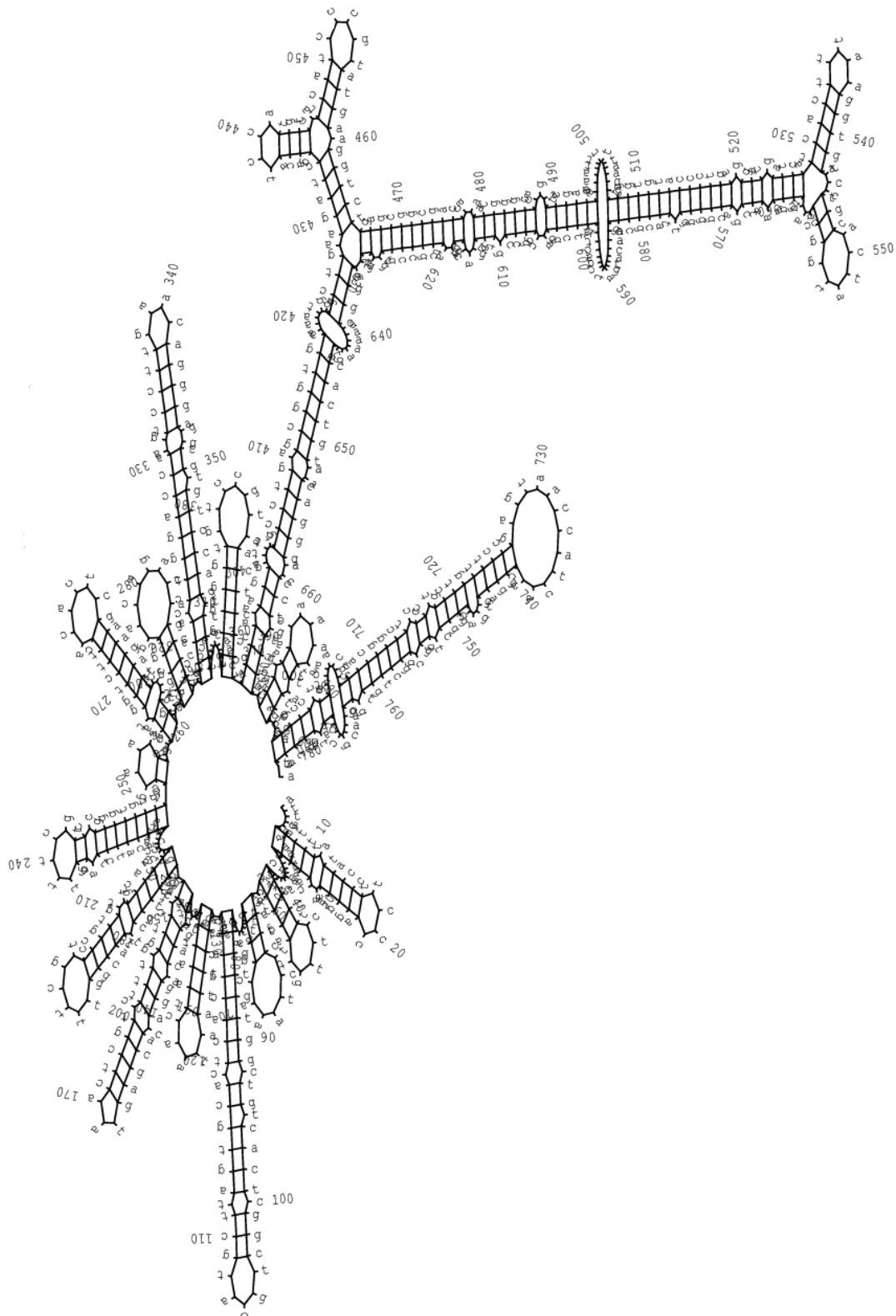


Abbildung 6.15 Sekundärstruktur der 5'-UTR mit der nLuc-Sequenz aus pNL-TK-CoV2wt. Die Berechnung der Sekundärstruktur der 5'-UTR mit der nLuc-Sequenz wurde mittels mfold durchgeführt. Dieser verwendete Bereich des Plasmids umfasst die ersten 781 Nucleotide wobei Position 1-265 der 5'-UTR entsprechen und Position 266-781 der Nano-Luciferase ($\Delta G = -236$ kcal/mol).

