

---

Charakterisierung der antiviralen Aktivität von  
Rocaglamid-Derivaten und Validierung der  
humanen RNA-Helikase eIF4A als Target

---

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften

**Dr. rer. nat.**

dem Fachbereich Pharmazie,  
Institut für Pharmazeutische Chemie,  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Wiebke Obermann, M. Sc.**  
aus Frankenberg (Eder)

Marburg an der Lahn, 2020

Dem Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
(Hochschulkennziffer 1180)

vorgelegt am:

28.10.2020

Erstgutachter:

PROF. DR. ARNOLD GRÜNWELLER  
(Philipps-Universität Marburg)

Zweitgutachter:

PROF. DR. ROLAND K. HARTMANN  
(Philipps-Universität Marburg)

Tag der mündlichen Prüfung:

17.12.2020

## **Abstract**

The ongoing COVID-19 pandemic (coronavirus disease 2019) shows the urgency for the development of new antiviral drugs. In this context, an antiviral compound with broad-spectrum activity could help to combat newly emerging viral infections. For such an approach an appropriate target, as well as specific drugs that efficiently inhibit the target and thereby viral replication are required. Since RNA viruses are able to adapt to new environmental conditions within a very short time through mutations in their genome, they might develop resistance to the drugs. A suitable target could therefore be a host factor, such as the eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A), which is used by a large number of viruses for their protein synthesis in infected host cells. In cancer research, eIF4A is already a well characterized target, but its validation as an antiviral target is still rather incomplete. A focus of this thesis was therefore the validation of the RNA helicase eIF4A as an antiviral target.

During translation initiation, eIF4A unwinds secondary structures within the 5'-UTR of a mRNA to enable protein synthesis. Since many viral mRNAs have highly structured 5'-UTRs, viral protein synthesis often depends on this helicase activity. Inhibition of eIF4A would consequently inhibit the synthesis of viral proteins and thus stop the viral replication in infected cells.

Previous cell culture experiments have already shown that the natural eIF4A inhibitor Silvestrol has an antiviral activity at low nanomolar concentrations against several pathogenic RNA viruses. Therefore, it was another focus of this work to identify new specific eIF4A inhibitors and characterize their antiviral activity. For this purpose, the cytotoxicity of potential synthetic eIF4A inhibitors was determined in a human cancer cell line. Then a reporter assay (dual luciferase assay, DLA) was carried out to validate the eIF4A specificity of the compounds. In addition, the binding of the ligands to recombinantly purified human eIF4A was characterized using a thermal shift assay (TSA) established in this work. With this approach the synthetic rocaglate CR-31-B (-) could be identified as a potent eIF4A inhibitor with comparable antiviral activity to Silvestrol. In addition, the rocaglate HGW-3 showed an activity at medium nanomolar concentrations in the DLA.

In order to predict a possible eIF4A dependency of viral protein synthesis based on the mRNA composition, various RNA structure and sequence elements were analyzed in the DLA. In addition to viral 5'-UTRs, variations of viral hairpin structures or unstructured RNA motifs with specific sequence patterns were also investigated. Moreover, the natural rocaglate Silvestrol was compared to the synthetic rocaglate CR-31-B (-) in the DLA. It was found that for CR-31-B (-) a polypurine stretch within the investigated RNA substrate is required, while with Silvestrol also RNA substrates without polypurine sequences but with RNA hairpin structures can mediate eIF4A dependency. This suggests differences in the molecular interaction mechanism.

To understand the mode of action of rocaglates in more detail, the interaction sites of eIF4A with the substrate RNA and the eIF4A inhibitors Silvestrol and CR-31-B (-) were investigated using hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS). Here, the interaction site that was postulated for RocA with eIF4A and the polypurine RNA could be confirmed. Nevertheless, no differences were found between Silvestrol and CR-31-B (-). Using a microscale thermophoresis assay (MST), a dissociation constant for the binding of the two ligands to eIF4A could be determined.

Finally, based on a published crystal structure of eIF4A (PDB: 5ZC9), docking experiments could be performed and the binding mode and the binding affinity of potential eIF4A inhibitors could be predicted. A possible binding pocket consisting of arginine residues could be identified through which an additional interaction with Silvestrol might be formed. This would explain differences in the mode of action between Silvestrol and CR-31-B (-). Furthermore, the virtual mutation of eIF4A enabled the prediction of presumably rocaglate-sensitive and -resistant eIF4A variants, which can be found in various human pathogenic organisms.



## Zusammenfassung

Die COVID-19-Pandemie (*coronavirus disease 2019*) zeigt momentan sehr eindringlich, wie wichtig die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente ist. Insbesondere ein Virostatikum mit Breitbandwirkung könnte dazu beitragen, auch neu auftretenden, bisher unbekanntem Virusinfektionen entgegenzuwirken. Um einen solchen Ansatz zu verfolgen, bedarf es geeigneter Zielstrukturen, sogenannter Targets, sowie spezifischer Wirkstoffe, die das Target und somit die Virusvermehrung effizient hemmen. Da viele RNA-Viren in der Lage sind, sich durch Mutationen in ihrem Genom innerhalb kürzester Zeit an neue Umweltbedingungen anzupassen, muss bei der Adressierung virus-spezifischer Faktoren mit der Entwicklung von Resistenzen gerechnet werden. Ein geeignetes Zielmolekül könnte daher ein körpereigener Faktor, wie der eukaryontische Initiationsfaktor 4A (eIF4A) sein, der von vielen Viren für die Vermehrung in infizierten Wirtszellen genutzt wird. In der Krebsforschung stellt eIF4A bereits ein vielfach charakterisiertes und adressiertes Zielmolekül dar, hingegen ist die Validierung der Helikase als Target einer antiviralen Therapie noch unvollständig. Ein Fokus dieser Arbeit lag daher auf der Validierung der RNA-Helikase eIF4A als antivirales Zielmolekül.

eIF4A entwindet Sekundärstrukturen innerhalb der 5'-UTR einer mRNA, damit die Proteinbiosynthese initiiert werden kann. Da viele virale mRNAs über hochstrukturierte 5'-UTRs verfügen, sind Viren bei ihrer Proteinsynthese häufig auf diese Helikase-Aktivität angewiesen. Eine Inhibition von eIF4A würde demnach die Synthese von Virusproteinen hemmen und infolgedessen die Vermehrung von Viren in infizierten Zellen stoppen.

In vorherigen Zellkultur-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass der natürlich vorkommende eIF4A-Inhibitor Silvestrol eine antivirale Aktivität im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich gegenüber verschiedenen pathogenen RNA-Viren aufweist. Es war daher ein weiterer Fokus dieser Arbeit, neben Silvestrol weitere spezifische eIF4A-Inhibitoren zu identifizieren und deren antivirale Aktivität zu charakterisieren. Hierfür wurde zunächst die Zytotoxizität der potentiellen synthetischen eIF4A-Inhibitoren in einer humanen Krebszelllinie bestimmt und mit einem Reporter-Assay (Dual-Luciferase-Assay, DLA) fortgeföhren, um die eIF4A-Spezifität der Verbindungen zu validieren. Zusätzlich wurde die Bindung der Liganden an rekombinant aufgereinigtes humanes eIF4A mithilfe eines in dieser Arbeit etablierten Thermal-Shift-

Assays (TSA) charakterisiert. Dabei konnte das synthetische Rocaglamid-Derivat CR-31-B (-) als hochwirksamer eIF4A-Inhibitor mit einer vergleichbaren antiviralen Aktivität wie Silvestrol identifiziert werden. Außerdem zeigte das Rocaglamid-Derivat HGW-3 im DLA eine Wirksamkeit im mittleren nanomolaren Bereich.

Um zukünftig anhand der mRNA-Beschaffenheit Vorhersagen über eine mögliche eIF4A-Abhängigkeit der viralen Proteinsynthese machen zu können, wurden mithilfe des DLAs verschiedene RNA-Struktur- und -Sequenzelemente untersucht. Neben viralen 5'-UTRs wurden auch Variationen viraler Haarnadel-Strukturen oder unstrukturierte RNA-Motive mit bestimmten Sequenzmustern untersucht. Zudem wurde der Naturstoff Silvestrol mit dem synthetischen CR-31-B (-) im DLA verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass für CR-31-B (-) hinsichtlich der eingesetzten RNA-Substrate eine Purin-Abhängigkeit zu bestehen scheint, während mit Silvestrol auch RNA-Substrate mit stabilen Haarnadelstrukturen ohne Polypurin-Sequenzen eine eIF4A-Abhängigkeit vermitteln. Dies lässt auf Unterschiede im molekularen Interaktionsmechanismus schließen.

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Rocaglamid-Derivaten wurde daher mithilfe der Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS) die Interaktionsfläche von eIF4A mit der Substrat-RNA und Silvestrol bzw. CR-31-B (-) auf Proteinebene analysiert. Hier konnte die bereits für RocA postulierte Interaktionsfläche mit eIF4A und der Polypurin-RNA bestätigt, jedoch keine Unterschiede zwischen Silvestrol und CR-31-B (-) festgestellt werden. Mit einem Microscale-Thermophoresis-Assay (MST) konnte eine Dissoziationskonstante für die Bindungen beider Liganden bestimmt werden.

Zuletzt konnten, ausgehend von einer publizierten Kristallstruktur von eIF4A (PDB: 5ZC9), Docking-Experimente durchgeführt und so Vorhersagen über den Bindungsmodus und die Bindungsaffinität potentieller Inhibitoren an eIF4A gemacht werden. Dabei konnte eine mögliche Bindetasche bestehend aus Arginin-Resten identifiziert werden, über die eine zusätzliche Interaktion mit Silvestrol ausgebildet werden könnte. Diese könnte Unterschiede in der Wirkweise zwischen Silvestrol und CR-31-B (-) erklären. Weiterhin ermöglichte die virtuelle Mutation von eIF4A die Vorhersage von vermutlich Rocaglamid-sensitiven und -resistenten eIF4A-Varianten, die in verschiedenen humanpathogenen Organismen zu finden sind.

*„Wissenschaft: Es ist nicht ihr Ziel, der unendlichen Weisheit eine Tür zu öffnen, sondern eine Grenze zu setzen dem unendlichen Irrtum.“*

BERTOLT BRECHT (1898 – 1956)



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meines Promotionsstudiums an der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von PROF. DR. ARNOLD GRÜNWELLER am Institut für Pharmazeutische Chemie in der Arbeitsgruppe von PROF. DR. ROLAND K. HARTMANN.

In den vergangenen drei Jahren meines Promotionsstudiums haben mich zahlreiche Menschen begleitet und unterstützt. All diesen Menschen gilt mein Dank.

Besonders hervorheben möchte ich den Betreuer und Erstgutachter meiner Doktorarbeit PROF. DR. ARNOLD GRÜNWELLER, der mir die Möglichkeit gegeben hat, Teil eines solch spannenden Projektes zu werden. Dank seines Ideenreichtums und der dadurch entstandenen zahlreichen, auch internationalen Kooperationen konnten wir zunehmend an Erkenntnissen gewinnen, die das Projekt maßgeblich vorangetrieben haben. Die regelmäßigen Gespräche und das mir entgegengebrachte Vertrauen haben stets motiviert und zu einer tollen Zusammenarbeit beigetragen.

PROF. DR. ROLAND K. HARTMANN möchte ich für die anregenden Diskussionen in unserem Arbeitsgruppenseminar danken. Seine vieljährige Erfahrung und sein umfassendes Wissen halfen dabei, stets eine neue Sichtweise auf das Projekt zu erlangen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei PROF. DR. JOHN ZIEBUHR und PROF. DR. JENS KOCKSKÄMPER für die Begutachtung der Arbeit als Mitglieder der Prüfungskommission bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes möchte ich dem LOEWE-Zentrum DRUID meinen Dank aussprechen. Bei dieser Gelegenheit möchte ich zudem allen Kooperationspartnern, darunter PROF. DR. HANS-GUIDO WENDEL (MSKCC, New York), DR. CHARLIE YEO (SBC, Borneo), DR. GASPAR TARONCHER-OLDENBURG (Gaspar Taroncher-Oldenburg Consulting, Philadelphia), CrystalsFirst (Marburg), PROF. DR. MARTIN SCHLITZER und seiner Mitarbeiterin THI LAN PHUONG PHAM (Philipps-Universität Marburg), DR. WIELAND STEINCHEN (Gerätezentrum für Massenspektrometrie und Elementaranalytik, Philipps-Universität Marburg), PROF. DR. TORSTEN STEINMETZER (Philipps-Universität Marburg), MELISSA DILLENBERGER (Justus-Liebig-Universität Gießen) und DR. JULIA HAHN

(Justus-Liebig-Universität Gießen), Danke sagen. Besonders hervorheben möchte ich die fruchtbare Kooperation mit PROF. DR. JOHN ZIEBUHR und seiner Mitarbeiterin DR. CHRISTIN MÜLLER (Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen).

Meinem Vorgänger DR. FALK WILHELM SCHULTE, der mich bereits während meiner Masterarbeit betreut hat, sowie meiner fleißigen und gewissenhaften ehemaligen Masterstudentin NINA SCHMIDT gebührt ebenfalls mein Dank. Dankbar anerkennen will ich auch das aufmerksame und detaillierte Korrekturlesen meiner Arbeit, für das sich NINA SCHMIDT und REBECCA FEYH freundlicherweise bereit erklärt haben.

Hier möchte ich nicht versäumen, allen Kolleginnen und Kollegen sowie ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre zu danken. Eure wertvollen Anregungen, die stete Hilfsbereitschaft, die aufbauenden Gespräche und die daraus entstandenen Freundschaften und Unternehmungen abseits des Laboralltags haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, meiner Schwester sowie meinem Freund. Euer stetiger Rückhalt, eure Geduld, euer Verständnis und eure unaufhörliche Unterstützung in jeglicher Hinsicht haben es mir erst ermöglicht, diesen Weg einzuschlagen.

Vielen Dank!

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Translationsinitiation und die Rolle der RNA-Helikase eIF4A	1
1.2	Humanes eIF4A als antivirales Target	6
1.3	Niedermolekulare eIF4A-Inhibitoren	12
1.4	Zielsetzung	16
<b>2</b>	<b>Materialien</b>	<b>19</b>
2.1	Chemikalien	19
2.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.3	Puffer, Kulturmedien und Stammlösungen	20
2.4	Kits, Größenstandards und Farbstoffe	22
2.5	Enzyme und Reagenzien	23
2.6	Plasmide	24
2.6.1	pFR_HCV_xb	24
2.6.2	pET-28a(+)_eIF4A1	25
2.7	Oligonukleotide	27
2.7.1	DNA-Oligonukleotide	27
2.7.2	RNA-Oligonukleotide	33
2.8	Bakterienstämme	34
2.9	Geräte	34
2.10	Software	36
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>37</b>
3.1	Sterilisation von Materialien und Lösungen	37
3.2	Nukleinsäure-Methoden	37
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	38
3.2.3	Gibson Assembly®	39

3.2.4	Ortsspezifische Mutagenese .....	40
3.2.5	Phosphorylierung .....	41
3.2.6	<i>DpnI</i> -Verdau .....	42
3.2.7	Ligation .....	42
3.2.8	Transformation.....	43
3.2.9	Kolonie-PCR .....	43
3.2.10	Plasmidpräparation .....	44
3.2.11	Sequenzierung.....	45
3.2.12	Kryokonservierung von Bakterienzellen.....	45
3.3	Protein-Methoden.....	46
3.3.1	Rekombinante Überexpression und Zellernte.....	46
3.3.2	Zellaufschluss.....	48
3.3.3	Nickel-Affinitätschromatographie.....	48
3.3.4	Dialyse .....	49
3.3.5	Entfernung des <i>His<sub>6</sub>-Tags</i> .....	50
3.3.6	Heparin-Affinitätschromatographie.....	51
3.3.7	Protein-Massenspektrometrie.....	52
3.3.8	HPLC .....	52
3.3.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	53
3.3.10	Thermal-Shift-Assay (TSA) .....	54
3.3.11	Microscale-Thermophoresis-Assay (MST).....	56
3.3.12	HDX-Massenspektrometrie (HDX-MS) .....	60
3.3.13	Molekulares Docking .....	61
3.4	Zellkultur-Methoden.....	62
3.4.1	Kultivierung von HepG2-Zellen .....	63
3.4.2	Kryokonservierung und Auftauen der HepG2-Zellen.....	63
3.4.3	Transfektion.....	64
3.4.4	Behandlung von HepG2-Zellen .....	65
3.4.5	WST-1-Assay .....	65



3.4.6	Dual-Luciferase-Assay.....	67
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>71</b>
4.1	Untersuchung von RNA-Sequenz- und -Strukturelementen zur Vorhersage der eIF4A-Abhängigkeit.....	71
4.2	Vergleich der Wirkungsweise des Naturstoffs Silvestrol mit dem synthetischen Rocaglamid-Derivat CR-31-B (-) .....	80
4.3	eIF4A als antivirale Zielstruktur .....	91
4.4	Biochemische Charakterisierung der Interaktion von Rocaglamid-Derivaten mit eIF4A.....	95
4.4.1	Untersuchung der Proteinstabilität mithilfe des Thermal-Shift-Assays .....	95
4.4.2	Bestimmung von Bindungsaffinitäten mithilfe des MST-Assays.....	103
4.4.3	Identifikation der Interaktionsfläche von Rocaglamid-Derivaten an eIF4A mittels HDX-MS.....	105
4.5	Validierung der eIF4A-Spezifität weiterer Rocaglamid-Derivate .....	109
4.6	Screening neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren .....	117
4.7	Molekulares Docking zur Abschätzung der Bindungseffizienz neuer eIF4A-Inhibitoren sowie zur Vorhersage von Rocaglamid-sensitiven oder -resistenten eIF4A-Varianten .....	130
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>139</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>155</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>159</b>
	<b>Anhang A: Dual-Luciferase-Assay .....</b>	<b>161</b>
	Plasmidsequenz von pFR_HCV_xb_β-Globin.....	161
	Translationseffizienzen.....	162
	RNA-Sekundärstrukturvorhersagen.....	164

<b>Anhang B: Proteinaufreinigung von eIF4A1(19-406)</b> .....	<b>173</b>
Plasmidsequenz von pET-28a(+)_eIF4A1(19-406) .....	173
AS-Sequenz des Volllängen eIF4A1 inkl. His <sub>6</sub> -Tag .....	174
AS-Sequenz des trunkierten eIF4A1(19-406) inkl. His <sub>6</sub> -Tag .....	175
AS-Sequenz des trunkierten eIF4A1(19-406) nach His <sub>6</sub> -Tag-Abspaltung .....	176
TGX-Gelbilder und Chromatogramme.....	177
<b>Anhang C: Thermal-Shift-Assay</b> .....	<b>183</b>
<b>Anhang D: HDX-MS</b> .....	<b>185</b>
<b>Anhang E: Screening neuer eIF4A-Inhibitoren</b> .....	<b>189</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>213</b>
<b>Wissenschaftliche Beiträge</b> .....	<b>217</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Translationsinitiation und die Rolle der RNA-Helikase eIF4A

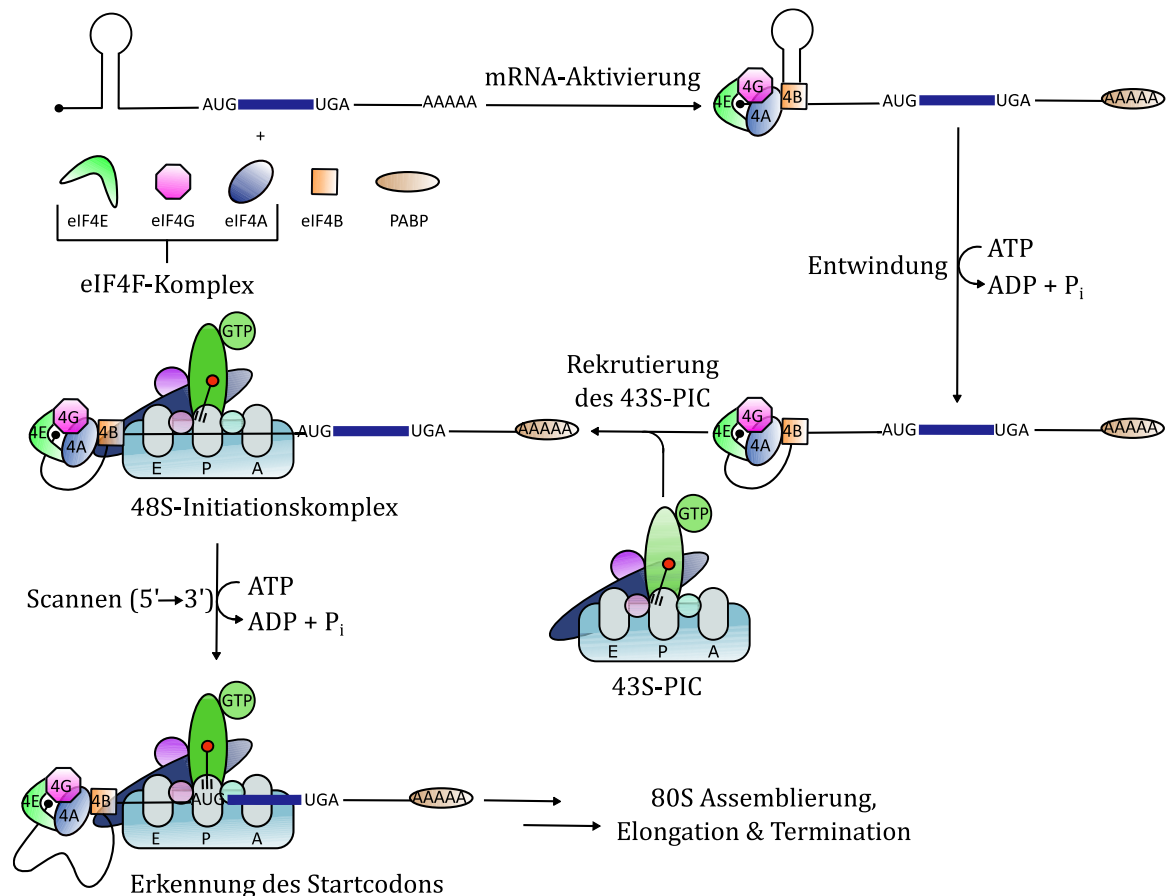
Einen für alle Lebewesen essentiellen Prozess stellt die Proteinbiosynthese dar, bei der die in der DNA enthaltenen genetischen Informationen in eine Aminosäuresequenz eines definierten Proteins übersetzt werden (*Berg et al., 2013*). Wird dieser Prozess inhibiert, hat dies Einfluss auf das Proteom, wodurch die Homöostase der Zelle gestört wird und Zellproliferation, Zellwachstum und Zellentwicklung zum Erliegen kommen können (*Hershey et al., 2012*). Dies wiederum resultiert in Krankheiten wie Krebs, in Störungen des Metabolismus und verursacht Alterungsprozesse in unseren Zellen (*Jin et al., 2013*). Gleichzeitig kann eine gezielte Inhibition aber auch als therapeutischer Ansatz zur Behandlung von Virusinfektionen oder bakteriellen Infektionen genutzt werden (*McCormick & Khapersky, 2017*). Aus diesem Grund ist das Verständnis der Proteinbiosynthese sowie die Identifikation geeigneter Zielstrukturen (Targets) und spezifischer Inhibitoren in der medizinischen und pharmazeutischen Forschung von großer Bedeutung und gewinnt zunehmend an Interesse (*Novac et al., 2004*).

