

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl für Virologie
Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Oliver Keppler

Cyclophiline als Angriffspunkt der antiviralen Intervention:
Mutationsinduktion und -analyse im humanen Coronavirus NL63

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sebastian Heinz Martin Schwinghammer

aus

Augsburg

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Dr. Albrecht von Brunn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Adler
Prof. Dr. Reinhard Zeidler

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2023

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ZUSAMMENFASSUNG	8
ABSTRACT	9
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	10
TABELLENVERZEICHNIS	13
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	15
1. EINFÜHRUNG	18
1.1 Einordnung von Coronaviren	18
1.2 Aufbau und Replikationszyklus von Coronaviren	19
1.2.1 Aufbau der Virionen	19
1.2.2 Organisation des Genoms der Coronaviren	20
1.2.3 Replikationszyklus und virale Proteine	23
1.3 Bedeutung von Coronaviren für Mensch und Tier	26
1.3.1 Humanpathogene Coronaviren	26
1.3.2 Das humane Coronavirus NL63	30
1.3.3 Tierpathogene Coronaviren	31
1.3.4 Coronaviren – Bedeutung als Zoonosen	32
1.4. Ansatzpunkte für die antivirale Intervention	33
1.4.1 Virostatika – ein Überblick	33
1.4.2 Resistenzenwicklung und <i>wirtsspezifische Virusinhibitoren</i>	35
1.4.3 Cyclophiline und Cyclophilininhibitoren	36
1.5 Ziel dieser Arbeit	40
2. MATERIALIEN UND METHODEN:	41
2.1 Allgemeines	41
2.2 Zellkultur	41
2.2.1. Verwendete Zellen	41
2.2.2. Zellkultur und -propagation	41
2.3. Virusinfektion	44
2.3.1 Virusinfektion im Allgemeinen	44
2.3.2 Herstellung von Virus-Stocks	44

2.4. Verwendete Inhibitoren	45
2.5 RNA-Isolation aus Zellüberständen	46
2.6 Sonden-RT-qPCR	47
2.7 Analyse der qPCR-Rohdaten	49
2.7.1 Standardkurve	49
2.7.2 Relative Quantifizierung von Genomäquivalenten	50
2.8 Mutationsinduktion im NL63-Coronavirus: Passageexperiment 1	50
2.8.1 Ziel des Experiments	50
2.8.2 Das Experiment im Überblick	51
2.8.3 Beginn des Passage-Experiments	52
2.8.4 Der Ablauf der folgenden Passagen	52
2.8.5 Vorvergleiche der Sensibilität von NL63-Coronaviren gegenüber den Inhibitoren	55
2.8.6 NGS: Probesequenzierung und Detektion einer Kontamination durch Mykoplasmen	56
2.8.7 Vorläufiger Abschluss des Passage-Experiments	56
2.8.8 Mykoplasmen-Detektion	56
2.8.9 Eradikation der Mykoplasmen-Kontamination und Abschluss der Passage	57
2.8.10 Vergleichsexperimente zur Resistenztestung	59
2.8.11 Virale Fitness und Abhängigkeit von PPIA	60
2.8.12 Präanalytik für das NGS	61
2.9 HCoV-NL63 Passageexperiment 2	61
2.9.1 Das Experiment im Überblick	61
2.9.2 Zellkultur	61
2.9.3 Virus	62
2.9.4 Initiale Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	62
2.9.5 Start des Passageexperiments 2	63
2.9.6 Ablauf der folgenden Passagen	63
2.9.7 Resistenztestung im Verlauf des Passageexperiments 2	65
2.9.8 Beendigung der Passagierung	65
2.9.9 Vergleichsexperimente zur Resistenzprüfung	66
2.9.10 Virale Fitness	67
2.9.11 Präanalytik für das NGS	68
2.10 HCoV-NL63 Passageexperiment 3	68
2.10.1 Überblick	68
2.10.2 Zellen und Zellkultur	68
2.10.3 Herstellung einer HCoV-NL63 Ausgangspopulation und Auswahl der Zellen	69
2.10.4 Herstellung der Inhibitor-Stocklösungen	70
2.10.5 Beginn des Passageexperiments 3	70
2.10.6 Der Ablauf der folgenden Passagen	71
2.10.7 Letzte Passage und Beendigung des Passageexperiments:	72
2.10.8 Relative Quantifizierung der Genomäquivalente	73
2.10.9 Vergleichsexperimente zur Resistenztestung	73
2.10.10 Virale Fitness	74
2.10.11 Präanalytik für das NGS	75
2.11 Statistische Auswertung der Inhibitionsexperimente	75
2.11.1 Allgemeines und Deskriptive Statistik	75
2.11.2 Halbmaximale Inhibitorische Konzentration	75

2.11.3 Verhältnis der IC ₅₀ -Werte	75
2.11.4 ANOVA	76
2.11.5 Gepaarter t-test	76
2.12 Prozessierung und Analyse der NGS-Daten	76
2.12.1 Erstellung einer Genomkarte	76
2.12.2 Analyse für die HCoV-NL63 Passageexperimente 1 & 2	78
2.12.3 Analyse für das HCoV-NL63 Passageexperiment 3	79
2.12.4 Bestimmung der Mutationsdichte der einzelnen Passageexperimente	80
2.12.5 Synopse der Mutationen der Passageexperimente	80
3. ERGEBNISSE	81
3.1. Ergebnisse zur Resistenztestung aus den Passageexperimenten	81
3.1.1 Passageexperiment 1	81
3.1.2 Passageexperiment 2	87
3.1.3 Passageexperiment 3	91
3.1.4 Zusammenfassung über drei Passageexperimente	100
3.2 Ergebnisse zur viralen Fitness	103
3.2.1 Virale Fitness im Anschluss an Passageexperiment 1	103
3.2.2 Virale Fitness im Anschluss an Passageexperiment 2	104
3.2.3 Virale Fitness im Anschluss an Passageexperiment 3	106
3.3 Ergebnisse des NGS	109
3.3.1 Ausgangspopulationen der Passageexperimente	109
3.3.2 Passageexperiment 1 - NGS	111
3.3.3 Passageexperiment 2 - NGS	114
3.3.4 Passageexperiment 3 – NGS	116
3.3.5 NGS - Ergebnisse über alle drei Passageexperimente	121
3.4 Synopse von NGS und Resistenztestung der passagierten Populationen	131
3.4.1 Synopse zu NGS und Resistenztestung im Passageexperiment 1	131
3.4.2 Synopse zu NGS und Resistenztestung im Passageexperiment 2	132
3.4.3 Synopse zu NGS und Resistenztestung im Passageexperiment 3	133
4. DISKUSSION	134
4.1 Einordnung der Passageexperimente	134
4.1.1 Geschichte serieller Passageexperimente	134
4.1.2 Passageexperimente zur Resistenzinduktion	134
4.1.3 Cyclophilinhibitoren und Resistenzentwicklung	136
4.1.4 Das Design der hier beschriebenen Passageexperimente im Vergleich	137
4.2 Ergebnisse zur Resistenzinduktion	138
4.3 Virale Fitness in den Passageexperimenten	141
4.4 Mutationen und Mutationsschwerpunkte	143
4.4.1 Basensubstitutionen pro Nukleotid	143
4.4.2 Resistenzmutationen in der Literatur	144
4.4.3 Mutationsanalyse nach den Passageexperimenten	145

4.5 Limitationen dieser Arbeit	148
4.6 Synopse und Ausblick	150
5 ANHANG	151
5.1 Verwendete Materialien und Software	151
5.1.1 Reagenzien	151
5.1.2 Verbrauchsmaterial	154
5.1.3 Biologische Materialien	157
5.1.4 Gebrauchsmaterialien und Geräte	157
5.1.5 Verwendete Software	160
5.2 Programmeinstellungen für die HCoV-NL63-RT-qPCR im LightCycler® 96	161
5.3. Genomäquivalente der Viruspopulationen in Passageexperiment 3	162
5.4. Verwendete Barcodes und Einstellungen für das NGS	163
5.4.1 Verwendete Barcodes für das Illumina-NGS	163
5.4.2 Einstellungen der Programme im Galaxy-Portal	164
5.5. Graphen und Tabellen zur Inhibition im NL63-Passageexperiment 1	166
5.5.1 Vergleichsexperimente während des ersten Passageexperimentes	166
5.5.2: IC ₅₀ -Werte der Viruspopulationen nach Abschluss des ersten Passageexperimentes	168
5.6 Graphen und Tabellen zur Inhibition im NL63-Passageexperiment 2	169
5.6.1 Vorläufiger Vergleich der Passage 5	169
5.6.2 IC ₅₀ -Werte der Viruspopulationen nach Abschluss des zweiten Passageexperimentes	170
5.6.3 Gegenüberstellung der Sensitivität von p15.2 zu den Kontrollen aus Passageexperiment 2	171
5.6.4 Vergleich der Interventionsgruppen mit Testung auf Signifikanz	172
5.7 Graphen und Tabellen zur Inhibition nach Passageexperiment 3	173
5.7.1 Log ₁₀ -Reduktion der Genomäquivalente unter dem Einfluss von ALV	173
5.7.2 Log ₁₀ -Reduktion der Genomäquivalente unter dem Einfluss von CsA	176
5.7.3 Log ₁₀ -Reduktion der Genomäquivalente unter dem Einfluss von NIM811	179
5.7.4 IC ₅₀ -Werte im Passageexperiment 3: Gesamtvergleich	182
5.7.5 IC ₅₀ -Werte im Passageexperiment 3: Alisporivir	183
5.7.6 IC ₅₀ -Werte im Passageexperiment 3: Cyclosporin A	184
5.7.7 IC ₅₀ -Werte im Passageexperiment 3: NIM811	185
5.7.8 Passageexperiment 3: Relative IC ₅₀ -Werte der einzelnen Populationen im Vergleich	186
5.8 Synopse der Passageexperimente: Graphen zur Inhibition	187
5.9 Tabellen zu den Ergebnissen des NGS– Anhang zum NGS	188
5.9.1 Passageexperiment 1 – Anhang zum NGS	188
5.9.2 Passageexperiment 2 – Anhang zum NGS	190
5.9.3 Passageexperiment 3 – Anhang zum NGS	192
5.9.4 Synopse des NGS	194
LITERATURVERZEICHNIS	197

DANKSAGUNG	212
AFFIDAVIT	213
LEBENS LAUF	214

Zusammenfassung

Coronaviren stellen eine Familie behüllter RNA-Viren dar, welche insbesondere Erkrankungen der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes in Mensch und Tier auslösen können [1, 2]. Hierdurch beeinflussen sie die Gesundheit der Weltbevölkerung, die Gesundheitssysteme, die Nutztierhaltung und das Wildleben erheblich. Nicht erst seit dem Ausbruch der SARS-CoV-2-Pandemie, welche bereits Millionen Menschenleben gefordert hat, zeigten die Vertreter dieser Virusfamilie oft eine hohe Virulenz und adaptierten sich als Zoonosen an neue Wirtsorganismen [3, 4].

Durch intensive und konzentrierte Bemühungen gelang erst im Verlauf der SARS-CoV-2-Pandemie die Entwicklung von direkt wirkenden antiviralen Wirkstoffen wie Nirmatrelvir/Ritonavir (Paxlovid®) und Molnupiravir (Lagevrio®), unter deren Einsatz krankheitsassoziierte Risiken deutlich gemildert werden konnten [5-7]. Cyclophilininhibitoren wie Cyclosporin A oder Alisporivir hemmen *in vitro* die Replikation verschiedener Virusentitäten, unter anderem auch Coronaviren [8-10]. Der Mechanismus der Inhibition ist für Coronaviren noch nicht vollständig geklärt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Resistenzinduktion im humanen Coronavirus (HCoV) NL63 gegen Cyclosporin A und dessen nicht-immunsuppressiven Derivat Alisporivir und NIM811. Durch serielle Passage in Zellkultur ist es gelungen, Viruspopulationen mit verringerter Sensitivität gegenüber diesen Inhibitoren zu erstellen.

Mittels *next generation sequencing* konnten dann in den Viruspopulationen wiederholt auftretende Mutationen identifiziert werden. Ein Vergleich der Mutationsdichte von Interventionsgruppe und Kontrollpassagen zeigte nur für die den Inhibitoren ausgesetzten Viruspopulationen einen Schwerpunkt im für das Nichtstrukturprotein 1 (Nsp1) kodierenden Genomabschnitt.

Abstract

Coronaviruses represent a family of enveloped RNA viruses that cause respiratory and gastrointestinal diseases in humans and animals [1, 2]. Hereby, they significantly affect health of the world population, health care systems, livestock and wildlife. Not only since the outbreak of the SARS-CoV-2 pandemic, which has already claimed millions of lives, the representatives of this virus family have often shown a high level of virulence and adapted as zoonoses to new host organisms [3, 4].

Through intensive and concentrated efforts during the SARS-CoV-2-Pandemy direct acting antivirals like Nirmatrelvir/Ritonavir (Paxlovid®) and Molnupiravir (Lagevrio®), which reduced the disease associated risk distinctly, were developed [5-7]. Cyclophilin inhibitors, such as Cyclosporin A or Alisporivir, hinder the replication of several viral entities *in vitro*, including coronaviruses [5-7]. The mechanism of inhibition in coronaviruses is yet not fully understood.

This thesis describes the induction of resistance mutations in human coronavirus HCoV-NL63 to Cyclosporine A and its non-immunosuppressive derivatives Alisporivir and NIM811. Serial passaging in cell culture was used to generate viral populations with reduced sensitivity to these inhibitors.

Next generation sequencing was applied to identify recurrent mutations in the virus populations. Comparison of the mutation density of intervention group and control passages showed a focus in the coding region of non-structural protein 1 (nsp1) only in the virus populations exposed to the inhibitors.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Digital nachkolorierte elektronen-mikroskopische Darstellung von HCoV-229E-Virionen.	18
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Corona-Virions.	20
Abb. 3: Schematische Darstellung des Genoms des humanen Coronavirus NL63.	21
Abb. 4: Darstellung der sub-genomischen messenger- RNA (sgmRNA) des humanen Coronavirus NL63..	22
Abb. 5: Schematische Darstellung des coronaviralen Replikationszyklus.	25
Abb. 6: Der die Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase) katalysierte Konformationswechsel.....	37
Abb. 7: Darstellung der intrazellulären Verteilung von CypA und CypB.	38
Abb. 8: CaCo-2-Zellen in Zellkultur.	41
Abb. 9: CaCo-2 Zellen zum Zeitpunkt einer Infektion.	44
Abb. 10: a) Cytopathischer Effekt der NL63-HCoV auf CaCo-2-Zellen. b) zeigt die parallel gehaltenen Zellen, deren Inokulum keine Viren enthielt.	45
Abb. 11: Bestimmung der Steigung (engl. slope) der Ausgleichsgerade mittels GraphPad Prism 9 am Beispiel der Standardkurve 2020-07.	50
Abb. 12: Konzentration der NL63-Genomäquivalente (GE) in den Überständen der einzelnen Löcher aus Passage 7 in Relation zur Kontrolle P7.11.	54
Abb. 13: Plan des Vergleichsexperiments im 48-Loch-Plate-Format.	60
Abb. 14: Mittels qPCR ermittelte HCoV-NL63-Genomäquivalente pro ml in Passage 5 des Passageexperiments 2.	64
Abb. 15: Plan der 96-Loch-Zellkulturplatten im Vergleichsexperiment.	67
Abb. 16: Genomäquivalente pro Milliliter von HCoV-NL63-Stocks im Vergleich, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei Messungen mittels RT-qPCR.	70
Abb. 17: Plan des Vergleichsexperiments im 96-Loch-Plate-Format.	74
Abb. 18: Kartierung des NL63-Genoms.	77
Abb. 19: Passageexperiment 1: Sensibilität der HCoV-NL63 Populationen gegenüber Alisporivir (ALV) nach Abschluss der Passagierung.	83
Abb. 20: Passageexperiment 1: Sensibilität der HCoV-NL63 Populationen gegenüber Cyclosporin A (CsA) nach Abschluss der Passagierung.	84
Abb. 21: Passageexperiment 1: Vergleich der Genomäquivalente der jeweiligen HCoV-NL63- Viruspopulationen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der eingesetzten Cyclophilin- Inhibitoren Alisporivir und Cyclosporin A, wobei 100 % der Medium-Kontrolle entspricht.	85
Abb. 22: IC ₅₀ Werte der Viruspopulationen nach Abschluss von Passageexperiment 1 für a) Alisporivir (ALV) und b) Cyclosporin A (CsA).	86
Abb. 23: Vergleichsexperimente von Passage 10 des zweiten Passageexperimentes.	87
Abb. 24: Darstellung der relativen Reduktion von NL63-Genomäquivalenten von Passage 15 Viruspopulationen des zweiten Passageexperimentes unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors Alisporivir (ALV).	89
Abb. 25: Darstellung der relativen Reduktion von NL63-Genomäquivalenten von Passage 15 Viruspopulationen des zweiten Passageexperimentes unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors Cyclosporin A (CsA).	89
Abb. 26: Darstellung der relativen Reduktion von NL63-Genomäquivalenten von Viruspopulationen aus Passage 15 des zweiten Passageexperimentes unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors NIM811.	90
Abb. 27: IC ₅₀ -Werte der NL63-Viruspopulationen nach Abschluss von Passageexperiment 2 für die Inhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA) und NIM811.	90
Abb. 28: Darstellung der Sensibilität von Viruspopulationen aus Passageexperiment 3.	93

Abb. 29: Sensibilitätstestung der Viruspopulationen aus Passage 15 des Passageexperiments 3 gegenüber dem Inhibitor Alisporivir (ALV).....	94
Abb. 30: Sensibilitätstestung der Viruspopulationen aus Passage 15 des Passageexperiments 3 gegenüber dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA).	95
Abb. 31: Sensibilitätstestung der Viruspopulationen aus Passage 15 des Passageexperiments 3 gegenüber dem Inhibitor NIM811.	96
Abb. 32: Graphische Darstellung der IC ₅₀ -Werte der Inhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA) und NIM811, geordnet nach der Intervention.....	97
Abb. 33: Graphische Darstellung der IC ₅₀ -Werte der Inhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA) und NIM811, geordnet nach Population und Intervention.	98
Abb. 34: Gegenüberstellung der relativen IC ₅₀ -Werte der beiden Interventionsgruppen aus Passageexperiment 3.	99
Abb. 35: Gegenüberstellung der relativen IC ₅₀ -Werte aus den Inhibitionsexperimenten aller drei Passageexperimente.	100
Abb. 36: Vergleich der relativen IC ₅₀ -Werte zu den Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 in Bezug auf die Viruspopulationen der Interventionsgruppe der drei Passageexperimente.	101
Abb. 37: Vergleich der relativen IC ₅₀ -Werte des Inhibitors in dem die jeweilige NL63-Population passagiert worden war und denen der anderen Cyclophilinhibitoren:	102
Abb. 38: Passageexperiment 1: a) und b): Darstellung der relativen viralen Replikation der Viruspopulationen aus Passage 25 3 im Verhältnis zur Kontrolle p0.....	104
Abb. 39: Virale Fitness in Passageexperiment 2: Der Graph zeigt das Verhältnis der Genomäquivalente im Überstand zum jeweiligen Zeitpunkt post infectionem zu denen im Inokulum.	105
Abb. 40: Virale Fitness in Passageexperiment 2: Virale Replikation in Bezug auf NL63 Berlin 1:.....	106
Abb. 41: Passageexperiment 3 - Virale Fitness. Zu sehen ist die durchschnittliche relative virale Replikation im Verhältnis zum Ausgangsstock NL63-2020-1 (p0).....	107
Abb. 42: Virale Fitness im Passageexperiment 3 - aufgeschlüsselt:	108
Abb. 43: Passageexperiment 1: Relative Dichte von Missense-Mutationen, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventions- bzw. Kontrollgruppe.....	113
Abb. 44: Estimation Plot zum Gepaarten t-test der Basensubstitutionsfrequenz (s.n-1). Verglichen wurden die Werte der Populationen aus Passage 10 und Passage 15.	115
Abb. 45: Passageexperiment 2: Relative Dichte von Missense-Mutationen in Passage 10 bzw. 15, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventions- bzw. Kontrollgruppe.	116
Abb. 46: Relative Dichte von Missense-Mutationen, dargestellt als Heatmap, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventionsgruppe (passagiert in ALV, CsA oder NIM811) bzw. Kontrollgruppe (passagiert in EtOH oder ohne Zusatz).....	120
Abb. 47: Passageexperimente 1 - 3: Relative Dichte von Missense-Mutationen, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventionsgruppe (passagiert in ALV, CsA oder NIM811) bzw. Kontrollgruppe (passagiert in EtOH oder ohne Zusatz).	124
Abb. 48: Synopsis: Relative Dichte von Mutationen aller drei Passageexperimente, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventions- bzw. Kontrollgruppe.	125
Abb. 49: Vergleich der Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) von Intervention und Kontrollpassage der Passageexperimente 1-3.	129
Abb. 50: Vergleich der Basenaustausche pro Nukleotid (sn-1) zwischen den Passageexperimenten 1, 2 und 3.....	129
Abb. 51: Darstellung der Konsensussequenz der Aminosäuren des Nichtstrukturprotein 1 von HCoV-NL63 und SARS-CoV-2.	130
Abb. 52: Darstellung der Übereinstimmung des Aminosäureaustauschs S1304F im S-Protein des HCoV-NL63 mit der entsprechenden Region im S-Protein des Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV).	130

Abb. 53: Programmeinstellungen zur HCoV-NL63-RT-qPCR aus der LightCycler® 96 Software	161
Abb. 54: Passageexperiment 1: Vergleichsexperimente im laufenden Experiment zur Sensitivität gegenüber den Inhibitoren Alisporivir (ALV) sowie Cyclosporin A (CsA).	166
Abb. 55: Passageexperiment 1: Vergleichsexperimente aus Passage 20.	167
Abb. 56: Passageexperiment 2: Darstellung der Inhibition von Viruspopulationen aus Passage 5.....	169
Abb. 57: Passageexperiment 2: Log10-Reduktion der Genomäquivalente der Viruspopulation NL63 p15-2 im Vergleich zu den Kontrollen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der Inhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA) sowie NIM811.....	171
Abb. 58: Passageexperiment 2: Vergleich der persistierenden Genomäquivalente unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der eingesetzten Cyclophilin-Inhibitoren Alisporivir, Cyclosporin A sowie NIM811.	172
Abb. 59: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set A gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Alisporivir (ALV).	173
Abb. 60: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set B gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Alisporivir (ALV).	174
Abb. 61: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set C gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Alisporivir (ALV).	175
Abb. 62: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set A gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Cyclosporin A (CsA).....	176
Abb. 63: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set B gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Cyclosporin A (CsA).	177
Abb. 64: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set C gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Cyclosporin A (CsA).	178
Abb. 65: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set A gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors NIM811.	179
Abb. 66: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set B gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors NIM811.	180
Abb. 67: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set C gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors NIM811.	181
Abb. 68: Gegenüberstellung der relativen IC ₅₀ -Werte aus den Passageexperimenten:	187

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zellkulturgefäße und Volumina des Kulturmediums	43
Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Inhibitoren.	46
Tabelle 3: Master-Mix mit Volumina für eine einzelne RT-qPCR-Reaktion	48
Tabelle 4: Für die HCoV-NL63-RT-qPCR verwendeten Primer und Sonde.....	49
Tabelle 5: Verwendete Inhibitoren und deren Konzentration zu Beginn des Passageexperiments 1 ...	52
Tabelle 6: Passagedauer und Konzentration der CYPA-Inhibitoren im Verlauf des ersten Passageexperiments.....	54
Tabelle 7: Vergleichsexperimente während des Passageexperimentes 1:.....	55
Tabelle 8: Mittels RT-qPCR und relativer Quantifizierung berechnete Genomäquivalente pro ml in den Viruspopulationen.....	59
Tabelle 9: Verwendete Inhibitoren und deren Konzentration zu Beginn des Passageexperiments 2 ...	63
Tabelle 10: Konzentrationen der Inhibitoren und der Lösungsmittelkontrolle im Verlauf des Passageexperiments 2 (c = Konzentration).....	64
Tabelle 11: Genomäquivalente pro ml in den HCoV-NL63-Stocks am Ende des Passageexperiments 2	66
Tabelle 12: Übersicht über die Inhibitoren und deren Konzentration (c) zu Beginn des Passageexperimentes 3.....	71
Tabelle 13: Überblick über die Passagen des Passageexperimentes 3.....	72
Tabelle 14: Genomäquivalente (GE) der verschiedenen HCoV-NL63 Viruspopulationen aus dem Passageexperiment 3	73
Tabelle 15: Unterteilung des HCoV-NL63-Genoms in die einzelnen Genomabschnitte (ORF = Open Reading Frame; UTR: Nicht translatierte Region) sowie die hierfür codierten Proteine.....	77
Tabelle 16: Inhibitionsexperimente zu Passageexperiment 3. Darstellung der Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den Gruppen von Viruspopulationen.	91
Tabelle 17: Virale Fitness im Passageexperiment 1	103
Tabelle 18: Virale Fitness in Passageexperiment 2.....	105
Tabelle 19: Virale Fitness in Passageexperiment 2: Virale Replikation in Bezug auf NL63 Berlin 1:	105
Tabelle 20: Mutationen in den Ausgangsstocks der Passageexperimente.	110
Tabelle 21: Passageexperiment 1: Mutationen der Interventionsgruppe, (...) welche mit hoher Frequenz aufgetreten waren.	111
Tabelle 22: Aufgeführt sind die Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) für die jeweilige Viruspopulation aus dem Passageexperiment 1.....	112
Tabelle 23: Passageexperiment 2: Mutationen der Interventionsgruppen	114
Tabelle 24: Aufgeführt sind die Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) für die jeweilige Viruspopulation der Passagen 10 und 15 aus dem Passageexperiment 2.....	115
Tabelle 25: Passageexperiment 3: Am häufigsten vorkommende Mutationen der Interventionsgruppe.	118
Tabelle 26: Passageexperiment 3: Am häufigsten vorkommende Mutationen in Kontroll- und Interventionsgruppe:	119
Tabelle 27: Aufgeführt sind die Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) für die jeweilige Viruspopulation der Sets A, B und C aus dem Passageexperiment 3.	120
Tabelle 28: Verteilung von Basenaustauschmutationen über die Passageexperimente 1-3.	122
Tabelle 29: Mutationen der Interventionsgruppen, welche in mehreren Passageexperimenten auftraten.	127
Tabelle 30: Mutationen welche in mehreren Passageexperimenten auch in den Kontrollgruppen auftraten.	128
Tabelle 31: Häufige Mutationen der Viruspopulationen p25 3.2-ALV sowie p25 3.6-NIM811 aus dem Passageexperiment 1.	131

Tabelle 32: Häufige Mutationen der Viruspopulationen p15.1-ALV sowie p15.2-CSA aus dem Passageexperiment 2.....	132
Tabelle 33: Häufige Mutationen in sich resistenter zeigenden Viruspopulationen aus Passageexperiment 3.....	133
Tabelle 34: Für diese Arbeit verwendete Reagenzien und Kits	154
Tabelle 35: Für diese Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	156
Tabelle 36: Für diese Arbeit verwendete biologische Materialien	157
Tabelle 37: Für diese Arbeit verwendete Gebrauchsmaterialien und Geräte	159
Tabelle 38: Für diese Arbeit verwendete Software	160
Tabelle 39: HCoV-NL63-Genomäquivalente (GE) in den Überständen der einzelnen Viruspopulationen in Passage 5 (P05) des Passageexperimentes 3.	162
Tabelle 40: HCoV-NL63-Genomäquivalente (GE) in den Überständen der einzelnen Viruspopulationen in Passage 10 (P10) des Passageexperimentes 3.	162
Tabelle 41: Barcodes der Rohdatensätze aus dem Illumina-NGS für die Passageexperimente 1 und 2. .	163
Tabelle 43: Einstellungen der Programme im Galaxy-Portal für die Auswertung der Rohdaten im Next-Generation-Sequencing der Passageexperimente 1 & 2.....	165
Tabelle 44: Werte der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) für die Viruspopulationen aus dem ersten Passageexperiment.....	168
Tabelle 45: Werte der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) für die Viruspopulationen aus dem zweiten Passageexperiment.	170
Tabelle 46: Passageexperiment 3: Tabellarische Auflistung der IC_{50} -Werte der Viruspopulationen, zusammen-gefasst nach Intervention, für die Inhibitoren Alisporivir, CsA und NIM811	182
Tabelle 47: Passageexperiment 3: Tabellarische Auflistung der IC_{50} -Werte der einzelnen Viruspopulationen der Sets A, B und C für den Inhibitor Alisporivir.....	183
Tabelle 48: Passageexperiment 3: Tabellarische Auflistung der IC_{50} -Werte der einzelnen Viruspopulationen der Sets A, B und C für den Inhibitor Cyclosporin A.	184
Tabelle 49: Passageexperiment 3: Tabellarische Auflistung der IC_{50} -Werte der einzelnen Viruspopulationen der Sets A, B und C für den Inhibitor NIM811.	185
Tabelle 50: Relative IC_{50} -Werte der einzelnen Populationen aus Passageexperiment 3 im Vergleich.	186
Tabelle 51: Mutationen im Passageexperiment 1:	188
Tabelle 52: Passageexperiment 1: Relative Mutationsdichte für die einzelnen Abschnitte im NL63-Genom, aufgeschlüsselt nach dem Vorkommen in den Kontrollen beziehungsweise in der Interventionsgruppe.....	189
Tabelle 53: Mutationen im Passageexperiment 2: Aufgeführt sind die 30 Mutationen mit der höchsten Allelfrequenz innerhalb einer passagierten Population.	190
Tabelle 54: Passageexperiment 1: Relative Mutationsdichte für die einzelnen Abschnitte im NL63-Genom, aufgeschlüsselt für Passage 10 und 15 des Experiments.	191
Tabelle 55: Nonsense-Mutationen im Passageexperiment 3.	192
Tabelle 56: Rasterschubmutationen in Population A5 (passagiert in 10 μ M NIM811) des Passageexperimentes 3:.....	192
Tabelle 57: Passageexperiment 3: Relative Mutationsdichte für die einzelnen Abschnitte im NL63-Genom.	193
Tabelle 58: Synopsis der Passageexperimente:.....	194
Tabelle 59: Relative Mutationsdichte über alle Passageexperimente 2:	195
Tabelle 60: Mutationen in den nicht translatierten Regionen:.....	196

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung:	Bezeichnung:
° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Å	Ångström (Längeneinheit, entspricht 0,1 nm)
aa	Aminosäure (engl. <i>amino acid</i>)
Abb.	Abbildung
ACE2	Angiotensin konvertierendes Enzym 2 (engl. <i>Angiotensin converting enzyme 2</i>)
AF	Allelfrequenz
ALV	Alisporivir
AT	Österreich
BCoV	Bovines Coronavirus
<i>BiFC</i>	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (engl. <i>bimolecular fluorescence complementation</i>)
Bp	Basenpaar (engl. <i>base pair</i>)
bzw.	Beziehungsweise
C	Konzentration
CCoV	Canines Coronavirus
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CoV	Coronavirus
CPE	Zytopathologischer Effekt (engl. <i>cytopathological effect</i>)
CsA	Cyclosporin A, engl. <i>Cycloporine A</i>
CYP	Cyclophilin
CYPA	Cyclophilin A
DE	Deutschland
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	Doppelmembran-Vesikel (engl. <i>double membrane vesicle</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSMZ	Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Escherichia coli
EAV	Equines Arteritis Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
E-Protein	Envelope-Protein
ERGIC	ER-Golgi-Intermediate compartement
EtOH	Ethanol, C ₂ H ₅ OH
FCS, FBS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GB	Vereinigtes Königreich von Großbritannien

GE	Genomäquivalente (<i>engl. Genome equivalents</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>engl. green fluorescent protein</i>)
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HCoV	Humanes Coronavirus
HCoV-NL63, NL63	humanes Coronavirus NL63
IBV	Infectious Bronchitis Virus
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
log ₁₀	Dekadischer Logarithmus
m	Meter
max.	Maximal
M-CoV	Murines Coronavirus
MERS	Middle Eastern Respiratory Syndrom
MERS-CoV	Middle Eastern Respiratory Syndrom Coronavirus
mg	Milligramm
MHV	Maus / Murines Hepatitis Virus
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>engl. multiplicity of infection</i>)
M-Protein	Membrane-Protein
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NGS	Next Generation Sequencing
nM	Nanomolar
Nm	Nanometer
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
NSP, Nsp	Nichtstrukturprotein
ORF	Offenes Leseraster (<i>engl. Open reanding frame</i>)
ORF	Offenes Leseraster, <i>engl. open reading frame</i>
ORFeom	Gesamtheit der ORFs
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl. Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl. Polymerase chain reaction</i>)
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus
PFU	Plaque forming Units
pmol	Pikomol
RFP	rot fluoreszierendes Protein (<i>engl. red fluorescent protein</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl. ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl. rounds per minute</i>)
RT	reverse Transkriptase
S	Sekunden
s.n ⁻¹	Basensubstitutionen pro Nukleotid (<i>engl. substitutions per nucleotide</i>)
SADS-CoV	Swine acute diarrhoea syndrome – Coronavirus
SGP	Singapur
SNP	Single nucleotide polymorphism, einzelner Basenaustausch

S-Protein	Spike-Protein
Stock	Bestand, Vorhaltung
SW	Schweden
Tab.	Tabelle
TGEV	Transmissible gastroenteritis coronavirus
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UTR	Nichttranslatierte Region, <i>engl. untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp, <i>engl.: wild type</i>
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid-System (engl. Yeast Two-Hybrid System)
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (engl. <i>yellow fluorescent protein</i>)

1. Einführung

1.1 Einordnung von Coronaviren

Coronaviridae, im Deutschen meist als „Coronaviren“ bezeichnet, stellen eine Familie von behüllten Viren dar, welche als Genom einen einzelnen Strang von Ribonukleinsäuren (RNA) in positiver Ausrichtung besitzen. Taxonomisch werden sie zum Zeitpunkt der Veröffentlichung nach dem International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [11] zur Ordnung der *Nidovirales* gezählt und stellen alle Mitglieder der Unterordnung *Cornidovirineae*. Die Familie der *Coronaviridae* lässt sich wiederum in die Unterfamilien *Letovirinae* und *Orthocoronavirinae* aufteilen. Die Unterordnung der *Orthocoronavirinae* fasst vier Gattungen zusammen, *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, sowie *Deltacoronaviren*. Während Alpha- und Betacoronaviren Säugetiere befallen, infizieren Gamma- und Deltacoronaviren vor allem Vögel. Sowohl Woo et al. (2012) als auch Wertheim et al (2013) publizierten, dass nach Analyse mittels molekularer Uhr der jüngste gemeinsame Vorfahre von Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren etwa vor 10000 Jahren existiert haben müsste. Der genaue Ursprung der Coronaviren ist nicht geklärt, jedoch wird vermutet, dass diese Virusfamilie bereits sehr früh in der Entwicklungsgeschichte aufgetreten ist [12, 13].

Diese Arbeit befasst sich mit dem Humanen Coronavirus (HCoV) NL63, das zur Gattung der *Alphacoronaviren* und zur Untergattung der *Setracoviren* gehört. In der Einführung werden auch andere Coronaviren beschrieben, um so einen Überblick über das Thema zu geben.

Den Namen *Coronaviren* erhielt die Familie aufgrund ihres Aussehens in der Darstellung mittels Elektronenmikroskopie. *June Almeida*, eine auf Elektronenmikroskopie spezialisierte Virologin, stellte 1964 als erste Coronaviren, unter anderem das HCoV-229E, dar und veröffentlichte u.a. ihre Ergebnisse zusammen mit D. A. J. Tyrrell 1967 im *Journal of General Virology* [14, 15]. Die in der Regel

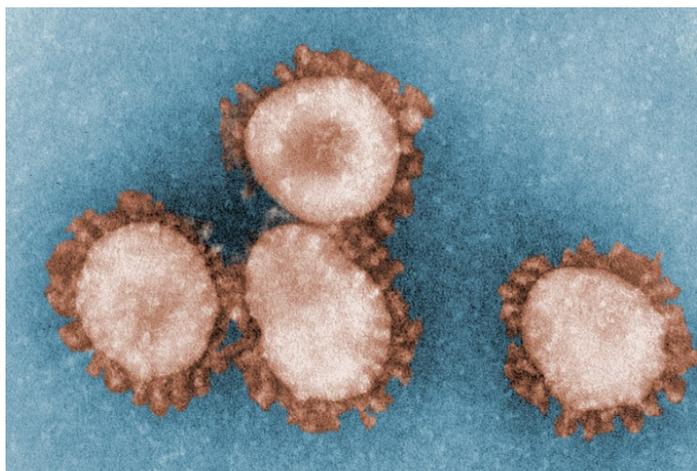


Abb. 1: Digital nachkolorierte elektronen-mikroskopische Darstellung von HCoV-229E-Virionen. Deutlich in braun zu erkennen sind die Spike-Proteine, welche den Virionen das typische Aussehen verleihen. Bildquelle: CDC/ Dr. Fred Murphy; Sylvia Whitfield, abgerufen unter: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=15523> am 23.05.2021

kugelförmigen, von einer Lipidmembran umhüllten Virionen haben einen Durchmesser von ca. 800 bis 1900 Å. Sie tragen die etwa 200 Å hervorragenden Spike-Proteine, welche Dornen oder Keulen ähneln, an ihrer Oberfläche, wodurch entsteht der namensgebende Eindruck eines Kranzes oder einer Krone entsteht. Abb. 1 zeigt eine elektronenmikroskopische Darstellung von HCoV-229E-Virionen.

Das Genom der Coronaviren ist mit einer Länge von ca. 25000 – 32000 Basen das größte unter den RNA-Viren [16]. Ein wichtiger Faktor für die Stabilität eines solch langen Genoms ist die Exonuklease-Aktivität der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase, welche zu einem gewissen Maße zur Fehlerkorrektur bei der Replikation des viralen Genoms in der Lage ist [17-19].

1.2 Aufbau und Replikationszyklus von Coronaviren

1.2.1 Aufbau der Virionen

Die Virionen der Coronaviren sind von sphäroider Form und besitzen einen Durchmesser von etwa 80 - 120 nm. Die Hülle besteht zum Teil aus der Lipiddoppelmembran der ehemaligen Wirtszelle, aus der das Virion ausgeschleust worden war. Zudem sind in die Hülle die viralen Strukturproteine integriert. Hierzu zählen zuallererst das namensgebende Spike-Protein (S-Protein), welches für Bindung und Fusion mit der neuen Wirtszelle notwendig ist. Auch finden sich das Envelope-Protein (E-Protein) sowie das Membrane-Protein (M-Protein). Im Inneren des Virions befindet sich das helixförmige Nukleokapsid. Hier stabilisiert das Nukleokapsid-Protein das virale Genom [20, 21]. Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung eines Virions. Die Funktionen der Strukturproteine werden in Kapitel 1.2.3 *Replikationszyklus und virale Proteine* näher erläutert.

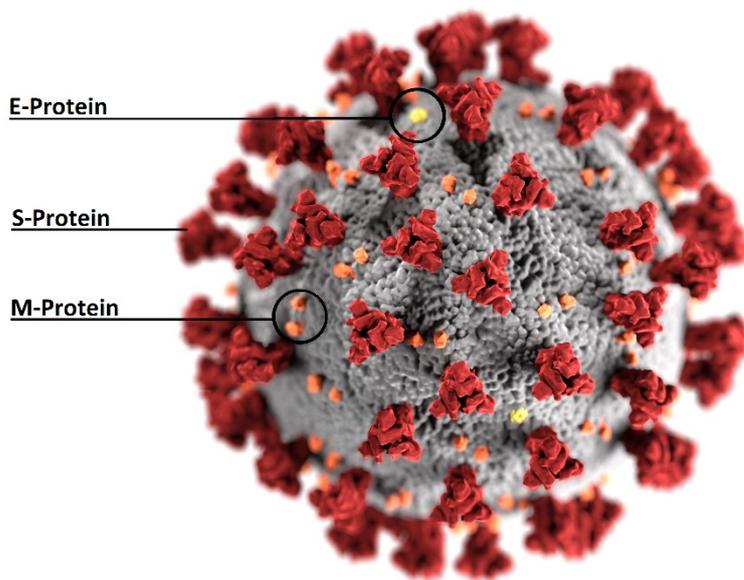


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Corona-Virions. Ins Auge fallen die hier rot gefärbten Spike-Proteine (S-Protein). Zudem enthalten die Virionen aller Coronaviren auch das Envelope-Protein (E-Protein), sowie das Membran-Protein (M-Protein). In Grau ist die Lipiddoppelmembran dargestellt. Modifiziert nach: CDC / Alissa Eckert, MSMI; Dan Higgins, MAMS; <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23313>, abgerufen am 23.05.2021

1.2.2 Organisation des Genoms der Coronaviren

Das Genom von Coronaviren besteht aus einem einzelnen RNA-Strang positiver Ausrichtung mit einer Länge von etwa 27 - 32 kb (Kilobasen) [16]. Am 5'-Ende des Genoms befindet sich die 5'-UTR (untranslated region), welche für kein Protein kodiert. Mit einem 5'-Cap initiiert sie die ribosomale Translation. Gleichzeitig bindet hier das coronavirale Nichtstrukturprotein 1 (Nsp1). Dieses stört die Translation zellulärer mRNA durch deren Degradation. Die 5'UTR verhindert dies, sodass die Translation der viralen Proteine nicht negativ beeinflusst wird. Den größten Teil des Genoms nimmt das offene Leseraster (ORF, engl. *Open Reading Frame*) 1ab ein. Dieser Genomabschnitt kodiert für das Polyprotein 1ab, welches von zwei viralen Proteasen proteolytisch in mehrere Nichtstrukturproteine (Nsp) gespalten wird. ORF1ab zeichnet sich durch eine Struktur aus, welche als Pseudoknoten (engl. *pseudoknot*) die ribosomale Translation beeinflussen kann. Am Ende des Unterabschnitts a des ORF 1ab befindet sich ein Stop-Codon, welches in der Regel die Translation beendet. Durch den Pseudoknoten kann es jedoch zu einem Rasterschub um eine Base zurück bei der Translation kommen (Rastersprung; engl. *-1 ribosomal frameshift*). Hierdurch wird dann das gesamte Polyprotein 1ab translatiert [22, 23]. Dabei wird das Verhältnis der vor und nach dem Frameshift translatierten Nsp beeinflusst [24-

26]. Dies betrifft insbesondere mit Nsp12 die RNA-abhängige RNA-Polymerase, deren codierende Region direkt vom Rastersprung betroffen ist [27].

Im Anschluss folgt eine je nach Virusspezies leicht variierende Anzahl ORFs, welche für die Strukturproteine kodieren. ORF S kodiert für das Spike-Protein (S-Protein), ORF 3 für das Protein 3, ORF E für das Envelope-Protein (E-Protein), ORF M für das Membrane-Protein (M-Protein) und zuletzt ORF N für das Nucleocapsid-Protein (N-Protein). Am Ende des Genoms befindet sich die 3'UTR, welche wiederum mit der 5'UTR interagieren kann [28]. An den 3'UTR schließt sich ein Poly-A-Schwanz an, welcher wie bei regulären mRNAs Schutz gegenüber Ribonukleasen bietet. Die Gesamtheit des beschriebenen Moleküls stellt die genomische RNA (gRNA) dar. Abb. 3 zeigt schematisch den Aufbau des coronaviralen Genoms am Beispiel des HCoV-NL63.

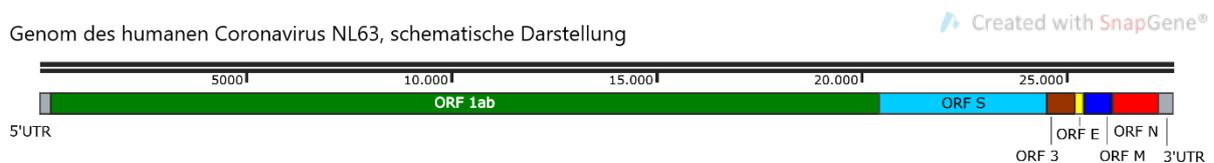


Abb. 3: Schematische Darstellung des Genoms des humanen Coronavirus NL63. Der schwarze Doppelbalken zeigt die Länge des Genoms in Basen an. Der untere Balken zeigt die einzelnen Abschnitte in unterschiedlichen Farben an. Am 5'-Ende befindet sich die 5'-UTR (nichttranslatierte Region, engl. untranslated region), hierauf folgen die offenen Leseraster (ORF, engl. open reading frame). Den größten Anteil stellt hierbei das ORF 1ab dar, gefolgt von den die Strukturproteine kodierenden ORFs. Am Ende befindet sich wiederum eine UTR am 3'-Ende. Erstellt mit SnapGene® in Anlehnung an [1].

Im Rahmen der Replikation werden durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase zunächst spiegelbildliche Abbilder der genomischen RNA erstellt. Diese dienen dann als Blaupause für neue gRNA. Zudem wird als Matrize für die Translation der Strukturproteine ein Satz an subgenomischen RNA (sgRNA) mit negativer Ausrichtung erstellt. Die Produktion beginnt am 3'-Ende der gRNA und endet spätestens nach dem ORF S. Im Anschluss wird dann die Information für die 5'UTR der gRNA an das 3'-Ende sgRNA angebracht [29, 30]. Nun werden mithilfe der (-)sgRNA als Matrize sgmRNA (*subgenomische messenger RNA*) erstellt. Diese besitzen so ebenfalls die coronavirale 5'UTR sowie 3'UTR. Die (-)sgRNA und die sgmRNA sind verschachtelt (engl. nested), ein Merkmal der Angehörigen der Ordnung der Nidovirales. Verschachtelung bedeutet, dass die sgmRNA eines ORFs zusätzlich auch die

Information der am 3'-Ende hiervon liegenden ORFs beinhaltet. Die Translation der Strukturproteine endet jeweils am Stop-Codon des am 5'-Ende befindlichen ORFs, sodass mit einer sgmRNA jeweils nur eines der Strukturproteine translatiert werden kann. Insgesamt treten so die am 3'-Ende des Genoms befindlichen ORFs wesentlich häufiger auf als die am 5'-Ende befindlichen. Dies kann dazu beitragen, eventuelle Mutationen, welche im Rahmen der Replikation der gRNA auftreten, durch homologe Rekombination auszugleichen und so zur Stabilität des für RNA-Viren ausgesprochen langen Genoms beitragen [31, 32]. In Abb. 4 sind die verschachtelten sgmRNA des humanen Coronavirus NL63 zur Veranschaulichung dargestellt.

Created with SnapGene®

Subgenomische RNA (sgmRNA) des hCoV NL63

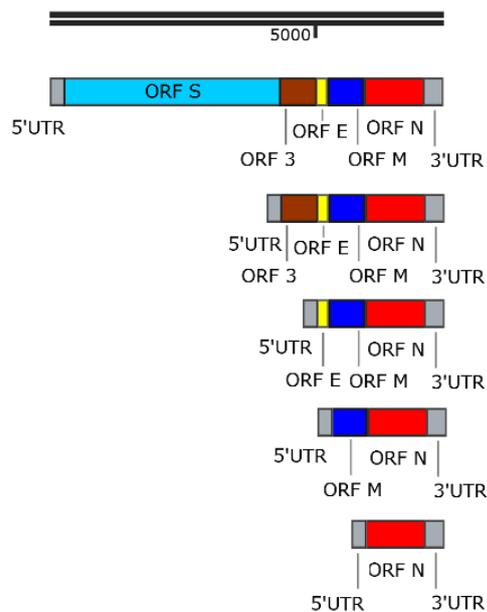


Abb. 4: Darstellung der subgenomischen messenger-RNA (sgmRNA) des humanen Coronavirus NL63. Am 5'-Ende befindet sich die 5'-UTR (nicht translatierte Region, engl. untranslated region), hierauf folgen die offenen Leseraster (ORF, engl. Open reading frame). Am Ende befindet sich wiederum eine UTR am 3'-Ende. Es wird jeweils nur das ORF am 5'-Ende der sgmRNA translatiert. Erstellt mit SnapGene®, modifiziert.

1.2.3 Replikationszyklus und virale Proteine

Wie bei allen anderen Viren ist die coronavirale Replikation obligat an Wirtszellen gebunden. Ort der Replikation ist das Zytosol [16]. Um dorthin zu gelangen, bindet das S-Protein des Virions an den jeweiligen zellulären Rezeptor der Wirtszelle. Damit bedingt das S-Protein sowohl den Wirtsorganismus als auch den Zelltropismus. Das S-Protein besteht aus zwei Domänen, welche bei einigen Coronaviren im Rahmen ihrer Modifikation im Golgiapparat gespalten werden. Die S1-Domäne bindet das Virion an den Rezeptor, die S2-Domäne ist verantwortlich für die darauf folgende Aufnahme in die Wirtszelle [33].

Nach Eintritt des Virions in das Zytosol erfolgt die Freigabe der gRNA. Diese wird nun wie eine mRNA von den zellulären Strukturen erkannt und die Translation des Polyproteins 1ab initiiert. Das Polyprotein spaltet sich autoproteolytisch in 16 Nichtstrukturproteine (Nsps). Hierfür sind verschiedene Proteasen verantwortlich. Zum einen stellt das Nsp5 die Hauptprotease (main protease, M^{pro}) dar, zum anderen finden sich eine oder mehrere Papain-like-Proteasen (PLP) innerhalb des Nsp3. Die einzelnen Nsps nehmen dann ihre unterschiedlichen Aufgaben und Aktivitäten auf [19, 34]. Das Nsp1 unterbindet u.a. durch Degradation von mRNA die zelluläre Translation. Hierdurch werden die Ressourcen auf die virale Replikation umgelenkt und intrazelluläre antivirale Mechanismen blockiert. Die viralen sgRNAs sind hiervon nicht betroffen, sie werden durch die 5'UTR geschützt [35-37]. Das Nsp2 ist möglicherweise ebenfalls an der Unterbindung zellulärer Signalwege beteiligt [38].

Nsp3, Nsp4 und Nsp6 nutzen ihre gemeinsamen Fähigkeiten, um Membranen zu falten und damit Doppelmembran-Vesikel (DMV, engl. *double membrane vesicle*) zu bilden. Diese Vesikel sind dem endoplasmatischen Retikulum (ER) angelagert und konzentrieren die viralen Moleküle an einem Ort, um so optimale Bedingungen für die Replikation zu schaffen. Gleichzeitig werden diese „Virusfabriken“ von der intrazellulären Immunabwehr abgeschirmt [39, 40]. Im Zentrum der viralen Replikation steht der Replikations- und Transkriptionskomplex (RTC, engl. *replication and transcription complex*) aus Nsp7, Nsp8 und Nsp12. Die Funktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP, engl. *RNA dependent RNA Polymerase*), wird durch Nsp12 gestellt. Zwar besitzt auch Nsp8 zumindest bei SARS-CoV eine RdRP-Aktivität, diese wirkt dabei jedoch am ehesten als Primase für Nsp12 [41, 42]. Nsp13 spaltet als Helikase doppelsträngige RNA auf, um so die Polymerisation des neuen Strangs zu ermöglichen [43].

Nsp 14 besitzt mit Nsp10 als Kofaktor eine Exonukleaseaktivität. Hierdurch können Fehler in der Replikation ausgeglichen werden [17, 44, 45]. Die Möglichkeit der Mismatch-Korrektur wird als einer der Gründe für das im Vergleich zu anderen RNA-Viren sehr lange coronavirale Genom angesehen. Zusammen mit Nsp16 übernehmen Nsp 10 und Nsp14 und Nsp16 zudem die Methylierung der 5'-Cap-Struktur der viralen RNA [46, 47]. Nsp8 und Nsp9 besitzen die Fähigkeit, RNA zu binden. Im Falle des SARS-CoV-2 wird so die 7SL-RNA, welche Teil des Signalerkennungspartikels (SRP, *engl. signal recognition particle*) ist, beeinflusst. Hierdurch wird der Transport von zellulären Molekülen an die Zelloberfläche schon vor Beendigung der Translation gestört [48]. Nsp9 bindet zudem an Nsp12, wobei die genaue Funktion für die virale Replikation derzeit noch nicht bekannt ist [49]. Nsp15 besitzt eine Endonukleaseaktivität, deren genaue Funktion für die coronavirale Replikation noch nicht sicher ist. Diskutiert werden unter anderem die Beeinflussung zellulärer RNA oder die Beteiligung an der Produktion von (-)sgRNA [50, 51].

Im Innern der DMV werden dann neben der gRNA die (-)sgRNA und sgRNA synthetisiert. Je nach Virusspezies werden so bis zu acht verschiedene Struktur- und akzessorische Proteine synthetisiert. Die sgRNAs besitzen eine Signalsequenz, sodass nach der Initiation ihrer Translation diese am ER fortgesetzt wird. Das von ORF 3 kodierte Protein 3 ist ein Typ 1-Transmembranprotein und wird zusammen mit dem E-Protein und dem M-Protein im ER-Golgi-Intermediate compartment (ERGIC) exprimiert und scheint eine wichtige Rolle in der Ausbildung neuer Virionen zu haben. Das homologe Protein 3a von SARS-CoV-2 bildet zudem Homodimere und Homotetramere aus, welche eine Ionenkanalfunktion haben. [52, 53]. Das von ORF E kodierte Protein zeigt je nach Spezies der Coronaviren leicht unterschiedliche Funktionen [54]. Nur zusammen mit dem M-Protein ist die Produktion von virusartigen Partikeln (VLP, *engl. virus like particles*) möglich [55, 56]. Ohne die Aktivität des E-Proteins ist die Struktur und Tenazität von MHV-Virionen gestört [57]. Die Infektiosität von SARS-CoV zeigte sich in Zellkultur stark eingeschränkt [58], während bei MERS-CoV keine funktionsfähigen Viruspartikel gebildet werden [59]. Zudem zeigt das E-Protein bei SARS-CoV antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften [60]. Einen Überblick über die Funktionen des E-Proteins bietet der Review-Artikel von Schoeman und Fielding [54]. Das M-Protein spielt die zentrale Rolle im Aufbau neuer Virionen und kommt am häufigsten an der Oberfläche der Viruspartikel vor [61]. Es kann an alle anderen Strukturmoleküle binden und ist

für den Zusammenhalt dieser von Bedeutung [62]. Neuman et al. zeigten, dass das M-Protein verschiedene Konformationen einnehmen kann, welche die Flexibilität der Virushülle und die Dichte von S-Proteinen an der Oberfläche der Virionen zu beeinflussen scheinen [63]. Eine vitale Rolle für die Produktion neuer funktionsfähiger Viruspartikel spielt das N-Protein. Es ist stark basisch, positiv geladen und bildet Multidimere aus, welche die virale gRNA binden und diese so in den Virionen konzentrieren [64, 65]. Zusammen bilden gRNA und N-Proteine das Ribonukleokapsid (RNP), welches eine helikale Struktur von 8-16 nm Durchmesser ausbildet [66]. Nach Fertigstellung (Assembly) werden die neu entstandenen Virionen dann ausgehend vom Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gebracht und ausgestoßen. Abb. 5 zeigt den coronaviralen Replikationszyklus schematisch.

Schematische Darstellung des coronaviralen Replikationszyklus:

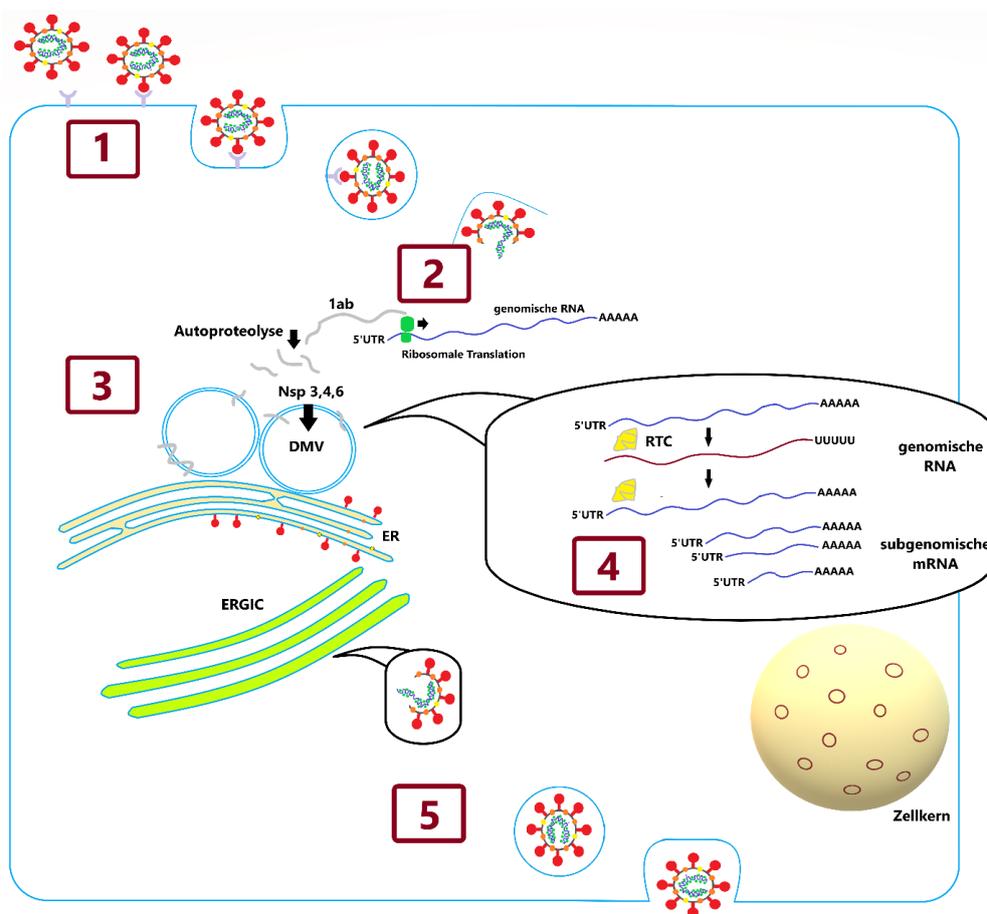


Abb. 5: Schematische Darstellung des coronaviralen Replikationszyklus. (1) Am Beginn steht die Bindung des Virions an den jeweiligen zellulären Rezeptor, welche durch die S1-Domäne des Spike-Proteins (rot dargestellt) vermittelt wird. Sie S2-Domäne initiiert dann die Aufnahme in die Wirtszelle. (2) Nach Auflösung des Viruspartikels wird die genomische RNA freigesetzt und mit ihrer 5'UTR (untranslated region) von einem Ribosom der Wirtszelle (grün) erkannt, gebunden und die Translation des Polyproteins 1ab initiiert. (3) Hierauf spaltet sich dieses autoproteolytisch mittels seiner Proteaseaktivitäten in 16 Nichtstrukturproteine (Nsp), welche dann

unterschiedliche Funktionen aufnehmen. Nsp3, Nsp4 und Nsp6 bilden aus zellulären Membranen Doppelmembranvesikel (DMV). (4) Dort bilden weitere Nsp den Replikations- und Transkriptionskomplex (RTC) aus, mit dem zum einen negative Abbilder der genomischen RNA (rot) produziert werden. Jene dienen dann wiederum als Matrize für neue genomische RNA. Auch werden subgenomische RNA und subgenomische messenger-RNA (sgmRNA) erstellt, welche dann für die Translation von Strukturproteinen zur Verfügung stehen und in das endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert werden. Im Inneren des ER-Golgi-Intermediärkompartiments (ERGIC) und im Golgi-Apparat kommt es dann zum Auf- und Zusammenbau neuer Virionen. Dies wird durch die Strukturproteine, insbesondere das Membran-Protein (orange) und Envelope-Protein (gelb) ermöglicht. Die genomische RNA bindet an das Nucleocapsid-Protein und wird im Inneren der Viruspartikel verpackt. Zum Schluss wird dann das Virion aus der Zelle ausgeschleust. Eigene Darstellung in Anlehnung an [19, 34, 40].

1.3 Bedeutung von Coronaviren für Mensch und Tier

1.3.1 Humanpathogene Coronaviren

Seit ihrer Erstbeschreibung war bis zur Jahrhundertwende nur die Humanpathogenität zweier Coronaviren (HCoV) bekannt, 229E und OC43. Beide Viren wurden hierbei mit meist benigne verlaufenden saisonalen Erkältungskrankheiten und Durchfallerkrankungen bei Neugeborenen und Kleinkindern in Verbindung gebracht [67-70].

Im März 2003 berichtete der Arzt *Carlo Urbani* über eine schwer verlaufende grippeartige Erkrankung, welche er erstmalig bei einem Patienten im vietnamesischen Hanoi festgestellt hatte. Infizierte Patienten zeigten hohes Fieber, Fatigue und im Verlauf eine schwere atypische Pneumonie mit Störung des Gasaustauschs. Carlo Urbani erkrankte selbst und erlag der Erkrankung. Rückblickend war die Erkrankung bereits 2002 in der südchinesischen Provinz Guangdong aufgetreten. Sie wurde *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS) genannt [3, 71, 72]. Der Krankheitserreger verbreitete sich rasch über Ländergrenzen hinweg und wurde vor allem in Südostasien, aber auch Kanada, den USA sowie in Europa nachgewiesen [73]. Im Verlauf konnte dann ein neues Coronavirus, SARS-CoV, als Verursacher identifiziert und dessen Genom sequenziert werden [3, 74]. Insgesamt registrierte die WHO 8096 Fälle, von denen 774 einen tödlichen Ausgang hatten. Dies entsprach einer fallbezogenen Letalität von 9,6 % [75]. Insgesamt waren milde oder gar asymptomatische Krankheitsverläufe selten, sodass durch Quarantänemaßnahmen eine vollständige Unterbindung von Mensch-zu-Mensch-Übertragungen erreicht werden konnte. Seit Mai 2004 waren beim Menschen keine neuen Erkrankungen registriert worden [76, 77].

In Folge der SARS-Pandemie wurde die Forschung zu Coronaviren und anderen unbekanntem Krankheitserregern intensiviert. Im Jahr 2003 wurde erstmals das Alphacoronavirus HCoV-

NL63 [78], im Jahr 2005 das Betacoronavirus HCoV-HKU1 [79] identifiziert. Beide Spezies verursachen in der Regel grippale Infekte, jedoch sind schwere Verläufe möglich [80, 81]. Das HCoV-NL63 steht im Zentrum dieser Arbeit und wird im anschließenden Kapitel eingehender beschrieben.

In Saudi-Arabien wurde 2012 ein neues humanpathogenes Coronavirus aus einem 60-jährigen, an einer atypischen Pneumonie verstorbenen Patienten isoliert. Das MERS-CoV (Middle Eastern Respiratory Syndrom Coronavirus) zeigt mit ca. 36 % eine noch höhere fallbezogene Letalität als das SARS-CoV. Die Erkrankung betrifft nicht nur das Lungengewebe, da man unter anderem bei betroffenen Patienten auch Nieren- und Multiorganversagen als Komplikationen feststellte [82]. Bis heute konnte keine spezifische Therapie bei MERS zugelassen werden, wobei eine placebokontrollierte Studie die Wirkung von Lopinavir/Ritonavir untersucht [83]. Als Intermediärwirt des MERS-CoV werden Dromedare angesehen, welche im Mittleren Osten als Sport- und Nutztiere gehalten werden. Erkrankte Tiere zeigen eine in der Regel nur geringfügig ausgeprägte Symptomatik eines Infekts der oberen Atemwege, infektiöse Viruspartikel konnten sowohl im Nasensekret als auch in der Milch weiblicher Dromedare nachgewiesen werden [84]. Zudem ist das MERS-CoV von Mensch zu Mensch übertragbar, was nicht zuletzt ein Ausbruch in Südkorea gezeigt hat. Ein einzelner infizierter Reisender führte dabei zur Infektion von 186 anderen Menschen. Dies war nicht zuletzt dadurch bedingt, dass bis zur Diagnosestellung Zeit vergangen war. Bemerkenswerterweise konnte ein Großteil der Übertragungen auf wenige „Superspreading Events“ zurückgeführt werden [85, 86].

Im Dezember 2019 präsentierten sich mehrere Patienten im chinesischen Wuhan mit einer atypischen Pneumonie, welche in epidemiologischem Zusammenhang mit einem Wildtier- und Fischmarkt standen. Als Verursacher dieser Erkrankung konnte im Verlauf ein Coronavirus identifiziert werden, welches zunächst 2019-nCoV und im Verlauf SARS-CoV-2 genannt wurde. Die durch das Virus verursachte Erkrankung trägt die von der WHO eingeführte Bezeichnung COVID-19 [87]. Initial wurde eine direkte Mensch-zu-Mensch-Übertragung für unwahrscheinlich gehalten, diese wurde jedoch kurze Zeit später durch weitere Ausbreitung des Virus dargestellt [88, 89]. Hauptsächlich erfolgt die Übertragung auf dem Luftweg. Im Gegensatz zu SARS ist das Virus bereits in einem Stadium der Erkrankung mit milden oder gar fehlenden Symptomen übertragbar, was Isolationsmaßnahmen erschwert. Die Erkrankungsschwere variiert stark und lässt sich im Einzelfall nur bedingt vorhersagen. Die

Mehrzahl der Patienten erleidet einen schweren grippalen Infekt, wobei es häufig zum passageren Verlust des Geruch- und Geschmackssinnes kommt. Bei einem Teil der Patienten verläuft die Erkrankung jedoch schwer, es kommt zu einer atypischen Pneumonie mit möglichem konsekutivem respiratorischen Versagen. Zudem kann es zu Nierenversagen und thrombembolischen Ereignissen kommen, wobei eine übermäßige, derangierte Immunantwort die Pathogenese der Erkrankung zumindest teilweise ausmacht. Insgesamt betrug die fallbezogene Letalität der COVID-19-Erkrankung in den ersten Jahren der Pandemie ca. 2 %, wobei die Wahrscheinlichkeit eines schweren Verlaufs mit einem höheren Lebensalter stark ansteigt [90]. Weitere Risikofaktoren stellen unter anderem Adipositas [91], das männliche Geschlecht, Herz-Kreislaufkrankungen inkl. Arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und Lungenerkrankungen dar [90]. Ein Teil der Patienten zeigt auch nach Genesung von der eigentlichen Erkrankung weiterhin, mithin über Monate, ausgeprägte Fatigue und mangelnde körperliche Leistungsfähigkeit. Diese Symptomkonstellation wird als Long-COVID bezeichnet [92]. Wie beim MERS-CoV kam es ebenfalls zu „Superspreading Events“, bei denen sich eine Vielzahl von Personen mit dem SARS-CoV-2 infizierten, während in der Mehrzahl der Fälle nur wenige Personen durch eine infizierte Person angesteckt wurden [93]. Die Erkrankung verbreitete sich innerhalb weniger Monate über alle Kontinente. Im März 2020 rief die Weltgesundheitsorganisation den Pandemiefall aus. Bis zum Februar 2023 waren über 673 Millionen Erkrankungsfälle im Menschen diagnostiziert worden, mehr als 6,8 Millionen Patienten waren an oder mit SARS-CoV-2 verstorben [94].

Zurecht richtete sich der Brennpunkt von Medizin, Wissenschaft und Forschung auf die Untersuchung von SARS-CoV-2 und weiterer Coronaviren. Dies zeigte sich schon anhand der bloßen Zahl an veröffentlichten Artikeln zu diesem Thema. Waren auf der Wissenschaftsdatenbank Pubmed bis zum Ende des Jahres 2019 ca. 15000 Publikationen zum Thema „coronavirus“ angegeben, imponierte zum 14.03.2023 eine Zahl von mehr als 230000 Artikeln [95]. Trotz der immensen Anstrengungen und des daraus folgenden Erkenntnisgewinns hinsichtlich der Pathophysiologie der COVID-19-Erkrankung konnten in der Entwicklung spezifischer antiviraler Medikamente zunächst nur eingeschränkt Erfolge erzielt werden. Die initiale Notfallzulassung des zur Prävention von Parasitosen und als Basismedikation rheumatischer Erkrankungen zugelassenen Hydroxychloroquins, teilweise in Kombination mit dem Antibiotikum Azithromycin, wurde bei unzureichendem Nutzen-

Risikoprofil wieder zurückgerufen [96]. Die bereits bei MERS untersuchte Therapie mit der Kombination aus Lopinavir und Ritonavir konnte in mehreren Studien keinen positiven Einfluss auf das Outcome der Patienten erwirken [97]. Das zur Behandlung von Hepatitis C und später für die Therapie von Ebola verwendete Nukleosidanalogen Remdesivir sowie die Therapie mit monoklonalen, gegen das Spike-Protein des SARS-CoV-2 gerichteten Antikörpern und die Behandlung mit dem Plasma gesunder, vormals an COVID-19 erkrankter Personen helfen im Allgemeinen nur in der Frühphase der Erkrankung [98-101]. Der generelle Einsatz von Remdesivir wurde von der WHO zwischenzeitlich nicht mehr empfohlen [102]. Die Steroidtherapie mit Dexamethason bei stationär behandelten Patienten sowie Budesonid bei ambulanten Patienten beeinflusst den Verlauf der Erkrankung positiv [103, 104]. Im Verlauf der Pandemie wurden zwei neue Medikamente zur Behandlung von COVID-19 entwickelt und zugelassen. Das Nukleosidanalogen Molnupiravir (Lagevrio®), welches zu Fehlern in der RNA-Replikation des Virus führt, führte in seiner Anwendung zu einer Reduktion des Risikos von Krankenhausaufnahme oder Tod um etwa 50 % [6, 7]. Noch effektiver zeigte sich das Kombinationspräparat Nirmatrelvir/Ritonavir als Hemmer der 3-Chymotrypsin-like Protease. Durch seinen Einsatz konnte das kombinierte Risiko von Krankenhausaufnahme und Tod um 70-90 % reduziert werden. [5, 7].

Durch die Entwicklung von Impfstoffen, insbesondere die Klasse der erstmals in breiter Masse eingesetzten mRNA-Impfstoffe, konnte die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung oder eines schweren Verlaufs stark gesenkt werden. [105-109]. Im Verlauf der Pandemie traten neue Varianten von SARS-CoV-2 auf, welche oft eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Infektiosität und Pathogenität aufwiesen. Auch die Effektivität der eingesetzten Impfstoffe zeigte sich hier teilweise eingeschränkt, auch Reinfektionen waren bei vorher an der Ursprungsvariante erkrankten und genesenen Personen möglich [110-113]. Diese „Variants of Concern“ (VOC, engl. für „besorgniserregende Variante“) wurden mit einer Buchstaben-Zahlen-Kodierung, der *Pango*-Nomenklatur [114] sowie zunächst, teilweise umgangssprachlich, mit dem Namen des Landes ihrer Erstidentifikation bezeichnet. Im Verlauf wurde dann eine Nomenklatur entsprechend des griechischen Alphabets angewandt. Besonders zu erwähnen sind die *Alpha*-Variante B.1.1.7 (ehemals „britische Variante“) [115-117], die *Delta*-Variante B.1.617.2 (initial teilweise als „indische Variante“ beschrieben) [118-120] und die hochinfektiöse *Omikron*-

Variante B.1.1.529, welche zuerst in Südafrika nachgewiesen werden konnte [121-123]. Allen gemein sind Mutationen, welche insbesondere das S-Protein betreffen [117, 120-123].