Zeitabhängiger Einfluss der siRNAs auf die Hemmwirkung der *small molecules* als Balkendiagramme

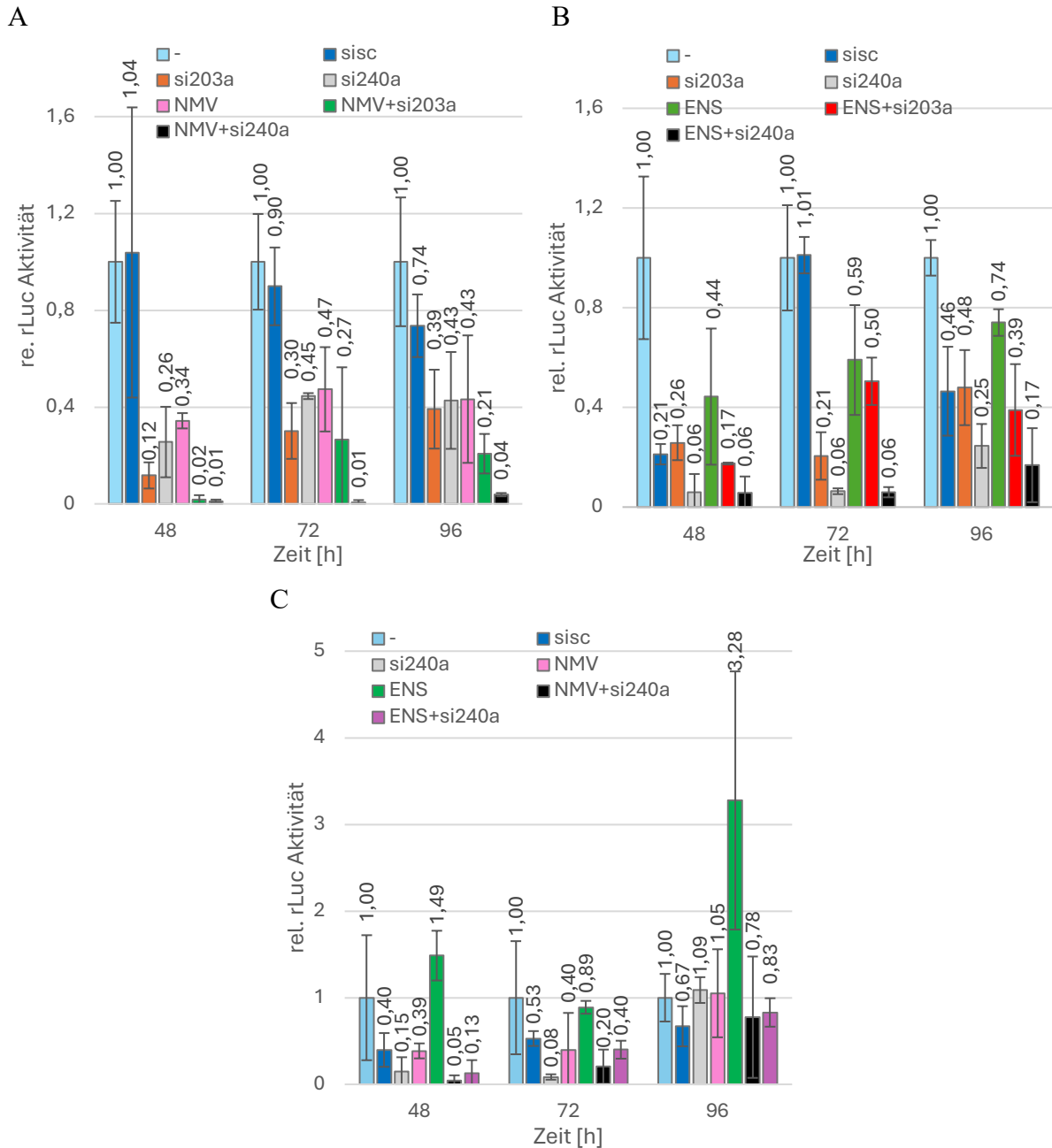
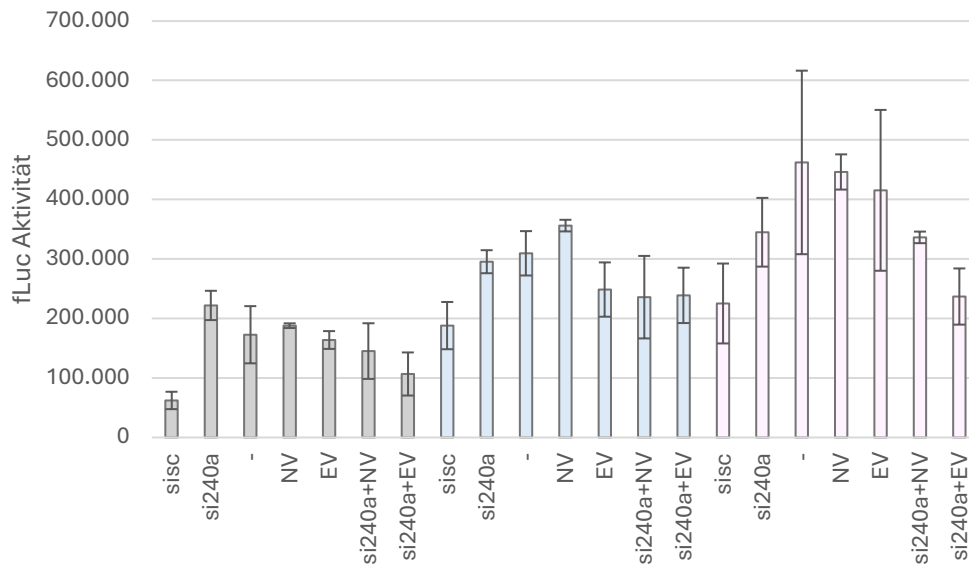