Im Rahmen der eukaryontischen Genexpression erfolgt zunächst die Transkription, ein hochkomplexer Vorgang zur Erstellung von RNA-Abschriften von der im Zellkern befindlichen DNA. Zu diesen RNAs gehören unter anderem die für Proteine codierenden prä-mRNAs (*precursor messenger ribonucleic acid*), die im Zellkern weiter zu mRNAs prozessiert werden. Dazu werden die nicht-codierenden Introns aus der prä-mRNA entfernt, eine 5'-7-Methylguanosin-Kappe (5'-m<sup>7</sup>G-Cap) an das 5'-Ende angefügt und das 3'-Ende mit einer Poly(A)-Sequenz modifiziert. Die so gereiften mRNAs verfügen über einen 5'- sowie 3'-untranslatierten Bereich (5'-UTR/3'-UTR), der die für das Protein codierende Region (ORF, *open reading frame*) umschließt. Die gereifte mRNA wird anschließend über die Kernporen ins Zytosol transportiert, wo die Translation mithilfe der Ribosomen stattfindet (*Campbell & Reece, 2006*). Während der eukaryontischen Translation wird die Basensequenz der mRNA am Ribosom in die entsprechende Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt. Dieser Vorgang kann in drei Schritte unterteilt werden: Die Initiation, die Elongation und die Termination. Abhängig von der zu translatierenden mRNA kann ferner zwischen Cap-abhängiger und Cap-unabhängiger Initiation unterschieden werden (*Kapp & Lorsch, 2004*), wobei der Fokus in dieser Arbeit auf die Cap-abhängige Initiation gelegt wird, da wahrscheinlich nur ein geringer Anteil an

zellulären mRNAs *Cap*-unabhängig bzw. IRES-vermittelt (*Internal Ribosomal Entry Site*) translatiert wird.

Während der *Cap*-abhängigen Translationsinitiation wird die mRNA zunächst zum eukaryontischen Initiationsfaktor 4F, kurz eIF4F, rekrutiert. Dieser Komplex setzt sich aus dem *Cap*-bindenden Protein eIF4E, der DEAD-Box RNA-Helikase eIF4A und dem Gerüstprotein (*scaffold protein*) eIF4G zusammen. Dieses kann neben der Bindung an eIF4E und eIF4A auch an das Poly(A)-bindende Protein (PABP) der mRNA sowie eIF3 binden (*Pestova et al., 2001*). Abgesehen von der Interaktion von eIF4G mit dem Poly(A)-bindenden Protein wird die Rekrutierung der mRNA außerdem durch die Bindung von eIF4E an die 5'-m<sup>7</sup>G-*Cap* der mRNA bewerkstelligt, was eine Zyklisierung der mRNA zur Folge hat (*Jackson et al., 2010*). Im Anschluss erfolgt die Bindung der 40S-ribosomalen Untereinheit an die mRNA. Da die mRNA-Bindestelle der 40S-ribosomalen Untereinheit nur einzelsträngige RNA binden kann (*Lawson et al., 1986*), müssen strukturierte Bereiche innerhalb der 5'-UTR sowie mRNA-bindende Proteine zunächst entfernt werden. An dieser Stelle zeigt sich die Relevanz von eIF4A: Die Helikase entwindet Sekundärstrukturen in der 5'-UTR und entfernt adhärente Proteine, um eine unstrukturierte Region und somit eine stabile Bindung der 40S-ribosomalen Untereinheit zu gewährleisten (*Rogers et al., 2002; Villa & Fraser, 2014*). Diese Helikase-Aktivität erfolgt unter ATP-Hydrolyse und kann sowohl durch die Assoziation mit eIF4G und eIF4E im eIF4F-Komplex als auch durch die Initiationsfaktoren eIF4B und zu einem geringeren Anteil auch durch eIF4H stimuliert werden (*Özeş et al., 2011*). Die Rekrutierung der 40S-ribosomalen Untereinheit zur mRNA erfolgt nach Ausbildung des 43S-Präinitiationskomplexes (43S-PIC). Dieser setzt sich aus der 40S-ribosomalen Untereinheit, dem eIF2-Ternären-Komplex (eIF2-TC), bestehend aus der mit Methionin beladenen Initiator-tRNA und einem Guanosintriphosphat (GTP), sowie den Translationsinitiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF3 und eIF5 zusammen (*Villa & Fraser, 2014*). Der 43S-PIC interagiert über eIF3 mit eIF4G und bildet dabei den 48S-Initiationskomplex aus (*Eliseev et al., 2018*). Dieser kann dann entlang der mRNA in 5' → 3'-Richtung scannen, bis das Startcodon durch Basenpaarung mit dem Anticodon der Initiator-tRNA erreicht wird (vgl. Abbildung 1) (*Brina et al., 2011; Cigan et al., 1988*). An dieser Stelle wird das GTP des eIF2-ternären Komplexes hydrolysiert, was die Dissoziation von eIF2-GDP vom 48S-Komplex bewirkt. Durch Bindung von eIF5B an den 48S-Komplex wird die Anlagerung der 60S-ribosomalen Untereinheit katalysiert und die Initiationsfaktoren eIF1, eIF3, eIF4F und eIF5 können

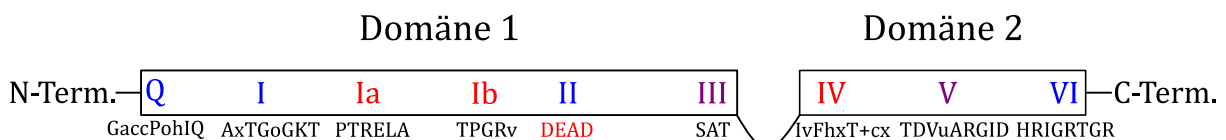
freigesetzt werden, sodass sich der elongationskompetente 80S-Initiationskomplex ausbilden kann (Eliseev *et al.*, 2018; Jackson *et al.*, 2010). Die zum nächsten Codon komplementäre Aminoacyl-Transfer-RNA (tRNA) kann dann an die A-Stelle des 80S-Ribosoms binden und so die Elongation der Polypeptidkette beginnen. Sobald ein Stopcodon erreicht wird, wird die Termination der Translation initiiert und die Polypeptidkette sowie das 80S-Ribosom werden freigesetzt (Kisselev *et al.*, 2003).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der eukaryontischen Translationsinitiation.** Bindung des eIF4F-Komplexes an die 5'-Cap der mRNA führt zur Aktivierung der mRNA. Durch Entwindung der 5'-proximalen Region der mRNA mithilfe der Helikase-Aktivität von eIF4A, die durch den eIF4F-Komplex und eIF4B stimuliert wird, kann der 43S-Präinitiationskomplex zur mRNA rekrutiert werden. Es folgt ein Scannvorgang des 43S-Initiationskomplexes entlang der mRNA in 5' → 3'-Richtung, bis das Startcodon erkannt wird. Dann kann die Assemblierung des 80S Ribosoms erfolgen und mit der Elongation und der Termination fortgefahren werden. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Jackson *et al.*, 2010) erstellt. Nicht dargestellt ist die Zyklisierung der mRNA, die durch Bindung von eIF4E an die 5'-Cap und Bindung von eIF4G an das Poly(A)-bindende Protein (PABP) zustande kommt.

Die Rolle von eIF4A während der Translationsinitiation kann also in der Entwindung von strukturierten Bereichen innerhalb der 5'-UTR zur Rekrutierung des 43S-PIC zusammengefasst werden. Hier ist jedoch anzumerken, dass eIF4A hauptsächlich frei vorliegt, da eIF4A deutlich höhere Syntheseraten als andere Initiationsfaktoren aufweist

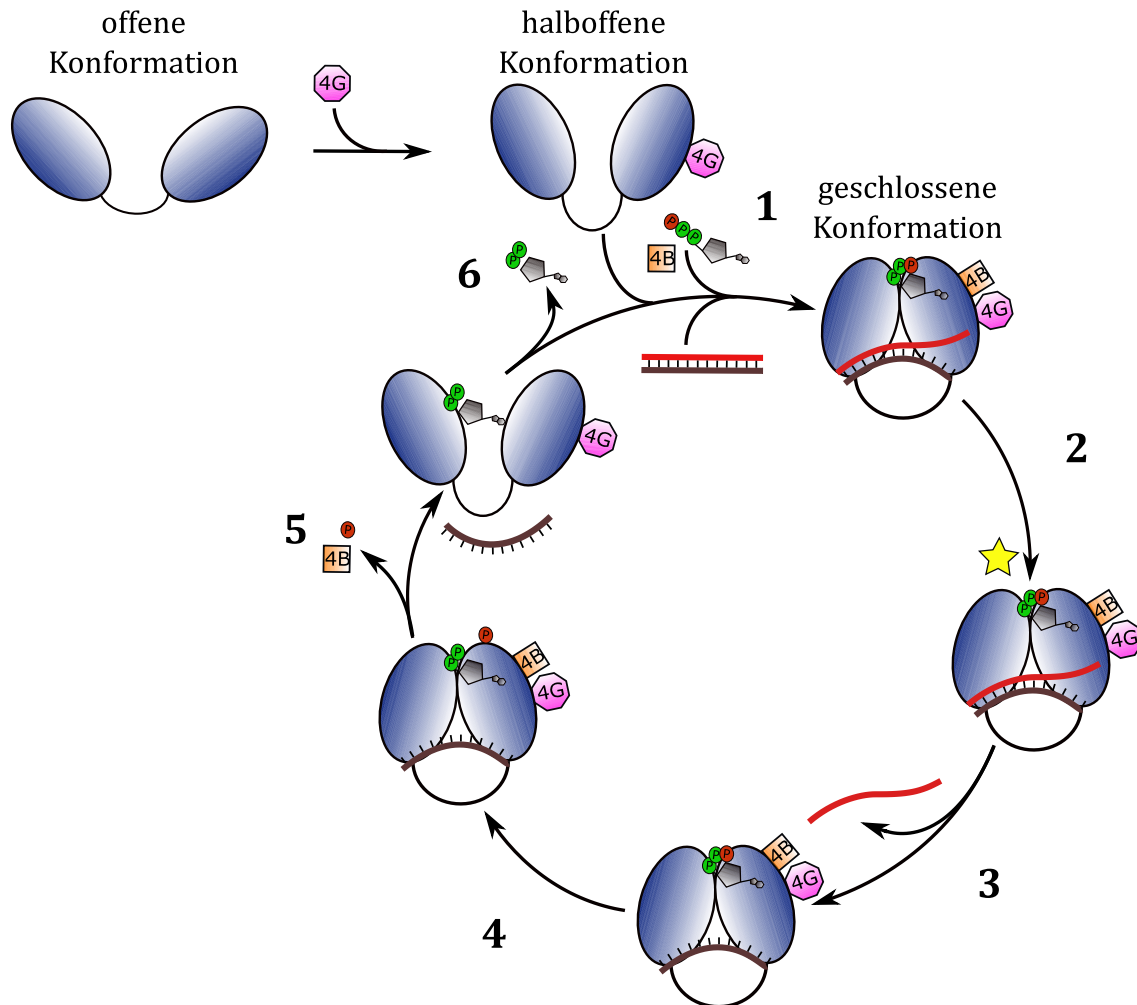
(~2,4 Kopien pro Ribosom in HeLa-Zellen) (Kulak *et al.*, 2014). Der Anteil an eIF4A, der im eIF4A Komplex komplexiert ist, beläuft sich demnach lediglich auf etwa 5 % der Gesamtpopulation an eIF4A. Die von eIF4A ausgeübte Helikase-Aktivität wird durch eine Konformationsänderung bewerkstelligt, die charakteristisch für Helikasen der DEAD-Box-Familie ist (Harms *et al.*, 2014). DEAD-Box-Helikasen, deren Namensgebung auf die konservierte Aminosäuresequenz D-E-A-D (Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat) zurückzuführen ist, besitzen zwei RecA-ähnliche Domänen, die über einen flexiblen Linkerbereich verbunden sind. Innerhalb dieser RecA-ähnlichen Domänen befindet sich der Kern der Helikase-Aktivität, der sich durch neun konservierte Motive, die in die Bindung von RNA oder Nukleotiden, aber auch in die ATP-Hydrolyse sowie die Entwindung von RNA-Duplexbereichen involviert sind, auszeichnet (vgl. Abbildung 2) (Andreou & Klostermeier, 2013).



**Abbildung 2: Aufbau der konservierten Motive von DEAD-Box-Proteinen.** Die DEAD-Box-Helikase eIF4A wird aus zwei RecA-ähnlichen Domänen, die über einen flexiblen Linker verbunden sind, aufgebaut. Die namensgebende Aminosäuresequenz D-E-A-D ist in Motiv II zu finden. Motive, die in die Bindung und Hydrolyse von ATP involviert sind, sind in Blau dargestellt, RNA-bindende Bereiche sind rot markiert und Motive, die für die ATP-Hydrolyse und die Entwindung benötigt werden, sind violett eingefärbt. Legende der Aminosäuresequenz (AS-Sequenz): a: Aromatische AS (F, W, Y); c: saure oder basische AS (D, E, H, K, R); h: hydrophobe AS (A, F, G, I, L, M, P, V, W); o: AS mit Hydroxygruppe (S, T, Y); u: Purinbasen (A, G); v: verzweigt-kettige AS (I, L, V); x: beliebige AS; +: positiv geladene AS (H, K, R). Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Cordin *et al.*, 2006) und (Andreou & Klostermeier, 2013) erstellt.

In Abwesenheit von RNA oder ATP sind die beiden RecA-ähnlichen Domänen durch einen Spalt voneinander getrennt. Dies wird als offene Konformation bezeichnet. In Gegenwart von eIF4G wird die halboffene Konformation bevorzugt, bei der der Abstand zwischen den beiden Domänen verringert wird. Durch kooperative Bindung von RNA und ATP nähern sich die durch die Linkerregion verbundenen Domänen einander an, sodass der Spalt zwischen den Domänen geschlossen wird. In dieser geschlossenen Konformation bilden die konservierten Motive der beiden Domänen eine Interaktionsfläche für ATP und RNA aus, sodass durch den Wechsel zwischen halboffener und geschlossener Konformation die ATPase-Aktivität und die Helikase-Aktivität zustande kommen können. Das Gleichgewicht zwischen den drei Konformationen kann durch die Anwesenheit von eIF4B zusätzlich in Richtung der geschlossenen Konformation verschoben werden (Andreou &

Klostermeier, 2014). Für den Konformationszyklus von eIF4A hat die Arbeitsgruppe um PROF. DR. DAGMAR KLOSTERMEIER einen Mechanismus postuliert, der im folgenden Abschnitt beschrieben wird (vgl. Abbildung 3).



**Abbildung 3: Konformationszyklus von eIF4A.** Die RNA-Helikase eIF4A kann drei Konformationen einnehmen. In Abwesenheit von Liganden liegt eIF4A in der offenen Konformation vor. In Gegenwart von eIF4G wird die halboffene Konformation bevorzugt, von der aus eIF4A durch Bindung von RNA und ATP in Gegenwart von eIF4B in die geschlossene Konformation übergehen kann (vgl. Schritt 1). In der geschlossenen Konformation findet die ATP-abhängige Entwindung des doppelsträngigen RNA-Substrats statt (vgl. Schritt 2). Nach Freisetzung des entwundenen RNA-Einzelstrangs (3) und ATP-Hydrolyse (4) kann auch der zweite Einzelstrang (5) sowie das ADP vom Komplex dissoziieren, sodass eIF4A wieder in die halboffene Konformation übergehen kann (6). Der Konformationszyklus kann dann erneut beginnen. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Harms *et al.*, 2014) erstellt.

In der halboffenen Konformation mit eIF4G wechselt eIF4A durch kooperative Bindung von RNA und ATP in Gegenwart von eIF4B in die geschlossene Konformation (vgl. Abbildung 3, Schritt 1). In diesem Zustand kann die Entwindung des doppelsträngigen RNA-Substrats unter ATP-Hydrolyse stattfinden (vgl. Abbildung 3, Schritte 2 - 4), sodass der entwundene Einzelstrang vom Komplex dissoziieren kann. Die Freisetzung des

Phosphats des hydrolysierten ATPs führt zu einer Öffnung des Spalts zwischen den beiden Domänen, sodass auch das zurückgebliebene einzelsträngige RNA-Substrat entlassen werden kann. Nach Dissoziation des resultierenden ADPs kann ein neuer Zyklus durch Bindung von RNA und ATP beginnen (*Harms et al., 2014*).

In Säugetieren existieren drei Isoformen der Helikase: eIF4AI (DDX2A), eIF4AII (DDX2B) und eIF4AIII (DDX48), wobei erstere die am besten untersuchte ist. Während die ersten beiden Isoformen im Menschen eine Sequenzidentität von 90 – 95 % aufweisen, zeigt eIF4AIII nur eine Sequenzidentität von ~60 % gegenüber den anderen Isoformen. Auch funktionell unterscheidet sich eIF4AIII von eIF4AI und eIF4AII und ist in den Zusammenbau des *Exon Junction Complex* (EJC) involviert, der das Spleißen der prä-mRNA koordiniert (*Andreou & Klostermeier, 2013*). Für Isoform 1 und 2 konnten *in vitro* kaum Unterschiede hinsichtlich ihrer biochemischen Aktivität festgestellt werden, dennoch unterscheiden sich die beiden Isoformen in Funktion und Genexpression *in vivo* deutlich voneinander. Isoform 1 wird hauptsächlich während des aktiven Zellwachstums in nahezu allen Geweben hergestellt, Isoform 2 dagegen größtenteils in Organen mit geringen Proliferationsraten (*Williams-Hill et al., 1997*). Zudem steigen bei Suppression von eIF4AI die eIF4AII-Level an, jedoch kann der Verlust von eIF4AI nicht durch eIF4AII kompensiert werden, da eIF4AI im Gegensatz zu eIF4AII essentiell für das Überleben der Zelle ist (*Galicia-Vazquez et al., 2012; Galicia-Vázquez et al., 2015*).

### **1.2 Humanes eIF4A als antivirales Target**

Nachdem im vorangegangenen Kapitel auf die mechanistischen Funktionen von eIF4A während der Translationsinitiation eingegangen wurde, soll dieses Kapitel den Zusammenhang zwischen eIF4A und Virusinfektionen herstellen. Aus diesem Grund wird zunächst die Vermehrungsstrategie von Viren betrachtet, um anhand dessen demonstrieren zu können, warum eIF4A sich als potentielles Zielmolekül in der Virustherapie eignet.