Durch strikte Maßnahmen des Infektionsschutzes konnte die Zahl der Erkrankungen in Deutschland anfangs gesenkt werden, wobei die nationalen und internationalen Folgen der COVID-19-Pandemie für Gesundheit, Gesellschaft und Wirtschaft immens und kaum abzuschätzen waren [124-126]. Insbesondere durch das Auftreten der im Vergleich hochansteckenden *Omikron*-Variante, welche einen großen Teil der Bevölkerung infizierte und einen durch Auffrischimpfung weiter bestehenden Impfschutz sank die Zahl der schweren Krankheitsfälle [127, 128], zumindest in Europa konnte die Erkrankung nun als endemisch bezeichnet werden [129-131]. Die Maßnahmen des Infektionsschutzes wurden wieder zurückgenommen, so hob das Bundesland Bayern die diesbezügliche Verordnung zum 01.03.2023 auf [132].

1.3.2 Das humane Coronavirus NL63

Im Jahr 2003 gelang der Nachweis eines bisher unbekanntes Coronavirus aus dem nasopharyngealen Aspirat eines damals 7 Monate alten Kindes. Das Kind litt an einer Bronchiolitis, wobei Tests auf Erreger anderer Atemwegserkrankungen keinen wegweisenden Befund erbrachten. In LLC-MK2-Zellen, welche mit der Probe inokuliert worden waren, zeigte sich ein zytopathologischer Effekt (CPE). Weitere Untersuchungen legten nahe, dass es sich um ein behülltes Virus handelte. Mittels der VIDISCA-Methode wurde das noch unbekanntes virale Genom mittels Restriktionsenzymen geschnitten und dann unter der Verwendung von an die Restriktionsschnittstellen bindenden Primern vervielfältigt und sequenziert. So konnte das Virus als Coronavirus identifiziert werden [133, 134]. Das veröffentlichte Referenzgenom hat eine Länge von 27553 Nukleotiden und beinhaltet ORF 1ab, ORF S, ORF 3, ORF E, ORF M und ORF N [135]. Kurz hierauf wurde das Virus auch von Fouchier et al. beschrieben [136].

Nach der derzeitigen Klassifikation der ICTV ist das NL63-CoV der Gattung der Alphacoronaviren und der Untergattung der Setracoviren zugeordnet.

Im Verlauf konnte ACE2 (engl. *Angiotensin converting enzyme 2*) als Rezeptor der Wirtszelle, an den das S-Protein des NL63-Virions bindet, ausgemacht werden. Ebenso wird ACE2 von SARS-CoV sowie von SARS-CoV-2 als Rezeptor angesteuert.

Klinisch löst das HCoV-NL63 beim Menschen vor allem Infekte der oberen und unteren Atemwege wie Pseudokrupp oder Bronchiolitis aus. Wie bei anderen respiratorischen Erkrankungen zeigt sich eine saisonale Häufung der Infektionszahl in den Wintermonaten [137]. Bis zum Auftreten von COVID-19 zeigte sich in Untersuchungen NL63 für etwa 3-4 % der Infekte der oberen Atemwege ursächlich. Dabei weist die Mehrzahl der Kinder eine NL63-Serokonversion vor Vollendung des vierten Lebensjahres auf [138, 139]. Insbesondere bei Kindern und Älteren sowie Patienten mit geschwächtem Immunsystem verursacht HCoV-NL63 schwerwiegendere Infekte bis hin zu einer atypischen Pneumonie [140, 141]. In einer Untersuchung stationär behandelter Patienten in Taiwan konnte HCoV-NL63 in 8,4 % der Fälle nachgewiesen werden. Koinfektionen mit Influenzaviren zeigten hier einen schwereren Verlauf [142]. Es existieren auch Fallberichte von tödlichen Verläufen einer Infektion mit HCoV-NL63, welche jedoch insgesamt sehr selten vorkommen [143, 144]. Bis heute ist keine ursächliche Behandlung der Erkrankung etabliert, sodass lediglich eine symptomatische Therapie möglich ist.

1.3.3 Tierpathogene Coronaviren

Neben dem Menschen befallen eine Vielzahl von Coronaviren andere Wirbeltiere. Auf einige dieser soll hier exemplarisch eingegangen werden. Insbesondere in der Nutztierhaltung verursachen die oft tödlich verlaufenden und hochansteckenden coronaviralen Infektionskrankheiten hohe Schäden. Die Alphacoronaviren Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV), das Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) und das Swine Acute Diarrhea Syndrome - Coronavirus (SADS-CoV) lösen schwere Gastroenteritiden aus, welche insbesondere für neugeborene Ferkel eine hohe Letalität aufweisen [2, 145, 146].

Geflügel, insbesondere Masthähnchen, erkranken am hochansteckenden Deltacoronavirus Infectious Bronchitis Virus (IBV), welches je nach Virenstamm unterschiedliche Syndrome auslöst. Eine Infektion der oberen und unteren Atemwege verläuft in der Regel nur bei Koinfektion mit weiteren Krankheitserregern schwer, während die durch nephrotrope Stämme ausgelöste Nephritis in etwa einem Drittel der Fälle einen letalen Ausgang hat. Zwar kommen Impfstoffe zum Einsatz, diese wirken jedoch durch das Auftreten verschiedener Varianten oft nur bedingt [147, 148].

Mäuse und Ratten, welche häufig als Versuchstiere zu wissenschaftlichen Zwecken gehalten werden, können vom Murinen Coronavirus (M-CoV, ehemals Maus Hepatitis Virus, MHV) befallen werden. Neben einer Hepatitis kann dieses Betacoronavirus je nach Virenstamm auch eine Hyperkoagulopathie oder eine im Verlauf demyelinisierende Enzephalitis auslösen [149, 150]. Die Letalität der Erkrankung variiert, wobei insbesondere Jungtiere schwer erkranken können. Da auch nicht letale Verläufe Experimente nachhaltig beeinflussen können, ist die Erkrankung in Versuchstierställen besonders gefürchtet.

Auch Haustiere sind von coronaviralen Erkrankungen betroffen. Das Canine Coronavirus (CCoV) löst bei Hunden eine meist benigne verlaufende Gastroenteritis aus, wobei ein pantroper Virenstamm für Ausbrüche mit letalem Verlauf verantwortlich ist [151, 152]. Ein ähnlicher Wechsel des Tropismus ist bereits bei Hauskatzen beschrieben. Das Feline Coronavirus löst in seiner Form als Felines Enterales Coronavirus (FECV) eine Gastroenteritis aus. In Folge von Mutationen ist es dem Virion jedoch möglich, Monozyten als Wirtszellen zu nutzen. Dieses als Felines Infektiöses Peritonitis-Virus (FIPV) bekannte Virus löst eine unbehandelt tödlich verlaufende Erkrankung mit gastroenterologischen Symptomen wie Aszites und Ikterus und neurologischen Symptomen wie epileptischen Anfällen aus [153, 154]. Das mit Remdesivir verwandte Nukleosidanalogen GS-441524 zeigt bei Katzen gute Erfolge in der Behandlung einer FIPV-Infektion, sodass die Mehrzahl der erkrankten Tiere geheilt werden kann. Derzeit ist GS-441524 jedoch noch nicht für die Tierbehandlung zugelassen [155].

Zusammenfassend existiert eine Vielzahl von Coronaviren, welche Säugetiere und Vögel infizieren können. Die ökologische, aber auch wirtschaftliche Bedeutung dieser Virenfamilie ist somit enorm.

1.3.4 Coronaviren – Bedeutung als Zoonosen

Als Ausgangswirt diverser, auf andere Arten neu übertragener Coronaviren konnten Fledermäuse ausgemacht werden [4]. Deren weltweite Verbreitung und die Besonderheit ihres Immunsystems, Virusinfektionen dauerhaft zu kontrollieren, ohne dass es zu einer Erkrankung kommt, begünstigen die Eigenschaft als Reservoir für Coronaviren [156-158].

Humanpathogene Coronaviren entwickelten sich teilweise über verschiedene Zwischenwirte, welche teilweise noch nicht identifiziert werden konnten. Im Falle von SARS-CoV dienten

wahrscheinlich Schleichkatzen als Überträger, MERS-CoV geht von Dromedaren auf den Menschen über. Im Falle von HCoV-OC43 sind Kühe als Ursprung identifiziert [159]. Die Arbeitsgruppe um Marc Van Ranst veröffentlichte im Jahr 2005 Ergebnisse, dass das HCoV-OC43 nach Analyse mittels der molekularen Uhr um das Jahr 1890 erstmalig im Menschen aufgetreten sein müsste, nachdem es sich aller Wahrscheinlichkeit nach aus dem Bovinen Coronavirus (BCoV) entwickelt hatte. In diese Zeit fiel auch die Influenza-Pandemie von 1889 bis 1895, damals zeitgenössisch auch als „Russische Grippe“ bezeichnet. So wird die Hypothese gestellt, dass das HCoV-OC43 der eigentliche Erreger der damaligen Pandemie war [160].

Im Falle von NL63 sowie SARS-CoV-2 ist die übertragende Tierspezies nicht bekannt. Im Verlauf der COVID-19-Pandemie zeigte sich, dass unter anderem Nerze für die Infektion mit SARS-CoV-2 nicht nur unter experimentellen Umständen empfänglich sind. Nach Ausbrüchen in dänischen Nerzfarmen wurden Millionen dieser Tiere gekeult [161].

Neben den bekannten humanpathogenen Coronaviren erregen weitere Aufmerksamkeit: Im Falle des porcinen SADS-CoV konnte zumindest *in vitro* die Replikation in humanen Zellen nachgewiesen werden, sodass hier zumindest die Gefahr der Entwicklung einer neuen Zooanthroponose besteht [162]. Eine aktuelle Publikation beschreibt den Nachweis eines rekombinanten CCoV in acht nasopharyngealen Abstrichen von Patienten mit Pneumonie im östlichen Malaysia. Sollten sich diese Ergebnisse reproduzieren lassen, wäre das mit CCoV-HuPn-2018 bezeichnete Coronavirus das achte beschriebene humanpathogene Coronavirus [163].

Die Anpassungsfähigkeit von Coronaviren, Begleitumstände wie Massentierhaltung und der enge Kontakt von Menschen mit Haus- und Nutztieren unterstützen die Entwicklung neuer humanpathogener Coronaviren. Somit ist eine globale Überwachung im Sinne des *One Health* Konzepts von sich neu entwickelnden Erkrankungen dringend notwendig [161].

1.4. Ansatzpunkte für die antivirale Intervention

1.4.1 Virostatika – ein Überblick

Prinzipiell bietet jeder Abschnitt des coronaviralen Replikationszyklus Angriffspunkte, die Vermehrung der Viren zu mindern. Extrazellulär können Virionen inaktiviert werden, was insbesondere durch neutralisierende Antikörper möglich ist. Diese unterbinden die weitere

Funktionsfähigkeit des Viruspartikels. Gegen SARS-CoV-2 wurden bereits mit Casirivimab/Imdevimab sowie Bamlanivimab monoklonale, gegen das S-Protein gerichtete, Antikörper für die Anwendung im Menschen entwickelt. Schon im Vorfeld wurde dieser Ansatz in der Therapie der HIV-Infektion verfolgt. Hier zeigte sich, auch bedingt durch die bei Retroviren besonders hohe Mutationsrate, eine rasche Resistenzentwicklung bei Verwendung einzelner monoklonaler Antikörper. Dieser Effekt konnte durch den gleichzeitigen Einsatz verschiedener Antikörper sowie breitneutralisierender Antikörper abgemindert werden [164, 165]. Ähnliches wird hinsichtlich des Influenza-A-Virus beschrieben [166].

Entryinhibitoren verhindern das Andocken an oder die Aufnahme in die potenzielle Wirtszelle [167]. Simmons et al. beschrieben 2005 mit *mdl 28170* einen experimentellen SARS-CoV Entryinhibitor [168].

Der nächste Schritt im viralen Replikationszyklus stellt das Uncoating, die Freisetzung der inneren Bestandteile des Virions in das Zytoplasma dar. Als Beispiel inhibiert Amantadin durch Blockade des M2-Kanals das Uncoating im Influenza A-Virus, wobei die Wirksamkeit durch weltweit aufgetretene Resistenzen mittlerweile stark eingeschränkt ist [169, 170].

Virusproteasen sind für die allermeisten Viren von immanenter Bedeutung. So revolutionierte die Kombinationstherapie des Proteaseinhibitors Simeprevir zusammen mit dem Nukleosidanalogen Sofosbuvir die Therapie der Hepatitis C [171]. In Zellkultur konnte die Virale Replikation verschiedener Corona- und Enteroviren durch α -Ketoamide, welche die Hauptprotease hemmen, wirksam unterdrückt werden. Dies gelang unter anderem auch für HCoV-NL63 und SARS-CoV-2 [172, 173].

Die Produktion der durch Coronaviren geformten intrazellulären Doppelmembranvesikel kann durch den experimentellen Wirkstoff K22 wirksam gehemmt werden. Resistente Viren wiesen Mutationen im das für DMV wichtigen Nsp6 auf, zeigten insgesamt jedoch eine niedrigere Infektiosität [174].

Als Hauptansatzpunkt vieler Virostatika gilt die virale RNA-Polymerase (bzw. DNA-Polymerase bei DNA-Viren). Insbesondere Nukleosidanaloga können diese hemmen, teilweise bedingt durch eine verminderte Selektivität dieser in der Wahl ihrer Substrate [175]. Es resultieren dann vermehrt, teilweise letale, Mutationen und Strangabbrüche. Das bereits erwähnte Nukleosidanaloga Remdesivir, der experimentelle Wirkstoff GS-441524 und Favipiravir hemmen wie auch das seit den 1970er Jahren bekannte Ribavirin die Replikation von Coronaviren und anderen, wie beispielsweise Lassa- und Ebolaviren [176-179]. Im

Tierversuch hat sich der Wirkstoff β -D-N⁴-hydroxycytidine (NHC) als wirksam gegenüber SARS-CoV-2 erwiesen [180].

Im späteren Verlauf des viralen Replikationszyklus können die Schritte des Zusammenbaus (Assembly) der Virionen sowie das Budding, das Ausschleusen aus der Wirtszelle, gehemmt werden. Beispielsweise inhibieren Neuraminidasehemmer wie Laninamivir oder Oseltamivir das Budding von Influenzaviren und werden klinisch eingesetzt. Zunehmend auftretende Resistenzen schränken den Einsatz ein [170]. Für Coronaviren bestehen bisher nur *in silico* – Analysen zum Einsatz von potenziellen Assembly-Inhibitoren [181, 182].

1.4.2 Resistenzentwicklung und *wirtsspezifische Virusinhibitoren*

Die fortschreitende Ausbildung von Resistenzen gegenüber antiviralen Wirkstoffen stellt eine andauernde Herausforderung für die Forschung dar. Die Fehleranfälligkeit der viralen RNA-Polymerasen bietet zusammen mit der hohen Reproduktionszahl ausgezeichnete Ausgangsbedingungen für neue Mutationen. Für RNA-Viren wird die Mutationsrate mit etwa 10^{-3} - 10^{-5} pro Nukleotid angegeben, wobei bei Coronaviren, insbesondere durch die von Nsp14 gestellte Exonukleaseaktivität die Häufigkeit von Fehlern weiter reduziert wird [183-187]. Sie beträgt im Falle von MHV etwa $2,5 \times 10^{-6}$ pro Nukleotid und Replikationszyklus, fehlt diese Exonukleaseaktivität, steigt die Rate auf $3,2 \times 10^{-5}$ an. [188]. Für SARS-CoV ist ähnliches beschrieben [18]. Smith et al. zeigten eine 300-fach erhöhte Anfälligkeit für Mutationen unter dem Einsatz von 5-Fluoruracil nach Stilllegung von Nsp14 im MHV [189].

Die den Mutationen folgenden Änderungen im Aufbau der viralen Proteine können die Bindungsstellen von antiviralen Wirkstoffen verändern, sodass die Affinität dieser abnimmt. Eine weitere Möglichkeit der Resistenzentwicklung stellt eine „Loss-of-function“ Mutation dar, welche für einige DNA-Viren aus der Familie der Herpesviridae beschrieben ist. Hier wird normalerweise das Nucleosidanalogon Aciclovir durch die virale Thymidinkinase in den aktiven Metaboliten umgewandelt. Fehlt die Kinaseaktivität in Folge einer Mutation, ist Aciclovir nicht mehr wirksam [190].

Jedoch können nicht nur virale Proteine als Angriffspunkt der antiviralen Intervention dienen. Im Rahmen ihrer Replikation interagieren diese mit einer Vielzahl zellulärer Proteine, von deren Aktivität sie abhängen. Wird eine solche Funktion unterbunden, ist es für das Virus wesentlich unwahrscheinlicher, dass die fehlende Aktivität über Mutationen wieder

ausgeglichen werden kann. Medikamente, welche an Strukturen der Wirtszelle ansetzen, werden als wirtsspezifische Virusinhibitoren (*host-targeted-antivirals* = HTAs) bezeichnet.

Einige Wirkstoffe können neben einem direkt gegen virale Strukturen gerichteten Effekt auch auf Proteine der Wirtszelle abzielen. Beispielsweise im Falle von Ribavirin zeigt sich neben der antiviralen Wirkung auf die RdRP auch eine Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), welche eine entscheidende Rolle in der Synthese von Guanosin-Monophosphat darstellt [189].

Weitere Beispiele sind die Hemmung des Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1), welcher von verschiedenen Viren wie dem Hepatitis C-Virus, HIV-1 und HSV-1 zur Initiation der Translation herangezogen wird. *In vitro* konnte die Substanz SD-29 und deren Analoga die Replikation von HSV-1 inhibieren [191]. Die Replikation von Hepatitis B- und Hepatitis D-Viren kann durch Cyclosporin A (CsA) gehemmt werden. Die Wirkung entfaltet es über die Blockade des NTCP Rezeptors, welcher den Eintritt der Viren in die Hepatozyten ermöglicht [192]. Ein weiterer Wirkmechanismus von CsA und dessen Analoga ist die Hemmung von Cyclophilinen, welches im folgenden Kapitel erläutert wird.

1.4.3 Cyclophiline und Cyclophilininhibitoren

Auf der Suche nach zellulären Interaktionspartnern von viralen Proteinen von NL63 und SARS-CoV wurde ein Screening mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (engl. *Yeast Two-Hybrid System*, Y2H) durchgeführt. Hier hatte sich eine deutliche Interaktion von Cyclophilin A (CYPA) mit dem Nsp1 von SARS-CoV [193] sowie Nsp3 und Nsp15 von HCoV-NL63 darstellen lassen (AG von Brunn, unveröffentlichte Daten).

Cyclophiline (CYP) stellen eine ubiquitär vorkommende Enzymklasse dar, welche eine Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase) Aktivität besitzen. Sie gehören zur Überklasse der Immunophiline. PPIasen wirken als Faltungshelfer im Rahmen der posttranslationalen Modifikation von Proteinen, indem an der Aminosäure Prolin der Wechsel zwischen cis- und trans-Konfiguration katalysiert wird [194, 195]. Abb. 6 veranschaulicht den Konformationswechsel.

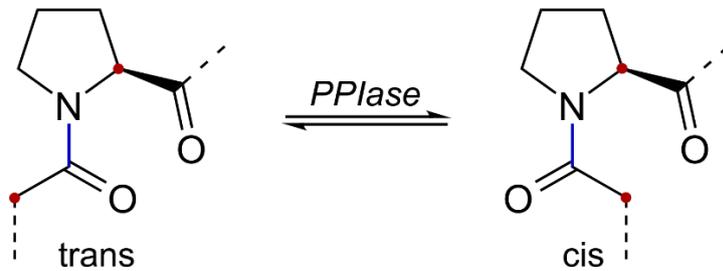


Abb. 6: Der die Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase) katalysierte Konformationswechsel. In der Mitte ist die Aminosäure Prolin dargestellt, in Blau die Bindung, an der der Wechsel zwischen cis- und trans- Konformation erfolgt. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf der Aminosäurekette an. Quelle: Wikipedia; URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Proline-cis-trans-isomerisation.svg>, gemeinfrei, abgerufen am 12.07.2021

Im Menschen sind 16 Isoformen der Cyclophiline (Cyp) bekannt, wobei Cyclophilin A (CypA, PPIA) am weitesten verbreitet und sowohl intrazellulär in allen Kompartimenten als auch extrazellulär auftritt [196]. Es macht zwischen 0,1 und 0,6 % des gesamten zellulären Proteins aus [195] und wurde als Bindungspartner des seit den 1980er Jahren als Immunsuppressivum eingesetzten Cyclosporin A identifiziert [197, 198]. CsA bindet CypA und inhibiert dabei auch dessen PPIase-Aktivität [199]. Der immunsuppressive Effekt wird durch einen Funktionszuwachs („gain of function“) des Cyclophilin A bewirkt. Nach Bindung von CsA und CypA ist dieser Komplex aus beiden in der Lage, in T-Lymphozyten die Phosphatase Calcineurin zu binden und zu hemmen. So ist Calcineurin nicht mehr in der Lage, den immunologisch wichtigen Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NFAT) zu dephosphorylieren. Dieser kann nicht mehr vom Zytosol in den Zellkern transportiert werden, um entsprechende Promotoren immunologisch wichtiger Gene zu regulieren.

Weitere Cyclophiline, wie CypB (PPIB) und C (PPIC) werden im endoplasmatischen Retikulum exprimiert, während CypD (PPID) mitochondrial lokalisiert ist [200]. Abb. 7 stellt zur Veranschaulichung die intrazelluläre Verteilung von PPIA und PPIB mittels Fluoreszenzmikroskopie dar.

Cyclophiline: Darstellung der intrazellulären Verteilung von CypA und CypB

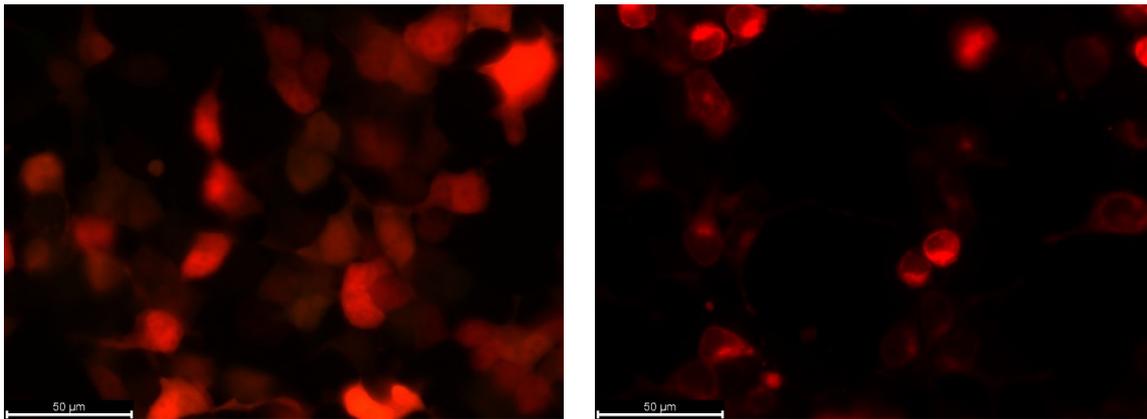


Abb. 7: Darstellung der intrazellulären Verteilung von CypA und CypB. Die Zellen wurden mit den Genen für RFP-CypA (links) beziehungsweise RFP-CypB (rechts) transfiziert. Unter Anregung bei einer Wellenlänge von 545 ± 40 nm wird rotes Licht emittiert. Zu sehen sind die unterschiedlichen intrazellulären Verteilungsmuster: Während PPIA in über die ganze Zelle hinweg exprimiert wird, zeigt sich eine Konzentration von PPIB am ehesten im endoplasmatischen Retikulum. Der Maßstabsbalken unten rechts im Bild zeigt die Länge von $50\ \mu\text{m}$ an. (Mikroskop: Leica DM400 B; Kamera DFC360FX; Ölimmersionsobjektiv HCX-PL-APO-CS63.0x1.40)

PPIA spielt eine Schlüsselrolle in entzündlichen infektiösen und nichtinfektiösen Erkrankungen. Beispielsweise konnte es als Marker und Mediator von Herz-Kreislauferkrankungen wie Arteriosklerose, akutem abdominalen Aortenaneurysma, Diabetes mellitus Typ 2 sowie von akuten und degenerativen Neurologischen Erkrankungen dargestellt werden [201]. So zeigten sich $\text{Apoe}^{-/-}$ -Mäuse, welche nach einem zweiten knock-out kein Cyclophilin A mehr exprimierten, geschützt gegenüber der Ausbildung und der Ruptur eines abdominalen Aortenaneurysmas [202].

In Patienten mit einer intrakraniellen Blutung nach Aneurysmaruptur korrelierte eine erhöhte Serumkonzentration von CypA mit einem schlechteren neurologischen Outcome [203]. Auch existieren Daten zur Inhibition von Cyclophilinen mit CsA in Patienten mit ischämischen Schlaganfall. So zeigte sich das Infarktvolume nach Großgefäßverschlüssen, welche einer Gefäßeröffnung zugänglich waren, im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringer [204].

Hinsichtlich der Rolle von CypA bei Infektionskrankheiten bietet der Review von Liao et al. „Cyclophilin A: a key player for etiological agent infection“ eine aktuelle Übersicht [205]. Der Replikationszyklus verschiedenster Bakterien und Viren wird durch Cyclophiline beeinflusst. Im Falle von Influenza wirkt Cyclophilin A selbst über unterschiedliche Wege als Inhibitor, bei HIV zeigt sich eine zelltypspezifische Verstärkung oder Minderung der viralen Replikation [205]. Weiter wirkt Cyclophilin A unter anderem auf die Replikation von Enteroviren, dem

humanem Cytomegalievirus, Rotaviren sowie Flaviviren verstärkend. In den genannten Viren zeigt sich eine Hemmung der Replikation unter dem Einfluss von Cyclophilinhibitoren [9, 38], interessanterweise auch im Falle der Influenzaviren. Hier sind cyclophilin-abhängige und insbesondere cyclophilin-unabhängige Wege beschrieben [10].

Für das Hepatitis C-Virus (HCV) ist Cyclophilin A durch Bindung an die Nichtstrukturproteine NS5A/NS5B essentiell für die virale Replikation und zudem notwendig für die Ausbildung von DMV [206, 207]. Nach Zugabe von Cyclophilinhibitoren wird nicht nur die Replikation von HCV stark gehemmt, sondern es kommt auch es zu Strukturänderungen im ER, sodass eine Reinfektion der Zellen unterbunden wird [208, 209].

Es liegt nahe, dass die durch CsA verursachte Immunsuppression bei der Behandlung von Infektionskrankheiten eine unerwünschte Nebenwirkung ist. So wurden Strukturanaloga des CsA entwickelt, welche zwar Cyclophiline binden und inhibieren, jedoch den NFAT-Signalweg nicht beeinflussen. Bereits in den 1990er Jahren entstand (Me-Ile-4)cyclosporin (NIM811), in den 2000er Jahren wurde Alisporivir (ALV, Debio-025) entwickelt [209, 210]. ALV stellt den bisher einzigen Cyclophilininhibitor dar, der in einer Phase III – Studie hinsichtlich seiner antiviralen Aktivität am Menschen erprobt worden ist. Trotz der Erfolge bei der Therapie von HCV zeigte sich ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Profil im Vergleich zu den später eingeführten direct acting antivirals. Eine Zulassung von Alisporivir erfolgte daher nicht. [211, 212].

Auch für die Replikation von Coronaviren spielen Cyclophiline eine tragende Rolle, obschon der genaue Mechanismus noch nicht abschließend geklärt ist. Verschiedene Veröffentlichungen stellen die Bedeutung von insbesondere CypA [213, 214] oder CypA und B heraus [215, 216]. CypA bindet im Falle von SARS-CoV das N-Protein, im Y2H-System konnte eine Interaktion mit Nsp1 dargestellt werden [193, 217]. Die Replikation verschiedener Coronaviren, u.a. gezeigt für HCoV-229E, HCoV-NL63, SARS-CoV, MERS-CoV, MHV sowie SARS-CoV-2 wird *in vitro* wirksam gehemmt [8, 193, 218-221]. Im Mausmodell konnte im Fall einer Infektion mit SARS-CoV durch Behandlung mit ALV der Gewichtsverlust im Rahmen der Erkrankung, nicht jedoch deren Letalität gemindert werden, wobei in dieser Veröffentlichung die Applikationsweise des ALV nicht angegeben wurde [219]. Angesichts der derzeit immanenten COVID-19-Pandemie wurden auch Cyclophilinhibitoren als mögliche Therapeutika benannt [222, 223]. Das Pharmaunternehmen Debiopharm startete im Jahr 2021 eine Phase II – Studie, um einen

möglichen Benefit der Therapie mit Alisporivir bei stationär behandelten COVID-19-Patienten zu untersuchen [224].

1.5 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Induktion und Analyse von Mutationen im humanen Coronavirus NL63, welche Hinweise auf die Resistenzentwicklung gegenüber Cyclophilininhibitoren erbringen sollten.

Am Anfang stand die Etablierung einer seriellen Passage von HCoV-NL63 in Zellkultur, wobei neben den Viren der Interventionsgruppe, die den Inhibitoren ausgesetzt wurden, auch Kontrollpopulationen passagiert wurden.

Im Anschluss daran wurden die Viruspopulationen untereinander hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber den eingesetzten Inhibitoren getestet. Mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) wurde das Genom der Viren sequenziert und so Einzelmutationen und Mutationsschwerpunkte (*hot spots*) dargestellt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Allgemeines

Die Experimente fanden, soweit nicht anders angegeben, in einem Labor mit der Zertifizierung als gentechnische Sicherheitsanlage der Stufe 2 statt. Die verwendeten Materialien sind in Kapitel 5.1 Verwendete Materialien und Software aufgelistet.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Verwendete Zellen

Als Wirtszellen für das HCoV-NL63 dienten CaCo-2 und LLC-MK2-Zellen. Beide Zelltypen exprimieren den ACE2-Rezeptor und sind so für das HCoV-NL63 empfänglich, wobei die virale Replikationsrate in CaCo-2-Zellen höher ist als in LLC-MK2-Zellen [1, 225]. Für die Versuche zur Proteininteraktion wurden HEK293-Zellen verwendet. CaCo-2- und HEK293-Zellen stammen aus dem Laborbestand, weitere CaCo-2- und LLC-MK2-Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von PD Marcel Müller (Charité - Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt. Ebenfalls wurden CaCo-2-Zellen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen. Im Rahmen eines anderen Projekts wurden von der AG Prof. Veit Hornung (LMU München) LLC-MK2-PPIA KO (Knock Out) Zellklone hergestellt. In dieser Arbeit wurde neben einem Wildtyp (wt)-Klon „LLC-MK2 A2“ ein Klon mit einem homozygoten PPIA-Knockout verwendet („LLC-MK2 C10“).

2.2.2 Zellkultur und -propagation

Die Kultivierung von Zellen und die Infektion dieser mit dem HCoV-NL63 erfolgte gemäß den bereits in der Arbeitsgruppe vorbestehenden Richtlinien und in Anlehnung an die Empfehlung der American Type Culture Collection (ATCC) [226]. Säugerzellen wurden in einer feuchten Atmosphäre, welche zu 95 % aus Luft und zu 5 % aus CO₂ bestand, inkubiert. Die Arbeiten wurden unter möglichst aseptischen

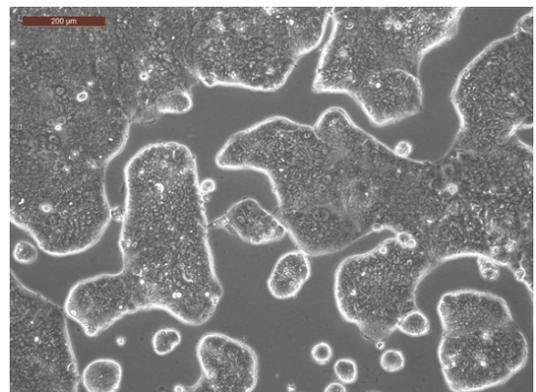


Abb. 8: CaCo-2-Zellen in Zellkultur

Bedingungen unter einer Sterilbank bei konstantem laminarem Luftstrom durchgeführt. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente kamen Zellen der Linien CaCo-2, LLC-MK2 und HEK-293 Zellen zur Verwendung. Abb. 8 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von CaCo-2-Zellen in Kultur.

Kulturmedien: Für Zellen des Typs LLC-MK2 und HEK293 diente DMEM, welches mit 10 % Fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin ergänzt worden war, als Nährmedium. CaCo-2-Zellen wurden in DMEM, welches mit 20 % FBS, 1 % MEM NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren), 1 % MEM Natrium Pyruvate (Natriumpyruvat) und 1 % Penicillin/Streptomycin ergänzt worden war, kultiviert. Im Verlauf wurde an dessen Stelle Medium aus 78 % DMEM, welches bereits Natriumpyruvat enthielt, 20 % FBS, 1 % MEM NEAA und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Als Waschlösung wurde für alle Zellen phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS) genutzt, das Volumen der Waschlösung entsprach jeweils der Hälfte des Volumens des Kulturmediums.

Auftauen der Zellen: Die Zellen waren in flüssigem Stickstoff eingelagert. Das Kryokonservierungsröhrchen wurde desinfiziert, dann kurz im Wasserbad bei Raumtemperatur geschwenkt und erneut desinfiziert. Unter möglichst sterilen Kautelen wurde dann der Inhalt des Röhrchens in insgesamt 20 ml raumtemperiertem Nährmedium schrittweise resuspendiert und der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden dann bei 1000 rpm / 220 x g für zwei Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen durch wiederholtes Pipettieren in Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei 10 cm- Zellkulturschalen ausgesät, durch vorsichtiges Schwenken verteilt und dann bei 37° C in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂ inkubiert.

Propagation in der Zellkultur: Um Subkulturen aus einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser anzulegen, wurde bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % zuerst der Überstand aus den Kulturgefäßen abgenommen. Dann wurden die Zellen zuerst mit 5 ml DPBS gewaschen und diese wiederum entfernt. Dann wurden 2 ml einer Lösung mit Trypsin-EDTA hinzugegeben, um Zell-Zell-Kontakte und Zell-Gefäßkontakte aufzulösen. Für HEK293- und LLCMK2-Zellen kam Trypsin-EDTA 0,05 % zum Einsatz, für CaCo-2-Zellen Trypsin-EDTA 0,25 %. Daraufhin wurden die Zellen bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert, bis diese sich ablösten, was in der Regel zwischen vier und zehn Minuten dauerte. Den Zellen wurde dann 4 ml Nährmedium zugegeben, um eine weitere Trypsinisierung zu unterbinden. Der Inhalt des

Gefäßes wurde dann in ein 15 ml bzw. 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 2 Minuten bei 1000 rpm / 220 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit Kulturmedium vermischt, um eine möglichst homogene Zellsuspension herzustellen. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert und in neue Zellkulturgefäße gegeben. Je nach deren Größe wurde dann die Suspension mit Kulturmedium ergänzt.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht zu den verwendeten Zellkulturgefäßen. Die Kulturgefäße wurden dann vorsichtig geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Dann erfolgte die erneute Inkubation im Zellkulturinkubator bei 37° C in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂ mit hoher Feuchtigkeit. Je nach Zellreihe und Wachstumsverhalten wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 bis zu 1:20 aufgeteilt.

Zellkulturgefäß	Kulturoberfläche	Kulturmedium
Zellkulturflasche	175 cm ²	22 ml
Zellkulturschale (10 cm)	58 cm ²	10 ml
6-Loch-Platte	9,5 cm ² /Loch	3,0 bzw. 2,5 ml
12-Loch-Platte	3,8 cm ² /Loch	1,5 ml
24-Loch-Platte	1,9 cm ² /Loch	600 µl
48-Loch-Platte	0,95 cm ² /Loch	400 µl
96-Loch-Platte	0,29 cm ² /Loch	110 µl

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zellkulturgefäße und Volumina des Kulturmediums

Einfrieren von Zellen: Die ersten Schritte der Kryokonservierung der CaCo-2-Zellen verliefen wie die oben beschriebene Propagation der Zellkultur. Das abzentrifugierte Zellpellet wurde dann jedoch mit einem modifiziertem Kulturmedium, welches mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt worden war, resuspendiert. Die Suspension wurde dann in Einfrierröhrchen überführt und diese dann verschlossen. Die Röhrchen wurden dann in mehrere Lagen Papierhandtücher verpackt und bei -80° C zwischengelagert. Nach mindestens 24 Stunden wurden die Röhrchen dann in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

2.3. Virusinfektion

2.3.1 Virusinfektion im Allgemeinen

Es wurden humane Coronaviren NL63 aus dem Laborbestand verwendet. Abweichungen im Genotyp dieser Virenpopulation von dem der Erstveröffentlichung [135] sind in Kapitel 3.3.1 Ausgangspopulationen der Passageexperimente aufgeführt (NL63-Stock 5/17). Im Verlauf erhielten wir dankenswerter Weise einen CaCo-2-adaptierten HCoV-NL63-Stock aus der AG Müller (Charité Universitätsmedizin Berlin) (NL63-Stock Berlin 1).

Die Mikroreaktionsgefäße, in welchen der Laborbestand bei -80° Celsius gelagert war, wurden auf Wassereis erwärmt und dann auf Zimmertemperatur aufgetaut. Die Inokula bestanden aus einer Mischung aus Überstand, welcher die Viren enthielt und zum anderen Teil aus DMEM. Die Konzentration von FCS konnte so niedrig gehalten werden, um den Vorgang der Infektion möglichst wenig durch Interaktion mit Serumproteinen zu beeinflussen.

Die Wirtszellen wurden bei einer Konfluenz von 60-80 % (siehe Abb. 9) mit DPBS gewaschen und dann mit dem Inokulum infiziert. Die Dauer der Infektion betrug meist 105 (+/-15) Minuten, wobei etwa alle 30 Minuten die Zellkulturgefäße leicht geschwenkt wurden, um das Inokulum gleichmäßig zu verteilen. Dann wurden die Zellen erneut mit DPBS gewaschen und im Anschluss Kulturmedium hinzugegeben, welches je nach Plan verschiedene Inhibitoren viraler Replikation enthielt.

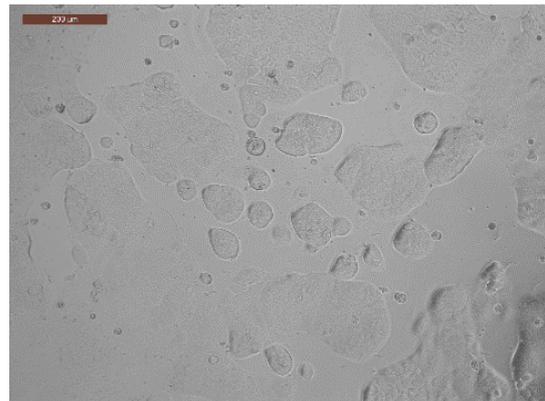


Abb. 9: CaCo-2 Zellen zum Zeitpunkt einer Infektion. Der Maßstabsbalken zeigt eine Länge von 200 μm an.

Für die Kombination von CaCo-2-Zellen und HCoV-NL63 wurde in der Regel eine MOI („Multiplicity of infection“, Virionen im Inokulum pro Zelle im Kulturgefäß) von 0,01; 0,04 oder 0,003 angewandt.

2.3.2 Herstellung von Virus-Stocks:

Als Ausgangspunkt für die Experimente wurden Virus-Stocks hergestellt, um ausreichend HCoV-NL63-Virionen für den Beginn des Passageexperimentes und für darauffolgende Vergleichsexperimente zur Verfügung zu haben. CaCo-2-Zellen wurden dazu in einer 175 cm^2

Zellkulturflasche ausgesät und nach etwa 2 - 4 Tagen bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 70 % mit DPBS gewaschen und mit 10 ml Inokulum aus DMEM und virionenhaltigem Zellkulturüberstand infiziert. Die Zellen wurden mit dem Inokulum für 90 – 120 Minuten bei 37° C / 5 % CO₂ inkubiert und die Flasche alle 20-30 Minuten leicht geschwenkt, um das Inokulum gleichmäßig zu verteilen. Daraufhin wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und 22 ml Zellkulturmedium hinzugegeben. Während der Inkubation wurden die Zellen regelmäßig mit dem Lichtmikroskop betrachtet (vgl. Abb. 10). Zeigte sich ein ausgeprägter CPE, wurde der Überstand abgeerntet. In einigen Fällen änderte sich die Morphologie der infizierten Zellen nicht, dann wurde der Überstand nach 5 – 7 Tagen abgenommen.

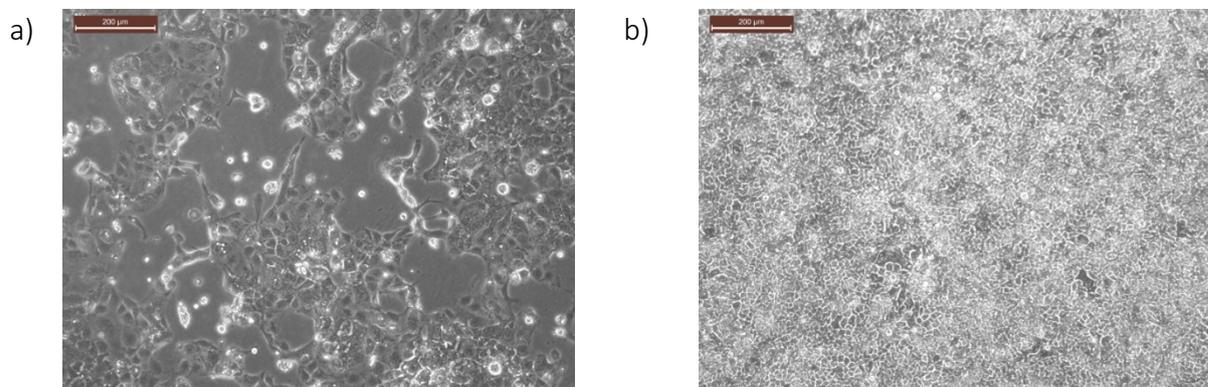


Abb. 10: a) Cytopathischer Effekt der NL63-HCoV auf CaCo-2-Zellen. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 für zwei Stunden inokuliert, dann gewaschen und Nährmedium hinzugefügt. Drei Tage nach der Infektion zeigen sich mottenfraßartige Löcher im Zellrasen, der Phänotyp der Zellen veränderte sich ins längliche. Zahlreiche abgestorbene Zellen und Zelltrümmer schwammen im Nährmedium. b) zeigt die parallel gehaltenen Zellen, deren Inokulum keine Viren enthielt.

2.4. Verwendete Inhibitoren

In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden als Inhibitoren der viralen Replikation neben den Cyclophilinhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA) und NIM811 ((Methyl-Ile4)cyclosporin) das Guanosinanalogon Ribavirin [177] angewandt. Die α -Ketoamide DZL973, DZL08 und DC401908 als Proteaseinhibitoren wurden von Prof. Dr. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld, Institut für Molekulare Medizin der Universität Lübeck, zur Verfügung gestellt. Tabelle 2 bietet einen Überblick über die Inhibitoren, hier sind diese im Detail beschrieben. Bis auf Ribavirin wurden die Wirkstoffe als Trockensubstanz bei 4° C gelagert und nach Mischung mit dem jeweiligen Lösungsmittel unter Beachtung des jeweiligen Molekulargewichts auf eine Konzentration von 20 mM in der Stocklösung verdünnt und bei -

20° C aufbewahrt. Ribavirin aus dem Institutsbestand war bereits mit einer Konzentration von 100 mg/ml in Wasser gelöster Form bei -80° C eingelagert und dann zur kurz- und mittelfristigen Verwendung Wasser verdünnt und wieder bei -20° C eingefroren.

Inhibitor	Bezug	Bezeichnung	Molekulargewicht	Lösungsmittel	c [Stock]
Alisporivir	Novartis	ALV DEB 025 ZA-12-FS46 SRC: 85071131	1216,67 g/mol	EtOH	20 mM
Cyclosporin A	Sigma	Cyclosporine PHR1092-500mg	1202,61 g/mol	EtOH	20 mM
NIM811	Novartis	JC-15-MC16 N-methyl-4- isoleucine cyclosporin SRC: 84358929	1202,64 g/mol	EtOH	20 mM
Ribavirin	Instituts- bestand	n.n.b.	244.21 g/mol	H ₂ O	10 mg/ml
DZL-983	AG Hilgenfeld	Sonderfertigung	566,65 g/mol	DMSO	20 mM
DZL08	AG Hilgenfeld	Sonderfertigung	572.71 g/mol	DMSO	20 mM
DC401908	AG Hilgenfeld	Sonderfertigung	532,63 g/mol	DMSO	20 mM

Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Inhibitoren. Als Lösungsmittel wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol (EtOH) verwendet. In der Spalte *c[Stock]* ist die Konzentration der Lösung des jeweiligen gelagerten Inhibitors verzeichnet.

2.5 RNA-Isolation aus Zellüberständen

Zur Isolation der viralen RNA aus den Überständen der Zellkultur wurde das Kit „Isolate II RNA Mini“ des Herstellers Bioline (REF: BIO-52073) verwendet. Die Isolation richtete sich nach Anweisungen des Herstellers für die Isolation von RNA aus biologischen Flüssigkeiten und Zellkulturüberständen. In einem Mikroreaktionsgefäß wurden 100 µl der Probe mit 350 µl Lysepuffer RLY und 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt und 2-3 Sekunden auf einem Vortex Gerät gemischt. Dann wurden 350 µl EtOH 70 % hinzugefügt und die Probe wiederum Vortex gemischt. Der Inhalt der Probengefäße wurde dann vollständig in RNA-Isolationssäulchen übergeführt und diese für 30 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert. Dann wurden 350 µl des Entsalzungspuffers MEM hinzugefügt und die Probe für 60 Sekunden bei 11000 x g

zentrifugiert. Im Anschluss wurden 95 µl einer Reaktionslösung, bestehend aus 10 µl in Wasser gelöster DNase I und 90 µl Reaktionspuffer RDN auf die Membran des Isolationssäulchens gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNase-Aktivität durch Zugabe von 200 µl des Waschpuffers RW1 beendet und die Säulchen 30 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert. Hierauf wurden 650 µl des Waschpuffers RW2 in die Säulchen gegeben und diese wiederum 30 Sekunden lang bei 11000 x g zentrifugiert. Dann erfolge eine erneute Zugabe von 200 µl RW2. Die Membran wurde dann durch Zentrifugation bei 11000 x g für 2 Minuten vollständig getrocknet und die Säulchen in RNase-freie Mikroreaktionsgefäße gesteckt. Um die RNA aus der Isolationsmembran zu lösen, wurden 40 bzw. 60 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 1-2 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Röhren mit Säulchen bei 11000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säulchen wurden entsorgt und die Röhren im Anschluss zur zeitnahen weiteren Verwendung entweder abgedunkelt in Wassereis zwischengelagert oder bei -80° C eingefroren. Um Kontaminationen mit RNase oder zwischen den Proben zu vermeiden, wurden für alle Schritte der RNA-Extraktion RNase-freie Filterpipettenspitzen und Mikroreaktionsgefäße verwendet.

2.6 Sonden-RT-qPCR

Die Probe-RT-qPCR (Reverse-Transkriptase-quantitative Polymerasekettenreaktion) ist eine Methode zum quantitativen Nachweis von RNA-Abschnitten [227]. Der Polymerasekettenreaktion wird zuerst ein Reaktionsschritt vorangestellt, bei dem das Enzym Reverse Transkriptase mit Hilfe der im Reaktionsansatz befindlichen DNA Primer die RNA-Proben als Matrize verwendet, um komplementäre DNA-Stränge (cDNA) herzustellen. Daraufhin wird die reverse Transkriptase durch Hitze inaktiviert und die eigentliche PCR-Reaktion beginnt. Zur Quantifizierung der Probenkonzentration befindet sich ein weiteres Oligonukleotid, die Sonde („probe“) im Reaktionsansatz. Diese beinhaltet den Fluoreszenzfarbstoff FAM und einen Inhibitor (Quencher) der Fluoreszenz, TAMRA [228]. Sie lagert sich zwischen den Primern an den zu replizierenden DNA-Strang an. Während des Amplifikationsschritts wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase zerstört und damit die Fluoreszenzfarbstoffe abgespalten. Farbstoff und Quencher stehen dann nicht mehr in räumlicher Nähe zueinander, sodass das Fluoreszenzsignal dann vom PCR-Gerät registriert werden kann. Je höher die

Konzentration an replizierter DNA ist, desto höher ist dann die Intensität des Fluoreszenzsignals. Erreicht die Intensität des Signals durch wiederholte Amplifikation der Matrize im Rahmen der PCR einen Schwellenwert („threshold“), wird dieser Zeitpunkt im Rahmen der PCR-Reaktion als Ct-Wert definiert. Wird beispielsweise die Schwelle nach 22,57 Zyklen der PCR überschritten, lautet der Ct-Wert 22,57. Ein hoher Ct-Wert entspricht dann einer niedrigen, ein niedriger Ct-Wert einer hohen Konzentration an gesuchten DNA-Abschnitten in der zu untersuchenden Probe. Zur Verwendung kam hier das Kit „SensiFAST™ Probe Hi-ROX One-Step Kit“ von Bioline Reagents. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl, für jede zu untersuchende Probe wurden drei Reaktionen angesetzt. Das Anmischen des Master-Mixes für die qPCR und die Pipettierschritte in der qPCR-Platte erfolgten auf Eis. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 3 beschrieben und entspricht im Verhältnis der Reagenzien den Empfehlungen des Herstellers, jedoch wurde nur die Hälfte des Reaktionsansatzes pro Reaktion angewandt. Die verwendeten Primer und die Sonde (Tabelle 4) gehen auf die von Glowacka, Bertram et. al. [229] beschriebene Methode zurück und lagern sich an den Genomabschnitt, welcher die RNA-abhängige RNA-Polymerase des NL63-HCoV codiert, an [230].

Reaktionsansatz mit 2 µl Probenvolumen		Reaktionsansatz mit 3 µl Probenvolumen	
Reagenz	Volumen (µl)	Reagenz	Volumen (µl)
RNase freies Wasser	1,8	RNase freies Wasser	0,8
2X SensiFast Mix	5	2X SensiFast Mix	5
10µM Forward Primer	0,4	10µM Forward Primer	0,4
10µM Reverse Primer	0,4	10µM Reverse Primer	0,4
10µM Sonde („probe“)	0,1	10µM Sonde („probe“)	0,1
Reverse Transkriptase	0,1	Reverse Transkriptase	0,1
RNase Inhibitor	0,2	RNase Inhibitor	0,2
RNA-Probenvolumen	2	RNA-Probenvolumen	3
Gesamtvolumen	10	Gesamtvolumen	10

Tabelle 3: Master-Mix mit Volumina für eine einzelne RT-qPCR-Reaktion

Oligonukleotid	Sequenz	Position im Genom NL63
Forward-Primer:	5'-CTTCTGGTGACGCTAGTACAGCTTAT-3'	14459–14484
Reverse-Primer:	5'-AGACGTCGTTGTAGATCCCTAACAT-3'	14573–14597
Sonde („probe“):	5'-FAM-CAGGTTGCTTAGTGCCCATCAGATTCAT-TAMRA-3'	14532–14560

Tabelle 4: Für die HCoV-NL63-RT-qPCR verwendeten Primer und Sonde

Die qPCR wurde mittels LightCycler96 (ROCHE) durchgeführt, das Reaktionsprotokoll des Experiments befindet sich unter Kapitel 5.2 Programmeinstellungen für die HCoV-NL63-RT-qPCR im LightCycler® 96.

2.7 Analyse der qPCR-Rohdaten

2.7.1 Standardkurve

Um eine relative Quantifizierung der RNA-Menge in den Proben zu ermöglichen, wurde wiederholt die Primer-Effizienz über eine Standardkurve bestimmt. Über mehrere Verdünnungen mit RNase-freiem Wasser um den Faktor 10 wird die RNA-Menge je Reaktionsansatz verringert. Die sich dann aus der qPCR ergebenden Ct-Werte wurden dann gegen die Verdünnungsstufen aufgetragen. Zur Prozessierung dieser Daten wurden GraphPad Prism 8, Version 8.4.3 (686) und Microsoft Excel 2010 verwendet. Aus den Ct-Werten, welche in einem Graphen als y-Werte und den Verdünnungsstufen, welche als log₁₀-Werte auf der X-Achse aufgetragen wurden, wurde die Steigung („slope“) der Ausgleichsgeraden zwischen diesen Punkten mittels linearer Regression bestimmt. Abb. 11 zeigt beispielhaft eine der regelmäßig erstellten Standardkurven.

Der Exponent x der exponentiellen Amplifikation in der PCR ist dann mit der Formel

$$x = 10^{-\frac{1}{slope}}$$

zu bestimmen. Die Effizienz E der Replikation pro PCR-Zyklus lässt sich dann mit der Formel

$$E = 1 - x$$

berechnen.

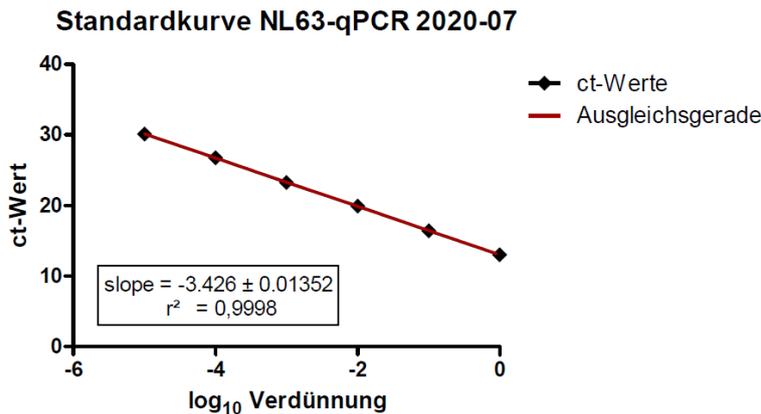


Abb. 11: Bestimmung der Steigung (engl. *slope*) der Ausgleichsgerade mittels GraphPad Prism 9 am Beispiel der Standardkurve 2020-07.

2.7.2 Relative Quantifizierung von Genomäquivalenten

Mittels des Exponenten x , welcher durch die Standardkurve bestimmt worden war, kann dann die Relation von Genomäquivalenten (GE) zweier verschiedener Proben bestimmt werden. Hatte die Standardabweichung der in Triplikaten der RT-qPCR gewonnenen Ct-Werte über 0,3 gelegen, wurden eventuell bestehende statistische Ausreißer entfernt oder die Messung wiederholt. Dann wird der jeweilige ct-Mittelwert der Bezugsprobe vom Ct-Wert der Probe subtrahiert. Die Differenz wird als Δ_{ct} bezeichnet. Ist Δ_{ct} positiv, ist die Anzahl der Genomäquivalente in der Probe geringer als in der Bezugsprobe. Ist Δ_{ct} negativ, ist sie größer. Um die Relation der Genomäquivalente auszudrücken, wird folgende Formel angewandt:

$$GE = \frac{1}{x \Delta_{ct}}$$

Die Variable x entspricht hier wiederum dem Exponenten, welcher mit der Ausgleichsgerade bestimmt worden war. Für eine Relation in Prozenten wird die Relation dann mit dem Faktor 100 multipliziert.

2.8 Mutationsinduktion im NL63-Coronavirus: Passageexperiment 1

2.8.1 Ziel des Experiments

Als Ziel dieses und der darauffolgenden Experimente wurde die Produktion einer Viruspopulation definiert, deren Sensibilität sich gegenüber einem der Inhibitoren ALV, CsA

oder NIM811 signifikant vermindert hat. Um dies zu erreichen, wurden NL63-Coronaviren über 25 Passagen dauerhaft dem Selektionsdruck eines dieser Inhibitoren ausgesetzt. Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden im Laufe des Experiments angehoben. Der Phänotyp einer Resistenz sollte dann durch eine Änderung der IC₅₀-Konzentration dargestellt werden. Das Genom resistenter Viruspopulationen wurde dann mittels Next-Generation-Sequencing analysiert und dabei Schwerpunkte der Mutationen im viralen Genom ausgemacht. Diese können dann Hinweise auf die Wirkweise von Cyclophilin-Inhibitoren auf die Replikation von Coronaviren geben.

2.8.2 Das Experiment im Überblick

Als Wirtszelle für die NL63-Coronaviren wurden Zellen der Linie CaCo-2 verwendet, welche zum einen sehr empfänglich für diese Art von Viren ist und zudem besonders hohe Replikationsraten der Viren zulässt [231].

Die Passagen dauerten drei bis vier Tage und wurden beendet, sobald sich ein mikroskopisch sichtbarer CPE an den Zellen zeigte. Dann wurden neue CaCo-2-Zellen mit einem Teil der Überstände der vorherigen Passage infiziert. Der übrige Teil der Überstände wurde bei -80° C aufbewahrt.

Als Inhibitoren wurden die CYP-Antagonisten Cyclosporin A, ALV und NIM811 verwendet. Die Substanzen waren in Pulverform bei 4° C gelagert und wurden dann in EtOH abs. gelöst, um eine Konzentration von 20 mM in der Stocklösung zu erzielen.

Zudem wurde in den Passagen 1-8 DZL983, ein α -Ketoamid mit breiter antiviraler Wirkung [172], eingesetzt. DZL983 zeigte jedoch keine Wirksamkeit gegenüber NL63-HCoV in CaCo-2-Zellen, was in parallel laufenden Experimenten untersucht wurde [172]. In den Passagen 9-25 wurde NL63 in Ribavirin, einem Guanosinanalogen [232] passagiert. In Kombination mit Alisporivir konnten de Wilde et. al [233] auch eine Hemmung der Replikation von Coronaviren zeigen. Aufgrund der verringerten Anzahl von Passagen und der dadurch fehlenden Vergleichbarkeit wurden die Untersuchungen jedoch nicht fortgeführt.

2.8.3 Beginn des Passage-Experiments

Zu Beginn der Passage wurden CaCo-2-Zellen in 6-Loch-Platten (je 9,5 cm² / Loch) bei einer Zellzahl von ca. 7-8x10⁵ Zellen / Loch mit 1,5 ml DPBS gewaschen und mit einem Inokulum bestehend aus 2500 PFU (MOI=0,003) NL63-HCoV aus dem Laborbestand („NL63 stock 5/17“) und 980 µl DMEM infiziert. Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37° C / 5 % CO₂ wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit DPBS gewaschen und 3 ml Nährmedium pro Loch zu den Zellen gegeben. Hierbei wurden elf unterschiedliche Rezepturen angewandt. Um eine Kontamination der Viruspopulationen untereinander zu vermeiden, wurden nach diesem ersten Schritt für jedes Loch eigene Pipetten verwendet.

Die Infizierten Zellen wurden für vier Tage bei 37° C / 5 % CO₂ inkubiert.

Loch	Inhibitor	Loch	Inhibitor
1	Alisporivir 2,5 µM	7	DZL983 2,5 µM
2	Alisporivir 10,0 µM	8	DZL983 10 µM
3	Cyclosporin A 2,5 µM	9	EtOH 0,2 % Kontrolle
4	Cyclosporin A 10,0 µM	10	DMSO 0,2 % Kontrolle
5	NIM811 2,5 µM	11	Medium Kontrolle
6	NIM811 10,0 µM	12	Mock (keine Infektion)

Tabelle 5: Verwendete Inhibitoren und deren Konzentration zu Beginn des Passageexperiments 1

Eine Passage wurde beendet, indem der Kulturüberstand in ein Mikroreaktionsgefäß überführt wurde. Dieser wurde dann für zehn Minuten bei 2000 x g für zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu pelletieren. 500 µl des hierbei entstandenen Überstands wurden dann als Inokulum für die folgende Passage weiterverwendet, ein Teil des dann noch vorhandenen Überstandes wurde bei -80° C asserviert.

2.8.4 Der Ablauf der folgenden Passagen

Das Inokulum für die folgenden Passagen bestand aus 500 µl Überstand der vorherigen Passage und 500 µl DMEM, ab Passage 7 aus 50 µl Überstand und 950 µl DMEM/ Loch, um bei sich im Verlauf der Passage sehr früh zeigendem CPE eine zu starke Erhöhung der MOI zu vermeiden.

CaCo-2-Zellen, welche zum Zeitpunkt der Infektion eine Konfluenz von 60-90 % besaßen, wurden mit DPBS gewaschen und für 105 (+/-15) Minuten bei 37° C / 5 % CO₂ mit dem Inokulum aus der vorherigen Passage inkubiert. Dann wurden die Zellen wiederum mit DPBS gewaschen und erneut Nährmedium mit Inhibitoren hinzugegeben. Die Zellen wurden dann für drei bis vier Tage bei 37° C / 5 % CO₂ inkubiert. Dieser Vorgang wurde bis zur Passage 25 wiederholt.

Der Ablauf des Experiments ließ so eine Kalkulation der MOI für jede Passage nicht zu, sodass sich bei Analyse der Überstände mittels RT-qPCR nur Hinweise auf eine Resistenz ermitteln ließen.

Die Konzentration der Inhibitoren wurde im Verlauf des Experiments schrittweise erhöht, um so resistente Mutanten zu selektionieren. In Passage 12 zeigte sich kein CPE nach vier Tagen Inkubation, sodass die Konzentration der Inhibitoren wieder reduziert werden musste. Tabelle 6 zeigt die Dauer der einzelnen Passagen und die Konzentration der Inhibitoren auf.

Wiederholt wurden im Laufe des Passageexperiments die NL63-Genomäquivalente aus den Überständen, wie in Kap. 2.5 ff. beschrieben bestimmt und relativ quantifiziert, um eine zu ausgeprägte Inhibition zu vermeiden. Abb. 12 zeigt die Genomäquivalente in Bezug zur Viruspopulation in Loch 11 (Medium-Kontrolle).

Passage	Dauer (d)	c [Inhibitor] Loch 1,3,5	c [Inhibitor] Loch 2,4,6
1-4	4	2,5 µM	10,0 µM
5-8	3	2,5 µM	10,0 µM
9	3	10,0 µM	20,0 µM
10-12	4	10,0 µM	20,0 µM
13-16	4	10,0 µM	15,0 µM
17-18	4	12,5 µM	17,5 µM
19-20	3	12,5 µM	17,5 µM
21-22	4	15,0 µM	20,0 µM
23-24	3	20,0 µM	30,0 µM
25	4	20,0 µM	30,0 µM
25 1	4	10,0 µM + 1 %myco1®	10,0 µM + 1 %myco1®
25 2	3	10,0 µM + 1 %myco2®	10,0 µM + 1 %myco2®
25 3	2	10,0 µM + 1 %myco1®	10,0 µM + 1 %myco1®
	6	10,0 µM + 1 %myco2®	10,0 µM + 1 %myco2®

Tabelle 6: Passagedauer und Konzentration der CYPA-Inhibitoren im Verlauf des ersten Passageexperiments. Die NL63-Populationen in Loch 1 und 2 waren Alisporivir ausgesetzt, in Loch 3 und 4 kam Cyclosporin A zur Anwendung, während in Loch 5 und 6 NIM811 eingesetzt wurde.

Relative Konzentration der Genomäquivalente in Passage 7

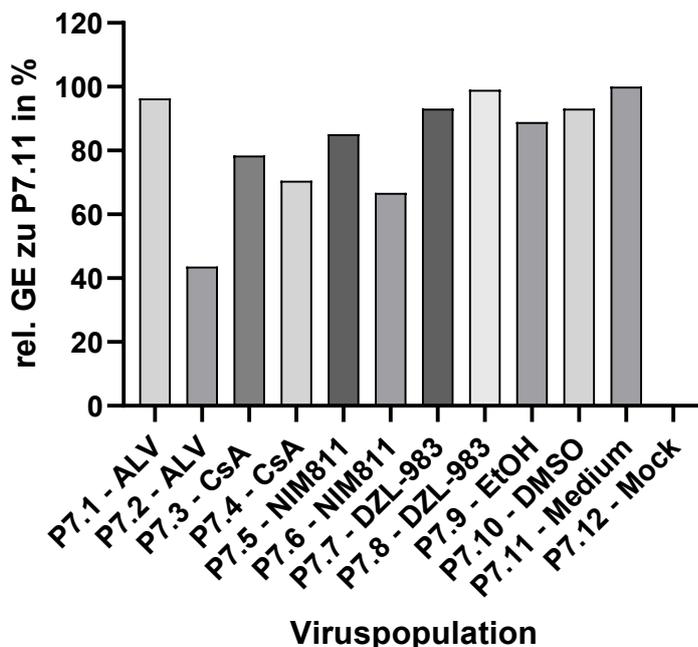


Abb. 12: Konzentration der NL63-Genomäquivalente (GE) in den Überständen der einzelnen Löcher aus Passage 7 in Relation zur Kontrolle P7.11. Die Zahl im Namen der Population bezeichnet das Loch und somit auch den angewandten Inhibitor und dessen Konzentration

2.8.5 Vorvergleiche der Sensibilität von NL63-Coronaviren gegenüber den Inhibitoren

Bereits im Laufe des Passageexperiments wurden stichprobenartig Inhibitionsversuche, welche eine Resistenzentwicklung anzeigen sollten, durchgeführt. Dabei wurden Viruspopulationen einer Passage aus der Interventionsgruppe mit einer Kontrollgruppe aus derselben Passage verglichen. Die einzelnen Vergleichsexperimente unterschieden sich dabei geringfügig im Aufbau, da in diesem Zeitraum die Methode erst etabliert wurde. Aus diesem Grund und der Übersichtlichkeit wegen sind die einzelnen Experimente mit ihren Variablen in Tabelle 7 ersichtlich, die gemeinsamen Elemente werden im Folgenden beschrieben:

CaCo-2-Zellen wurden in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und dann bei ca. 60-80 % Konfluenz mit DPBS gewaschen und mit einem Inokulum aus Zellkulturüberstand und DMEM infiziert. Das Volumen des Zellkulturüberstandes entsprach dabei bezogen auf die Zellzahl in den Löchern dem des Passageexperiments oder einer MOI von 0,01. Nach einer 120-minütigen Inkubation im Zellkulturschrank bei 37° C und 5 % CO₂ wurde der Infektionsschritt durch Waschen mit DPBS beendet. In die Löcher wurden 600 µl Zellkulturmedium, welches als Kontrolle EtOH oder Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen enthielt, gegeben. Je zwei Löcher wurden als Duplikate unter denselben Bedingungen gehalten. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und dabei die Duplikate gemischt, dann diese für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. 100 µl Überstand wurden für die weitere Analyse aliquotiert und mit den in Kap. 2.5 ff. beschriebenen Methoden zur relativen Quantifizierung weiterverarbeitet.

Passage	Viruspopulation 1	Viruspopulation 2	Inokulum/Loch	Inhibitor
7	2 (ALV 10 µM)	11 (nur Medium)	10 µl Überstand + 190 µl DMEM	ALV (5-40µM)
13	3 (CsA 10 µM)	10 (EtOH 0,15 %)	11 µl Überstand + 239 µl DMEM	CsA (5-40 µM)
15	4 (CsA 15 µM)	11 (nur Medium)	11 µl Überstand + 239 µl DMEM	CsA (5-40µM)
15	2 (ALV 15 µM)	11 (nur Medium)	11 µl Überstand + 239 µl DMEM	ALV (5-40µM)
16	1 (ALV 10 µM)	11 (nur Medium)	11 µl Überstand + 239 µl DMEM	ALV (5-40µM)
20	2 (ALV 17,5 µM)	11 (nur Medium)	11 µl Überstand + 289 µl DMEM	ALV (2,5-40µM)
20	2 (ALV 17,5 µM)	11 (nur Medium)	300 µl, MOI=0,01	ALV (2,5-80µM)

Tabelle 7: Vergleichsexperimente während des Passageexperimentes 1: Jede Zeile der Tabelle steht für ein eigenes Experiment, der allgemeine Ablauf ist in diesem Kapitel dargestellt. Verglichen wurden jeweils eine Population der Interventionsgruppe (Viruspopulation 1) mit einer Population der Kontrollgruppe (Viruspopulation 2). In Klammern ist jeweils der Inhibitor bzw. der jeweilige Zusatz zum Kulturmedium verzeichnet.

2.8.6 NGS: Probesequenzierung und Detektion einer Kontamination durch Mykoplasmen

Zu Testzwecken wurden drei Proben der Arbeitsgruppe Helmut Blum (Genzentrum, LMU München) übersandt. Ziel war es, herauszufinden, ob es möglich ist genügend virale RNA aus den vorbereiteten Zellkulturüberständen zu isolieren und in eine DNA-Library zu überführen, um diese dann mittels Illumina® Sequencer zu analysieren. Es wurden Zellkulturüberstände mit NL63-Coronaviren aus dem Stock "5/17", welcher den Ursprung der Passage darstellt und Material zweier weiterer Stocks, welche aus Überständen von Passage 7 (Loch 2 "ALV, 10µM" und Loch 11 „infection control“) abstammten, untersucht.

Die Zellkulturüberstände waren nach Zentrifugation bei 2000 x g für 10 Minuten bei -80° C eingefroren worden. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und 500 µl Überstand mit 1500 µl TRIzol™ Reagent (Invitrogen; REF: 15596026) vermengt. Die Suspension wurde dann wiederum bei -80° C aufbewahrt und auf Trockeneis zum Zielort transportiert. Dort wurde dann die RNA aus den Proben extrahiert und eine cDNA library erstellt.

Die Herstellung einer cDNA library und die Sequenzierung verliefen erfolgreich, jedoch zeigte sich in der ersten bioinformatischen Analyse der Sequenzen eine Kontamination der Proben durch Mykoplasmen, hierbei vor allem *M. hyorhinitis*. Ebenfalls ließen sich Sequenzen des Mammalian orthorubulavirus 5 (frühere Bezeichnung: Parainfluenzavirus 5) in geringer Menge nachweisen, was jedoch als unspezifisch gewertet wurde.

2.8.7 Vorläufiger Abschluss des Passage-Experiments

Zum Zeitpunkt der Analyse befand sich das Passage-Experiment bereits kurz vor dem geplanten Abschluss, sodass es vorläufig mit Passage 25 beendet wurde. Die Zellkulturüberstände wurden 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und bei -80° C asserviert.

2.8.8 Mykoplasmen-Detektion

Es war notwendig, eine reliable Methode zur Detektion von Mykoplasmen in der Zellkultur anzuwenden. Daher wurde auf die kommerzielle Dienstleistung der GATC Biotech AG, mittlerweile an die Eurofins Genomics Germany GmbH angegliedert, zurückgegriffen. Das Labor ist akkreditiert nach ISO17025 und ist in der Lage, zahlreiche Mykoplasmenspezies in Proben sicher zu erkennen. Die Vorbereitung der Proben erfolgte nach den Anweisungen des

Anbieters. Bei etwa 80 % Konfluenz der Zellen im Kulturgefäß wurden 500 µl Zellkulturüberstand abgenommen und in ein Mikroreaktionsgefäß verbracht. Dieses wurde dann für 10 Minuten bei 95° C inkubiert. Hierauf wurde das Gefäß bei 13000 rpm für etwa 5 Sekunden zentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurden dann in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Dieses wurde dann an den Testanbieter verschickt.