Abbildung 6.16 Zeitabhängige Hemmung von si203a und si240a in Kombination mit NMV und ENS in HuhT7-Zellen. Die Werte wurden über einen Zeitraum von 96 h im 24 h Intervall mittels DLR-Assay erhoben. Das Signal des Renilla-Luciferasesgens wurde auf das Firefly-Luciferasesignal normalisiert und gegen die Zeit in Stunden aufgetragen. Die *small molecules* wurden mit den IC₅₀ (NMV: 140 nM; ENS: 25 nM) und die siRNAs mit 1 nM in HuhT7-Zellen im pHybrid-Replikonsystem transfiziert. A) Kombination der siRNAs mit NMV. B) Kombination der siRNAs mit ENS. C) Kombination von si240a mit NMV und ENS. Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

Rohdaten für die mutierten Varianten des pHybrid-Replikons

A



B

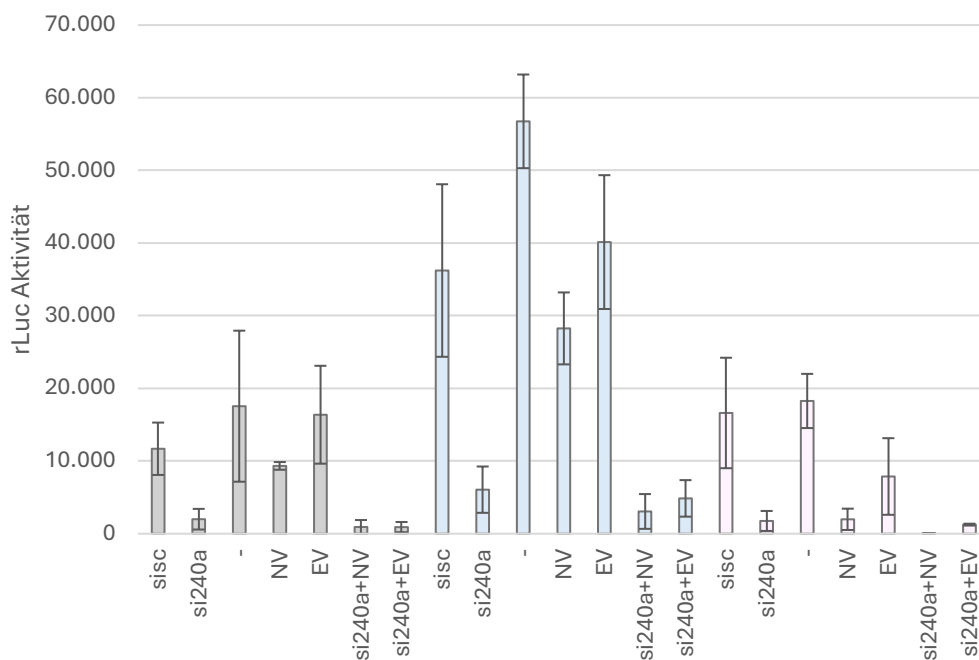


Abbildung 6.17 Vergleich der Wirksamkeit von si240a, NMV und ENS einzeln und in Kombination auf Proteinebene in HuhT7-Zellen als Rohwerte. Die Wirkstoffe si240a, Nirmatrelvir (NMV) und Ensitrelvir (ENS) wurden mit 1 nM, 140 nM, 25 nM (IC₅₀) in HuhT7-Zellen jeweils einzeln und in Kombination im pHybrid-Replikonsystem transfiziert. Zur Kontrolle der siRNA wurde sisc transfiziert. Die Messung erfolgte mittels DLR-Assay. A) Aktivität der Firefly-Luciferase in RLU (*relative light units*). B) Aktivität der Renilla-Luciferase in RLU. Grau: pHybrid-Replikon (wt), blau: pHybrid-Replikon_S144A (S144A), rosa: pHybrid-Replikon_Q189K (Q189K). Die Fehlerbalken errechnen sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte von sechs technischen Replikaten aus der Luciferasemessung.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
+ssRNA	positiv polarisierte einzelsträngige RNA
-ssRNA	negativ polarisierte einzelsträngige RNA
3CLpro	<i>3C-Like protease</i>
A	Absorption; Adenin; Alanin
Abb.	Abbildung
ACC	<i>accession</i>