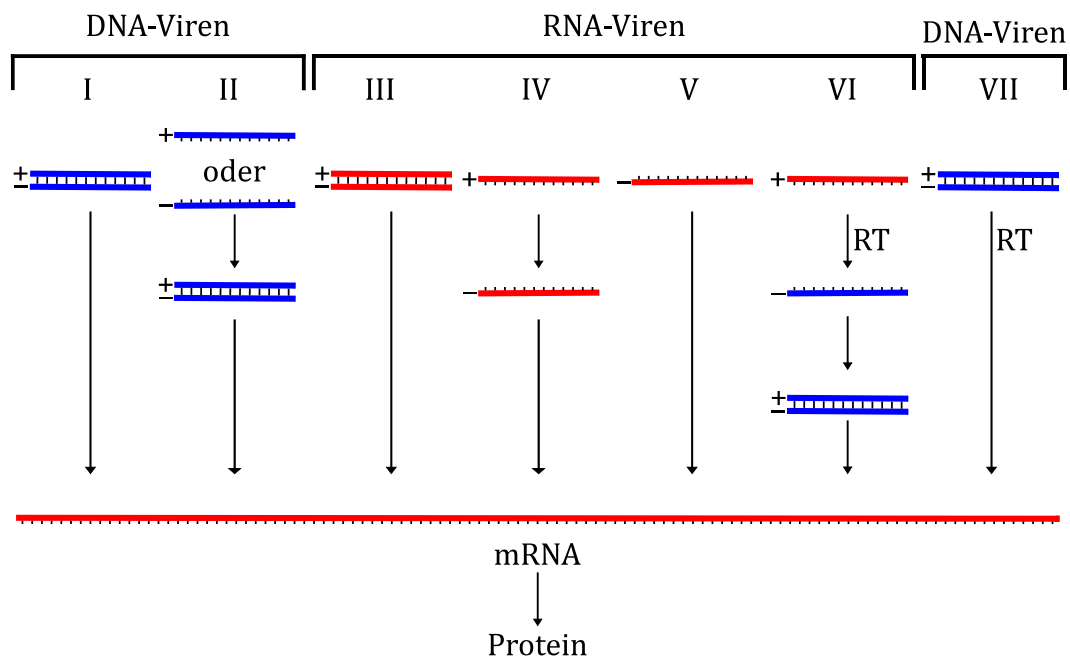
Viren sind parasitäre Partikel in Form von replikationsfähigen Nukleoproteinkomplexen, die anhand des Virusgenoms (RNA- oder DNA-Viren) klassifiziert werden können (*Groß, 2009*). Da Viren keinen eigenen Stoffwechsel haben, sind sie bei der Vermehrung auf die Proteinsynthese-Maschinerie des Wirts angewiesen. Die Vermehrung, auch viraler Replikationszyklus genannt, erfolgt demnach über die Zusammensetzung von viralen Proteinen, Nukleinsäuren und gegebenenfalls einer Lipidhülle, wobei die einzelnen



Komponenten größtenteils in der Wirtszelle hergestellt werden. Der virale Replikationszyklus kann grundsätzlich in Adsorption, Penetration, *Uncoating*, Replikation, Zusammenbau und Freisetzung unterteilt werden. Die Adsorption beschreibt die Bindung des Virus an die Wirtszelle, was meist über spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellen geschieht. Je nach Virustyp findet dann durch direkten Transmembrantransport, Endozytose oder Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle die Penetration statt. Beim *Uncoating* werden die viralen Nukleinsäuren in Form von DNA oder RNA in die Wirtszelle freigesetzt und schließlich während der Replikation vermehrt. Die Synthese der viralen Proteine wird über die wirtseigene Translationsmaschinerie bewerkstelligt und mit dem Zusammenbau (*Assembly*) der Viruskomponenten finalisiert. Virusabhängig können die fertigen Virionen durch Wirtszelllyse oder Exozytose im Falle von unbehüllten Viren oder durch Knospung (*Budding*) im Falle von Viren mit Hülle freigesetzt werden (Groß, 2009).

Für die Vermehrung entscheidend ist der Ablauf der Replikation des Virusgenoms, der abhängig von der Art der Nukleinsäure ist (vgl. Abbildung 4, Baltimore-Schema).

### Virale Replikationsstrategien (Baltimore-Schema)



**Abbildung 4: Virale Replikationsstrategien nach dem Baltimore-Schema.** Legende: RT: Reverse Transkriptase, Blau: DNA, Rot: RNA. Während das Genom von doppelsträngigen Nukleinsäuren oder einzelsträngiger Minusstrang-RNA als Matrize zur Bildung von mRNA verwendet werden kann, müssen einzelsträngige Nukleinsäuren anderer Polarität zunächst umgeschrieben werden. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Schartl et al., 2009) und (Pellett et al., 2014) erstellt.

Es kann zwischen DNA und RNA, einzel- oder doppelsträngig, Plus- oder Minusstrang und segmentiertem oder nicht-segmentiertem Genom unterschieden werden. Während das Genom von Plusstrang-RNA-Viren beispielsweise mit der mRNA übereinstimmt, dient das Genom von Minusstrang-RNA-Viren als Matrize zur Bildung von mRNA und ist somit komplementär zur mRNA (*Schartl et al., 2009*). Retroviren hingegen nutzen die virale Reverse Transkriptase (RT), um ihr Genom in DNA umzuschreiben. Die Transkription der Provirus-DNA erfolgt mithilfe der zellulären RNA-Polymerase II (*Pellett et al., 2014*).

Sobald die virale mRNA vorliegt, wird die Proteinsynthese eingeleitet. Da die Translation viraler Proteine in direkter Konkurrenz zur Translation zellulärer Proteine steht, haben Viren verschiedene Mechanismen entwickelt, damit die Synthese der viralen Proteine bevorzugt wird (*Montero et al., 2015; Smith & Gray, 2010*). Unter anderem werden Translationsinitiationsfaktoren, darunter auch der eIF4F-Komplex, die oftmals in die Translation viraler Proteine involviert sind, als Folge der Infektion vom Virus reguliert (*Walsh, 2010*). Somit stellt auch die RNA-Helikase eIF4A als Teil des eIF4F-Komplexes ein potentiell Target für die antivirale Therapie dar (*Montero et al., 2019*). Die bereits erörterte Funktion von eIF4A, strukturierte mRNA-Bereiche zu entwinden, ist nicht nur bei der *Cap*-abhängigen Translation im eIF4F-Komplex von Bedeutung, sondern kann auch bei der *Cap*-unabhängigen, IRES-vermittelten Translation viraler mRNAs eine Rolle spielen. Da viele virale mRNAs über hochstrukturierte 5'-UTRs verfügen, liegt außerdem die Vermutung nahe, dass während der Translation die Entwindungsaktivität von eIF4A benötigt wird (*Madhugiri et al., 2016; Schlereth et al., 2016*). Die Adressierung von eIF4A als antivirales Target stellt demnach eine vielversprechende Strategie zur Kontrolle von Virusinfektionen dar (*Montero et al., 2015*). Was die Auswirkungen einer solchen eIF4A-Inhibition angeht, konnte in Studien gezeigt werden, dass lediglich etwa 300 zelluläre mRNAs, darunter zahlreiche Protoonkogene, auf eIF4A angewiesen sind. Dies lässt die Strategie der Inhibition von eIF4A aussichtsvoll erscheinen, da dementsprechend wenige Nebenwirkungen zu erwarten sind (*Chan et al., 2019; Rubio et al., 2014*). Zudem weist die Adressierung von wirtseigenen Faktoren einen großen Vorteil gegenüber der direkten Adressierung des Virus auf, da nur in geringerem Maße mit der Entwicklung von Resistenzen zu rechnen ist.

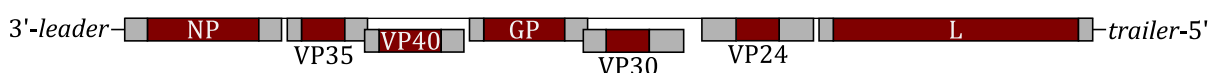
Aktuell verfügbare Virostatika adressieren Enzyme der viralen Replikation, wie z. B. die virale Polymerase oder die virale Reverse Transkriptase (z. B. Nukleosidanaloga wie Aciclovir gegen Herpesviren oder Lamivudin gegen HIV), virale Proteasen (z. B.

Proteinanaloge wie Saquinavir oder Indinavir gegen HIV) oder inhibieren den Viruseintritt (z. B. Amantadin oder Rimantadin gegen Influenza-Viren) bzw. die Virusfreisetzung (z. B. Neuraminidase-Inhibitoren wie Zanamivir oder Oseltamivir gegen Influenza-Viren). Die Schwierigkeit in der Entwicklung von Virostatika liegt hierbei im fehlenden Stoffwechsel der Viren. So können nur wenige virusspezifische Stoffwechselschritte attackiert werden, um die Vermehrung des Virus zu hemmen und gleichzeitig den Stoffwechsel infizierter und gesunder Zellen des Wirts nicht stark zu beeinträchtigen (Lüllmann *et al.*, 2010). Ein Problem, das hierbei jedoch häufig auftritt, ist die Entwicklung von Resistenzen. Da Viren eine hohe Replikationsrate haben (Berstgröße (Anzahl der Virionen pro infizierter Zelle) von HIV: 1.000 – 3.000  $\Rightarrow$   $\sim$ 10 Milliarden Virionen pro Tag (Milo & Phillips, 2016)), können sie sich durch Mutation in ihrem Genom schnell an selektive Umweltbedingungen anpassen und den Wirkmechanismus des Virostatikums umgehen. Aus diesem Grund kann die Adressierung eines wirtsspezifischen Enzyms, wie beispielsweise der Helikase eIF4A, sich als vorteilhaft erweisen, da das Virus dem Wirkstoff nicht direkt ausgesetzt ist und sich nur durch Änderung seiner Translationsstrategie der Wirkung entziehen kann. Außerdem könnten durch gezielte Inhibition von eIF4A gleich mehrere Virustypen angesprochen werden, darunter auch bislang unbekannt oder neuauftretende Viren, wie das erstmalig im November 2019 in Wuhan ausgebrochene *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), was weltweit dramatische gesundheitliche und wirtschaftliche Auswirkungen hat und bisher zahlreiche Todesopfer (Stand September 2020: knapp eine Million bestätigte Todesfälle) fordert (WHO, 2020b). Die potentielle Breitbandwirkung eines wirtsspezifischen Inhibitors ist ein wichtiges Argument für die Entwicklung eines solchen Wirkstoffes, da sogenannte *First-Line*-Medikamente zur Bekämpfung neuartiger Viren dringend benötigt werden, um zukünftige Pandemien wirkungsvoll verhindern zu können. Für den antiviralen Wirkstoff Remdesivir, der zu den Nukleosidanaloga zählt und die virale RNA-Polymerase inhibiert, konnte im Zuge der Behandlung von COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) bereits ein breites Wirtsspektrum festgestellt werden. Ursprünglich wurde der Wirkstoff zur Behandlung der Ebola-Viruskrankheit entwickelt, zwischenzeitlich konnte jedoch auch eine Wirksamkeit gegen Coronaviren wie SARS-CoV-2 und MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) und das Respiratorisches-Synzytial-Virus (RSV) nachgewiesen werden (Agostini *et al.*, 2018; Lo *et al.*, 2019; Warren *et al.*, 2016). Neben Remdesivir stellt auch Ribavirin eines der wenigen Virostatika mit einer

Breitbandwirkung dar (Lüllmann *et al.*, 2010). Es handelt sich ebenfalls um ein Nukleosidanalogen, das gegen Respiratorische Synzytial-Viren, Hepatitis-C-Viren (HCV) oder Arenaviren, darunter z. B. das Lassa-Virus (LASV), eingesetzt werden kann (Lüllmann *et al.*, 2010). Dessen ungeachtet adressieren alle genannten Virostatika mit Breitbandwirkung virusspezifische Faktoren. Der Bedarf an einem Breitband-Virostatikum, das ein wirtsspezifisches Enzym anspricht, ist also weiterhin groß, was die Relevanz der Charakterisierung von eIF4A als potentiell antivirales Target unterstreicht.

In jüngster Vergangenheit verdeutlichten sowohl die Ebolafieber-Epidemie, die 2014 in Westafrika ausbrach (WHO, 2020a) als auch der Ausbruch der COVID-19-Krankheit, die im März 2020 zu einer weltweiten Pandemie erklärt wurde (WHO, 2020b), welche Bedrohungen durch Ausbrüche von Infektionskrankheiten ausgehen können. Aufgrund dieser aktuellen Präsenz werden daher in dieser Arbeit sowohl das Ebolavirus (EBOV) als auch humanpathogene Coronaviren wie das Humane Coronavirus 229E (HCoV-229E), MERS-CoV oder SARS-CoV-2 als Modellsysteme zur Validierung der humanen Helikase eIF4A als antivirales Zielmolekül verwendet. Im nachstehenden Abschnitt wird folglich auf die Organisation und den Aufbau der Genome der beiden Vertreter humanpathogener Viren eingegangen.

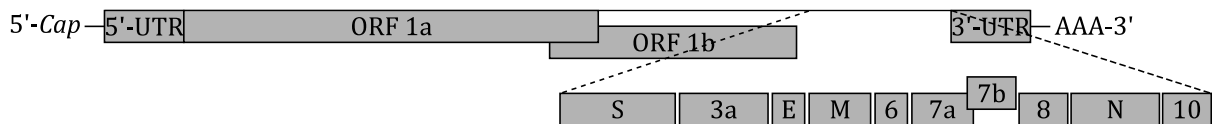
Das Ebolavirus zählt zusammen mit dem Marburg-Virus (MARV) zur Familie der *Filoviridae* und verursacht hämorrhagisches Fieber. Die höchste Mortalitätsrate weist das *Zaire-Ebolavirus* auf, dessen Verlauf meist tödlich ausgeht (Modrow *et al.*, 2010). Es handelt sich um ein einzelsträngiges nicht-segmentiertes Minusstrang-RNA-Virus, dessen Genom etwa 19 Kilobasen lang ist (Sanchez *et al.*, 1993). Insgesamt codiert es für sieben Gene, deren mRNAs jeweils mit einer 5'-(m<sup>7</sup>G)-Cap sowie einem 3'-Poly(A)-Schwanz modifiziert sind und über strukturierte nicht-codierende Bereiche an den 5'- und 3'-Enden verfügen (vgl. Abbildung 5) (Shabman *et al.*, 2013). Eine Besonderheit der 5'-UTRs sind die 5'-terminalen Haarnadelstrukturen (*Hairpins*, kurz: HP), die alle sieben Gene enthalten und die zur eIF4A-Abhängigkeit bei der Translation beitragen.



**Abbildung 5: Genomorganisation des Ebolavirus am Beispiel des *Zaire-Ebolavirus*.** Legende: Dunkelrot: Offener Leserahmen (ORF), Grau: 5'-UTR bzw. 3'-UTR. Das Genom des Ebolavirus besteht aus einer einzelsträngigen nicht-segmentierten RNA mit negativer Orientierung. Die Enden werden durch eine 3'-leader- sowie eine 5'-trailer-Region flankiert. Insgesamt codiert das Genom für sieben Gene, die jeweils über strukturierte 5'- und 3'-UTRs verfügen und mit einer 5'-Cap-Struktur sowie einem 3'-Poly(A)-Schwanz modifiziert sind. Die Abbildung wurde basierend auf der NCBI-Sequenz des *Zaire-Ebolavirus* (Accession Number: NC\_002549) in Anlehnung an (Modrow *et al.*, 2010) erstellt.

Das RNA-Genom ist helikal angeordnet und bildet durch Interaktion mit den viralen Proteinen VP35 und VP30, dem Nukleoprotein NP und der RNA-Polymerase L das Nukleokapsid aus. Dieses ist von einer Membranhülle umgeben und wird durch die Matrixproteine VP24 und VP40, die sich an der Membraninnenseite befinden, gebunden. In die Membran ist das Glykoprotein GP als Trimer eingelagert, welches als einziges der sieben Proteine an der Virusoberfläche exponiert ist (*Modrow et al., 2010*).

Im Gegensatz zum Ebolavirus verursacht ein Großteil der humanpathogenen Coronaviren, die zur Familie der *Coronaviridae* innerhalb der Ordnung *Nidovirales* gehören, meist harmlose Erkältungssymptome oder Infektionen im oberen Respirationstrakt (*Corman et al., 2019*). Eine Ausnahme stellen die zoonotischen Coronaviren, darunter das SARS-CoV, das MERS-CoV sowie das SARS-CoV-2 dar, die neben schweren Atemwegserkrankungen auch eine deutlich höhere Letalitätsrate als die endemischen humanen Coronaviren aufweisen (*RKI, 2020*). Das RNA-Genom der Coronaviren ist einzelsträngig mit Plusstrangorientierung und zählt mit einer Länge von 27 bis 32 Kilobasen zu den größten Genomen unter den RNA-Viren. Es ist mit einer 5'-(m<sup>7</sup>G)-Cap sowie einem 3'-Poly(A)-Schwanz modifiziert und nicht-segmentiert (vgl. Abbildung 6) (*Pellett et al., 2014*).



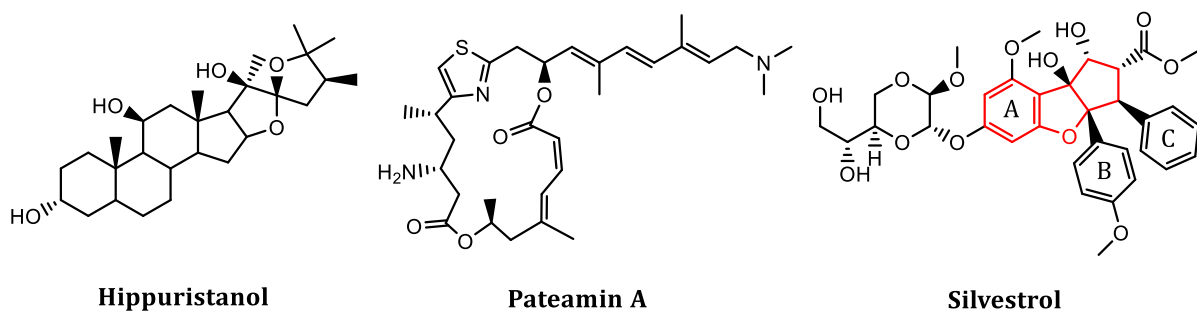
**Abbildung 6: Genomorganisation der Coronaviren am Beispiel von SARS-CoV-2.** Das Genom der Coronaviren besteht aus einer einzelsträngigen nicht-segmentierten RNA mit positiver Orientierung. Die überlappenden offenen Leseraster (ORF 1a und ORF 1b) codieren für die Nichtstrukturpolyproteine 1a und 1b. Das Plusstrang-RNA-Genom wird mithilfe der RNA-abhängigen RNA-Polymerase in einen Negativstrang transkribiert, der u. a. als Matrize für die Synthese von subgenomischen mRNA-Spezies, die mit einer 5'-Cap-Struktur sowie einem 3'-Poly(A)-Schwanz modifiziert sind, dient. Die subgenomischen mRNAs codieren für verschiedene virale Strukturproteine. Die Abbildung wurde basierend auf der NCBI-Sequenz des *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (*Accession Number: NC\_045512*) in Anlehnung an (*Modrow et al., 2010*) erstellt.

Wie auch das Genom des Ebolavirus ist es helikal gewunden und von einer Membranhülle umgeben. Komplexiert mit den N-Proteinen bildet es das Nukleokapsid aus, das sich im Innern der Coronaviruspartikel befindet. Über Interaktion mit dem Matrix-Protein (M-Protein) ist das Nukleokapsid mit der Membran assoziiert. Neben dem M-Protein sind außerdem das S-Protein (*Spike-Protein*) und das E-Protein (*envelope protein*) in die Membran eingelagert. Einige Vertreter der Coronaviren verfügen zusätzlich über das HE-

Protein (Hämagglutinin-Esterase), das ebenfalls mit der Membran assoziiert ist (*Modrow et al., 2010*). Der Name „Coronaviren“ (lat.: *corona*: Kranz, Krone) leitet sich von der charakteristischen kronenförmigen Anordnung der S-Proteine um das Viruspartikel ab.

### 1.3 Niedermolekulare eIF4A-Inhibitoren

Für die im vorherigen Abschnitt verdeutlichte Relevanz der Validierung von eIF4A als antivirales Target bedarf es gleichermaßen eines geeigneten spezifischen Wirkstoffs. Dieses Unterkapitel soll daher einen Einblick in den aktuellen Stand der Forschung zu bekannten niedermolekularen eIF4A-Inhibitoren geben. Ursprünglich wurden diese hinsichtlich ihrer Aktivität als potentielle Antitumor-Therapeutika durch Inhibition von eIF4A als Zielmolekül in der Onkologie identifiziert und detailliert untersucht (*Bordeleau et al., 2008; Cencic et al., 2012*). Da eIF4A nicht nur über eine ATP-Bindetasche, sondern auch eine Nukleinsäure-Bindestelle verfügt und zudem die Aktivität durch Konformationsänderungen, bei denen intermolekulare Domänen in Bewegung treten, zustande kommt, gibt es eine Vielzahl möglicher Interaktionsflächen, an denen sowohl spezifische als auch potente Inhibitoren, in Form von niedermolekularen Molekülen binden können (*Kwong et al., 2005*). Die ersten eIF4A-Inhibitoren wurden innerhalb eines Hochdurchsatz-Screenings zur Identifikation von Inhibitoren der eukaryontischen Translation in der Forschungsgruppe um PROF. DR. JERRY PELLETIER (McGill Universität, Montréal, Kanada) entdeckt (*Bordeleau et al., 2005; Bordeleau, Cencic, et al., 2006; Bordeleau, Mori, et al., 2006*). Es handelt sich um die Naturstoffe Hippuristanol, Pateamin A und Silvestrol, die sich stark in ihrer chemischen Struktur unterscheiden (vgl. Abbildung 7). Nachfolgend werden deren Eigenschaften sowie deren Interaktion mit eIF4A genauer beleuchtet.