2.8.9 Eradikation der Mykoplasmen-Kontamination und Abschluss der Passage

Mykoplasmen gehören zur Klasse der Mollicutes und besitzen keine Zellwand. Betalaktam-Antibiotika, wie das dem Nährmedium zugesetzte Penicillin, besitzen deshalb keine Wirksamkeit gegenüber Mykoplasmen. Gegen Streptomycin, welches ebenfalls Bestandteil des Nährmediums ist, bestehen oft ausgeprägte Resistenzen [234].

Eine Kontamination von Zellkulturen mit Mykoplasmen stellt deshalb ein Problem dar, da sich verschiedenste Aspekte des Zellmetabolismus ändern. Zellsignalwege, Proteinbiosynthese, Proliferation und Reaktion auf Oxidativen Stress verlaufen unter dem Einfluss von Mykoplasmen anders als in deren Abwesenheit [234, 235]. Die Ergebnisse von solchen Experimenten können deshalb verfälscht werden und sind ohne Kontamination unter Umständen nicht reproduzierbar.

Die positiv getesteten Kulturen wurden dann entweder vernichtet oder, wenn keine Zellen als Ersatz vorhanden waren, mit dem Wirkstoff „Myco-3 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, REF: A5240) anbehandelt. Myco3 basiert auf dem Antibiotikum Ciprofloxacin, welches als Fluorchinolon unter anderem die bakterielle Topoisomerase IV hemmt [236].

Ciprofloxacin zeigte jedoch in diesem Fall keine ausreichende Wirksamkeit, was sich darin äußerte, dass die Testung auf Mykoplasmen unter laufender Therapie weiterhin positiv ausfiel.

Daraufhin wurden mit Myco-1 (Tiamulin) und Myco-2 (Minocyclin), (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, REF: A8360) zwei Hemmstoffe der bakteriellen Proteinbiosynthese eingesetzt, deren Wirkung gegenüber *M. hyorhinis* bereits gezeigt worden war [237]. Entsprechend der Anweisungen des Herstellers wurden die Antibiotika dem Kulturmedium im Verhältnis 1 zu 100 zugefügt. Die Zellen wurden dann im Wechsel vier Tage mit Myco-1 und drei Tage mit Myco-2 behandelt. Um die Wirksamkeit der Antibiotischen Therapie zu

erhöhen, wurden die Zellen bei jedem Wechsel des Antibiotikums erneut in eine neue Zellkulturschale überführt. Das abzentrifugierte Zellpellet wurde dabei direkt mit frischem antibiotikahaltigem Kulturmedium resuspendiert. So konnte das jeweilige Antibiotikum die Zellen von allen Seiten erreichen und es ergaben sich möglichst wenig Nischen für Mykoplasmen. Nach zwei Wochen konnte unter Therapie ein negatives Testergebnis auf Mykoplasmen aus dem Kulturbestand erzielt werden, Die Therapie wurde dann noch für eine weitere Woche fortgeführt. Hierauf wurden die Zellen wieder mit dem standardmäßig verwendeten Kulturmedium für zwei Wochen gehalten. Eine anschließend durchgeführte Kontrolle des Überstandes auf Mykoplasmen mit negativem Ergebnis bestätigte den Erfolg der Behandlung.

Die Virusüberstände des Passageexperiments und der Start-Stock 5/17 mussten ebenfalls von Mykoplasmen befreit werden, ansonsten würden nachfolgende Experimente zum Vergleich eventuell bestehender Resistenz dieser Viren nicht reproduzierbar sein. Die Entfernung der Mykoplasmen aus den virionenhaltigen Überständen erfolgte in Anlehnung an eine von Malenovska und Reichelova 2011 veröffentlichte Methode [238].

Nicht kontaminierte CaCo-2-Zellen wurden dazu zuerst in 12-Loch-Zellkulturplatten in Zellkulturschalen ausgesät. Dabei war dem Nährmedium direkt Myco-1 beigefügt, um eine ausreichende Konzentration des Antibiotikums innerhalb der Zellen bereits vor dem Kontakt mit Mykoplasmen zu erreichen. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen dann mit den kontaminierten Virus-Überständen aus Passage 25 und dem Stock „NL63-5/17“ infiziert. Das Inokulum bestand aus 100 µl Überstand aus der Passage und 300 µl DMEM und wurde im Vorfeld mit 1 % Myco-1 versetzt. Nach eineinhalb Stunden Infektion wurden die Überstände entfernt, die Zellen gewaschen und 1,5 ml Myco-1-haltiges Medium hinzugefügt. Zudem wurden Inhibitoren in den in Tabelle 6 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Nach vier Tagen wurden die Überstände abgenommen, und für 10 Minuten bei 2000 x g abzentrifugiert. CaCo-2-Zellen, welche bereits mit 1 % Myco-2 im Kulturmedium in 6-Loch Platten gewachsen waren, wurden mit einem Inokulum aus 500 µl Überstand, 500 µl DMEM und 1 % myco2 infiziert. Die Zellen wurden dann mit Inhibitor und Kulturmedium mit 1 % Myco-2 für drei Tage im Inkubator gehalten. Nun wurde eine 10-cm-Zellkulturschale mit CaCo-2-Zellen, die in Myco-1-haltigem Kulturmedium ausgesät worden waren, mit DPBS gewaschen und mit einem Inokulum aus 1,5 ml virionenhaltigem Überstand, 3,5 ml DMEM und 1 % Myco-

1 bei 37° C und 5 % CO₂ für 90 Minuten infiziert. Daraufhin wurden die Zellen gewaschen und 10 ml Kulturmedium mit Inhibitor und 1 % Myco-1 hinzugefügt. Nach 2 Tagen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und 10 ml Myco-2-haltiges Medium mit Inhibitor hinzugegeben. Nach sechs weiteren Tagen wurde dann der Überstand für 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, der Überstand hiervon abgenommen, dieser erneut gemischt und auf Mikroreaktionsgefäße verteilt. Die Gefäße wurden dann bei - 80° C eingefroren. Die Viruspopulation aus dem „Stock NL63-5/17“ wurde nach der Dekontamination „p0wt“ genannt, die aus dem Passageexperiment „p25|3.x“. Im Anschluss wurde die RNA aus jeweils 100 µl Überstand (Kap. 2.5) isoliert und dann mittels der in Kap. 2.6 f. beschriebenen Methoden relativ quantifiziert (siehe Tabelle 8) Hier zeigte sich, dass im Stock p25|3.4 -CsA auch nach wiederholter Dekontamination keine virale RNA mehr nachweisbar war, sodass diese Probe verworfen werden musste.

Viruspopulation	Genomäquivalente / ml
NL63 p0wt	2,11E+04
NL63 p25 3.1-ALV	1,34E+04
NL63 p25 3.2-ALV	6,28E+03
NL63 p25 3.3-CsA	7,72E+03
NL63 p25 3.4-CsA	-
NL63 p25 3.5-NIM811	1,66E+04
NL63 p25 3.6-NIM811	1,42E+04
NL63 p25 3.10-EtOH	3,15E+04
NL63 p25 3.11-Medium	3,11E+04

Tabelle 8: Mittels RT-qPCR und relativer Quantifizierung berechnete Genomäquivalente pro ml in den Viruspopulationen

2.8.10 Vergleichsexperimente zur Resistenztestung

Im Anschluss wurden die passagierten Virusstocks und der Stock p0 in jeweils eigenen Experimenten auf ihre Sensibilität gegenüber den Inhibitoren ALV und CsA hin untersucht. Mykoplasmen-negative CaCo-2-Zellen wurden in 48-Loch-Zellkulturschalen ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % infiziert. Hierzu wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und 200 µl Inokulum, welches aus DMEM und virionenhaltigem Überstand bestand, in jedes Loch gegeben. Bei einer MOI von 0,004 betrug die Anzahl der Virionen etwa 350/Loch. Nach einer 120-minütigen Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂ wurde die Infektion durch Waschen mit DPBS beendet und 400 µl Medium, welches entweder als Kontrolle EtOH 0,3 % oder einen der Inhibitoren in einer Konzentration von 1,25 bis 60 µM enthielt, hinzugegeben. Je zwei Löcher wurden dabei als Duplikate unter den gleichen Bedingungen gehalten. Abb. 13 zeigt die

Verteilung in den 48-Loch-Platten. Die Zellkulturplatten wurden für 72 h bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und dabei die Duplikate gemischt. Die Überstände wurden für 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und jeweils 100 µl aliquotiert. Die Proben wurden bei -80° C eingefroren. Im Verlauf wurde die RNA aus den Überständen wie in Kap. 2.5 beschrieben isoliert und dann deren Genomäquivalente mittels RT-qPCR mit der in Kap. 2.6 f. beschriebenen Methode relativ quantifiziert.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	EtoH	1,25	2,5	5	10	15	20	30
B	EtoH	1,25	2,5	5	10	15	20	30
C	45	45					60	60
D	45	45					60	60
E	EtoH	1,25	2,5	5	10	15	20	30
F	EtoH	1,25	2,5	5	10	15	20	30

Abb. 13: Plan des Vergleichsexperiments im 48-Loch-Plate-Format. Auf jeder Platte wurden zwei Viruspopulationen in Duplikaten unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von Alisporivir bzw. Cyclosporin A untersucht. Die Zahlen stehen für die Konzentration des jeweiligen Inhibitors in µM, mit EtOH ist die Ethanolkontrolle bezeichnet. Die Buchstaben und Zahlen am Rand der Abbildung zeigen die Koordinaten des jeweiligen Lochs an.

2.8.11 Virale Fitness und Abhängigkeit von PPIA

Neben einer eventuellen Resistenzentwicklung wurde die Fähigkeit zur Replikation und die Abhängigkeit von PPIA in den Wirtszellen untersucht. Hierzu wurden LLC-MK2-Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Es handelte sich um die Klone A2(wt) und C10(PPIA^{-/-}). Bei etwa 80 % Konfluenz wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit einem Inokulum aus DMEM und den NL63-Passageüberständen aus Passage 25|3 und p0 infiziert. Mit jeder Viruspopulation wurden jeweils zwei Löcher der Klone A2 und C10 infiziert. Das Volumen des Inokulums betrug 300 µl pro Loch, die MOI 0,01. Dann wurden die Platten für 120 min bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert und daraufhin die Infektion durch Waschen beendet. In jedes Loch wurden 70 µl Kulturmedium gegeben und die Zellen bei 37° C und 5 % CO₂ für 72 h gehalten. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen, die Duplikate gemischt und für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden dann mittels der in Kap. 2.5 RNA-Isolation aus Zellüberständen ff. beschriebenen Methoden verarbeitet und die darin befindlichen NL63-Genomäquivalente relativ quantifiziert.

2.8.12 Präanalytik für das NGS

Die von Mykoplasmen befreiten Virusüberstände aus Passage 25|3 und p0 wurden in Wassereis aufgetaut und dann zweimalig für jeden Stock 400 µl Zellkulturüberstand mit je 1200 µl TRIzol reagent (Life Technologies, REF: 15596918) in einem 2 ml-Mikroreaktionsgefäß vermischt, das Gefäß geschwenkt und kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden dann wiederum bei -80° C eingefroren, um im Verlauf auf Trockeneis für die NGS Sequenzierung versandt zu werden.

2.9 HCoV-NL63 Passageexperiment 2

2.9.1 Das Experiment im Überblick

Das HCoV-NL63 Passageexperiment 2 wurde im Anschluss an das erste Experiment in reduzierterem Umfang durchgeführt, um Resistenzen ohne die Anwesenheit der Kontamination mit Mykoplasmen zu induzieren. Zuerst wurde der IC₅₀-Wert der Inhibitoren ALV und Ribavirin von NL63 in CaCo-2-Zellen getestet. Im Anschluss wurden im Wechsel nach drei beziehungsweise vier Tagen HCoV-NL63 haltige Zellkulturüberstände passagiert. Zu Beginn waren die Virionen dann konstant einem der Inhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA), NIM811 oder Ribavirin ausgesetzt. Zudem wurde eine Ethanolkontrolle und eine Kulturmediumkontrolle mitpassagiert. Die Konzentration der drei Cyclophilinhibitoren entsprach zu Beginn mit 5,0 µM dem Doppelten der vorher bestimmten IC₅₀-Konzentration von ALV von 2,5 µM, die Passage mit Ribavirin startete bei 10 µg/ml. Die aus der letzten Passage gewonnenen Virus-Stocks wurden teilweise im Verlauf und dann nach Abschluss des Passageexperiments hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Inhibitoren getestet und das virale Genom aus Passage 10 und 15 mittels NGS sequenziert.

2.9.2 Zellkultur

Zur Verwendung kamen CaCo-2-Zellen, welche von PD Marcel Müller (Charité – Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt worden waren. Die Zellkultur entsprach der unter Kapitel 2.2.2 beschriebenen Vorgehensweise, als Kulturmedium kam DMEM, welches mit 20 % FBS, 1 % MEM NEAA, 1 % MEM Sodium Pyruvate und 1 % Penicillin/Streptomycin

ergänzt worden war, zum Einsatz. Eine Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen wurde im Vorfeld des Passageexperiments entsprechend Kapitel 2.8.8 Mykoplasmen-Detektion ausgeschlossen.

2.9.3 Virus

Auch der HCoV-NL63-Stock war aus dem Labor von PD Marcel Müller (Charité – Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt worden. Der Grundstock p0 für das Passageexperiment entstammt der zweiten in CaCo-2-Zellen produzierten Passage des aus Berlin erhaltenen Stocks und wurde mit „NL63-Stock Berlin 1“ bezeichnet. Der Stock wurde wie in Kapitel 2.8.8 beschrieben negativ auf Mykoplasmen getestet.

2.9.4 Initiale Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die Konzentrationen der Inhibitoren in den einzelnen Passagen betragen ein Vielfaches des IC₅₀, um einen ähnlichen Selektionsdruck auf die verschiedenen Viruspopulationen ausüben zu können. So wurde die Sensitivität des Start-Stocks „NL63-Stock Berlin 1“ gegenüber den Inhibitoren ALV, Ribavirin und den experimentellen α -Ketoamid-Inhibitoren DZL08 und DC401908 aus der Arbeitsgruppe Rolf Hilgenfeld, Universität zu Lübeck getestet. Als Wirtszellen dienten CaCo-2-Zellen, welche in 48-Loch-Platten ausgesät worden waren. Bei etwa 80 % Konfluenz wurden die Zellen gewaschen und mit 200 μ l Inokulum aus DMEM und virionenhaltigem Überstand infiziert. Die MOI betrug 0,004 mit circa 350 Virionen pro Loch. Zur Infektion wurden die Platten dann für 120 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert und jeweils nach ca. 30 Minuten leicht geschwenkt. Daraufhin wurden die Zellen gewaschen und den Löchern 400 μ l Kulturmedium, welches die Inhibitoren ALV, DZL08 oder DC401908 in Konzentrationen von 1,25 μ M bis 40 μ M beziehungsweise Ribavirin in Konzentrationen von 1,25 μ g/ml bis 40 μ g/ml enthielt, hinzugegeben. Die Lösungsmittelkontrollen enthielten EtOH bzw. DMSO 0,2 % oder Kulturmedium. Je zwei Löcher wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten. Nach drei Tagen wurde der Überstand der zusammengehörigen Löcher gemischt und für 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. 100 μ l wurden vom Überstand abgenommen und bei -80° C eingefroren. Die Überstände wurden im Verlauf auf Eis aufgetaut und deren RNA wie in Kapitel 2.5 beschrieben isoliert. Die darin enthaltenen

Genomäquivalente wurden dann entsprechend Kapitel 2.6 mittels RT-qPCR bestimmt und nach Kapitel 2.7 relativ quantifiziert. Die IC₅₀-Werte der Inhibitoren wurden dann unter Zuhilfenahme der Software GraphPad Prism5 (Version 5.01) bestimmt. Die Berechneten IC₅₀-Werte betragen für ALV 2,414 µM und für Ribavirin 4,432 µM. DZL08 und DC401908 wiesen in diesem Experiment keine ausreichende Inhibition auf, sodass diese keine weitere Verwendung fanden.

2.9.5 Start des Passageexperiments 2

CaCo-2-Zellen wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, bei Erreichen einer 90 %igen Konfluenz gewaschen und mit 1000 µl Inokulum aus DMEM und „NL63-Stock Berlin 1“ infiziert. Die MOI betrug 0,004 bei circa 3400 Virionen pro Loch. Während der Infektion wurden die Platten dann für 120 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert und jeweils nach ca. 30 Minuten leicht geschwenkt. Die Infektion wurde durch Waschen beendet und 2500 µl Kulturmedium mit Inhibitoren oder Lösungsmittel hinzugegeben. Die Zellen wurden dann bei 37° C und 5 % CO₂ für drei Tage inkubiert. Die Inhibitoren und deren Konzentration zu Beginn des Passageexperiments 2 sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Loch	Inhibitor	Konzentration in Passage 1
1	ALV	5 µM
2	CsA	5 µM
3	NIM811	5 µM
4	Ribavirin	10 µg/ml
5	EtOH	0,025 %
6	Medium	-
7 Mock – Keine Infektion	Medium	-

Tabelle 9: Verwendete Inhibitoren und deren Konzentration zu Beginn des Passageexperiments 2

2.9.6 Ablauf der folgenden Passagen

Die Passagen wurden jeweils im Wechsel nach drei bzw. vier Tagen mit der Abnahme des Zellkulturüberstandes beendet. Der Überstand wurde für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert und aus 500 µl nun von Zelltrümmern befreitem Überstand und 500 µl DMEM das Inokulum für die folgende Passage hergestellt. Übriger Überstand wurde bei -80° C eingefroren. CaCo-2-Zellen waren im Vorfeld so in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät worden, dass sie zum

Zeitpunkt der Infektion eine Konfluenz von ca. 70-90 % aufwiesen. Die Zellen wurden gewaschen und dann mit dem Inokulum aus der vorherigen Passage für 90-120 min bei 37° C und 5 % CO₂ infiziert. Regelmäßig wurden die Platten dabei leicht geschwenkt. Im Anschluss wurde die Infektion durch Waschen mit DPBS beendet und 2500 µl Zellkulturmedium, welches mit Inhibitoren versetzt worden war, hinzugegeben. Eine Darstellung der Konzentrationen der Inhibitoren befindet sich in Tabelle 10. Während des Experimentes wurden die Überstände auf Persistenz von Genomäquivalenten, wie in Kapitel 2.5 ff. beschrieben, mittels qPCR getestet. Hier zeigte sich in Passage 5 eine massive Reduktion der in Loch 4 (Ribavirin) gehaltenen Viruspopulation (siehe Abb. 14). Für Loch 4 wurde hierauf das Experiment ab Passage 9 mit reduzierter Konzentration von Ribavirin neu gestartet.

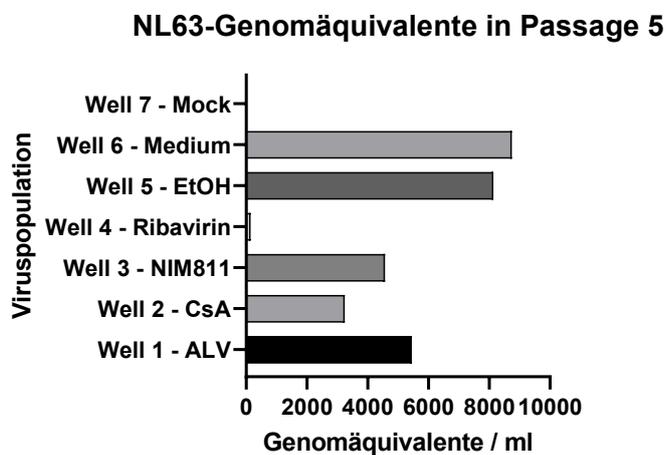


Abb. 14: Mittels qPCR ermittelte HCoV-NL63-Genomäquivalente pro ml in Passage 5 des Passageexperiments 2

Passage	c [ALV, CsA, NIM811]	c [Ribavirin]	c [EtOH]
1-2	5,0 µM	10,0 mg/ml	0,025 %
3-4	7,5 µM	15,0 mg/ml	0,038 %
5-6	10,0 µM	20,0 mg/ml	0,050 %
7-8	12,5 µM	25,0 mg/ml	0,063 %
9-10	15 µM	10,0 mg/ml	0,075 %
11-12	15 µM	12,5 mg/ml	0,075 %
13-15	15 µM	15,0 mg/ml	0,075 %

Tabelle 10: Konzentrationen der Inhibitoren und der Lösungsmittelkontrolle im Verlauf des Passageexperiments 2 (c = Konzentration)

2.9.7 Resistenztestung im Verlauf des Passageexperiments 2

Die Viruspopulationen aus den Passagen 5 und 10 wurden im Vergleich zur EtOH-Kontrolle auf ihre Suszeptibilität gegenüber den in ihnen gehaltenen Inhibitoren getestet. Dazu wurden CaCo-2-Zellen in 48-Loch-Zellkulturplatten gesät und bei Erreichen von 80 % Konfluenz mit DPBS gewaschen und mit 150 µl Inokulum aus DMEM und virionenhaltigem Überstand infiziert. Mit einer MOI von 0,004 wurden etwa 350 Virionen in jedes Loch gegeben. Nach einer 120-minütigen Infektion im Zellkulturinkubator bei 37° C und 5 % CO₂ und regelmäßigem Schwenken wurde die Infektion durch Waschen der Zellen mit DPBS beendet und 300 µl Zellkulturmedium, welches Inhibitoren enthielt, hinzugegeben. Der Inhibitor entsprach dabei demjenigen, in dem das Virus passagiert worden war. Die EtOH-Passagekontrolle wurde jeweils gegenüber allen drei Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 auf ihre Sensitivität getestet. Für das Inhibitionsexperiment aus Passage 5 wurde hierbei mit 25 µM die zehnfache IC₅₀ und eine 0,125 % EtOH-Kontrolle angewandt, für das aus Passage 10 die fünf- und zehnfache IC₅₀ und eine 0,125 % EtOH-Kontrolle. Jeweils zwei Löcher waren denselben Bedingungen ausgesetzt. Die Zellkulturplatten wurden dann für 72 h bei 37° C und 5 % CO₂ gehalten. Im Anschluss wurden die Überstände gemischt und für 10 min bei 2000 x g abzentrifugiert. Zur relativen Quantifizierung wurde dann 100 µl des Überstands entsprechend Kap. 2.5 ff. weiterverarbeitet, mittels qPCR analysiert und relativ quantifiziert.

2.9.8 Beendigung der Passagierung

Um eine ausreichende Menge an virionenhaltigem Überstand für nachfolgende Vergleichsexperimente und NGS-Analyse herzustellen, wurde die letzte Passage in 10-cm-Zellkulturschalen durchgeführt. Die Zellkulturüberstände aus Passage 14 wurden abgenommen und für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Für das Inokulum wurden 1500 µl Überstand mit 3500 µl DMEM gemischt. CaCo-2-Zellen wurden bei ca. 80 % Konfluenz mit DPBS gewaschen und dann mit dem Inokulum für 120 min bei 37° C und 5 % CO₂ infiziert und dabei regelmäßig geschwenkt. Im Anschluss wurden die Zellen wieder gewaschen und 10 ml Zellkulturmedium mit Inhibitoren hinzugegeben. Die Zellen wurden dann bei 37° C und 5 % CO₂ für sieben Tage gehalten. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und 10 min bei 2000 x g abzentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde dann in einem neuen Zentrifugenröhrchen resuspendiert und auf verschiedene Mikroreaktionsgefäße verteilt. Die

Überstände wurden bei -80° C eingefroren, 100 µl Überstand wurden für jede Population zur relativen Quantifizierung mittels RT-qPCR analysiert (siehe Kap. 2.5 ff.). Die Konzentration der Genomäquivalente der Viruspopulationen am Ende des Passageexperiments 2 ist in Tabelle 11 aufgetragen.

Viruspopulation	Genomäquivalente / ml
Stock Berlin 1	2,89E+04
p15.1-ALV	3,37E+03
p15.2-CsA	4,30E+03
p15.3-NIM811	3,76E+03
p15.4-Ribavirin	9,43E+03
p15.5-EtOH	9,14E+03
p15.6-Medium	6,64E+03

Tabelle 11: Genomäquivalente pro ml in den HCoV-NL63-Stocks am Ende des Passageexperiments 2

2.9.9 Vergleichsexperimente zur Resistenzprüfung

Die aus Passage 15 gewonnenen Virus-Stocks wurden im Anschluss an das Passageexperiment hinsichtlich ihrer Sensibilität gegenüber den eingesetzten Inhibitoren getestet.

Die in Loch 1, 2 und 3 gehaltenen Viruspopulationen wurden zusammen mit der EtOH-Kontrolle und dem Ausgangs-Stock „NL63 Berlin 1“ in drei Experimenten den Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 ausgesetzt. Hierzu wurden CaCo-2-Zellen in 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, wobei die außenliegenden Löcher mit DPBS gefüllt waren, um ein homogenes Feuchtigkeitmilieu innerhalb der Platten zu erreichen. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und jedem Loch 50 µl Inokulum aus virionenhaltigem Zellkulturüberstand und DMEM hinzugefügt. Die MOI betrug 0,004 und damit die geschätzte Zahl der Virionen etwa 100 pro Loch. Die Platten wurden dann bei 37° C und 5 % CO₂ für 120 min inkubiert und dabei regelmäßig geschwenkt. Die Infektion wurde dann durch Waschen mit DPBS beendet und 110 µl Kulturmedium hinzugefügt. Dem Medium waren die Inhibitoren in Konzentrationen von 2,5 bis 60 µM beigefügt, die Kontrolle enthielt 0,3 % EtOH. Je drei Löcher wurden als Triplikat den gleichen Bedingungen ausgesetzt. Abb. 15 zeigt die Verteilung auf der Zellkulturplatte schematisch. Nach 72 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und dabei die Triplikate gemischt. Dann wurden die Überstände bei 2000 × g für

10 min zentrifugiert und 100 µl zellfreier Überstand abgenommen. Die Proben wurden dann bei -80° C eingefroren.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	PBS	EtOH 0,3%	2,5	5	10	15	20	40	60	PBS	PBS
C	PBS	PBS	EtOH 0,3%	2,5	5	10	15	20	40	60	PBS	PBS
D	PBS	PBS	EtOH 0,3%	2,5	5	10	15	20	40	60	PBS	PBS
E	PBS	PBS	EtOH 0,3%	2,5	5	10	15	20	40	60	PBS	PBS
F	PBS	PBS	EtOH 0,3%	2,5	5	10	15	20	40	60	PBS	PBS
G	PBS	PBS	EtOH 0,3%	2,5	5	10	15	20	40	60	PBS	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Abb. 15: Plan der 96-Loch-Zellkulturplatten im Vergleichsexperiment. Jeweils zwei Viruspopulationen wurden auf einer Platte getestet und der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Alisporivir bzw. Cyclosporin A oder NIM811 untersucht. Die Zahlen stehen für die Konzentration des jeweiligen Inhibitors in µM, mit EtOH ist die Ethanolkontrolle bezeichnet. Die Buchstaben und Zahlen am Rand bestimmen als Koordinaten die Position der einzelnen Löcher.

Die mit Ribavirin in Loch 4 gehaltene Viruspopulation wurde in gleicher Weise wie in diesem Kapitel beschrieben mit der Medium-Passagekontrolle und dem Stock „NL63-Berlin 1“ verglichen. Als Inhibitor diente Ribavirin in einer Konzentration von 2,5 bis 60 µg/ml. Als Kontrolle wurde Kulturmedium verwendet.

2.9.10 Virale Fitness

Um die Replikationsleistung der einzelnen Viruspopulationen aus dem Passageexperiment zu vergleichen, wurde zunächst eine weitere Passage durchgeführt. Diese entsprach im Aufbau und Ablauf den Passagen 2-14, jedoch wurden keine Inhibitoren dem Kulturmedium zugegeben. Auf diese Weise wurde ausgeschlossen, dass Reste der Inhibitoren im Inokulum die virale Replikation im nächsten Experiment beeinflussten. Die NL63-Genomäquivalente aus Passage 16 wurden dann ebenfalls mittels der in Kapitel 2.5 RNA-Isolation aus Zellüberständen ff. beschriebenen Methoden relativ quantifiziert.

Im Anschluss wurden CaCo-2-Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten gesät und bei einer Konfluenz von 80 % mit DPBS gewaschen und mit einem Inokulum aus Überstand und DMEM infiziert. Das Volumen betrug 1000 µl per Loch, die MOI 0,004. Ein Aliquot des Inokulums wurde eingefroren. Nach einer Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂ von 120 min Dauer wurde die Infektion beendet und 2500 µl Kulturmedium in jedes Loch gegeben. Die Platten wurden für 72 h bei 37° C und 5 % CO₂ gehalten, nach 24 und 48 h wurden jeweils 250 µl Überstand aus jedem Loch abgenommen und asserviert. Am Ende des Experiments wurden die Überstände 10 min

bei 2000 x g abzentrifugiert und im Verlauf jeweils 100 µl zur relativen Quantifizierung der Genomäquivalente in den Proben mit den in Kap. 2.5 ff. beschriebenen Methoden weiterverarbeitet.

2.9.11 Präanalytik für das NGS

Zur Vorbereitung der Proben für das NGS wurden Virusüberstände aus Passage 10 und 15 sowie dem Stock „Berlin 1“ in Wassereis aufgetaut und dann zweimalig für jeden Stock 400 µl Zellkulturüberstand mit je 1200 µl TRIzol in einem 2 ml-Mikroreaktionsgefäß vermischt, das Gefäß geschwenkt und kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden dann wiederum bei -80° C eingefroren, um im Verlauf auf Trockeneis versandt zu werden.

2.10 HCoV-NL63 Passageexperiment 3

2.10.1 Überblick

Das HCoV-NL63 Passageexperiment 3 wurde im Anschluss an die beiden vorherigen Passageexperimente durchgeführt, um zum einen für das NGS eine größere Anzahl zu sequenzierender Populationen zu erhalten und zum anderen zusätzlich das Mutations- und Resistenzverhalten der Viruspopulationen bei aufsteigender und gleichbleibender Konzentration von Cyclophilinhibitoren vergleichen zu können.

Es wurden mit dem Set A, B, und C drei Sätze des Experiments mit gleichem Ablauf parallel ausgeführt, um eine ausreichende Reliabilität zu erreichen. Die einzelnen Schritte des Experimentes, beispielsweise das Anmischen der Inhibitoren, wurden dabei unabhängig voneinander vollzogen. Aufgrund des besonderen Umfangs und der langen Dauer des Experiments war eine Wiederholung des Experiments in vollständig separierten Ansätzen nicht möglich.

2.10.2 Zellen und Zellkultur

Als Wirtszellen für das HCoV-NL63 dienten CaCo-2-Zellen, welche für das Virus empfänglich sind und eine hohe Reproduktionsrate zeigen [231]. Die Zellen wurden vor Beginn des

Experiments mittels qPCR auf HCoV-NL63 getestet. Zuvor und im Verlauf des Experiments wurde die Anwesenheit von Mykoplasmen wie in Kapitel 2.8.8 beschrieben ausgeschlossen.

Als Nährmedium diente DMEM, welches bereits Pyruvat enthielt und mit 20 % FBS, 1 % MEM NEAA und 1 % Penicillin/Streptomycin ergänzt worden war. Als Waschlösung wurde DPBS angewandt.

2.10.3 Herstellung einer HCoV-NL63 Ausgangspopulation und Auswahl der Zellen

Für das Passageexperiment 3 wurde ein neuer Stock von virionenhaltigem Überstand benötigt. Dieser sollte als gemeinsamer Start der Passage und als Kontrolle hinsichtlich der Sensibilität gegenüber Cyclophilininhibitoren nach Beendigung der Passage 15 dienen. Im Laborbestand befanden sich die zwei bereits beschriebenen CaCo-2-Zellpopulationen: „Berlin“ und „S-I“. Erstere zeigte ein schnelleres Wachstumsmuster. Zum Vergleich der Virusproduktion wurden beide Zellpopulationen in je eine 175 cm² Zellkulturflasche ausgebracht und dann bei Erreichen einer Konfluenz von 70 % mit der gleichen Menge an HCoV-NL63-haltigem Überstand inokuliert. Hierbei wurde zuerst der Kulturüberstand entfernt und die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen mit einem Inokulum, bestehend aus 13 ml DMEM und 2 ml virushaltigem Überstand (NL63 wt Stock Berlin 2+3; ca. 20000 PFU) infiziert. Die MOI entsprach hier etwa 0,0015. Dann wurden die Zellen für 90 Minuten bei 37° C in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂ mit hoher Feuchtigkeit inkubiert. Hierauf wurde der Überstand entfernt und 22 ml Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Nach vier Tagen Inkubation bei 37° C in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂ mit hoher Feuchtigkeit wurde der Kulturüberstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde in einem neuen Zentrifugenröhrchen resuspendiert und auf Mikroreaktionsgefäße verteilt. Die Virus-Stocks wurden dann bei -80° C eingefroren. Zur relativen Quantifizierung der Viruskonzentration in den Stocks wurden 100 µl zur RNA-Isolation und RT-qPCR separat eingelagert. In der Analyse der RT-qPCR-Daten zeigte sich dann in dem in den CaCo-2-Zellen „S-I“ erstellten Stock „NL63-2020-1“ eine deutlich höhere Konzentration an Genomäquivalenten im Vergleich zu dem in CaCo-2-Zellen „Berlin“ produziertem Stock NL63-

2020-2. Abb. 16 stellt dies graphisch dar. Deshalb wurde der Stock NL63-2020-1 und- die CaCo-2-Zellen „S-1“ für das Passageexperiment verwendet.

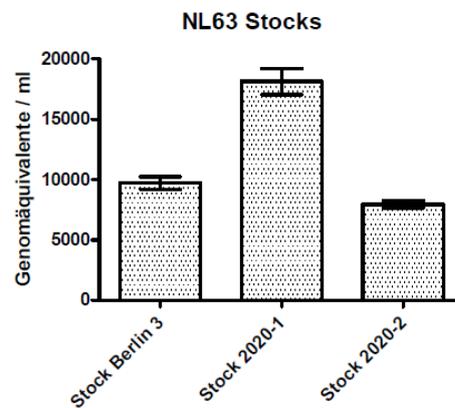


Abb. 16: Genomäquivalente pro Milliliter von HCoV-NL63-Stocks im Vergleich, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei Messungen mittels RT-qPCR

2.10.4 Herstellung der Inhibitor-Stocklösungen

Als Inhibitoren wurden wieder die CYP-Antagonisten Cyclosporin A (CsA; RTC/SIGMA-ALDRICH, Laramie, Wyoming, USA, REF: PHR1092-500mg), Alisporivir (ALV; Novartis, Basel, Schweiz, REF: JC-15-MC16) und NIM811 (Novartis, Basel, Schweiz, REF: JC-15-MC16) verwendet. Die Substanzen waren in Pulverform bei -20° C gelagert.

2.10.5 Beginn des Passageexperiments 3

CaCo-2-Zellen wurden in drei Sets zu je 9 Löchern in zwei 6-Lochplatten ausgesät und nach vier Tagen bei einer Konfluenz von ca. 75 % mit 1 ml DPBS/Loch gewaschen und acht der Löcher mit einem Inokulum aus DMEM und Virus-Stock „NL63 2020-1“ infiziert. Um eine MOI von 0,01 zu erreichen, war für das Inokulum ein Master-Mix separat für jedes Set aus 3,18 ml Virusüberstand und 4,82 ml DMEM hergestellt worden, das Volumen betrug dann 1000 µl/Loch. Ein Loch wurde nur mit DMEM als Mock-Infektion behandelt. Die Platten wurden dann für 90 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert und jeweils nach ca. 30 Minuten leicht geschwenkt. Danach wurden die Zellen wiederum mit 1 ml DPBS gewaschen und 1,5 ml Zellkulturmedium hinzugegeben. Hierauf wurde dann Zellkulturmedium, welchem Inhibitoren zugesetzt waren, den jeweiligen Löchern hinzugegeben. In Tabelle 12 sind

Inhibitoren und deren Konzentration als Übersicht dargestellt. Die Platten wurden dann für drei Tage bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert.

Platte	Loch	Zusatz	c [Inhibitor]
1	1	ALV	10µM
1	2	ALV	2,5 µM
1	3	CsA	10 µM
1	4	CsA	2,5 µM
1	5	NIM811	10 µM
1	6	NIM811	2,5 µM
2	7	EtOH	0,05 %
2	8	Medium	-
2	9	Mock	-

Tabelle 12: Übersicht über die Inhibitoren und deren Konzentration (c) zu Beginn des Passageexperimentes 3. Loch 7 stellt die Lösungsmittel-Kontrolle, Loch 8 die Passagekontrolle ohne Lösungsmittel dar. In Loch 9 wurde keine Infektion durchgeführt.

2.10.6 Der Ablauf der folgenden Passagen

Am Ende jeder Passage wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für 5 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. 500 µl des Überstands wurden dann mit 500 µl DMEM gemischt als Inokulum für die folgende Passage verwendet, 1700 µl des Überstandes wurden bei -80° C asserviert. Zur Infektion wurden frische CaCo-2-Zellen bei 60-80 % Konfluenz mit DPBS gewaschen und mit dem Inokulum für 90 - 110 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert und regelmäßig leicht geschwenkt um das Inokulum zu verteilen. Die Infektion wurde durch Waschen mit DPBS beendet und 1,5 ml Zellkulturmedium in die Löcher gegeben. Dann wurde Zellkulturmedium, welchem Inhibitoren zugesetzt waren, den jeweiligen Löchern nach dem in Tabelle 13 aufgeführten Plan hinzugegeben. Die Zellen wurden dann bei 37° C und 5 % CO₂ für 4 bzw. 3 Tage im Wechsel inkubiert, um dann die Überstände in eine neue Passage zu überführen. Im Laufe des Passageexperimentes wurde die Konzentration von NL63-Genomäquivalenten in den Zellkulturüberständen von Passage fünf und zehn mittels RT-qPCR und relativer Quantifizierung bestimmt. Hiermit wurde eine Persistenz der Viruspopulationen über die Passagierung hinweg sichergestellt. Tabelle 39 und Tabelle 40 im Anhang zeigen die Genomäquivalente der einzelnen Viruspopulationen und deren Persistenz über die Passagierung.

Passage	Dauer (d)	c Inhibitor Loch 1,3,5 (μM)	c Inhibitor Loch 2,4,6 (μM)	c EtOH in Loch 7
1	3	10,0	2,5	0,05 %
2	4	10,0	2,5	0,05 %
3	3	10,0	5,0	0,05 %
4	4	10,0	5,0	0,05 %
5	3	10,0	7,5	0,05 %
6	4	10,0	7,5	0,05 %
7	3	10,0	10,0	0,05 %
8	4	10,0	10,0	0,05 %
9	3	10,0	12,5	0,06 %
10	4	10,0	12,5	0,06 %
11	3	10,0	15,0	0,08 %
12	4	10,0	15,0	0,08 %
13	3	10,0	17,5	0,09 %
14	4	10,0	17,5	0,09 %
15	3	10,0	20,0	0,10 %

Tabelle 13: Überblick über die Passagen des Passageexperimentes 3: Dargestellt sind Passagedauer und die Konzentrationen der Inhibitoren im Verlauf (d=Tag; c= Konzentration).

2.10.7 Letzte Passage und Beendigung des Passageexperimentes:

Die letzte Passage erfolgte in 10 cm - Zellkulturschalen, um ausreichend Virionen für die folgenden Vergleichsexperimente zu erzeugen. Der Zellkulturüberstand der Passage 14 wurde abgenommen und 5 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. Dann wurden Inokula aus 3000 μl DMEM und 2000 μl Überstand angemischt. CaCo-2-Zellen, welche zum Zeitpunkt der Infektion 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurden gewaschen und mit dem Inokulum für 110 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert und die Schalen regelmäßig leicht geschwenkt. Die Infektion wurde dann durch Waschen mit DPBS beendet und 10 ml Kulturmedium mit Inhibitor wurden zu den Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellkulturschalen für drei Tage bei 37° C und 5 % CO₂ im inkubiert. Im Anschluss wurde der Zellkulturüberstand in ein Zentrifugenröhrchen verbracht und 5 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. Der nun von Zelltrümmern befreite Überstand wurde dann in einem neuen Zentrifugenröhrchen resuspendiert um eine homogene Verteilung der Virionen zu erreichen. Dann wurden 100 μl Überstand zur qPCR-Analyse asserviert, der Rest wurde in mehrere Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Die Überstände wurden bei -80° C eingefroren.

2.10.8 Relative Quantifizierung der Genomäquivalente

Um die MOI in den folgenden Vergleichsexperimenten zur Resistenztestung jeweils ähnlich zu halten, wurde die RNA aus jeweils 100 µl Virusüberstand der Passagen isoliert und mittels qPCR relativ quantifiziert (Tabelle 14). Die Methoden sind unter Kapitel 2.5 ff. dieser Arbeit beschrieben.

Stock	GE/ml	Stock	GE/ml	Stock	GE/ml
2020-1	1,8E+04				
P15-A1-ALV	2,6E+04	P15-B1-ALV	3,2E+04	P15-C1-ALV	2,9E+04
P15-A2-ALV	2,5E+04	P15-B2-ALV	3,9E+04	P15-C2-ALV	5,7E+04
P15-A3-CsA	3,1E+04	P15-B3-CsA	4,2E+04	P15-C3-CsA	3,1E+04
P15-A4-CsA	5,3E+03	P15-B4-CsA	3,3E+04	P15-C4-CsA	3,8E+04
P15-A5-NIM811	6,4E+04	P15-B5-NIM811	7,5E+04	P15-C5-NIM811	1,2E+05
P15-A6-NIM811	4,0E+04	P15-B6-NIM811	6,9E+04	P15-C6-NIM811	5,6E+04
P15-A7-EtOH	1,6E+04	P15-B7-EtOH	5,6E+04	P15-C7-EtOH	8,2E+04
P15-A8-Medium	7,8E+04	P15-B8-Medium	3,2E+04	P15-C8-Medium	8,9E+04

Tabelle 14: Genomäquivalente (GE) der verschiedenen HCoV-NL63 Viruspopulationen aus dem Passageexperiment 3

2.10.9 Vergleichsexperimente zur Resistenztestung

Im Anschluss an das Passageexperiment 3 wurde jede der daraus hervorgegangenen Viruspopulationen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 überprüft. Aufgrund des besonderen Umfangs dieses Experiments wurden diese Testungen jeweils nur in einfacher Ausführung durchgeführt. Die Replikation der Viren sollte unter dem Einfluss von sechs verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors (1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µM) mit der einer EtOH-Kontrolle (0,2 %) verglichen werden. Je drei Löcher wurden den gleichen Bedingungen ausgesetzt. In jedem Experiment wurde der Startstock des Passageexperimentes NL63-2020-1 ebenfalls getestet.

Für die Vergleiche zur Resistenz wurden CaCo-2-Zellen (DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) REF: ACC 169) in 96-Loch-Plates

ausgesät, wobei die umgebenden Löcher mit DPBS gefüllt waren, um ein homogenes Feuchtigkeitsmilieu innerhalb der Platten zu erreichen. Das Inokulum betrug 50 µl pro Loch, wobei Virusüberstand und DMEM für jede Viruspopulation jeweils so gemischt waren, dass eine MOI von 0,01 erreicht wurde (~180 Virionen/Loch). Bei 80 % Konfluenz wurden die CaCo-2-Zellen dann mit ~100 µl DPBS/Loch gewaschen und nach Hinzugabe des Inokulums bei 37° C und 5 % CO₂ für 90 Minuten infiziert. 100 µl des Inokulums wurden bei -80° C asserviert. Die Infektion wurde durch Waschen mit ~100 µl DPBS/Loch beendet und in jedes Loch 110 µl Kulturmedium, welches mit dem Inhibitor versetzt war, gegeben. Die Platten wurden für 72 Stunden bei 37° C und 5 % CO₂ gehalten und im Anschluss die Kulturüberstände des jeweiligen Triplikates gemischt in Mikroreaktionsgefäßen 5 min bei 2000 x g zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden dann abgenommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Überstände wurden bei -80° C eingefroren.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	PBS	PBS	EtOH 0,2%	1,25	2,5	5	10	20	40	PBS	PBS
C	PBS	PBS	PBS	EtOH 0,2%	1,25	2,5	5	10	20	40	PBS	PBS
D	PBS	PBS	PBS	EtOH 0,2%	1,25	2,5	5	10	20	40	PBS	PBS
E	PBS	PBS	PBS	EtOH 0,2%	1,25	2,5	5	10	20	40	PBS	PBS
F	PBS	PBS	PBS	EtOH 0,2%	1,25	2,5	5	10	20	40	PBS	PBS
G	PBS	PBS	PBS	EtOH 0,2%	1,25	2,5	5	10	20	40	PBS	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Abb. 17: Plan des Vergleichsexperiments im 96-Loch-Plate-Format. Auf jeder Platte wurden zwei Viruspopulationen in Triplikaten unter Einfluss verschiedener Konzentrationen (hier in µM) des jeweiligen Inhibitors Alisporivir, Cyclosporin A oder NIM811 gehalten, die umliegenden Löcher waren mit DPBS gefüllt. Die Zahlen und Buchstaben am Rand dienen als Koordinaten zur Identifizierung der einzelnen Löcher.

Im Verlauf wurden dann die Überstände auf Eis aufgetaut und deren RNA isoliert. Mittels qPCR wurde dann die Konzentration der Genomäquivalente in den Überständen in Relation zur Kontrollprobe bestimmt. Die Methoden sind unter Kapitel 2.5 ff. dieser Arbeit beschrieben.

2.10.10 Virale Fitness

Um die Replikationsfähigkeit der einzelnen Viruspopulationen aus dem Passageexperiment zu vergleichen, wurde im unter Kap. 2.10.9 beschriebenen Vergleichsexperiment auch das Inokulum asserviert. Mittels den in Kap. 2.5 ff beschriebenen Methoden wurden dann die Genomäquivalente im Inokulum mit denen in der EtOH-Kontrolle des Vergleichsexperiments verglichen.

2.10.11 Präanalytik für das NGS

Die Sequenzierung des HCoV-NL63-Genoms aus dem Passageexperiment 3 wurde vom Labor für NGS und Microarray-Diagnostik des Instituts für Virusdiagnostik (IVD) am Friedrich-Loeffler-Institut für Tiergesundheit, durchgeführt. Präanalytisch wurden Virusüberstände aus Passage 15 und dem Stock „NL63-2020-1“ in Wassereis aufgetaut und dann zweimalig für jeden Stock 400 µl Zellkulturüberstand mit je 1200 µl TRIzol reagent in einem 2 ml-Mikroreaktionsgefäß vermischt, das Gefäß geschwenkt und kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden dann wiederum bei -80° C eingefroren, um im Verlauf auf Trockeneis versandt zu werden.

2.11 Statistische Auswertung der Inhibitionsexperimente

2.11.1 Allgemeines und Deskriptive Statistik

Die mittels RT-qPCR gewonnenen Daten aus den Vergleichsexperimenten, welche im Rahmen der Passageexperimente durchgeführt worden waren, wurden wie unter Kap. 2.7 dargestellt mittels relativer Quantifizierung prozessiert und damit die HCoV-NL63-Genomäquivalente der einzelnen Proben im Überstand in Relation gebracht. Danach wurden die Daten mit der Software GraphPad Prism 9 Version 9.1.0 (121) weiterverarbeitet. Deskriptiv wurde die Sensitivität der viralen Replikation gegenüber den Inhibitoren die Reduktion der Genomäquivalente (GE, engl. Genome equivalents) als Log₁₀-Reduktion graphisch dargestellt.

2.11.2 Halbmaximale Inhibitorische Konzentration

Induktiv wurden mittels nichtlinearer Regression die mittleren Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors, bei dem die Replikation halbmaximal gehemmt wird (IC₅₀, engl. half maximal inhibitory concentration) bestimmt. Im Programm kam hierbei das Tool „[inhibitor] vs. normalized response“ zum Einsatz.

2.11.3 Verhältnis der IC₅₀-Werte

Um die Auswirkungen verschiedener Cyclophilin-Inhibitoren auf die Replikation der Viruspopulationen zu vergleichen, wurde für die Passageexperimente 1, 2 und 3 die IC₅₀ Werte der jeweiligen Population ins Verhältnis zu denen der Kontrollen gesetzt. Mithilfe dieser

relativen IC_{50} -Werte konnten Resistenzprofile der Viruspopulationen über mehrere Experimente oder Inhibitoren hinweg verglichen werden.

2.11.4 ANOVA

Mittels ANOVA wurde die unterschiedliche Reduktion von Genomäquivalenten verschiedener Viruspopulationen unter dem Einfluss einzelner Konzentrationen von Inhibitoren auf statistische Signifikanz hin geprüft. Hierbei wurden die Ergebnisse zu den verschiedenen verwendeten Inhibitoren zusammengefasst. Zuerst wurden mittels ROUT statistische Ausreißer entfernt (Einstellung: $Q = 1\%$). Hierauf wurden die Datensätze dann mittels one-way-ANOVA geprüft. Die Tools hierzu waren im Programm GraphPad Prism 9 verbaut.

2.11.5 Gepaarter t-test

Die Basenaustauschraten (s.n-1) der Viruspopulationen aus Passageexperiment 2, welche in zwei sowohl in Passage 10 als auch Passage 15 sequenziert worden waren, wurden dann mittels gepaartem t-Test (GraphPad Prism 9) miteinander verglichen.

2.12 Prozessierung und Analyse der NGS-Daten

2.12.1 Erstellung einer Genomkarte

Um Mutationen an einer bestimmten Position im NL63-Genom einem davon betroffenen Protein zuordnen zu können, wurde mittels des Programms SnapGene® (Version 5.2) eine Genomkarte erstellt. Die Daten zu den Positionen aus den ORFs stammen aus der Veröffentlichung von van der Hoek et al., 2004 [78], die Abschnitte aus ORF 1ab zu den einzelnen Nichtstrukturproteinen wurden mit Hilfe der Online-Datenbanken UniProt [239, 240] und ViPR-Virus Pathogen Resource [241] bestimmt. Diese hatten sich wiederum auf Clementz et al., Dominguez et al., Geng et al., Pyrc et al., van der Hoek et al. sowie Zhang et al. bezogen [78, 242-246]. Abb. 18 zeigt die daraus entstandene Genomkarte. In Tabelle 15 werden die einzelnen Genomabschnitte und die diesbezüglichen Proteine aufgelistet.

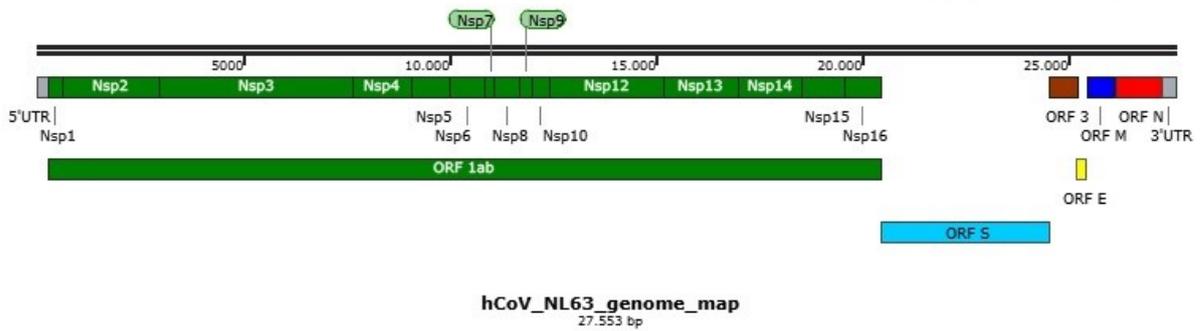


Abb. 18: Kartierung des NL63-Genoms: Dargestellt sind die Open Reading Frames (ORF) sowie die nicht-translatierten Regionen (UTR) entlang des 27553 Basen langen Genoms. Zudem sind die Abschnitte des ORF 1ab, welche für die einzelnen Nichtstrukturproteine (Nsp) codieren, verzeichnet. Eigene Grafik, erstellt mit SnapGene®.

Unterteilung des HCoV-NL63-Genoms:

Genomabschnitt		Codiertes Protein:	Beginn:	Ende:	Länge:
5'UTR			1	286	286
ORF 1ab	ORF1a	Polyprotein 1ab	287	20475	20189
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp1	287	616
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp2	617	2980
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp3	2981	7672
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp4	7673	9103
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp5	9104	10012
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp6	1013	10849
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp7	10850	11098
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp8	11099	11683
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp9	11684	12010
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp10	12011	12415
ORF 1ab	ORF1a	"	Nsp11	12416	12486
ORF 1ab		"	Nsp12*	12416	15195
ORF 1ab		"	Nsp13	15196	16986
ORF 1ab		"	Nsp14	16987	18540
ORF 1ab		"	Nsp15	18541	19572
ORF 1ab		"	Nsp16	19573	20475
ORF S		Spike-Protein	20472	24542	4071
ORF 3		Protein 3	24542	25219	678
ORF E		Envelope-Protein	25200	25433	234
ORF M		Membrane-Protein	25442	26122	681
ORF N		Nucleocapsid-Protein	26133	27266	1134
3'UTR			27267	27553	287
*-1 ribosomal frameshift			12439	12440	

Tabelle 15: Unterteilung des HCoV-NL63-Genoms in die einzelnen Genomabschnitte (ORF = Open Reading Frame; UTR: Nicht translatierte Region) sowie die hierfür codierten Proteine. Auch verzeichnet sind der Beginn, das Ende und die Länge des jeweiligen Abschnitts. Das Polyprotein 1ab spaltet sich nach Translation durch Autoproteolyse

in die Nichtstrukturproteine (Nsp). Im Rahmen eines ribosomalen Rastersprungs endet die Translation des ORF1ab nicht nach Produktion des Nsp11, sondern wird durch Überspringen des Stop-Codons an Position 12439 fortgesetzt. Es entstehen dann auch die Nsp12-16.

2.12.2 Analyse für die HCoV-NL63 Passageexperimente 1 & 2

Die RNA aus den virionenhaltigen Überständen aus den HCoV-NL63 Passageexperimenten 1 & 2 wurden durch das Labor von Dr. Helmut Blum am Genzentrum der LMU München sequenziert. Nach Herstellung einer cDNA-Library kam dort das System Illumina Hi-seq1500® zum Einsatz. Die Sequenzierung wurde als „Single-Read-Sequencing“ durchgeführt.

Die Datensätze, welche nach der Sequenzierung durch die AG Blum erstellt wurden, wurden dann unter Zuhilfenahme des LaFuGa Galaxy-Portals prozessiert [247]. Die Rohdatensätze sind im „fastq“ Format gespeichert und beinhalten somit auch Informationen zur Sequenzierqualität. [248, 249]. Die Ergebnisse sind in zwei Dateien gespeichert. Die eine beinhaltet die Sequenzen vom Rd1 Seq Primer, der den Barcode beinhaltet, die andere enthält die „index reads“.

Am Anfang der Analyse steht die Demultiplexierung. Hierbei werden aus dem Rohdatensatz diejenigen Sequenzen, welche den gesuchten Barcode besitzen und damit einer Probe zugeordnet sind, herausgefiltert. Hierfür wurde das Programm „Illumina Demultiplex (Galaxy Version 1.0.0)“ angewendet. Im Anhang sind in Tabelle 41 die Datensätze und die den Proben zugeordneten Barcodes aufgelistet. Hierauf wurden mit dem Programm Bowtie 2 (Version 2.1.0) [250] die jeweils einzelnen Reads an das Referenzgenom HCoV-NL63, Stamm Amsterdam I [134, 251] angelegt. Das Programm ordnet die einzelnen Reads der passenden Position im Referenzgenom zu. Die so erzeugten Daten werden im Bam-Format und einer Bam-Index-Datei (.bai) gespeichert. Reads, deren Sequenz nicht an das Referenzgenom angelegt werden konnten, wurden dabei aussortiert.

Nun war es notwendig, die Häufigkeit der Variabilität der sequenzierten Nukleotide gegenüber dem Referenzgenom darzustellen. Dazu wurde das Programm LoFreq (Version 2.1.3.1) [252] auf die mittels Bowtie 2 erstellten Dateien angewandt. Als Referenzgenom diente wiederum HCoV-NL63, Stamm Amsterdam I. Die einzelnen Varianten wurden zusammen mit ihrer Allelfrequenz durch das Programm LoFreq tabellarisch aufgelistet. Deren Auswirkung auf die Aminosäuresequenz der durch die jeweiligen Genomabschnitte kodierten Proteine

wurde dann unter Verwendung des Programmes SnapGene® bestimmt. Hierzu wurde zuerst eine Genomkarte erstellt. Als Referenz diente das von Lia van der Hoek et. al 2004 im Rahmen der Erstbeschreibung im Jahr 2004 publizierte Genom [78] (NCBI Reference Sequence: NC_005831.2). Aufgrund des Prozesses des Umschreibens der viralen RNA in DNA im Rahmen der Sequenzierung wurde für die weitere Analyse der Buchstabe T für die Base Thymin anstelle des in RNA vorkommenden U (Uracil) verwendet. Die Basensubstitutionen pro Nukleotid ($s.n^{-1}$, engl.: substitutions per nucleotide) zeigen jeweils die Mutationshäufigkeit in den Passageexperimenten an. Der Wert errechnet sich aus der Anzahl der Mutationen, multipliziert mit ihrer jeweiligen Häufigkeit, die dann durch die Gesamtzahl der Nukleotide des NL63-Genoms, 27553 Nukleotide [135], geteilt wird.

2.12.3 Analyse für das HCoV-NL63 Passageexperiment 3

Die im Anschluss an das Passageexperiment 3 gewonnenen, und wie in Kapitel 2.10.11 beschrieben, vorbereiteten Proben wurden dann an das Labor für NGS und Microarray-Diagnostik des Instituts für Virusdiagnostik (IVD) am Friedrich-Loeffler-Institut für Tiergesundheit versandt. Dort wurde im Labor für NGS und Microarray-Diagnostik unter der Leitung von Dr. Dirk Höper durch Dr. Claudia Wylezich die Prozessierung der Proben sowie die Sequenzierung der RNA-Abschnitte mittels einer *Ion Torrent Personal Genome Machine* vorgenommen. Die Handlungsabfolge von Extraktion und Sequenzierung ist im Detail in Wylezich et al. beschrieben [253].

Die dann zur Verfügung gestellten Varianztabelle wurden anschließend zusammengefasst und sortiert. Mittels des Programms SnapGene® wurden dann die einzelnen Mutationen mit dem Referenzgenom [78] verglichen und der Effekt der Mutation dargestellt. Aussortiert wurden Mutationen, welche in weniger als 5% der korrespondierenden Reads auftraten oder innerhalb der translatierbaren Region des NL63-Genoms keine Veränderung in der Aminosäuresequenz hervorgerufen hätten. Mutationen, die anhand der Varianztabelle nicht direkt dem Referenzgenom zugeordnet werden konnten, jedoch in Summe zu mehr als 5% auftraten, wurden mittels der Programme *Integrative Genomics Viewer* (IGV) sowie *Tablet* [254, 255] weiter analysiert. Hier wurde dann die „bam-Datei“, in welcher wie in Kapitel 2.12.2 beschrieben die Daten der einzelnen sequenzierten Stränge dem Referenzgenom angelegt. Diese wurden in Folge manuell ausgewertet und die Mutation dann durch Betrachtung der

einzelnen Reads der korrekten Position im Referenzgenom zugeordnet. Initiale Abweichungen in der Varianztabelle kamen durch Verschiebung um eine Basenlänge im Rahmen einer vorangegangenen Deletion oder Insertion zustande.

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde auch hier für die Bezeichnung der Mutationen die Base Thymin (T) anstelle des in RNA vorkommenden Uracils (U) verwendet. Die Basensubstitutionen pro Nukleotid (s.n-1, engl.: substitutions per nucleotide) wurde ebenfalls wie in Kapitel 2.12.2 beschrieben bestimmt.

2.12.4 Bestimmung der Mutationsdichte der einzelnen Passageexperimente

Die in den vorherigen Kapiteln identifizierten Mutationen wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen die Gruppe „Resistenzassoziiert“ und zum anderen die Gruppe „Replikationsassoziiert“. Zur ersten Gruppe gehörten Mutationen, welche in Summe zu weniger als 5 % in den Kontrollpopulationen des Passageexperiments auftraten. In der Gruppe „Replikationsassoziiert“ wurden Mutationen zusammengefasst, welche in Summe zu mindestens 5 % in Kontrollpopulationen auftraten. Um den verschiedenen großen Abschnitten des NL63-Genoms Rechnung zu tragen, wurde die Zahl der abweichenden Varianten innerhalb eines Genomabschnitts in Relation zur Gesamtzahl der Nukleotide desselben Genomabschnitts gesetzt. Dies geschah für jedes Passageexperiment, getrennt für die resistenzassoziierten Varianten („Intervention“) sowie die replikationsassoziierten Varianten („Kontrollen“). In diesem Rahmen war nur eine relative Gewichtung möglich.

2.12.5 Synopse der Mutationen der Passageexperimente

Die Gesamtheit der in den drei Passageexperimenten aufgetretenen Mutationen wurde dann zusammengetragen. Wie im vorangegangenen Kapitel bereits beschrieben, wurde die Mutationsdichte zusammenfassend bestimmt. Hier wurde aufgrund des höheren Vorkommens von Kontrollpopulationen ein Schwellenwert für eine Mutationsfrequenz von 7,5 Prozentpunkten angelegt, um zwischen replikationsassoziierten sowie resistenzassoziierten Mutationen zu unterscheiden.

Zudem wurden Mutationen identifiziert, welche übergreifend in mehreren Passageexperimenten auftraten.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse zur Resistenztestung aus den Passageexperimenten

3.1.1 Passageexperiment 1

Die im Laufe des ersten Passageexperimentes durchgeführten Vergleichsexperimente, welche in Kapitel 2.8.10 Vergleichsexperimente zur Resistenztestung beschrieben sind, wurden dann wie unter Kap. 2.7.1 Standardkurve mittels relativer Quantifizierung ausgewertet. Die Reduktion von Genomäquivalenten unter dem Einfluss der Inhibitoren wurde im Log₁₀-Format in Graphen aufgetragen. Diese sind im Anhang unter Kapitel 5.6.1 einsehbar. Es zeigten sich hierbei bereits Unterschiede zwischen Intervention und Kontrolle hinsichtlich der Sensitivität gegenüber den jeweiligen Inhibitoren. Insgesamt sind die Ergebnisse dieser Vergleichsexperimente jedoch nur eingeschränkt zu werten, da zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente die Kontamination mit Mykoplasmen bestanden hatte. Zudem unterschied sich der Aufbau, und es wurde jeweils nur eine Population mit einer Kontrolle verglichen.

In den Vergleichsexperimenten, welche nach Abschluss des Passageexperiments 1 mit den Viruspopulationen aus Passage 25|3 und p0 durchgeführt wurden, wiesen diese ausgeprägte Unterschiede hinsichtlich der Sensibilität gegenüber den Inhibitoren ALV und CsA auf. Die Graphen in den Abb. 19 f. zeigen eine deutlich reduzierte Verminderung der Genomäquivalente in der Interventionsgruppe im Vergleich zu den Kontrollpopulationen unter dem Einfluss der Inhibitoren. Zwar wurde die virale Replikation in diesem Experiment durch CsA stärker inhibiert als durch ALV, jedoch zeigt sich ein ähnliches Ansprechen der einzelnen Viruspopulationen auf die Inhibitoren in beiden Experimenten.

Mittels nichtlinearer Regression wurde dann die IC₅₀ der einzelnen Viruspopulationen für die Inhibitoren ALV und CsA berechnet. Die Graphen hierzu finden sich in Abb. 22. Die Werte sind tabellarisch im Anhang unter Abschnitt 5.6.2 aufgelistet. Aufgrund der verringerten Sensitivität und der damit atypischeren Reaktion auf die Inhibitoren zeigten sich die 95 %-Konfidenzintervalle der IC₅₀-Werte der Interventionsgruppe vielfach größer als in den Kontrollen. Insbesondere der obere Wert des Konfidenzintervalls lag bei Population p25|3.3-CsA für beide Inhibitoren und für Population p25|3.2-ALV für die Testung gegenüber Alisporivir im Unendlichen. Im Vergleichsexperiment zur Sensitivität gegenüber Alisporivir zeigten sich die Populationen p.25|3.2-ALV und p.25|3.6-NIM811 auch unter Berücksichtigung

der Konfidenzintervalle different zu den Kontrollen. Im Vergleichsexperiment zu Cyclosporin A, zeigte sich dies in keiner Population. Auch wenn sich die 95 % Konfidenzintervalle von Intervention und Kontrollen nicht überschneiden, ist eine Testung auf statistische Signifikanz der Unterschiede im IC₅₀ nicht möglich, da das Experiment jeweils nur einmalig durchgeführt worden war.

Mittels one-way-ANOVA wurde die Persistenz der Genomäquivalente der verschiedenen Gruppen (Keine Passage, Kontrollpopulationen sowie Intervention) unter Zusammenfassung der Experimente mit ALV und CsA für die Konzentrationen 2,5 µM, 5,0 µM, 20 µM sowie 40 µM verglichen. Die Unterschiede der Kontrollen zeigten sich für die Konzentration 5,0 µM signifikant ($p = 0,010$). Abb. 21 zeigt die dazugehörigen Graphen.

Passageexperiment 1: Sensibilität der HCoV-NL63 Populationen gegenüber Alisporivir nach Abschluss der Passagierung

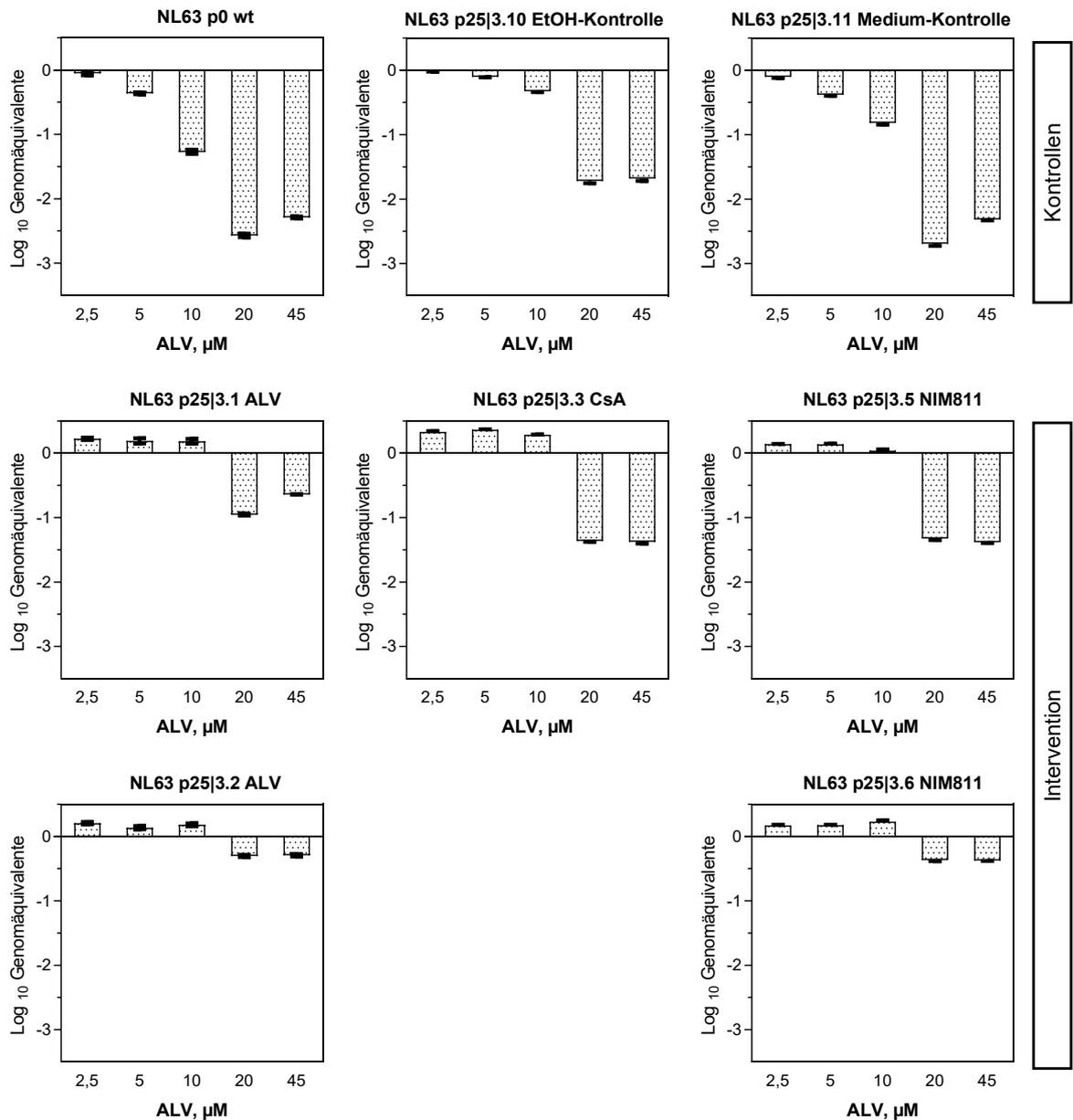


Abb. 19: Passageexperiment 1: Sensibilität der HCoV-NL63 Populationen gegenüber Alisporivir (ALV) nach Abschluss der Passagierung. Die Graphen zeigen die Reduktion der NL63-Genomäquivalente der verschiedenen Viruspopulationen unter dem Einfluss von ALV in aufsteigenden Konzentrationen. Der Name der jeweiligen Population enthält den Zusatz, in welchem diese propagiert wurde. (NL63 p25|3.1 und p25|3.2 in ALV; NL63 p25|3.3 in Cyclosporin A (CsA) sowie p25|3.5 und p25|3.6 in NIM811. Die Population p0 wt entstammt dem Ausgangsstock und war nur dreimalig in Kulturmedium passagiert worden.