ACE2	<i>Angiotensin Converting Enzyme 2</i>
ACTR3C	<i>Actin Related protein 3C</i>
AG	Arbeitsgruppe
Ago	Argonaut
AmpR	Ampicillinresistenz
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASO	Antisense-Oligonukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
BGH	<i>Bovine growth hormone</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
BP	Bandpassfilter
BPB	Bromphenolblau
BRSK2	<i>Brain selective serine/threonine kinase 2</i>
BSL	<i>Bulged Stem-Loop</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cystein; Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
ch.	<i>chapter</i>
CH	<i>central helix</i>
CLSTN3	Calsyntenin 3
cm	Centimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COA7	<i>Cytochrome c oxidase assembly factor 7</i>
COVID-19	<i>Corona virus disease-2019</i>
CS	<i>Conserved sequence</i>

Anhang

C _t	<i>Cycle threshold</i>
CT	<i>Cytoplasmic tail</i>
CTD	<i>C-terminale Domäne</i>
CTZ	Coelenterazine
Cys	Cystein
d	Schichtdicke
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DAR	<i>Downstream AUG Region</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLR	Dual Luciferase Reporter
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dTdT	Desoxythymidindinukleotid
DW	Dosis-Wirkung
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E	Effizienz; <i>Envelope</i> ; Expressionsniveau
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEF1A	<i>eukaryotic Elongation Factor 1A</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ENS	Ensitrelvir
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	endoplasmatisches Retikulum-Golgi-Interkompartiment
<i>et al.</i>	und andere
EtBr.	Ethidiumbromid
ExoN	Exoribonuklease
F	Phenylalanin
FCS	fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ; Fluoresceindiacetat
fLuc	Firefly-Luciferase
FP	Fusionspeptid