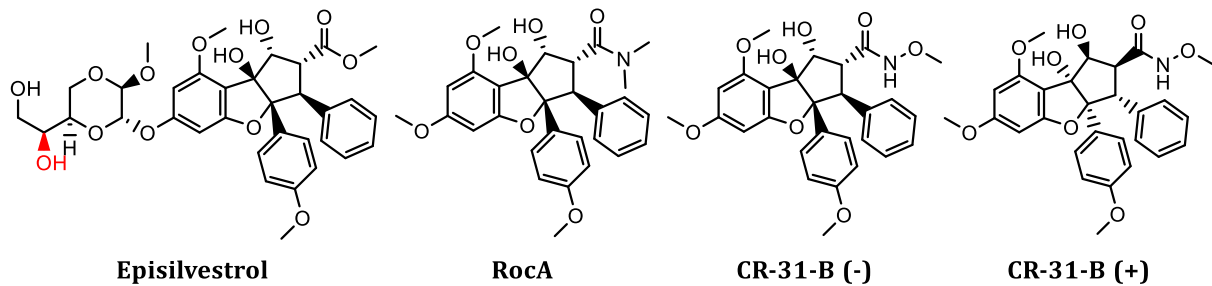
**Abbildung 7: Strukturformeln der eIF4A-Inhibitoren Hippuristanol, Pateamin A und Silvestrol.** In Rot: Cyclopenta[*b*]benzofuran-Grundgerüst der Rocaglamid-Derivate. A, B und C kennzeichnen die aromatischen Ringsysteme in Silvestrol.

Hippuristanol ist ein Polyhydroxysteroid, welches in der Koralle *Isis hippuris* vorkommt. Es interagiert mit der C-terminalen Domäne von eIF4A über die Motive V und VI und verhindert so die Bindung von RNA (Lindqvist et al., 2008). Durch diese allosterische Inhibition wird eIF4A in der geschlossenen Konformation festgehalten und kann keine Helikase-Aktivität ausüben (Cencic & Pelletier, 2016). Da die Motive V und VI der C-terminalen Domäne innerhalb der DEAD-Box-Helikasen eine hohe Sequenzvariation aufweisen, kann Hippuristanol als ein sehr selektiver Inhibitor von eIF4A angesehen werden. Im Gegensatz zur RNA-Bindung kann die Bindung von ATP in Gegenwart des Inhibitors stattfinden, weil die N-terminale Domäne von eIF4A nicht durch die Bindung von Hippuristanol beeinflusst wird (Lindqvist et al., 2008).

Pateamin A (PatA) zählt zu den Makrodioliden, einer Klasse makrozyklischer Naturstoffe, die sich durch zahlreiche biologische Aktivitäten auszeichnet (Grabley & Thiericke, 1999). Der Naturstoff wird aus dem Schwamm *Mycale hentscheli* isoliert und induziert eine irreversible Sequestrierung von eIF4A an die RNA (Bordeleau, Cencic, et al., 2006; Northcote et al., 1991). Dies hat zur Folge, dass weniger eIF4A für die Bildung des eIF4F-Komplexes zur Verfügung steht, was wiederum die Assemblierung des 43S-PIC während der Translationsinitiation verhindert. Pateamin A wirkt somit als chemischer Induktor einer Dimerisierung zwischen eIF4A und der RNA (Bordeleau, Cencic, et al., 2006). Im Unterschied zu Hippuristanol kann PatA nur freies eIF4A binden. Dies lässt vermuten, dass die Bindestelle für Pateamin A im eIF4F-Komplex nicht zugänglich ist und die Interaktion mit eIF4A an der Schnittstelle der N- und C-terminalen Domäne zu finden ist (Cencic et al., 2012).

Silvestrol ist ein Rocaglamid-Derivat, das aus asiatischen Mahagonigewächsen der Gattung *Aglaia* isoliert wird (S. Kim et al., 2007). Rocaglamid-Derivate zählen zur Klasse der Flavagline und zeichnen sich durch ein Cyclopenta[b]benzofuran-Grundgerüst aus (vgl. Abbildung 7, in Rot dargestellter Bereich) (Schulz et al., 2020). Eine Besonderheit von Silvestrol ist die 1,4-Dioxan-Gruppe, die mit dem Phenylrest des Rings A verknüpft ist und eine Seltenheit unter den Rocaglamid-Derivaten darstellt (Shen & Pelletier, 2020). Das erste Rocaglamid-Derivat, genannt Rocaglamid A (RocA), wurde 1982 isoliert und dessen chemische Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse geklärt (King et al., 1982). Seitdem konnten über 100 Rocaglamid-Derivate identifiziert und isoliert werden, darunter 2004 das Silvestrol und sein Diastereomer, das Episilvestrol (Hwang et al., 2004). In 1990 gelang erstmalig die chemische Synthese von RocA, die insgesamt

18 Schritte umfasst und die absolute Stereochemie der Molekülklasse aufdeckte (*Trost et al.*, 1990). Zwischenzeitlich konnte die Synthese optimiert und um eine Vielzahl an modifizierten Rocaglamid-Derivaten erweitert werden (*Zhang et al.*, 2019). Ein Beispiel eines solchen nicht natürlich vorkommenden Rocaglamid-Derivats ist das CR-31-B. Bei der Synthese von CR-31-B wird ein racemisches Gemisch zweier Enantiomere erhalten, von denen lediglich das (-)-Enantiomer biologisch aktiv ist (vgl. Abbildung 8).



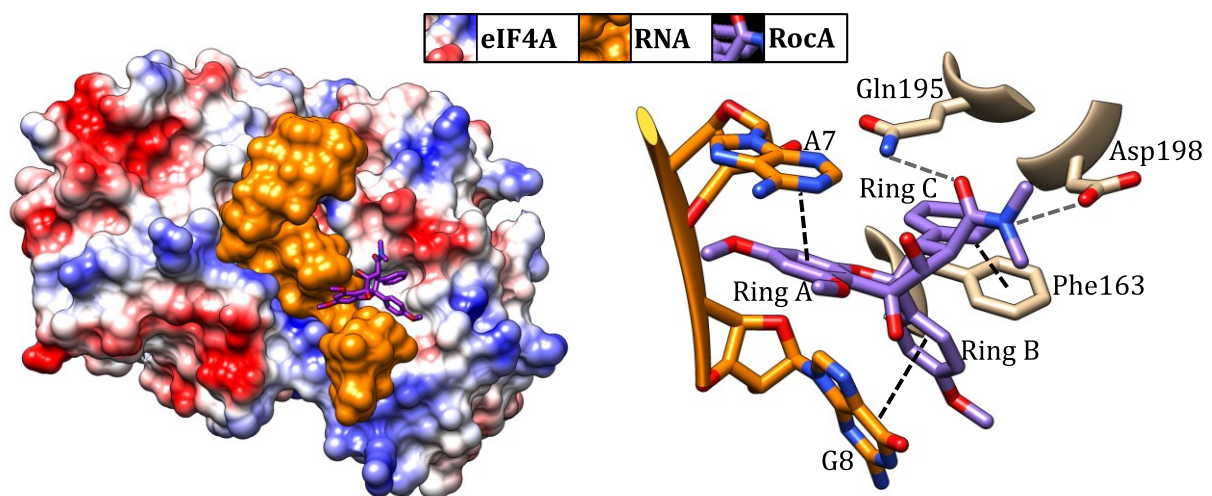
**Abbildung 8: Natürliche und chemisch synthetisierte Rocaglamid-Derivate.** Episilvestrol, das Diastereomer zu Silvestrol, unterscheidet sich von Silvestrol in der Chiralität der in Rot gekennzeichneten Hydroxygruppe. Bei Episilvestrol und RocA handelt es sich um Naturstoffe, während CR-31-B (+) und CR-31-B (-) chemisch synthetisierte Rocaglamid-Derivate sind. CR-31-B (+) und (-) sind Enantiomere, wobei nur das (-)-Enantiomer eine biologische Aktivität zeigt (vgl. *Müller, Obermann et al.*, 2020).

Ursprünglich wurden die Rocaglamid-Derivate hinsichtlich ihrer Antitumor-Wirkung in der Krebsforschung untersucht und zeigten hier bereits im niedrigen nanomolaren Bereich zytotoxische Effekte in Krebszellen (*Hwang et al.*, 2004). Eine antivirale Aktivität wurde allerdings erst 2008 bei einem neu entdeckten Flavaglin gegen das Herpes-simplex-Virus-1 (HSV-1) festgestellt und daraufhin die Forschungsarbeiten hinsichtlich des Potentials als antivirale Therapeutika ausgedehnt (*Joycharat et al.*, 2008). Inzwischen konnten antivirale Wirkungen von Rocaglamid-Derivaten wie Silvestrol gegen das Ebolavirus (EBOV), Coronaviren, darunter das HCoV-229E oder das MERS-CoV, das Zika-Virus (ZIKV), das Chikungunya-Virus (CHIKV), das Lassa-Virus, das Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHF) und das Hepatitis-E-Virus (HEV) im niedrigen nanomolaren Bereich in Zellkulturexperimenten beobachtet werden (*Biedenkopf et al.*, 2017; *Elgner et al.*, 2018; *Glitscher et al.*, 2018; *Henss et al.*, 2018; *Müller et al.*, 2018, *Müller, Obermann et al.* 2020). Interessanterweise ist die Zytotoxizität von Silvestrol in primären Zellen in den genannten Studien relativ gering, wodurch die therapeutische Relevanz der Rocaglamid-Derivate als antivirale Breitbandwirkstoffe zusätzlich unterstrichen wird. Abgesehen von ihrer antiviralen Aktivität zeigen Rocaglamid-Derivate außerdem auch gegenüber anderen Pathogenen eine vielversprechende Wirksamkeit. So konnte z. B. eine



antiplasmodiale Aktivität von CR-31-B (-) in *Plasmodium*-infizierten Mäusen beobachtet werden (Langlais *et al.*, 2018). Weiterhin wurde in einem Hochdurchsatz-Screening zur Identifikation von Antimykotika gegen das Pilzpathogen *Candida auris* eine fungizide Wirkung von Rocaglamid-Derivaten entdeckt (Iyer *et al.*, 2020). Diese Erkenntnisse verdeutlichen das breite Spektrum an potentiellen Einsatzmöglichkeiten dieser Substanzklasse.

Im Hinblick auf den Wirkmechanismus der Rocaglamid-Derivate wird ein Festklemmen der RNA an eIF4A (*RNA clamping*) vermutet, welches im Gegensatz zu Pateamin A jedoch reversibel zu sein scheint (Bordeleau *et al.*, 2008). In diesem Kontext konnte 2019 eine Publikation von SHINTARO IWASAKI und Kollegen einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Rocaglamid-Derivaten leisten (Iwasaki *et al.*, 2019). Die Kristallstruktur einer trunktierten Version von humanem eIF4A im Komplex mit einer Polypurin-RNA und RocA sowie dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogen AMP-PNP bestätigte die Interaktionen des Rocaglamids mit der Helikase und dem RNA-Substrat auf molekularer Ebene (PDB: 5ZC9) (vgl. Abbildung 9).



**Abbildung 9: Kristallstruktur des eIF4A1-AMP-PNP-RocA-Polypurin-RNA-Komplexes.** Die Abbildung wurde mithilfe der Software UCSF Chimera (RBVI) angefertigt. Die Farbgebung der Oberfläche von eIF4A resultiert aus dem elektrostatischen Potential (Blau: positives Potential, Rot: negatives Potential). Die Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> ist in Orange dargestellt, das RocA in Violett. Die schwarz-gestrichelten Linien deuten die  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen des Rocaglamids mit der RNA und der Helikase an, die hellgrau-gestrichelten Linien zeigen mögliche Wasserstoffbrückenbindungen an. (PDB: 5ZC9) (Iwasaki *et al.*, 2019).

Demnach bindet RocA an der direkten Schnittstelle der *N*-terminalen Domäne von eIF4A mit der RNA und interagiert über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit den Purinbasen des RNA-Substrats (AG)<sub>5</sub> und dem Phenylalanin von eIF4A an Position 163. Zudem können

Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Glutamin-Rest an Position 195, dem Aspartat an Position 198 sowie dem Stickstoff N7 der Guaninbase der RNA die Bindung des Rocaglamid-Derivats verstärken (*Iwasaki et al., 2019*). Dieser Einblick in den potentiellen Interaktionsmechanismus auf molekularer Ebene ermöglicht seitdem eine gezielte Entwicklung neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren. Beispielsweise kann durch molekulares Docking die Bindung potentieller eIF4A-Inhibitoren *in silico* vorhergesagt und für Struktur-basiertes Wirkstoffdesign genutzt werden.

Neben den drei bekanntesten eIF4A-Inhibitor-Klassen gibt es weitere niedermolekulare Verbindungen, denen in Studien eine Hemmung der Helikase nachgesagt wird. Darunter Allolaurinterol, Elisabatin A, 6-Aminocholestanol (6-AC), Sanguinarine (SAN), Elatol oder das Prostaglandin 15d-PGJ2 (*Abdelkrim et al., 2018; Jiang et al., 2019; W. J. Kim et al., 2007; Peters et al., 2018; Tillotson et al., 2017*). Jedoch konnten die Spezifität und Selektivität einiger dieser potentiellen Inhibitoren in einer kürzlich veröffentlichten Studie nicht bestätigt werden (*Naineni et al., 2020*).

### 1.4 Zielsetzung

Um vorhersagen zu können, welche Eigenschaften einer mRNA eine eIF4A-abhängige Translation bedingen, sollen verschiedene RNA-Sequenz- und -Strukturelemente untersucht werden. Dies kann beispielsweise mithilfe eines Dual-Luciferase-Assays (DLA) durch Messung der Translationseffizienzen der Reporter-mRNAs bei selektiver Inhibition von eIF4A mit Silvestrol bestimmt werden. Außerdem soll überprüft werden, ob durch Einfügen von Sequenzelementen in die 5'-UTRs von Genen, deren Translation ursprünglich nicht eIF4A-abhängig ist, eine künstliche eIF4A-Abhängigkeit induziert werden kann. Solche Sequenzelemente sind z. B. Polypurin-Sequenzen, die eine Bindung von Rocaglamid-Derivaten an den eIF4A-RNA-Komplex fördern.

Um ein besseres Verständnis für den Wirkmechanismus von Rocaglamid-Derivaten zu entwickeln, sollen die Protein-Ligand-Interaktionen zwischen eIF4A und Silvestrol genauer untersucht werden. Dafür soll eIF4A rekombinant produziert, isoliert und aufgereinigt werden. Mithilfe eines geeigneten Proteinassays sollen dann Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen eIF4A und Silvestrol abgeleitet werden.

In einer Kooperation mit PROF. DR. HANS-GUIDO WENDEL (*Memorial Sloan Kettering Cancer Centre, New York, USA*) sollen außerdem die Spezifität und Wirksamkeit von Rocaglamid-Derivaten wie CR-31-B mit der Aktivität von Silvestrol verglichen werden. Die in der Arbeitsgruppe WENDEL synthetisierten Derivate, die untersucht werden sollen, verfügen nicht über die für Silvestrol charakteristische 1,4-Dioxan-Einheit, daher könnten sie sich in ihrer Wirkungsweise von Silvestrol unterscheiden.

Da die Synthese von Rocaglamid-Derivaten sehr komplex und zeitaufwendig ist, sollen in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PROF. DR. MARTIN SCHLITZER (Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) weniger komplizierte Moleküle, denen ein Liganden-basiertes oder Struktur-basiertes Design ausgehend von Silvestrol zugrunde liegt, hinsichtlich ihrer Aktivität als potentielle eIF4A-Inhibitoren getestet werden. Ein Vorteil dieser Strategie könnte die einfachere chemische Synthese solcher neuer eIF4A-Inhibitoren sein, was generell für die Wirkstoffentwicklung von großer Bedeutung ist.

Ausgehend von der publizierten Kristallstruktur von eIF4A im Komplex mit einer RNA, RocA und AMP-PNP (PDB: 5ZC9), soll der Bindungsmodus neuer Wirkstoffkandidaten anhand von molekularem Docking vorhergesagt werden. Zudem soll durch Mutation gezielter Positionen in eIF4A abgeschätzt werden, welche Mutationen einen Verlust der Rocaglamid-Sensitivität hervorrufen könnten. Eine solche Rocaglamid-Resistenz ist z. B. in Pflanzen der Gattung *Aglaia* zu finden, aus denen Silvestrol isoliert werden kann.



## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von den Herstellern Carl Roth®, GERBU Biotechnik GmbH, Sigma-Aldrich oder Thermo Fisher Scientific mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* (*p. a.*) oder über die Chemikalienausgabe des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg erworben.

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Modellbezeichnung und zugehörigem Hersteller. Ein Großteil der Verbrauchsmaterialien wurde über die Chemikalienausgabe des Instituts für Pharmazeutische Chemie bezogen.

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Modellbezeichnung und zugehörigem Hersteller.**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Modellbezeichnung (Hersteller)</b>
96-Well-Platten	Cellstar® 96-Well Microplate, flat bottom black polystyrene wells, sterile (Greiner Bio-One) Cellstar® 96-Well Microplate, flat bottom clear polystyrene wells, sterile (Greiner Bio-One)
Deckgläser	Stärke 1, 22 × 22 mm (Carl Roth)
Dialyseschläuche	ZelluTrans, MWCO: 12 – 14 kDa (Carl Roth)
Einmalküvetten	(Sarstedt)
Einmaltransferpipetten	(Sarstedt)
Einmalpipettenspitzen	(Sarstedt)
Einmalpipettenspitzen mit Filter	Biosphere® (Sarstedt)
Einmalspritzen	Inkjet® (B. Braun)
Flaschenaufsatzfilter	Filtopur BT50, 500 mL, 0,2 µm (Sarstedt)
Glasperlen	(Biospec)
Kanülen	Sterican® (B. Braun)
Kapillaren	Premium Capillaries (NanoTemper Technologies)
Konzentratoren	Amicon®, MWCO: 10 kDa (Merck Millipore Ltd.)
Kryoröhrchen	2 mL (Sarstedt) CryoTube™ Vials, 1,8 mL (Thermo Fisher Scientific)
PCR-Mikroreaktionsgefäße	MultiPLY®-µStrip Pro, 0,2 mL (Sarstedt)
Petrischalen	92 × 16 mm (Sarstedt)
Polypropylen-Reagierröhren	15 mL; 50 mL (Greiner Bio-One)
Säulen zur Proteinaufreinigung	HisTrap™ HP 1 mL; 5 mL (GE Healthcare) HisTrap™ FF 5 mL (GE Healthcare) HiTrap™ Heparin HP 1 mL; 5 mL (GE Healthcare) Mono Q™ 5/50 GL, 1 mL (GE Healthcare)
Superloop	50 mL Superloop (GE Healthcare) 10 mL Superloop (GE Healthcare)
Reagiergefäße	1,5 mL; 2,0 mL (Sarstedt)

## 2 Materialien

	0,2 mL ( <i>Biozym</i> )
Reagiergefäße mit Schraubdeckel	5,0 mL ( <i>Eppendorf</i> )
Schraubröhrchen	15 mL; 50 mL ( <i>Sarstedt</i> )
Serologische Pipetten	5 mL; 10 mL; 25 mL; 50 mL ( <i>Sarstedt</i> )
Skalpell	Cutfix stainless Einmalskalpell #21 ( <i>B. Braun</i> )
Spritzenvorsatzfilter	Filtopur S, 0,2 µm ( <i>Sarstedt</i> )
Zählkammer	Neubauer improved bright-line, 0,1 mm, 0,0025 mm <sup>2</sup> ( <i>Marienfeld-Superior</i> )
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> ; 75 cm <sup>2</sup> ( <i>Greiner Bio-One</i> )
Zellschaber	( <i>Sarstedt</i> )

### 2.3 Puffer, Kulturmedien und Stammlösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Puffer, Kulturmedien oder Stammlösungen mit entmineralisiertem Wasser oder doppelt-destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) hergestellt und bei Bedarf sterilfiltriert oder autoklaviert. Die Zusammensetzung kann Tabelle 2, Tabelle 3 und Tabelle 4 entnommen werden.

**Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung (ggf. Hersteller)</b>
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau G-250 10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol
10× FastDigest-Puffer	siehe Herstellerangaben ( <i>Thermo Scientific</i> )
Heparin-Elutionspuffer	20 mM HEPES 1 M KCl 0,1 mM EDTA 2 mM CaCl <sub>2</sub> 10 % (v/v) Glycerin → pH 7,5; sterilfiltriert
HEPES-Puffer A0	50 mM HEPES 100 mM NaCl → pH 7,4; sterilfiltriert Zugabe von 0,05 % Tween-20
4× Lämmli-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl 8 % (w/v) SDS 8 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerin → pH 6,8
Ni-NTA-Resuspensions- und Waschpuffer ( <i>Iwasaki et al., 2019</i> )	20 mM HEPES 300 mM KCl 20 mM Imidazol 0,1 mM EDTA 5 mM β-Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin → pH 7,5; sterilfiltriert

Ni-NTA-Elutionspuffer ( <i>Iwasaki et al.</i> , 2019)	20 mM HEPES 300 mM KCl 200 mM Imidazol 0,1 mM EDTA 5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin → pH 7,5; sterilfiltriert
10× PNK-Puffer B (exchange)	siehe Herstellerangaben ( <i>Fermentas</i> )
Protease Inhibitor Cocktail	siehe Herstellerangaben ( <i>Sigma</i> )
Rotiphorese® 10× SDS-PAGE-Laufpuffer	siehe Herstellerangaben ( <i>Carl Roth</i> )
Storage-Puffer ( <i>Iwasaki et al.</i> , 2019)	20 mM HEPES 100 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA 1 mM DTT 10 % (v/v) Glycerin → pH 7,5; sterilfiltriert
5× TBE-Puffer	89 mM Tris 89 mM Borsäure 99,8 %ig 2 mM EDTA-Disodium → pH 8,3
Thrombin-Cleavage-Puffer	20 mM HEPES 150 mM KCl 0,1 mM EDTA 2 mM CaCl <sub>2</sub> 10 % (v/v) Glycerin → pH 7,5; sterilfiltriert

Tabelle 3: Zusammensetzung der Kulturmedien.