Passageexperiment 1: Sensibilität der HCoV-NL63 Populationen gegenüber Cyclosporin A nach Abschluss der Passagierung

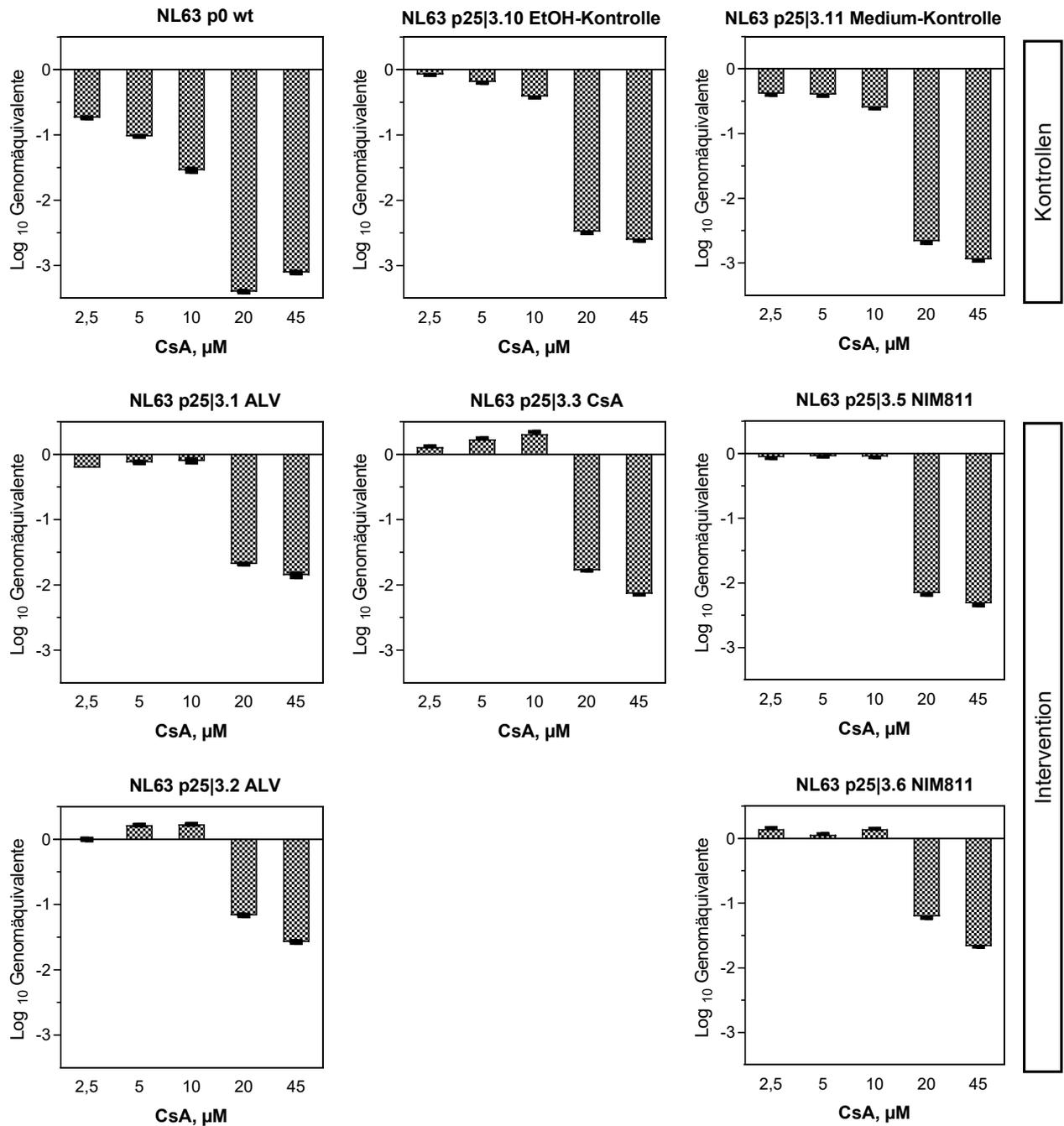


Abb. 20: Passageexperiment 1: Sensibilität der HCoV-NL63 Populationen gegenüber Cyclosporin A (CsA) nach Abschluss der Passagierung. Die Graphen zeigen die Reduktion der NL63-Genomäquivalente der verschiedenen Viruspopulationen unter dem Einfluss von CsA in aufsteigenden Konzentrationen. Der Name der jeweiligen Population enthält den Zusatz, in welchem diese propagiert wurde. (NL63 p25|3.1 und p25|3.2 in Alisporivir (ALV); NL63 p25|3.3 in CsA sowie p25|3.5 und p25|3.6 in NIM811. Die Population p0 wt entstammt dem Ausgangsstock und war nur dreimalig in Kulturmedium passagiert worden.

Passageexperiment 1: Vergleich der Sensitivität der Viruspopulationen gegenüber den Cyclophilin - Inhibitoren Alisporivir und Cyclosporin A (gemischt) in ausgewählten Konzentrationen

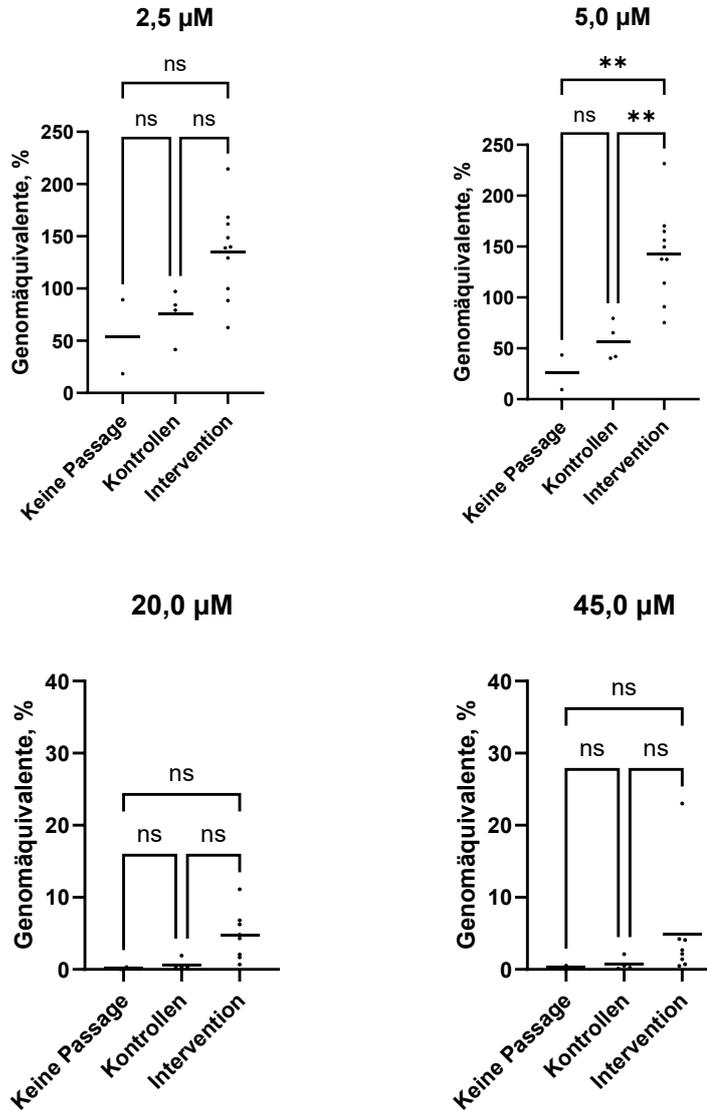
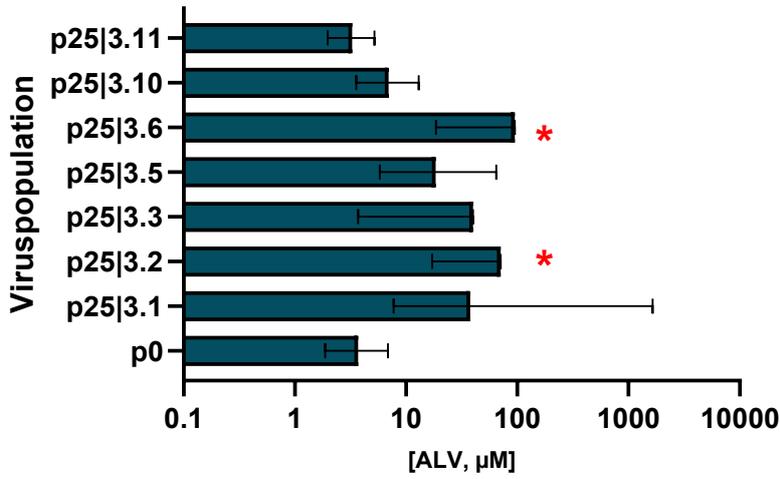


Abb. 21: Passageexperiment 1: Vergleich der Genomäquivalente der jeweiligen HCoV-NL63-Viruspopulationen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der eingesetzten Cyclophilin-Inhibitoren Alisporivir und Cyclosporin A, wobei 100 % der Medium-Kontrolle entspricht. Die Genomäquivalente wurden 72 h post infectionem in CaCo2-Zellen mittels qPCR aus dem Kulturüberstand bestimmt, wobei die Ergebnisse zu beiden Inhibitoren gepoolt wurden. Die Unterschiede zwischen den Kontrollen und der Interventionsgruppe zeigten sich nur im Konzentrationsbereich von 5 µM signifikant ($p \leq 0,01$).

a) **IC₅₀-Werte für Alisporivir**



b) **IC₅₀-Werte für Cyclosporin A**

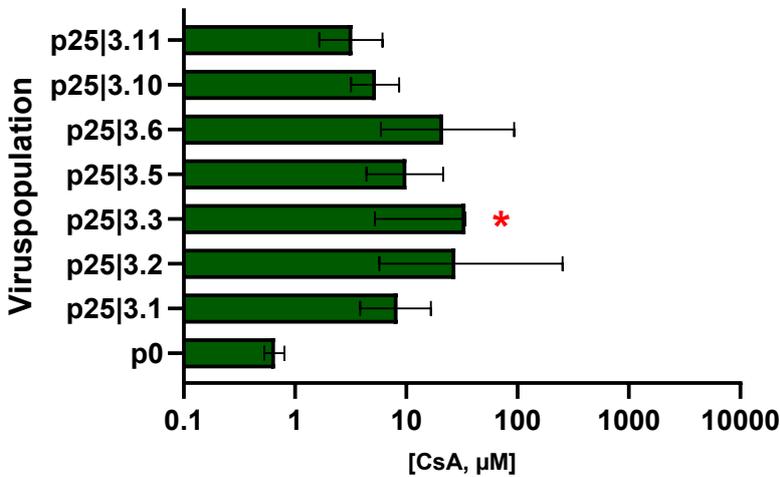


Abb. 22: IC₅₀ Werte der Viruspopulationen nach Abschluss von Passageexperiment 1 für a) Alisporivir (ALV) und b) Cyclosporin A (CsA). Auf der X-Achse ist die Konzentration des jeweiligen Inhibitors mittels log₁₀-Skala in µM aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen das 95 %-Konfidenzintervall dar. Liegt hierbei der obere Wert des Konfidenzintervalls im Unendlichen, ist der Balken mit einem roten Stern markiert.

3.1.2 Passageexperiment 2

Die NL63-Genomäquivalente aus den Überständen, welche im Anschluss von Vergleichsexperimenten aus Passageexperiment 2 gewonnen worden waren, wurden relativ quantifiziert.

In einem vorläufigen Vergleich während der laufenden Passagen zeigte sich zwischen Intervention und Passagekontrolle der Passage 5 noch keine reduzierte Sensitivität gegenüber den jeweiligen Inhibitoren, in denen diese passagiert worden waren. In dieser Untersuchung war jedoch nur eine Inhibitor-Konzentration von 25 μM angewandt worden. Vielmehr war die Replikation von p5.1 unter 25 μM ALV stärker beeinträchtigt als die von p5.5. Abb. 56 zeigt die Inhibition im Graphen.

In Passage 10 konnte dann ein augenscheinlicher Unterschied zwischen der Sensitivität der Population p10.1 und der EtOH-Kontrolle p10.5 gegenüber Alisporivir gezeigt werden (Reduktion um 72 % bzw. 64 % für p10.1 und 88 % bzw. 95 % für p10.5). Ein noch deutlicherer Unterschied präsentierte sich zwischen p10.2 und p10.5 gegenüber Cyclosporin A (Ausbleibende Reduktion unter 12,5 μM und Reduktion um 94 % unter 25 μM für p10.2 und 94 %, bzw. 99 % Reduktion für p10.5). Für Population p10.3 fiel kein solcher Unterschied hinsichtlich der Sensitivität gegenüber NIM811 auf (Reduktion um 77 % bzw. 99 % für p10.3 und 82 bzw 99 % für p10.5). Die Reduktion der Genomäquivalente aus dem Vergleich von Passage 10 ist in den Graphen in Abb. 23 aufgetragen.

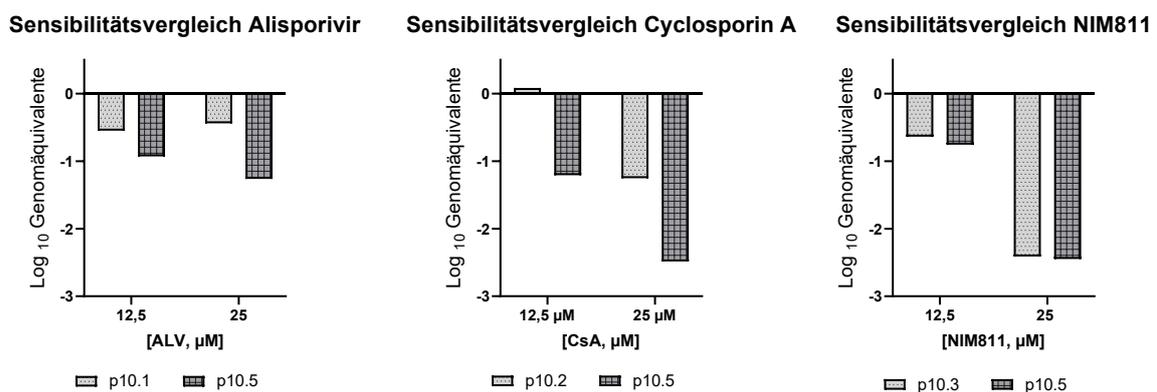


Abb. 23: Vergleichsexperimente von Passage 10 des zweiten Passageexperimentes. Die Reduktion der Genomäquivalente durch die angegebene Konzentration des jeweiligen Inhibitors ist mittels Log₁₀-Skala aufgetragen. Die einzelnen Populationen der Passage 10 sind hierbei p10.1 (Passage in Alisporivir (ALV) p10.2 (Passage in Cyclosporin A (CsA) und p10.3 (Passage in NIM811). Als Kontrolle diente p10.5 (EtOH-Passagekontrolle).

Nach Abschluss der Passagen wurden die drei in Kapitel 2.9.9 beschriebenen Inhibitionsexperimente durchgeführt. Die NL63-Viruspopulationen p15.1-ALV, p15.2-CsA, p15.3-NIM811, p15.5-EtOH und der Ausgangsstock Berlin 1 wurden auf ihre Sensitivität gegenüber den Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 hin getestet. Die Reduktion der Genomäquivalente durch die verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren ist in den folgenden Graphen im Log_{10} -Verhältnis aufgetragen. Abb. 24 beinhaltet die Graphen zur Inhibition mit ALV, Abb. 25 zu CsA und Abb. 26 diejenigen zu NIM811. Es zeigte sich insbesondere für Population p15.2 eine verminderte Sensitivität gegenüber den drei verwendeten Inhibitoren. Für p15.1 und p15.3 gilt dies in verringertem Maße. Eine Gegenüberstellung findet sich in Abb. 57. Die im Anschluss berechneten IC_{50} -Werte sind im Anhang unter Abschnitt 5.7.2 tabellarisch aufgeführt und graphisch in Abb. 27 dargestellt.

Auch wurde die Wirkung aller drei Cyclophilin-Inhibitoren für einzelne Konzentrationen auf Signifikanz der Unterschiede zwischen den Populationsgruppen „keine Passage“ (Berlin 1), „Kontrolle“ NL63 p15.5) und „Intervention“ (NL63 p15.1, p15.2 und p15.3) hin untersucht. Mit 2,5 μM , 5 μM , 20 μM und 40 μM wurden die Werte je zweier niedrigerer sowie höherer Konzentrationen der Inhibitoren herangezogen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich in der Testung mittels one-way-ANOVA nicht signifikant. Die Graphen hierzu befinden sich im Anhang unter Abschnitt 5.6.4 Vergleich der Interventionsgruppen mit Testung auf Signifikanz.

NL63-Passageexperiment 2: Sensibilitätstestung gegenüber Alisporivir

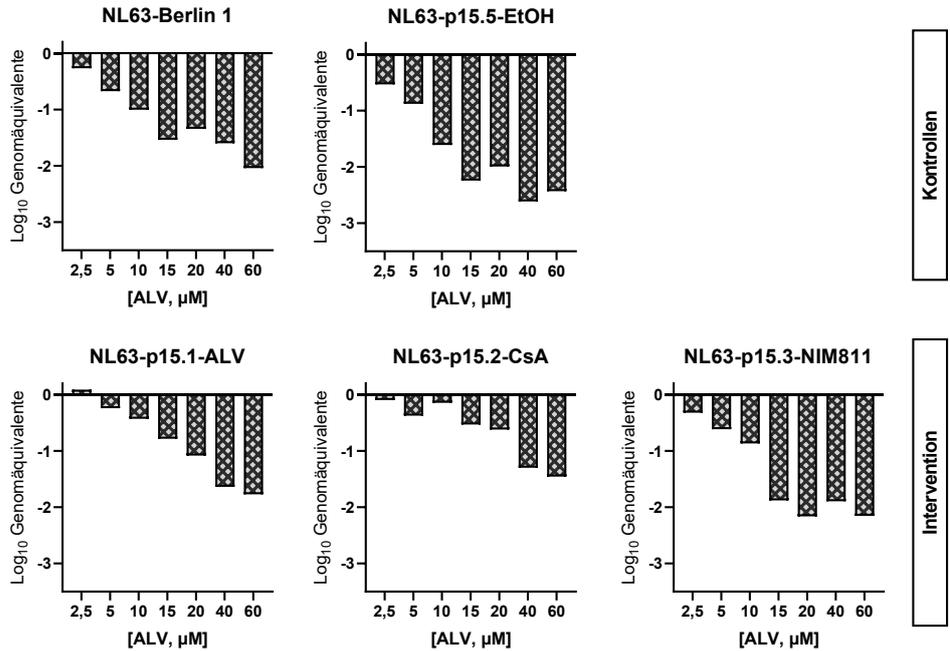


Abb. 24: Darstellung der relativen Reduktion von NL63-Genomäquivalenten von Passage 15 Viruspopulationen des zweiten Passageexperimentes unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors Alisporivir (ALV). Die Reduktion ist auf einer Log₁₀-Skala aufgetragen.

NL63-Passageexperiment 2: Sensibilitätstestung gegenüber Cyclosporin A

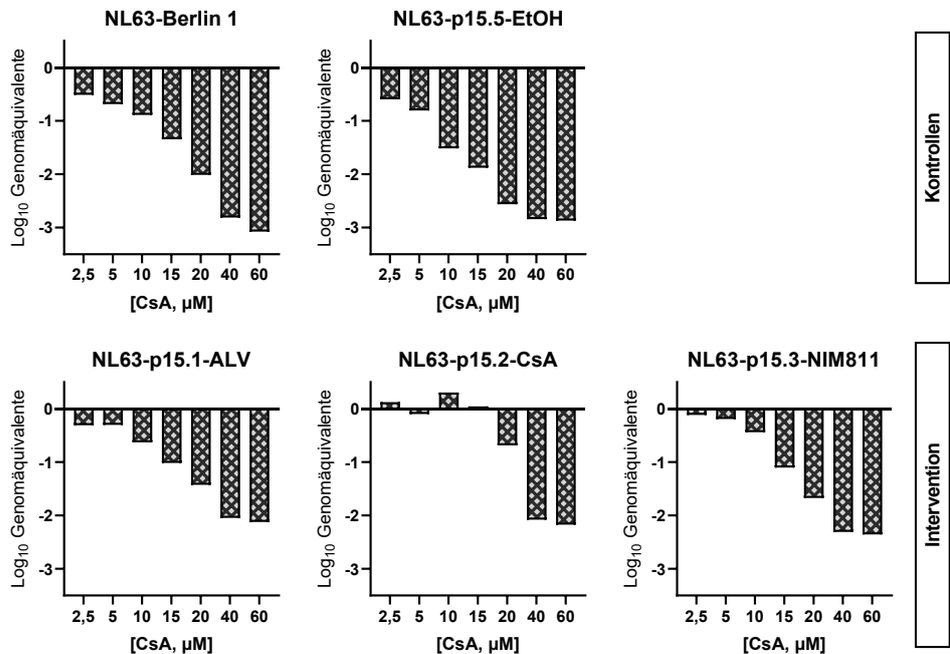


Abb. 25: Darstellung der relativen Reduktion von NL63-Genomäquivalenten von Passage 15 Viruspopulationen des zweiten Passageexperimentes unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors Cyclosporin A (CsA). Die Reduktion ist in auf einer Log₁₀-Skala aufgetragen.

NL63-Passageexperiment 2: Sensibilitätstestung gegenüber NIM811

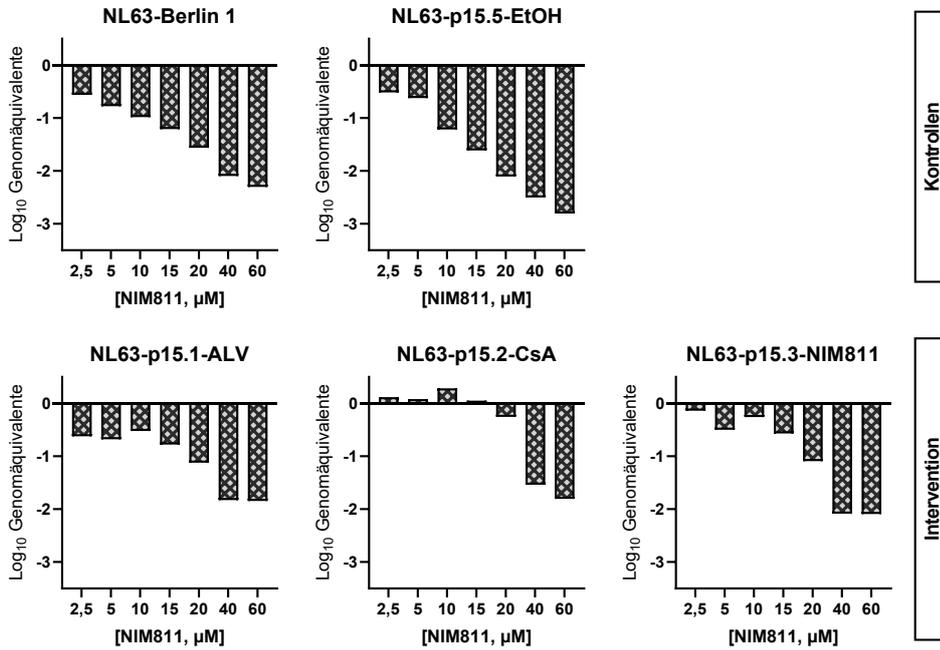


Abb. 26: Darstellung der relativen Reduktion von NL63-Genomäquivalenten von Viruspopulationen aus Passage 15 des zweiten Passageexperimentes unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen des Inhibitors NIM811. Die Reduktion ist in auf einer Log₁₀-Skala aufgetragen.

NL63-Passageexperiment 2: IC₅₀-Werte der verschiedenen Inhibitoren gegenüber den Viruspopulationen

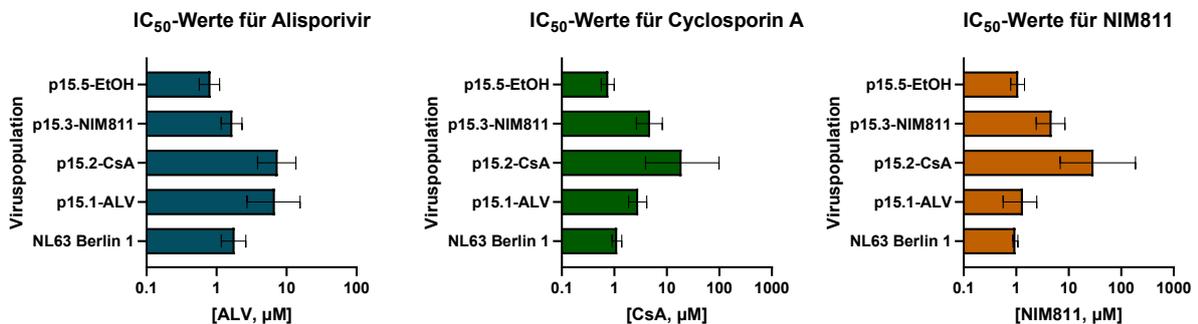


Abb. 27: IC₅₀-Werte der NL63-Viruspopulationen nach Abschluss von Passageexperiment 2 für die Inhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA) und NIM811. Für jeden Inhibitor sind die Werte in einem eigenen Graphen auf einer Log₁₀-Skala aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen das 95 %-Konfidenzintervall dar.

3.1.3 Passageexperiment 3

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Passageexperimenten wurde das Passageexperiment 3 in drei parallellaufenden Sets A, B und C durchgeführt. Jede Viruspopulation aus jedem Set wurde im Anschluss an die Passagierung zusammen mit dem Ausgangsstock NL63 2020-1 auf ihre Sensitivität gegenüber den Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 getestet.

In den Abbildungen 29 ff. ist die Sensitivität der Viruspopulationen, zusammengefasst nach der jeweiligen Intervention, anhand der log₁₀-Reduktion der Genomäquivalente dargestellt. Abb. 29 zeigt die Reduktion der Genomäquivalente der NL63-Replikation gegenüber ALV, Abb. 30 entsprechend gegenüber CsA sowie Abb. 31 unter dem Einfluss von NIM811. Insbesondere im Bereich von niedrigeren Konzentrationen zeigten sich die Viruspopulationen der Interventionsgruppe gegenüber allen drei geprüften Inhibitoren deutlich resistenter als die Kontrollen. Dies konnte mittels statistischer Auswertung anhand eines One-Way ANOVA bestätigt werden. Über alle Inhibitoren hinweg präsentierten sich in der RT - qPCR in den Konzentrationen bis 20 µM signifikant mehr Genomäquivalente bei der Interventionsgruppe als in der Ursprungspopulation bzw. den Kontrollen. Bei einer Konzentration von 40 µM zeigte sich der Unterschied zwischen Intervention und Ursprungspopulation nicht mehr signifikant. Die Signifikanzniveaus sind in Tabelle 16 dargestellt, Abb. 28 zeigt die Ergebnisse in graphischer Form.

[ALV, CsA, NIM811], gepoolt	Intervention vs. Ursprungspopulation	Intervention vs. Passagekontrolle	Ursprungspopulation vs. Passagekontrolle
2,5 µM	p = 0,0459	p = 0,0053	P = 0,6336
5,0 µM	P = 0,0053	p = 0,0053	P = 0,8200
20 µM	p = 0,0326	p ≤ 0,0001	p = 0,5496
40 µM	p = 0,1299	P = 0,0058	p = 0,8942

Tabelle 16: Inhibitionsexperimente zu Passageexperiment 3. Darstellung der Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den Gruppen von Viruspopulationen.

Die Reduktion der Virusreplikation unter Einfluss der Inhibitoren, aufgeschlüsselt nach den einzelnen Populationen der drei Sets A, B und C ist im Anhang unter Kapitel 5.8 aufgeführt. Auch findet sich dort die tabellarische Auflistung der IC₅₀-Werte zu den jeweiligen Inhibitoren.

Im Folgenden sind die IC₅₀-Werte der Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 in graphischer Form dargestellt. Die ersten drei Graphen in Abb. 32 zeigen die Werte zu allen drei Sets A, B und C

zusammengefasst, während im Anschluss in Abb. 33 auch die Werte für die einzelnen Populationen aufgetragen sind.

Insgesamt zeigte sich die Replikation über alle Viruspopulationen hinweg in den Vergleichsexperimenten deutlich reduziert. So wurden in den Kontrollen der Inhibitionsexperimente gegenüber ALV Ct-Werte von durchschnittlich 23,72 (SD 1,44; minimal 20,56; maximal 25,97) nachgewiesen. Dies entsprach einer durchschnittlichen Replikationsrate von nur 2,4 %. In der Kontrolle von Passage 10 beispielsweise imponierten qPCR Ct-Werte von durchschnittlich 16,12 (SD 0,95; minimal 13,73; maximal 17,35). Experimente, welche in der Arbeitsgruppe von Brunn im Verlauf durchgeführt worden waren, zeigten eine deutlich geringere Expression des ACE-2-Rezeptors in den von der DSMZ bezogenen CaCo-2-Zellen als erwartet (AG von Brunn, unveröffentlichte Daten).

Passageexperiment 3: Vergleich der Sensitivität der Viruspopulationen gegenüber Cyclophilin - Inhibitoren ausgewählter Konzentrationen

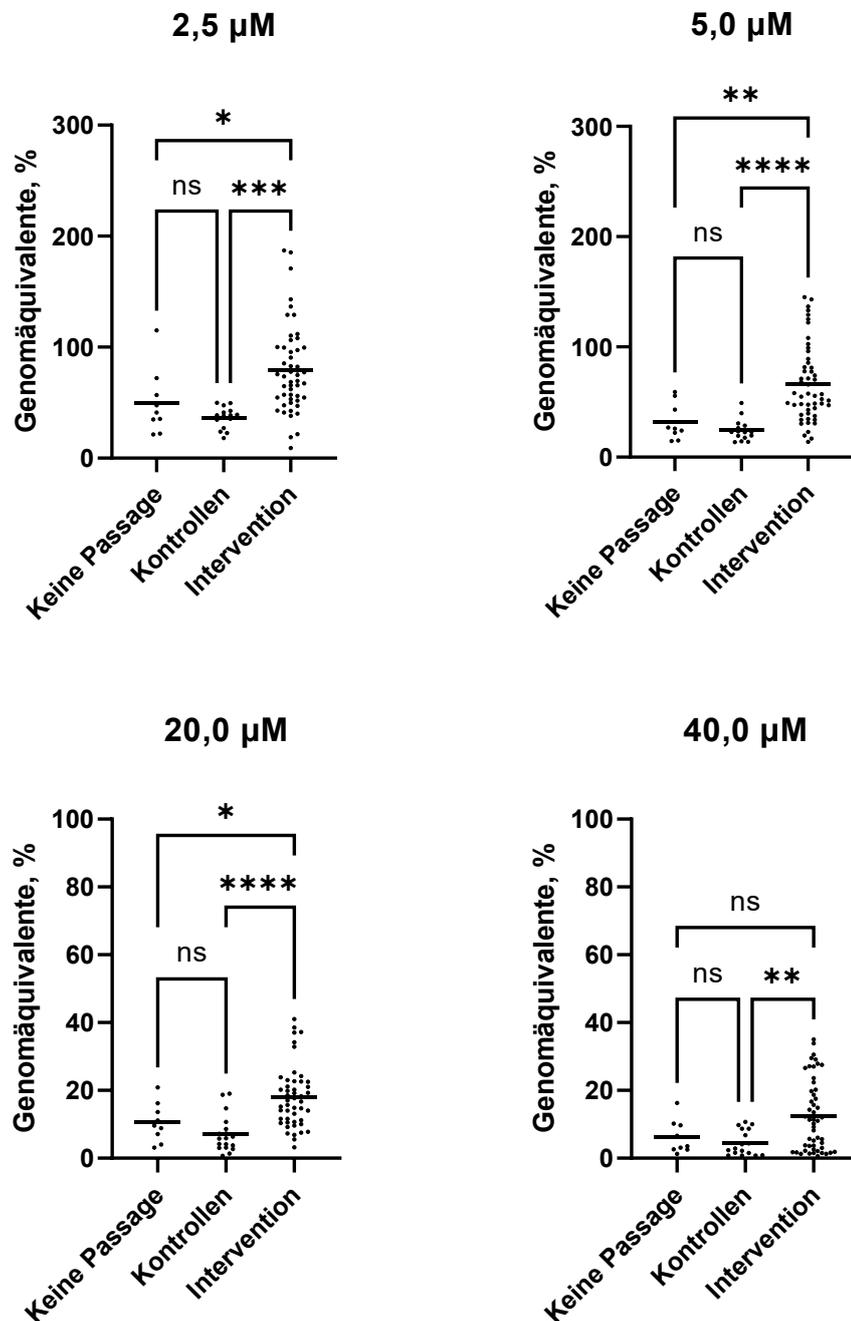


Abb. 28: Darstellung der Sensibilität von Viruspopulationen aus Passageexperiment 3. Die Werte aller Populationen sowie der drei verwendeten Inhibitoren Alisporivir, Cyclosporin A sowie NIM811 wurden zusammengefasst. Dargestellt sind die Genomäquivalente im Vergleich zur Ethanolkontrolle unter Einfluss der Konzentrationen 2,5; 5,0; 20 sowie 40 µM der eingesetzten Inhibitoren. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen ist mit Sternchen dargestellt. (ns = nicht signifikant; * ~ $P \leq 0,05$; ** ~ $p \leq 0,01$; *** ~ $p \leq 0,001$; **** ~ $p \leq 0,0001$)

NL63-Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung gegenüber Alisporivir

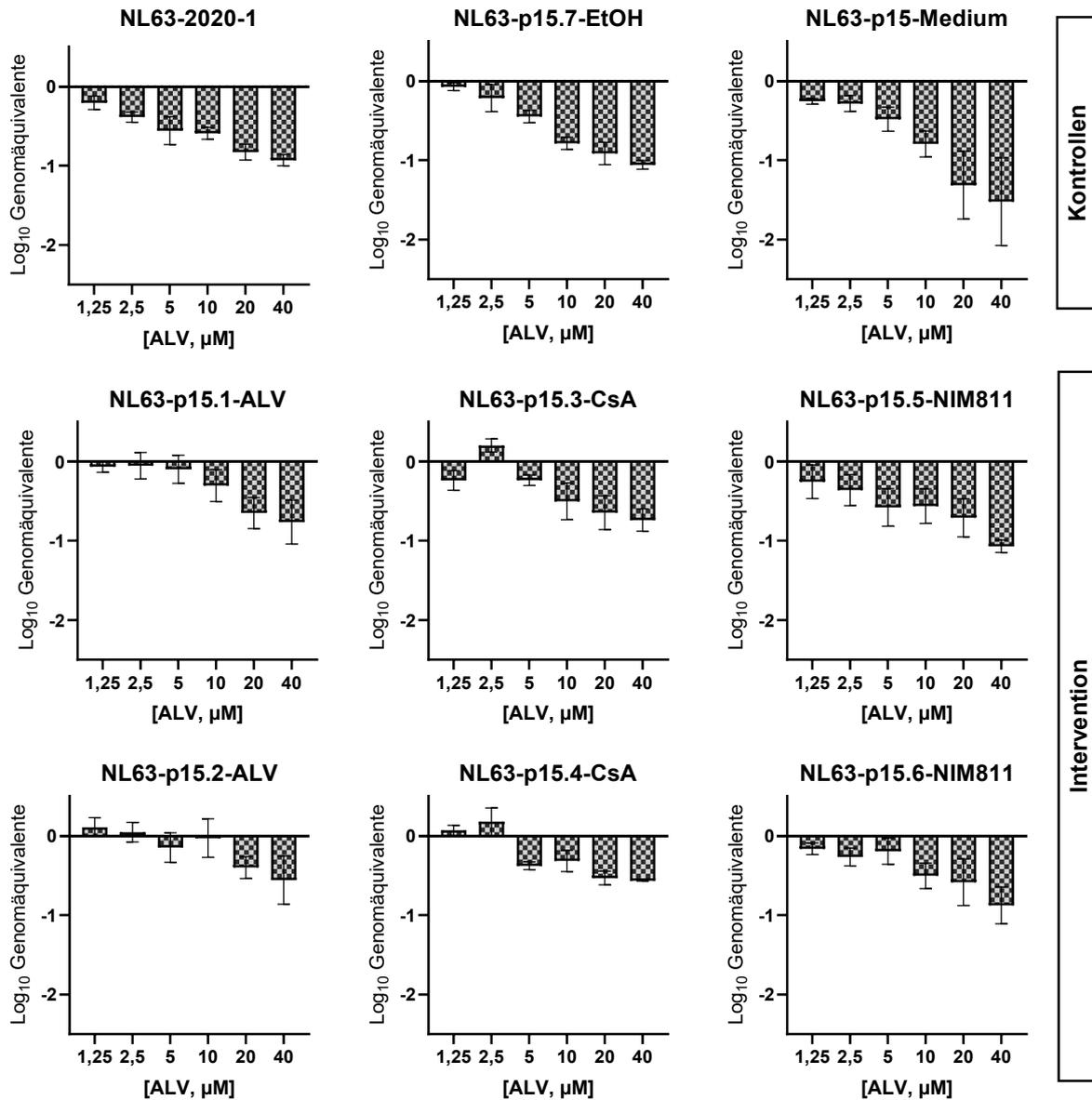


Abb. 29: Sensibilitätstestung der Viruspopulationen aus Passage 15 des Passageexperiment 3 gegenüber dem Inhibitor Alisporivir (ALV). Hier aufgetragen ist die Reduktion der viralen Replikation auf einer Log₁₀-Skala unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von ALV, sortiert nach der jeweiligen Intervention. Der Stock NL63-2020-1 diente als Ausgangsstock ohne Passage, der Name der einzelnen Passagepopulation enthält den jeweiligen Zusatz zum Kulturmedium. Die Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler des Mittelwerts (engl. SEM) an.

NL63-Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung gegenüber Cyclosporin A

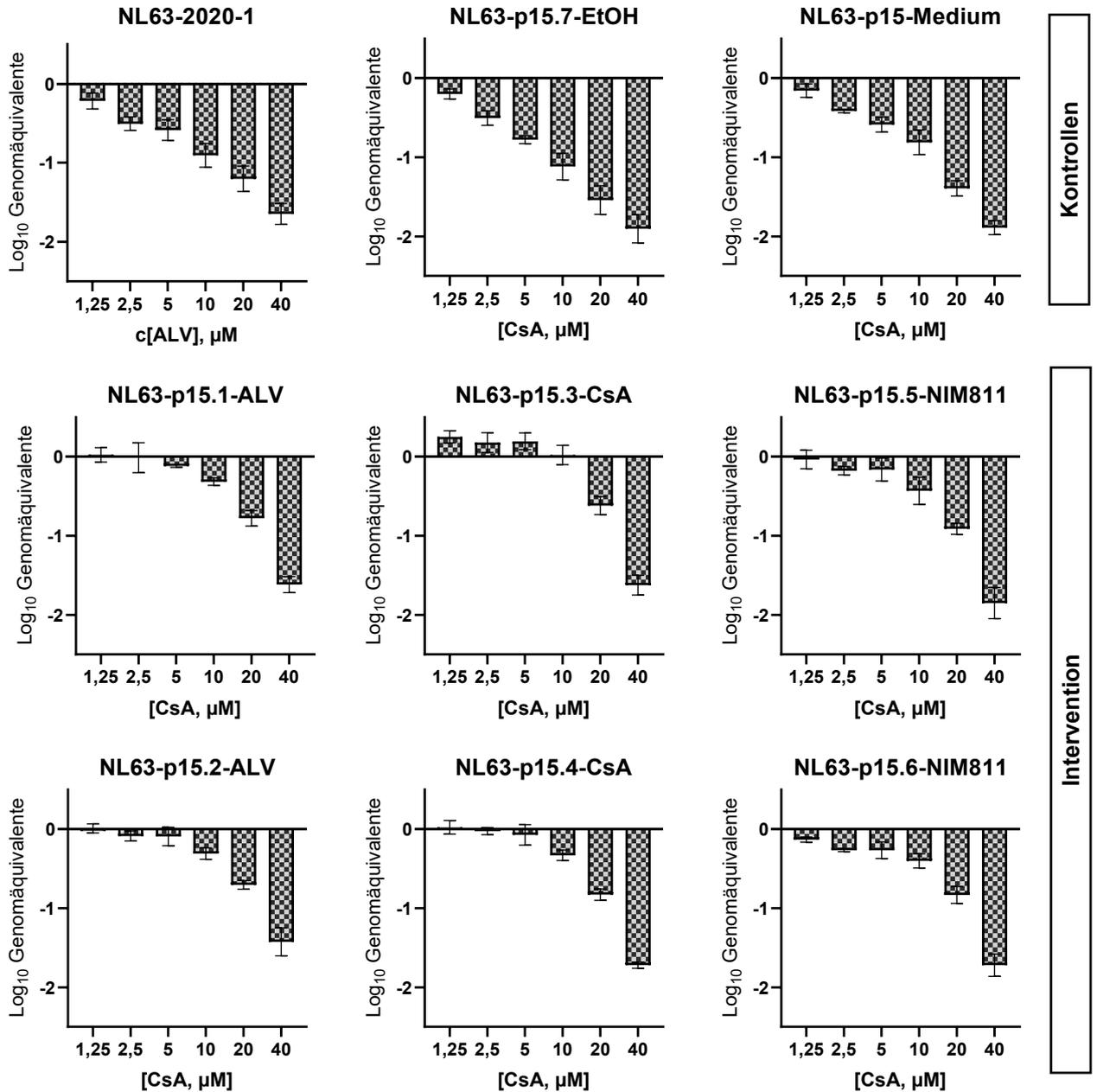


Abb. 30: Sensibilitätstestung der Viruspopulationen aus Passage 15 des Passageexperiment 3 gegenüber dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA). Hier aufgetragen ist die Reduktion der viralen Replikation auf einer Log₁₀-Skala unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von CsA, sortiert nach der jeweiligen Intervention. Der Stock NL63-2020-1 diente als Ausgangsstock ohne Passage, der Name der einzelnen Passagepopulation enthält den jeweiligen Zusatz zum Kulturmedium. Die Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler des Mittelwerts (engl. SEM) an.

NL63-Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung gegenüber NIM811

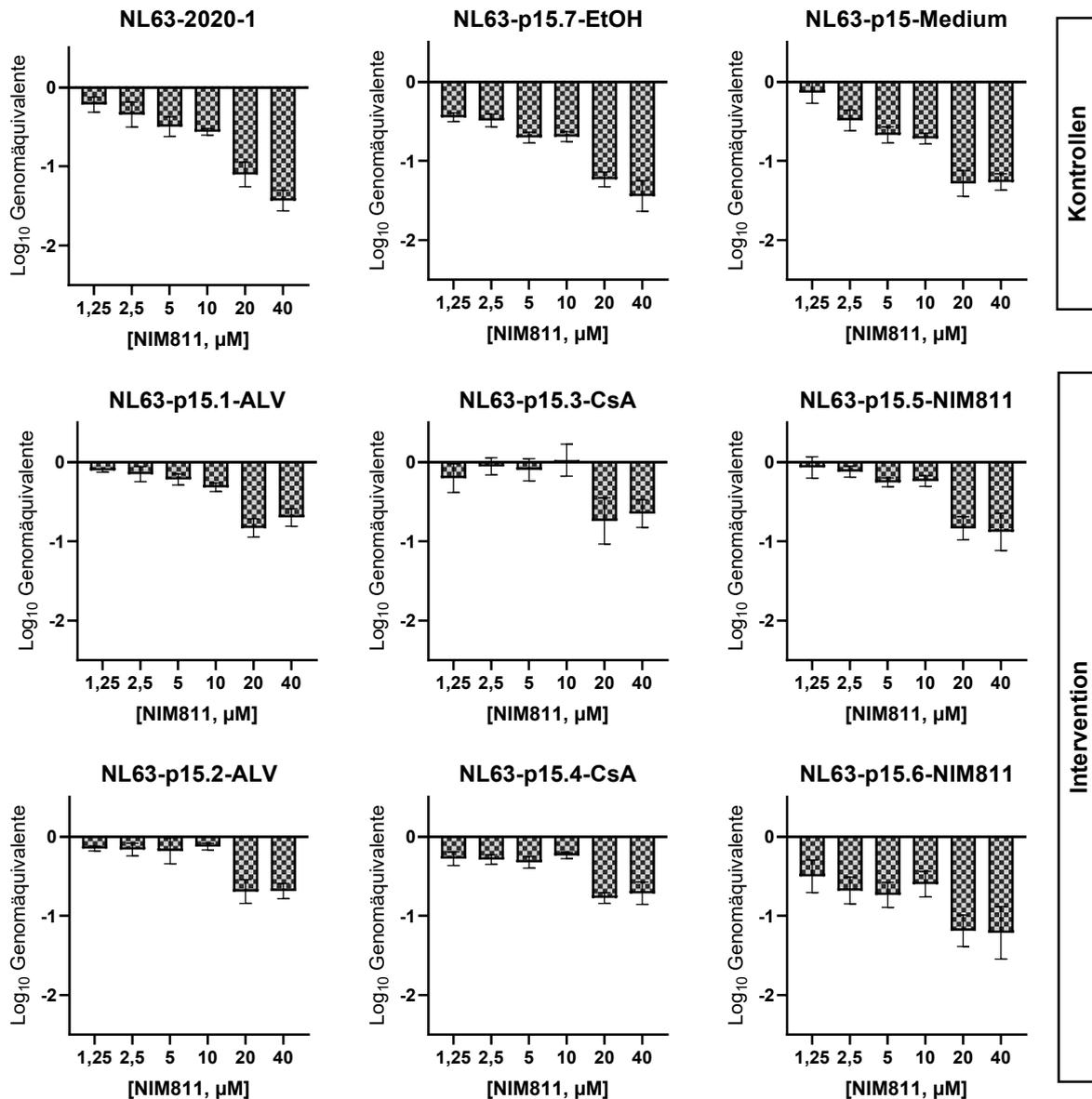


Abb. 31: Sensibilitätstestung der Viruspopulationen aus Passage 15 des Passageexperiment 3 gegenüber dem Inhibitor NIM811. Hier aufgetragen ist die Reduktion der viralen Replikation auf einer Log₁₀-Skala unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von NIM811, sortiert nach der jeweiligen Intervention. Der Stock NL63-2020-1 diente als Ausgangsstock ohne Passage, der Name der einzelnen Passagepopulation enthält den jeweiligen Zusatz zum Kulturmedium. Die Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler des Mittelwerts (engl. SEM) an.

Um die Resistenz der Viruspopulationen des dritten Passageexperimentes – wenn auch eingeschränkt – untereinander vergleichen zu können, wurden die in Tabelle 46 ff. dargestellten IC_{50} -Werte für jeden Inhibitor einzeln ins Verhältnis zum Median der Werte gesetzt. Im Anschluss wurden dann aus diesen Verhältniswerten Mittelwerte für alle drei untersuchten Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 erstellt. Hierdurch konnte dann eine Rangfolge hinsichtlich des wahrscheinlichen Resistenzlevels erstellt werden. Diese ist in Tabelle 49 dargestellt.

Passageexperiment 3: IC_{50} -Werte der Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 nach Abschluss des Passageexperimentes

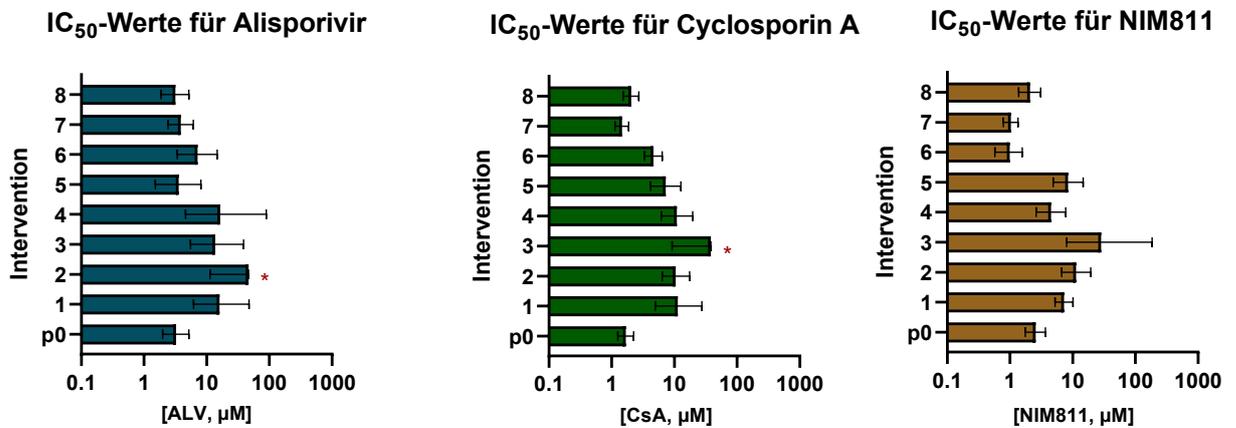


Abb. 32: Graphische Darstellung der IC_{50} -Werte der Inhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA) und NIM811, geordnet nach der Intervention. Mit p0 ist der Ausgangsstock NL63-2020-1 bezeichnet, 1 und 2 bezeichnet eine Passage in ALV, 3 und 4 eine Passage in CsA und 5 sowie 6 eine Passage in NIM811. Passage 7 ist die EtOH-Kontrolle, 8 die Kontrolle in Kulturmedium. Die Fehlerbalken bezeichnen das 95 % Konfidenzintervall. Ist ein Balken mit einem roten Stern markiert, liegt der obere Wert des 95 %-Konfidenzintervalls im Unendlichen.

Passageexperiment 3: IC₅₀-Werte der Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 nach Abschluss des Passageexperimentes, aufgeschlüsselt nach den einzelnen Populationen

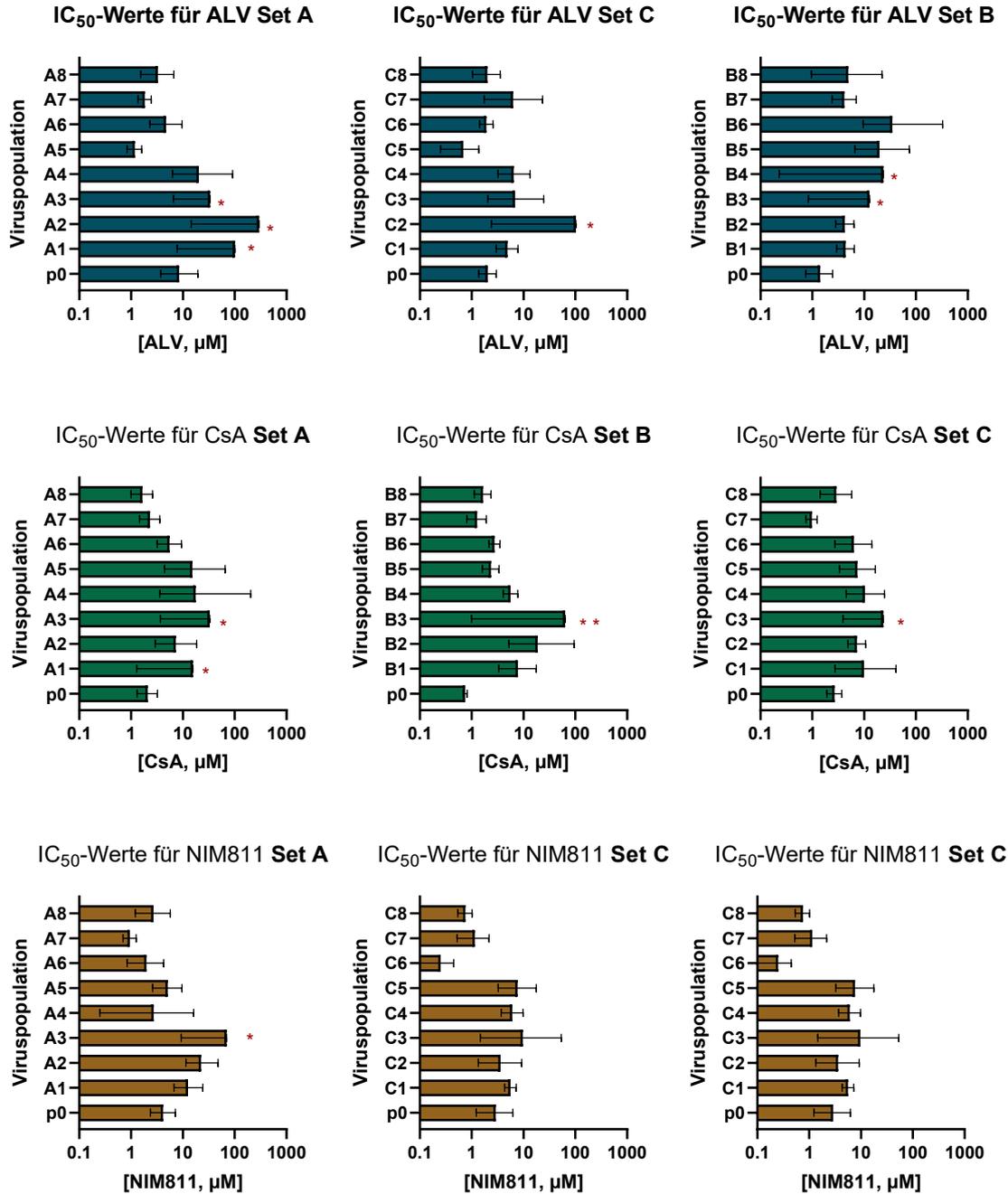


Abb. 33: Graphische Darstellung der IC₅₀-Werte der Inhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA) und NIM811, geordnet nach Population und Intervention. Die drei parallellaufenden Experimente Set A, B und C sind nebeneinander aufgetragen, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu verdeutlichen. Mit p0 ist der Ausgangsstock NL63-2020-1 bezeichnet, 1 und 2 bezeichnet eine Passage in ALV, 3 und 4 eine Passage in CsA und 5 sowie 6 eine Passage in NIM811. Passage 7 ist die EtOH-Kontrolle, 8 die Kontrolle in Kulturmedium. Die Fehlerbalken bezeichnen das 95 % Konfidenzintervall. Ist ein Balken mit einem roten Stern markiert, liegt der obere Wert des 95 %-Konfidenzintervalls im Unendlichen. Bei einer Markierung mit zwei roten Sternen konnte kein oberer Wert für das 95 %-Konfidenzintervall errechnet werden.

In Passageexperiment 3 wurden zwei verschiedene Wege für jeden der Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 in der Interventionsgruppe gewählt. Zum einen wurde in jedem Set in jedem der drei verwendeten Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 in jeder Passage die Konzentration von 10 μM angewandt (Population A1, B1, C1, A3, B3, C3 sowie A5, B5 und C5). Zum anderen waren die Viruspopulationen A2, B2, C2, A4, B4, C4, A6, B6 und C6 aufsteigenden Konzentrationen von 2,5 - 20 μM ausgesetzt. Um diese beiden Interventionsgruppen zu vergleichen, wurden die IC_{50} -Werte der Viruspopulationen jeweils in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Im Anschluss wurden dann diese relativen IC_{50} -Werte der beiden Gruppen mittels des ungepaarten t-Tests miteinander verglichen. Der Unterschied zeigte sich hierbei nicht statistisch signifikant ($p=0,5325$). Abb. 34 veranschaulicht dies graphisch.

Gegenüberstellung der relativen IC_{50} -Werte der beiden Interventionsgruppen (stabile vs. ansteigende Konzentration) aus Passageexperiment 3

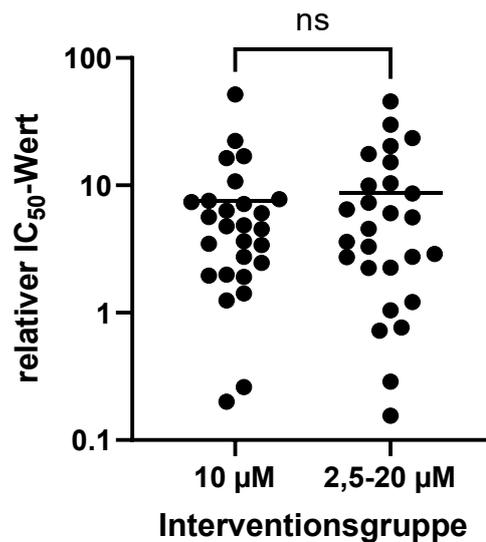


Abb. 34: Gegenüberstellung der relativen IC_{50} -Werte der beiden Interventionsgruppen aus Passageexperiment 3. Zum einen waren die Viruspopulationen einer gleichbleibenden Konzentration des Inhibitors von 10 μM ausgesetzt, die anderen Populationen standen unter dem Einfluss von aufsteigenden Konzentrationen von 2,5 μM bis 20 μM . Die Unterschiede zeigten sich statistisch nicht signifikant.

3.1.4 Zusammenfassung über drei Passageexperimente

Die für die in den drei Passageexperimenten für jede Viruspopulation ermittelten IC_{50} -Werte für ALV, CsA und NIM811 wurden dann innerhalb des jeweiligen Experiments in Relation zu denen der Kontrollen gesetzt. Das arithmetische Mittel der relativen IC_{50} -Werte für die Interventionsgruppe im Vergleich zu den Kontrollen betrug 7,85, der Median 4,56. Die Gruppen „Intervention“, „Kontrollpassage“ sowie „keine Passage“ wurden gegenübergestellt und dann die Unterschiede der IC_{50} -Werte, wie in Kapitel 2.11.4 ANOVA beschrieben, mittels ANOVA auf Signifikanz hin überprüft. Die Unterschiede zwischen „Intervention“ und „Kontrollpassage“ sowie zwischen „Intervention“ und „keine Passage“ zeigten sich signifikant ($p < 0,0001$; $p: 0,0001$), während diese zwischen „Kontrollpassage“ und „keine Passage“ nicht signifikant waren ($p: 0,9993$). In der Betrachtung der einzelnen Inhibitoren stellen sich die Unterschiede nur für CsA signifikant dar (siehe Abb. 68).

Gegenüberstellung der relativen IC_{50} -Werte aus den Passageexperimenten

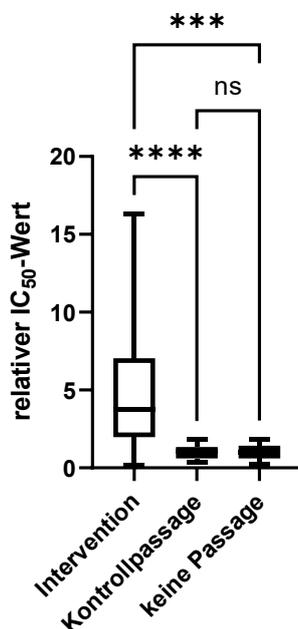


Abb. 35: Gegenüberstellung der relativen IC_{50} -Werte aus den Inhibitionsexperimenten aller drei Passageexperimente. Die relativen IC_{50} -Werte der Interventionsgruppe (Passage im Inhibitor) zeigen sich signifikant unterschiedlich zu denen der jeweiligen Kontrollpassagen und Ursprungspopulationen. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen ist mit Sternchen dargestellt (ns = nicht signifikant; *** $\sim p \leq 0,001$; **** $\sim p \leq 0,0001$). Die Balken markieren den Minimum- und Maximumwert nach Entfernen statistischer Ausreißer.

Die, im Verhältnis zu den Kontrollen, relativen IC_{50} -Werte der Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 für die Viruspopulationen der Interventionsgruppe wurden untereinander verglichen, um eventuell bestehende Unterschiede hinsichtlich einer Resistenzentwicklung gegenüber den drei verwendeten Cyclophilinhibitoren aufzudecken. In der Testung mittels ungepaarter ANOVA zeigten sich die Unterschiede nicht signifikant ($p=0,8284$). Graphisch ist dies in Abb. 36 dargestellt.

Vergleich der relativen IC_{50} -Werte von ALV, CsA und NIM811 in allen unter deren Einfluss passagierten Viruspopulationen

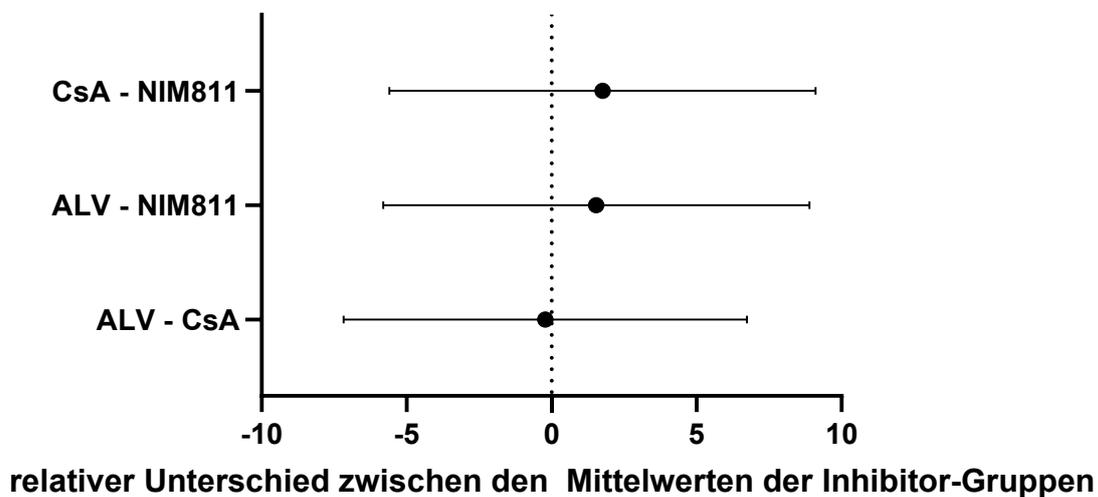


Abb. 36: Vergleich der relativen IC_{50} -Werte zu den Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 in Bezug auf die Viruspopulationen der Interventionsgruppe der drei Passageexperimente. Dargestellt sind die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Inhibitor-Gruppen, die Balken stellen das 95%-Konfidenzintervall dar. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Auch stellte sich die Frage, ob sich für die einzelnen Viruspopulationen Unterschiede hinsichtlich ihrer IC_{50} -Werte zwischen dem Inhibitor, in dem sie passagiert worden waren, sowie den anderen in den Vergleichsexperimenten verwendeten Inhibitoren ergaben. Mittels gepaartem t-Test wurden so die IC_{50} -Werte untersucht. Hier zeigten sich ein im Schnitt höherer relativer IC_{50} -Wert für die Inhibitoren, in welchen die jeweilige Population passagiert worden war (Mittelwert: 11,58, Median: 6,15) gegenüber den IC_{50} -Werten der Inhibitoren, in denen diese nicht passagiert worden waren (Mittelwert: 5,81; Median: 3,96) Die Unterschiede stellten sich in der Testung dann jedoch nicht als signifikant dar ($p=0,564$). Abb. 37 zeigt die Mittelwerte im Diagramm.

Vergleich der relativen IC₅₀-Werte des Inhibitors aus der Passage und den anderen Cyclophilin-inhibitoren

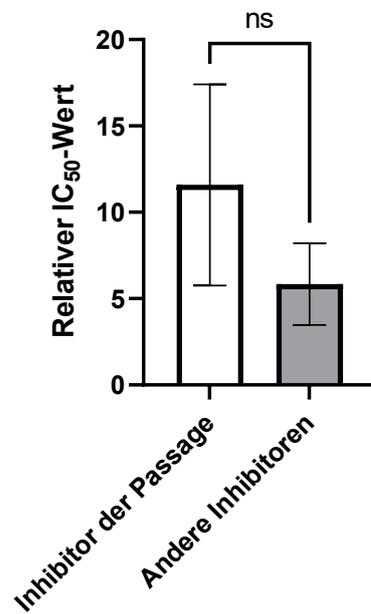


Abb. 37: Vergleich der relativen IC₅₀-Werte des Inhibitors, in dem die jeweilige NL63-Population passagiert worden war, und denen der anderen Cyclophilin-inhibitoren: Für die jeweilige Viruspopulation erschienen die berechneten IC₅₀-Werte des Inhibitors, in dem sie passagiert worden waren, durchschnittlich höher als die der anderen Inhibitoren. Der Unterschied zeigte sich jedoch in der Testung mittels gepaartem t-Test nicht signifikant (ns; $p=0,564$). Die Fehlerbalken stellen das 95 % Konfidenzintervall dar.

3.2 Ergebnisse zur viralen Fitness

3.2.1 Virale Fitness im Anschluss an Passageexperiment 1

Wie in Kapitel 2.8.11 Virale Fitness und Abhängigkeit von PPIA beschrieben, wurden die Viruspopulationen im Anschluss an das Passageexperiment 1 in zwei verschiedenen Klonen von LLC-MK2-Zellen kultiviert. Neben einem Wildtyp-Klon wurde ein homozygoter PPIA-Knockout-Klon verwendet. Hierdurch konnten sowohl die Replikationsrate der einzelnen Viruspopulationen untereinander sowie die Veränderung der Replikation bei Fehlen von PPIA in den Wirtszellen untersucht werden.

Bemerkenswerterweise stellte sich die Replikation der passagierten Viruspopulationen in PPIA-wt-Zellen heterogen und teilweise leicht erhöht gegenüber der Ausgangskontrolle p0, dann im Kontrast dazu in PPIA-Knockout-Zellen in jeder Hinsicht vermindert gegenüber p0 dar. Insgesamt zeigte sich, dass für jede Viruspopulation, auch diejenigen, welche sich weniger sensitiv gegenüber Cyclophilin-A-Inhibitoren gezeigt hatten, die Replikation unter Abwesenheit von PPIA gemindert wurde. Tabelle 17 zeigt die einzelnen Verhältnisse der Replikation der passagierten Viruspopulationen zur Population p0 sowie den Einfluss eines PPIA-Knockouts. Abb. 38 stellt dies graphisch dar (Grau: keine Passage, Rot: Passage in Inhibitor, Grün: Kontrollpassage).

Virale Fitness im Passageexperiment 1

Viruspopulation	Replikation in PPIA wt-Zellen Im Verhältnis zu p0	Replikation in PPAI KO-Zellen Im Verhältnis zu p0	Verhältnis von Replikation PPIA KO zu PPIA wt
p0wt	-	-	0,61
p25 3.1-ALV	0,64	0,38	0,36
p25 3.2-ALV	0,43	0,47	0,66
p25 3.2-CsA	1,18	0,25	0,13
p25 3.5-NIM811	0,35	0,28	0,49
p25 3.6-NIM811	2,20	0,64	0,18
p25 3.10-EtOH	1,01	0,93	0,56
p25 3.11-Medium	0,60	0,61	0,62

Tabelle 17: Virale Fitness im Passageexperiment 1: In den ersten beiden Spalten wurde die relative virale Replikation der jeweiligen Viruspopulation 72 h *post infectionem* im Verhältnis zum Ausgangsstock p0 eingetragen. Je eine Spalte repräsentiert die Replikation in PPIA-wt (LLC-MK2, Klon A2) beziehungsweise PPIA-KO (LLC-MK2, Klon C10) Zellen im Vergleich. In der letzten Spalte ist das Verhältnis der Replikation in Abwesenheit von PPIA im Vergleich zu dessen Anwesenheit für jede einzelne Viruspopulation aufgetragen. Auf die Verhältnisse der Replikation wurde durch relative Quantifizierung der Genomäquivalente in den virushaltigen Zellkulturüberständen mittels Sonden-RT-q-PCR geschlossen.

Passageexperiment 1: Virale Replikation im Verhältnis zum Ausgangsstock p0

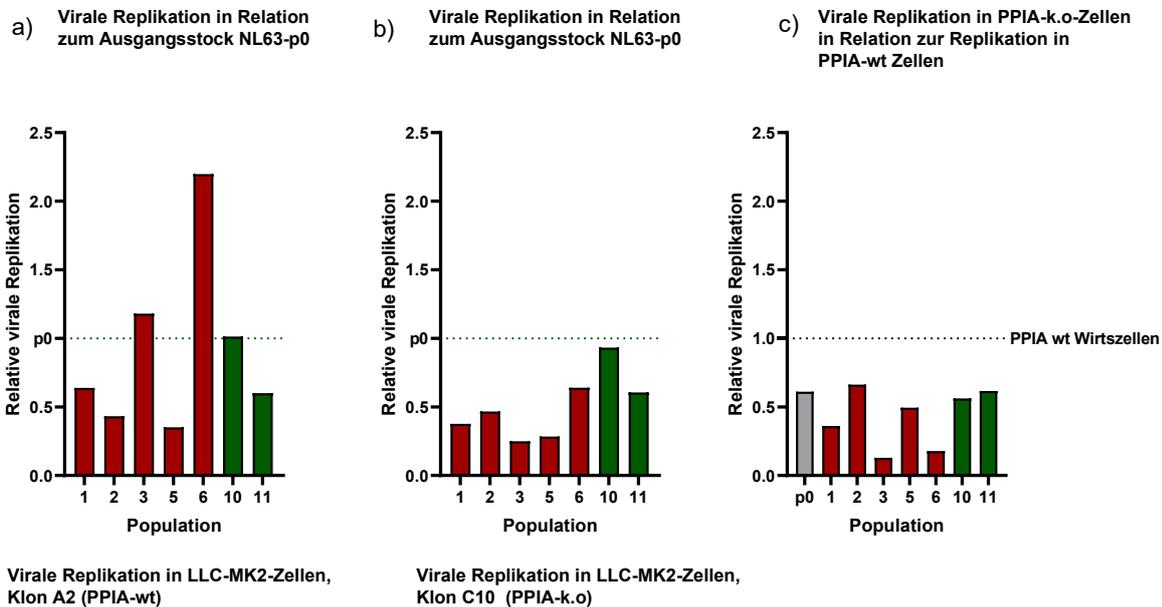


Abb. 38: Passageexperiment 1: a) und b): Darstellung der relativen viralen Replikation der Viruspopulationen aus Passage 25|3 im Verhältnis zur Kontrolle p0. a) zeigt die Replikation in Cyclophilin A (PPIA)- Wildtyp-Zellen, b) die Replikation in PPIA-Knockout-Zellen. Im Graph c) ist das Verhältnis der Replikation der jeweiligen Population zwischen der Kultivierung PPIA-wt und k.o. – Wirtszellen aufgetragen. Die Populationen sind nummeriert (1+2: Passage in ALV, 3: Passage in CsA; 5,6: Passage in NIM811; 10: EtOH-Kontrolle; 11: Medium-Kontrolle. Rote Balken beschreiben die Populationen der Interventionsgruppe, grüne die Kontrollen.

3.2.2 Virale Fitness im Anschluss an Passageexperiment 2

Die Viruspopulationen aus Passageexperiment 2 wurden ein weiteres Mal ohne Inhibitoren passagiert, um eventuell noch vorhandene Reste in den Inokula auszuschließen. Dann wurden die Viruspopulationen in CaCo-2-Zellen im Sechs-Loch-Format kultiviert. Dieses Format machte es möglich, Überstände an mehreren Tagen in Folge abzunehmen, ohne die Replikation der Viren dabei relevant zu beeinflussen. Die virale Replikation im Vergleich zum Ausgangsstock zeigte sich dabei heterogen, wobei die Population p16.3 (passagiert in NIM811) die geringste Replikation aufwies. Die einzelnen Verhältnisse der Replikation im Vergleich zum Inokulum sind in Tabelle 18 einzeln aufgeführt, in Abb. 39 wird dies veranschaulicht. Gleichzeitig nahm die relative Replikation aller passagierten Viruspopulationen im Vergleich zum Ausgangsstock über die drei Tage des Experiments ab, wobei sich dieser Effekt der Passage in der EtOH-Kontrolle am geringsten zeigte. In Tabelle 19 finden sich die einzelnen Werte, in Abb. 40 die graphische Darstellung dieses Effekts.