Anhang

FPPR	<i>fusion-peptide proximal region</i>
FT	Strahlenteiler
fwd	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung; Gramm
G	Glycin; Guanin
G418	Geneticin
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
gRNA	genomische RNA
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HiDi	Hydroxylamin-Dihydrochlorid
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HR	<i>Heptad-Repeat</i>
HSV-TK	Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase
IBV	<i>Avian Infectious Bronchitis Virus</i>
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IDR	<i>intrinsic disordered region</i>
IFN	Interferon
I _{max}	maximal mögliche Hemmung
IMM	Institut für Molekulare Medizin
IQCB1	<i>IQ motif containing B1</i>
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle
K	Lysin
Kap.	Kapitel
L	Leucin; Liter
LB	<i>Luria Broth</i>
LFP	lokales Faltungspotenzial
LKR	<i>linker region</i>
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
LNP	Lipid-Nanopartikel
LOC	Lokus
m	Meter; <i>milli</i> ; Steigung
μ	<i>mikro</i>
M	Membran; Molar
mAb	<i>monoclonal Antibodies</i>
MARCHF4	<i>Membrane associated ring-ch-type finger 4</i>
MERS-CoV	<i>Middle east respiratory syndrome coronavirus</i>

Anhang

MHV	Maus Hepatitis Virus
min	Minute
miRNA	<i>micro</i> -RNA
MOE	Methoxyethyl
MON1B	<i>Monensin-sensitive 1 homolog B</i>
Mpro	<i>Main protease</i>
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mt	mutiert
MTHFSD	<i>Methenyltetrahydrofolate synthetase domain</i>
MYO5B	<i>Myosin VB</i>
n	nano; Stichprobenanzahl
N	Asparagin; Nukleokapsid
NARS1	<i>AsparaginyI-tRNA synthetase 1</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
ncRNA	<i>noncoding</i> RNA
NF-κB	nuklearer Faktor Kappa B
nLuc	Nano-Luciferase
NLR	<i>NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain)-Like Receptor</i>
NLRP3	<i>NLR Family Pyrin Domain Containing 3</i>
NMV	Nirmatrelvir
noRT	Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase
Nsp	<i>Non-structural protein</i>
nt	Nukleotid
NTC	<i>Non-Template Control</i>
NTD	N-terminale Domäne
OMe	O-Methylierung
Ori	<i>Origin of replication</i>
Orf	<i>Open reading frame</i>
p	Plasmid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PANGO	<i>Phylogenetic assignment of named global outbreak</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin-Hydrobromid
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PK	Pseudoknot
PL ^{pro}	<i>Papain-like protease</i>
Pos.	Position

Anhang

pp	Polyprotein
PPi	Diphosphat
pre-mRNA	<i>precursor-mRNA</i>
PRKAR1B	<i>Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit beta</i>
PS/PTO	Phosphorothioate
Q	Glutamin
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	Arginin
RBD	RNA-Bindungsdomäne
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
Ref.	Referenz
rel.	relativ
rev	<i>reverse</i>
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	relative Lichteinheiten
rLuc	Renilla-Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	<i>real time</i> ; reverse Transkriptase
RTC	<i>Replikation transkription complex</i>
s	Standardabweichung
S	Serin; Spike
S2'	<i>Second protease cleavage site</i>
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus</i>
sc oder scr	<i>scramble</i>
sek	Sekunde
SEN3	<i>SUMO specific peptidase 3 scramble</i>
sfRNA	subgenomische Flavivirus-RNA
sgRNA	subgenomische RNA
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SL	<i>Stem-Loop</i>
<i>small molecule</i>	<i>small molecule antiviral drug</i>
SMG9	<i>nonsense mediated mRNA decay factor</i>
SNAP91	<i>Synaptosome associated protein 91</i>

Anhang

sncRNAs	<i>small non-coding RNAs</i>
SNORD126	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 126</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
T	Threonin; Thymin; Zielstruktur; Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
TM	<i>Transmembrane anchor</i>
TMD	Transmembrandomäne
TMEM114	<i>Transmembrane protein 114</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease serine subtype 2</i>
Tris	α, α, α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
tRNA	transfer RNA
TRS	transkriptionsregulatorische Sequenz
U	<i>unit</i> ; Uracil
UAR	<i>Upstream AUG region</i>
UDG	Uracil-DNA-Glykosidase
uORF	<i>upstream open reading frame</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt; Valin
v/v	Volumen pro Volumen
VOC	<i>Variant of concern</i>
VOI	<i>Variant of interest</i>
VWF	Von-Willebrand-Faktor
w	<i>width</i> (Fensterweite)
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	<i>World health organisation</i>
WNV	West-Nil-Virus
wt	Wildtyp
XC	Xylencyanol
z.B.	zum Beispiel