Kulturmedien	Zusammensetzung (ggf. Hersteller)
Fetal Bovine Serum (FBS) Superior	siehe Herstellerangaben ( <i>Sigma Aldrich</i> )
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	siehe Herstellerangaben ( <i>Gibco</i> )
Lysogeny-Broth-Medium (LB-Medium)	10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Pepton → pH 7,5; autoklaviert
Lysogeny-Broth-Agarplatten (LB-Agarplatten)	10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Pepton → pH 7,5 15 g/L Agar Agar → autoklaviert → vor Gebrauch Zugabe des Antibiotikums
Opti-MEM™ Reduced Serum Media	siehe Herstellerangaben ( <i>Gibco</i> )
Phosphate-buffered saline (PBS)	siehe Herstellerangaben ( <i>Gibco</i> )
Trypsin/EDTA (10×) 0,5 %/0,2 % in PBS	siehe Herstellerangaben ( <i>Biochrom</i> )

**Tabelle 4: Konzentrationen der verwendeten Stammlösungen.** Sofern nicht anders angegeben, wurden die Stammlösungen in ddH<sub>2</sub>O angesetzt und ggf. sterilfiltriert.

<b>Stammlösung</b>	<b>Konzentration (ggf. Hersteller)</b>
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Ampicillin (Amp100)	100 mg/mL Ampicillin
Adenosintriphosphat (ATP)	10 mM Adenosintriphosphat ( <i>Carl Roth</i> ) 100 mM Adenosintriphosphat ( <i>Carl Roth</i> )
Adenylyl-Imidodiphosphat (AMP-PNP)	100 mM Adenylyl-Imidodiphosphat ( <i>Roche</i> )
*CR-31-B (+)	10 mM CR-31-B (+) in DMSO 1 mM CR-31-B (+) in DMSO
*CR-31-B (-)	10 mM CR-31-B (-) in DMSO
*CR-31-B (rac)	10 mM CR-31-B (rac) in DMSO
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kanamycin (Kan50)	50 mg/mL Kanamycin
Silvestrol	6 mM Silvestrol in DMSO 7,48 mM Silvestrol in DMSO 2,59 mM Silvestrol in DMSO
*HGW-0	10 mM HGW-0 in DMSO
*HGW-8	10 mM HGW-8 in DMSO
*HGW-9	10 mM HGW-9 in DMSO
*HGW-4	10 mM HGW-4 in DMSO
*HGW-3	10 mM HGW-3 in DMSO

\* Die gekennzeichneten Substanzen wurden zur Testung der antiviralen Aktivität und Spezifität als eIF4A-Inhibitoren von PROF. DR. HANS-GUIDO WENDEL (MSKCC, New York) zur Verfügung gestellt.

## 2.4 Kits, Größenstandards und Farbstoffe

Eine Auflistung aller verwendeten Kits, Größenstandards und Farbstoffe ist in Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 zu finden.

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kits.**

<b>Verwendung</b>	<b>Kit-Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Dual-Luciferase-Assay	Dual-Luciferase® Reporter Assay System	<i>Promega</i>
MST-Assay	Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation	<i>NanoTemper Technologies GmbH</i> <i>NanoTemper Technologies GmbH</i>
Plasmidpräparation/ DNA-Aufreinigung	GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit Plasmid DNA purification NucleoBond® Xtra	<i>Thermo Scientific</i> <i>Macherey-Nagel</i>
PCR-Aufreinigung/ Gelextraktion	Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit Monarch® DNA Gel Extraction Kit	<i>Promega</i> <i>Zymo Research</i> <i>New England Biolabs</i>
SDS-PAGE	TGX Stain Free™ Fast Cast™ Acrylamide Kit, 10 %	<i>Bio-Rad</i>
WST-1-Assay	Cell Proliferation Reagent WST-1	<i>Roche</i>



Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Größenstandards.

Verwendung	Größenstandard-Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	100 bp DNA Ladder (0,1 µg/µL)	Cytogen
	1 kb DNA Ladder (0,1 µg/µL)	Cytogen
SDS-PAGE	Precision Plus Protein Unstained Standards	Bio-Rad
	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 – 250 kDa)	Thermo Scientific

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Farbstoffe.

Verwendung	Farbstoff-Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	GelRed® Nucleic Acid Stain, 10.000×	Biotium
	Ethidiumbromidlösung, 1 %ige Lösung	Carl Roth
	HDgreen™ DNA-Dye	iNTAS
	6x DNA Loading Dye	New England Biolabs
Thermal-Shift-Assay	SYPRO® Orange Protein Gel Stain	Sigma-Aldrich

## 2.5 Enzyme und Reagenzien

Tabelle 8 und Tabelle 9 zeigen eine Übersicht über die verwendeten Enzyme und Reagenzien.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Enzyme und Mastermixe.

Verwendung	Enzym/Mastermix	Hersteller
DpnI-Verdau	DpnI FastDigest	Thermo Scientific
His-Tag Entfernung	Thrombin (1 U/µL) in PBS	GE Healthcare
Ligation	2× Gibson Assembly® Master Mix	New England Biolabs
	T4 DNA Ligase (5 U/µL)	Thermo Scientific
Kolonie-PCR	5× HOT CYTOPol Blend Master Mix (10 mM MgCl <sub>2</sub> )	Cytogen
Phosphorylierung	T4 Polynucleotide Kinase (PNK) (10 U/µL)	Thermo Scientific
PCR	2× Phusion High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Scientific
Zellaufschluss	Ambion™ DNase I	Roche
	cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
	Lysozym (100 mg/mL)	unbekannt

**Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Reagenzien.**

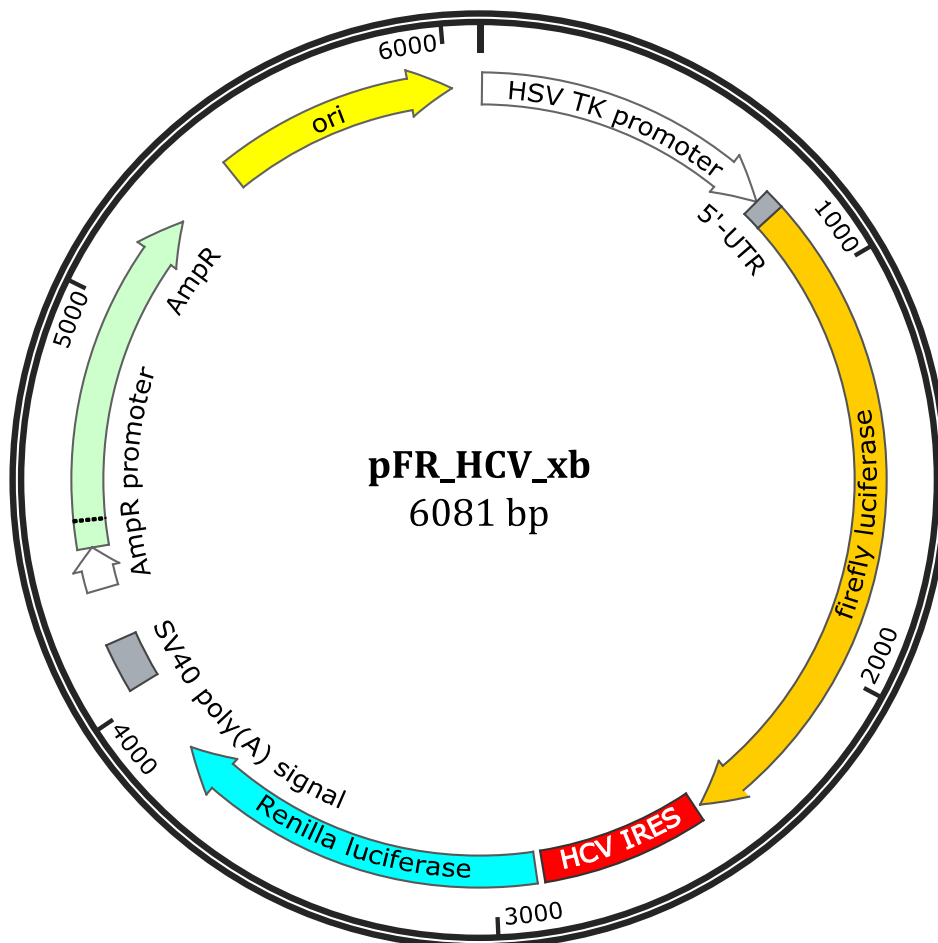
<b>Verwendung</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Transfektion	Lipofectamine® 2000-Transfektionsreagenz	<i>Invitrogen™</i>
	Lipofectamine® 3000-Transfektionsreagenz	<i>Invitrogen™</i>
SDS-PAGE	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	<i>Carl Roth</i>
	Ammoniumperoxodisulfat (APS)	<i>GERBU</i>
	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Carl Roth</i>

## 2.6 Plasmide

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide genauer skizziert. Für die Darstellung der Plasmidkarten sowie Klonierungsplanungen und das Primer-Design wurde die Software SnapGene® (*GSL Biotech LLC*) eingesetzt.

### 2.6.1 pFR\_HCV\_xb

Das Plasmid pFR\_HCV\_xb wurde kommerziell von *Addgene* (Addgene plasmid #11510) erworben und entstammt ursprünglich der Arbeitsgruppe um P. A. SHARP (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA) (*Petersen et al., 2006*). In dieser Arbeit wurde es für die Dual-Luciferase-Assays in Kombination mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (*Promega*) zur Untersuchung der eIF4A-Abhängigkeit verschiedener mRNAs verwendet. Da der Vektor innerhalb einer mRNA für zwei Luciferasen codiert, darunter eine Firefly-Luciferase und eine Renilla-Luciferase, eignet sich dieser besonders gut für die Untersuchung von Translationseffekten. Der schematische Aufbau des Vektors ist in Abbildung 10 gezeigt. Die Transkription von pFR\_HCV\_xb wird durch einen HSV-TK-Promotor (*Herpes simplex virus thymidine kinase promoter*) reguliert. Nachfolgend wurden vor den *Open Reading Frame* (ORF) der Firefly-Luciferase die zu untersuchenden 5'-UTRs kloniert. Die entsprechenden Sequenzen sind Tabelle A.5 des Anhangs zu entnehmen. Die Translationseffizienz der unterschiedlichen mRNAs wird durch die Aktivität der Firefly-Luciferase reflektiert. Als Transfektionskontrolle dient die Renilla-Luciferase, deren Translation der Regulation einer HCV-IRES (*Hepatitis C virus internal ribosome entry site*) unterliegt. Für die Termination der Transkription ist die SV40 Poly(A)-Sequenz zuständig. Außerdem dient eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker (siehe auch Kapitel 3.4.6 Dual-Luciferase-Assay).



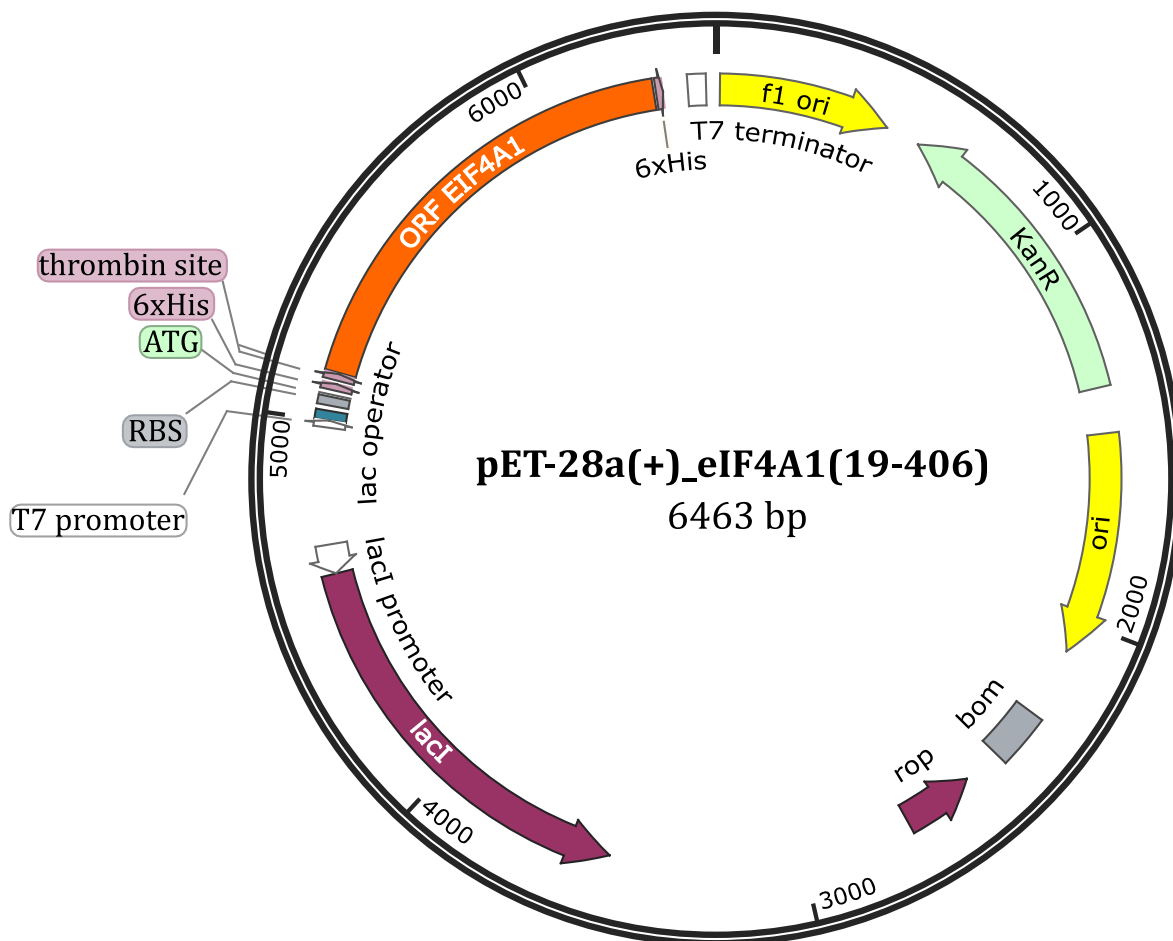
**Abbildung 10: Schematische Plasmidkarte von pFR\_HCV\_xb (Addgene Plasmid #11510)** (Petersen *et al.*, 2006). Die Transkription des Plasmids pFR\_HCV\_xb wird durch einen HSV-TK-Promotor (weiß) reguliert. Die für die Dual-Luciferase-Reporter-Assays eingefügten variierenden 5'-UTRs (grau) steuern die Translationseffizienz einer Firefly-Luciferase (orange). Als Transfektionskontrolle dient eine Renilla-Luciferase (türkis), deren Translation über eine HCV-IRES (rot) eIF4A-unabhängig reguliert wird. Die Selektion erfolgt über eine Ampicillin-Resistenz (hellgrün). Die Illustration wurde mit der Software SnapGene® (GSL Biotech LLC) erstellt. Die zugehörige Plasmidsequenz kann Abbildung A.1 des Anhangs entnommen werden.

### 2.6.2 pET-28a(+)\_eIF4A1

Das Plasmid pET-28a(+)\_eIF4A1 wurde kommerziell von *GenScript* erworben. Nach cDNA-Synthese des für eIF4A1 codierenden Genabschnitts und Codonoptimierung für die Überexpression in *E. coli* wurde der für eIF4A1 codierende Genabschnitt über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in das Plasmid pET-28a(+) kloniert. Dieser Vektor eignet sich besonders gut für die bakterielle Überexpression von Genen, da er über einen T7 Promotor verfügt, der von der bakteriellen T7-RNA-Polymerase für die Transkription genutzt werden kann (Studier & Moffatt, 1986). Durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) kann die Expression des T7-RNA-Polymerase-Gens induziert werden und so die Transkription des gewünschten Gens auf dem Plasmid realisiert werden (siehe auch Kapitel 3.3.1 Rekombinante Überexpression und Zellernte)

(Novagen, 1999). Zudem codiert das Plasmid für einen N- oder C-terminalen Polyhistidin-Tag (His<sub>6</sub>-Tag), der für die Proteinaufreinigung genutzt werden kann. In dieser Arbeit wurde lediglich vom N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag Gebrauch gemacht, der über die auf dem Plasmid hinterlegte Sequenz für eine Thrombin-Schnittstelle durch einen Thrombin-Verdau entfernt werden kann. Als Selektionsmarker dient eine Kanamycin-Resistenz.

Da das mithilfe des Expressionsvektors produzierte Vollängen-Protein eIF4A1 über einen sehr flexiblen N-Terminus verfügt, der bei einigen Assays hinderlich sein kann, wurde nach ersten Untersuchungen eine Deletion der Aminosäuren Ser2 – Glu18 (vgl. *Iwasaki et al.*, 2019) mithilfe der ortsspezifischen Mutagenese durchgeführt. Das daraus resultierende Plasmid pET-28a(+)\_eIF4A1(19-406), mit einer Länge von 6463 bp, wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet (vgl. Abbildung 11).



**Abbildung 11: Schematische Plasmidkarte von pET-28a(+)\_eIF4A1(19-406).** Neben dem für eIF4A1(19-406) codierenden Genabschnitt weist pET-28a(+) einen T7-Promotor auf, der die Transkription von eIF4A1(19-406) mithilfe der bakteriellen T7-RNA-Polymerase ermöglicht (*Studier & Moffatt*, 1986). Zudem codiert der Vektor für einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag und eine Thrombin-Schnittstelle, die es ermöglicht, den His<sub>6</sub>-Tag nach Proteinproduktion und -isolierung abzuspalten. Die Selektion erfolgt über eine Kanamycin-Resistenz (hellgrün). Die Illustration wurde mit der Software SnapGene® (*GSL Biotech LLC*) erstellt. Die zugehörige Plasmidsequenz kann Abbildung B. 1 des Anhangs entnommen werden.

## 2.7 Oligonukleotide

Alle zur Sequenzierung und Klonierung verwendeten DNA-Oligonukleotide, nachfolgend Primer genannt, wurden von ©metabion international AG bezogen. Das Design der Primer sowie die Klonierungsplanung erfolgte mithilfe der Software SnapGene® (GSL Biotech LLC). Die Primer wurden lyophilisiert geliefert und mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Sowohl die Stammlösungen als auch die Verdünnungen wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.7.1 DNA-Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Sequenzierungen oder Klonierungen via Gibson Assembly® oder ortsspezifischer Mutagenese eingesetzt wurden, sind in Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 10: Auflistung der für die Sequenzierungen verwendeten Primer inklusive Sequenz.**

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
pFR_seqfwd	CAT ATT AAG GTG ACG CGT GTG
pFR_universal rev	CCA GGG CGT ATC TCT TCA TAG
FF_Luc1_seqfwd	CGG CGC CAT TCT ATC CGC TG
FF-Luc2_seqfwd	GGA GCC TTC AGG ATT ACA AG
HCV-IRES_seqfwd	GGC CAA GAA GGG CGG AAA G
HSV-TK-Promotor_seqfwd	CAG CAA CGC GGC CTT TTT ACG
Ren-Luc_seqfwd	GTC GGC CAT GAT TGG GGT GC
T7 seq	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7 term seq	TGC TAG TTA TTG CTC AGC GG

**Tabelle 11: Auflistung der für die Klonierungen via Gibson Assembly® verwendeten Primerpaare inklusive Konstruktbezeichnung und Nukleotidsequenz.**

Konstrukt	Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
pFR_HCV_xb +NP	pFR+NP_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAG AGG AAG ATT AAT AAT TTT CCT CTC ATT GAA ATT TAT ATC GG
	pFR+NP_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATA CTC GGA ATT TTG TGA TTC CGA G
	pFR+NP_Vfwd	GGA ATC ACA AAA TTC CGA GTA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG G
	pFR+NP_Vrev	GAA AAT TAT TAA TCT TCC TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG

## 2 Materialien

pFR_HCV_xb +VP35	pFR+VP35_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAG ATG AAG ATT AAA CCT TCA TCA TCC TTA CGT
	pFR+VP35_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATC TTG TTA GAC CAG CTT TTC TTT TAC ATT GA
	pFR+VP35_Vfwd	AGA AAA GCT GGT CTA ACA AGA TGG AAG ACG CCA AAA ACAT AAA GAA AG
	pFR+VP35_Vrev	TGA AGG TTT TAA TCT TCA TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG
pFR_HCV_xb +VP40	pFR+VP40_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAG ATG AAG ATT AAG AAA AAC CTA CCT CGG C
	pFR+VP40_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATA TTT TTA ACA ATT TTG CTC AAC GTT TAC AAG ATG A
	pFR+VP40_Vfwd	TGA GCA AAA TTG TTA AAA ATA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG G
	pFR+VP40_Vrev	GGT TTT TCT TAA TCT TCA TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG
pFR_HCV_xb +GP	pFR+GP_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAG ATG AAG ATT AAG CCG ACA GTG AGC
	pFR+GP_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATT GTG TTG TTG CCC ACA
	pFR+GP_Vfwd	TAT TGT GGG GCA ACA ACA CAA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG G
	pFR+GP_Vrev	CTG TCG GCT TAA TCT TCA TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG
pFR_HCV_xb +VP30	pFR+VP30_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAG ATG AAG ATT AAG AAA AAG GTA ATC TTT CGA TTA TCT TTA ATC TTC
	pFR+VP30_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATT TAA AAG TTG TCT CCA CTC ACT GTT TAA ATT TCT
	pFR+VP30_Vfwd	TGA GTG GAG ACA ACT TTT AAA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG
	pFR+VP30_Vrev	CCT TTT TCT TAA TCT TCA TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG
pFR_HCV_xb +VP24	pFR+VP24_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAG ATG AAG ATT AAT GCG GAG GTC TGA TAA GA
	pFR+VP24_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATG GTT TTT TCT CAG GTC TTG CT
	pFR+VP24_Vfwd	GCA AGA CCT GAG AAA AAA CCA TGG AAG ACG CCA AAA ACA
	pFR+VP24_Vrev	CCT CCG CAT TAA TCT TCA TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG
pFR_HCV_xb+L	pFR+L_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAG AGG AAG ATT AAG AAA AAC TGC TTA TTG GGT
	pFR+L_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATT TAA TAT CAA GAG GAA GAA TTT CAA CTG CT
	pFR+L_Vfwd	ATT CTT CCT CTT GAT ATT AAA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG
	pFR+L_Vrev	AGT TTT TCT TAA TCT TCC TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG

pFR_HCV_xb +PIM1	pFR+Pim-1_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAC CCT TTA CTC CT
	pFR+Pim-1_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATC GCC GCG GGG CA
	pFR+Pim-1_Vfwd	TAG CCT CCT GCC CCG CGG CGA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG
	pFR+Pim-1_Vrev	CCG CAG CCA GGA GTA AAG GGT TAA GCG GGT CGC TGC AGG
pFR_HCV_xb +β-Actin	pFR+β-Actin_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAA CCG CCG AGA CC
	pFR+β-Actin_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATG GTG AGC TGG CGG CG
	pFR+β-Actin_Vfwd	ACA CCC GCC GCC AGC TCA CCA TGG AAG ACG CCA AAA ACA
	pFR+β-Actin_Vrev	GCG GAC GCG GTC TCG GCG GTT TAA GCG GGT CGC TGC AGG G
pFR_HCV_xb +GP+VP24-HP	pFR+GP/VP24_HP_ Ffwd	TGG CCT CGA ACA CCG AGC GAC CCT GCA GCG AC
	pFR+GP_HPVP24_ Frev	AAA ACA AAT AAT CTA AGA GAG ATG AAG AAT GCC TC TTG GGG
	pFR+GP_HPVP24_ Vfwd	CCC AAG AGG CAT TCT TCA TCT CTC TTA GAT TAT TTG TTT TCC AGA GTA GGG
	pFR+GP/VP24_HP_ Vrev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG GGT CGC TCG GTG TT
pFR_HCV_xb +VP24+GP-HP	pFR+GP/VP24_HP_ Ffwd	TGG CCT CGA ACA CCG AGC GAC CCT GCA GCG AC
	pFR+VP24_HPGP_ Frev	ATA GTA CTT TGC TAA AAG GAG ATG AAG ATT ACG CTC ACT GTC G
	pFR+VP24_HPGP_ Vfwd	CAG TGA GCG TAA TCT TCA TCT CCT TTT AGC AAA GTA CTA TTT CAG G
	pFR+GP/VP24_HP_ Vrev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG GGT CGC TCG GTG TT
pFR_HCV_xb +CHIKV	pFR+CHIKV_Vfwd	CTA AAC ACT AAT CAG CTA CAA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG GCC C
	pFR+CHIKV_Vrev	GTG CGT ACC TAT TTA GGA CCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG
	pFR+CHIKV_Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAG GTC CTA AAT AGG TAC GCA CTA CAGC
	pFR+CHIKV_Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATT GTA GCT GAT TAG TGT TTA GAT ACT TGC TGT
pFR_HCV_xb +SARS-CoV-2	pFR+SARS-CoV-2_ Ffwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAA TTA AAG GTT TAT ACC TTC CCA GGT AAC AAA CC
	pFR+SARS-CoV-2_ Frev	ATG TTT TTG GCG TCT TCC ATC TTA CCT TTC GGT CAC ACC C
	pFR+SARS-CoV-2_ Vfwd	GGG TGT GAC CGA AAG GTA AGA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG
	pFR+SARS-CoV-2_ Vrev	GGA AGG TAT AAA CCT TTA ATT TAA GCG GGT CGC TGC AGG GTC GC

**Tabelle 12: Auflistung der für Klonierungen via ortsspezifischer Mutagenese verwendeten Primerpaare inklusive Konstruktbezeichnung und Nukleotidsequenz.**

<b>Konstrukt</b>	<b>Primer-Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'→ 3')</b>
pFR_HCV_xb +β-Globin	pFR+β-Globin_fwd	TCA CTA GCA ACC TCA AAC AGA CAC CAT GGA AGA CGC CAA AAA C
	pFR+β-Globin_rev	ACA CAG TTG TGT CAG AAG CAA ATG TTT AAG CGG GTC GC
pFR_HCV_xb +Prohibitin	pFR+Prohibitin_fwd	GAA GCA GGT GTG AGA GGG TCC AGC AGA AGG AAA CAT GGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG
	pFR+Prohibitin_rev	CAC TCT GAC CTC CAC ATG AAT TCC CCA ACC ACA CAT ACT GCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG
pFR_HCV_xb +NP-ΔHP	pFR+NP-HPdelfwd	TCA TTG AAA TTT ATA TCG GAA TTT AAA TTG AAA TTG TTA CTG TAA TCA C
	pFR+NP-HPdelrev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +NP-NheI	pFR+NP-NheI_Mutfwd	CCC TGC AGC GAC CCG CTT AAG AGG AAG ATT AAT TAA GCT AGC CTC ATT GAA ATT TAT ATC GG CCG ATA TAA ATT TCA ATG AGG CTA GCT TAA TTA TCT TCC TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG G
	pFR+NP-NheI_Mutrev	CCG ATA TAA ATT TCA ATG AGG CTA GCT TAA TTA TCT TCC TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG G
pFR_HCV_xb +NP-Δ3'-HP	pFR+NP-del3'-HP_fwd	ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GG
	pFR+NP-del3'-HP_rev	AAT TTG TCT TTT AAC TAT TTC CAA TGT TTT ACC CCA AG
pFR_HCV_xb+ β-Globin- 3'-HP-NP	pFR+β-Globin- 3'-HP-NP_fwd	CAA AAT TCC GAG TAT GGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG
	pFR+β-Globin- 3'-HP-NP_rev	TGA TTC CGA GCG GTG TCT GTT TGA GGT TGC TAG TG
pFR_HCV_xb +β-Globin- 5'-HP-VP35	pFR+β-Globin- 5'-HP-VP35_fwd	AAA CCT TCA TCA CAT TTG CTT CTG ACA CAA CTG TGT T
	pFR+β-Globin- 5'-HP-VP35_rev	TAA TCT TCA TCT TAA GCG GGT CGC TGC AGG
pFR_HCV_xb +β-Globin- 3'-HP-VP35	pFR+β-Globin- 3'-HP-VP35_fwd	AAA ACC TTC ATC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GG
	pFR+β-Globin- 3'-HP-VP35_rev	AAT CTT CAT CGG TGT CTG TTT GAG GTT GCT AGT G
pFR_HCV_xb +β-Globin-Purin	pFR+β-Globin- Purin_fwd	CAA CCT CAA ACA GAG ACC ATG GAA GAC GCC
	pFR+β-Globin- Purin_rev	CTA GTG AAC ACA GTT GTG TCA GAA GCT TCT CTT TAA GCG GGT CGC
pFR_HCV_xb +VP35-stabHP	pFR+VP35-stabHP_fwd	AAA CCT TCA TCC TTC ATC ATC CTT ACG TCA ATT GAA TTC TCT AGC ACT
	pFR+VP35-stabHP_rev	TAA TCT TCA TCC TTC ATC TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +VP35-ΔHP	pFR+VP35-delHP_fwd	ATC CTT ACG TCA ATT GAA TTC TCT AGC ACT C
	pFR+VP35-delHP_rev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G



pFR_HCV_xb +VP35-nurHP	pFR+NP-del3'-HP_fwd	ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GG
	pFR+VP35-nurHP_rev	GAT GAA GGT TTT AAT CTT CAT CTT AAG CGG GTC
pFR_HCV_xb +VP35-GCHP	pFR+VP35-GCHP_fwd	GCG GCC GGC GGC ATC CTT ACG TCA ATT GAA TTC TCT AGC ACT C
	pFR+VP35-GCHP_rev	CGC TTT TAA TCG GCG GCC GGC GGC TTA AGC GGG TCG CTG CAG
pFR_HCV_xb +GCHP-(AC) <sub>15</sub>	pFR+VP35-PolyAC_fwd	ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG
	pFR+VP35-GCHP- PolyAC_rev	GGG GGG GGG GGC TTT TAA TC
pFR_HCV_xb +VP35-HP +(AC) <sub>5</sub>	pFR+VP35_PolyAC- 10bp_fwd	CAC ACA TGG AAG ACG CCA AAA AC
	pFR+VP35-PolyAC- 10bp_rev	TGT GTG ATG AAG GTT TTA ATC TTC ATC TTA AGC G
pFR_HCV_xb +VP35-HP +(AC) <sub>10</sub>	pFR+VP35-PolyAC- 20bp_fwd	CAC ACA CAC ATG GAA GAC GCC
	pFR+VP35-PolyAC- 20bp_rev	TGT GTG TGT GTG ATG AAG GTT TTA ATC TTC ATC
pFR_HCV_xb +VP35-HP +(AC) <sub>15</sub>	pFR+VP35-PolyAC_fwd	ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG
	pFR+VP35-nurHP_rev	GAT GAA GGT TTT AAT CTT CAT CTT AAG CGG GTC
pFR_HCV_xb +VP35-HP +(AC) <sub>20</sub>	pFR+VP35-PolyAC- 40bp_fwd	ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAT GGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA G
	pFR+VP35-nurHP_rev	GAT GAA GGT TTT AAT CTT CAT CTT AAG CGG GTC
pFR_HCV_xb +VP35-HP +(AC) <sub>25</sub>	pFR+VP35-PolyAC- 50bp_fwd	ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AG
	pFR+VP35-nurHP_rev	GAT GAA GGT TTT AAT CTT CAT CTT AAG CGG GTC
pFR_HCV_xb +VP35-HP +(AG) <sub>5</sub>	pFR+VP35-PolyAG- 10bp_fwd	GAG AGA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AG
	pFR+VP35-PolyAG- 10bp_rev	TCT CTG ATG AAG GTT TTA ATC TTC ATC TTA AGC GG
pFR_HCV_xb +VP35-HP +(AG) <sub>10</sub>	pFR+VP35-PolyAG- 20bp_fwd	GAG AGA GAG ATG GAA GAC GCC
	pFR+VP35-PolyAG- 20bp_rev	TCT CTC TCT CTG ATG AAG GTT TTA ATC TTC ATC
pFR_HCV_xb +VP35-HP +(AG) <sub>15</sub>	pFR+VP35_PolyAG _fwdneu	GAG AGA GAG AGA GAG ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GG
	pFR+VP35_PolyAG _revneu	TCT CTC TCT CTC TCT GAT GAA GGT TTT AAT CTT CAT CTT AAG CGG GTC
pFR_HCV_xb +VP35-HP +PolyAC- mid(AG) <sub>5</sub>	pFR+VP35-PolyAC- midAG_fwd	CCT TCA TCA CAC ACA CAC ACA GAG AGA CAC ACA CAC ACA TGG AAG AC
	pFR+VP35-PolyAC- midAG_rev	GTC TTC CAT GTG TGT GTG TGT CTC TCT GTG TGT GTG TGT GAT GAA GG
pFR_HCV_xb +VP35-HP +PolyAC- 5'&3'-(AG)	pFR+VP35-PolyAC- termAG_fwd	CCT TCA TCA CAG AGA CAC ACA CAC ACA CAC ACA GAG ACA TGG AAG AC
	pFR+VP35-PolyAC- termAG_rev	GTC TTC CAT GTC TCT GTG TGT GTG TGT GTG TGT CTC TGT GAT GAA GG

## 2 Materialien

pFR_HCV_xb +(AC) <sub>15</sub>	pFR+PolyAC_fwd	ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +(AG) <sub>15</sub>	pFR+PolyAG_fwd	AGA GAG AGA GAG AGA GAG AGA GAG AGA
	pFR+VP35-delHP_rev	GAG ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +PolyAC- 5'-(AG) <sub>2,5</sub>	pFR+PolyAC- 5'-5AG_fwd	AGA GAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +PolyAC- 5'-(AG) <sub>5</sub>	pFR+PolyAC- 5'-10AG_fwd	AGA GAG AGA GAC ACA CAC ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +PolyAC- 5'-(AG) <sub>7,5</sub>	pFR+PolyAC- 5'-15AG_fwd	AGA GAG AGA GAG AGA CAC ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +PolyAC- 5'-(AG) <sub>10</sub>	pFR+PolyAC -5'-20AG_fwd	AGA GAG AGA GAG AGA GAG AGA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +PolyAC- mid(AG) <sub>2,5</sub>	pFR+PolyAC- mid-5AG_fwd	ACA CAC ACA CAG AGA GAC ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +PolyAC- mid(AG) <sub>5</sub>	pFR+PolyAC- mid-10AG_fwd	ACA CAC ACA GAG AGA GAG ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +PolyAC- mid(AG) <sub>7,5</sub>	pFR+PolyAC- mid-15AG_fwd	ACA CAC AGA GAG AGA GAG AGA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +PolyAC- mid(AG) <sub>10</sub>	pFR+PolyAC- mid-20AG_fwd	ACA CAG AGA GAG AGA GAG AGA GAG ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +(AG) <sub>5</sub> -(AC) <sub>10</sub>	pFR+10AG-20AC_fwd	AGA GAG AGA GAC ACA CAC ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +(AG) <sub>5</sub> -(AC) <sub>12,5</sub>	pFR+10AG-25AC_fwd	AGA GAG AGA GAC ACA CAC ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ACA CAA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG G TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +(AG) <sub>5</sub> -(AC) <sub>15</sub>	pFR+10AG-30AC_fwd	AGA GAG AGA GAC ACA CAC ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ACA CAC ACA CAT GGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +(AG) <sub>5</sub> -(AC) <sub>17,5</sub>	pFR+10AG-35AC_fwd	AGA GAG AGA GAC ACA CAC ACA CAC ACA
	pFR+VP35-delHP_rev	CAC ACA CAC ACA CAC ACA ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GG TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +NP-nurHP	pFR+NP-nurHP_fwd	GAG GAA GAT TAA TAA TTT TCC TCA TGG
	pFR+VP35-delHP_rev	AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG G TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +NP-HP-G4U	pFR+NPHP-G4U_fwd	GAG TAA GAT TAA TAA TTT TCC TCA TGG
	pFR+VP35-delHP_rev	AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG G TTA AGC GGG TCG CTG CAG G

pFR_HCV_xb +NP-HP-C20A	pFR+NPHP-C20A_fwd	GAG GAA GAT TAA TAA TTT TAC TCA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG G
	pFR+VP35-delHP_rev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +NP-HP-genom.	pFR+NPHP- genom_fwd	CTC CTT CTA ATT ATT AAA AGG AGA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAG G
	pFR+VP35-delHP_rev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +NP-HP- genom.-G20U.	pFR+NP- genom-Mut_fwd	CTC CTT CTA ATT ATT AAA ATG AGA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TAA AGA AAGG
	pFR+VP35-delHP_rev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +VP35- ΔPromotor	pFR+VP35- delProm_fwd	GAT GAA GAT TAA AAC CTT CAT CAT CCT TAC GTC AAT TG
	pFR-delProm_rev	TCG AGG CCA CAC GCG TCAC
pFR_HCV_xb +VP40- ΔPromotor	pFR+VP40- delProm_fwd	GAT GAA GAT TAA GAA AAA CCT ACC TCG GCT GAG AG
	pFR-delProm_rev	TCG AGG CCA CAC GCG TCAC
pFR_HCV_xb +CHIKV-C18A	pFR+CHIKV_C18A_fwd	GGT CCT AAA TAG GTA CGA ACT ACA GCT ACC
	pFR+VP35-delHP_rev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +HEVgt3c	pFR+HEVgt3c_fwd	GCA GAC CAC GTA TGT GGT CGA TGC CAT GGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG
	pFR+VP35-delHP_rev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +HEVgt3c-G4C	pFR+HEVgt3c- G4C_fwd	GCA CAC CAC GTA TGT GGT CGA TGC CAT GGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG
	pFR+VP35-delHP_rev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +HEVgt3c- G4CC6A	pFR+HEVgt3c- G4CC6A_fwd	GCA CAA CAC GTA TGT GGT CGA TGC CAT GGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG
	pFR+VP35-delHP_rev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pFR_HCV_xb +HEVgt3c-Purin	pFR+HEV-Purin- neu_fwd	GGA GAG GAC GTA TGT GGT CGA TGC CAT GGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG
	pFR+VP35-delHP_rev	TTA AGC GGG TCG CTG CAG G
pET-28a(+) eIF4A1(19-406)	eIF4A1(19-406)_fwd	CCG GAA GGT GTT ATT GAA AGC AAC TGG
	eIF4A1(19-406)_rev	CAT ATG GCT GCC GCG CG

### 2.7.2 RNA-Oligonukleotide

Die Sequenzen der kommerziell erworbenen synthetischen RNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 13 mit Angabe des Molekulargewichts, der Länge und des Herstellers zusammengetragen.

Tabelle 13: Auflistung der synthetisch hergestellten RNA-Oligonukleotide.

RNA-Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge [bp]	MW [g/mol]	Hersteller
Polypurin-RNA	AGA GAG AGA G	10	3310	biomers.net
HEVgt3c	GCA GAC CAC GUA UGU GGU CGA UGC C	25	8013	biomers.net
HEVgt3c-Purin	GGA GAG GAC GUA UGU GGU CGA UGC C	25	8132	biomers.net

## 2.8 Bakterienstämme

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme findet sich in Tabelle 14.

**Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.**

Bakterienstamm	Organismus	Verwendung
DH5 $\alpha$	<i>Escherichia coli</i>	Klonierung
BL21(DE3)	<i>Escherichia coli</i>	Überexpression

## 2.9 Geräte

Die Modellbezeichnungen der verwendeten Geräte sind in Tabelle 15 angegeben.

**Tabelle 15: Übersicht über die eingesetzten Geräte inklusive Modellbezeichnung und Hersteller.**

Gerät	Modellbezeichnung (Hersteller)
Agarose-Gelelektrophorese	
Dokumentationssystem	Gerix 1000 ( <i>biostep</i> )
Dunkelhaube	DH-50 ( <i>biostep</i> )
Transilluminator	UST_30M-BE ( <i>biostep</i> )
Elektrophoresekammer	Perfect Blue™ Mini S und L ( <i>PEQLAB</i> )
Spannungsquelle	Standard Power Pack P25 ( <i>Biometra</i> )
ÄKTAexplorer™	
Fraktionator	Frac-950 Fraction Collector ( <i>Amersham Biosciences</i> )
pH- und Leitfähigkeitsmonitor	Monitor pH/C-900 ( <i>Amersham Biosciences</i> )
Pumpen	P-900 ( <i>Amersham Biosciences</i> )
UV-Monitor	UPC-900 ( <i>Amersham Biosciences</i> )
ÄKTApurifier™	
Fraktionator	Frac-950 ( <i>Amersham Biosciences</i> )
pH- und Leitfähigkeitsmonitor	pH/C-900 ( <i>Amersham Biosciences</i> )
Pumpen	P-900 ( <i>Amersham Biosciences</i> )
UV-Monitor	UPC-900 ( <i>Amersham Biosciences</i> )
Autoklav	V-95 ( <i>Systec</i> )
Bi-Destillierapparat	Destamat Bi 18 E ( <i>Heraeus</i> )
Brutschrank	
Bakterien	BE 400 ( <i>Memmert</i> )
Zellkultur	NuAire NU-5510E ( <i>ibs tecnomara</i> )
Heizblöcke	AccuBlock™ ( <i>Labnet International Inc.</i> )
	Dri-Block® DB-3D ( <i>Techne</i> )
	TB1; TB2 ( <i>Biometra</i> )
Heiz- und Magnetrührer	Rotilabo® MH15 ( <i>Carl Roth</i> )
	RET-G ( <i>IKA</i> )
HPLC	Primaide™ ( <i>Hitachi</i> )
Microplate Reader	Safire II ( <i>Tecan</i> )
Mikrowelle	8020E ( <i>Pivileg</i> )

Mikroskop	Inverted Laboratory Microscope DM IL LED ( <i>Leica</i> )
PCR-Cycler	LifeECO™ ( <i>BIOER</i> ) TOne 96G ( <i>Biometra</i> ) T1 Thermocycler ( <i>Biometra</i> ) QuantStudio3™ Real-Time PCR System ( <i>Applied Biosystems</i> )
Peristaltikpumpe	CTP300 ( <i>Fisher Scientific</i> )
pH-Meter	pH Level 1 ( <i>inoLab</i> )
Pipetten	PIPETMAN® Classic Starter Kit ( <i>Gilson</i> ) Pipettierhelfer accu-jet® pro ( <i>Brand</i> )
Schüttelinkubator	3033 ( <i>GFL</i> )
SDS-PAGE	
Dokumentationssystem	ChemiDoc™ MP Imaging System ( <i>Bio-Rad</i> )
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell ( <i>Bio-Rad</i> )
Spannungsquelle	PowerPac™ 3000 ( <i>Bio-Rad</i> )
Sicherheitswerkbank	Herasafe® ( <i>Thermo Electron Corporation</i> )
Spektralphotometer	
OD <sub>600</sub> -Bestimmung	7305 ( <i>Jenway</i> )
Konzentrationsbestimmung	UV5Nano ( <i>Mettler Toledo</i> )
Thermoschüttler	Thermomixer 5436 ( <i>Eppendorf</i> )
Ultraschall-Homogenisierer	Sonifier 250 ( <i>Branson</i> )
Vortexer	Vortex Mixer 7-2020 ( <i>neoLab</i> )
Waagen	L 2200 S ( <i>Sartorius</i> ) TP-3002 ( <i>Denver Instrument</i> )
Wasserbad	W200 ( <i>Memmert</i> ) Thermostatic Water Bath WBS ( <i>neoLab</i> )
Wasserbadschüttler	Aquatron ( <i>INFORS HT</i> )
Zentrifugen	Biofuge® pico ( <i>Heraeus</i> ) 5810 R ( <i>Eppendorf</i> ) 5415D ( <i>Eppendorf</i> ) MiniSpin® ( <i>Eppendorf</i> ) Mini Star D-6020 ( <i>neoLab</i> ) Universal 320 ( <i>Hettich</i> )

## 2.10 Software

Eine Übersicht über die Software, die für Auswertungen, molekulares Docking, Illustrationen oder andere Zwecke genutzt wurde, befindet sich in Tabelle 16.