Virale Fitness in Passageexperiment 2: Relative Virale Replikation über 72 Stunden post infectionem

Zeitpunkt post infectionem	Viruspopulation				
	Berlin 1	p16.1-ALV	p16.2-CsA	p16.3-NIM811	p16.5-EtOH
24 h	0,34	0,35	0,38	0,13	0,44
48 h	2,74	2,76	1,46	0,63	2,92
72 h	11,01	4,23	3,80	0,71	7,13

Tabelle 18: Virale Fitness in Passageexperiment 2: Diese Tabelle zeigt das Verhältnis der Genomäquivalente im Überstand zu denen des Inokulums zum jeweiligen Zeitpunkt post infectionem. (NL63 Berlin 1: keine Passage; p16.1 Passage in ALV, p16.2 Passage in CsA; p16.3 Passage in NIM811, p16.5 Passage in EtOH (max. 0,15 %).

Passageexperiment 2: Relative virale Replikation über 72 Stunden

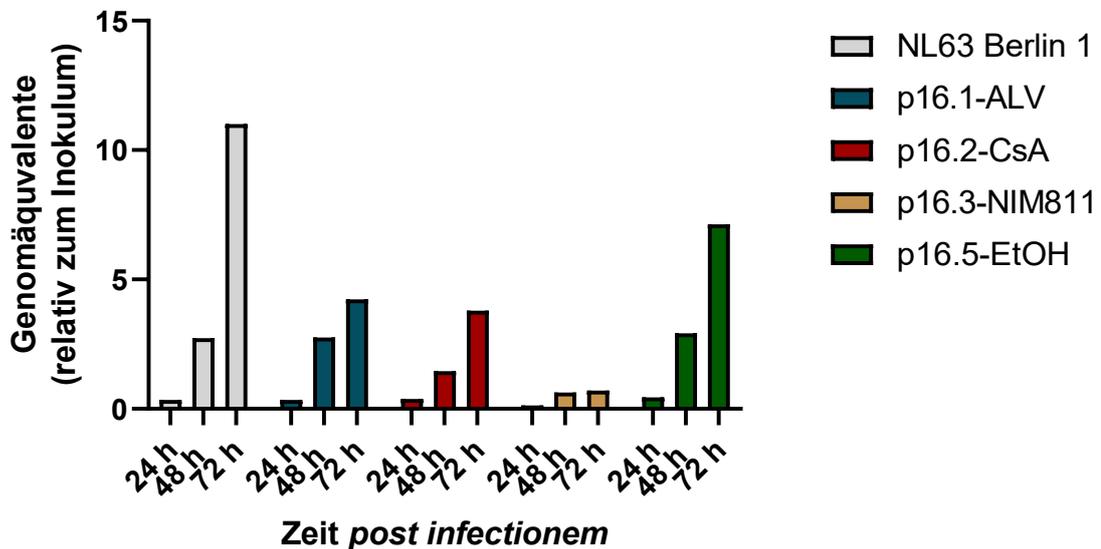


Abb. 39: Virale Fitness in Passageexperiment 2: Der Graph zeigt das Verhältnis der Genomäquivalente im Überstand zum jeweiligen Zeitpunkt post infectionem zu denen im Inokulum. (NL63 Berlin 1: keine Passage; p16.1 Passage in ALV, p16.2 Passage in CsA; p16.3 Passage in NIM811, p16.5 Passage in EtOH (max. 0,15 %))

Virale Fitness in Passageexperiment 2: Virale Replikation in Bezug auf NL63 Berlin 1

Zeitpunkt post inf.	Viruspopulation			
	p16.1-ALV	p16.2-CsA	p16.3-NIM811	p16.5-EtOH
24 h	1,02	1,11	0,37	1,29
48 h	1,01	0,53	0,23	1,07
72 h	0,38	0,34	0,06	0,65

Tabelle 19: Virale Fitness in Passageexperiment 2: Virale Replikation in Bezug auf NL63 Berlin 1: Diese Tabelle zeigt das Verhältnis der in Tabelle 18 beschriebenen viralen Replikationsrate der passagierten Viruspopulationen im Verhältnis zum Ausgangsstock NL63 Berlin 1, gemessen anhand von Genomäquivalenten im Zellkulturüberstand nach 24, 48 sowie 72 Stunden. (NL63 Berlin 1: keine Passage; p16.1 Passage in Alisporivir, p16.2 Passage in CsA; p16.3 Passage in NIM811, p16.5 Passage in EtOH (max. 0,15 %)

Virale Replikation in Relation zum Ausgangsstock NL63-Berlin 1

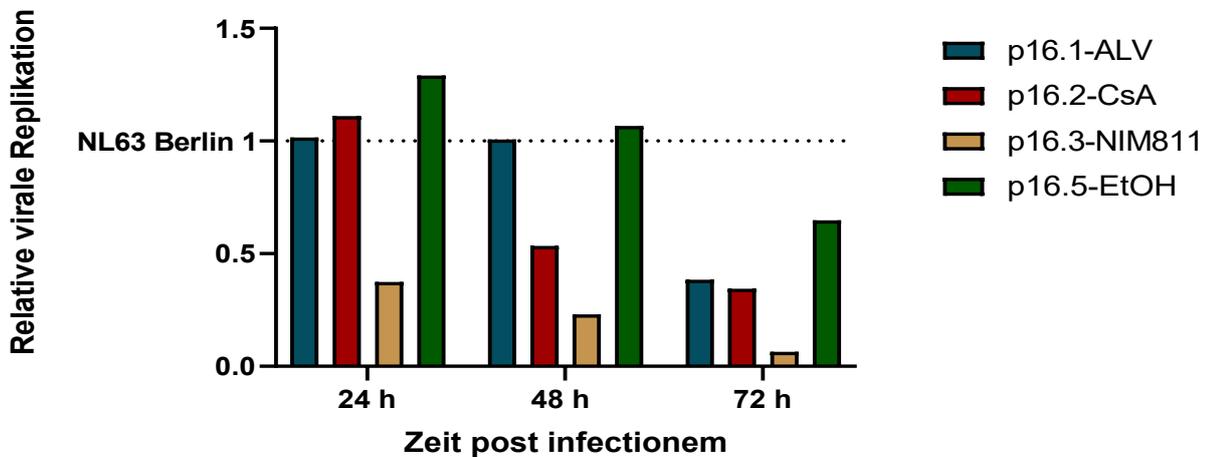


Abb. 40: Virale Fitness in Passageexperiment 2: Virale Replikation in Bezug auf NL63 Berlin 1: Dieser Graph zeigt das Verhältnis der in Tabelle 21 aufgetragenen viralen Replikation der passagierten Viruspopulationen im Verhältnis zu NL63 Berlin 1. (NL63 Berlin 1: keine Passage; p16.1 Passage in Alisporivir; p16.2 Passage in CsA; p16.3 Passage in NIM811, p16.5 Passage in EtOH (max. 0,15 %)

3.2.3 Virale Fitness im Anschluss an Passageexperiment 3

In Passageexperiment 3 wurde aufgrund der großen Zahl an Viruspopulationen die virale Fitness im Rahmen der Inhibitionsexperimente bestimmt. Hierbei wurde die Relation der Genomäquivalente in der 0,2 %-EtOH-Kontrolle 72 h post infectionem zu den Genomäquivalenten im Inokulum bestimmt. Um die Daten aus den verschiedenen Experimenten vergleichen zu können, wurde die Replikation jeweils ins Verhältnis zu der des Ausgangsstocks NL63-2020-1 gesetzt. Insgesamt zeigte sich die virale Replikation in allen passagierten Populationen im Vergleich zum Ausgangsstock deutlich erhöht. Durchschnittlich wiesen die Populationen der Interventionsgruppe die 13,8-fache, die der Kontrollpassage die 7,0-fache Replikation auf (siehe Abb. 41). Der Unterschied zwischen Intervention und Kontrolle ist statistisch signifikant ($p=0,0028$) In Abb. 42 ist in Graph a) die relative Replikation der einzelnen passagierten Populationen und in Graph b) der Mittelwert aus den der Sets A, B und C dargestellt.

Einschränkend ist anzumerken, dass die Virusreplikation unter Verwendung der in Kap. 2.10.9 beschriebenen Zellen insgesamt deutlich reduziert war. Experimente, welche in der Arbeitsgruppe im Verlauf durchgeführt worden waren, zeigten eine deutlich verminderte

Expression des ACE-2-Rezeptors in den von der DSMZ bezogenen CaCo-2-Zellen (AG von Brunn, unveröffentlichte Daten).

Passageexperiment 3: Viral Fitness

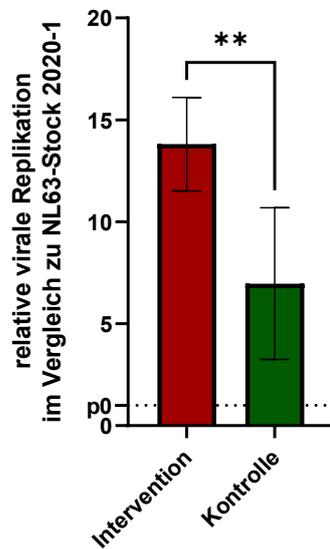
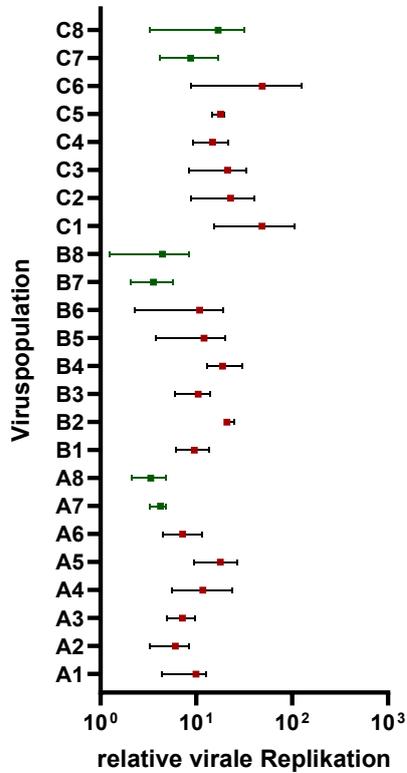


Abb. 41: Passageexperiment 3 - Virale Fitness. Zu sehen ist die durchschnittliche relative virale Replikation im Verhältnis zum Ausgangsstock NL63-2020-1 (p_0). Der rote Balken stellt die Populationen der Interventionsgruppe, der grüne die Passagekontrollen dar. Die Fehlerbalken zeigen das jeweilige 96 %-Konfidenzintervall an. Der Unterschied zwischen Intervention und Kontrollen ist statistisch signifikant ($p=0,0028$).

Virale Fitness im Passageexperiment 3 - aufgeschlüsselt

a)

Virale Replikation in Relation zum Ausgangsstock NL63-2020-1



b)

Virale Replikation in Relation zum Ausgangsstock NL63-2020-1

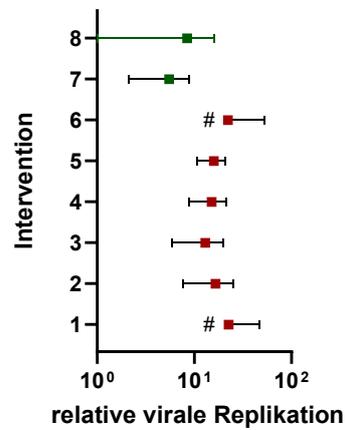


Abb. 42: Virale Fitness im Passageexperiment 3 - aufgeschlüsselt: In Graph a) ist die virale Replikation der einzelnen Populationen im Verhältnis zum Ausgangsstock der Passage aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die Populationen mit ihrer Buchstaben-Zahlenkombination verzeichnet. Der Buchstabe bezeichnet das jeweilige Set des Experiments (A, B und C), während die Zahl die Intervention kodiert. (1,2: Passage in ALV; 3,4: Passage in CsA, 5,6: Passage in NIM811; 7: EtOH-Kontrolle, 8: Medium-Kontrolle, siehe Kapitel 2.10.1 Überblick). Die Fehlerbalken zeigen die Werte von Minimum und Maximum dreier Replikate an. Graph b) zeigt die relative Replikation geordnet nach der Intervention, also die Zusammenfassung der drei erzeugten Sets A, B, C. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall an. Ein zum Nullpunkt reichender Fehlerbalken kann auf einer Log₁₀-Skala nicht angezeigt werden (mit „#“ markiert).

3.3 Ergebnisse des NGS

3.3.1 Ausgangspopulationen der Passageexperimente

Um neue Mutationen von bereits in den Ausgangspopulationen existierenden unterscheiden zu können, wurden auch deren Basensequenzen mit dem Referenzgenom [78] verglichen. Hier zeigten bereits vor Start der Passageexperimente und somit vor Kontakt der Viren mit einem der Untersuchten Inhibitoren Mutationen, teilweise mit vollständiger Penetranz. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur Mutationen, welche zu mehr als 20 % auftraten, sowie solche, die sich auch später in den Passageexperimenten zeigten, in Tabelle 20 aufgelistet. Häufig zeigten sich auch stumme Mutationen von Cytosin zu Uracil (als Thymin sequenziert). Noch erwähnenswert ist die Mutation an Position 12442, welche sowohl in allen Ausgangspopulationen als auch später noch in 18 von 38 passagierten Viruspopulationen auftrat. Sie ist durch ihre Position vom ribosomalen Rastersprung „frameshift“ an Position 12439 [78] betroffen und verursacht damit zwei verschiedene Änderungen in Nsp11 bzw. Nsp12. Der von der Mutation an Position 12442 betroffene Abschnitt kodiert für die Nidovirus RdRp-associated nucleotidyl transferase (NiRAN), eine Subdomäne des Replikasekomplexes [256].

Basenabweichung der NL63-Ausgangsstocks der drei Passageexperimente zum Referenzgenom

Nukleotid-Position im Genom	Referenz	Variante	Effekt	ORF	Protein	Mutationsfrequenz, %			
						Stock5/17	p0	Berlin 1	2020-1
327	C	T	S14L	ORF 1a	Nsp1	99,81	99,80	99,80	ident. Zu Berlin 1
2956	T	A	P890P	ORF 1a	Nsp2	99,90	99,69	99,67	ident. Zu Berlin 1
2977	T	A	A897A	ORF 1a	Nsp2	99,90	99,82	99,87	ident. Zu Berlin 1
9279	C	T	L59L	ORF 1a	Nsp5	9,96	9,31		
9948	C	T	S282F	ORF 1a	Nsp5	11,14	20,28		
10565	T	C	S185P	ORF 1a	Nsp6	99,58	99,55	99,61	ident. Zu Berlin 1
10805	C	A	L265I	ORF 1a	Nsp6	2,78	6,89	99,61	ident. Zu Berlin 1
11766	C	T	A28V	ORF 1a	Nsp9	4,39	5,62		
12442	G	T	E9D A10S	ORF 1a ORF 1b	Nsp11 Nsp12	50,78	43,35	61,98	10,9
12442	G	T	A10S	ORF 1b	Nsp12 (NiRAN)	50,78	43,35	61,98	10,9
12477	C	T	C21C	ORF 1b	Nsp12 (NiRAN)	99,89	99,90	99,84	ident. Zu Berlin 1
17621	C	T	S212F	ORF 1b	NSP14	99,90	99,87	99,71	ident. Zu Berlin 1
21162	C	T	P231S	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	99,91	99,88	99,70	ident. Zu Berlin 1
21217	T	C	S249F	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	99,90	99,86	99,89	ident. Zu Berlin 1
21390	T	G	L307V	ORF S	Spike-Protein	99,85	99,96	99,95	ident. Zu Berlin 1
21659	C	T	F396F	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)		5,32		
22783	C	T	T771I	ORF S	Spike-Protein (S2-Domäne)	3,04	6,54		
25237	T	C	L13P	ORF E	Envelope-Protein		44,48		

Tabelle 20: Mutationen in den Ausgangsstocks der Passageexperimente. Dargestellt sind die Varianten der NL63-Populationen 5/17 und p0 (Passageexperiment 1), Berlin-1 (Passageexperiment 2) sowie 2020-1 (Passageexperiment 3) vor Beginn der Experimente und damit vor Selektion in den angewandten Inhibitoren. Der Effekt der jeweiligen Mutation ist mit der Änderung der Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code) des jeweiligen Proteinabschnitts beschrieben. (ORF: Open reading frame; Nsp: Nichtstrukturprotein, NiRAN: Nidovirus RdRp-associated nucleotidyl transferase). Die Zahlen stellen die Mutationsfrequenz im Vergleich zum Referenzgenom in Prozent dar.

3.3.2 Passageexperiment 1 - NGS

Im Anschluss an das erste Passageexperiment waren im Rahmen der in Kapitel 2.12.2 beschriebenen Auswertung insgesamt 110 Mutationen identifiziert worden, die durchschnittliche Allelfrequenz, also der Anteil der abweichenden Sequenzen an denen der Gesamtheit der untersuchten Probe, betrug 27,4 %. Es traten 21 Mutationen mit einer Allelfrequenz von über 80 % in mindestens einer der jeweils betroffenen Populationen auf. Diejenigen Mutationen, welche in Summe zu mindestens 50 % auftraten, sind im Anhang in Tabelle 50 aufgeführt. Mutationen der Interventionsgruppe betrafen hierbei gehäuft das Nsp1, das Nsp4 sowie das Spike-Protein. Eine Auswahl ist in der folgenden Tabelle 21 aufgeführt.

Insgesamt traten im Passageexperiment 1 durchschnittlich $2,92E-04$ Basensubstitutionen pro Nukleotid ($s.n^{-1}$) auf (kleinster Wert: $1,92E-04$; höchster Wert: $4,01E-04$). In Tabelle 22 sind die Werte für jede Viruspopulation aufgelistet.

Häufige Mutationen der Interventionsgruppe in Passageexperiment 1

Position im Genom	Referenz	Variante	Effekt	ORF	Protein
356	C	T	P24S	ORF 1a	Nsp1
360	C	T	S25F	ORF 1a	Nsp1
515	C	T	P77S	ORF 1a	Nsp1
573	A	G	Y96C	ORF 1a	Nsp1
8373	A	G	D234G	ORF 1a	Nsp4
8502	T	C	I277T	ORF 1a	Nsp4
8851	G	T	E393D	ORF 1a	Nsp4
15081	T	G	N889K	ORF 1b	Nsp12
19262	C	T	T241I	ORF 1b	Nsp15
20842	T	C	F124S	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)
21621	T	G	F384V	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)
21937	C	T	A489V	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)
22348	A	C	N626T	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)
23445	A	G	S992G	ORF S	Spike-Protein (S2-Domäne)
24462	C	T	T1331I	ORF S	Spike-Protein (S2-Domäne)

Tabelle 21: Passageexperiment 1: Mutationen der Interventionsgruppe, also der Populationen, die unter dem Einfluss von ALV, CsA oder NIM811 passagiert worden waren, welche mit hoher Frequenz aufgetreten waren. Der Effekt der jeweiligen Mutation ist mit der Änderung der Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code) des jeweiligen Proteinabschnitts beschrieben. (ORF: Open reading frame; Nsp: Nichtstrukturprotein)

Basenaustausche pro Nukleotid im Passageexperiment 1

Viruspopulation	s.n ⁻¹
p25 3.1-ALV	3,32E-04
p25 3.2-ALV	2,95E-04
p25 3.2-CsA	3,11E-04
p25 3.5-NIM811	2,68E-04
p25 3.6-NIM811	4,01E-04
p25 3.10-EtOH	1,92E-04
p25 3.11-Medium	2,46E-04

Tabelle 22: Aufgeführt sind die Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) für die jeweilige Viruspopulation aus dem Passageexperiment 1.

Über alle Mutationen hinweg wurde die Häufigkeit von Missense-Mutationen in Abhängigkeit der Anzahl an Nukleotiden eines bestimmten Genomabschnittes bestimmt. Dies geschah getrennt für Mutationen, welche sich ausschließlich oder zu $\geq 5\%$ in Kontrollen fanden, sowie für diejenigen, die nur der Interventionsgruppe zugeordnet waren. Die sich hieraus ergebenden Werte wurden dann wiederum ins Verhältnis zum höchsten im Passageexperiment 1 vorkommenden gesetzt, um so die relative Dichte zu erhalten. Die relative Mutationsdichte ist in Zahlen in Tabelle 51 aufgeführt. Einen Überblick zeigt die graphische Darstellung als Heatmap in Abb. 43. Hier fällt insbesondere die Häufung von Mutationen im für das Nsp1 codierenden Bereich des Genoms ins Auge, welche nur in der Interventionsgruppe auftritt. Eine Häufung von Mutationen trat ebenfalls im ORF E auf, diese betraf dann auch die Kontrollgruppe.

Passageexperiment 1: Relative Dichte von Missense - Mutationen

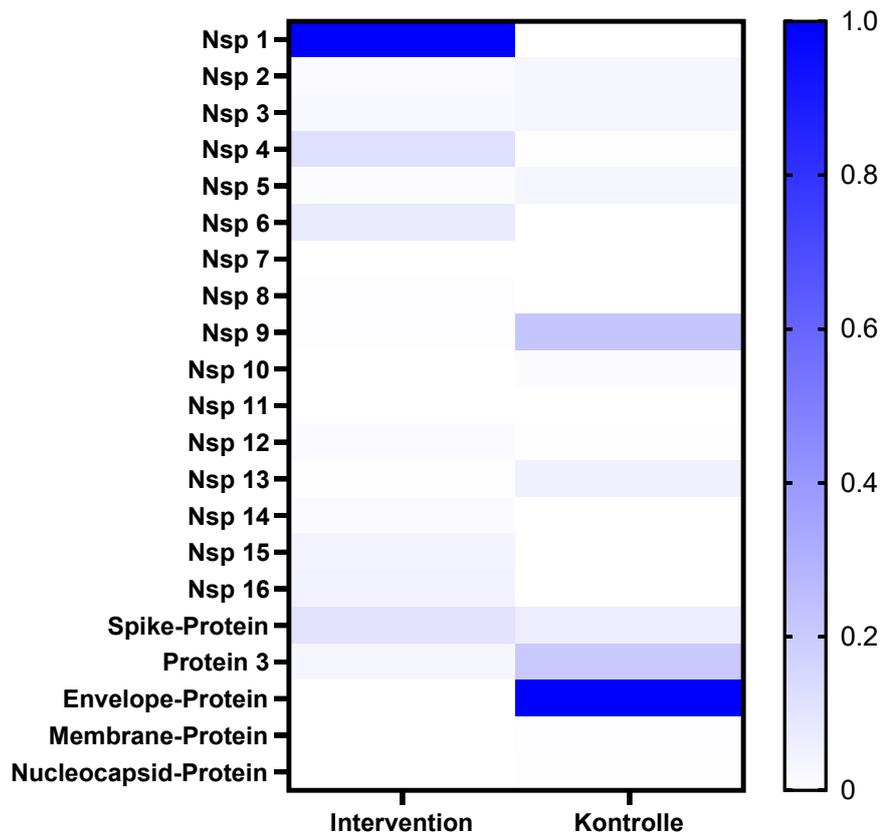


Abb. 43: Passageexperiment 1: Relative Dichte von Missense-Mutationen, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventions- bzw. Kontrollgruppe. Die Zeilen zeigen jeweils das Protein an, für den der jeweilige Abschnitt im Genom codiert (Nsp = Nichtstrukturprotein). In der Interventionsgruppe zeigt sich eine relative Häufung von Mutationen im für das Nsp1 codierenden Abschnitt.

3.3.3 Passageexperiment 2 - NGS

Die NGS-Rohdaten aus dem Passageexperiment 2 wurden, wie in Kapitel 2.12.2 beschrieben, analysiert. Hierbei konnten 53 Mutationen identifiziert werden. In Tabelle 52 sind die 30 Mutationen mit der höchsten Allelfrequenz innerhalb einer passagierten Population aufgelistet. Insgesamt zeigten sich weniger Mutationen als in Passageexperiment 1, jedoch erschienen diese dann mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 27,8 % ähnlich häufig. Von den 53 Mutationen zeigten 9 eine Allelfrequenz von über 80 % in jeweils mindestens einer Viruspopulation. Die häufigsten Missense-Mutationen der Interventionsgruppe sind mit ihrer Auswirkung im Folgenden unter Tabelle 23 aufgelistet.

Position im Genom	Referenz	Variante	Effekt	ORF	Protein
522	C	T	S79F	ORF 1a	Nsp1
8265	C	T	T198I	ORF 1a	Nsp4
22482	A	G	N671D	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)
22593	T	G	L708V	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)
24382	C	T	S1304F	ORF S	Spike-Protein (S2-Domäne)
24393	G	T	V1308F	ORF S	Spike-Protein (S2-Domäne)
24665	C	T	L42F	ORF 3	Protein 3
25222	A	C	D8A	ORF E	Envelope-Protein
25242	T	C	S15P	ORF E	Envelope-Protein

Tabelle 23: Passageexperiment 2: Mutationen der Interventionsgruppen, welche mit hoher Frequenz aufgetreten waren. Zur Interventionsgruppe gehörten die den Inhibitoren ALV, CsA oder NIM811 ausgesetzten Populationen. Der Effekt der jeweiligen Mutation ist mit der Änderung der Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code) des jeweiligen Proteinabschnitts beschrieben. (ORF: Open reading frame; Nsp: Nichtstrukturprotein)

Die Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) wurden sowohl für die Populationen aus Passage 10 als auch Passage 15 berechnet. In Passage 10 traten durchschnittlich $9,97E-05$ s.n-1 auf (minimal $5,39E-05$ s.n-1, maximal $1,45E-04$ s.n-1), bis zur Passage 15 stieg der Wert auf im Mittel $1,89E-04$ s.n-1 an (kleinster Wert: $1,26E-04$ s.n-1, größter Wert: $2,32E-04$ s.n-1). Tabelle 24 zeigt die einzelnen Werte auf. Die Unterschiede der Basenaustauschfrequenz zwischen Passage 10 und Passage 15 wurden mittels gepaartem t-Test verglichen. Diese zeigte sich hier signifikant unterschiedlich ($p=0,0445$). Graphisch zeigt Abb. 44 die Unterschiede an.

Basenaustausche pro Nukleotid im Passageexperiment 2

Viruspopulation	Passage 10, s.n ⁻¹	Passage 15, s.n ⁻¹
1-ALV	9,00E-05	1,84E-04
2-CsA	1,45E-04	2,32E-04
3-NIM811	1,10E-04	1,26E-04
5-EtOH	5,39E-05	1,90E-04
6-Medium	-	2,14E-04

Tabelle 24: Aufgeführt sind die Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) für die jeweilige Viruspopulation der Passagen 10 und 15 aus dem Passageexperiment 2. Population 6 wurde in Passage 10 nicht sequenziert.

Estimation Plot: Gepaarter t-Test

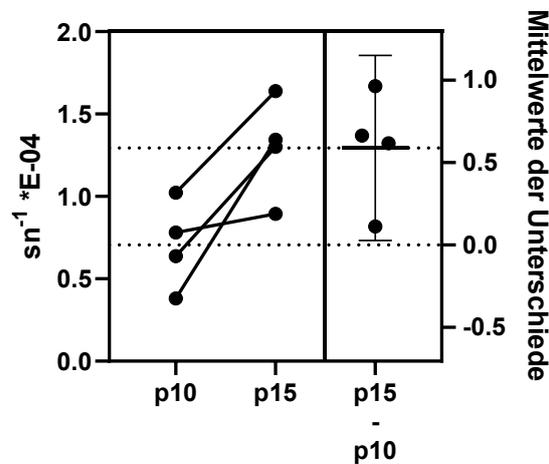


Abb. 44: Estimation Plot zum Gepaarten t-test der Basensubstitutionsfrequenz (s.n-1). Verglichen wurden die Werte der Populationen aus Passage 10 und Passage 15.

Auch wurde, wie für das Passageexperiment 2, die Häufigkeit von Missense-Mutationen in Abhängigkeit der Anzahl an Nukleotiden eines bestimmten Genomabschnittes bestimmt. Dies geschah sowohl für Passage 10 als auch Passage 15 getrennt für Mutationen, welche sich nur oder zu $\geq 5\%$ in Kontrollen fanden, sowie für diejenigen, die nur der Interventionsgruppe zugeordnet waren. Die sich hieraus ergebenden Werte wurden dann wiederum ins Verhältnis zum höchsten der in der jeweiligen Passage vorkommenden gesetzt, um so die relative Dichte zu erhalten. Die relative Mutationsdichte ist in Zahlen in Tabelle 53 aufgeführt. Einen Überblick zeigt die graphische Darstellung als Heatmap in Abb. 45. Eine Häufung von Mutationen im für das Nsp1 codierenden Bereich, welche nur in der Interventionsgruppe auftritt, zeigt sich hier erst in Passage 15. Eine Konzentration von Mutationen trat ebenfalls im ORF E auf, diese betraf sowohl die Interventions- als auch die Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe imponierte eine Häufung in der 5'UTR, welche sich am Anfang des NL63-Genoms befindet.

Passageexperiment 2: Relative Dichte von Missense - Mutationen im Vergleich

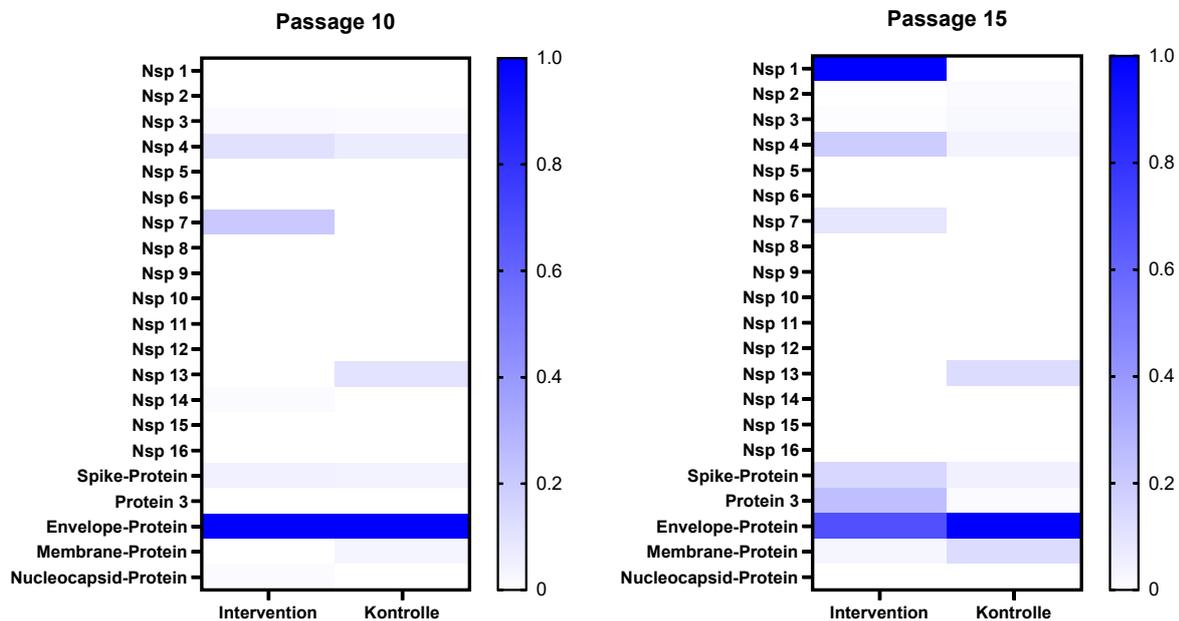


Abb. 45: Passageexperiment 2: Relative Dichte von Missense-Mutationen in Passage 10 bzw. 15, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventions- bzw. Kontrollgruppe. Die Zeilen zeigen jeweils das Protein an, für das der jeweilige Abschnitt im Genom codiert (Nsp = Nichtstrukturprotein). In der Interventionsgruppe zeigt sich in Passage 15 eine relative Häufung von Mutationen im für das Nsp1 codierenden Abschnitt. Das für das Envelope-Protein codierende ORF E stellt in beiden Gruppen einen Mutationsschwerpunkt dar.

3.3.4 Passageexperiment 3 – NGS

Die Rohdaten des NGS aus Passageexperiment 3 wurden entsprechend Kapitel 2.12.3 aufbereitet. Insgesamt flossen 244 Mutationen in den Viruspopulationen in die Bewertung ein. Durchschnittlich traten diese mit einer Allelfrequenz von 20,5 % in den betroffenen Populationen etwas seltener auf als diejenigen im Anschluss an die Passageexperimente 1 und 2 bestimmten Mutationen, zudem traten mit 15 Mutationen anteilig weniger mit einer sehr hohen Allelfrequenz von über 80 % innerhalb einer Population auf.

Durch die sich zu den für die vorhergehenden Passageexperimenten unterscheidende Sequenziermethode konnten in Passageexperiment 3 auch Insertionen sowie Deletionen aus den generierten Datensätzen untersucht werden. Es zeigten sich 57 Mutationen, welche durch Insertion oder Deletion eine Verschiebung im Leseraster der Basentriplets zur Folge hatten. Aufgrund der nur schwer vorhersagbaren Konsequenz für die Translation der dadurch

entstandenen mutierten Virusgenome, wird auf diese Insertionen und Deletionen im Folgenden weniger intensiv Bezug genommen. Zu erwähnen ist allerdings Population A5 (passagiert in 10 μ M NIM811), in welcher mit insgesamt zehn Rasterschubmutationen die meisten dieser Art auftraten. Es konnten zwei Nonsense-Mutationen nachgewiesen werden, von denen eine, an Position 13222 im NL63-Genom, mit höherer Allelfrequenz aufkam. Diese Mutationen lagen im das Nsp12 kodierenden Abschnitt. Die Einzelheiten sind im Anhang in Tabelle 54 zu finden. Auch konnten 35 stumme Mutationen bestimmt werden, diese traten mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 13,2 % auf.

Die häufigsten Missense-Mutationen durch SNPs oder durch Deletionen, welche einen umschriebenen Einfluss auf die Aminosäuresequenz der translatierten Proteine hatten, sind in Tabelle 25 für die Interventionsgruppe und Tabelle 26 für die Kontroll- sowie Interventionsgruppe aufgeführt. In der Interventionsgruppe traten die Mutationen insbesondere im für das Nsp1 sowie für das Spike-Protein codierenden Bereich auf. Betrachtet man auch die Kontrollpopulationen, zeigen sich neben einer Häufung im ORF S und ORF M insbesondere zwei Mutationen an Position 4740 (Nsp3) sowie an Position 11766 (Nsp9). Da diese auch in anderen Passageexperimenten auftraten, werden diese weiter in Kapitel 3.3.5 beschrieben.

Über alle Mutationen hinweg wurde die Häufigkeit von Missense-Mutationen sowie Deletionen mit lokal umschriebenem Effekt in Abhängigkeit der Anzahl an Nukleotiden eines bestimmten Genomabschnittes bestimmt. Dies geschah getrennt für Mutationen, welche sich nur oder in Summe zu ≥ 5 % in Kontrollen fanden, sowie für diejenigen, die nur der Interventionsgruppe zugeordnet waren. Die sich hieraus ergebenden Werte wurden dann wiederum ins Verhältnis zum höchsten im Passageexperiment 3 vorkommenden gesetzt, um so die relative Dichte zu erhalten. Die relative Mutationsdichte ist in Zahlen in Tabelle 56 aufgeführt. Einen Überblick gibt die graphische Darstellung als Heatmap in Abb. 46. Wie bereits in den Passageexperimenten 1 und 2 zeigte sich auch hier eine Häufung an Mutationen im für das Nsp1 codierenden Genomabschnitt für die Interventionsgruppe. Ein Schwerpunkt für Mutationen der Kontrollgruppe zeigte sich im für das Nsp9 codierenden Abschnitt.

Passageexperiment 3: Am häufigsten vorkommende Mutationen in den Interventionsgruppen

Position im Genom	Referenz	Variante	Effekt	ORF	Protein	Ø AF, %	N
324	A	G	D13G	ORF 1a	Nsp1	12,4	8
360	C	A	S25Y	ORF 1a	Nsp1	21,5	2
423	C	T	A46V	ORF 1a	Nsp1	11,0	8
537	A	C	N84T	ORF 1a	Nsp1	20,0	2
858	GCAAACCTTAC TA	-	C81Y; K82L83T84N85d el	ORF 1a	Nsp3	63,4	1
11709	TTAAGCAAAA ACCTATGAAA GCTGAGGGTG ATGGTGGTG	-	K10Q11K12P13 M14K15A16E17 G18D19G20G21 V22del	ORF 1a	Nsp9	56,0	1
13222	TCACTGAACA TAAAGAAAAT TTATTCAATA	-	F270Stop	ORF 1b	Nsp12	45,3	1
14210	C	A	T591N	ORF 1b	Nsp12 (RdRP)	47,6	1
20654	T	A	N61K	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	92,0	1
21546	A	C	T359P	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	64,6	1
22281	A	G	N604D	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	19,9	3
22349	T	G	N625K	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	92,2	1
22492	T	C	I674T	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	18,0	5
23408	TA	AT	F979L, N980I	ORF S	Spike-Protein (S2-Domäne)	39,4	1
23642	A	C	Q1057H	ORF S	Spike-Protein (S2-Domäne)	41,4	1

Tabelle 25: Passageexperiment 3: Am häufigsten vorkommende Mutationen der Interventionsgruppe. Zur Interventionsgruppe gehörten die den Inhibitoren ALV, CsA oder NIM811 ausgesetzten Populationen. Aufgeführt sind die 15 am häufigsten vorkommenden Mutationen mit umschriebenem Einfluss auf die Aminosäuresequenz des betroffenen Proteinabschnitts, welche nur in der Interventionsgruppe des Passageexperiments nachzuweisen waren. Mit Ø AF ist die durchschnittliche Allelfrequenz in den betroffenen Populationen, mit N deren Anzahl bezeichnet.

Passageexperiment 3: Am häufigsten vorkommende Mutationen (mit Kontrollgruppe)

Position im Genom	Referenz	Variante	Effekt	ORF	Protein	Ø AF, %	N
4740	C	T	A587V	ORF 1a	Nsp3	70,4	24
8757	G	T	S362I	ORF 1a	Nsp4	34,2	23
11766	C	T	A28V	ORF 1a	Nsp9	66,1	23
18514	C	A	Q510K	ORF 1b	Nsp14	27,8	14
20478	C	T	L3F	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	18,2	4
21420	T	C	F317L	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	40,8	5
21733	T	C	V421A	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	73,8	4
22335	T	A	L622I	ORF S	Spike-Protein (S1-Domäne)	29,5	3
23645	A	C	Q1058H	ORF S	Spike-Protein (S2-Domäne)	77,0	17
24463	C	T	T1331I	ORF S	Spike-Protein (S2-Domäne)	15,3	10
24605	C	T	L22F	ORF 3		25,5	10
24606	T	C	L22P	ORF 3		34,3	9
25222	A	C	D8A	ORF E		75,5	3
25446	C	T	S2F	ORF M		56,2	6
26076	A	G	Q212R	ORF M		32,7	2

Tabelle 26: Passageexperiment 3: Am häufigsten vorkommende Mutationen in Kontroll- und Interventionsgruppe: Aufgeführt sind die 15 am häufigsten vorkommenden Mutationen mit umschriebenem Einfluss auf die Aminosäuresequenz des betroffenen Proteinabschnitts. Mit Ø AF ist die durchschnittliche Allelfrequenz in den betroffenen Populationen, mit N deren Anzahl bezeichnet.

Die Basenaustauschrate ($s.n^{-1}$) in Passageexperiment 3 betrug durchschnittlich $2,25 \cdot 10^{-04} s.n^{-1}$ (Minimaler Wert: $1,24 \cdot 10^{-04} s.n^{-1}$, maximaler Wert: $4,59 \cdot 10^{-04} s.n^{-1}$). Die Werte sind für die einzelnen Viruspopulationen in aufgeführt. Ein Vergleich der Sets A, B und C untereinander mittels ANOVA erbrachte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,5511$).

Basenaustausche pro Nukleotid im Passageexperiment 3

Viruspopulation	Set A, s.n ⁻¹	Set B, s.n ⁻¹	Set C, s.n ⁻¹
1-ALV	1,91E-04	2,32E-04	1,71E-04
2-ALV	1,95E-04	1,86E-04	2,75E-04
3-CsA	3,03E-04	2,57E-04	2,23E-04
4-CsA	2,29E-04	1,90E-04	2,33E-04
5-NIM811	4,59E-04	1,56E-04	2,25E-04
6-NIM811	1,24E-04	2,00E-04	1,68E-04
7-EtOH	2,82E-04	2,28E-04	2,76E-04
8-Medium	1,66E-04	2,03E-04	2,19E-04

Tabelle 27: Aufgeführt sind die Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) für die jeweilige Viruspopulation der Sets A, B und C aus dem Passageexperiment 3.

Passageexperiment 3: Relative Dichte von Missense - Mutationen

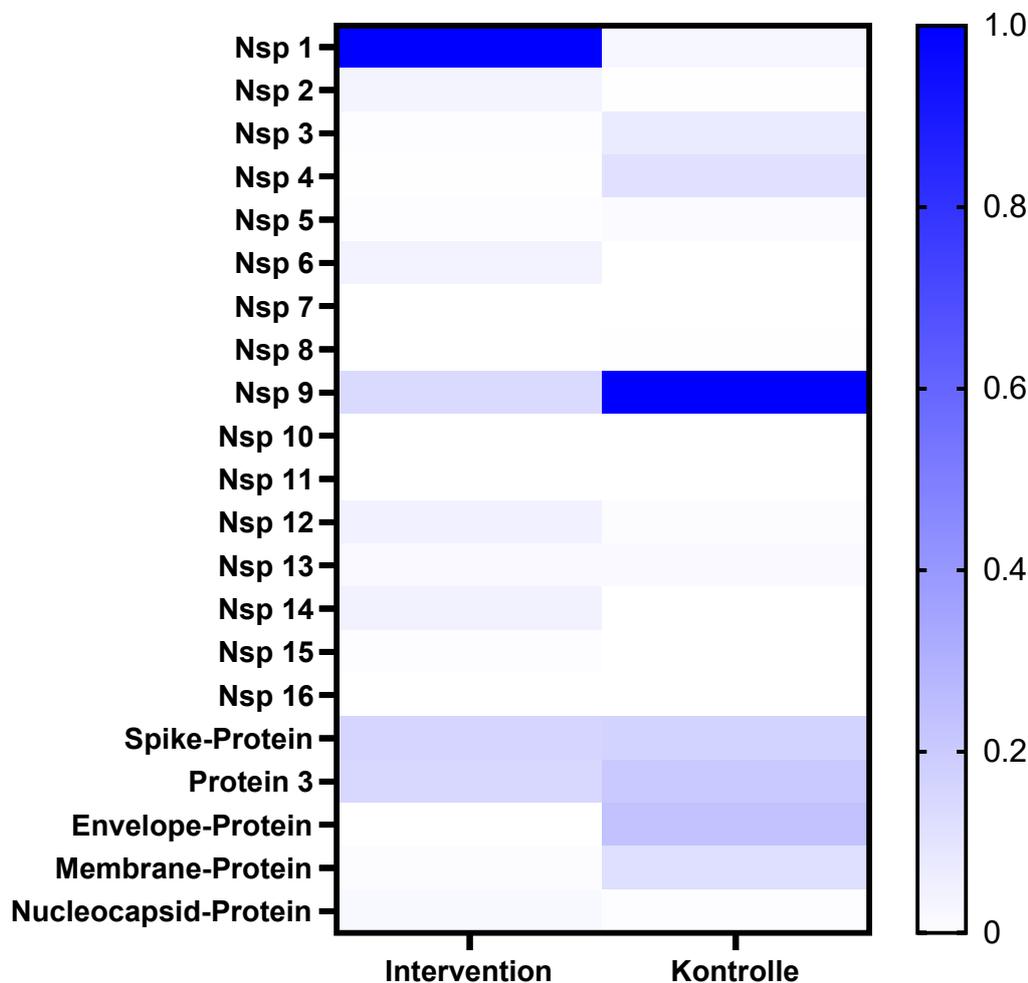


Abb. 46: Relative Dichte von Missense-Mutationen, dargestellt als Heatmap, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventionsgruppe (passagiert in ALV, CsA oder NIM811) bzw. Kontrollgruppe (passagiert in EtOH oder ohne Zusatz). Die Zeilen zeigen jeweils das Protein an, für das der jeweilige Abschnitt im Genom codiert (Nsp = Nichtstrukturprotein). In der Interventionsgruppe zeigt sich eine relative Häufung von Mutationen im für das Nsp1 codierenden Abschnitt; im Gegensatz dazu zeigte sich auch in den Kontrollpopulationen eine erhöhte Mutationsdichte im für das Nsp9 codierenden Abschnitt.

3.3.5 NGS - Ergebnisse über alle drei Passageexperimente

Im Rahmen einer Synopse wurden die Mutationen, welche in den Passageexperimenten 1-3 identifiziert worden waren, gegenübergestellt.

Hier flossen alle Mutationen, auch stumme, Nonsense- oder Rasterschubmutationen sowie Deletionen, mit in die Bewertung ein. Insgesamt gingen 363 Mutationen in den Vergleich der drei Passageexperimente ein. Durchschnittlich traten diese jeweils in 2,4 der Populationen (1 - 34 Populationen) mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 22,9 % (Median: 14,9 %) auf.

Den größten Teil mit 209 Mutationen nahmen dabei Basenaustausche, welche eine Änderung in der Aminosäuresequenz des vom jeweiligen Abschnitt codierten Translationsprodukts bewirkten, ein. Die Allelfrequenz betrug durchschnittlich 25,8 %, im Median 18,4 %.

Daneben erwiesen sich 76 Mutationen als stumm, zeigten also keine Änderung im codierten Protein. Diese traten durchschnittlich in 14,7 % und im Median zu 9,4 % auf.

Es kam zu 18 Deletionen, in deren Rahmen drei oder ein Vielfaches von drei Basen fehlten (Durchschnittliche Allelfrequenz 23,0 %; Median 13,6 %). Hier waren dann nur die direkt betroffenen Aminosäuren des Translationsprodukts betroffen, die dann folgenden blieben davon unberührt.

Im Gegensatz dazu imponierten 57 Rasterschubmutationen, bei denen durch Insertion oder Deletion in der Basenabfolge, welche nicht einem Vielfachen von drei entsprach, auch die Sequenz der darauffolgenden Aminosäuren im jeweiligen codierenden Abschnitt betraf (Durchschnittliche Allelfrequenz 23,8 %; Median 11,1 %).

Zwölf verschiedene Mutationen konnten in den nicht Translatierten Regionen (UTR) nachgewiesen werden, davon neun am 5'-Ende und drei am 3'-Ende des NL63-Genoms. Die Mutationen traten in bis zu 21 der untersuchten Populationen mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 21,6 % (Median 16,3 %) auf. Ein direkter Effekt dieser Mutationen ist nicht ersichtlich. Die Mutationen sind in Tabelle 59 aufgeführt.

Zuletzt sind zwei Nonsense-Mutationen zu erwähnen, deren Basenaustausch zu einem Stop-Codon führte und damit die Translation des betroffenen codierenden Abschnitts vorzeitig beendete (durchschnittliche Allelfrequenz 37,9 %).

Die Art der Basenaustausche im Rahmen von SNPs war nicht zufällig verteilt. Am häufigsten konnten Mutationen von Cytosin zu Thymin (im Virus dann Uracil) identifiziert werden. Das Vorkommen ist in der folgenden Tabelle 28 dargestellt.

Passageexperimente 1-3: Verteilung von Basenaustauschmutationen

Art des Basenaustauschs	Anzahl der Mutationen
A zu T	5
A zu G	28
A zu C	9
T zu A	13
T zu G	15
T zu C	68
G zu A	10
G zu T	12
G zu C	1
C zu A	9
C zu T	104
C zu G	2

Tabelle 28: Verteilung von Basenaustauschmutationen über die Passageexperimente 1-3. Am häufigsten kamen Austausche von Cytosin zu Thymin (im RNA-Virus Uracil) zustande. (A: Adenin; T: Thymin; C: Cytosin; G: Guanin)

Die Mutationsdichte wurde nun, wie bereits zuvor beschrieben, über alle Passageexperimente hinweg für die einzelnen Genomabschnitte bestimmt. Zuerst wurden Mutationen mit umschriebener Änderung der Aminosäuresequenz der betroffenen Proteine, welche in Summe zu mehr als 5 % oder nur in den Kontrollpopulationen auftraten, der Kategorie „Kontrollen“, alle anderen Mutationen der Kategorie „Intervention“ zugeordnet. Die sich hieraus ergebenden Werte wurden dann wiederum ins Verhältnis zum höchsten vorkommenden gesetzt, um so die relative Dichte zu erhalten. In Zahlen ist die Mutationsdichte über die drei Passageexperimente in Tabelle 57 für den jeweiligen Genomabschnitt aufgeführt. Die folgende Heatmap in Abb. 47 veranschaulicht die Mutationsschwerpunkte graphisch. Für die Interventionsgruppe imponierte weiterhin die Häufung im für das Nsp1 codierenden Bereich, während das Nsp9 sowie die Strukturproteine auch in den Kontrollen vermehrt von Mutationen betroffen waren. Die Mutationsdichte der drei Passageexperimente wurde für jeden beschriebenen Abschnitt mittels des *Multiple unpaired t tests* (Graph-Pad Prism V. 9.1.2) auf Signifikanz der Unterschiede

zwischen Kontrolle und Intervention untersucht. Alleine der für das Nsp1 kodierende Abschnitt zeigte sich hierbei signifikant unterschiedlich ($p < 0,000001$).

Zudem wurde die Dichte aller registrierten Mutationen, unabhängig von ihrer Auswirkung, dargestellt. Neben den bereits beschriebenen Häufungen in den für das Nsp1 codierenden Abschnitten bei den Interventionsgruppen und denen für Nsp9 und Envelope-Protein in den Kontrollen präsentierte sich ein weiterer Schwerpunkt in der 5'-UTR. Graphisch sind die Schwerpunkte in Abb. 47, als Zahlenwerte in Tabelle 58 dargestellt.

Synopse: Relative Dichte von Missense-Mutationen

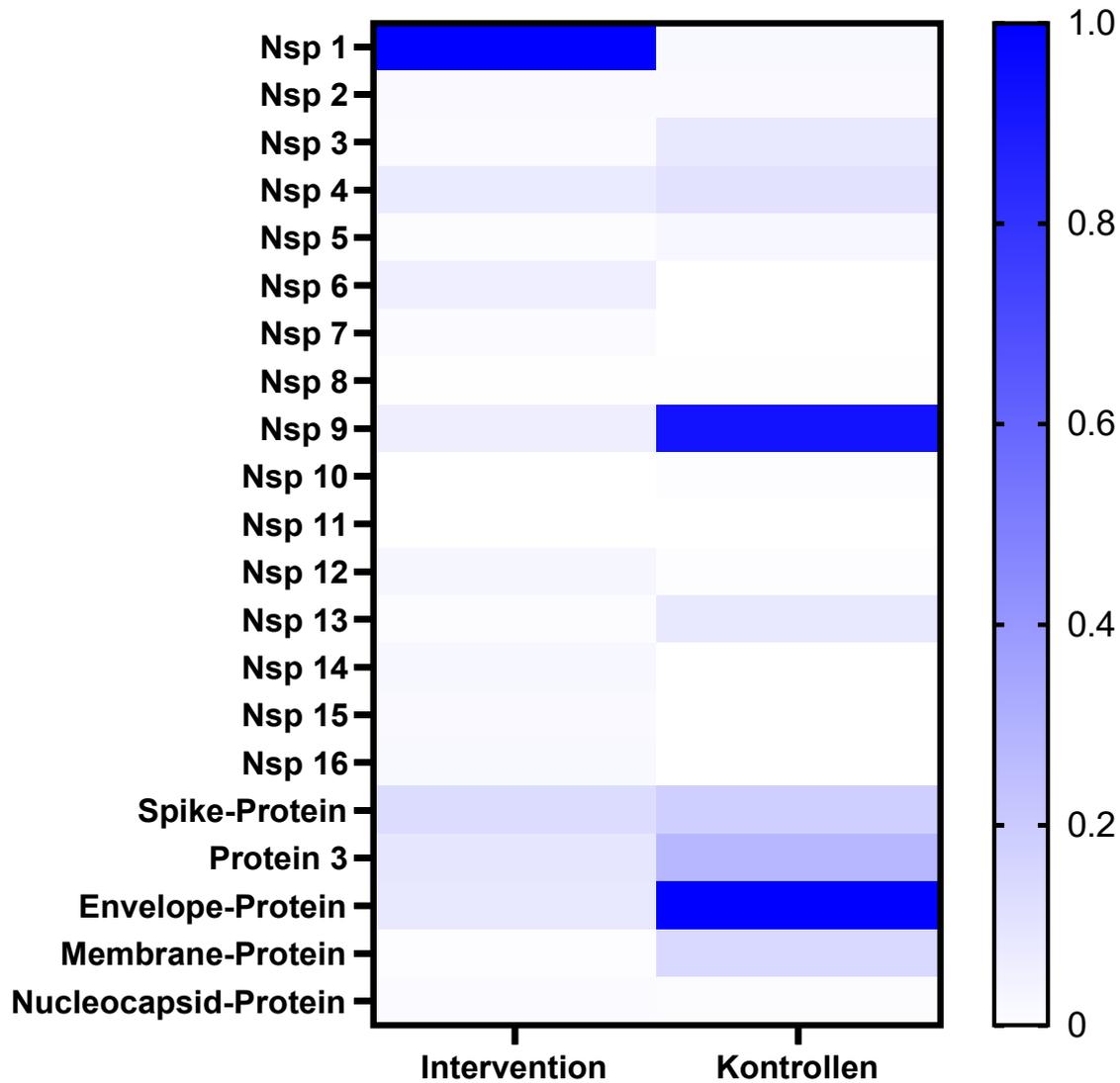


Abb. 47: Passageexperimente 1 - 3: Relative Dichte von Missense-Mutationen, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventionsgruppe (passagiert in ALV, CsA oder NIM811) bzw. Kontrollgruppe (passagiert in EtOH oder ohne Zusatz). Die Zeilen zeigen jeweils das Protein an, für das der jeweilige Abschnitt im Genom codiert (Nsp = Nichtstrukturprotein). In der Interventionsgruppe zeigt sich eine relative Häufung von Mutationen im für das Nsp1 codierenden Abschnitt.

Synopse: Relative Dichte von Mutationen

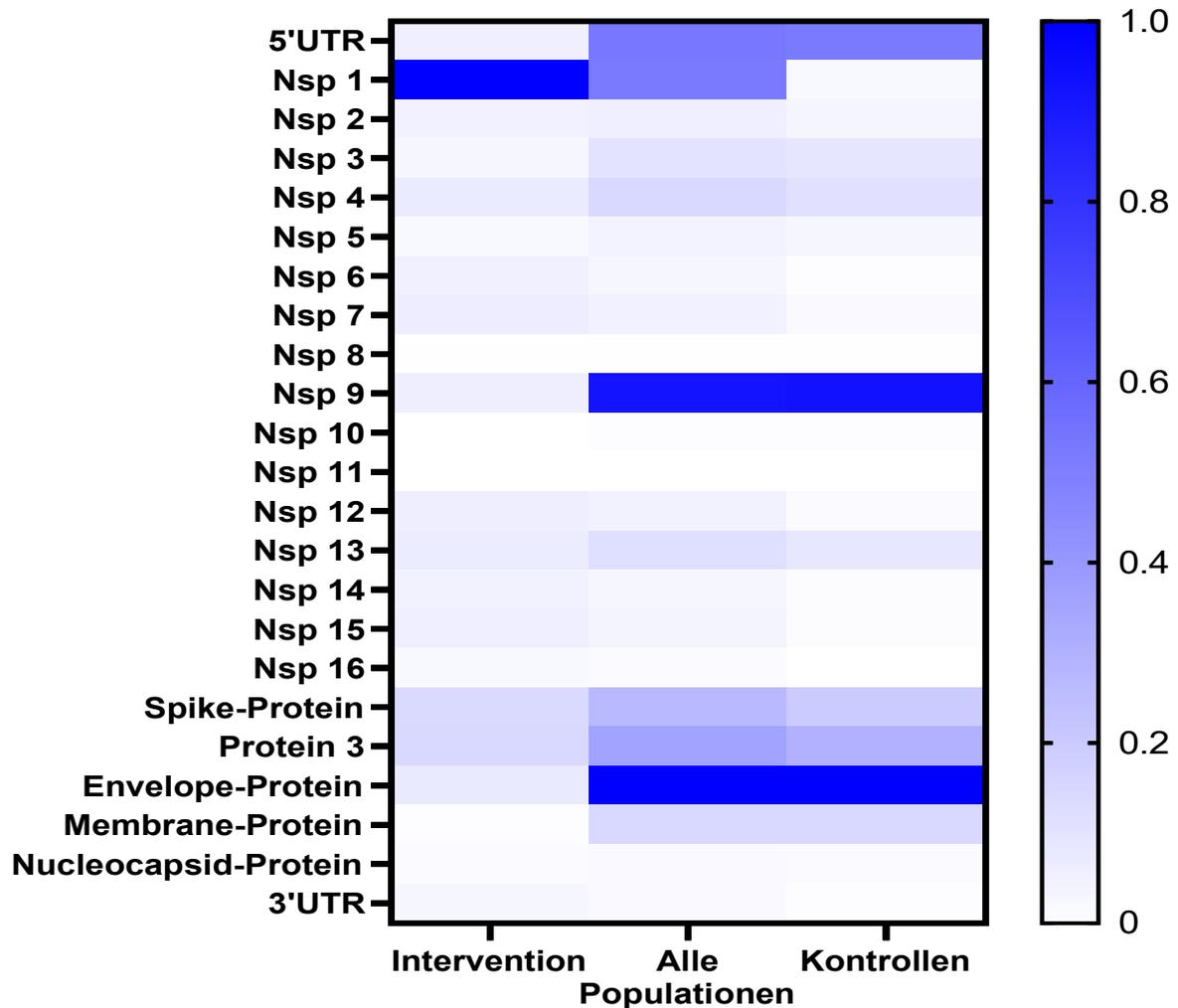


Abb. 48: Synopse: Relative Dichte von Mutationen aller drei Passageexperimente, aufgeschlüsselt nach Vorkommen in der Interventions- bzw. Kontrollgruppe. Mittig ist hier die Dichte über alle Populationen angegeben. Die Zeilen zeigen jeweils das Protein an, für das der jeweilige Abschnitt im Genom codiert (Nsp = Nichtstrukturprotein, UTR: Nicht-translatierte Region)). In der Interventionsgruppe (passagiert in ALV, CsA oder NIM811) zeigt sich eine relative Häufung von Mutationen im für das Nsp1 codierenden Abschnitt, in den Kontrollen (passagiert in EtOH oder ohne Zusatz) erscheint diese insbesondere im Bereich der 5'UTR und in den das Nsp9 und E-Protein betreffenden Regionen.

Besonderes imponierten 36 verschiedene Mutationen, welche identisch in verschiedenen Passageexperimenten, also völlig unabhängig voneinander, aufkamen. Zehn der Mutationen zeigten sich spezifisch für die Interventionsgruppen, lediglich in zweien (4724 sowie 24515) konnte die Mutation in sehr geringem Umfang auch in Kontrollpopulationen nachgewiesen werden. Diese sind in Tabelle 29 aufgeführt. Auffällig ist hier erneut eine Häufung von Mutationen im für das Nsp1 codierenden Genomabschnitt.

Die 26 Mutationen, welche sich auch in den Kontrollgruppen mehrerer Passageexperimente zeigten, häuften sich besonders im ORF S. Es imponierten zudem drei weitere Punktmutationen: Die erste, C4740T betrifft einen Bereich zwischen Makro- oder X-Domäne und der PLP2 des Nsp3 und tauscht das Alanin an Position 587 mit Valin aus. Diese Mutation erscheint in allen drei Passageexperimenten in 34 von 36 untersuchten Populationen. Die Zweite, G8757T, ändert das Serin an Position 362 des Nsp4 in ein Isoleucin. Sie wurde in 24 Populationen in Passageexperiment 2 und 3 nachgewiesen. Als Dritte verursacht C11766T wiederum eine Änderung von Alanin zu Valin an Position 28 des Nsp9. Diese präsentierte sich in 28 Populationen der Passageexperimente 1 und 3. Die Mutationen sind in Tabelle 30 zu finden.

Einige der Mutationen, welche bei Kontrollpopulationen über mehrere Passageexperimente erschienen, waren bereits in den Ausgangspopulationen nachweisbar. Diese wurden nur dann in der Auswertung berücksichtigt, wenn sie in einem Passageexperiment erschienen, in dessen Ausgangspopulation die jeweilige Mutation nicht vertreten war. Die Mutationen an Position 9948 sowie 11766 und 21659 erschienen sowohl in den Stocks 5/17 bzw. p0 als auch im Passageexperiment 3. Die Mutation an Position 22783 war im Ausgangsstock für Passageexperiment 1 bereits nachweisbar, imponierte dann aber auch in den Passageexperimenten 2 und 3. Die Mutation an Position 25237 zeigte sich nicht im Ausgangsstock von Passageexperiment 1, jedoch bereits in p0 sowie dann auch im Passageexperiment 3.

Auch hinsichtlich der Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) konnten durch das Heranziehen der Daten aus den drei Passageexperimenten weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Ein Vergleich der Werte von Kontrollpassage und Intervention mittels ungepaartem T-test zeigte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der s.n-1 ($p=0,05536$). Graphisch ist dies in Abb. 49 dargestellt.

Ein Vergleich der drei Passageexperimente untereinander hinsichtlich der Basenaustauschrate der Viruspopulationen am Ende des jeweiligen Passageexperiments mittels one-way ANOVA zeigte jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen den Passageexperimenten 1 und 2 sowie 1 und 3, nicht jedoch zwischen 2 und 3 ($p=0,0242$; $p=0,0472$; $p=0,5018$). Graphisch veranschaulicht dies Abb. 50 a). Wird jedoch dann die höhere Zahl an Passagen im

Passageexperiment 1 mit einberechnet, verschwindet dieser signifikante Unterschied, wie in Abb. 50 b). zu sehen ist.

Die in den Interventionsgruppen wiederholt nachweisbaren Missense-Mutationen D13G im Nsp1 sowie S1304F im S-Protein (s. Tabelle 29) wurden näher untersucht. Mittels EMBOSS Matcher [257] wurde ein Alignment der Aminosäureabfolge der Nsp1 von NL63 und SARS-CoV-2 durchgeführt (Abb. 51). Hier markiert das Aspartat an Position 13 den Beginn einer, wenn auch schwach ausgeprägten, Konsensussequenz mit dem Nsp1 von SARS-CoV-2 und anderen Betacoronaviren, wie beispielsweise bei Min et al beschrieben [258]. Weitere Übereinstimmungen konnten nicht identifiziert werden. Die Mutation S1304F zeigt sich nach Überprüfung mittels BLAST (NCBI) die Aminosäure Phenylalanin in der entsprechenden Region im S-Protein des Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) [259-261], dargestellt in Abb. 52.

Mutationen der Interventionsgruppen, welche in mehreren Passageexperimenten auftraten

Position im Genom	Referenz	Variante	Effekt	ORF	Protein	PE	N	Ø AF, %
324	A	G	D13G	ORF 1a	Nsp1	2	10	17,18
423	C	T	A46V	ORF 1a	Nsp1	3	10	11,36
522	C	T	S79F	ORF 1a	Nsp1	2	2	30,54
573	A	G	Y96C	ORF 1a	Nsp1	2	2	48,27
4724	A	G	I582V	ORF 1a	Nsp3	2	4	45,19
14451*	C	T	D679D	ORF 1b	Nsp12	2	2	8,05
24382	C	T	S1304F	ORF S	S-Protein (S2-Domäne)	2	4	16,68
24515*	C	T	Y1348Y	ORF S	S-Protein (S2-Domäne)	2	3	9,53
24665	C	T	L42F	ORF 3	Protein 3	2	2	23,57
26790	C	T	L220F	ORF N	N-Protein	2	2	10,45

Tabelle 29: Mutationen der Interventionsgruppen, welche in mehreren Passageexperimenten auftraten. Der Effekt der Mutationen auf die Aminosäuresequenz der codierten Proteine ist im Ein-Buchstaben-Code mit der jeweiligen Position dargestellt (*: Die Mutationen an Position 14451 sowie 24515 sind stumm). Unter PE ist die Anzahl der betroffenen Passageexperimente, unter N die Anzahl der jeweils betroffenen Populationen aufgeführt. Ø AF bezeichnet die durchschnittliche Allelfrequenz.

Mutationen welche in mehreren Passageexperimenten auftraten, u.a. in Kontrollgruppen

Position im Genom	Referenz	Variante	Effekt	ORF	Protein	PE	N	∅ AF, %
173	C	T		5'UTR		2	4	11,71
1698	C	T	A361V	ORF 1a	Nsp2	3	8	39,43
4740	C	T	A587V	ORF 1a	Nsp3	3	34	64,62
6835	T	C	D1285D	ORF 1a	Nsp3	2	2	14,33
8757	G	T	S362I	ORF 1a	Nsp4	2	24	33,52
9948	C	T	S282F	ORF 1a	Nsp5	2	7	17,76
10063*	C	T	F17F	ORF 1a	Nsp6	2	4	6,14
11766	C	T	A28V	ORF 1a	Nsp9	2	28	59,46
11838	T	C	V52A	ORF 1a	Nsp9	2	5	18,39
16598	C	T	A468V	ORF 1b	Nsp13	2	8	39,64
21420	T	C	F317L	ORF S	S-Protein (S1-Domäne)	2	6	34,54
21506*	C	T	S345S	ORF S	S-Protein (S1-Domäne)	3	9	23,03
21659*	C	T	F396F	ORF S	S-Protein (S1-Domäne)	2	3	17,37
21733	T	C	V421A	ORF S	S-Protein (S1-Domäne)	3	6	54,40
22335	T	A	L622I	ORF S	S-Protein (S1-Domäne)	2	6	57,85
22348	A	C	N626T	ORF S	S-Protein (S1-Domäne)	2	7	30,92
22593	T	G	L708V	ORF S	S-Protein (S1-Domäne)	3	19	23,28
22783	C	T	T771I	ORF S	S-Protein (S2-Domäne)	3	15	19,43
23086	C	T	A872V	ORF S	S-Protein (S2-Domäne)	2	5	9,41
23482	T	C	I1004T	ORF S	S-Protein (S2-Domäne)	2	11	26,40
24105	C	T	P1212S	ORF S	S-Protein (S2-Domäne)	3	8	31,17
24156	C	T	P1229S	ORF S	S-Protein (S2-Domäne)	2	2	22,27
24942	C	T	S134L	ORF 3	Protein 3	2	10	33,21
25222	A	C	D8A	ORF E	E-Protein	2	11	43,46
25237	T	C	L13P	ORF E	E-Protein	2	8	84,36
26076	A	G	Q212R	ORF M	M-Protein	2	3	24,57

Tabelle 30: Mutationen, welche in mehreren Passageexperimenten auch in den Kontrollgruppen auftraten. Der Effekt der Mutationen auf die Aminosäuresequenz der codierten Proteine ist im Ein-Buchstaben-Code mit der jeweiligen Position dargestellt (*: Die Mutationen an Position 10063, 21506 und 21659 sind stumm). Unter PE ist die Anzahl der betroffenen Passageexperimente, unter N die Anzahl der jeweils betroffenen Populationen aufgeführt. ∅ AF bezeichnet die durchschnittliche Allelfrequenz.

Vergleich der Basenaustausche pro Nukleotid zwischen Kontrollpassage und Intervention

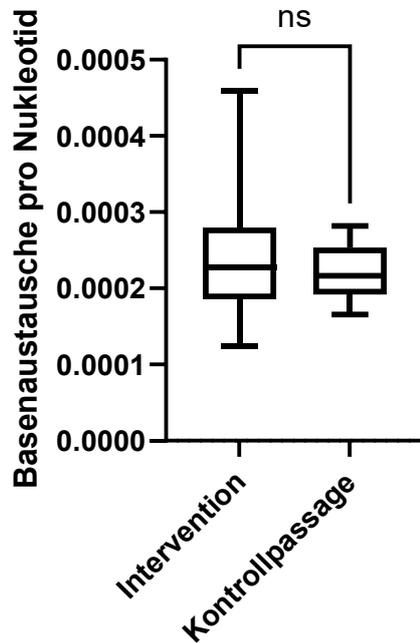


Abb. 49: Vergleich der Basenaustausche pro Nukleotid (s.n-1) von Intervention und Kontrollpassage der Passageexperimente 1-3. Die Unterschiede zeigten sich nicht signifikant (ns; $p=0,5536$).

Vergleich der Basenaustausche pro Nukleotid in den drei Passageexperimenten

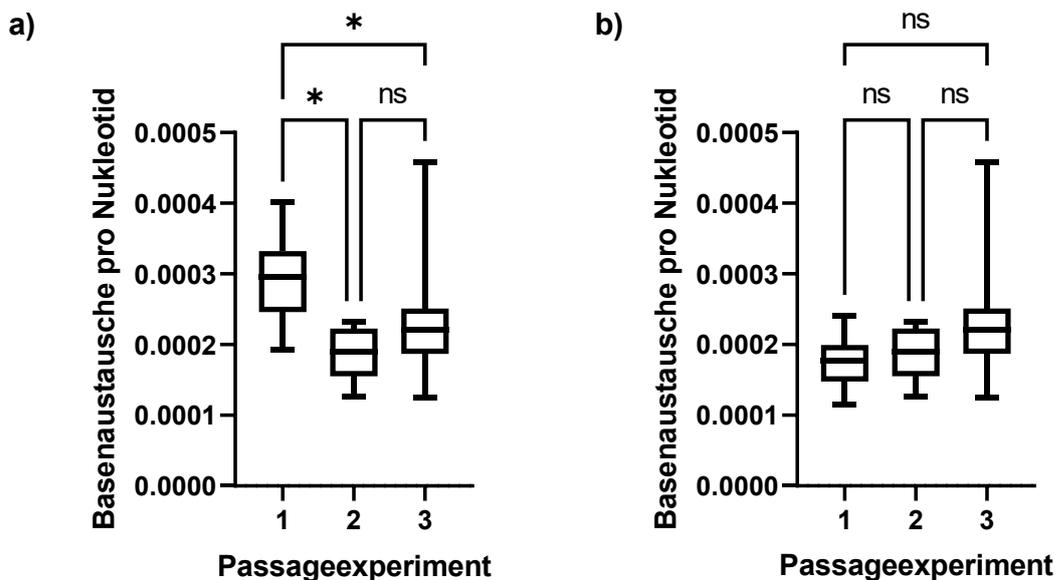


Abb. 50: Vergleich der Basenaustausche pro Nukleotid (sn-1) zwischen den Passageexperimenten 1, 2 und 3. a) Die Unterschiede zwischen 1 und 2 sowie 1 und 3, nicht jedoch zwischen 2 und 3 ($p=0,0242$; $p=0,0472$; $p=0,5018$) zeigen sich signifikant. b) Wird jedoch die höhere Anzahl von Passagen im Passageexperiment 1 miteinberechnet, zeigt sich kein Unterschied mehr.