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Taxonomie der Ordnung Nidoviridae bis zum Genus der Betacoronaviren.....	6
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Viruspartikels von SARS-CoV-2.....	8
Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Untereinheiten des S-Proteins.	9
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Genomstruktur von SARS-CoV-2.	11
Abbildung 1.5 Sekundärstrukturvorhersage der 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2.....	14
Abbildung 1.6 Replikationszyklus von SARS-CoV-2.....	17
Abbildung 2.1 Biolumineszenzreaktion der Firefly-, Renilla und Nano-Luciferase.	49
Abbildung 3.1 Sekundärstrukturvorhersage der 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2 und Zielgene....	67
Abbildung 3.2 Faltungspotenzial der 5'-UTR von SARS-CoV-2.	72
Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Designs der Antisense-Oligonukleotide.....	74
Abbildung 3.4 Schematisches Transfektionsprotokoll für das vorliegende Testsystem.....	78
Abbildung 3.5 Ausschnitt aus dem pNL-TK-CoV2wt-Vektor und vergrößerte 5'-UTR.....	79
Abbildung 3.6 Vitalitätsmessung von HEK293T-Zellen nach Behandlung mit ASOs.....	80
Abbildung 3.7 Vergleich der Hemmwirkung ausgewählter ASOs.	81
Abbildung 3.8 Dosis-Wirkungskurven für die ausgewählten ASOs in HEK293T-Zellen..	83
Abbildung 3.9 Untersuchung der RNase H-Aktivität..	86
Abbildung 3.10 Kombination der ASOs as203 und as240.	87
Abbildung 3.11 Messung der Hemmaktivität auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene. ..	89
Abbildung 3.12 Messung der Hemmaktivität auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene. ..	90
Abbildung 3.13 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs auf Proteinebene in HEK293T- und ECV304-Zellen.	94
Abbildung 3.14 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs auf Proteinebene in HeLa-Zellen.....	95
Abbildung 3.15 Dosis-Wirkungskurven für die ausgewählten siRNAs in HEK293T-Zellen..	97
Abbildung 3.16 Dosis-Wirkungskurven für die ausgewählten siRNAs in ECV-Zellen.....	98
Abbildung 3.17 Kombination der siRNAs si203 und si240..	99
Abbildung 3.18 Einfluss einer Punktmutation auf die Wirksamkeit von as240 auf Proteinebene in HEK293T-Zellen.....	101
Abbildung 3.19 Einfluss von Punktmutationen auf die Wirksamkeit von si240 und as240 auf Proteinebene in HEK293T-Zellen.....	102
Abbildung 3.20 Messung der Hemmaktivität der siRNAs auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene in HEK293T-Zellen.....	104
Abbildung 3.21 Messung der Hemmaktivität der siRNAs auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene in HeLa.	105
Abbildung 3.22 Ausschnitt aus der Sekundärstrukturvorhersage der 5'-UTR-Sequenz von SARS-CoV-2.....	106
Abbildung 3.23 Konzentrationsreihe zur Ermittlung der Translationseffizienz in HEK293T-Zellen.	107
Abbildung 3.24 Schematische Darstellung vom pHybrid-Replikon mit allen Transkripten und synthetisierten Proteinen.	110
Abbildung 3.25 Sekundärstrukturmodelle der 5'-UTR von SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2.....	111
Abbildung 3.26 Darstellung des Alignments der ersten 270 Nukleotide aus der SARS-CoV-1-Sequenz des pHybrid-Replikons und der Referenzsequenz (NC_045512.2) von SARS-CoV-2.....	113
Abbildung 3.27 Transkriptionseffizienz des Gesamtlängentranskriptes..	115