**Tabelle 16: Übersicht über die verwendete Software inklusive Herstellerangabe.**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
ACD/ChemSketch 2019.2.0	<i>Advanced Chemistry Development, Inc.</i>
AutoDock Vina	<i>The Scripps Research Institute (Trott &amp; Olson, 2010)</i>
ChemDraw Professional 18.0.0.231	<i>PerkinElmer Informatics, Inc.</i>
GraphPad Prism 8	<i>GraphPad Software, Inc.</i>
Inkscape 0.92	<i>GNU General Public License, Free Software Foundation, Inc.</i>
MGLTools (Molecular Graphics Laboratory) AutoDockTools Version 1.5.7 Python Molecular Viewer 1.5.7 Vision 1.5.7	<i>The Scripps Research Institute</i>
Microsoft Office Professional Plus 2016	<i>Microsoft Corporation</i>
MO.Affinity Analysis v2.3	<i>NanoTemper Technologies GmbH</i>
NT Analysis 1.5.37	<i>NanoTemper Technologies GmbH</i>
Protein Thermal Shift™ Software v1.4	<i>Applied Biosystems®</i>
SnapGene® 4.1.9	<i>GSL Biotech LLC</i>
The PyMOL Molecular Graphics System 2.3.3	<i>Schrödinger, LLC.</i>
UCSF Chimera Version 1.13.1	<i>The Regents of the University of California</i>
Unicorn Analysis Module 5.3	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>

## 3 Methoden

### 3.1 Sterilisation von Materialien und Lösungen

Hitzebeständige Feststoffe wie Glas oder Plastikmaterialien sowie Flüssigmedien oder bidestilliertes demineralisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) wurden durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Nicht hitzebeständige Puffer wurden mit den Spritzenvorsatzfiltern Filtopur (0,2 µm oder 0,45 µm Porenweite, *Sarstedt*) oder den Flaschenaufsatzfiltern Filtopur BT50 (500 mL, 0,2 µm, *Sarstedt*) entsprechend des gewünschten Sterilitätsgrades sterilfiltriert.

### 3.2 Nukleinsäure-Methoden

Die Nukleinsäure-Methoden behandeln die in dieser Arbeit angewendeten gentechnischen Methoden der Klonierung, darunter u. a. die Amplifikation, Mutation, Quantifizierung, Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren.

#### 3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1984 von KARY MULLIS entwickelte Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragments (*Saiki et al.*, 1985).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurde der 2× Phusion™ High-Fidelity PCR Mastermix (*Thermo Scientific*) verwendet, der bereits die Phusion-DNA-Polymerase, dNTPs sowie Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) beinhaltet. Dieser wurde zu einem Ansatz bestehend aus dem Primerpaar und dem DNA-Templat hinzugegeben. Zur Steigerung der Effizienz wurde zusätzlich Magnesiumchlorid hinzugefügt. Der PCR-Ansatz wurde auf Eis pipettiert und die PCR-Reaktion im Thermocycler TOne 96G oder T1 Thermocycler (*Biometra*) gestartet (vgl. Tabelle 17 und Tabelle 18). Die *Annealing*-Temperatur der Primer wurde mit SnapGene® (*GSL Biotech LLC*) kalkuliert, wobei der Algorithmus auf dem Prinzip basiert, das SANTALUCIA und HICKS 2004 publiziert haben (*SantaLucia & Hicks* 2004). Nach vollendeter PCR-Reaktion wurde die Amplifikation mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bei erfolgreicher Amplifikation wurde der PCR-Ansatz aus dem Agarosegel extrahiert (vgl. Kapitel 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion).

Tabelle 17: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der Polymerase-Kettenreaktion.

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	finale Konzentration
2× Phusion™ High-Fidelity PCR Mastermix ( <i>Thermo Scientific</i> )	10	1×
DNA-Templat (10 ng/ $\mu\text{L}$ )	1	10 ng
Forward-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	1	0,5 $\mu\text{M}$
Reverse-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	1	0,5 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub> (5 mM)	2	500 $\mu\text{M}$
ddH <sub>2</sub> O	5	-
	$\Sigma$ 20	

Tabelle 18: PCR-Reaktionszyklen mit Angabe der Temperaturen und Inkubationszeiten für die Programmierung des Thermocyclers.

Zyklusphase	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initialisierung	98 $^{\circ}\text{C}$	30 s	1
Denaturierung	98 $^{\circ}\text{C}$	10 s	
Annealing	60 $^{\circ}\text{C}$ – 72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	30
Elongation	72 $^{\circ}\text{C}$	30 s/kb	
Termination	72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
	4 $^{\circ}\text{C}$	$\infty$	-

### 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Zur Kontrolle der Amplifikation eines DNA-Fragments mittels PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Diese ermöglicht die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten anhand ihrer Größe und erlaubt so unter anderem die gezielte Isolierung und Aufreinigung von PCR-Produkten (*Berg et al., 2018*).

Je nach Größe des zu erwartenden PCR-Produkts wurden 0,7 %ige – 1 %ige (w/v) Agarosegele gegossen (vgl. Tabelle 19). Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in TBE-Puffer aufgekocht, das Gemisch auf etwa 50  $^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und anschließend mit 0,00004 % (v/v) GelRed® Nucleic Acid Stain (*Biotium*), Ethidiumbromid (*Carl Roth*) oder HDgreen™ DNA-Dye (*iNTAS*) versetzt. Diese Lösung wurde in eine Agarose-Gelelektrophoresekammer Perfect Blue™ Mini S oder L (*PEQLAB*) gegossen und für etwa 30 Minuten auspolymerisiert. Sodann wurden die Taschen mit den zu untersuchenden DNA-Proben oder PCR-Produkten beladen und die Elektrophorese durch Anlegen einer elektrischen Stromstärke von 110 mA gestartet. Je nach gewünschtem Auftrennungsgrad wurde die Elektrophorese für 30 bis 50 Minuten ausgeführt und bei Bedarf mit einer Gelextraktion mit dem Monarch® DNA Gel Extraction Kit (*New England Biolabs*) oder dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega*) gemäß Herstellerangaben fortgeföhren.



**Tabelle 19: Übersicht der Agarosekonzentration im Gel in [%] (w/v) zur Auftrennung von linearisierten DNA-Fragmenten verschiedener Größen in [bp].**

Agarosekonzentration im Gel [%] (w/v)	Länge des linearisierten DNA-Fragments [bp]
0,5	1.000 - 30.000
0,7	800 - 12.000
1,0	500 - 7.000
1,2	400 - 6.000
1,5	200 - 3.000
2,0	100 - 2.000

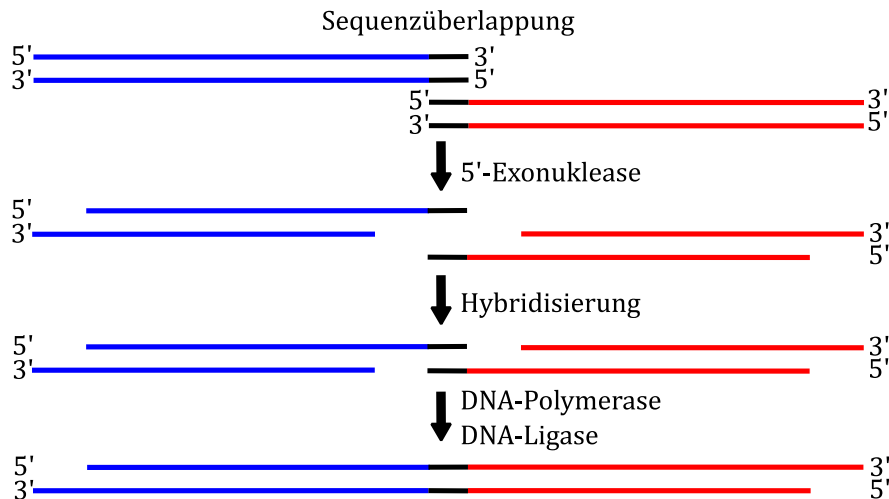
### 3.2.3 Gibson Assembly®

Eine Klonierungsstrategie, die in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat, stellt die Gibson Assembly®-Reaktion dar. Diese bietet - neben dem mehrschrittigen, klassischen Restriktionsverdau - die Möglichkeit, mehrere DNA-Fragmente in nur einem Schritt zusammenzufügen. Hierbei wird von den Aktivitäten einer 5'-Exonuklease, einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase Gebrauch gemacht (*Gibson et al., 2009*). Als Ausgangsprodukt werden linearisierte DNA-Fragmente mit Sequenzüberlappungen, die mithilfe einer PCR-Reaktion generiert werden können, eingesetzt (vgl. Abbildung 12). Im Anschluss an die Gibson Assembly®-Reaktion wird das erhaltene rekombinante Plasmid über eine Transformation (siehe Kapitel 3.2.8 Transformation) in Bakterienzellen (hier *E. coli* DH5 $\alpha$ ) gebracht und amplifiziert.

Die Primer für die Gibson Assembly®-Reaktion wurden mithilfe der Klonierungssoftware SnapGene® (*GSL Biotech LLC*) designt. Der Reaktionsansatz für die PCR-Reaktion zur Generierung der benötigten Überhänge kann Kapitel 3.2.1 entnommen werden. Für die Gibson Assembly®-Reaktion wurden linearisierter Vektor und Fragment im Verhältnis 1 : 3 zusammen mit dem Gibson Assembly® Master Mix (*NEB*) gemäß Herstellerangaben auf Eis pipettiert (vgl. Tabelle 20). Dann erfolgte eine Inkubation im Thermocycler bei 50 °C für 20 Minuten, ehe die Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen durchgeführt wurde.

**Tabelle 20: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Gibson Assembly®-Reaktion.**

Komponente	Menge
linearisierter Vektor	100 ng
Fragment	300 ng
Gibson Assembly® Master Mix ( <i>New England Biolabs</i> )	10 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 $\mu$ L
	$\Sigma$ 20 $\mu$ L

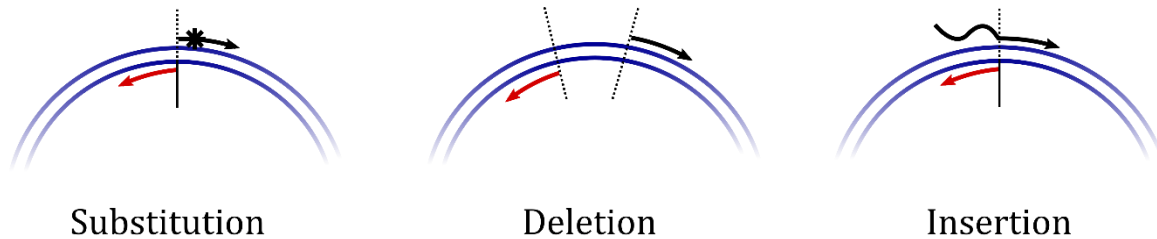


**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Gibson Assembly®-Reaktion.** Zuerst werden mithilfe einer PCR-Reaktion Sequenzüberlappungen generiert und die Ausgangsfragmente linearisiert. Im nächsten Schritt werden die 5'-Enden durch die 5'-Exonuklease gekürzt, wodurch eine Hybridisierung der Fragmente möglich wird. Die Elongation der Fragmente wird mithilfe der DNA-Polymerase bewerkstelligt. Im letzten Schritt werden die Einzelstränge mithilfe der DNA-Ligase ligiert. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (iGEM WHU-China, 2013) erstellt.

#### 3.2.4 Ortsspezifische Mutagenese

Mit der ortsspezifischen Mutagenese (auch ortsgerechtere oder gezielte Mutagenese, engl. *site-directed Mutagenesis*, SDM) können definierte Mutationen - im Speziellen Substitutionen, Deletionen oder Insertionen - an einem beliebigen Plasmid vorgenommen werden (Kunkel, 1985). Dieses Verfahren wurde neben der Gibson Assembly®-Reaktion angewendet, um die für den Dual-Luciferase-Assay verwendeten Konstrukte auf Basis des Vektors pFR\_HCV\_xb zu generieren. Außerdem wurde das für die Aufreinigung von trunkiertem, rekombinantem eIF4A1(19-406) benötigte Konstrukt pET-28a(+)\_eIF4A1(19-406) mittels ortsspezifischer Mutagenese kloniert. Durch speziell designte Primer können die entsprechenden Mutationen über eine PCR-Reaktion an der gewünschten Position eines DNA-Fragments oder Plasmids eingefügt werden.

Die Primer wurden mit der Software SnapGene® (GSL Biotech LLC) konstruiert. Für Substitutionen wurde die zu mutierende Position im *Forward*-Primer durch die gewünschten Nukleotide ersetzt. Der *Reverse*-Primer wurde, komplementär zum DNA-Templat, fortlaufend zum *Forward*-Primer (*back-to-back*) konstruiert. Bei einer Deletion wurde das Primerpaar so designt, dass die zu entfernende Sequenz von den 5'-Enden der beiden Primer flankiert wurde. Für eine Insertion wurde die einzufügende Sequenz an das 5'-Ende des *Forward*-Primers angehängt, der *Reverse*-Primer wurde abermals fortlaufend zum *Forward*-Primer (*back-to-back*) konstruiert (vgl. Abbildung 13) (NEB, o. J.). Für alle Primer wurde eine Schmelztemperatur von etwa 60 °C gewählt.



**Abbildung 13: Strategien der ortsspezifischen Mutagenese.** Die Substitution wird durch Einfügen der gewünschten Nucleotide in den *Forward*-Primer erzielt. Der *Reverse*-Primer wird fortlaufend konstruiert (*back-to-back*), sodass die entstehenden Enden nach Phosphorylierung ligiert werden können. Bei der Deletion wird die zu deletierende Position von den Primern ausgespart. Eine Insertion kann durch Anhängen der gewünschten Nucleotide an das 5'-Ende des *Forward*-Primers erzielt werden. Wie bei der Substitution muss der *Reverse*-Primer fortlaufend konstruiert werden, sodass eine Ligation der Enden nach Phosphorylierung möglich ist. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (NEB, o. J.) erstellt.

Im Anschluss an die PCR-Reaktion erfolgte eine Phosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe, gefolgt von einer Ligation mit *DpnI*-Verdau. Zur Isolierung der Konstrukte wurde eine Transformation in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.5 – 3.2.8).

### 3.2.5 Phosphorylierung

Die Phosphorylierung dient der Übertragung von Phosphatgruppen des Donor-Moleküls ATP auf die 5'-Hydroxygruppe von Nucleinsäure-Fragmenten. Da die 5'-Enden von PCR-Produkten oder synthetisch hergestellten Oligonucleotiden nicht phosphoryliert sind, ist bei der molekularen Klonierung eine Kinase-Behandlung mit der Polynucleotidkinase notwendig, um eine Ligation mit der T4-DNA-Ligase zu ermöglichen (Richardson, 1965). Für den Reaktionsansatz der Phosphorylierung wurden die entsprechenden Komponenten zusammengegeben und für 30 bis 45 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (vgl. Tabelle 21). Zur Inaktivierung der Polynucleotidkinase wurde der Ansatz für 20 Minuten bei 80 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurde mit dem *DpnI*-Verdau fortgefahren.

**Tabelle 21: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Phosphorylierung von PCR-Produkten.**

Komponente	Volumen [ $\mu$ L]
ddH <sub>2</sub> O	7,5
aufgereinigtes PCR-Produkt	8
ATP (10 mM)	2
10 $\times$ PNK-Reaktionspuffer B ( <i>Thermo Scientific</i> )	2
T4 Polynucleotidkinase (10 U/ $\mu$ L) ( <i>Thermo Scientific</i> )	0,5
	$\Sigma$ 20

### 3.2.6 *DpnI*-Verdau

Um die in der PCR-Reaktion eingesetzte Plasmid-DNA zu entfernen, kann ein *DpnI*-Verdau hinzugezogen werden. Bei *DpnI* handelt es sich um eine methylierungssensitive Restriktionsendonuklease, die von der in *E. coli* vorhandenen Desoxyadenosin-Methylase (Dam-Methylase) methylierte Plasmid-DNA spezifisch innerhalb der Sequenz GA↓TC schneidet (Li & Mullins, 2002). Da die Amplifikate einer PCR-Reaktion keine Methylierung an den Adeninbasen innerhalb der GATC-Sequenz aufweisen, werden diese von der Restriktionsendonuklease nicht verdaut.

Für den *DpnI*-Verdau wurde das aus dem Gel aufgereinigte, phosphorylierte PCR-Produkt mit FastDigest™ *DpnI* (Thermo Scientific) und 10× FastDigest™ Puffer (Thermo Scientific) versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert (vgl. Tabelle 22). Im Anschluss wurde das *DpnI*-verdaute PCR-Fragment mit der T4-DNA-Ligase ligiert (vgl. Kapitel 3.2.7).

**Tabelle 22: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den *DpnI*-Verdau.**

Komponente	Volumen [μL]
aufgereinigtes, phosphoryliertes PCR-Produkt	20
10× FastDigest™ Puffer	2
FastDigest™ <i>DpnI</i>	0,5
	Σ 22,5

### 3.2.7 Ligation

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die ATP-abhängige Synthese von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphoryl- und 3'-Hydroxygruppen doppelsträngiger DNA. Somit wird die Ligation zweier DNA-Doppelstränge ermöglicht (Lehman, 1974).

Die Ligation wurde im Anschluss an den *DpnI*-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde das phosphorylierte und *DpnI*-verdaute PCR-Produkt mit der T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) (Reaktionsansatz siehe Tabelle 23) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

**Tabelle 23: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Ligation von PCR-Produkten.**

Komponente	Volumen [μL]
phosphoryliertes, <i>DpnI</i> -verdautes PCR-Produkt	5
10× T4-DNA-Ligase-Puffer (Thermo Scientific)	1
T4-DNA-Ligase (5 U/μL) (Thermo Scientific)	0,5
ddH <sub>2</sub> O	auf 10
	Σ 10

Nach erfolgter Ligation wurde eine Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen angeschlossen.

### 3.2.8 Transformation

Das Einbringen von fremder Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Dieses Verfahren dient vor allem dem Vermehrungsprozess von Plasmid-DNA (Schartl *et al.*, 2009). Die gängigste Methode zur Generierung kompetenter Bakterienzellen ist die Calciumchlorid-Methode, aber auch mit Elektroporation ist die Erzeugung von Kompetenz möglich (Mülhardt, 2009).

In dieser Arbeit wurde die Calciumchlorid-Methode zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen angewandt (Mülhardt, 2009). Die chemisch-kompetenten Zellen wurden in 180  $\mu$ L Aliquots bei -80 °C aufbewahrt. Die Transformation wurde mit 60  $\mu$ L der kompetenten Zellen durchgeführt. Dafür wurden diese zunächst kurz auf Eis aufgetaut. Dann wurden 2  $\mu$ L des Ligationsansatzes oder 40 ng Plasmid-DNA hinzugegeben und es folgte eine Inkubation auf Eis für 20 Minuten. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden durchgeführt. Um die Bakterien zu schonen, wurden die Zellen anschließend erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900  $\mu$ L LB-Medium wurde der Ansatz für 1 Stunde im Heizschüttler bei 37 °C geschüttelt. Vor dem Ausplattieren auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums wurden die Zellen für 2 Minuten bei 5.000 rpm pelletiert und das Pellet in 100  $\mu$ L LB-Medium resuspendiert. Die LB-Agarplatte wurde dann für 16 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag auf das Wachstum von Kolonien inspiziert. Die Überprüfung der Kolonien erfolgte durch Ansetzen einer Kolonie-PCR-Reaktion (vgl. Kapitel 3.2.9), ehe eine Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA in Auftrag gegeben wurde.

### 3.2.9 Kolonie-PCR

Mit der Kolonie-PCR können bei der Transformation erhaltene Kolonien auf Aufnahme des korrekten *Inserts* bzw. Plasmids überprüft werden. Hierfür werden die Bakterienkolonien kurz erhitzt, um die Zellen aufzuschließen und so die darin enthaltene DNA für die PCR-Reaktion zugänglich zu machen.