HCoV-NL63	Nsp1	13	DSEISGFGFAIPSV	26
			...: ...:	
SARS-CoV-2	Nsp1	25	DVLVRGFGDSVEEV	38

Abb. 51: Darstellung der Konsensussequenz der Aminosäuren des Nichtstrukturprotein 1 von HCoV-NL63 und SARS-CoV-2. Die Übereinstimmende Sequenz betrifft die Aminosäuren 13-26 des Nsp1 von NL63 sowie die Aminosäuren 25-28 von SARS-CoV-2

NL63	1272	LIDQINSTYVDLKLLNRFENYIKWPWWVLIIFVWFVLLSLLVFCCLSTGCCGCCNCLT	1331
		LI IN+T VDL+ LNR E YIKWPWWVLIIF+V + ++SLLVFCC+STGCCGCC C	
PEDV	1308	LIYNINNTLVLDLEWLN RVET YIKWPWWVLIIFIVLIFVVSLLVFCCISTGCCGCCGCC	1367

Abb. 52: Darstellung der Übereinstimmung des Aminosäureaustauschs S1304F im S-Protein des HCoV-NL63 mit der entsprechenden Region im S-Protein des Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). Die Aminosäuresequenzen wurden mithilfe von BLAST (NCBI) aneinandergelagt.

3.4 Synopse von NGS und Resistenztestung der passagierten Populationen

3.4.1 Synopse zu NGS und Resistenztestung im Passageexperiment 1

Die Resistenztestung im Anschluss an das erste Passageexperiment zeigte eine, im Vergleich zu den Kontrollen, deutlich verringerte Sensibilität der passagierten Viruspopulationen der Interventionsgruppe gegenüber den Cyclophilininhibitoren ALV und CsA. Insbesondere die Populationen p25|3.2-ALV und p25|3.6-NIM811 stachen hier deutlich heraus, weshalb einige Mutationen dieser Populationen, welche nicht in den Kontrollgruppen erschienen waren, genauer erläutert werden. Die Mutationen der beiden Viruspopulationen mit einer Allelfrequenz von über 30 % sind Tabelle 31 dargestellt. Auffällig ist, dass identische Mutationen nicht auftraten, sich jedoch in beiden Fällen eine Häufung im Bereich des ORF S sowie der das Nsp 1 betreffenden Region zeigte.

Häufige Mutationen der Viruspopulationen p25|3.2-ALV sowie p25|3.6-NIM811

Position im Genom	Referenz	Variante	Effekt	ORF	Protein	p25 3.2-ALV AF (%)	p25 3.6-NIM811 AF (%)
324	A	G	D13G	ORF 1a	Nsp 1		67,2
553	C	T	L89L	ORF 1a	Nsp 1		45,3
573	A	G	Y96C	ORF 1a	Nsp 1	87,5	
8373	A	G	D234G	ORF 1a	Nsp 4		54,2
19262	C	T	T241I	ORF 1b	Nsp 15		58,2
21005	C	A	N178K	ORF S	Spike	48,0	
21621	T	G	F384V	ORF S	Spike	70,3	
22492	T	G	I674S	ORF S	Spike		99,2
23445	A	G	S992G	ORF S	Spike	50,4	
24396	G	T	V1309L	ORF S	Spike	48,4	
24462	C	T	T1331I	ORF S	Spike		66,1

Tabelle 31: Häufige Mutationen der Viruspopulationen p25|3.2-ALV sowie p25|3.6-NIM811 aus dem Passageexperiment 1. Der Effekt der Mutationen auf die Aminosäuresequenz der codierten Proteine ist im Ein-Buchstaben-Code mit der jeweiligen Position dargestellt. (ORF = Open Reading Frame; Nsp = Nichtstrukturprotein; AF = Allelfrequenz)

3.4.2 Synopse zu NGS und Resistenztestung im Passageexperiment 2

Im zweiten Passageexperiment zeigte sich insbesondere die Population p15.2-CsA im Vergleich zu den Kontrollen resistenter als die Kontrollen gegenüber dem Einfluss von Cyclophilinhibitoren. In geringerem Umfang zeigte sich dies für die Population p15.1-ALV. Bemerkenswerterweise wies die hier am häufigsten, nicht in den Kontrollpopulationen auftretende Mutation nur eine Allelfrequenz von 53,7 % auf. Überraschenderweise konnte in p15.1-ALV keine Mutation im Nsp1 dargestellt werden. In Tabelle 32 sind die häufigsten Mutationen der beiden Populationen aufgelistet.

Häufige Mutationen der Viruspopulationen p15.1 sowie p15.2

Position im Genom	Referenz	Variante	Effekt	ORF	Protein	P15.1-ALV AF (%)	P15.2-CsA AF (%)
522	C	T	S79F	ORF 1a	Nsp 1		37,4
8265	C	T	T198I	ORF 1a	Nsp 4		53,7
21161	C	T	F230F	ORF S	Spike		33,3
22482	A	G	N671D	ORF S	Spike		38,9
24382	C	T	S1304F	ORF S	Spike	34,4	
24393	G	T	V1308F	ORF S	Spike	45,1	
24665	C	T	L42F	ORF 3	Protein 3		31,7
25242	T	C	S15P	ORF E	Envelope		19,2

Tabelle 32: Häufige Mutationen der Viruspopulationen p15.1-ALV sowie p15.2-CSA aus dem Passageexperiment 2. Der Effekt der Mutationen auf die Aminosäuresequenz der codierten Proteine ist im Ein-Buchstaben-Code mit der jeweiligen Position dargestellt. (ORF = Open Reading Frame; Nsp = Nichtstrukturprotein; AF = Allelfrequenz)

3.4.3 Synopse zu NGS und Resistenztestung im Passageexperiment 3

Die IC₅₀ Werte der einzelnen Viruspopulationen wurden wie in Kapitel 3.1.3 Passageexperiment 3 beschrieben ins Verhältnis zueinander gesetzt. Acht der untersuchten Populationen zeigten einen im Vergleich zum Mittelwert mehr als zweifach erhöhten IC₅₀-Wert (siehe Tabelle 49). Mutationen dieser Populationen mit hoher Allelfrequenz (>25 %) werden im Folgenden in Tabelle 33 aufgezeigt.

Häufige Mutationen in sich resistenter zeigenden Viruspopulationen aus Passageexperiment 3

Position im Genom	Ref	Var	Effekt	ORF	Protein	A1	A2	A3	A4	B2	B3	B5	C3
324	A	G	D13G	1a	Nsp 1	2,7	17,8	14,9	29,5		2,8		
423	C	T	A46V	1a	Nsp 1				3,5				14,7*
4035	T	C	V352A	1a	Nsp 3				20,2				
9836 - 9860 del			RS	1a	Nsp 5			52,6					
10742	G	A	V244I	1a	Nsp 6							23,4	
16603 – 16625 del			RS	1b	Nsp 13						74,2		
16779 – 16819 del			RS	1b	Nsp 13						59,7		
17878 – 17896 del			RS	1b	Nsp 14			54,7					
18969	-	A	INS	1b	Nsp 15	71,9							
20654	T	A	N61K	S	S-Protein					92			
21546	A	C	T359P	S	S-Protein	64,6							
22161	A	G	K564E	S	S-Protein				32,7				
23854 – 23881 del			Del	S	S-Protein			23					
24189	C	T	P1240S	S	S-Protein				34,2				
24382	C	T	S1304F	S	S-Protein		25,1						

Tabelle 33: Häufige Mutationen in sich resistenter zeigenden Viruspopulationen aus Passageexperiment 3. Dargestellt sind die Mutationen der Interventionsgruppe (passagiert in ALV, CsA oder NIM811), deren Effekt und die jeweilige Allelfrequenz in Prozent in der Population. Der Buchstabe A, B oder C beschreibt einen der drei parallelaufenden Sätze, die Zahl dahinter den eingesetzten Inhibitor (1,2: ALV, 3,4: CsA, 5, NIM811). Der Effekt der Mutationen auf die Aminosäuresequenz der codierten Proteine ist im Ein-Buchstaben-Code mit der jeweiligen Position beschrieben. *: Die Mutation mit der höchsten Allelfrequenz in Population C3 betrug nur 14,7 %. (Ref = Referenz; Var = Variante; ORF = Open Reading Frame; Nsp = Nichtstrukturprotein; RS = Rasterschub; INS = Insertion)

4. Diskussion

4.1 Einordnung der Passageexperimente

4.1.1 Geschichte serieller Passageexperimente

Die serielle Passage von Bakterien und Viren ist eine seit sehr langer Zeit etablierte Methode, um Änderungen in deren Merkmalen zu erzeugen. So passagierte Louis Pasteur das Tollwutvirus in Kaninchen, wodurch es sich dann gegenüber dem Menschen attenuiert zeigte und als Impfstoff 1885 erstmalig eingesetzt werden konnte [262, 263]. Bereits 1881 hatte er durch Passagierung von *Bacillus anthracis* in Kulturmedium einen Tierimpfstoff gegen Milzbrand erzeugt [264]. Später entwickelte Max Theiler im Jahr 1937 nach Passage von Gelbfiebviren in Zellkultur mit dem Stamm 17D einen bis heute genutzten Lebendimpfstoff [265, 266]. Passageexperimente sind bis heute fester Bestandteil bakteriologischer und virologischer Forschung.

4.1.2 Passageexperimente zur Resistenzinduktion

Schon Mitte des 20. Jahrhunderts wurden Passageexperimente zur Veränderung der Sensitivität von Mikroorganismen gegenüber Antibiotika beschrieben. So zeigten beispielsweise Golub et. al. im Jahr 1948 die Resistenzinduktion im Erreger der Psittakose gegenüber Sulfadiazin nach Passage unter dem Einfluss des Antibiotikums [267].

Im Jahr 1961 beschrieben Melnick et al. die Resistenzinduktion von Polioviren gegenüber Guanidinhydrochlorid sowohl in Zellkultur als auch in *Cynomolgus*-Affen. Hier wurde das Virus *in vitro* fünfmalig passagiert, *in vivo* nach fünf Tagen asserviert. Die dem Einfluss des Inhibitors ausgesetzten Viren zeigten eine um das 100 bis 1000-fache reduzierte Sensitivität gegenüber Guanidinhydrochlorid [268].

Der Inhibitor Amantadin wurde bereits in den 1960er-Jahren als Prophylaxe gegenüber einer Influenzaerkrankung diskutiert [269]. Oxford et al. veröffentlichten Daten zur Resistenzinduktion in Influenza A gegenüber Amantadin durch Passage in Mäusen. Nach sechs Passagen war der IC₅₀-Wert von Amantadin um das 50-fache erhöht [270].

Perales et al. (2013) beschrieben die Resistenzinduktion in Zellkultur passagierten Hepatitis C-Viren gegenüber dem Interferon alpha (IFN- α). HCV wurde hier bis zu 100-fach passagiert. Die dem Inhibitor ausgesetzten Viruspopulationen zeigten nach der Passage diesem gegenüber

eine deutlich verminderte Sensitivität. Bemerkenswerterweise zeigten Viren der Kontrollgruppe, welche ohne Selektionsdruck durch Interferon passagiert worden waren, ebenfalls eine leicht ausgeprägte Resistenz [271].

Das HI-Virus stellt seit seiner Entdeckung einen Schwerpunkt virologischer Forschung dar. Einer der ersten zur Kontrolle der HIV-Infektion eingesetzten Wirkstoffe ist Zidovudin [272]. Larder et. al. (1991) untersuchten die Wirkung von zwölf Passagen in aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors auf das Virus. In der anschließenden Resistenztestung zeigte eine der Populationen eine 200-fach verringerte Sensitivität [273].

Exemplarisch soll auch die Wirkung einer Passage von HIV-1 unter Einfluss von Maraviroc, einem Entryinhibitor, erwähnt werden. Ratcliff et al. zeigten, dass sich auch die Sensitivität von Viren gegenüber wirtsspezifischen Virusinhibitoren ändern kann. In 21 Passagen von jeweils einwöchiger Dauer waren die Viren dem Inhibitor ausgesetzt. Konnte Replikation nachgewiesen werden, wurde für die jeweiligen Viren die Konzentration von Maraviroc erhöht. Hierauf konnte eine im Vergleich zur Kontrollpopulation bis zu 40-fach verringerte Sensitivität gegenüber dem Entryinhibitor dargestellt werden [274].

Auch ist die Resistenzentwicklung in Coronaviren gegenüber Inhibitoren ihrer Replikation beschrieben. Bereits in der Einführung erwähnt war die Wirkung von K22 auf die Replikation von Coronaviren. Zur Eingrenzung des Wirkmechanismus passagierten Lundin et al. (2014) HCoV-229E über 10-13 Passagen mit aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors. Die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor verringerte sich um das 14-fache. Resistente Viruspopulationen wiesen einen Mutationsschwerpunkt im Nsp6 auf [174].

Agostini et. al. (2018) wandten das Nukleosidanalogen Remdesivir auf MHV in bis zu 23 Zellkulturpassagen an. Die passagierten Viren zeigten sich um das 5,6-fache resistenter gegenüber dem Inhibitor. Dieser Vorteil ging jedoch mit einer verminderten Fitness einher [275]. Andreano et. al (2020) beschrieben die Resistenzentwicklung von SARS-CoV-2 gegenüber neutralisierenden Antikörpern aus Rekonvaleszentenplasmen. Hier wurden die Viren über mehr als 90 Tage in Vero E6-Zellen passagiert. Im Laufe der Zeit sammelten sich hier mehrere Mutationen im für das S-Protein kodierenden Genomabschnitt an, bis die Insertion eines Glykan-Sequons zu einer kompletten Resistenz gegenüber der Wirkung der Antikörper führte [276].

4.1.3 Cyclophilininhibitoren und Resistenzentwicklung

Auch zum Cyclophilininhibitor Cyclosporin A sind Passageexperimente beschrieben, welche die Resistenzentwicklung von Viren diesen gegenüber zu induzieren versuchten. Ma et al. (2016) setzten Influenza-A-Viren des Subtyps H1N1 10 Passagen einer Konzentration von 3 μM CsA aus, in einem weiteren Passageexperiment waren Viren des Subtyps H3N2 aufsteigenden Konzentrationen von CsA im Bereich von 0,5 – 4 μM exponiert. Im zweiten Experiment wurde der Neuraminidase-Inhibitor Oseltamivir als Inhibitor für Passagekontrollen verwendet. Im Anschluss an die Passagen zeigte sich in beiden Experimenten eine gleichbleibende Wirksamkeit von CsA auf die virale Replikation, während sich die Sensitivität der Kontrollpopulationen gegenüber Oseltamivir unter den gleichen Bedingungen um das zehnfache verringert hatte [277].

Arai et al. (2014) untersuchten die Wirkung einer Passage von HCV FLR-N-Replikon-Zellen in CsA. Hier wurden die Zellen zunächst einer Konzentration von 2 μM CsA ausgesetzt, dann wurden die überlebenden Zellen in Kulturmedium mit bis zu 6 μM CsA über 40 Tage gehalten. In der darauffolgenden Sequenzierung der Replikons konnten spezifische Mutationen und den Nichtstrukturproteinen 3, 4A und 5A nachgewiesen werden. Diese Mutationen bedingten eine bis zu 30-fach verringerte Empfindlichkeit gegenüber CsA, während diese gegenüber NIM811 und ALV um das 20- beziehungsweise 13,7-fache gesenkt war [278]. Ein weiterer nicht-immunsuppressiver Cyclophilininhibitor mit Namen STG-175 wurde in seiner Wirkung auf HCV-Replikons unterschiedlichen Genotyps von Gallay et al. 2016 beschrieben. Unter anderem wurde auch die Resistenzinduktion mittels Passagierung in den Inhibitoren CsA, ALV und STG-175 beschrieben. Die Replikons wurden über bis zu 22 Passagen unter anderem unter dem Einfluss von 0,5 μM und 1 μM ALV oder CsA sowie 0,25 μM und 1 μM STG-175 kultiviert, bis sich resistente Populationen zeigten. Dies dauerte für CsA und ALV 14-1[279] 7 Passagen, im Falle von STG-175 18 bzw. 21 Passagen. Für resistente Populationen erhöhte sich der IC_{50} -Wert für STG-175 dann auf das bis zu 49-fache. Nach Sequenzierung der resistenten Replikons wurden zwei Mutationen im NS5A identifiziert. Das Einbringen dieser Mutationen in Wildtyp-Replikons erbrachte eine 2-3-fache Resistenz gegenüber STG-175 [280].

Die Resistenzentwicklung von Coronaviren gegenüber Cyclophilininhibitoren war bisher nicht beschrieben worden. Zu einem anderen Vertreter aus der Ordnung der Nidovirales, dem Equinen Arteritis-Virus (EAV), beschrieben de Wilde et al. 2019 die Resistenzinduktion [279].

In verschiedenen Experimenten wurden die Viren hier in Zellkultur unter dem Einfluss von CsA oder ALV passagiert. CsA wurde in 9 Passagen in aufsteigenden Konzentrationen von 4-20 μM (EC_{50} des EAV_{wt}: 2,4 μM), während ALV in 10 Passagen in Konzentrationen von 4-75 μM angewandt wurde (IC_{50} des EAV_{wt}: 4,5 μM). Die in CsA passagierten Viren wiesen eine bis zu 5,1-fach verringerte Sensitivität auf, während diese im Falle der in ALV passagierten Viren um das 7,4-fache vermindert war. In ALV passagierte Viren zeigten sich ebenfalls resistenter gegenüber CsA. Die im Anschluss an die Passage durchgeführte RNA-Sequenzierung zeigte wiederkehrende Mutationen in beiden Passagen im für Nsp5 kodierenden Abschnitt, während für eine Resistenz gegenüber ALV zudem Mutationen im Nsp2 kodierenden Abschnitt notwendig waren. Beide Nichtstrukturproteine sind am Replikase-Komplex des Virus beteiligt. Rekombinante Viren, in die die beschriebenen Mutationen eingebracht worden waren, zeigten ebenfalls eine verringerte Sensitivität gegenüber den Inhibitoren [279].

4.1.4 Das Design der hier beschriebenen Passageexperimente im Vergleich

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Passageexperimente lassen sich in mehreren Punkten mit den im vorhergegangenen Kapitel beschriebenen vergleichen.

Die Passageexperimente 2 und 3 hatten bei 15 Passagen eine Dauer von 56 bzw. 52 Tagen, während das erste Experiment mit 98 Tagen und 25+3 Passagen deutlich länger gelaufen war. Die zuvor beschriebenen Passageexperimente beinhalteten 5 bis 100 Passagen. Agostini et al., Andreano et al. sowie Lundin et al. passagierten Coronaviren in 10 bis 23 Passagen [174, 275, 276]. Das ebenfalls zu den *Nidovirales* zählende EAV wurde von de Wilde et al. bis zu zehnmalig in ALV bzw. CsA weitergetragen [279]. Neben de Wilde setzen auch Arai et al., Gallay et al. und Ma et al. CsA ein. Arai et al. passagierten ihr HCV-Replikon über 40 Tage, Ma et al. Influenza A über 10 Passagen von 2-3 Tagen Dauer [278, 281]. Gallay et al. wandten bis zu 22 Passagen an, beendet wurde hier das Experiment bei Eintreten einer Resistenz [280]. Das hier am längsten dauernde Experiment führten Perales et al. mit 100, 3-4 Tage andauernden Passagen von HCV in Interferon- α durch [271].

Wie bei Larder et al., Agostini et al. und de Wilde et al. wurde die Passageexperimente 1-3 mitunter mit dem ein- bis zweifachen des IC_{50} -Wertes des jeweiligen Inhibitors begonnen [273, 275]. Arai et al. setzten HCV-Replikons schon zu Beginn des Experiments der zehnfachen IC_{50} von CsA aus, Gallay et al. begannen mit dem durchschnittlich 13- und 53-fachen [280]. Ma et

al. starteten mit 25 % nur mit einem Bruchteil der jeweiligen IC_{50} [174]. Die Konzentration der Inhibitoren wurde in den Passageexperimenten 1-3 auf das 10-30-fache der IC_{50} von ALV, CsA und NIM811 gesteigert, was in etwa auch denen von Agostini et al., Arai et al., de Wilde et al. sowie Lundin et al., entspricht [174, 275, 278, 279]. Deutlich geringere Steigerungen der Konzentration der Inhibitoren führten Ma et al. auf ein 1,6-faches des jeweiligen IC_{50} -Wertes durch, während Gallay et al. die Konzentrationen der Inhibitoren im Laufe der Passage nicht steigerten [280, 282]. Eine ausgeprägtere Steigerung vollzogen Larder mit einer dem 250-fachen des IC_{50} -Wertes entsprechenden Endkonzentration von Zidovudin [273].

Für diese Arbeit wurden in den drei Passageexperimenten 26 Viruspopulationen in der Interventionsgruppe sowie 9 Viruspopulationen als Kontrollen passagiert. Andreano et al. stellten 12 Interventionspopulationen 6 Kontrollen gegenüber, bei Lundin et al. wurden mindestens 15 der Interventionsgruppe mit 3 Kontrollen verglichen, wobei die genaue Anzahl in der Veröffentlichung nicht ersichtlich ist [174, 276]. Arai et al. und Gallay et al. passagierten 9 Replikon-Populationen in Cyclophilininhibitoren, während Agostini al., De Wilde et. al., Ma et al., Perales et al. und Ratcliff et al. meist insgesamt eine mittlere einstellige Zahl an Populationen untersuchten [271, 274, 275, 278, 279, 281]. Im Vergleich wurden die hier beschriebenen Passageexperimente 1-3 in ihrer Zahl an Populationen umfangreicher durchgeführt.

4.2 Ergebnisse zur Resistenzinduktion

Der Versuch, resistente HCoV-NL63-Viruspopulationen durch serielle Passageexperimente in den Inhibitoren ALV, CsA und NIM811 zu generieren, war erfolgreich.

Wie in Kapitel 3.1.1 ff. dargestellt, zeigten sich die Populationen der Interventionsgruppe oft weniger sensitiv gegenüber den Inhibitoren als die Ausgangspopulationen oder die Passagekontrollen. Dies gilt insbesondere für Inhibitorkonzentrationen von kleiner als 25 μ M (siehe Abb. 21 f., 26 ff. sowie 31 ff.).

Dies zeigte sich auch in veränderten IC_{50} -Werten (siehe Abb. 24, 29 und 35). Im Schnitt über alle Passageexperimente und eingesetzten Inhibitoren hinweg zeigte sich eine 7,8-fache Steigerung des IC_{50} -Wertes in der Intervention. Dieser Unterschied zu den Passagekontrollen als auch zu den Ursprungspopulationen ist sowohl deutlich als auch statistisch signifikant (siehe Abb. 37).

Betrachtet man die Ergebnisse zu den einzelnen Inhibitoren, zeigt sich weiterhin ein Unterschied, welcher jedoch nur im Falle von CsA statistisch signifikant ist (siehe Abb. 68).

Der relative IC_{50} -Wert für Inhibitoren, in denen die jeweilige Viruspopulation passagiert worden war, zeigte sich im Durchschnitt mit 11,6 höher als der für die Inhibitoren, in denen die Passage nicht erfolgt war. Hier betrug der Mittelwert 5,8. In der Testung mittels t-Test stellten sich die Unterschiede dann jedoch nicht statistisch signifikant dar (siehe Abb. 37). Ein unterschiedlicher Einfluss von gleichbleibenden oder aufsteigenden Konzentrationen der Inhibitoren konnte in Passageexperiment 3 nicht dargestellt werden. Wie in Abb. 34 zu sehen, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den relativen IC_{50} -Werten dieser zwei verschiedenen Interventionsgruppen.

Die um das 7,8-fach verringerte Sensitivität gegenüber den Cyclophilinhibitoren bewegt sich in einem vergleichbaren Rahmen mit der Resistenzentwicklung von MHV gegenüber Remdesivir bei Agostini et al. (ca., 5,6-fach) sowie der von HCoV-229E gegenüber K22 bei Lundin et al. [174, 275]. In den von de Wilde et al. beschriebenen Passagen von EAV in CsA und ALV zeigten passagierte Populationen im Vergleich zum Ausgangsstock 5- bzw. 7-fach erhöhte IC_{50} -Werte. Passagekontrollen zeigten hierbei keine Änderung im Ansprechen auf die Inhibitoren [279]. Arai et. al. erwirkten für die in CsA passagierten HCV-Replikons eine Teilresistenz gegenüber den Inhibitoren ALV, CsA und NIM811. Die IC_{50} -Werte stiegen gegenüber der Ausgangspopulation nach der Passage auf das 30-fache für CsA, das 20-fache für NIM811 sowie das 13,7-fache für ALV [278]. Gallay et al. zeigten in den passagierten HCV-Replikons eine um das bis zu 53-fache vermindertes Ansprechen gegenüber dem Cyclophilinhibitor STG-175. Zu den Experimenten von Arai et al. sowie Gallay et al. soll erwähnt werden, dass bei der Passage von Replikons naturgemäß die Zellen ebenfalls weitergetragen werden. Replikons mit denen von Gallay et al. identifizierten resistenzassoziierten Mutationen zeigten eine nur 2-3-fach verminderte Sensitivität. Gallay et al. diskutieren in ihre Veröffentlichung selbst, dass ebenfalls der Metabolismus der Wirtszellen unter dem Einfluss der Cyclophilinhibitoren die Expression von Cyclophilinen oder den Abbau der Inhibitoren beeinflussen könnten [280].

Der Versuch, gegenüber CsA resistente Influenza A-Viren durch serielle Passage zu erzeugen, gelang Ma et al. in ihrem 2016 veröffentlichten Paper nicht. Passagierte Viruspopulationen und Kontrollen zeigten hier keine Unterschiede im Ansprechen auf CsA, eine Kontrollpassage in

Oseltamivir erzeugte hierbei eine mehr als 10-fach verringerte Sensitivität [282]. Gegenüber dem Host-targeting-Antiviral Maraviroc zeigte sich HIV-1 nach Passage um das 40-fache weniger sensitiv, wie von Ratcliff et. al. beschrieben [274]. Eine komplette Resistenz konnten Andreano et al. in SARS-CoV-2 gegenüber neutralisierenden Antikörpern aus Rekonvaleszentenplasmen induzieren [276]. Ebenfalls ausgeprägte Resistenzen konnten bei Larder et al. in HIV gegenüber Zidovudin oder Melnick et al. in Polioviren gegenüber Guanidinhydrochlorid erzeugt werden [268, 273]. Perales et al. induzierten mittels Passage von HCV in Interferon alpha resistente Viruspopulationen, wobei nach der Passage keine Quantifizierung einer Resistenz mittels IC_{50} stattfand. Bemerkenswerterweise präsentierten dort sich auch einige Populationen der Kontrollpassage mit einem gering verminderten Ansprechen auf den Inhibitor. Ähnliches trat auch in einigen der Kontrollpopulationen der Passageexperimente 1 und 3 auf (siehe Abb. 24 b. Abb. 35, z.B. Population B8).

Zusammenfassend zeigt sich die Resistenzentwicklung in den drei Passageexperimenten im Durchschnitt vergleichbar mit ähnlichen Experimenten mit Coronaviren bzw. Nidovirales. Eine komplette oder nahezu vollständige Resistenz konnte nicht induziert werden, was auch insgesamt bei Cyclophilinhibitoren nicht beschrieben ist.

4.3 Virale Fitness in den Passageexperimenten

Umfassend bezeichnet der Begriff „virale Fitness“ die Reproduktionsfähigkeit eines Virus [283]. Sie ist Abhängig von verschiedenen Faktoren und kann im Modell unter Aspekten wie Rezeptor- und Wirtsspezifität, Rezeptoraffinität, Wirts-Immunevasion, Zeitdauer der Infektiosität des Wirts, Tenazität von Virionen, Übertragungswegen oder der Replikationsrate gemessen werden [283]. Unter Laborbedingungen und unter Berücksichtigung der zur Verfügung stehenden Möglichkeiten wurde lediglich die Replikationsrate in Zellkultur, bestimmt mittels qPCR, als Vergleichsmittel zwischen den erzeugten HCoV-NL63-Populationen herangezogen. Die virale Replikationsfähigkeit oder Fitness wird durch resistenzassoziierte Mutationen nicht zwangsläufig eingeschränkt. Govorkova et al. beschrieben dies im Hinblick auf Influenza A-Viren, welche resistent gegenüber Oseltamivir waren. Die virale Fitness der resistenten Populationen war hier gegenüber den Oseltamivir-sensitiven teilweise höher, teilweise niedriger [284].

In den drei für diese Arbeit durchgeführten Passageexperimenten wurde im Anschluss an diese die virale Fitness der passagierten Populationen in jeweils unterschiedlichen Experimenten mit der der Ausgangspopulation verglichen. Den Experimenten gemein war die Messung der Genomäquivalente mittels RT-qPCR aus dem Überstand nach Infektion und der Vergleich dieser mit denen des jeweiligen Inokulums. Andere Aspekte, wie Zytopathologischer Effekt, Plaque-Titration oder Polymeraseaktivität, wie beispielsweise bei Andreano et al. beschrieben [276], wurden hier nicht betrachtet.

Im Anschluss an das erste Passageexperiment standen PPIA-KO-Zellen zur Verfügung, sodass neben der Replikationsfähigkeit selbst auch der Einfluss des Mangels an PPIA-Aktivität untersucht wurde. Die Populationen der Interventionsgruppe zeigten eine 0,35 - 2,2-fache Replikation der Ausgangspopulation (Abb. 38 a)). In PPIA-KO-Zellen erreichten diese nur noch eine relative Replikation von 0,25 - 0,64 (Abb. 38 b)). In allen untersuchten Viruspopulationen ist die Population unter Abwesenheit von PPIA vermindert (Abb. 38 c))

Die Fitness der Viruspopulationen nach dem zweiten Passageexperiment wurde über drei Tage post infectionem betrachtet. Hier stellt sich im Vergleich zur Ausgangspopulation eine über die Zeit zunehmend verminderte Replikation dar. Bei initial noch sehr ähnlichen Werten wiesen die Populationen der Interventionsgruppe nach 72 Stunden noch ein 0,34 bis 0,54-faches der Genomäquivalente im Überstand auf (siehe Abb. 40).

Passageexperiment 3 beinhaltete die meisten untersuchten Populationen. Hier wurde die Replikationsfähigkeit im Rahmen der Inhibitionsergebnisse bestimmt. Die Ethanolkontrolle der jeweiligen Population wurde dabei immer mit dem zugehörigen Inokulum ins Verhältnis gesetzt. Bemerkenswerterweise war die ermittelte Replikationsrate in allen passagierten Populationen höher als im Ausgangsstock. Die Interventionsgruppe erbrachte im Mittel das 13,8-fache an Genomäquivalenten, die Kontrollpassagen das 7-fache. Der Unterschied zwischen Intervention und Kontrolle zeigte sich zudem statistisch signifikant ($p=0,0028$), dargestellt in Abb. 41 und 42.

In vielen der aufgeführten Passageexperimente war die virale Fitness ebenfalls untersucht worden. Die Coronaviren MHV und 229E, in welchen durch Agostini et al. sowie Lundin et al. eine Resistenz gegenüber Remdesivir bzw. K22 induziert worden war, zeigten sich in ihrer Fitness gegenüber den Ausgangspopulationen reduziert. Im Falle des von Lundin et al. beschriebenen 229E sogar bis um das 34-fache nach 48 h p.i. [174, 275].

Die von Perales et al. unter Cyclophilin-Inhibitoren passagierten HCV-Replikons zeigten im Anschluss eine um 50-75 % reduzierte Replikationsrate, die Replikons von Gallay et al. wiesen eine kaum veränderte Fitness auf [271].

Von de Wilde et al. erzeugte rekombinante EAV, welche eine Resistenz gegenüber CsA aufwiesen, zeigten eine um etwa 60 % reduzierte Fitness [279]. Die von Andreano et al. beschriebene SARS-CoV-2-Population, welche durch Passage resistent gegenüber Antikörpern aus Rekonvaleszentenplasmen geworden war, wies eine im Wesentlichen unveränderte Replikationsfähigkeit auf [276].

Ratcliff et al. beschrieben auch die virale Fitness von HIV-1-Populationen nach Resistenzinduktion gegenüber dem Entryinhibitor Maraviroc. Hier zeigte sich die Replikationsfähigkeit von Maraviroc-resistenten Populationen im direkten Vergleich meist stärker als die der -sensitiven Populationen [274].

Insgesamt stellt sich die virale Fitness nach Resistenzinduktion sowohl in den eigenen als auch in den von anderen Autoren beschriebenen Experimenten heterogen dar, wobei nach Resistenzinduktion gegenüber Cyclophilininhibitoren sich die Replikationsfähigkeit häufiger vermindert zeigt. Dies spiegeln auch die Ergebnisse der Passageexperimente 1 und 2 wider. Dem gegenüber stehen die im Anschluss an das Passageexperiment 3 durchgeführten

Untersuchungen, in denen die Populationen der Interventionsgruppe eine durchweg höhere Replikationsrate aufwiesen. Da dies hier auch für die Populationen der Kontrollpassagen zutrifft, ist ebenso eine Anpassung an den Metabolismus der CaCo-2-Zellen zu diskutieren.

4.4 Mutationen und Mutationsschwerpunkte

4.4.1 Basensubstitutionen pro Nukleotid

Wie in den für diese Arbeit durchgeführten Passageexperimenten wurden auch in vielen der beschriebenen im Anschluss Sequenzierungen des viralen Genoms oder seiner Bestandteile durchgeführt, um Erkenntnisse zum molekulargenetischen Hintergrund der Resistenzentwicklung zu erlangen.

Im Passageexperiment 1 traten durchschnittlich $2,92E-04$ Punktmutationen pro Nukleotid ($s.n^{-1}$) auf, in den Passageexperimenten 2 und 3 traten diese mit $1,89E-04 s.n^{-1}$ und $2,25E-04 s.n^{-1}$ mit geringerer Häufigkeit auf. Würde die höhere Anzahl an Passagen in diese Berechnung mit einbezogen, verschwand dieser zunächst signifikante Unterschied, wie in Abb. 50 dargestellt. Für das Coronavirus MHV wird in der Literatur eine Mittlere Mutationsrate von $3,5E-06$ je Nukleotid pro Replikationszyklus angegeben [185, 188].

In den aufgeführten Passageexperimenten wurden die Basensubstitutionen pro Nukleotid nur bei Perales et al. beschrieben. Hier traten in HCV nach 100 Passagen unter Interferon alpha $2,5E-03 s.n^{-1}$ auf [271]. Für HCV wird eine durchschnittliche Mutationsrate von $1,2E-04$ aufgeführt. [185, 285]

Ein direkter Vergleich dieser Mutationsraten ist freilich nicht möglich, jedoch erscheint die in den drei beschriebenen Passageexperimenten nicht außerordentlich hoch oder niedrig.

Am häufigsten wurde in den nach den Passageexperimenten identifizierten Mutationen ein Cytosin gegen ein Uracil ausgetauscht, was am Ehesten der Desaminierung von Cytosin entspricht, wie beispielsweise bei Lindahl et al. beschrieben [286, 287]

4.4.2 Resistenzmutationen in der Literatur

Mittels whole genome sequencing machten Agostini et al. in gegenüber Remdesivir resistenten MHV-Populationen einen Hotspot an Mutationen in für den Replikasekomplex kodierenden Abschnitten, so im Nsp12 (F476L sowie V553L), im Nsp13 (A335V) sowie im S-Protein (A34V und I924T) aus [275].

Lundin et al. identifizierten in CoV-229E-Populationen, welche resistent gegenüber K22 waren, einen Mutationsschwerpunkt im Nsp6 mit zwei wiederholt aufgetretenen Missense-Mutationen (H121L, M159V) [174].

Im SARS-CoV-2 zeigten Andreano et al., dass sich unter dem Einfluss von neutralisierenden Antikörpern Mutationen im S-Protein häuften. Zunächst kam es zur Deletion von F150, dann zu einer Substitution (E484K), schlussendlich zu einer Insertion, welche für 11 Aminosäuren kodierte (248aKTRNKSTSRRE248k). Diese erbrachte dann eine vollständige Resistenz [276].

De Wilde et al. beschrieben mehrere Mutationsschwerpunkte im EAV nach Passage in CsA und ALV. Zum einen waren Transmembrandomänen von Nsp2 und Nsp5 betroffen, welche Teile des Replikasekomplexes der Arteriviren darstellen (H114R im Nsp2 sowie Q21R, Y113H und A134V im Nsp5. Weitere Mutationen lagen in der 5'UTR sowie in den für das Glykoprotein (gp) 2 und 4 kodierenden Abschnitten [279]. GP 2 und 4 bilden als Strukturproteine mit GP3 einen Komplex, welcher u.a. für den Eintritt des Virions in die Wirtszelle relevant ist [288].

Ratcliff et al. zeigten, dass im Rahmen einer Resistenzinduktion gegen den Entryinhibitor Maraviroc Mutationen im GP120, einem Strukturprotein, welches unter anderem die Bindung an die Wirtszelle und den Eintritt in diese vermittelt, auftraten. Insbesondere galt dies für die Substitutionen R117Q, L/G396V sowie N425K [274].

Perales et al. identifizierten im Anschluss an die Passage von HCV in Interferon alpha Mutationen in allen bis auf das Nichtstrukturprotein 4A kodierenden Bereichen. Auch hier traten solche sowohl in der Interventionsgruppe als auch in den Kontrollpopulationen auf, wie N34D, N17D sowie Y618F im Nichtstrukturprotein 3.

In HCV-Replikons stellten Arai et al. nach Resistenzinduktion gegenüber CsA Mutationen in Ns3 (T1280I), Ns4a (V1681A) sowie im Ns5A (D2303H, S2362G und E2414K) dar [289]. Galloway

et al. identifizierten Mutationen im Ns5a (D320e sowie Y321N) nach Resistenzinduktion in Cyclophilinhibitoren [280].

4.4.3 Mutationsanalyse nach den Passageexperimenten

Die in den durch die Passageexperimente 1-3 erstellten Viruspopulationen konnten mittels Next generation sequencing auf Mutationen hin untersucht. Über alle Viruspopulationen hinweg wurden insgesamt 363 verschiedene Mutationen identifiziert, wovon 227 Mutationen einen Einfluss auf die lokale Aminosäuresequenz hatten.

Einige der Mutationen traten nur in Populationen der Interventionsgruppe, andere nur in den Kontrollen oder beiden Gruppen auf. Durchschnittlich traten die Mutationen mit einer Allelfrequenz von 28 % auf.

Besonderes Interesse weckten die Mutationen, welche sich im Anschluss an verschiedene Passageexperimente zeigten. Diese sind in Tabelle 29 aufgeführt. Von acht dieser Missense-Mutationen liegen vier im für das Nsp1 kodierenden Bereich (D13G; A46V; S79F; Y96C). Weitere Mutationen betreffen das Nsp3 (I582V), das S-Protein (S1304F), das Protein 3 (L42F) sowie das N-Protein (L220F).

Betrachtet man die NL63-Viruspopulationen mit hoher Resistenz gegenüber den Cyclophilinhibitoren, so lässt sich auch in diesen eine Mutation im Nsp1 (D13G) sowie eine im S-Protein (S1304F) wiederholt identifizieren (siehe Tabelle 31 f.). D13G im Nsp1 ist bisher nicht in der Literatur beschrieben [290]. Mittels pubmed BLAST wurde ein Alignment der Aminosäureabfolge der Nsp1 von NL63 und SARS-CoV-2 durchgeführt (siehe Abb. 51). Interessanterweise markiert das Aspartat an Position 13 den Beginn einer, wenn auch schwach ausgeprägten, Konsensussequenz mit dem Nsp1 von SARS-CoV-2 und anderen Betacoronaviren, wie beispielsweise bei Min et al. beschrieben [258]. Weitere Übereinstimmungen konnten nicht identifiziert werden.

Die Mutation S1304F ist zwar im HCoV-NL63 bisher nicht veröffentlicht, jedoch zeigt sich nach Überprüfung mittels BLAST (NCBI) die Aminosäure Phenylalanin in der entsprechenden Region im S-Protein des Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), wie in Abb. 52 dargestellt [259-261]. In beiden Fällen ist die Transmembrandomäne der S2-Domäne im Spike-Protein des jeweiligen Virus betroffen [240, 291, 292].

Auch die wiederholt auftretenden Mutationen A46V, S79F sowie Y96C im Nsp1 sind bisher nicht veröffentlicht worden [293-295]. Die Mutation I582V im Nsp3 befindet sich zwischen dem für die Macro- oder X-Domäne und dem für die PLP2 kodierenden Abschnitt [296]. Auch diese ist bisher noch nicht beschrieben worden [297]. Der Basenaustausch L43F im ORF3 trifft die N-terminale Transmembrandomäne des Protein 3 [298]. In der Literatur ist dieser bis dato nicht erwähnt worden [299]. Das Leucin 220 im Nucleocapsid-Protein, das vom Austausch L220F betroffen ist, steht kurz vor dem Beginn der C-terminalen Domäne des N-Proteins [300]. Diese Basensubstitution ist bereits von Kim et al. im mit CN/0601/14 bezeichneten Stamm, welcher in Südkorea isoliert worden war, identifiziert worden [301].

Im Rahmen der Passageexperimente sind eine Vielzahl an Mutationen in den Kontrollpassagen aufgetreten. Besonders bemerkenswert ist die Mutation A587V im Nsp3, welche sich in allen drei Passageexperimenten in 32 von 34 Populationen mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 65 % präsentierte. Diese Mutation, welche höchstwahrscheinlich einen Reproduktionsvorteil bietet, ist bereits von Fouchier et al. 2004 beschrieben worden. Identifiziert war das Virus in einer schon 1988 in den Niederlanden asservierten cDNA-Probe eines 8 Monate alten Patienten mit Pneumonie [302]. Dies spricht für eine Verbreitung dieser Variante unter freien Bedingungen. Viele weitere der wiederkehrenden Mutationen in Kontrollpassage sind in der S1- sowie S2-Domäne des S-Proteins lokalisiert, wie in Tabelle 30 ersichtlich [291].

In Anbetracht der PPIase-Aktivität der Cyclophiline sind Mutationen, in welchen ein Prolin teil der Substitution ist, ebenfalls von Interesse. Wiederkehrend zeigten sich hier keine in verschiedenen Passageexperimenten, in den einzelnen konnten vier Mutationen ausgemacht werden. Im ersten Passageexperiment traten im Nsp1 die Mutationen P24S in p25|3.1-ALV sowie P77S in p25|3.2-CsA auf. Im Passageexperiment 2 war die Mutation S15P im E-Protein in den Populationen p15.1 und p15.2 anzutreffen. Das S-Protein wies mit T359P eine Mutation in Population A1 des dritten Passageexperiments auf (siehe Tabelle 21, 23 und 25).

Sehr eindeutig zeigten sich die Ergebnisse zur Mutationsdichte in den einzelnen für Proteine kodierenden Abschnitten des NL63-Genoms. Nach Gewichtung der Länge des jeweiligen Abschnitts imponierte ein ausgeprägter Unterschied zwischen den Populationen der

Interventionsgruppe und den Kontrollen. Wiederholt in den einzelnen Passageexperimenten und folglich auch durchschnittlich präsentierte sich für die unter dem Einfluss von Cyclophilinhibitoren passagierten Viruspopulationen der Schwerpunkt der Mutationen im für das Nsp1 kodierenden Abschnitt des ORF1a. Dies ist besonders dahingehend interessant, als die Entdeckung von Cyclosporin A als Pan-Coronavirus Inhibitor über die besonders auffällige Interaktion von zellulären Cyclophilinen mit dem Nsp1 Protein des SARS-CoV(-1) in einem ungerichteten Hefe-2-Hybrid Protein-Protein Interaktionscreening des viralen Orfeoms mit humanen cDNA Banken gelang (Pfefferle et al., 2011) [193]. Im Kontrast dazu zeigte sich in den Kontrollpopulationen eine erhöhte Mutationsdichte in den für das Nsp9 sowie für das Envelope-Protein kodierenden Regionen. Die Mutationsdichte im Nsp1 zeigte sich dabei auch statistisch signifikant unterschiedlich zwischen Intervention und Kontrolle ($p < 0,000001$), während dies nicht für die anderen kodierenden Regionen im NL63-Genom dargestellt werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine rekombinanten Coronaviren erstellt, mit welchen dann der Einfluss einer oder die Kombination mehrerer bestimmter Mutationen auf die Sensitivität gegenüber den Cyclophilinhibitoren getestet werden könnte. Agostini et al., de Wilde et al., Gally et al. und Lundin et al. hatten dies im Anschluss an die Resistenzinduktion in ihren Veröffentlichungen durchgeführt [174, 275, 280, 303]. Obschon die in den Tabellen 29 sowie 31 ff. aufgeführten Mutationen wiederholt nur in Viruspopulationen der Interventionsgruppe aufgetreten sind, ist ein Zusammenhang zu einer Resistenz damit nicht belegt, weshalb an dieser Stelle nicht weiter auf diese einzelnen resistenzassoziierten Mutationen eingegangen wird.

Der ausgeprägte und statistisch signifikante Mutationsschwerpunkt im Nsp1 weist jedoch deutlich auf die Relevanz dieses Proteins für eine Resistenzentwicklung gegenüber Cyclophilinhibitoren hin.

4.5 Limitationen dieser Arbeit

Wie so oft lassen sich auch in der vorliegenden Arbeit nicht alle Fragen zur Gänze klären. Durch serielle Passageexperimente lassen sich zwar Mutationen, welche eine Resistenz bewirken, induzieren und dann identifizieren, jedoch ist Geschwindigkeit einer solchen Resistenzentwicklung damit nicht bestimmbar [304]. Die Passage von Viren in Zellkultur lässt zudem Aspekte der Immunantwort des Wirtsorganismus unberücksichtigt.

Die verschiedenen Passageexperimente unterschieden sich deutlich in ihrem Design, insbesondere die Untersuchungen zur viralen Fitness wichen dabei untereinander deutlich ab, sodass hier die Vergleichbarkeit nur eingeschränkt möglich ist.

Natürlich bedingt auch die im ersten Passageexperiment identifizierte Mykoplasmen-Kontamination eine Einschränkung hinsichtlich der Verwertbarkeit der Ergebnisse. Durch die Alteration des zellulären Stoffwechsels, wie u.a. von Miller et al. beschrieben [305], ist es durchaus möglich, dass die Resistenzentwicklung in den passagierten Viruspopulationen beeinflusst worden war. Bemerkenswerterweise zeigten sich die Virus-Titer der kontaminierten Überstände höher als in denen der im späteren Verlauf durchgeführten Experimente. Die im Vergleich zu den anderen beiden Passageexperimenten höhere Basenaustauschfrequenz (siehe Abb. 50) ist am ehesten durch die höhere Anzahl an Passagen zu erklären, eine Beteiligung der Mykoplasmen hieran lässt sich freilich nicht ausschließen. Ein direkter Einfluss der Mykoplasmen auf die Experimente zur Sensitivitätstestung der Viruspopulationen im Anschluss an das erste Passageexperiment kann jedoch durch die effektive und nachgewiesene Mykoplasmen-Eradikation (siehe Kapitel 2.8.9 Eradikation der Mykoplasmen-Kontamination und Abschluss der Passage) mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Der sichere Effekt einzelner Mutationen auf die Resistenzentwicklung gegenüber Cyclophilinhibitoren kann nur mit Hilfe rekombinanter Coronaviren dargestellt werden, welche nur diese Mutationen tragen. Durch das Aufkommen weiterer Mutationen in den Kontrollpassagen ohne Selektionsdruck durch Inhibitoren zeigt sich, dass auch mit weiteren Änderungen des Genoms zusätzlich zur gewünschten zu rechnen ist. Diese können dann im Sinne eines Mediator- oder Moderatoreffekts diese Auswirkung verschleiern. Eine Vereinzelung von Viren ist zwar beispielsweise mittels Plaque-Isolation [225] möglich, jedoch müssen diese wiederum für Sequenzierung und Folgeexperimente propagiert werden, was

wiederum zu Mutationen führen kann. So kann diese Frage zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Auch im Allgemeinen wäre es möglicherweise sinnvoll, beim Propagieren von Virus-Stocks das Aufkommen von Mutationen und deren Einfluss zu berücksichtigen. Ein wiederholtes Sequenzieren von Stocks wäre dabei jedoch mit großem zeitlichem Aufwand und erheblichen Kosten verbunden.

4.6 Synopse und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, durch serielle Passage in Zellkultur NL63-Viruspopulationen mit verringerter Sensitivität gegenüber Cyclophilininhibitoren zu erzeugen. Zwar konnten einige wiederholt vorkommende Resistenzmutationen wie D13G, A46V, S79F sowie Y96C im Nsp1 identifiziert werden, jedoch müssten rekombinante, genau diese Mutationen tragende Viren erstellt werden, um die Auswirkung der Mutationen prüfen zu können. Dieser Ansatz kann in zukünftigen Arbeiten verfolgt werden. Hierbei könnten die derzeit am Anfang stehenden Methoden des *Third Generation Sequencing* ausreichend lange Genabschnitte lesen, um so auch das komplette coronavirale Genom abdecken zu können [306]. Der eindrückliche Mutationsschwerpunkt im für das Nsp1 codierenden Genomabschnitt, welcher sich nur in Viruspopulationen der Interventionsgruppe zeigte, macht die Relevanz dieses Proteins für die Resistenz gegenüber Cyclophilininhibitoren deutlich.

Coronaviren üben derzeit weltweit einen immensen Einfluss auf Gesundheit, Ökonomie und Ökologie aus. Wirtszellspezifische antivirale Wirkstoffe hätten angesichts noch unbekannter (Corona-)Viren mit humanpathogenem Potenzial den Vorteil, nicht in dem gleichen Maße wie direkt wirkende Substanzen auf das Ziel zugeschnitten sein zu müssen. Insgesamt besteht weiter dringender Bedarf an der Erforschung neuer antiviraler Wirkmechanismen.

5 Anhang

5.1 Verwendete Materialien und Software

5.1.1 Reagenzien

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller	Sitz	Land	Bestell-Nr.
Agar-Agar	Agar-Agar, Kobe I, Kobe I, pulv., für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	5210.2
Agarose	Agarose SERVA for DNA electrophoresis, research grade	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg	DE	11404
Alisporivir	ALV, MW: 1216.67 g/Mol / SRC: 85071131	Novartis	Basel	CH	ZA-12-FS46
Ampicillin	Ampicillin sodium salt	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri	USA	A9518-25G
Beta-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol zur Analyse	Merck KGaA	Darmstadt	DE	915 ZA 7689555
Beta-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol BioUltra	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri	USA	63689-25ML-F
BP Clonase II Enzym-Mix	Clonase™ Gateway™ BP Clonase II Enzym-Mix	Invitrogen AG	Carlsbad, Kalifornien	USA	11789100
BSRGI	Bsp1407I (BsrGI) (10 U/μL) (enthält Enzym und Reaktionspuffer "10x buffer Tango")	Thermo Scientific	Rockford, Illinois	USA	ER0932
Crimson DNA-Polymerase	Crimson TaqDNA Polymerase (enthält Polymerase und 5x Crimson reaction buffer)	New England BioLabs®	Ipswich, Massachusetts	USA	M0324S
Cyclosporin A	Cyclosporine A	RTC / SIGMA-ALDRICH	Laramie, Wyoming	USA	PHR1092-500mg
DMEM	gibco® Dulbecco's modified Eagle medium [+] 4.5g/l Glucose, L-Glutamine [-] Pyruvate	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	41965-039
DMEM	gibco® Dulbecco's Modified Eagle Medium [+] 4.5g/l Glucose, Pyruvate [-] L-Glutamine	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	21969-035
Dimethylsulfoxid, DMSO	Dimethylsulfoxide	Biomol GmbH	Hamburg	DE	54686.100

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller	Sitz	Land	Bestell-Nr.
DNA-Leiter	2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb)	New England BioLabs®	Ipswich, Massachusetts	USA	N3200S
DNase freies Wasser	DEPC-behandeltes Wasser	Thermo Scientific	Rockford, Illinois	USA	AM9915G
dNTP MIX	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England BioLabs®	Ipswich, Massachusetts	USA	N0447S
DPBS	gibco® Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [-] CaCl2 [-] MgCl2	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	14190-094
Essigsäure	Essigsäure ROTIPURAN® 100 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	3738.1
ETDA	EDTA Disodium Salt: Dihydrate	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, Missouri	USA	E5134
Ethanol, EtOH	UN1170 Ethanol 510, (Ethylalkohol) mind. 99,8 % vol	Karl-Josef Kost, Alkohole und Produkte aus Alkohol KG	Koblenz	DE	603-002-00-5
Ethanol, EtOH	Ethanol, 1 l, Glas, ≥ 99,5 %, Ph.Eur., reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	5054.1
Fetales Kälberserum, FBS	Fetal Bovine Serum, Standard Quality	PAA Laboratories GmbH	Pasching	AT	A10110-2848
Fetales Kälberserum, FBS	gibco® Fetal Bowine Serum	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	10270-106
Flächendesinfektionsmittel	Bacillol AF	Paul Hartmann AG	Heidenheim an der Brenz	DE	973380
Gelextraktions-Kit	mi- Gel Extraction Kit, 250 preps (enthält die Puffer (GEX, WN, WS))	metabion	Planegg	DE	mi-GEL250
Gentamicin	Gentamicinsulfat >= 590 I.U./mg, für die Biochemie	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	0233.3
Hefeextrakt	Hefeextrakt, pulv., für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	2363.3
Ladepuffer	Gel Loading Dye Purple (6x)	New England BioLabs®	Ipswich, Massachusetts	USA	B7024S
Lipofectamine	Lipofectamine® 3000 Transfection Kit	Invitrogen AG	Carlsbad, Kalifornien	USA	L3000-015

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller	Sitz	Land	Bestell-Nr.
LR Clonase II Enzym-Mix	Clonase™ Gateway™ LR Clonase II Enzym-Mix	Invitrogen AG	Carlsbad, Kalifornien	USA	11791100
MEM NEAA	gibco® Minimal Essential Medium Non Essential Amino Acids	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	11140-035
MEM Natrium Pyruvate	Gibco® Natrium Pyruvate Solution 100mM	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	11360-070
Midori Green Advanced	Midori Green Advanced DNA Stain	Biozym Biotech Trading GmbH	Wien	AT	617004
Miniprep Kit	mi-Plasmid Miniprep Kit, 250 preps (enthält die Puffer MX1, MX2, MX3, WN, WS und RNase A	metabion	Planegg	DE	mi-PMN-250
Myco-1&2 Set	Myco-1&2 Set	AppliChem GmbH	Darmstadt	DE	A8360
Myco-3	myco3	AppliChem GmbH	Darmstadt	DE	A5240
Natriumchlorid	Natriumchlorid, >/=99,9 %, CELLPURE®	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	HN00.2
Natriumhydroxid	Natriumhydroxid, >/=98 %, Ph.Eur., BP, NF	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	P031.2
NIM811	NIM811, MW 1202.64 g/Mol / SRC: 84358929	Novartis	Basel	CH	JC-15-MC16
Opti-MEM	gibco® Opti-MEM® (1X) Reduced Serum Medium	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	31985-047
Penicillin/Streptomycin	gibco® 10000 U/ml Penicillin; 10000 µg/ml Streptomycin	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	15140-122
Reverse Transkriptase	SuperScript™ II Reverse Transcriptase (enthält reverse Transkriptase, first strand buffer, 0,1 M DTT)	Invitrogen AG	Carlsbad, Kalifornien	USA	18064-014
RNA-Isolations-Kit (enthält die Puffer RLY, MEM, RDN, RW1, RW2, DNase 1 und RNase-freies Wasser)	ISOLATE II RNA Mini Kit, 250 Preps	Bioline Reagents Limited	London	GB	BIO-52073

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller	Sitz	Land	Bestell-Nr.
RT-qPCR Kit	SensiFast™ Probe Hi-ROX One-Step Kit	Bioline Reagents Limited	London	GB	BIO-77005
Salzsäure	Salzsäure 32 % ROTIPURAN® p.a., ISO	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	P074.1
Steriles Wasser	Ampuwa®, Steriles Wasser für Spülzwecke	Fresenius Kabi	Bad Homburg vor der Höhe	DE	1080181
TRIS	TRIS PUFFERAN® ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	4855.2
TRIzol®	ambion® TRIzol® Reagent	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	15596918
Trypsin-EDTA 0,05 %	gibco® Trypsin-EDTA 0,05 %	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	25300-054
Trypsin-EDTA 0,25 %	gibco® Trypsin-EDTA 0,25 %	Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien	USA	25200-056
Trypton/Pepton	Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	8952.2

Tabelle 34: Für diese Arbeit verwendete Reagenzien und Kits

5.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller	Sitz	Land	Bestell-Nr.
10 cm-Zellkulturschale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	DE	83.3902
175 cm ² Zellkulturflasche	Falcon® 175cm ² Rectangular Straight Neck Cell Culture Flask with Vented Cap	Corning Inc.	Corning, NY	USA	353112
Abwurfbox	E-SAFE® Standard	Udo Heisig GmbH	Putzbrunn	DE	46200
Deckgläser	Deckgläser Ø 12 mm	Menzel GmbH & Co KG	Braunschweig	DE	Ø 12 mm # 1
Einfrierröhrchen	2 ml Expell Cryo Tube	CAPP	Nordhausen	DE	5042000C
Einwegskalpell	Cutfix stainless Einmalskalpell #11	Aesculap AG	Tuttlingen	DE	5518040

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller	Sitz	Land	Bestell-Nr.
Filter Pipettenspitze	Biosphere® Filter Tips 0.1-10 µl -Low Retention-	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	DE	70.1130.215
Filter Pipettenspitze	Biosphere® Filter Tips 2-20 µl	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	DE	70.760.213
Filter Pipettenspitze	Biosphere® Filter Tips 100-1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	DE	70.762.211
Filter Pipettenspitze	Biosphere® Filter Tips 2-200 µl	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	DE	70.760.211
Laborhandschuhe	Safegrip® Puderfreie Laborhandschuhe S	Süd-Laborbedarf GmbH	Gauting	DE	46 L200S
Laborhandschuhe	Safegrip® Puderfreie Laborhandschuhe M	Süd-Laborbedarf GmbH	Gauting	DE	46 L300M
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg	DE	30120086
Mikroreaktionsgefäß 2,0 ml	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg	DE	30120094
Objektträger	Objektträger Kanten geschliffen 90°, Mit Mattrand	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	DE	H870.1
PARAFILM®	PARAFILM® "M" Laboratory Film	Bemis	Neenah, Wisconsin	USA	#PM996
PCR-Reaktionsgefäß	0,2 ml PCR-Gefäße farblos	BRAND GMBH + CO KG	Wertheim	DE	781305
Petrischale	Petri dish, 94x16, with vents, with logo, light version	greiner bio-one	Kremsmünster	AT	633180
Pipette 10 ml	costar® stripette® 10ml	Corning Inc.	Corning, New York	USA	4488
Pipette 25 ml	costar® stripette® 25ml	Corning Inc.	Corning, New York	USA	4489
Pipette 5 ml	costar® stripette® 5ml	Corning Inc.	Corning, New York	USA	4487
Pipette 50 ml	costar® stripette® 50ml	Corning Inc.	Corning, New York	USA	4490
Pipettenspitze	Brand 1000 µl PLASTIBRAND®	BRAND GMBH + CO KG	Wertheim	DE	G209-3

Bezeichnung im Text	Produktbezeichnung	Hersteller	Sitz	Land	Bestell-Nr.
Pipettenspitze	Pipettenspitze 10µl, farblos	Sarstedt	Nümbrecht	DE	70.1130
Pipettenspitze	Pipettenspitze 200µl	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	DE	70-760.002
qPCR-Platte	Light Cycler® 480 Multiwell Plate 96, white, with cover foil	Roche	Basel	CH	04 729 692 001
Zellkulturplatte 12 Loch	costar® 12 Well Cell Culture Cluster	Corning Inc.	Corning, New York	USA	3513
Zellkulturplatte 24 Loch	costar® 24 Well Cell Culture Cluster	Corning Inc.	Corning, New York	USA	3524
Zellkulturplatte 48 Loch	costar® 48 Well Cell Culture Cluster	Corning Inc.	Corning, New York	USA	3548
Zellkulturplatte 6 Loch	costar® 6 Well Cell Culture Cluster	Corning Inc.	Corning, New York	USA	3516
Zellkulturplatte 96 Loch	Nunclon™ Surface Tissue culture plate, 96 well	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts	USA	167008
Zellkulturplatte 96 Loch	Falcon® Tissue culture plate, 96 well	Corning Inc.	Corning, NY	USA	353072
Zentrifugenröhrchen 15ml	Cellstar® Tubes 15ml	greiner bio- one	Kremsmünster	AT	188 271
Zentrifugenröhrchen 50ml	Cellstar® Tubes 50ml	greiner bio- one	Kremsmünster	AT	227 261

Tabelle 35: Für diese Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

5.1.3 Biologische Materialien

Bezeichnung im Text	Biologische Sicherheitsstufe	Bezug
CaCo-2-Zellen	1	Laborbestand
CaCo-2-Zellen	1	AG Müller, Charité Berlin
CaCo-2-Zellen	1	DSMZ - Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DE, ACC 169
HCoV-NL63	2	Laborbestand
HCoV-NL63	2	AG Müller, Charité Berlin
HEK293-Zellen	1	Laborbestand
LLC-MK2-Zellen	1	AG Müller, Charité Berlin

Tabelle 36: Für diese Arbeit verwendete biologische Materialien

5.1.4 Gebrauchsmaterialien und Geräte

Bezeichnung	Produktbezeichnung	Hersteller/Fachhandel	Betriebssitz	Land
Bakterieninkubator	15115300002020	WTC Binder	Tuttlingen	DE
Biologische Sicherheitswerkbank Klasse 2	BDK S 1500; DIN EN 12 469	BDK - Luft- und Reinraumtechnik GmbH	Sonnenbühl	DE
Feinwaage	BP 615	Sartorius AG	Göttingen	DE
Fluoreszenz-mikroskop	LEICA DMI400 B	Leica Camera AG	Wetzlar	DE
GeneAmp® PCR System	GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems	Waltham, Massachusetts	USA
Inkubations-Schüttelmaschine	ISF-1-W	Adolf Kühner AG	Birsfelden	CH
Kamera Gelelektrophorese	Biorad Gel Doc XR System	Bio-Rad	Hercules, Kalifornien	USA
Kamera Mikroskop	DFC345FX	Leica Camera AG	Wetzlar	DE
Kamera Mikroskop	DFC360FX	Leica Camera AG	Wetzlar	DE
Lichtmikroskop Zellkultur	Axiovert 25	Carl Zeiss AG	Oberkochen	DE
Luftpolster-mehrkanalpipette	PIPETMAN L Multichannel P8x300L	Gilson Incorporated	Middleton, WI	USA

Bezeichnung	Produktbezeichnung	Hersteller/Fachhandel	Betriebssitz	Land
Luftpolsterpipette 10 µl	Eppendorf Research	Eppendorf AG	Hamburg	DE
Luftpolsterpipette 10 µl	PIPETMAN Classic P10	Gilson Incorporated	Middleton, WI	USA
Luftpolsterpipette 1000 µl	PIPETMAN Classic P1000	Gilson Incorporated	Middleton, WI	USA
Luftpolsterpipette 2 µl	PIPETMAN Classic P2	Gilson Incorporated	Middleton, WI	USA
Luftpolsterpipette 20 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG	Hamburg	DE
Luftpolsterpipette 20 µl	PIPETMAN Classic P20	Gilson Incorporated	Middleton, WI	USA
Luftpolsterpipette 200 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG	Hamburg	DE
Luftpolsterpipette 200 µl	PIPETMAN Classic P200	Gilson Incorporated	Middleton, WI	USA
Magnetrührer mit Glaseramikheizplatte	SU1300	Labdiscount GmbH	Mannheim	DE
Nanodrop Spectrometer	NanoDrop® ND-1000 UV- Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific	Rockford, Illinois	USA
Netzgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech	Uppsala	SW
Netzgerät	PowerPac Basic	Bio-Rad	Hercules, Kalifornien	USA
Objektiv	HCX PL FLUOTAR 10x/0.30 PH1	Leica Camera AG	Wetzlar	DE
Objektiv	HCX PL FLUOTAR 40x/0.75 PH2	Leica Camera AG	Wetzlar	DE
Objektiv	HCX PL FLUOTAR L 20x/0.40 CORR	Leica Camera AG	Wetzlar	DE
Okular	HC PLAN s 10x/22	Leica Camera AG	Wetzlar	DE
Ölimmersions- objektiv	HCX-PL-APO-CS63.0x1.40 OIL PH 3 CS Objective	Leica Camera AG	Wetzlar	DE
Pipettierhilfe	ClearLine® Pipette Controller	Kisker Biotech GmbH & Co. KG	Steinfurt	DE
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu 2	Integra Biosciences AG	Zizers	CH
qPCR Automat	LightCycler® 96 Instrument	Roche	Basel	CH
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg	DE
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf AG	Hamburg	DE

Bezeichnung	Produktbezeichnung	Hersteller/Fachhandel	Betriebssitz	Land
Tischkühlzentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG	Hamburg	DE
Tischkühlzentrifuge	6K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz	DE
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417 C	Eppendorf AG	Hamburg	DE
Vakuumpumpe	BVC 21	VACUUBRAND GMBH + CO KG	Wertheim	DE
Vakuumpumpe	BVC professional	VACUUBRAND GMBH + CO KG	Wertheim	DE
Vortexer	Vortex Genie 2, G-560E	Scientific Industries Inc.	Bohemia, N.Y.	USA
Waage	CP 4202 S	Sartorius AG	Göttingen	DE
Wasserbad	GFL Typ 1002	LAUDA-GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel	DE
Zellkulturinkubator CO ₂	Hera Cell 150	Thermo Electron Corporation	Waltham, Massachusetts	USA
Zellkulturinkubator CO ₂	Heraeus Function Line BB16	Thermo Electron Corporation	Waltham, Massachusetts	USA
Zellkulturmikroskop mit Kamera	LEICA DM400 B	Leica Camera AG	Wetzlar	DE
Zentrifuge Zellkultur	Rotanda 460 (Rotor 5624)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen	DE

Tabelle 37: Für diese Arbeit verwendete Gebrauchsmaterialien und Geräte

5.1.5 Verwendete Software

Produktbezeichnung	Version	Hersteller	Betriebssitz	Land
Bowtie 2	2.1.0	University of Maryland	College Park, Maryland	USA
Endnote X9	9.3.3	Clarivate Analytics	Philadelphia, Pennsylvania	USA
GraphPad Prism 5	5.01	GraphPad Software	San Diego, Kalifornien	USA
GraphPad Prism 9	9.1.2 (121)	GraphPad Software	San Diego, Kalifornien	USA
Integrative Genomics Viewer (IGV)	2.9.4	Broad Institute	Cambridge, Massachusetts	USA
Leica Application Suite	4.3.0	Leica Microsystems CMS GmbH	Mannheim	DE
Leica Application Suite Advanced Fluorescence	2.6.07266	Leica Microsystems CMS GmbH	Mannheim	DE
Leica Application Suite X	3.7.2.22383	Leica Microsystems CMS GmbH	Mannheim	DE
LightCycler® Software Instrument	1.01.00.0045	Roche	Basel	CH
LightCycler® Software PC	1.1.0.1320	Roche	Basel	CH
LoFreq	2.1.3.1	Genome Institute of Singapore	Singapur	SGP
Microsoft® Excel® 2010	14.0.7257.599	Microsoft Corporation	Redmond, Washington	USA
Microsoft® Excel® 2016 Home and Student	16.0.13029.20232	Microsoft Corporation	Redmond, Washington	USA
Microsoft Paint 3D	6.2009	Microsoft Corporation	Redmond, Washington	USA
Nanodrop®	3.5.2	Thermo Scientific	Rockford, Illinois	USA
SnapGene®	5.2	GSL Biotech LLC	Chicago, Illinois	USA
Tablet®	1.21.02.08	James Hutton Institute	Dundee	GB

Tabelle 38: Für diese Arbeit verwendete Software

5.2 Programmeinstellungen für die HCoV-NL63-RT-qPCR im LightCycler® 96

Detection Format

Channel	Dye	Quant Factor	Melt Factor	Integration Time [s]
470/514	FAM	10.00	1.20	1.00

Integration Time: Dynamic

Reaction Volume: 10 µl

Programs

Preincubation , 1 Cycles

Description	Aquisition	Ramp Rate
45°C for 1200 s	None	4.4
95°C for 600 s	None	4.4

2 Step Amplification , 45 Cycles

Description	Aquisition	Ramp Rate
95°C for 15 s	None	4.4
60°C for 30 s	Single	2.2

Temperature Profile



Abb. 53: Programmeinstellungen zur HCoV-NL63-RT-qPCR aus der LightCycler® 96 Software, Version 1.1.0.1320 (Screenshot)

5.3 Genomäquivalente der Viruspopulationen in Passageexperiment 3

Population	GE/ml	Population	GE/ml	Population	GE/ml
P05-A1	5,8E+03	P05-B1	4,4E+03	P05-C1	4,5E+03
P05-A2	8,6E+03	P05-B2	7,7E+03	P05-C2	5,9E+03
P05-A3	5,7E+03	P05-B3	5,6E+03	P05-C3	8,3E+03
P05-A4	6,2E+03	P05-B4	6,9E+03	P05-C4	1,0E+04
P05-A5	4,0E+03	P05-B5	5,5E+03	P05-C5	4,7E+03
P05-A6	5,5E+03	P05-B6	4,8E+03	P05-C6	3,9E+03
P05-A7	5,0E+03	P05-B7	5,9E+03	P05-C7	6,1E+03
P05-A8	5,6E+03	P05-B8	7,5E+03	P05-C8	6,0E+03

Tabelle 39: HCoV-NL63-Genomäquivalente (GE) in den Überständen der einzelnen Viruspopulationen in Passage 5 (P05) des Passageexperimentes 3. Die Populationen sind mit dem Buchstaben des parallel laufenden Satzes A, B oder C sowie einer Zahl, welche für den zugesetzten Inhibitor steht (1,2=ALV; 3,4 = CsA; 5,6=NIM811; 7=EtOH; 8=Medium), benannt.

Population	GE/ml	Population	GE/ml	Population	GE/ml
P10-A1	1,0E+04	P10-B1	1,1E+04	P10-C1	8,8E+03
P10-A2	7,4E+03	P10-B2	1,1E+04	P10-C2	5,2E+03
P10-A3	1,3E+04	P10-B3	5,7E+04	P10-C3	1,4E+04
P10-A4	1,7E+04	P10-B4	1,5E+04	P10-C4	8,2E+03
P10-A5	8,8E+03	P10-B5	8,9E+03	P10-C5	5,5E+03
P10-A6	8,7E+03	P10-B6	1,6E+04	P10-C6	5,0E+03
P10-A7	6,3E+03	P10-B7	5,5E+04	P10-C7	1,5E+04
P10-A8	1,2E+04	P10-B8	2,9E+04	P10-C8	5,2E+03

Tabelle 40: HCoV-NL63-Genomäquivalente (GE) in den Überständen der einzelnen Viruspopulationen in Passage 10 (P10) des Passageexperimentes 3. Die Populationen sind mit dem Buchstaben des parallel laufenden Satzes A, B oder C sowie einer Zahl, welche für den zugesetzten Inhibitor steht (1,2=ALV; 3,4 = CsA; 5,6=NIM811; 7=EtOH; 8=Medium), benannt.