Anhang

Abbildung 3.28 CMV-gesteuerte Transkription verglichen zur RdRp-gesteuerten Transkription.	117
Abbildung 3.29 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs auf Proteinebene in HEK293T-Zellen.	118
Abbildung 3.30 Vergleich der Wirksamkeit der ASOs auf Proteinebene in HEK293T-Zellen.	119
Abbildung 3.31 Dosis-Wirkungskurven für die ausgewählten siRNAs in HEK293T-Zellen.	120
Abbildung 3.32 Dosis-Wirkungskurven für si203a und si240a in HuhT7-Zellen.	121
Abbildung 3.33 Messung der Hemmaktivität der siRNAs auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene.	123
Abbildung 3.34 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs und small molecules auf Proteinebene in HuhT7-Zellen.	125
Abbildung 3.35 Vergleich der Wirksamkeit der siRNAs und small molecules einzeln und in Kombination auf Proteinebene in HuhT7-Zellen.	126
Abbildung 3.36 Messung der Hemmaktivität der siRNAs in Kombination mit den small molecules auf RNA-Ebene und Vergleich mit der Proteinebene.	130
Abbildung 3.37 Dosis-Wirkungskurven für si240a in HuhT7-Zellen in Kombination mit NMV und ENS.	132
Abbildung 3.38 Dosis-Wirkungskurven für si203a in HuhT7-Zellen in Kombination mit NMV und ENS.	133
Abbildung 3.39 Zeitabhängige Hemmung von si203a und si240a in Kombination mit NMV und ENS in HuhT7-Zellen.	136
Abbildung 3.40 Vergleich der Wirksamkeit von si240a, NMV und ENS einzeln und in Kombination auf Proteinebene in HuhT7-Zellen.	137
Abbildung 3.41 Sekundärstrukturvorhersage der 5'- und 3'-UTR-Sequenz des West-Nil-Virus.	140
Abbildung 3.42 Sekundärstrukturvorhersage der 5'- und 3'-UTR-Sequenz des West-Nil-Virus und Zielgene.	141
Abbildung 4.1 Potenzielle Spaltstellen der ASOs as203 und as240 mittels RNase H.	152
Abbildung 6.1 Alignment der 5'-UTRs der VOCs von SARS-CoV-2.	199
Abbildung 6.2 Sekundärstrukturen der 5'-UTR der VOCs von SARS-CoV-2.	203
Abbildung 6.3 Sekundärstruktur der 5'-UTR (Pos. 1-268) von SARS-CoV-2.	204
Abbildung 6.4 Vektorkarte des pNL-TK-CoV2wt Vektors.	205
Abbildung 6.5 Modifizierte 5'-UTR-Sequenzen aus pNL-TK-CoV2wt und -mt.	206
Abbildung 6.6 Dosis-Wirkungskurven für as35,21, as220,22 und as222,20 in HEK293T-Zellen. ...	207
Abbildung 6.7 Dosis-Wirkungskurven für as203 und as240 in HEK293T-Zellen.	208
Abbildung 6.8 Vektorkarte des pHybrid-Replikons.	209
Abbildung 6.9 Ausschnitte aus der Mpro-Sequenz des pHybrid-Replikons und Vergleich mit den mutierten Varianten.	210
Abbildung 6.10 Gelelektrophoretische Überprüfung des Restriktionsverdaus von pHybrid-Replikon.	211
Abbildung 6.11 Dosis-Wirkungskurven für si203a und si240a in HuhT7-Zellen.	212
Abbildung 6.12 Alignment des subgenomisches Transkripts aus pHybrid-Replikon.	214
Abbildung 6.13 Dosis-Wirkungskurven der small molecule antiviral drugs.	215
Abbildung 6.14 Nachtrag zur Messung der Hemmaktivität der siRNAs in Kombination mit den small molecules auf RNA-Ebene.	217
Abbildung 6.15 Sekundärstruktur der 5'-UTR mit der nLuc-Sequenz aus pNL-TK-CoV2wt.	218

Anhang

Abbildung 6.16 Zeitabhängige Hemmung von si203a und si240a in Kombination mit NMV und ENS in HuhT7-Zellen.	219
Abbildung 6.17 Vergleich der Wirksamkeit von si240a, NMV und ENS einzeln und in Kombination auf Proteinebene in HuhT7-Zellen als Rohwerte.....	220