5.4. Verwendete Barcodes und Einstellungen für das NGS

5.4.1 Verwendete Barcodes für das Illumina-NGS

Barcodes NGS NL63 serial passage experiment I

First sequencing:

datasets:	lane8_R1.fastq	fastqsanger	9.4 GB	09.11.2017
	lane8_R2.fastq	fastqsanger - index read	2.4 GB	09.11.2017
	lane5_R1.fastq	fastqsanger	9.6 GB	11.10.2017
	lane5_R2.fastq	fastqsanger - index read	1.6 GB	11.10.2017
	lane5_R3.fastq	fastqsanger - used	1.2 GB	11.10.2017

sample name	passage	cultivated in	date	barcode
NL63 stock 5/17	no passage	culture medium	03.05.2017	GTGTTA
stock passage EtOH	stock derived from passage 7+1	EtOH 0,1%	07.08.2017	TGTGAA
stock NL63 ALVres 1	stock derived from passage 7+1	ALV 7,5µM	08.08.2017	ACAAAC

Second sequencing:

datasets:	lane4_R1.fastq	fastqsanger	16.3 GB	08.03.2018
	lane4_R2.fastq	fastqsanger - index read	2.4 GB	08.03.2018

sample name	passage	cultivated in	date	barcode
p0wt	3 treatment cycles	culture medium + myco1/2 1%	28.01.2018	TGTTGC
p25.1	25 passages + 3 treatment cycles	ALV 10µM + myco1/2 1%	28.01.2018	ACACGA
p25.2	25 passages + 3 treatment cycles	ALV 10µM + myco1/2 1%	28.01.2018	CACACA
p25.3	25 passages + 3 treatment cycles	CsA 10µM + myco1/2 1%	28.01.2018	GTGTTA
p25.5	25 passages + 3 treatment cycles	NIM811 10µM + myco1/2 1%	28.01.2018	TGTGAA
p25.6	25 passages + 3 treatment cycles	NIM811 10µM + myco1/2 1%	28.01.2018	ACAAAC
p25.10	25 passages + 3 treatment cycles	EtOH 0,05% + myco1/2 1%	28.01.2018	CACCTC
p25.11	25 passages + 3 treatment cycles	culture medium + myco1/2 1%	28.01.2018	GTGGCC
C5B7	derived from passage 20+1 +3tc	ALV 10µM + myco1/2 1%	14.02.2018	AAGGGA

Barcodes NGS NL63 serial passage experiment II

datasets:	lane4_R1.fastq	fastqsanger	12.5 GB	03.07.2018
	lane4_R2.fastq	fastqsanger - index read	3.3 GB	03.07.2018

sample name	passage	cultivated in	date	barcode
p0wtBerlin1	no passage	culture medium	21.02.2018	TGTTGC
p10.1	10 passages	ALV 15µM	15.04.2018	TGTGAA
p10.2	10 passages	CsA 15µM	15.04.2018	ACAAAC
p10.3	10 passages	NIM811 15µM	15.04.2018	CACCTC
p10.5	10 passages	EtOH 0,075%	15.04.2018	GTGGCC
p15.1	15 passages	ALV 15µM	22.05.2018	AAGGGA
p15.2	15 passages	CsA 15µM	22.05.2018	CCTTCA
p15.3	15 passages	NIM811 15µM	22.05.2018	GGACCC
p15.4	15 passages	Ribavirin 15µg/ml	22.05.2018	TTCAGC
p15.5	15 passages	EtOH 0,075%	22.05.2018	AAGACG
p15.6	15 passages	culture medium	22.05.2018	CCTCGG

Tabelle 41: Barcodes der Rohdatensätze aus dem Illumina-NGS für die Passageexperimente 1 und 2. Wie in Kapitel 2.12.2 Analyse für die HCoV-NL63 Passageexperimente 1 & 2 beschrieben, sind in der Gesamtheit der Rohdaten, welche im fastq-Format gespeichert wurden, die einzelnen Proben mittels eines Barcodes aus 6 Basen identifizierbar.

5.4.2 Einstellungen der Programme im Galaxy-Portal

Illumina Demultiplex	
Galaxy Tool Version:	1.0.0
Tool Parameters	
Input Parameter	Value
Is it a paired-end run?	Single
Fastq file	[variabel]_R1.fastq
Use Illumina index read for demultiplexing	Yes
Index reads	[variabel].fastq
Filter reads that do NOT contain the barcodes	
Mismatch in Index	1
How many barcodes?	[variabel]
Barcode1	[variabel]
Barcode2	[variabel]
Barcode3	[variabel]
Bowtie2	
Format:	Bam
Tool Parameters	
Input Parameter	Value
Number of processes (threads) used?	8
Is this library mate-paired?	Single
FASTQ file	[variabel]
Write unaligned reads to separate file(s)	False
Will you select a reference genome from your history or use a built-in index?	History
Select the reference genome	[NL63_NCBI_Fasta.txt].fasta
Specify the read group for this file?	No
Parameter Settings	

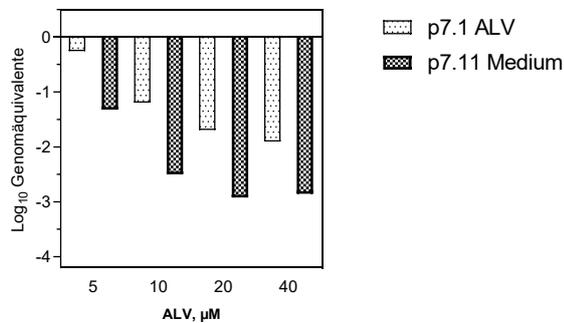
LoFreq Calling Variants	
Tool Parameters	
Input Parameter	Value
Input Bam File	[variabel]
Indexed reference fasta file (gzip supported)	1: [NL63_NCBI_Fasta.txt].fasta
Limit calls to this region (chrom:start-end)	Empty.
List of positions (chr pos) or regions (BED) file	
Skip any base with baseQ smaller than	30
Skip alternate bases with baseQ smaller than	30
Overwrite baseQs of alternate bases (that passed bq filter) with this value (-1: use median ref-bq; 0: keep)	0
Skip any base with joinedQ smaller than	0
Skip alternate bases with joinedQ smaller than	0
Overwrite joinedQs of alternate bases (that passed jq filter) with this value (-1: use median ref-bq; 0: keep)	0
Base-alignment (BAQ) and indel-alignment (IDAQ) qualities Options	Nothing selected.
Skip reads with mapping quality smaller than	0
Cap mapping quality at	0
If >= 0, then replace non-match base qualities with this default value [-1]	0
Test only positions having at least this coverage	1
Cap coverage at this depth	1000000
Don't merge mapping quality in LoFreq's model	True
Ignore variants in this vcf file for source quality computation.	
Indels Options	Nothing selected.
P-Value cutoff / significance level [0.010000]	0.01
Bonferroni factor. 'dynamic' (increase per actually performed test) or INT ['dynamic']	dynamic
Misc Options	Nothing selected.

Tabelle 42: Einstellungen der Programme im Galaxy-Portal für die Auswertung der Rohdaten im Next-Generation-Sequencing der Passageexperimente 1 & 2.

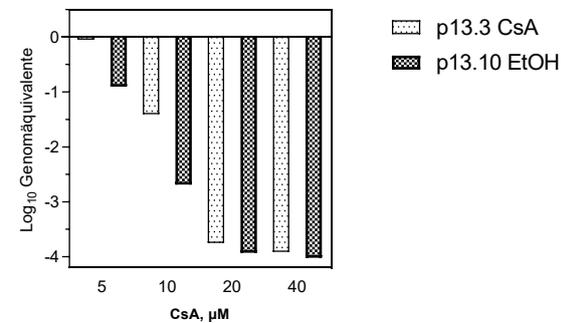
5.5. Graphen und Tabellen zur Inhibition im NL63-Passageexperiment 1

5.5.1 Vergleichsexperimente während des ersten Passageexperimentes

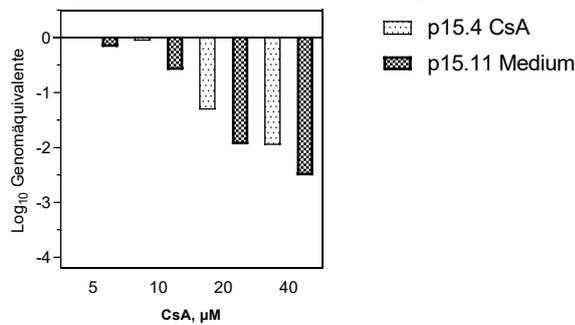
Passage 7 - Sensitivität von HCoV-NL63 gegenüber ALV



Passage 13 - Sensitivität von HCoV-NL63 gegenüber CsA



Passage 15 - Sensitivität von HCoV-NL63 gegenüber CsA



Passage 16 - Sensitivität von HCoV-NL63 gegenüber ALV

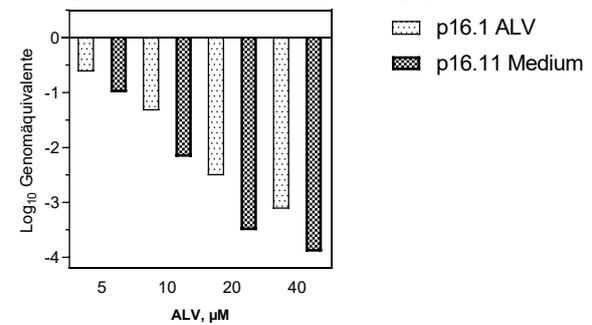


Abb. 54: Passageexperiment 1: Vergleichsexperimente im laufenden Experiment zur Sensitivität gegenüber den Inhibitoren Alisporivir (ALV) sowie Cyclosporin A (CsA). Gezeigt ist die Reduktion der Genomäquivalente in der Log₁₀-Skala unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors. Aus Passage 7 wurden die Population 1 (Passagiert in ALV) mit Population 11 (Passagiert in Kulturmedium) verglichen, aus Passage 13 die in CsA passagiierte Population 3 mit der Ethanolkontrolle. Aus Passage 15 wurde der ebenfalls in CsA passagiierten Population 4 die Mediumkontrolle gegenübergestellt, aus Passage 16 wiederum die gleichen Populationen wie in Passage 7.

Passage 20 - Sensitivität von HCoV-NL63 gegenüber ALV

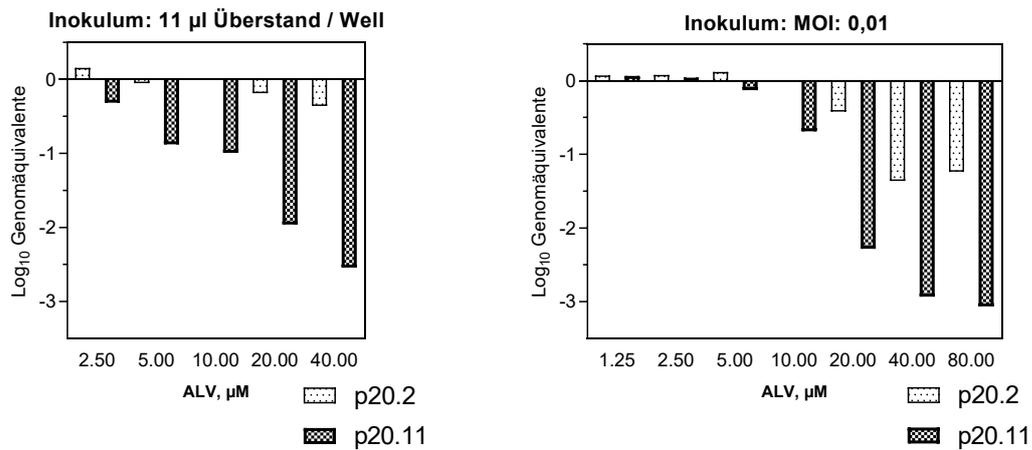


Abb. 55: Passageexperiment 1: Vergleichsexperimente aus Passage 20. Gezeigt ist die Log₁₀-Reduktion der Genomäquivalente der Viruspopulationen 1 (Passagiert in Alisporivir (ALV)) gegenüber der Kontrollpopulation 11 (passagiert in Kulturmedium) aus Passage 20 gegenüber verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors ALV. Im ersten Experiment (linker Graph) wurde jeweils das gleiche Volumen an Überstand, im zweiten für beide Gruppen die gleiche Menge infektiöser Einheiten pro Zelle (MOI, Multiplicity of infection, jeweils gleich 0,01). In beiden Experimenten zeigten sich deutliche Unterschiede der Sensitivität gegenüber ALV zwischen den jeweiligen Viruspopulationen.

5.5.2 IC₅₀-Werte der Viruspopulationen nach Abschluss des ersten Passageexperimentes

a)

Alisporivir			
Viruspopulation	IC ₅₀ , μM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
p0 NL63 wt	3,71	1,87 - 6,88	Kontrollen
NL63 p25 3.10 EtOH-Kontrolle	6,95	3,56 - 12,95	
NL63 p25 3.11 Medium-Kontrolle	3,26	1,97 - 5,17	
NL63 p25 3.1-ALV	37,64	7,72 - 1652,00	Intervention
NL63 p25 3.2-ALV	70,73	17,15 - ∞	
NL63 p25 3.2-CsA	40,01	3,71 - ∞	
NL63 p25 3.5-NIM811	18,44	5,78 - 64,61	
NL63 p25 3.6-NIM811	94,72	18,51 - ∞	

b)

Cyclosporin A			
Viruspopulation	IC ₅₀ , μM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
p0 NL63 wt	0,66	0,53 - 0,81	Kontrollen
NL63 p25 3.10 EtOH-Kontrolle	5,33	3,18 - 8,60	
NL63 p25 3.11 Medium-Kontrolle	3,28	1,65 - 6,11	
NL63 p25 3.1-ALV	8,32	3,85 - 16,60	Intervention
NL63 p25 3.2-ALV	27,62	5,71 - 253,50	
NL63 p25 3.2-CsA	33,89	5,21 - ∞	
NL63 p25 3.5-NIM811	10,00	4,38 - 21,36	
NL63 p25 3.6-NIM811	21,47	5,92 - 92,87	

Tabelle 43: Werte der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) für die Viruspopulationen aus dem ersten Passageexperiment. In Abschnitt a) sind die Werte für Alisporivir, in Abschnitt b) für Cyclosporin A verzeichnet.

5.6 Graphen und Tabellen zur Inhibition im NL63-Passageexperiment 2

5.6.1 Vorläufiger Vergleich der Passage 5

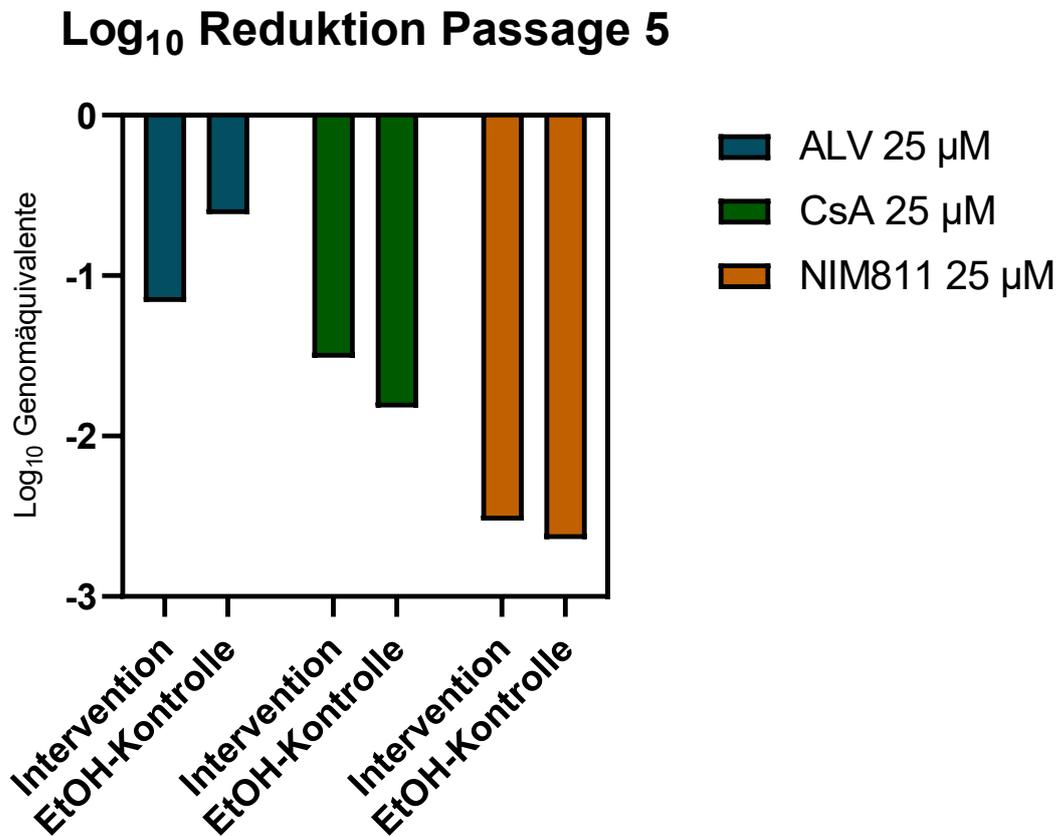


Abb. 56: Passageexperiment 2: Darstellung der Inhibition von Viruspopulationen aus Passage 5. Dargestellt ist die Log₁₀-Reduktion der Genomäquivalente. Auf die Populationen der Interventionsgruppe wurden jeweils der Inhibitor angewandt, welchem diese auch in der Passage ausgesetzt waren. Als Kontrolle diente die Viruspopulation, welche als Kontrolle parallel in EtOH passagiert wurde.

5.6.2 IC₅₀-Werte der Viruspopulationen nach Abschluss des zweiten Passageexperimentes

a)

Alisporivir			
Viruspopulation	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 Berlin 1	1,82	1,17 - 2,63	Kontrollen
NL63 p15.5 EtOH-Kontrolle	0,82	0,57 - 1,10	
NL63 p15.1 (Passage in Alisporivir)	6,81	2,72 - 15,60	Intervention
NL63 p15.2 (Passage in Cyclosporin A)	7,46	3,86 - 13,63	
NL63 p15.3 (Passage in NIM811)	1,68	1,17 - 2,31	

b)

Cyclosporin A			
Viruspopulation	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 Berlin 1	1,14	0,91 - 1,39	Kontrollen
NL63 p15.5 EtOH-Kontrolle	0,77	0,56 - 0,99	
NL63 p15.1 (Passage in Alisporivir)	2,86	1,87 - 4,16	Intervention
NL63 p15.2 (Passage in Cyclosporin A)	19,11	3,93 - 99,12	
NL63 p15.3 (Passage in NIM811)	4,81	2,64 - 8,20	

c)

NIM811			
Viruspopulation	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 Berlin 1	0,97	0,87 - 1,07	Kontrollen
NL63 p15.5 EtOH-Kontrolle	1,09	0,78 - 1,45	
NL63 p15.1 (Passage in Alisporivir)	1,35	0,56 - 2,47	Intervention
NL63 p15.2 (Passage in Cyclosporin A)	29,56	6,92 - 186,2	
NL63 p15.3 (Passage in NIM811)	4,72	2,41 - 8,49	

Tabelle 44: Werte der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) für die Viruspopulationen aus dem zweiten Passageexperiment. In Abschnitt a) sind die Werte für Alisporivir, in Abschnitt b) für Cyclosporin A und in Abschnitt c) für NIM811 verzeichnet.

5.6.3 Gegenüberstellung der Sensitivität von p15.2 zu den Kontrollen aus Passageexperiment 2

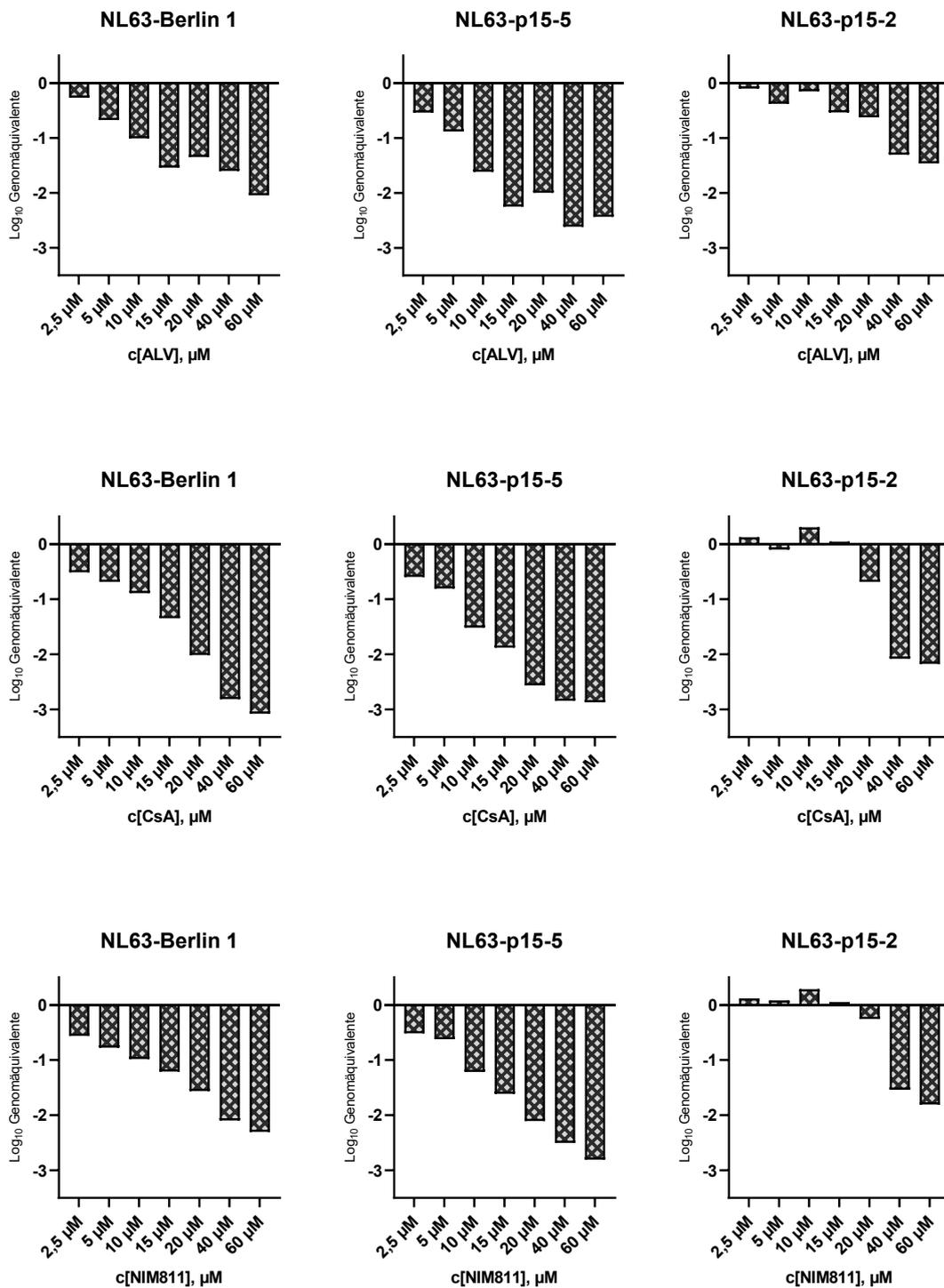


Abb. 57: Passageexperiment 2: Log₁₀-Reduktion der Genomäquivalente der Viruspopulation NL63 p15-2 im Vergleich zu den Kontrollen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der Inhibitoren Alisporivir (ALV), Cyclosporin A (CsA) sowie NIM811. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Sensitivität.

5.6.4 Vergleich der Interventionsgruppen mit Testung auf Signifikanz

Passageexperiment 2: Vergleich der Sensitivität der Viruspopulationen gegenüber Cyclophilin - Inhibitoren ausgewählter Konzentrationen

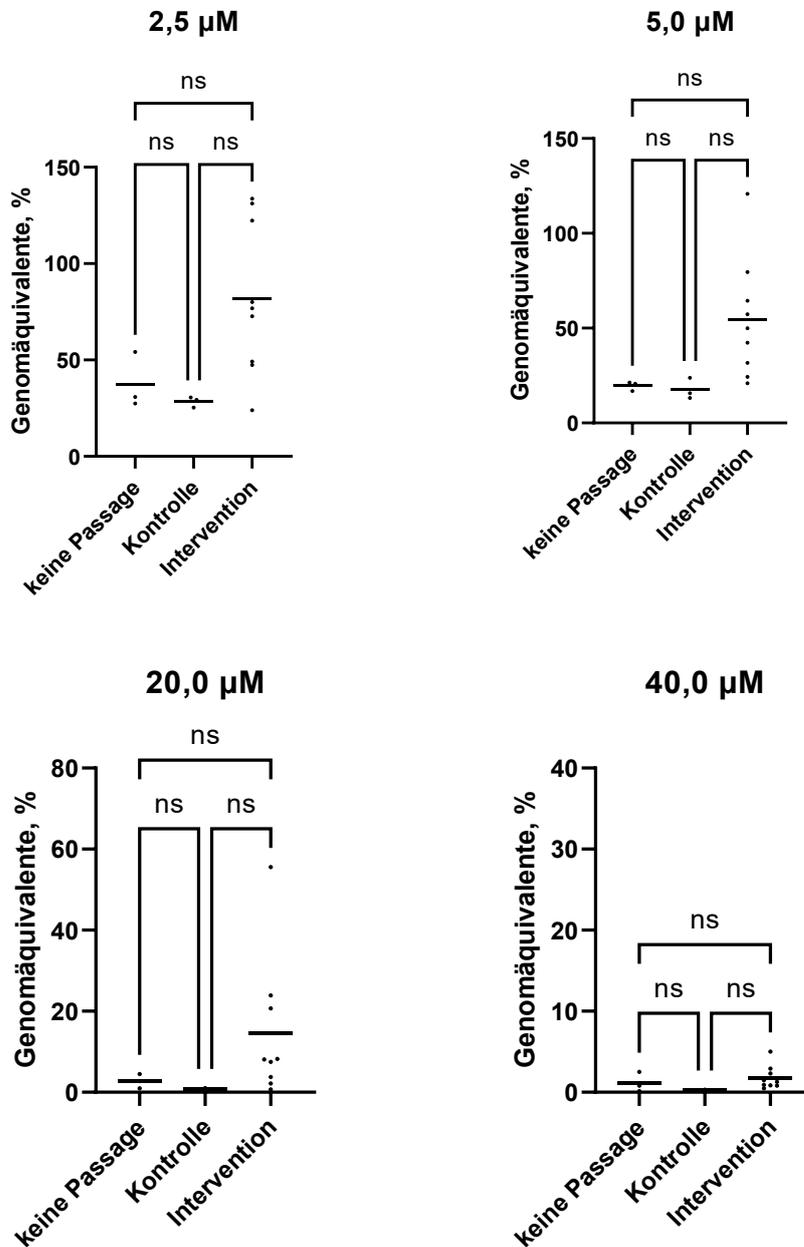


Abb. 58: Passageexperiment 2: Vergleich der persistierenden Genomäquivalente unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der eingesetzten Cyclophilin-Inhibitoren Alisporivir, Cyclosporin A sowie NIM811. Die Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich nicht statistisch signifikant.

5.7 Graphen und Tabellen zur Inhibition nach Passageexperiment 3

5.7.1 Log₁₀-Reduktion der Genomäquivalente unter dem Einfluss von ALV

NL63-Passageexperiment 3: Set A: Sensibilitätstestung gegenüber Alisporivir

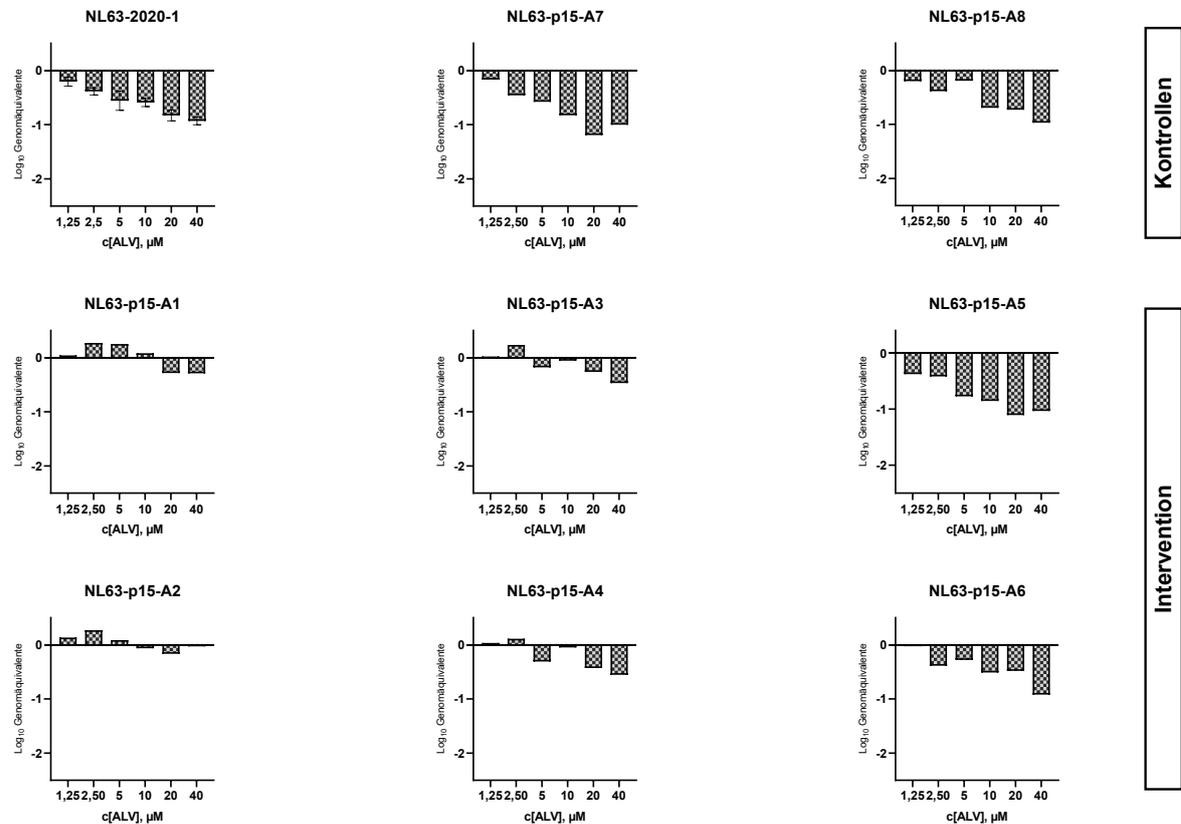


Abb. 59: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set A gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Alisporivir (ALV). Dargestellt ist die Reduktion der Genomäquivalente mittels Log₁₀-Skala. Die Zahlen am Ende der Bezeichnung der jeweiligen Viruspopulation codieren die Intervention. (1,2: Passage in Alisporivir, 3,4: Passage in Cyclosporin A; 5,6: Passage in NIM811; 7: Passage in EtOH, max. 0,1 %; 8: Passage in Kulturmedium)

NL63-Passageexperiment 3: Set B: Sensibilitätstestung gegenüber Alisporivir

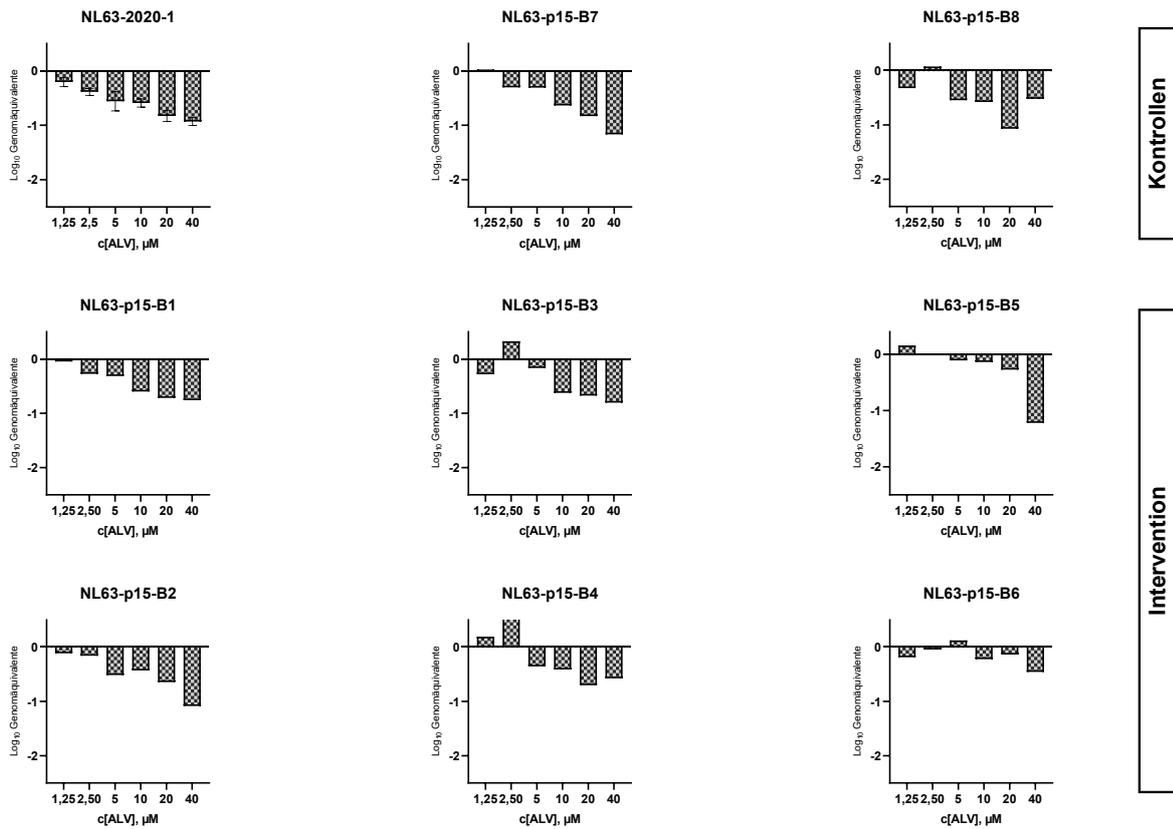


Abb. 60: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set B gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Alisporivir (ALV). Dargestellt ist die Reduktion der Genomäquivalente mittels Log₁₀-Skala. Die Zahlen am Ende der Bezeichnung der jeweiligen Viruspopulation codieren die Intervention. (1,2: Passage in Alisporivir, 3,4: Passage in Cyclosporin A; 5,6: Passage in NIM811; 7: Passage in EtOH, max. 0,1 %; 8: Passage in Kulturmedium)

NL63-Passageexperiment 3: Set C: Sensibilitätstestung gegenüber Alisporivir

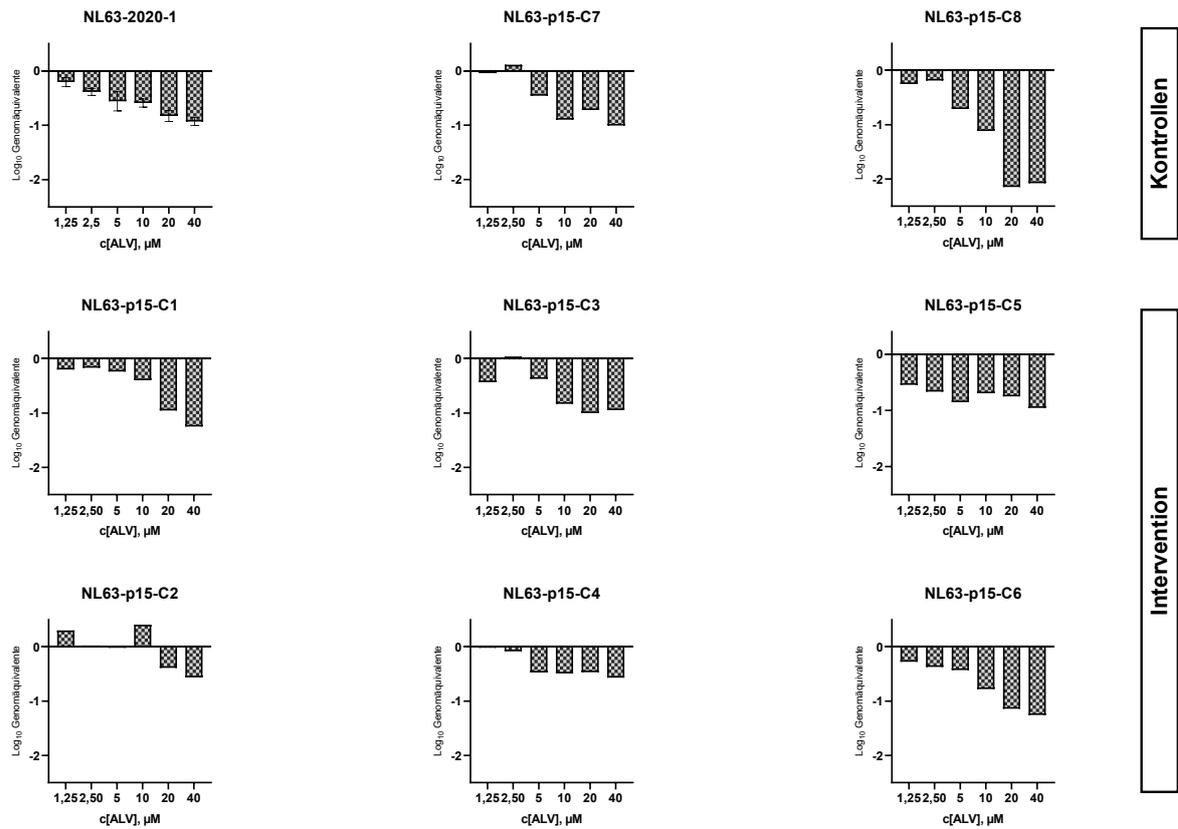


Abb. 61: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set C gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Alisporivir (ALV). Dargestellt ist die Reduktion der Genomäquivalente mittels Log₁₀-Skala. Die Zahlen am Ende der Bezeichnung der jeweiligen Viruspopulation codieren die Intervention. (1,2: Passage in Alisporivir, 3,4: Passage in Cyclosporin A; 5,6: Passage in NIM811; 7: Passage in EtOH, max. 0,1 %; 8: Passage in Kulturmedium)

5.7.2 Log₁₀-Reduktion der Genomäquivalente unter dem Einfluss von CsA

NL63-Passageexperiment 3: Set A: Sensibilitätstestung gegenüber Cyclosporin A

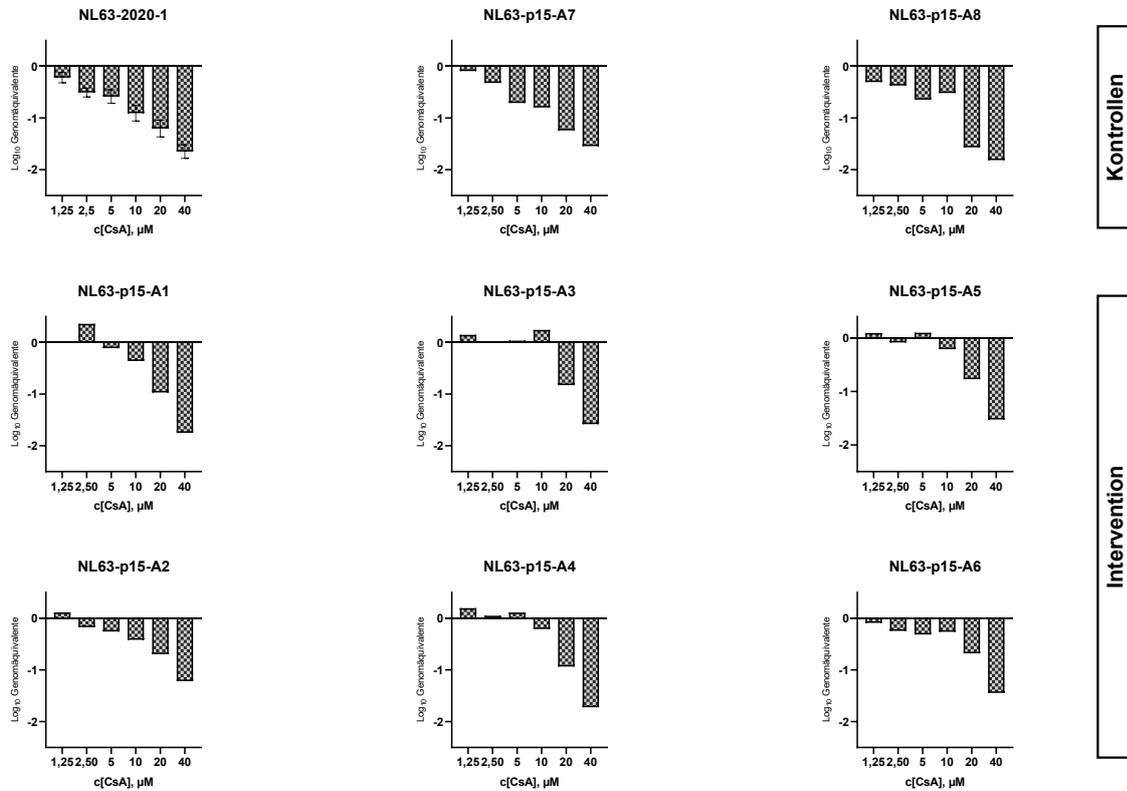


Abb. 62: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set A gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Cyclosporin A (CsA). Dargestellt ist die Reduktion der Genomäquivalente mittels Log₁₀-Skala. Die Zahlen am Ende der Bezeichnung der jeweiligen Viruspopulation codieren die Intervention. (1,2: Passage in Alisporivir, 3,4: Passage in Cyclosporin A; 5,6: Passage in NIM811; 7: Passage in EtOH, max. 0,1 %; 8: Passage in Kulturmedium)

NL63-Passageexperiment 3: Set B: Sensibilitätstestung gegenüber Cyclosporin A

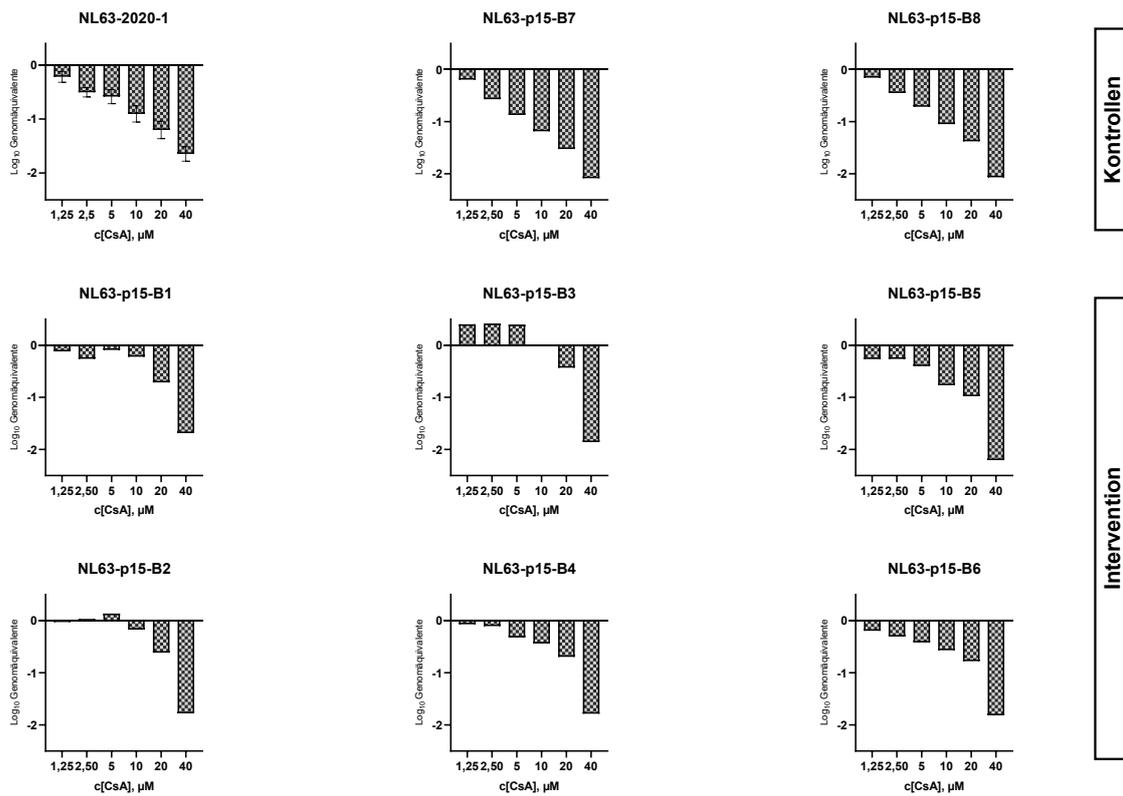


Abb. 63: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set B gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Cyclosporin A (CsA). Dargestellt ist die Reduktion der Genomäquivalente mittels Log₁₀-Skala. Die Zahlen am Ende der Bezeichnung der jeweiligen Viruspopulation codieren die Intervention. (1,2: Passage in Alisporivir, 3,4: Passage in Cyclosporin A; 5,6: Passage in NIM811; 7: Passage in EtOH, max. 0,1 %; 8: Passage in Kulturmedium)

NL63-Passageexperiment 3: Set C: Sensibilitätstestung gegenüber Cyclosporin A

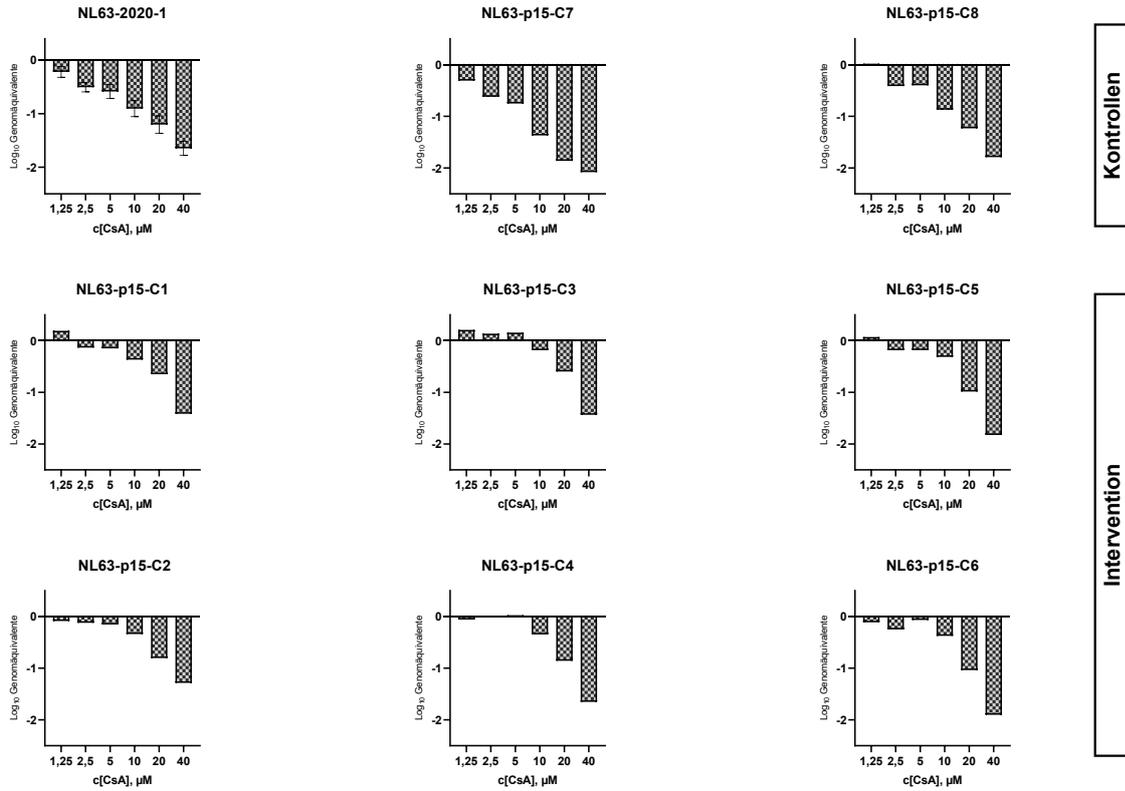


Abb. 64: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set C gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors Cyclosporin A (CsA). Dargestellt ist die Reduktion der Genomäquivalente mittels Log₁₀-Skala. Die Zahlen am Ende der Bezeichnung der jeweiligen Viruspopulation codieren die Intervention. (1,2: Passage in Alisporivir, 3,4: Passage in Cyclosporin A; 5,6: Passage in NIM811; 7: Passage in EtOH, max. 0,1 %; 8: Passage in Kulturmedium)

5.7.3 Log₁₀-Reduktion der Genomäquivalente unter dem Einfluss von NIM811

NL63-Passageexperiment 3: Set A: Sensibilitätstestung gegenüber NIM811

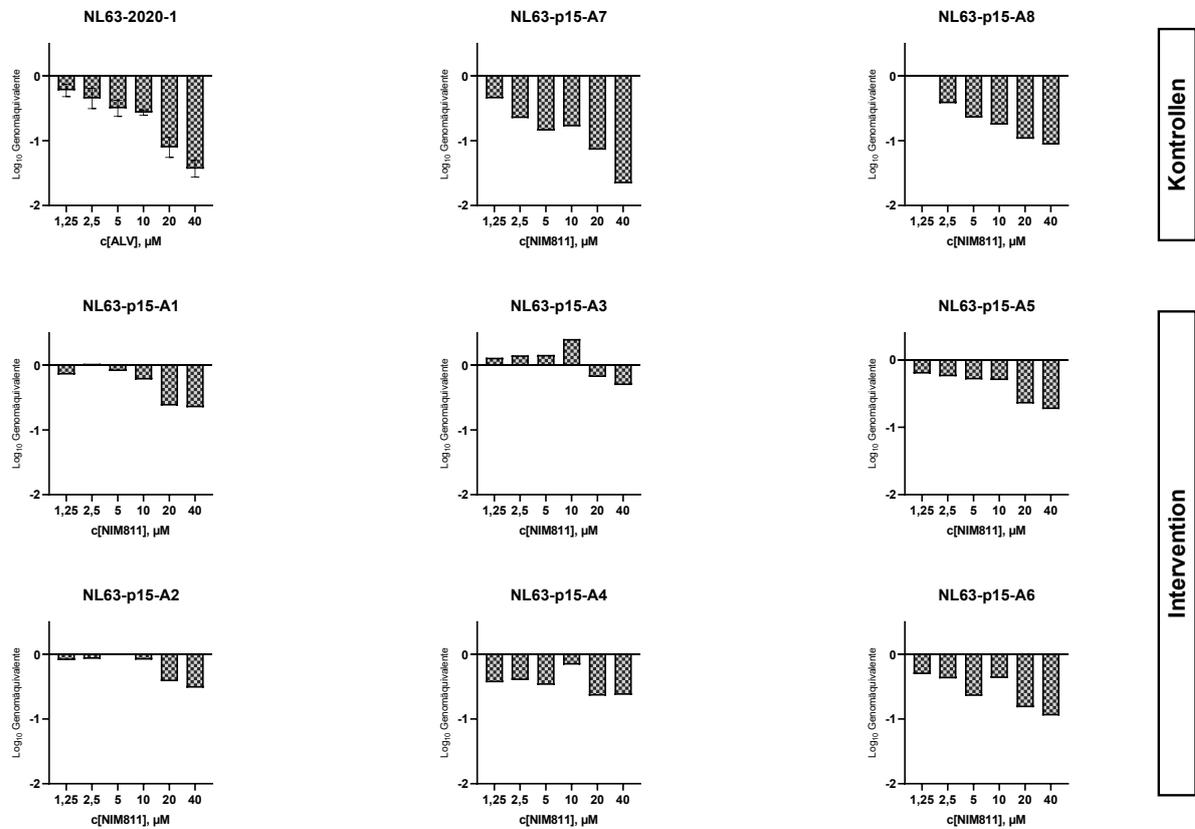


Abb. 65: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set A gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors NIM811. Dargestellt ist die Reduktion der Genomäquivalente mittels Log₁₀-Skala. Die Zahlen am Ende der Bezeichnung der jeweiligen Viruspopulation codieren die Intervention. (1,2: Passage in Alisporivir, 3,4: Passage in Cyclosporin A; 5,6: Passage in NIM811; 7: Passage in EtOH, max. 0,1 %; 8: Passage in Kulturmedium)

NL63-Passageexperiment 3: Set B: Sensibilitätstestung gegenüber NIM811

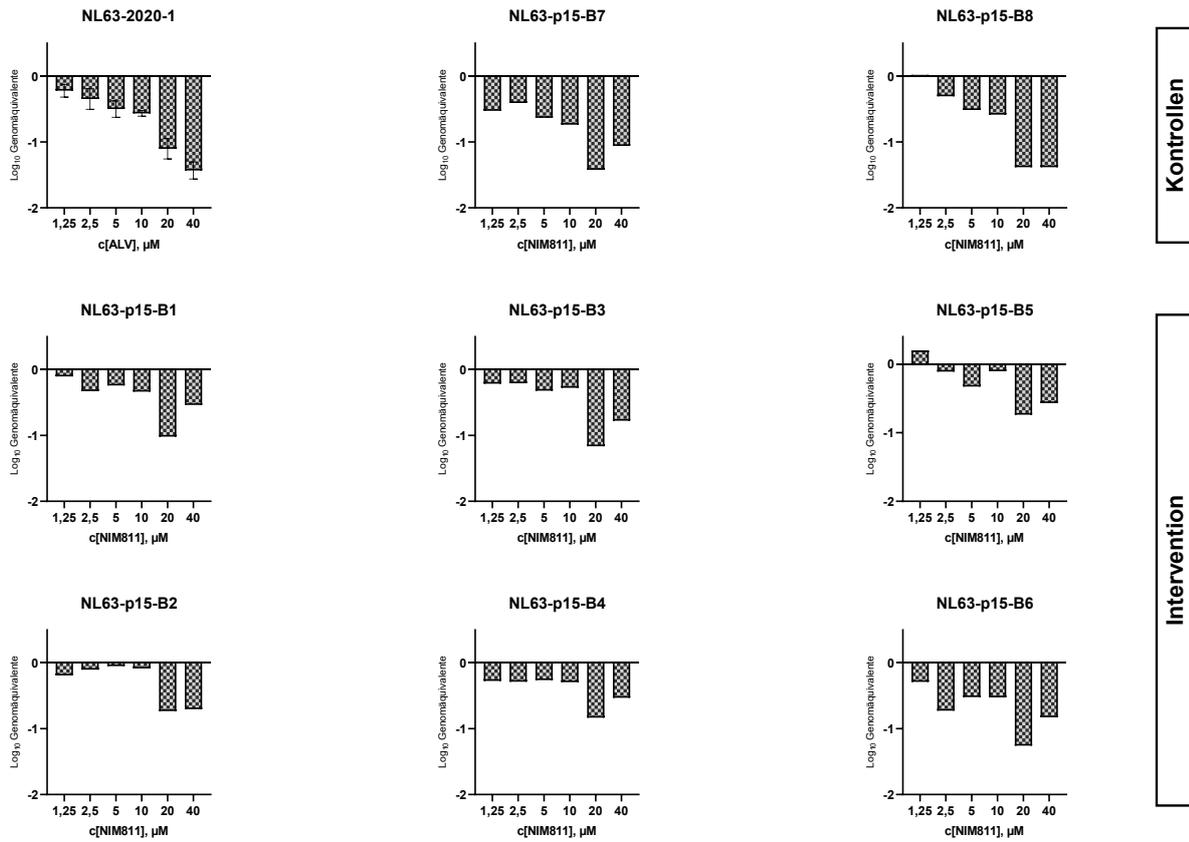


Abb. 66: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set B gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors NIM811. Dargestellt ist die Reduktion der Genomäquivalente mittels Log₁₀-Skala. Die Zahlen am Ende der Bezeichnung der jeweiligen Viruspopulation codieren die Intervention. (1,2: Passage in Alisporivir, 3,4: Passage in Cyclosporin A; 5,6: Passage in NIM811; 7: Passage in EtOH, max. 0,1 %; 8: Passage in Kulturmedium)

NL63-Passageexperiment 3: Set C: Sensibilitätstestung gegenüber NIM811

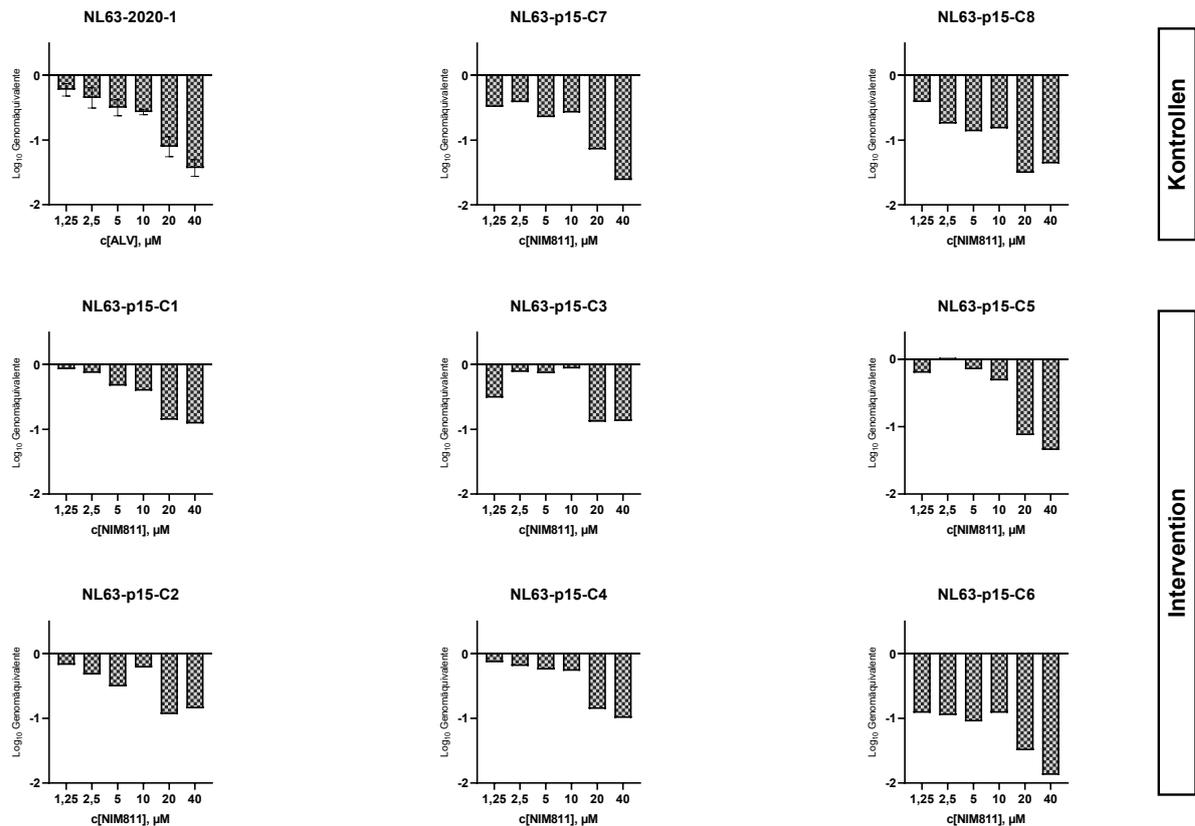


Abb. 67: Passageexperiment 3: Sensibilitätstestung der NL63-Ausgangspopulation 2020-1 sowie der passagierten Viruspopulationen im Set C gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors NIM811. Dargestellt ist die Reduktion der Genomäquivalente mittels Log₁₀-Skala. Die Zahlen am Ende der Bezeichnung der jeweiligen Viruspopulation codieren die Intervention. (1,2: Passage in Alisporivir, 3,4: Passage in Cyclosporin A; 5,6: Passage in NIM811; 7: Passage in EtOH, max. 0,1 %; 8: Passage in Kulturmedium)

5.7.4 IC₅₀-Werte im Passageexperiment 3: Gesamtvergleich

Alisporivir im Gesamtvergleich				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	3,25	1,99 - 5,20	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	3,87	2,42 - 6,11	
NL63 p15.8	Kulturmedium	3,17	1,87 - 5,22	
NL63 p15.1	Alisporivir	16,1	6,20 - 47,40	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	46,43	11,3 - ∞	
NL63 p15.3	CsA	13,75	5,53 - 38,84	
NL63 p15.4	CsA	16,44	4,61 - 89,68	
NL63 p15.5	NIM811	3,58	1,41 - 08,10	
NL63 p15.6	NIM811	7,14	3,41 - 14,76	

Cyclosporin A im Gesamtvergleich				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	1,69	1,251 - 2,233	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	1,47	1,13 - 1,87	
NL63 p15.8	Kulturmedium	2,05	1,53 - 2,70	
NL63 p15.1	Alisporivir	11,37	4,97 - 27,50	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	10,52	6,38 - 17,55	
NL63 p15.3	CsA	38,20	9,22 - ∞	
NL63 p15.4	CsA	10,94	6,20 - 19,66	
NL63 p15.5	NIM811	7,32	4,17 - 12,74	
NL63 p15.6	NIM811	4,65	3,34 - 6,42	

NIM811 Gesamtvergleich				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	2,57	1,76 - 3,69	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	1,04	0,78 - 1,34	
NL63 p15.8	Kulturmedium	2,09	1,38 - 3,09	
NL63 p15.1	Alisporivir	7,29	5,24 - 10,14	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	11,37	6,67 - 19,43	
NL63 p15.3	CsA	28,51	8,01 - 185	
NL63 p15.4	CsA	4,54	2,61 - 7,72	
NL63 p15.5	NIM811	8,44	4,88 - 14,66	
NL63 p15.6	NIM811	0,99	0,57 - 1,68	

Tabelle 45: Passageexperiment 3: Tabellarische Auflistung der IC₅₀-Werte der Viruspopulationen, zusammengefasst nach Intervention, für die Inhibitoren Alisporivir, CsA und NIM811

5.7.5 IC₅₀-Werte im Passageexperiment 3: Alisporivir

Alisporivir Vergleich Set A				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	8,42	3,37 - 19,47	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	1,84	1,36 - 2,45	
NL63 p15.8	Kulturmedium	3,28	1,53 - 6,68	
NL63 p15.1	Alisporivir	100,5	7,75 - ∞	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	205,5	14,40 - ∞	
NL63 p15.3	CsA	33,42	6,67 - ∞	
NL63 p15.4	CsA	20,33	6,27 - 90,61	
NL63 p15.5	NIM811	1,18	0,84 - 1,60	
NL63 p15.6	NIM811	4,72	2,30 - 9,59	

Alisporivir Vergleich Set B				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	1,42	0,74 - 2,47	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	4,13	2,40 - 7,04	
NL63 p15.8	Kulturmedium	4,93	0,97 - 22,02	
NL63 p15.1	Alisporivir	4,35	2,93 - 6,45	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	4,23	2,80 - 6,35	
NL63 p15.3	CsA	12,74	0,83 - ∞	
NL63 p15.4	CsA	23,53	0,23 - ∞	
NL63 p15.5	NIM811	19,70	6,62 - 74,67	
NL63 p15.6	NIM811	34,87	9,59 - 327,3	

Alisporivir Vergleich Set C				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	2,04	1,37 - 2,97	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	6,28	1,74 - 23,20	
NL63 p15.8	Kulturmedium	2,00	1,05 - 3,54	
NL63 p15.1	Alisporivir	4,88	2,99 - 7,82	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	102,7	2,41 - ∞	
NL63 p15.3	CsA	6,84	2,04 - 24,63	
NL63 p15.4	CsA	6,48	3,22 - 13,34	
NL63 p15.5	NIM811	0,69	0,25 - 1,37	
NL63 p15.6	NIM811	0,99	1,41 - 2,57	

Tabelle 46: Passageexperiment 3: Tabellarische Auflistung der IC₅₀-Werte der einzelnen Viruspopulationen der Sets A, B und C für den Inhibitor Alisporivir.

5.7.6 IC₅₀-Werte im Passageexperiment 3: Cyclosporin A

Cyclosporin A Vergleich Set A				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	2,08	1,31 - 3,21	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	2,32	1,46 - 3,58	
NL63 p15.8	Kulturmedium	1,65	1,00 - 2,60	
NL63 p15.1	Alisporivir	15,68	1,28 - ∞	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	7,26	2,93 - 18,45	
NL63 p15.3	CsA	32,97	3,66 - ∞	
NL63 p15.4	CsA	17,66	3,59 - 203,2	
NL63 p15.5	NIM811	15,23	4,43 - 65,19	
NL63 p15.6	NIM811	5,50	3,20 - 9,35	

Cyclosporin A Vergleich Set B				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	0,75	0,68 - 0,82	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	1,28	0,81 - 1,91	
NL63 p15.8	Kulturmedium	1,67	1,13 - 2,37	
NL63 p15.1	Alisporivir	7,81	3,35 - 17,66	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	18,72	5,25 - 95,3	
NL63 p15.3	CsA	63,83	1,00 - n.n.	
NL63 p15.4	CsA	5,62	4,07 - 7,73	
NL63 p15.5	NIM811	2,36	1,62 - 3,38	
NL63 p15.6	NIM811	2,77	2,16 - 3,51	

Cyclosporin A Vergleich Set C				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	2,68	1,92 - 3,69	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	0,98	0,76 - 1,24	
NL63 p15.8	Kulturmedium	2,92	1,41 - 5,74	
NL63 p15.1	Alisporivir	9,92	2,75 - 41,39	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	7,26	4,90 - 10,72	
NL63 p15.3	CsA	23,58	3,91 - ∞	
NL63 p15.4	CsA	10,41	4,51 - 24,67	
NL63 p15.5	NIM811	7,44	3,37 - 16,50	
NL63 p15.6	NIM811	6,34	2,73 - 14,15	

Tabelle 47: Passageexperiment 3: Tabellarische Auflistung der IC₅₀-Werte der einzelnen Viruspopulationen der Sets A, B und C für den Inhibitor Cyclosporin A.

5.7.7 IC₅₀-Werte im Passageexperiment 3: NIM811

NIM811 Vergleich Set A				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	4,15	2,37 - 7,18	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	0,95	0,70 - 1,25	
NL63 p15.8	Kulturmedium	2,71	1,21 - 5,70	
NL63 p15.1	Alisporivir	12,63	6,71 - 24,37	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	22,50	11,47 - 47,91	
NL63 p15.3	CsA	70,2	9,28 - ∞	
NL63 p15.4	CsA	2,74	0,25 - 16,25	
NL63 p15.5	NIM811	5,09	2,62 - 9,65	
NL63 p15.6	NIM811	1,99	0,83 - 4,26	

NIM811 Vergleich Set B				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	1,23	0,77 - 1,86	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	1,03	0,48 - 1,88	
NL63 p15.8	Kulturmedium	3,31	1,74 - 6,09	
NL63 p15.1	Alisporivir	5,09	2,41 - 10,58	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	13,59	5,14 - 37,47	
NL63 p15.3	CsA	4,57	2,20 - 9,16	
NL63 p15.4	CsA	4,55	1,56 - 12,27	
NL63 p15.5	NIM811	13,24	2,84 - 93,36	
NL63 p15.6	NIM811	1,34	0,57 - 2,73	

NIM811 Vergleich Set C				
Viruspopulation	Passage in	IC ₅₀ , µM	95 %-Konfidenzintervall	Gruppe
NL63 2020-1	-	2,91	1,23 - 6,24	Kontrollen
NL63 p15.7	EtOH	1,15	0,52 - 2,16	
NL63 p15.8	Kulturmedium	0,76	0,54 - 1,102	
NL63 p15.1	Alisporivir	5,60	4,34 - 7,21	Intervention
NL63 p15.2	Alisporivir	3,62	1,34 - 9,18	
NL63 p15.3	CsA	9,71	1,46 - 53,46	
NL63 p15.4	CsA	6,05	3,70 - 9,79	
NL63 p15.5	NIM811	7,65	3,25 - 17,70	
NL63 p15.6	NIM811	0,25	0,09 - 0,45	

Tabelle 48: Passageexperiment 3: Tabellarische Auflistung der IC₅₀-Werte der einzelnen Viruspopulationen der Sets A, B und C für den Inhibitor NIM811.

5.7.8 Passageexperiment 3: Relative IC₅₀-Werte der einzelnen Populationen im Vergleich

Population	Rel. IC ₅₀ ALV	Rel. IC ₅₀ CsA	Rel. IC ₅₀ NIM811	∅ rel. IC ₅₀
A3	2,90	5,20	16,91	8,34
A2	6,26	1,15	5,42	4,28
B3	0,36	10,07	1,10	3,84
A1	3,37	2,47	3,04	2,96
B2	1,22	2,95	3,27	2,48
C3	0,89	3,72	2,34	2,32
B5	2,88	0,37	3,19	2,15
A4	2,73	2,79	0,66	2,06
B6	4,17	0,44	0,32	1,64
C4	1,40	1,64	1,46	1,50
C1	1,30	1,56	1,35	1,40
A5	0,37	2,40	1,23	1,33
B1	1,27	1,23	1,23	1,24
C5	0,11	1,17	1,84	1,04
C2	1,05	1,15	0,87	1,02
NL63 2020-1 (Messung 1)	1,47	0,33	1,00	0,93
A6	1,00	0,87	0,48	0,78
B4	0,10	0,89	1,10	0,69
NL63 2020-1 (Messung 3)	0,60	0,42	0,70	0,57
C6	0,61	1,00	0,06	0,56
A8	0,67	0,26	0,65	0,53
B7	1,04	0,20	0,25	0,50
B8	0,42	0,26	0,80	0,49
C7	0,76	0,15	0,28	0,40
A7	0,59	0,37	0,23	0,40
C8	0,46	0,46	0,18	0,37
NL63 2020-1 (Messung 2)	0,32	0,12	0,30	0,25

Tabelle 49: Relative IC₅₀-Werte der einzelnen Populationen aus Passageexperiment 3 im Vergleich. Die IC₅₀-Werte (in µM) für die einzelnen Inhibitoren wurden zunächst ins Verhältnis zum Median der IC₅₀-Werte aller untersuchten Populationen gesetzt. Hierauf wurde dann der Durchschnitt der dieser Werte berechnet. Die Reihenfolge beginnt hier mit der Population mit dem höchsten durchschnittlichen IC₅₀-Wert.

5.8 Synopse der Passageexperimente: Graphen zur Inhibition

Gegenüberstellung der relativen IC₅₀-Werte aus den Passageexperimenten

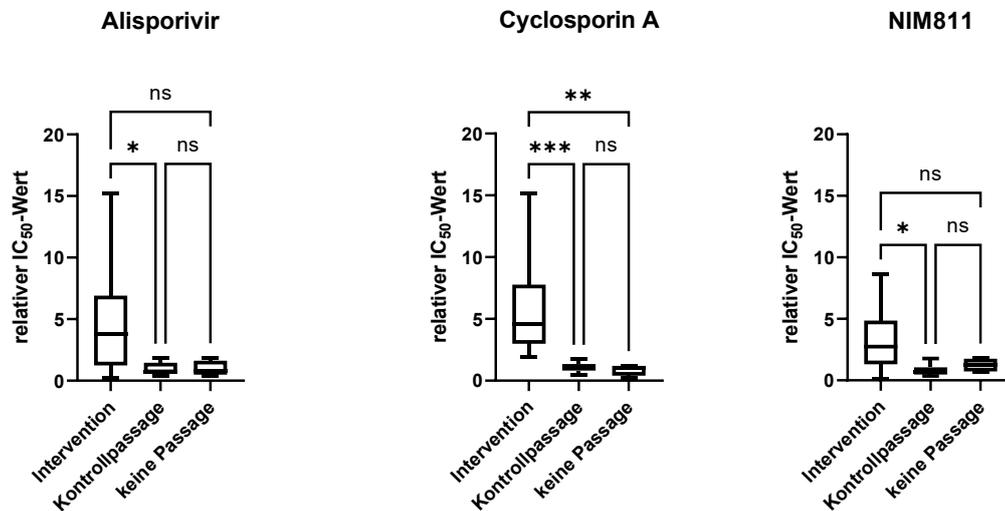


Abb. 68: Gegenüberstellung der relativen IC₅₀-Werte aus den Passageexperimenten: Die jeweiligen relativen IC₅₀-Werte wurden bezüglich ihres jeweiligen Inhibitors aufgeschlüsselt. Es zeigt sich weiterhin ein Unterschied zwischen der Interventionsgruppe und den Kontrollen, jedoch ist dieser nur im Falle von Cyclosporin A statistisch signifikant. Im Falle von Alisporivir und NIM811 ist kein signifikanter Unterschied zwischen Ausgangspopulation und Intervention darstellbar. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen ist mit Sternchen dargestellt. (ns = nicht signifikant; * ~ p ≤ 0,05; ** ~ p ≤ 0,01; ***- ~ p ≤ 0,001). Für NIM811 wurden im Anschluss an Passageexperiment 1 keine Vergleichsexperimente durchgeführt, sodass hierfür keine Ergebnisse einfließen.

5.9 Tabellen zu den Ergebnissen des NGS– Anhang zum NGS

5.9.1 Passageexperiment 1 – Anhang zum NGS

Mutationen mit hoher Penetranz im Passageexperiment 1

Position	Ref.	Var.	Effekt	Protein	p25.10	p25.11	p25.1	p25.2	p25.3	p25.5	p25.6
324	A	G	D13G	Nsp1					5,5		67,2
356	C	T	P24S	Nsp1			86,0				
360	C	T	S25F	Nsp1						56,1	
515	C	T	P77S	Nsp1					86,0		
573	A	G	Y96C	Nsp1				87,5			
1698	C	T	A361V	Nsp2		82,8		30,4	5,6		92,3
2155	T	A	V513V	Nsp2						57,4	
4724	A	G	I582V	Nsp3	3,3		87,8		83,4		
4740	C	T	A587V	Nsp3	83,5	65,3		99,5	17,8	99,6	99,8
8373	A	G	D234G	Nsp4					2,7		54,2
8502	T	C	I277T	Nsp4						99,7	
8851	G	T	E393D	Nsp4					89,4		
10227	T	C	F89L	Nsp6			99,5				
11766	C	T	A28V	Nsp9		4,6	99,5	3,1	4,9		31,5
15081	T	G	N889K	Nsp12					92,1		
15488	C	T	T98I	Nsp13	71,6	60,4		18,6	6,7		83,1
19262	C	T	T241I	Nsp15					2,7		58,2
20573	C	T	D34D	Spike-Protein			73,8				
20842	T	C	F124S	Spike-Protein					91,7		
21621	T	G	F384V	Spike-Protein				70,3			
21937	C	T	A489V	Spike-Protein			99,6				
22335	T	A	L622I	Spike-Protein	59,8		99,7			99,2	
22348	A	C	N626T	Spike-Protein					8,1		99,8
22492	T	G	I674S	Spike-Protein	2,7				10,1		99,2
22783	C	T	T771I	Spike-Protein		46,1			89,2	45,2	
23445	A	G	S992G	Spike-Protein				50,4			
24105	C	T	P1212S	Spike-Protein		35,6		91,9		3,3	
24462	C	T	T1331I	Spike-Protein					7,7		66,1
24942	C	T	S134L	Protein 3	5,7		58,3		98,2	29,8	99,2
25237	T	C	L13P	Envelope-Protein	77,8	86,9	99,9	99,8	98,4	99,7	99,8

Tabelle 50: Mutationen im Passageexperiment 1: Aufgeführt sind Mutationen, welche in mindestens einer Population mit einer Allelfrequenz von mindestens 50 % aufgetreten waren. (Nsp: Nichtstrukturprotein)

Relative Mutationsdichte im Passageexperiment 1

ORF	Protein	Intervention	Kontrolle
ORF 1a	Nsp1	1,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp2	0,0129	0,0316
ORF 1ab	Nsp3	0,0255	0,0351
ORF 1ab	Nsp4	0,1234	0,0037
ORF 1ab	Nsp5	0,0103	0,0327
ORF 1ab	Nsp6	0,0816	0,0000
ORF 1ab	Nsp7	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp8	0,0053	0,0000
ORF 1ab	Nsp9	0,0058	0,2235
ORF 1ab	Nsp10	0,0000	0,0161
ORF 1ab	Nsp11	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp12	0,0227	0,0010
ORF 1ab	Nsp13	0,0011	0,0564
ORF 1ab	Nsp14	0,0120	0,0000
ORF 1ab	Nsp15	0,0405	0,0000
ORF 1ab	Nsp16	0,0494	0,0000
ORF S	Spike-Protein	0,1092	0,0679
ORF 3	Protein 3	0,0332	0,2097
ORF E	Envelope-Protein	0,0000	1,0000
ORF M	Membrane-Protein	0,0000	0,0044
ORF N	Nucleocapsid-Protein	0,0000	0,0038

Tabelle 51: Passageexperiment 1: Relative Mutationsdichte für die einzelnen Abschnitte im NL63-Genom, aufgeschlüsselt nach dem Vorkommen in den Kontrollen beziehungsweise in der Interventionsgruppe. Einbezogen wurden die Mutationen mit umschriebener Wirkung auf die Aminosäuresequenz der dafür codierten Proteine. (ORF = Open Reading Frame, Nsp = Nichtstrukturprotein)

5.9.2 Passageexperiment 2 – Anhang zum NGS

Mutationen mit hoher Penetranz in Passageexperiment 2

Position	Referenz	Variante	Effekt	Protein	P15.6	P15.5	P10.1	P15.1	p15.2	P15.3
1	C	G				47,41				
4	A	T				25,27				
64	C	A			46,17	40,11	55,86	42,35	38,99	42,86
213	A	G				47,11				
522	C	T	S79F	Nsp1					37,38	
1698	C	T	A361V	Nsp2	70,46					
4740	C	T	A587V	Nsp3	96,86	6,25	18,22	80,97	51,37	
8264	A	G	T198A	Nsp4		9,2			43,36	20,94
8265	C	T	T198I	Nsp4					53,72	
8649	T	C	I326T	Nsp4		32,76				
16598	C	T	A468V	Nsp13		89,77			92,74	87,67
16604	A	C	K470T	Nsp13	79,68		45,94	95,3		
21161	C	T	F230F						33,3	
22127	T	C	F552F					31,75		
22482	A	G	N671D						38,91	
22593	T	G	L708V				50,49	83,56	38,5	65,24
24105	C	T	P1212S			62,96				
24207	C	T	L1246F		99,59					
24382	C	T	S1304F					34,4		
24393	G	T	V1308F					45,06		
24665	C	T	L42F						31,73	
24851	T	C	L104L						23,42	
25222	A	C	D8A			3,62	29,32	74,41	72,48	99,19
25242	T	C	S15P				13,75	10,83	19,22	
25284	G	A	A29T			33,53				
25332	T	A	F45I			54,65				
25378	C	T	A60V		98,21					
25452	G	T	S4I			39,11				
25914	C	T	T158I			33,59				
25916	C	T	R159C		98,58					

Tabelle 52: Mutationen im Passageexperiment 2: Aufgeführt sind die 30 Mutationen mit der höchsten Allelfrequenz innerhalb einer passagierten Population. Die Zahl 10 bzw. 16 bezeichnet die Anzahl der Passagen, die Zahl hinter dem Punkt die Intervention (1: ALV; 2: CsA; 3: NIM811; 5: EtOH-Kontrolle; 6: Medium-Kontrolle).

Relative Mutationsdichte im Passageexperiment 2

Abschnitt		Passage 10		Passage 15	
ORF	Protein	Intervention	Kontrolle	Intervention	Kontrolle
ORF 1a	Nsp1	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0160
ORF 1ab	Nsp3	0,0213	0,0138	0,0046	0,0269
ORF 1ab	Nsp4	0,1145	0,0721	0,1997	0,0465
ORF 1ab	Nsp5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp7	0,2116	0,0000	0,0951	0,0000
ORF 1ab	Nsp8	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp9	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp10	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp11	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp12	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp13	0,0000	0,1073	0,0000	0,1334
ORF 1ab	Nsp14	0,0178	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp15	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp16	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ORF S	Spike-Protein	0,0536	0,0437	0,1547	0,0561
ORF 3	Protein 3	0,0000	0,0000	0,2490	0,0176
ORF E	Envelope-Protein	1,0000	1,0000	0,6833	1,0000
ORF M	Membrane-Protein	0,0000	0,0372	0,0343	0,1350
ORF N	Nucleocapsid-Protein	0,0152	0,0000	0,0000	0,0000

Tabelle 53: Passageexperiment 1: Relative Mutationsdichte für die einzelnen Abschnitte im NL63-Genom, aufgeschlüsselt für Passage 10 und 15 des Experiments. Einbezogen wurden die Mutationen mit umschriebener Wirkung auf die Aminosäuresequenz der der dafür codierten Proteine. (ORF = Open Reading Frame, Nsp = Nichtstrukturprotein).

5.9.3 Passageexperiment 3 – Anhang zum NGS

Nonsense-Mutationen im Passageexperiment 3

Position im Genom	Referenz	Variante	Protein	Effekt	Population / Allelfrequenz
404	C	T	Nsp1	Q40Stop	B1: 4 % B2: 8,6 % B3: 17,9 %
13222	TCACTGAACATAAAGAAAATTATTCAATA	-	Nsp13	F270Stop	C4: 45,3 %

Tabelle 54: Nonsense-Mutationen im Passageexperiment 3. Dargestellt sind die zwei identifizierten Mutationen, welche im Effekt zu einer Beendigung der Translation führen, sowie die jeweilige Allelfrequenz.

Rasterschubmutationen in Population A5

Position im Genom	Referenz	Variante	Protein	AF
827	GGTACTACAGGTCATACTTT	-	Nsp2	61,3 %
929	-	TATA	Nsp2	32,8 %
3336	TAGAGAAGAGGTTGATATAATTGAACAACCTTTT	-	Nsp3	57,3 %
3405	-	T	Nsp3	7,6 %
3959	GTTT	-	Nsp3	66,5 %
6107	CAGGTGTTATTTTG	-	Nsp3	6,1 %
13326	GCTAATTT	-	Nsp12	37,6 %
14124	AAATCCATTGTTA	-	Nsp12	56,4 %
15262	TGTT	-	Nsp13	55,0 %
24833	-	T	Protein 3	10,7 %

Tabelle 55: Rasterschubmutationen in Population A5 (passagiert in 10 µM NIM811) des Passageexperiment 3: Aufgeführt sind die jeweiligen Mutationen mit der dazugehörigen Allelfrequenz (AF).

Passageexperiment 3: Relative Mutationsdichte

ORF	Protein	Intervention	Kontrolle
ORF 1ab	Nsp1	1,0000	0,0300
ORF 1ab	Nsp2	0,0399	0,0036
ORF 1ab	Nsp3	0,0046	0,0747
ORF 1ab	Nsp4	0,0033	0,1140
ORF 1ab	Nsp5	0,0063	0,0162
ORF 1ab	Nsp6	0,0461	0,0000
ORF 1ab	Nsp7	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp8	0,0000	0,0026
ORF 1ab	Nsp9	0,1414	1,0000
ORF 1ab	Nsp10	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp11	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp12	0,0514	0,0085
ORF 1ab	Nsp13	0,0203	0,0215
ORF 1ab	Nsp14	0,0508	0,0000
ORF 1ab	Nsp15	0,0053	0,0000
ORF 1ab	Nsp16	0,0000	0,0000
ORF S	Spike-Protein	0,1622	0,1689
ORF 3	Protein 3	0,1524	0,2109
ORF E	Envelope-Protein	0,0000	0,2383
ORF M	Membrane-Protein	0,0113	0,1244
ORF N	Nucleocapsid-Protein	0,0263	0,0078

Tabelle 56: Passageexperiment 3: Relative Mutationsdichte für die einzelnen Abschnitte im NL63-Genom, aufgeschlüsselt nach dem Vorkommen in den Kontrollen beziehungsweise in der Interventionsgruppe. Einbezogen wurden die Mutationen mit umschriebener Wirkung auf die Aminosäuresequenz der der dafür codierten Proteine. (ORF: Open reading frame; Nsp: Nichtstrukturprotein)

5.9.4 Synopse des NGS

Relative Mutationsdichte über alle Passageexperimente 1

ORF	Protein	Intervention	Kontrollen
ORF 1ab	Nsp1	1,0000	0,0246
ORF 1ab	Nsp2	0,0235	0,0232
ORF 1ab	Nsp3	0,0171	0,0868
ORF 1ab	Nsp4	0,0775	0,1129
ORF 1ab	Nsp5	0,0079	0,0290
ORF 1ab	Nsp6	0,0611	0,0000
ORF 1ab	Nsp7	0,0184	0,0000
ORF 1ab	Nsp8	0,0027	0,0021
ORF 1ab	Nsp9	0,0629	0,9286
ORF 1ab	Nsp10	0,0000	0,0077
ORF 1ab	Nsp11	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp12	0,0334	0,0074
ORF 1ab	Nsp13	0,0092	0,0871
ORF 1ab	Nsp14	0,0292	0,0000
ORF 1ab	Nsp15	0,0229	0,0000
ORF 1ab	Nsp16	0,0252	0,0000
ORF S	Spike-Protein	0,1360	0,1906
ORF 3	Protein 3	0,0980	0,2798
ORF E	Envelope-Protein	0,0869	1,0000
ORF M	Membrane-Protein	0,0070	0,1471
ORF N	Nucleocapsid-Protein	0,0125	0,0083

Tabelle 57: Synopse der Passageexperimente: Relative Mutationsdichte für die einzelnen Abschnitte im NL63-Genom, aufgeschlüsselt nach dem Vorkommen in den Kontrollen beziehungsweise in der Interventionsgruppe. Einbezogen wurden die Mutationen mit umschriebener Wirkung auf die Aminosäuresequenz der der dafür codierten Proteine. (ORF: Open reading frame; Nsp: Nichtstrukturprotein)

Relative Mutationsdichte über alle Passageexperimente 2

Abschnitt	Protein	Intervention	Alle Populationen	Kontrollen
5'UTR	-	0,0605	0,5295	0,5205
ORF 1ab	Nsp1	1,0000	0,5198	0,0246
ORF 1ab	Nsp2	0,0516	0,0623	0,0383
ORF 1ab	Nsp3	0,0314	0,1087	0,0971
ORF 1ab	Nsp4	0,0767	0,1487	0,1153
ORF 1ab	Nsp5	0,0265	0,0446	0,0328
ORF 1ab	Nsp6	0,0575	0,0333	0,0050
ORF 1ab	Nsp7	0,0686	0,0531	0,0199
ORF 1ab	Nsp8	0,0026	0,0033	0,0021
ORF 1ab	Nsp9	0,0654	0,9248	0,9301
ORF 1ab	Nsp10	0,0000	0,0074	0,0077
ORF 1ab	Nsp11	0,0000	0,0000	0,0000
ORF 1ab	Nsp12	0,0664	0,0492	0,0170
ORF 1ab	Nsp13	0,0737	0,1234	0,0905
ORF 1ab	Nsp14	0,0477	0,0333	0,0100
ORF 1ab	Nsp15	0,0609	0,0414	0,0116
ORF 1ab	Nsp16	0,0237	0,0118	0,0000
ORF S	Spike-Protein	0,1444	0,2712	0,2033
ORF 3	Protein 3	0,1463	0,3634	0,3031
ORF E	Envelope-Protein	0,0817	1,0000	1,0000
ORF M	Membrane-Protein	0,0074	0,1458	0,1482
ORF N	Nucleocapsid-Protein	0,0127	0,0229	0,0173
3'UTR	-	0,0350	0,0230	0,0059

Tabelle 58: Relative Mutationsdichte über alle Passageexperimente 2: Einbezogen wurden alle festgestellten Mutationen welche nach den drei Passageexperimenten festgestellt worden waren. (ORF: Open reading frame; Nsp: Nichtstrukturprotein; UTR: Nicht translatierte Region)

Mutationen in den nicht translatierten Regionen

Position im Genom	Referenz	Variante	Abschnitt	N	∅ AF, %
1	C	G	5'UTR	1	47,4
4	A	T	5'UTR	1	25,3
17	GAATT	AAAA	5'UTR	1	42,2
25	A	G	5'UTR	1	10,4
27	A	G	5'UTR	2	6,7
64	C	A	5'UTR	9	28,5
173	C	T	5'UTR	4	11,7
190	T	C	5'UTR	21	20,8
213	A	G	5'UTR	1	47,1
27419	T	G	3'UTR	1	11,8
27467	G	A	3'UTR	2	4,8
27549	T	C	3'UTR	3	3,1

Tabelle 59: Mutationen in den nicht translatierten Regionen: Aufgeführt sind die Mutationen am 5'- bzw. 3'-Ende des NL63-Genoms. Unter N ist die Anzahl der betroffenen Populationen, unter ∅ AF die durchschnittliche Allelfrequenz der Mutation angegeben.

Literaturverzeichnis

1. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*. 2004;10(4):368-73.
2. Schwegmann-Wessels C, Herrler G. Transmissible gastroenteritis virus infection: a vanishing specter. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2006;113(4):157-9.
3. Drosten C, Preiser W, Günther S, Schmitz H, Doerr HW. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med*. 2003;9(8):325-7.
4. Hu B, Ge X, Wang LF, Shi Z. Bat origin of human coronaviruses. *Virology*. 2015;12:221.
5. Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, Abreu P, Bao W, Wisemandle W, et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(15):1397-408.
6. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *The New England journal of medicine*. 2022;386(6):509-20.
7. Vangeel L, Chiu W, De Jonghe S, Maes P, Slechten B, Raymenants J, et al. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Res*. 2022;198:105252.
8. Carbajo-Lozoya J, Ma-Lauer Y, Malešević M, Theuerkorn M, Kahlert V, Prell E, et al. Human coronavirus NL63 replication is cyclophilin A-dependent and inhibited by non-immunosuppressive cyclosporine A-derivatives including Alisporivir. *Virus Research*. 2014;184(Supplement C):44-53.
9. Peel M, Scribner A. Cyclophilin inhibitors as antiviral agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(16):4485-92.
10. Liu X, Zhao Z, Li Z, Xu C, Sun L, Chen J, et al. Cyclosporin A Inhibits the Influenza Virus Replication through Cyclophilin A-Dependent and -Independent Pathways. *PLOS ONE*. 2012;7(5):e37277.
11. ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy: 2020 Release 2021*; Abgerufen am 23.05.2021 unter: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
12. Wertheim JO, Chu DKW, Peiris JSM, Kosakovsky Pond SL, Poon LLM. A case for the ancient origin of coronaviruses. *Journal of virology*. 2013;87(12):7039-45.
13. Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of virology*. 2012;86(7):3995-4008.
14. Almeida JD, Tyrrell DA. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol*. 1967;1(2):175-8.
15. Cunningham; JDADMBCH, McIntosh; DHMSHLMK, Tyrrell DAJ. *Virology: Coronaviruses*. *Nature*. 1968;220(5168):650-.
16. Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*. 1997;48:1-100.
17. Ferron F, Subissi L, Silveira De Morais AT, Le NTT, Sevajol M, Gluais L, et al. Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(2):E162.
18. Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, et al. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS pathogens*. 2010;6(5):e1000896.
19. Robson F, Khan KS, Le TK, Paris C, Demirbag S, Barfuss P, et al. Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting. *Molecular cell*. 2020;79(5):710-27.
20. Fan H, Ooi A, Tan YW, Wang S, Fang S, Liu DX, et al. The Nucleocapsid Protein of Coronavirus Infectious Bronchitis Virus: Crystal Structure of Its N-Terminal Domain and Multimerization Properties. *Structure*. 2005;13(12):1859-68.

21. Lang Y, Chen K, Li Z, Li H. The nucleocapsid protein of zoonotic betacoronaviruses is an attractive target for antiviral drug discovery. *Life Sciences*. 2020;118754.
22. Brierley I, Digard P, Inglis SC. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell*. 1989;57(4):537-47.
23. Liphardt J, Naphine S, Kontos H, Brierley I. Evidence for an RNA pseudoknot loop-helix interaction essential for efficient -1 ribosomal frameshifting. *J Mol Biol*. 1999;288(3):321-35.
24. Baranov PV, Henderson CM, Anderson CB, Gesteland RF, Atkins JF, Howard MT. Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. *Virology*. 2005;332(2):498-510.
25. Bhatt PR, Scaiola A, Loughran G, Leibundgut M, Kratzel A, Meurs R, et al. Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science*. 2021;372(6548):1306.
26. Plant EP, Dinman JD. The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation. *Front Biosci*. 2008;13:4873-81.
27. Jain J, Gaur S, Chaudhary Y, Kaul R. The molecular biology of intracellular events during Coronavirus infection cycle. *Virusdisease*. 2020;31(2):1-5.
28. Yang D, Leibowitz JL. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Research*. 2015;206:120-33.
29. Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol*. 1988;69 (Pt 12):2939-52.
30. Sawicki SG, Sawicki DL. Coronaviruses use Discontinuous Extension for Synthesis of Subgenome-Length Negative Strands. In: Talbot PJ, Levy GA, editors. *Corona- and Related Viruses: Current Concepts in Molecular Biology and Pathogenesis*. Boston, MA: Springer US; 1995. p. 499-506.
31. Wu H-Y, Brian DA. Subgenomic messenger RNA amplification in coronaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(27):12257.
32. Fu K, Baric RS. Map locations of mouse hepatitis virus temperature-sensitive mutants: confirmation of variable rates of recombination. *Journal of virology*. 1994;68(11):7458-66.
33. Lin H-X, Feng Y, Tu X, Zhao X, Hsieh C-H, Griffin L, et al. Characterization of the spike protein of human coronavirus NL63 in receptor binding and pseudotype virus entry. *Virus research*. 2011;160(1-2):283-93.
34. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*. 2021;19(3):155-70.
35. Thoms M, Buschauer R, Ameismeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, et al. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science*. 2020;369(6508):1249.
36. Narayanan K, Ramirez SI, Lokugamage KG, Makino S. Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus research*. 2015;202:89-100.
37. Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. SARS Coronavirus nsp1 Protein Induces Template-Dependent Endonucleolytic Cleavage of mRNAs: Viral mRNAs Are Resistant to nsp1-Induced RNA Cleavage. *PLoS pathogens*. 2011;7(12):e1002433.
38. Cornillez-Ty CT, Liao L, Yates JR, 3rd, Kuhn P, Buchmeier MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *J Virol*. 2009;83(19):10314-8.
39. Angelini Megan M, Akhlaghpour M, Neuman Benjamin W, Buchmeier Michael J, Moscona A. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles. *mBio*. 4(4):e00524-13.
40. Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, Bárcena M. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends Microbiol*. 2020;28(12):1022-33.
41. Imbert I, Guillemot JC, Bourhis JM, Busetta C, Coutard B, Egloff MP, et al. A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *Embo j*. 2006;25(20):4933-42.
42. te Velthuis AJW, Arnold JJ, Cameron CE, van den Worm SHE, Snijder EJ. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Research*. 2010;38(1):203-14.

43. Seybert A, Hegyi A, Siddell SG, Ziebuhr J. The human coronavirus 229E superfamily 1 helicase has RNA and DNA duplex-unwinding activities with 5'-to-3' polarity. *RNA*. 2000;6(7):1056-68.
44. Bouvet M, Imbert I, Subissi L, Gluais L, Canard B, Decroly E. RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(24):9372.
45. Minskaia E, Hertzog T, Gorbalenya AE, Campanacci V, Cambillau C, Canard B, et al. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(13):5108-13.
46. Bouvet M, Debarnot C, Imbert I, Selisko B, Snijder EJ, Canard B, et al. In vitro reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS pathogens*. 2010;6(4):e1000863.
47. Chang LJ, Chen TH. NSP16 2'-O-MTase in Coronavirus Pathogenesis: Possible Prevention and Treatments Strategies. *Viruses*. 2021;13(4).
48. Banerjee AK, Blanco MR, Bruce EA, Honson DD, Chen LM, Chow A, et al. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell*. 2020;183(5):1325-39.e21.
49. Egloff M-P, Ferron F, Campanacci V, Longhi S, Rancurel C, Dutartre H, et al. The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(11):3792.
50. Ulferts R, Ziebuhr J. Nidovirus ribonucleases: Structures and functions in viral replication. *RNA Biol*. 2011;8(2):295-304.
51. Bhardwaj K, Guarino L, Kao CC. The severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp15 protein is an endoribonuclease that prefers manganese as a cofactor. *Journal of virology*. 2004;78(22):12218-24.
52. Kern DM, Sorum B, Mali SS, Hoel CM, Sridharan S, Remis JP, et al. Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 ORF3a in lipid nanodiscs. *Nat Struct Mol Biol*. 2021.
53. Müller MA, Hoek Lvd, Voss D, Bader O, Lehmann D, Schulz AR, et al. Human Coronavirus NL63 Open Reading Frame 3 encodes a virion-incorporated N-glycosylated membrane protein. *Robert Koch-Institut*; 2010.
54. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology*. 2019;16(1):69.
55. Corse E, Machamer CE. Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles. *J Virol*. 2000;74(9):4319-26.
56. Mortola E, Roy P. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett*. 2004;576(1-2):174-8.
57. Fischer F, Stegen CF, Masters PS, Samsonoff WA. Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *J Virol*. 1998;72(10):7885-94.
58. DeDiego ML, Alvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol*. 2007;81(4):1701-13.
59. Almazán F, DeDiego ML, Sola I, Zuñiga S, Nieto-Torres JL, Marquez-Jurado S, et al. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio*. 2013;4(5):e00650-13.
60. DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Jiménez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Alvarez E, Oliveros JC, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS pathogens*. 2011;7(10):e1002315.
61. Wong NA, Saier MH, Jr. The SARS-Coronavirus Infection Cycle: A Survey of Viral Membrane Proteins, Their Functional Interactions and Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3).
62. Tseng Y-T, Chang C-H, Wang S-M, Huang K-J, Wang C-T. Identifying SARS-CoV Membrane Protein Amino Acid Residues Linked to Virus-Like Particle Assembly. *PLOS ONE*. 2013;8(5):e64013.

63. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol.* 2011;174(1):11-22.
64. He R, Dobie F, Ballantine M, Leeson A, Li Y, Bastien N, et al. Analysis of multimerization of the SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(2):476-83.
65. Chang C-k, Hou M-H, Chang C-F, Hsiao C-D, Huang T-h. The SARS coronavirus nucleocapsid protein – Forms and functions. *Antiviral Research.* 2014;103(Supplement C):39-50.
66. Macnaughton MR, Davies HA, Nermut MV. Ribonucleoprotein-like Structures from Coronavirus Particles. *Journal of General Virology.* 1978;39(3):545-9.
67. Isaacs D, Flowers D, Clarke JR, Valman HB, MacNaughton MR. Epidemiology of coronavirus respiratory infections. *Arch Dis Child.* 1983;58(7):500-3.
68. Myint SH. Human coronaviruses: A brief review. *Rev Med Virol.* 1994;4(1):35-46.
69. Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):539-42.
70. Nokso-Koivisto J, Pitkäranta A, Blomqvist S, Kilpi T, Hovi T. RESPIRATORY CORONAVIRUS INFECTIONS IN CHILDREN YOUNGER THAN TWO YEARS OF AGE. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2000;19(2).
71. Tong TR. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV). *Perspect Med Virol.* 2006;16:43-95.
72. WHO. WHO | Dr. Carlo Urbani of the World Health Organization dies of SARS 2003; abgerufen am 02.06.2021 unter: <https://www.who.int/csr/sars/urbani/en/>.
73. CDC. Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome ---Worldwide, 2003 2003; abgerufen am 02.06.2021 unter: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5211a5.htm>.
74. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, Becker S, et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine.* 2003;348(20):1967-76.
75. WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 2003; abgerufen am 02.06.2021 unter: <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>.
76. Yu ITS, Sung JY. The epidemiology of the outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Hong Kong--what we do know and what we don't. *Epidemiol Infect.* 2004;132(5):781-6.
77. WHO. WHO | China's latest SARS outbreak has been contained, but biosafety concerns remain – Update 7 2004; angerufen am 02.06.2021 unter: https://www.who.int/csr/don/2004_05_18a/en/.
78. Hoek Lvander, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med.* 2004;10.
79. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol.* 2005;79.
80. Woo PC, Lau SK, Tsoi HW, Huang Y, Poon RW, Chu CM, et al. Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J Infect Dis.* 2005;192(11):1898-907.
81. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol.* 2007;81(7):3051-7.
82. Motavalli R, Abdelbasset WK, Rahman HS, Achmad MH, Zekiy AO, Adili A, et al. The lethal internal face of the coronaviruses: Kidney tropism of the SARS, MERS, and COVID-19 viruses. *IUBMB Life.* 2021.
83. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) NCFBI. MERS-CoV Infection treated With A Combination of Lopinavir /Ritonavir and Interferon Beta-1b - Full Text View - ClinicalTrials.gov (NCT number): NCT02845843 2020 [22.09.21]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02845843>.
84. Azhar EI, Hui DSC, Memish ZA, Drosten C, Zumla A. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(4):891-905.

85. Kim KH, Tandil TE, Choi JW, Moon JM, Kim MS. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) outbreak in South Korea, 2015: epidemiology, characteristics and public health implications. *J Hosp Infect.* 2017;95(2):207-13.
86. Kim SW, Park JW, Jung HD, Yang JS, Park YS, Lee C, et al. Risk factors for transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection during the 2015 outbreak in South Korea. *Clin Infect Dis.* 2017;64(5):551-7.
87. Ciotti M, Angeletti S, Minieri M, Giovannetti M, Benvenuto D, Pascarella S, et al. COVID-19 Outbreak: An Overview. *Chemotherapy.* 2019;64(5-6):215-23.
88. WHO WHO. Pneumonia of unknown cause – China 2020 [22.09.2021]. Abgerufen am 22.09.2021 unter: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2020-DON229>.
89. WHO WHO. Statement on the meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus 2019 (n-CoV) on 23 January 2020 [22.09.2021]. Abgerufen am 22.09.2021 unter: [https://www.who.int/news/item/23-01-2020-statement-on-the-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news/item/23-01-2020-statement-on-the-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)).
90. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* 2020;584(7821):430-6.
91. Popkin BM, Du S, Green WD, Beck MA, Algaith T, Herbst CH, et al. Individuals with obesity and COVID-19: A global perspective on the epidemiology and biological relationships. *Obes Rev.* 2020;21(11):e13128.
92. Amenta EM, Spallone A, Rodriguez-Barradas MC, El Sahly HM, Atmar RL, Kulkarni PA. Postacute COVID-19: An Overview and Approach to Classification. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(12):ofaa509.
93. Stadnytskyi V, Anfinrud P, Bax A. Breathing, speaking, coughing or sneezing: What drives transmission of SARS-CoV-2? *J Intern Med.* 2021.
94. Medicine JHU. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center: Johns Hopkins University & Medicine. Abgerufen am 01.07.2021 unter: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
95. National Library of Medicine. coronavirus - Search Results - PubMed Abgerufen am 14.03.2023 unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=coronavirus&sort=date>.
96. Grygiel-Górniak B. Antimalarial drugs-are they beneficial in rheumatic and viral diseases?-considerations in COVID-19 pandemic. *Clin Rheumatol.* 2021:1-18.
97. Horby PW, Mafham M, Bell JL, Linsell L, Staplin N, Emberson J, et al. Lopinavir–ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *The Lancet.* 2020;396(10259):1345-52.
98. Casadevall A, Pirofski L-a. The convalescent sera option for containing COVID-19. *The Journal of Clinical Investigation.* 2020;130(4):1545-8.
99. Shen C, Wang Z, Zhao F, Yang Y, Li J, Yuan J, et al. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *JAMA.* 2020;323(16):1582-9.
100. Hurt AC, Wheatley AK. Neutralizing Antibody Therapeutics for COVID-19. *Viruses.* 2021;13(4).
101. Heustess AM, Allard MA, Thompson DK, Fasinu PS. Clinical Management of COVID-19: A Review of Pharmacological Treatment Options. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(6).
102. WHO. WHO recommends against the use of remdesivir in COVID-19 patients: World Health Organisation; 2020. Abgerufen am 04.07.2021 unter: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/who-recommends-against-the-use-of-remdesivir-in-covid-19-patients>.
103. Group TRC. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine.* 2020;384(8):693-704.
104. Ramakrishnan S, Nicolau DV, Jr., Langford B, Mahdi M, Jeffers H, Mwasuku C, et al. Inhaled budesonide in the treatment of early COVID-19 (STOIC): a phase 2, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2021;9(7):763-72.
105. Lamb YN. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. *Drugs.* 2021;81(4):495-501.
106. Soiza RL, Scicluna C, Thomson EC. Efficacy and safety of COVID-19 vaccines in older people. *Age and Ageing.* 2021;50(2):279-83.

107. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2020;384(5):403-16.
108. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *The Lancet*. 2021;397(10269):99-111.
109. Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, Heerwegh D, Truyers C, de Groot AM, et al. Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(19):1824-35.
110. Boehm E, Kronig I, Neher RA, Eckerle I, Vetter P, Kaiser L. Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clin Microbiol Infect*. 2021.
111. Lazarevic I, Pravica V, Miljanovic D, Cupic M. Immune Evasion of SARS-CoV-2 Emerging Variants: What Have We Learnt So Far? *Viruses*. 2021;13(7).
112. Novazzi F, Baj A, Genoni A, Spezia PG, Colombo A, Cassani G, et al. SARS-CoV-2 B.1.1.7 reinfection after previous COVID-19 in two immunocompetent Italian patients. *J Med Virol*. 2021.
113. Wall EC, Wu M, Harvey R, Kelly G, Warchal S, Sawyer C, et al. Neutralising antibody activity against SARS-CoV-2 VOCs B.1.617.2 and B.1.351 by BNT162b2 vaccination. *The Lancet*. 2021;397(10292):2331-3.
114. Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*. 2020;5(11):1403-7.
115. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *medRxiv*. 2021:2020.12.24.20248822.
116. Gangavarapu K, Latif AA, Mullen JL, Alkuzweny M, Hufbauer E, Tsueng G, et al. Outbreak.info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations. *Nature Methods*. 2023.
117. Karthik Gangavarapu AAL, Julia L. Mullen et al. Outbreak.info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations: B.1.1.7 Lineage Report Outbreak.info2023. Abgerufen am 06.03.2023 unter: https://outbreak.info/situation-reports?pango=B.1.1.7&loc=GBR&loc=USA&loc=USA_US-CA&selected=Worldwide.
118. Sah P, Vilches TN, Shoukat A, Fitzpatrick MC, Pandey A, Singer BH, et al. Quantifying the potential dominance of immune-evading SARS-CoV-2 variants in the United States. *medRxiv*. 2021.
119. Callaway E. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. *Nature*. 2021;595(7865):17-8.
120. Karthik Gangavarapu AAL, Julia L. Mullen et al. B.1.617.2 Lineage Report Outbreak.info2023. Abgerufen am 06.03.2023 unter: <https://outbreak.info/situation-reports?pango=B.1.617.2>.
121. Callaway E. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert. *Nature*. 2021;600(7887):21.
122. Torjesen I. Covid-19: Omicron may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. *Bmj*. 2021;375:n2943.
123. Karthik Gangavarapu AAL, Julia L. Mullen et al. Omicron Variant Report Outbreak.info2023. Abgerufen am 06.03.2023 unter: <https://outbreak.info/situation-reports/Omicron?xmin=2022-09-06&xmax=2023-03-06>.
124. Statistisches Bundesamt. Die Folgen der Corona-Pandemie in 10 Zahlen 2021 . Abgerufen am 11.07.2021 unter: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/03/PD21_N023_p001.html.
125. Landeszentrale für politische Bildung BW. Folgen von Corona | Auswirkungen auf die Wirtschaft: Landeszentrale für politische Bildung BW; 2021. Abgerufen am 11.07.2021 unter: <https://www.lpb-bw.de/wirtschaft-und-corona>.
126. Chackalackal DJ, Al-Aghbari AA, Jang SY, Ramirez TR, Vincent J, Joshi A, et al. The Covid-19 pandemic in low- and middle-income countries, who carries the burden? Review of mass media and publications from six countries. *Pathog Glob Health*. 2021;115(3):178-87.

127. Bar-On YM, Goldberg Y, Mandel M, Bodenheimer O, Freedman L, Alroy-Preis S, et al. Protection against Covid-19 by BNT162b2 Booster across Age Groups. *The New England journal of medicine*. 2021;385(26):2421-30.
128. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC updates its guidance regarding quarantine and isolation considering the rapid spread of Omicron in the EU/EEA: ECDC; 2022: Abgerufen am 11.03.2023 unter <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-updates-guidance-regarding-quarantine-and-isolation-considering-spread-of-omicron>.
129. Accorsi EK, Britton A, Fleming-Dutra KE, Smith ZR, Shang N, Derado G, et al. Association Between 3 Doses of mRNA COVID-19 Vaccine and Symptomatic Infection Caused by the SARS-CoV-2 Omicron and Delta Variants. *Jama*. 2022;327(7):639-51.
130. Chen JM. Novel statistics predict the COVID-19 pandemic could terminate in 2022. *J Med Virol*. 2022;94(6):2845-8.
131. tagesschau.de. Drogen zur Corona-Lage: "Die Pandemie ist vorbei" | tagesschau.de 2022. Abgerufen am 06.03.2023 unter: <https://www.tagesschau.de/inland/gesellschaft/corona-pandemie-drogen-101.html>.
132. Verordnung zur Aufhebung der Siebzehnten Bayerischen Infektionsschutzmaßnahmenverordnung, (2023).
133. Bachem CW, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J*. 1996;9(5):745-53.
134. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*. 2004;10(4):368-73.
135. van der Hoek L, Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J. and Berkhout, B. Human Coronavirus NL63, complete genome Pubmed2004. Abgerufen am 11.07.2021 unter https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_005831.2?report=genbank.
136. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6212-6.
137. van der Hoek L. Human coronaviruses: what do they cause? *Antivir Ther*. 2007;12(4 Pt B):651-8.
138. van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006;30(5):760-73.
139. Dijkman R, Jebbink MF, El Idrissi NB, Pyrc K, Muller MA, Kuijpers TW, et al. Human coronavirus NL63 and 229E seroconversion in children. *J Clin Microbiol*. 2008;46.
140. Kristoffersen AW, Nordbø SA, Rognlien AG, Christensen A, Døllner H. Coronavirus causes lower respiratory tract infections less frequently than RSV in hospitalized Norwegian children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(4):279-83.
141. Corman VM, Lienau J, Witzenthat M. Coronaviren als Ursache respiratorischer Infektionen. *Der Internist*. 2019;60(11):1136-45.
142. Huang SH, Su MC, Tien N, Huang CJ, Lan YC, Lin CS, et al. Epidemiology of human coronavirus NL63 infection among hospitalized patients with pneumonia in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017;50(6):763-70.
143. Mayer K, Nellesen C, Hahn-Ast C, Schumacher M, Pietzonka S, Eis-Hübinger AM, et al. Fatal outcome of human coronavirus NL63 infection despite successful viral elimination by IFN-alpha in a patient with newly diagnosed ALL. *Eur J Haematol*. 2016;97(2):208-10.
144. Oosterhof L, Christensen CB, Sengeløv H. Fatal lower respiratory tract disease with human coronavirus NL63 in an adult haematopoietic cell transplant recipient. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(6):1115-6.
145. Jung K, Saif LJ, Wang Q. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control. *Virus Res*. 2020;286:198045.

146. Zhou P, Fan H, Lan T, Yang XL, Shi WF, Zhang W, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature*. 2018;556(7700):255-8.
147. Ignjatović J, Sapats S. Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech*. 2000;19(2):493-508.
148. Legnardi M, Tucciarone CM, Franzo G, Cecchinato M. Infectious Bronchitis Virus Evolution, Diagnosis and Control. *Vet Sci*. 2020;7(2).
149. Levy G, Abecassis M. Activation of the immune coagulation system by murine hepatitis virus strain 3. *Rev Infect Dis*. 1989;11 Suppl 4(Suppl 4):S712-21.
150. Matthews AE, Weiss SR, Paterson Y. Murine hepatitis virus--a model for virus-induced CNS demyelination. *J Neurovirol*. 2002;8(2):76-85.
151. Licitra BN, Duhamel GE, Whittaker GR. Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. *Viruses*. 2014;6(8):3363-76.
152. Decaro N, Buonavoglia C. Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2011;41(6):1121-32.
153. Tekes G, Thiel HJ. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. *Adv Virus Res*. 2016;96:193-218.
154. Kennedy MA. Feline Infectious Peritonitis: Update on Pathogenesis, Diagnostics, and Treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2020;50(5):1001-11.
155. Amirian ES, Levy JK. Current knowledge about the antivirals remdesivir (GS-5734) and GS-441524 as therapeutic options for coronaviruses. *One Health*. 2020;9:100128.
156. Latinne A, Hu B, Olival KJ, Zhu G, Zhang L, Li H, et al. Origin and cross-species transmission of bat coronaviruses in China. *Nature Communications*. 2020;11(1):4235.
157. Banerjee A, Baker ML, Kulcsar K, Misra V, Plowright R, Mossman K. Novel Insights Into Immune Systems of Bats. *Front Immunol*. 2020;11:26.
158. Frutos R, Serra-Cobo J, Pinault L, Lopez Roig M, Devaux CA. Emergence of Bat-Related Betacoronaviruses: Hazard and Risks. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12(437).
159. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(3):181-92.
160. Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Thoelen I, Wollants E, Lemey P, et al. Complete Genomic Sequence of Human Coronavirus OC43: Molecular Clock Analysis Suggests a Relatively Recent Zoonotic Coronavirus Transmission Event. *Journal of Virology*. 2005;79(3):1595.
161. Sharun K, Tiwari R, Natesan S, Dhama K. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, associated zoonotic concerns, and importance of the One Health approach during the ongoing COVID-19 pandemic. *Vet Q*. 2021;41(1):50-60.
162. Edwards CE, Yount BL, Graham RL, Leist SR, Hou YJ, Dinnon KH, et al. Swine acute diarrhea syndrome coronavirus replication in primary human cells reveals potential susceptibility to infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(43):26915.
163. Vlasova AN, Diaz A, Dامتie D, Xiu L, Toh T-H, Lee JS-Y, et al. Novel Canine Coronavirus Isolated from a Hospitalized Pneumonia Patient, East Malaysia. *Clinical Infectious Diseases*. 2021.
164. Caillat C, Guilligay D, Sulbaran G, Weissenhorn W. Neutralizing Antibodies Targeting HIV-1 gp41. *Viruses*. 2020;12(11).
165. Sok D, Burton DR. Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV. *Nat Immunol*. 2018;19(11):1179-88.
166. Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(2):143-55.
167. Pattnaik GP, Chakraborty H. Entry Inhibitors: Efficient Means to Block Viral Infection. *J Membr Biol*. 2020;253(5):425-44.
168. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(33):11876-81.
169. Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *Embo j*. 1985;4(11):3021-4.

170. Li TC, Chan MC, Lee N. Clinical Implications of Antiviral Resistance in Influenza. *Viruses*. 2015;7(9):4929-44.
171. Sclair SN, Hernandez MDP, Vance E, Gilinski D, Youtseff H, Toro M, et al. Sofosbuvir and Simeprevir Combination Therapy for HCV Genotype 1 Infection: Results of a Single-Center VA Experience. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2016;12(8):490-7.
172. Zhang L, Lin D, Kusov Y, Nian Y, Ma Q, Wang J, et al. α -Ketoamides as Broad-Spectrum Inhibitors of Coronavirus and Enterovirus Replication: Structure-Based Design, Synthesis, and Activity Assessment. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020.
173. Tripathi N, Tripathi N, Goshisht MK. COVID-19: inflammatory responses, structure-based drug design and potential therapeutics. *Mol Divers*. 2021:1-17.
174. Lundin A, Dijkman R, Bergström T, Kann N, Adamiak B, Hannoun C, et al. Targeting Membrane-Bound Viral RNA Synthesis Reveals Potent Inhibition of Diverse Coronaviruses Including the Middle East Respiratory Syndrome Virus. *PLoS pathogens*. 2014;10(5):e1004166.
175. Long C, Romero ME, La Rocco D, Yu J. Dissecting nucleotide selectivity in viral RNA polymerases. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021;19:3339-48.
176. Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science*. 1972;177(4050):705-6.
177. Witkowski JT, Robins RK, Sidwell RW, Simon LN. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-.beta.-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1972;15(11):1150-4.
178. Geraghty RJ, Aliota MT, Bonnac LF. Broad-Spectrum Antiviral Strategies and Nucleoside Analogues. *Viruses*. 2021;13(4).
179. Karatas E, Aksoy L, Ozaslan E. Association of Early Favipiravir Use with Reduced COVID-19 Fatality among Hospitalized Patients. *Infect Chemother*. 2021;53(2):300-7.
180. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, Graham RL, Pruijssers AJ, Agostini ML, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Science Translational Medicine*. 2020;12(541):eabb5883.
181. Mukherjee D RU. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Assembly Inhibitors: Repurposing Antiviral and Antimicrobial Drugs Targeting Nucleocapsid-RNA Interaction. Cambridge: Cambridge Open Engage. 2020.
182. Bhowmik D, Nandi R, Jagadeesan R, Kumar N, Prakash A, Kumar D. Identification of potential inhibitors against SARS-CoV-2 by targeting proteins responsible for envelope formation and virion assembly using docking based virtual screening, and pharmacokinetics approaches. *Infect Genet Evol*. 2020;84:104451-.
183. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(9):4171-5.
184. Belshaw R, Gardner A, Rambaut A, Pybus OG. Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. *Trends in ecology & evolution*. 2008;23(4):188-93.
185. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *J Virol*. 2010;84(19):9733-48.
186. Duffy S. Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLOS Biology*. 2018;16(8):e3000003.
187. Smith EC, Denison MR. Coronaviruses as DNA wannabes: a new model for the regulation of RNA virus replication fidelity. *PLoS pathogens*. 2013;9(12):e1003760.
188. Eckerle LD, Lu X, Sperry SM, Choi L, Denison MR. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. *Journal of virology*. 2007;81(22):12135-44.
189. Smith EC, Blanc H, Vignuzzi M, Denison MR. Coronaviruses Lacking Exoribonuclease Activity Are Susceptible to Lethal Mutagenesis: Evidence for Proofreading and Potential Therapeutics. *PLoS pathogens*. 2013;9(8):e1003565.
190. Sauerbrei A, Bohn-Wippert K, Kaspar M, Krumbholz A, Karrasch M, Zell R. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA

- polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(1):6-16.
191. Ullah H, Hou W, Dakshanamurthy S, Tang Q. Host targeted antiviral (HTA): functional inhibitor compounds of scaffold protein RACK1 inhibit herpes simplex virus proliferation. *Oncotarget*. 2019;10(35):3209-26.
192. Nkongolo S, Ni Y, Lempp FA, Kaufman C, Lindner T, Esser-Nobis K, et al. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol*. 2014;60(4):723-31.
193. Pfeifferle S, Schöpf J, Kögl M, Friedel CC, Müller MA, Carbajo-Lozoya J, et al. The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors. *PLoS pathogens*. 2011;7(10):e1002331.
194. Lang K, Schmid FX, Fischer G. Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature*. 1987;329(6136):268-70.
195. Harikishore A, Yoon HS. Immunophilins: Structures, Mechanisms and Ligands. *Curr Mol Pharmacol*. 2015;9(1):37-47.
196. Hoffmann H, Schiene-Fischer C. Functional aspects of extracellular cyclophilins. *Biological Chemistry*. 2014;395(7-8):721-35.
197. Harding MW, Handschumacher RE. Cyclophilin, a primary molecular target for cyclosporine. Structural and functional implications. *Transplantation*. 1988;46(2 Suppl):29s-35s.
198. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, Henderson R, et al. Cyclosporin A in clinical organ grafting. First Northern Ireland Kidney Research Fund lecture. *Ulster Med J*. 1981;50(Suppl 1):62-70.
199. Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*. 1989;337(6206):473-5.
200. Price ER, Jin M, Lim D, Pati S, Walsh CT, McKeon FD. Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(9):3931-5.
201. Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis*. 2013;4:e888.
202. Satoh K, Nigro P, Matoba T, O'Dell MR, Cui Z, Shi X, et al. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nature medicine*. 2009;15(6):649-56.
203. Kao H-W, Lee K-W, Chen W-L, Kuo C-L, Huang C-S, Tseng W-M, et al. Cyclophilin A in Ruptured Intracranial Aneurysm: A Prognostic Biomarker. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(39):e1683-e.
204. Nighoghossian N, Berthezène Y, Mechtouff L, Derex L, Cho TH, Ritzenthaler T, et al. Cyclosporine in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2015;84(22):2216-23.
205. Liao Y, Luo D, Peng K, Zeng Y. Cyclophilin A: a key player for etiological agent infection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(4):1365-77.
206. Fernandes F, Poole DS, Hoover S, Middleton R, Andrei AC, Gerstner J, et al. Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural proteins NS5A and NS5B. *Hepatology*. 2007;46(4):1026-33.
207. Hanouille X, Badillo A, Wieruszkeski J-M, Verdegem D, Landrieu I, Bartenschlager R, et al. Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(20):13589-601.
208. Chatterji U, Bobardt M, Schaffer L, Wood M, Gallay PA. Cyclophilin Inhibitors Remodel the Endoplasmic Reticulum of HCV-Infected Cells in a Unique Pattern Rendering Cells Impervious to a Reinfection. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0159511.
209. Flisiak R, Dumont JM, Crabbé R. Cyclophilin inhibitors in hepatitis C viral infection. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(9):1345-54.
210. Rosenwirth B, Billich A, Datema R, Donatsch P, Hammerschmid F, Harrison R, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analog. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(8):1763-72.

211. Stanciu C, Trifan A, Muzica C, Sfarti C. Efficacy and safety of alisporivir for the treatment of hepatitis C infection. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(4):379-84.
212. Pawlotsky J-M, Flisiak R, Sarin SK, Rasenack J, Piratvisuth T, Chuang W-L, et al. Alisporivir plus ribavirin, interferon free or in combination with pegylated interferon, for hepatitis C virus genotype 2 or 3 infection. *Hepatology*. 2015;62(4):1013-23.
213. Carbajo-Lozoya J, Ma-Lauer Y, Malešević M, Theuerkorn M, Kahlert V, Prell E, et al. Human coronavirus NL63 replication is cyclophilin A-dependent and inhibited by non-immunosuppressive cyclosporine A-derivatives including Alisporivir. *Virus Res*. 2014;184:44-53.
214. von Brunn A, Ciesek S, von Brunn B, Carbajo-Lozoya J. Genetic deficiency and polymorphisms of cyclophilin A reveal its essential role for Human Coronavirus 229E replication. *Curr Opin Virol*. 2015;14:56-61.
215. de Wilde AH, Zevenhoven-Dobbe JC, Beugeling C, Chatterji U, de Jong D, Gallay P, et al. Coronaviruses and arteriviruses display striking differences in their cyclophilin A-dependence during replication in cell culture. *Virology*. 2018;517:148-56.
216. Tanaka Y, Sato Y, Sasaki T. Feline coronavirus replication is affected by both cyclophilin A and cyclophilin B. *J Gen Virol*. 2017;98(2):190-200.
217. Luo C, Luo H, Zheng S, Gui C, Yue L, Yu C, et al. Nucleocapsid protein of SARS coronavirus tightly binds to human cyclophilin A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321(3):557-65.
218. de Wilde AH, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Thiel V, Narayanan K, Makino S, et al. Cyclosporin A inhibits the replication of diverse coronaviruses. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 11):2542-8.
219. de Wilde AH, Falzarano D, Zevenhoven-Dobbe JC, Beugeling C, Fett C, Martellaro C, et al. Alisporivir inhibits MERS- and SARS-coronavirus replication in cell culture, but not SARS-coronavirus infection in a mouse model. *Virus Res*. 2017;228:7-13.
220. Softic L, Brillet R, Berry F, Ahnou N, Nevers Q, Morin-Dewaele M, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 Infection by the Cyclophilin Inhibitor Alisporivir (Debio 025). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2020;64(7):e00876-20.
221. Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, Limpens RWAL, van der Meer Y, Caly L, et al. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *Journal of General Virology*. 2020;101(9):925-40.
222. Poulsen NN, von Brunn A, Hornum M, Blomberg Jensen M. Cyclosporine and COVID-19: Risk or favorable? *Am J Transplant*. 2020;20(11):2975-82.
223. Pawlotsky JM. COVID-19 Pandemic: Time to Revive the Cyclophilin Inhibitor Alisporivir. *Clin Infect Dis*. 2020;71(16):2191-4.
224. Balfour H. Phase II trial to establish if alisporivir can prevent COVID-19 progression: European Pharmaceutical Review. Abgerufen am 13.07.2021 unter <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/140512/phase-ii-trial-to-establish-whether-alisporivir-can-prevent-covid-19-progression/>.
225. Herzog P, Drosten C, Müller MA. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virology Journal*. 2008;5:138-.
226. ATCC. [Caco2] (ATCC® HTB37™) - Caco-2 product sheet. ATCC2018.
227. Clementi M, Menzo S, Manzin A, Bagnarelli P. Quantitative molecular methods in virology. *Arch Virol*. 1995;140(9):1523-39.
228. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and applications*. 1995;4(6):357-62.
229. Glowacka I, Bertram S, Herzog P, Pfefferle S, Steffen I, Muench MO, et al. Differential Downregulation of ACE2 by the Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Human Coronavirus NL63. *Journal of Virology*. 2010;84(2):1198.
230. Zhang Y, Ren L, and Wang J. Human coronavirus NL63 isolate 2093A_2010 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, partial cds. unpublished. 2010.
231. Herzog P, Drosten C, Müller MA. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virology Journal*. 2008;5(1):138.

232. Loustaud-Ratti V, Debette-Gratien M, Jacques J, Alain S, Marquet P, Sautereau D, et al. Ribavirin: Past, present and future. *World J Hepatol.* 2016;8(2):123-30.
233. de Wilde AH, Falzarano D, Zevenhoven-Dobbe JC, Beugeling C, Fett C, Martellaro C, et al. Alisporivir inhibits MERS- and SARS-coronavirus replication in cell culture, but not SARS-coronavirus infection in a mouse model. *Virus Research.* 2017;228:7-13.
234. Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology.* 2002;39(2):75-90.
235. Ji Y, Karbaschi M, Cooke MS. Mycoplasma infection of cultured cells induces oxidative stress and attenuates cellular base excision repair activity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2019;845:403054.
236. Schmitt K, Däubener W, Bitter-Suermann D, Hadding U. A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin. *Journal of Immunological Methods.* 1988;109(1):17-25.
237. Borup-Christensen P, Erb K, Jensenius JC. Curing human hybridomas infected with *Mycoplasma hyorhinis*. *Journal of Immunological Methods.* 1988;110(2):237-40.
238. Malenová H, Reichelová M. Elimination of mycoplasma contamination of virus stocks. *Veterinarni Medicina.* 2011;56:547-50.
239. UniProt Consortium. rep - Replicase polyprotein 1ab - Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) - rep gene & protein. Abgerufen am 22.04.2021 unter: https://www.uniprot.org/uniprot/P0C6X5#PRO_0000283884.
240. The UniProt C. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research.* 2021;49(D1):D480-D9.
241. Virus Pathogen Resource. Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) - Coronaviridae - Protein Details for replicase polyprotein orf1ab - Alphacoronavirus Human coronavirus NL63 - NL63/DEN/2005/1876. Abgerufen am 22.04.2021 unter: <https://www.viprbrc.org/brc/viprDetails.spg?ncbiProteinId=AFD98833&decorator=corona&context=1619074468761>.
242. Clementz MA, Chen Z, Banach BS, Wang Y, Sun L, Ratia K, et al. Deubiquitinating and interferon antagonism activities of coronavirus papain-like proteases. *J Virol.* 2010;84(9):4619-29.
243. Dominguez SR, Sims GE, Wentworth DE, Halpin RA, Robinson CC, Town CD, et al. Genomic analysis of 16 Colorado human NL63 coronaviruses identifies a new genotype, high sequence diversity in the N-terminal domain of the spike gene and evidence of recombination. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt 11):2387-98.
244. Geng H, Cui L, Xie Z, Lu R, Zhao L, Tan W. Characterization and Complete Genome Sequence of Human Coronavirus NL63 Isolated in China. *Journal of Virology.* 2012;86(17):9546.
245. Pyrc K, Dijkman R, Deng L, Jebbink MF, Ross HA, Berkhout B, et al. Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *Journal of molecular biology.* 2006;364(5):964-73.
246. Zhang L, Lin D, Kusov Y, Nian Y, Ma Q, Wang J, et al. α -Ketoamides as Broad-Spectrum Inhibitors of Coronavirus and Enterovirus Replication: Structure-Based Design, Synthesis, and Activity Assessment. *J Med Chem.* 2020;63(9):4562-78.
247. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Čech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research.* 2018;46(W1):W537-W44.
248. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1988;85(8):2444-8.
249. Cock PJA, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic acids research.* 2010;38(6):1767-71.
250. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology.* 2009;10(3):R25.
251. Schildgen O, Jebbink MF, de Vries M, Pyrc K, Dijkman R, Simon A, et al. Identification of cell lines permissive for human coronavirus NL63. *J Virol Methods.* 2006;138.

252. Wilm A, Aw PPK, Bertrand D, Yeo GHT, Ong SH, Wong CH, et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic acids research*. 2012;40(22):11189-201.
253. Wylezich C, Papa A, Beer M, Höper D. A Versatile Sample Processing Workflow for Metagenomic Pathogen Detection. *Scientific Reports*. 2018;8(1):13108.
254. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. 2011;29(1):24-6.
255. Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJA, Pritchard L, Cardle L, et al. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*. 2013;14(2):193-202.
256. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Prorule annotation rule: PRU01292. Abgerufen am 23.08.2022 unter: <https://prosite.expasy.org/rule/PRU01292>.
257. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*. 2019;47(W1):W636-W41.
258. Min Y-Q, Mo Q, Wang J, Deng F, Wang H, Ning Y-J. SARS-CoV-2 nsp1: Bioinformatics, Potential Structural and Functional Features, and Implications for Drug/Vaccine Designs. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11(2393).
259. Boniotti MB, Papetti A, Lavazza A, Alborali G, Sozzi E, Chiapponi C, et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(1):83-7.
260. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) NCfBI. NCBI Blast:Protein Sequence » results for RID-M8ZTSGDT01R 2021. Abgerufen am 17.09.2021 unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
261. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.
262. Schwartz M. The life and works of Louis Pasteur. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91(4):597-601.
263. Vignal MW. Report on M, Pasteur's Researches on Rabies and the Treatment of Hydrophobia by Preventive Inoculation. *Br Med J*. 1886;1(1319):671-3.
264. Fitzgerald JG. LOUIS PASTEUR-HIS CONTRIBUTION TO ANTHRAX, VACCINATION AND THE EVOLUTION OF A PRINCIPLE OF ACTIVE IMMUNIZATION. *Cal State J Med*. 1923;21(3):101-3.
265. Theiler M, Smith HH. THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. *J Exp Med*. 1937;65(6):787-800.
266. Barrett ADT, Teuwen DE. Yellow fever vaccine—how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Current Opinion in Immunology*. 2009;21(3):308-13.
267. Golub OJ. Acquired resistance of psittacosis virus to sulfadiazine and effects of chemical antagonists on sulfonamide activity. *J Lab Clin Med*. 1948;33(10):1241-8.
268. Melnick JL, Crowther D, Barrera-Oro J. Rapid Development of Drug-Resistant Mutants of Poliovirus. *Science*. 1961;134(3478):557.
269. Jackson GG, Muldoon RL, Akers LW. SEROLOGICAL EVIDENCE FOR PREVENTION OF INFLUENZAL INFECTION IN VOLUNTEERS BY AN ANTI-INFLUENZAL DRUG ADAMANTANAMINE HYDROCHLORIDE. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*. 1963;161:703-7.
270. Oxford JS, Logan IS, Potter CW. In vivo Selection of an Influenza A2 Strain resistant to Amantadine. *Nature*. 1970;226(5240):82-3.
271. Perales C, Beach NM, Gallego I, Soria ME, Quer J, Esteban JI, et al. Response of hepatitis C virus to long-term passage in the presence of alpha interferon: multiple mutations and a common phenotype. *Journal of virology*. 2013;87(13):7593-607.
272. Wright K. AIDS therapy: First tentative signs of therapeutic promise. *Nature*. 1986;323(6086):283-.
273. Larder BA, Coates KE, Kemp SD. Zidovudine-resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell culture. *J Virol*. 1991;65(10):5232-6.
274. Ratcliff AN, Shi W, Arts EJ. HIV-1 resistance to maraviroc conferred by a CD4 binding site mutation in the envelope glycoprotein gp120. *J Virol*. 2013;87(2):923-34.

275. Agostini Maria L, Andres Erica L, Sims Amy C, Graham Rachel L, Sheahan Timothy P, Lu X, et al. Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease. *mBio*. 2018;9(2):e00221-18.
276. Andreano E, Piccini G, Licastro D, Casalino L, Johnson NV, Paciello I, et al. SARS-CoV-2 escape from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(36).
277. Ma C, Li F, Musharrafieh RG, Wang J. Discovery of cyclosporine A and its analogs as broad-spectrum anti-influenza drugs with a high in vitro genetic barrier of drug resistance. *Antiviral Research*. 2016;133(Supplement C):62-72.
278. Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, Inoue K, Kohara M. Resistance to cyclosporin A derives from mutations in hepatitis C virus nonstructural proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448(1):56-62.
279. de Wilde AH, Boomaars-van der Zanden AL, de Jong AWM, Bárcena M, Snijder EJ, Posthuma CC. Adaptive Mutations in Replicase Transmembrane Subunits Can Counteract Inhibition of Equine Arteritis Virus RNA Synthesis by Cyclophilin Inhibitors. *Journal of virology*. 2019;93(18):e00490-19.
280. Gallay PA, Chatterji U, Bobardt MD, Long Z, Zhang S, Su Z. Characterization of the Anti-HCV Activities of the New Cyclophilin Inhibitor STG-175. *PLOS ONE*. 2016;11(4):e0152036.
281. Ma C, Li F, Musharrafieh RG, Wang J. Discovery of cyclosporine A and its analogs as broad-spectrum anti-influenza drugs with a high in vitro genetic barrier of drug resistance. *Antiviral Res*. 2016;133:62-72.
282. Ma C, Li F, Musharrafieh RG, Wang J. Discovery of cyclosporine A and its analogs as broad-spectrum anti-influenza drugs with a high in vitro genetic barrier of drug resistance. *Antiviral research*. 2016;133:62-72.
283. Wargo AR, Kurath G. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. *Current Opinion in Virology*. 2012;2(5):538-45.
284. Govorkova EA. Consequences of resistance: in vitro fitness, in vivo infectivity, and transmissibility of oseltamivir-resistant influenza A viruses. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7 Suppl 1(Suppl 1):50-7.
285. Cuevas JM, González-Candelas F, Moya A, Sanjuán R. Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *Journal of virology*. 2009;83(11):5760-4.
286. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993;362(6422):709-15.
287. Lindahl T, Nyberg B. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. 1974;13(16):3405-10.
288. Veit M, Matczuk AK, Sinhadri BC, Krause E, Thaa B. Membrane proteins of arterivirus particles: structure, topology, processing and function. *Virus research*. 2014;194:16-36.
289. Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, Inoue K, Kohara M. Resistance to cyclosporin A derives from mutations in hepatitis C virus nonstructural proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;448(1):56-62.
290. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) NCBI. NCBI Blast:Protein Sequence » results for RID-M8YBFJZV01R 2021. Abgerufen am 17.09.2021 unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>.
291. The UniProt Consortium. S - Spike glycoprotein precursor - Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) - S gene & protein 2021. abgerufen am 17.09.2021 unter: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q6Q1S2>.
292. The UniProt Consortium. S - Spike glycoprotein precursor - Porcine epidemic diarrhea virus (strain CV777) (PEDV) - S gene & protein 2021. Abgerufen am 17.09.2021 unter <https://www.uniprot.org/uniprot/Q91AV1>.
293. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) NCfBI. NCBI Blast:Protein Sequence » results for RID-M9HBJOXX013 2021. Abgerufen am 17.09.2021 unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
294. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) NCfBI. NCBI Blast:Protein Sequence » results for RID-M9RD45JD016 2021. Abgerufen am 17.09.2021 unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

295. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) NCfBI. NCBI Blast:Protein Sequence » results for RID-M9HT2UUY013 2021. Abgerufen am 17.09.2021 unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>.
296. Chen Z, Wang Y, Ratia K, Mesecar Andrew D, Wilkinson Keith D, Baker Susan C. Proteolytic Processing and Deubiquitinating Activity of Papain-Like Proteases of Human Coronavirus NL63. *Journal of Virology*. 2007;81(11):6007-18.
297. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) NCfBI. NCBI Blast:Protein Sequence » results for RID-MAA7SNUU016 2021. Abgerufen am 18.09.2021 unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>.
298. the UniProt Consortium. ORF3 - Protein 3 - Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) - ORF3 gene & protein. Abgerufen am 18.09.2021 unter: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q06XP3>.
299. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) NCfBI. NCBI Blast:Protein Sequence » results for RID-MABAVZ2K013 2021. Abgerufen am 18.09.2021 unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>.
300. the UniProt Consortium. N - Nucleoprotein - Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) - N gene & protein. Abgerufen am 18.09.2021 unter: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q6Q1R8>.
301. Kim J-M, Kim,S.-T., Yang,J.-S., Kim,S.S. and Cheong,H.-M. The complete genome sequence of human coronavirus NL63 CN/0601/14 strain, first isolated from South Korea. 2018.
302. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, et al. Human group 1 coronavirus associated with pneumonia, complete genome - Nucleotide - NCBI 2004. Abgerufen am 21.07.2021 unter: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY518894.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=FE731YYG016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY518894.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=FE731YYG016).
303. de Wilde AH, Boomaars-van der Zanden AL, de Jong AWM, Bárcena M, Snijder EJ, Posthuma CC. Adaptive Mutations in Replicase Transmembrane Subunits Can Counteract Inhibition of Equine Arteritis Virus RNA Synthesis by Cyclophilin Inhibitors. *J Virol*. 2019;93(18).
304. Martínez JL, Baquero F, Andersson DI. Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(5):439-45.
305. Miller CJ, Kassem HS, Pepper SD, Hey Y, Ward TH, Margison GP. Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. *Biotechniques*. 2003;35(4):812-4.
306. Bleidorn C. Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. *Systematics and Biodiversity*. 2016;14(1):1-8.

Danksagung

Ich möchte allen Personen, welche mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, meinen tiefen Dank aussprechen. Zuallererst gilt dies für meinen geschätzten Doktorvater, Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Albrecht von Brunn. Ihm gegenüber möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die intensive und ausführliche Einarbeitung, die Unterstützung während der gesamten Zeit und die gewährten Freiheiten in der Planung und Ausführung der Experimente bedanken. Dr. Yue Ma-Lauer stand immer mit Rat und Tat zur Seite und wies mich in die Technik der Split-YFP-Fluoreszenzmikroskopie ein. Frau Brigitte von Brunn hatte bereits im Vorfeld dieser Arbeit den größten Teil des NL63-ORFeoms in Plasmide eingefügt und stellte mir diese dann für die Experimente zur Proteininteraktion zur Verfügung. Auch ihre bereitwillige Einführung und Unterstützung in den Laborbetrieb möchte ich nicht missen. Besonders möchte ich mich bei meinem Mitdokoranden Konstantin Pusl bedanken. Unsere Diskussionen zu Experimenten und Problemlösungen werden mir im Gedächtnis bleiben. So waren selbst lange Labornächte unterhaltsam und erkenntnisreich. Mit seinen Kenntnissen der Bioinformatik konnten neue Aspekte der Mutationsgewichtung gewonnen werden.

Auch PD Dr. Wolfgang Fischer vom Max von Pettenkofer-Institut der LMU München und Prof. Dr. rer. nat. Christian Ries vom Institute for Cardiovascular Prevention der LMU München gilt mein Dank. Als Mitbetreuer unterstützten sie das Projekt und standen mit gutem Rat zur Seite.

Ich danke Herrn PD Dr. Marcel Müller, Institut für Virologie der Charité Universitätsmedizin Berlin für die Überlassung von Stocks von HCoV-NL63, CaCo-2- und LLC-MK2-Zellen. Prof. Dr. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld, Institut für molekulare Medizin der Universität Lübeck, stellte dankenswerterweise die Proteaseninhibitoren, welche im ersten Passageexperiment Anwendung fanden, zur Verfügung.

Die Sequenzierung des NL63-Genoms im Anschluss an die Passageexperimente wäre nicht ohne Unterstützung von außen möglich gewesen. Dr. Helmut Blum und Dr. Stefan Krebs vom Genzentrum der LMU führten die Sequenzierung der Proben zu den Passageexperimenten 1 & 2 durch und wiesen mich in die Grundlagen der Analyse der Rohdaten ein. Weitere Analysen wurden PD Dr. Torsten Hain und Theresa Graf, Medizinische Mikrobiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Für das dritte Passageexperiment wurden die Proben am Institut für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Instituts bei Prof. Dr. Martin Beer und Dr. Claudia Wylezich sequenziert und analysiert. Ihnen gebührt mein Dank.

Insbesondere möchte ich meiner Familie, meiner Mutter Renate Seefried und meinem Bruder Maximilian Schwinghammer danken, dass sie mich auch persönlich und moralisch während dieser Arbeit unterstützt haben. Meinem Vater Dr. med. dent. Gerd Schwinghammer möchte ich posthum meinen besonderen Dank aussprechen. Schon früh hatte er mein Interesse an den Naturwissenschaften geweckt und gefördert. Auch danke ich Nicholas Fearn, Maximilian Wietrzichowski sowie allen Freunden und Kommilitonen, welche mich in dieser besonderen Zeit begleitet haben.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Schwinghammer, Sebastian Heinz Martin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Cyclophiline als Angriffspunkt der antiviralen Intervention:

Mutationsinduktion und -analyse im humanen Coronavirus NL63

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06.12.2023

Ort, Datum

Sebastian Heinz Martin Schwinghammer

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Lebenslauf

Sebastian Heinz Martin Schwinghammer

Der Lebenslauf wird in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.