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Geräte.....	30
Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 2.3 Chemikalien	33
Tabelle 2.4 Puffer und Lösungen.....	35
Tabelle 2.5 Enzyme.....	37
Tabelle 2.6 Kits.....	38
Tabelle 2.7 Größenmarker.....	38
Tabelle 2.8 Zellkulturmedien und -zusätze.....	38
Tabelle 2.9 Humane Zelllinien.....	39
Tabelle 2.10 Bakterienkulturmedien.....	39
Tabelle 2.11 Bakterienstämme.....	40
Tabelle 2.12 Primer mit den zugehörigen Sequenzen.....	40
Tabelle 2.13 Antisense-Oligonukleotide mit den zugehörigen Sequenzen..	41
Tabelle 2.14 <i>Small-interfering</i> RNAs (siRNAs) Duplexe mit den zugehörigen Sequenzen.....	42
Tabelle 2.15 Plasmide und Replikons.....	42
Tabelle 2.16 Programme.....	43
Tabelle 2.17 Weblinks.....	43
Tabelle 2.18 Verwendete Filtersätze des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200M (HBO 100).....	47
Tabelle 2.19 Zusammensetzung der Ansätze für die cDNA-Synthese.....	54
Tabelle 2.20 Programm der reversen Transkription im Thermoblock T Gradient.....	54
Tabelle 2.21 Programm der quantitativen Echtzeit-PCR im Thermocycler ABI PRISM 7900HT.....	55
Tabelle 2.22 Prozentigkeit der Agarosegele in Abhängigkeit der Nukleinsäurelänge.....	57
Tabelle 2.23 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine Kolonie-PCR.....	63
Tabelle 2.24 Programm der Kolonie-PCR im Thermoblock T Gradient.....	63
Tabelle 2.25 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine Sequenzierungs-PCR.....	64
Tabelle 2.26 Programm der Sequenzierungs-PCR im Thermoblock T Gradient.....	64
Tabelle 3.1 Liste der VOCs mit den Mutationen in der 5'-UTR-Sequenz.....	69
Tabelle 3.2 Bezeichnung und Sequenz der ersten 10 ausgewählten ASOs.....	75
Tabelle 3.3 NCBI-BLAST-Analyse der ASOs.....	76
Tabelle 3.4 NCBI-BLAST-Analyse der ASOs as203 und as240.....	84
Tabelle 3.5 Modifikation der ASOs zur Untersuchung des RNase H-Effekts.....	85
Tabelle 3.6 Bezeichnung und Sequenzen der siRNAs.....	92
Tabelle 3.7 NCBI-BLAST-Analyse der verwendeten siRNAs.....	92
Tabelle 3.8 Mutierte Varianten von as240 und si240.....	100
Tabelle 3.9 Anpassung der siRNAs si203 und si240 an das Replikonsystem.....	114
Tabelle 3.10 Wirkstoffbezeichnung und zugehörige IC ₅₀	124
Tabelle 3.11 Bezeichnungen und Sequenzen der entworfenen ASO-Kandidaten gegen die 5'- und 3'-UTR des WNV.....	142
Tabelle 6.1 Tabellarische Darstellung der I _{max} und IC ₅₀ von si203a und si240a in Kombination mit small molecules.....	216

6.5 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken die mich während der Durchführung meines Promotionsvorhabens begleitet und unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

Prof. Dr. Georg Sczakiel – für die Ausgabe dieses interessanten Promotionsthemas sowie der intensiven wissenschaftlichen Betreuung und den wertvollen Diskussionen von Ergebnissen und Fragestellungen.

Dr. Ralf Werner und Dr. Rosel Kretschmer-Kazemi Far - für die fachliche Unterstützung und Beratung bei wissenschaftlichen Fragestellungen, sowie die Möglichkeit der Sequenzierung meiner Proben durch Ralf Werner.

Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld – und seiner Arbeitsgruppe für die Möglichkeit der Verlängerung des Beschäftigungsverhältnisses sowie der fachlichen Kooperation und der Bereitstellung von Materialien.

Kirsten Frank und Julian Pirsing – für die Unterstützung im Laboralltag und bei technischen Fragenstellungen.

Petra Höltig – für die Unterstützung bei administrativen und bürokratischen Angelegenheiten

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für die ständige Unterstützung und den Rückhalt während meiner Promotionszeit bedanken sowie bei allen, die diese Arbeit korrekturgelesen haben.