Die in der Kolonie-PCR zu testenden Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und zum Animpfen mehrmals in 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O getaucht. Für die spätere Verwendung wurde mit der gleichen Pipettenspitze ein Ausstrich auf einer LB-Agarplatte gemacht, der für das Animpfen von Flüssigkulturen verwendet wurde. Das mit der Kolonie angeimpfte ddH<sub>2</sub>O wurde für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurde 1  $\mu\text{L}$  in einem PCR-Mikroreaktionsgefäß (*Sarstedt*) vorgelegt, zu dem 19  $\mu\text{L}$  des Kolonie-PCR-Mastermixes, bestehend aus den in Tabelle 24 aufgelisteten Komponenten, hinzupipettiert wurden.

**Tabelle 24: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Kolonie-PCR.**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Kolonie (in 50 $\mu\text{L}$ ddH <sub>2</sub> O)	1
Forward-Primer (10 $\mu\text{M}$ ) pFR_seq_fwd	1
Reverse-Primer (10 $\mu\text{M}$ ) pFR_univ_rev	1
5× HOT CYTOPol® Blend Master Mix (10 mM MgCl <sub>2</sub> ) ( <i>Cytogen</i> )	4
ddH <sub>2</sub> O	auf 20
	$\Sigma$ 20

Die Kolonie-PCR wurde gemäß der in Tabelle 25 angegebenen Parameter durchgeführt und der Erfolg auf einem Agarosegel überprüft.

**Tabelle 25: Einstellungen des Thermocyclers bei der Kolonie-PCR.**

Zyklusphase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing	57 °C	20 s	30
Elongation	72 °C	20 s	
Termination	72 °C	1 min	1
	16 °C	$\infty$	-

#### 3.2.10 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation dient der Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen. Das Prinzip beruht auf der selektiven alkalischen Denaturierung von chromosomaler DNA, wohingegen die zu isolierende zirkuläre Plasmid-DNA doppelsträngig bleibt. Durch anschließende Neutralisation mit saurem Natriumacetat fällt die chromosomale DNA als unlösliches Aggregat aus und kann so von der sich in Lösung befindlichen Plasmid-DNA abgetrennt werden. Zudem sorgt die Zugabe des sauren Natriumacetats dafür, dass Proteine und andere Zellbestandteile präzipitieren.

Durch Zentrifugation kann die Plasmid-DNA schließlich isoliert werden und der Reinheitsgrad durch Waschen mit Ethanol erhöht werden (*Birnboim & Doly, 1979*).

Die Minipreps wurden unter Zuhilfenahme des GeneJET™ Plasmid-Miniprep-Kits (*Thermo Scientific*) gemäß Herstellerangaben durchgeführt, für Maxipreps wurde das Plasmid DNA purification NucleoBond® Xtra Kit (*Macherey-Nagel*) genutzt. Die Elution erfolgte mit den beiliegenden Elutionspuffern in 50 µL (Miniprep) bzw. 250 µL (Maxiprep) Elutionsvolumen. Vor der Verwendung und Lagerung der isolierten Plasmid-DNA bei -20 °C wurde die DNA-Konzentration und -Reinheit am Spektralphotometer UV5Nano (*Mettler Toledo*) bestimmt.

### 3.2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung nach FREDERICK SANGER (auch als Sanger- oder Didesoxymethode bezeichnet) ermöglicht die Bestimmung der Nukleotidsequenz eines DNA-Fragments (*Sanger & Coulson, 1975*).

Die Sequenzierungen wurden von *Microsynth Seqlab* (Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurden 480 – 1.200 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 12 µL mit 3 µL des entsprechenden Primers ( $C_{\text{Primer}}$ : 2 µM) versetzt und die Sequenzierung beauftragt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit der Software SnapGene® (*GSL Biotech LLC*) überprüft und ausgewertet.

### 3.2.12 Kryokonservierung von Bakterienzellen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Glycerin-Stocks angefertigt. Die Zugabe von Glycerin verhindert, dass die Zellen beim Einfrieren durch die Bildung von Eiskristallen beschädigt werden. Befinden sich die Zellen zum Zeitpunkt des Wegfrierens in der exponentiellen Wachstumsphase, ist außerdem ein schnelles Anwachsen bei erneuter Inokulation gewährleistet (*Mülhardt, 2009*).

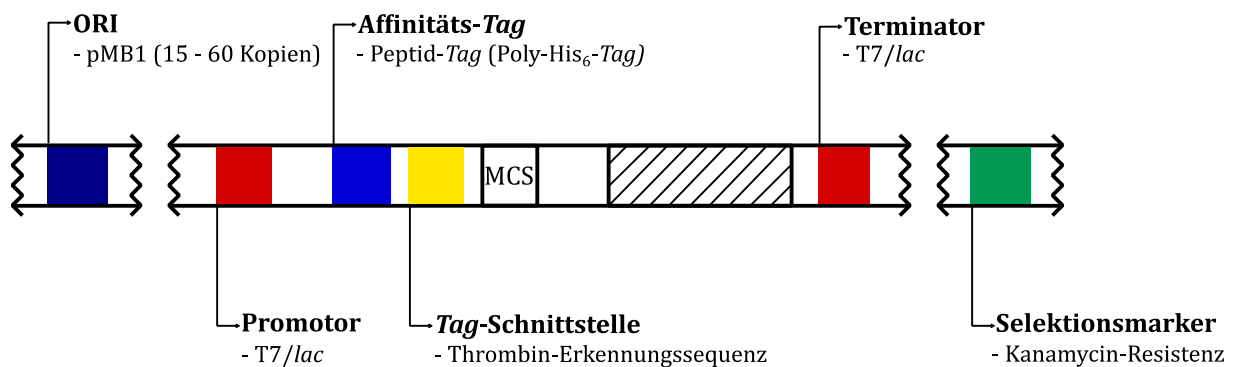
Für die Herstellung von Glycerin-Stocks wurden 2 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in einem Reagenzglas mit der zu konservierenden Bakterienkolonie inokuliert. Nach einer Inkubation für 5 – 6 Stunden bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator (3303, *GFL*) wurden 500 µL der Kultur in ein Kryoröhrchen (CryoTube™ Vials, 1,8 mL (*Thermo Fisher Scientific*)) mit 500 µL autoklaviertem Glycerin überführt. Nach kurzem Vortexen wurde das Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.3 Protein-Methoden

Die Synthese rekombinanter Proteine in einem geeigneten Expressionssystem wie *E. coli* sowie die Möglichkeit, diese in großem Maßstab zu isolieren und aufzureinigen, ist für die biochemische Charakterisierung von Proteinen und die Entwicklung proteinbasierter Assays essentiell (Rosano & Ceccarelli, 2014). Im Folgenden werden die Grundlagen ebenso wie die Durchführung der Genexpression bis hin zum gereinigten Protein sowie die in dieser Arbeit genutzten Proteinassays zur biochemischen Charakterisierung von eIF4A1 erläutert.

#### 3.3.1 Rekombinante Überexpression und Zellernte

Als Überexpression wird die erhöhte Expressierung eines Gens bezeichnet, die schlussendlich in einer erhöhten Proteinproduktion resultiert. Hierfür werden spezielle Expressionsvektoren benötigt, in die das zu exprimierende Gen kloniert wird. Die Expression dieser Vektoren wird dann in einem geeigneten Wirtsorganismus induziert, wodurch die Transkription und Translation des gewünschten Gens angeregt wird. Das Resultat ist eine Anreicherung des rekombinanten Proteins in der Wirtszelle, das nach Isolation und Aufreinigung für Proteinfunktionsanalysen oder andere wissenschaftliche oder industrielle Zwecke genutzt werden kann (Spektrum-Akademischer-Verlag, 1999). Für die Überexpression von *eIF4A1* wurde der Expressionsvektor pET-28a(+) verwendet.



**Abbildung 14: Schematischer Aufbau des verwendeten Expressionsvektors pET-28a(+).** Der Expressionsvektor verfügt über einen pMB1-Replikationsursprung (ORI). Das Expressionssystem basiert auf dem T7/lac-System. Als Affinitäts-Tag dient ein Poly-Histidin<sub>6</sub>-Tag, der über eine Thrombin-Schnittstelle abgespalten werden kann. Die Selektion erfolgt über eine Kanamycin-Resistenz. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Rosano & Ceccarelli, 2014) erstellt.

Hierbei handelt es sich um ein Plasmid mit einer mittleren Kopienzahl mit einem pMB1 Replikationsursprung (*origin of replication*, ORI). Zudem verfügt der Vektor über das T7-



Expressionssystem, das heißt, dass Promotor und Terminator auf die T7-RNA-Polymerase abgestimmt sind (Rosano & Ceccarelli, 2014). Die für die Transkription benötigte T7-RNA-Polymerase wird über den Wirt, den *E. coli*-Stamm BL21(DE3), geliefert. Dieser Stamm verfügt über den  $\lambda$ DE3-Prophagen, der für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors codiert, was die Synthese der T7-Polymerase durch Induktion mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) ermöglicht (Daegelen et al., 2009), (Noll et al., 2013). Als Affinitäts-Tag wurde ein N-terminaler Poly-Histidin<sub>6</sub>-Tag an eIF4A angefügt, der über eine im Vektor vorhandene Thrombin-Erkennungssequenz abgespalten werden kann. Ein Kanamycin-Resistenzgen diente der Selektion (siehe Abbildung 14).

Die Überexpression von *eIF4A1* wurde in Anlehnung an die Publikation von S. IWASAKI und Kollegen durchgeführt (Iwasaki et al., 2019). Gestartet wurde mit der Kultivierung einer Übernachtskultur. Hierfür wurden 50 mL LB-Medium, versetzt mit Antibiotikum (50 mg/mL Kanamycin), mit *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die das Plasmid pET-28a(+)\_eIF4A1, später pET-28a(+)\_eIF4A1(19-406), tragen, inokuliert. Die Übernachtskultur wurde für 16 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und am nächsten Tag jeweils 5 mL der Übernachtskultur in Schikanekolben mit 500 mL LB-Medium (+Kan50) überführt. Die Kultivierung der 1:100-Verdünnung wurde bei gleichen Bedingungen (200 rpm, 37 °C) fortgesetzt. Währenddessen wurde das Bakterienwachstum durch photometrische Bestimmung der OD<sub>600 nm</sub> kontrolliert. Bei Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 wurden die Bakterienkulturen in einen Wasserschüttler überführt, der auf 15 °C vortemperiert war. Gleichzeitig wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von 0,5 mM IPTG die Überexpression induziert. Diese wurde bei 15 °C und 200 rpm für 18 – 20 Stunden durchgeführt. Zum Ernten der Zellen wurden die Kulturen für 20 Minuten bei 4 °C und 4.000 × g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in wenig LB-Medium resuspendiert, in ein 50 mL Falcon™-Röhrchen überführt und erneut für 10 Minuten bei 4 °C und maximal 6.000 × g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Zellaufschluss (vgl. Kapitel 3.3.2) bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle der Überexpression wurden 1 mL-Proben der Bakterienkultur vor Induktion sowie nach Induktion auf einem SDS-Gel analysiert (vgl. Abbildung B.2 im Anhang). Für einen besseren Vergleich wurden die Proben entsprechend ihrer OD verdünnt (OD<sub>600 nm</sub> = 0,5 entspricht einer Resuspension des Pellets in 50  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, OD<sub>600 nm</sub> = 2 entspricht einer Resuspension in 200  $\mu$ L).

### 3.3.2 Zellaufschluss

Um das gewünschte Protein nach der Überexpression zu isolieren, müssen die Bakterienzellen zuerst aufgeschlossen werden. Dies kann sowohl mechanisch durch Homogenisierung oder mit einer Glasperlenmühle als auch enzymatisch mit Lysozym oder chemisch durch Zugabe von EDTA oder Toluol geschehen (*Rehm & Letzel, 2016*).

Der Zellaufschluss der *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurde durch Sonifikation bewerkstelligt. Die Bakterienpellets wurden auf Eis aufgetaut und pro Pellet einer 500 mL-Kultur in 10 mL Ni-NTA-Resuspensionspuffer (vgl. Tabelle 2) gelöst. Zu dem resuspendierten Pellet wurde Lysozym (finale Lysozymkonzentration: 0,5 mg/mL), eine Spatelspitze DNaseI (*Roche*) sowie eine Tablette des cOMplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktails (*Roche*) hinzugegeben und die Suspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Am Ultraschall-Homogenisierer Sonifier 250 (*Branson*) wurde der Zellaufschluss mit jeweils 60 Impulsen mit einem Tastgrad von 50 % und einem Output von 5 insgesamt drei bis vier Mal wiederholt. Damit die Zellsuspension nicht erhitzt, wurde dieser Vorgang in einem Eisbad durchgeführt. Zudem wurde nach jedem der drei Zyklen für zwei Minuten pausiert. Zur Abtrennung der Zellbestandteile wurde die Suspension für 20 Minuten bei 4 °C und 10.000 × g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (*Sarstedt*) filtriert, ehe mit der Nickel-Affinitätschromatographie fortgefahren wurde. Zur Überprüfung der Effizienz des Zellaufschlusses wurden eine Probe des Lysats sowie des Pellets nach Zellaufschluss auf ein SDS-Gel aufgetragen und der Anteil an eIF4A1 bzw. eIF4A1(19-406) in der löslichen Fraktion untersucht (vgl. Abbildung B.4 im Anhang).

### 3.3.3 Nickel-Affinitätschromatographie

Mit der Affinitätschromatographie lassen sich Proteine aufgrund ihrer Affinität zu bestimmten chemischen Gruppen aufreinigen. Die Nickel-Affinitätschromatographie zählt zu der Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), bei der bestimmte Aminosäuregruppen kovalent an Metallionen binden. Im speziellen Fall der Nickel-Affinitätschromatographie fungiert eine an das Protein fusionierte Polyhistidinsequenz als Anker, der an auf einer Säulenmatrix immobilisierte Nickel(II)-Ionen bindet. So wird das aufzureinigende Protein an der Säule festgehalten, während andere Proteine oder Zellbestandteile die Säule passieren. Nach einigen Waschschritten kann das über den

His<sub>6</sub>-Tag gebundene Protein durch Zugabe von Imidazol, das das Histidin aus dem mit den Nickel(II)-Ionen gebildeten Chelatkomplex verdrängt, von der Säule eluiert werden. Mit der Nickel-Affinitätschromatographie von eIF4A1 bzw. eIF4A1(19-406) wurde direkt nach dem Zellaufschluss begonnen. Grundsätzlich wurden sämtliche Puffer vor Nutzung der ÄKTAexplorer™ bzw. der ÄKTApurifier™ (Amersham Biosciences) sterilfiltriert. Zuerst wurde die HisTrap™ HP-Säule (1 mL oder 5 mL, GE Healthcare) gemäß Herstellerangaben angeschlossen und mit 5 Säulenvolumen (*column volumes*, CV) ddH<sub>2</sub>O gespült. Dann wurde sie mit 5 - 10 CV Ni-NTA-Waschpuffer (Iwasaki et al., 2019) bei einer Flussrate von 1 mL/min (1 mL Säule) bzw. 2 – 5 mL/min (5 mL Säule) äquibriert. Die Beladung der Säule mit dem filtrierten Lysat nach Zellaufschluss erfolgte bei 0,5 mL/min bzw. 1 mL/min mit Ni-NTA-Waschpuffer über einen zuvor mit der Probe beladenen 50 mL Superloop (GE Healthcare) oder sukzessive durch Injektion der Probe in einen 2 mL Sample loop (GE Healthcare). Um Zellbestandteile und unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde mit mindestens 10 CV Ni-NTA-Waschpuffer gespült, bis eine stabile Basislinie erreicht wurde. Sowohl der Durchfluss während des Beladens der Säule als auch die Waschfraktionen wurden aufgefangen und auf einem SDS-Gel analysiert (vgl. Abbildung B.4 im Anhang). Die Elution von eIF4A1(19-406) erfolgte durch Anlegen eines linearen Imidazolgradienten über 15 – 20 CV bei einer Flussrate von 1 mL/min bzw. 2 – 5 mL/min mit Ni-NTA-Elutionspuffer (Iwasaki et al., 2019). Die Elutionsfraktionen wurden in 2 – 5 mL-Fraktionen aufgefangen und auf einem SDS-Gel analysiert (vgl. Abbildung B.3 und Abbildung B.4 im Anhang). Zur Regeneration der HisTrap™ HP-Säule wurde diese entsprechend der Herstellerangaben gespült und in 20 %iger Ethanollösung bei Raumtemperatur gelagert. Die identifizierten Proteinfractionen wurden wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben dialysiert, um das Imidazol zu entfernen.

### 3.3.4 Dialyse

Zum Wechseln eines Puffers oder zur Entfernung von Salzen oder anderen Pufferbestandteilen wurden die entsprechenden Proteinfractionen dialysiert. Das Prinzip der Dialyse beruht auf semipermeablen Membranen, die Salze und niedermolekulare Stoffe entsprechend des Ausschlussvolumens (*cut-off*) hindurch diffundieren lassen, während größere Moleküle wie Proteine die Membran nicht passieren können (Berg et al., 2018). Das Volumen des Dialysepuffers sollte etwa dem 200-fachen Volumen der zu

dialysierenden Proteinprobe entsprechen, außerdem verbessert mehrfaches Wechseln des Puffers den Dialyseerfolg (*Hemschemeier & Maelicke, o. J.*).

Die Dialyse von eIF4A1 bzw. eIF4A1(19-406) fand nach der Nickel-Affinitätschromatographie zur Entfernung des Imidazols sowie für sämtliche Pufferwechsel oder Entsalzungen Anwendung. Begonnen wurde mit dem Aktivieren des Dialyseschlauches (ZelluTrans, MWCO: 12 – 14 kDa, *Carl Roth*), das durch zweiminütiges Aufkochen des Schlauches in ddH<sub>2</sub>O geschah. Dann wurde der Dialyseschlauch in 1 L Dialysepuffer äquilibriert. Damit der Dialyseschlauch maximal zu 2/3 befüllt ist, wurden nicht mehr als 5 mL der zu dialysierenden Proteinfractionen in den äquilibrierten Dialyseschlauch gegeben. Die Proteinfractionen wurden so für 16 – 20 Stunden bei 4 °C unter leichtem Rühren dialysiert. Der Puffer wurde währenddessen mindestens zweimal gewechselt, um den Entsalzungseffekt zu maximieren.

### 3.3.5 Entfernung des His<sub>6</sub>-Tags

Zur Entfernung des His<sub>6</sub>-Tags wurde eIF4A1(19-406) mit Thrombin verdaut. Thrombin gehört zu den Serinproteasen und spaltet die Peptidbindung zwischen Arginin und Glycin innerhalb der Peptidsequenz Leu-Val-Pro-Arg-↓-Gly-Ser (*Waugh, 2011*). Ein Vorteil von Thrombin gegenüber anderen Proteasen ist die geringe unspezifische Spaltungsrate sowie der Einsatz in katalytischen Mengen (Verhältnis 1 : 2000 Thrombin : Protein). Da Reduktionsmittel die Aktivität von Thrombin inhibieren, sollten diese vor dem Verdau durch Dialyse entfernt werden (*Novagen, 1998*).

Die Thrombin-Spaltung des His<sub>6</sub>-Tags von eIF4A1(19-406) wurde im Anschluss an die Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Hierfür wurde eIF4A1(19-406), wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, von Ni-NTA-Waschpuffer gegen Thrombin-Cleavage-Puffer dialysiert. Nach Bestimmung des Proteingehalts mit dem UV5Nano Photometer (*Mettler Toledo*) wurde pro Milligramm Protein eine Einheit Thrombin (*GE Healthcare*) (1 Unit/mg) eingesetzt. Die mit Thrombin versetzten Proteinfractionen wurden für 24 Stunden bei 4 °C im Kühlraum inkubiert. Dann wurde die Reaktion entweder durch Zugabe von 1 mM PMSF gestoppt oder eine Affinitätschromatographie zur Entfernung des Thrombins angeschlossen. Zur Kontrolle des Spaltungserfolgs wurde ein Aliquot des dialysierten Proteins vor und nach Thrombinzugabe entnommen und auf einem SDS-Gel untersucht (vgl. Abbildung B.5 im Anhang). Zur Abtrennung des Thrombins und des abgespaltenen His<sub>6</sub>-Tags wurde mit der Heparin-Affinitätschromatographie fortgefahren.

### 3.3.6 Heparin-Affinitätschromatographie

Die Grundlage der Heparin-Affinitätschromatographie bilden die hohen anionischen Ladungen der Sulfatgruppen des Heparins, weshalb sie neben der Affinitätschromatographie auch zur Kationenaustauscher-Chromatographie gezählt werden kann (Bolten *et al.*, 2018). Das lineare Polysaccharid imitiert wegen der zahlreichen an Stickstoff- oder Sauerstoffatome gebundenen, negativ geladenen Sulfatgruppen das Phosphodiesterückgrat einer Nukleinsäure und ermöglicht somit die Interaktion mit Nukleinsäure-bindenden Proteinen. Die Elution erfolgt über einen Salzgradienten, wobei die individuelle Kombination aus Affinität und Ionenaustausch eines jeden Proteins gewährleistet, dass auch Proteine mit kleinsten Unterschieden voneinander getrennt werden können (GE-Healthcare, 2007).

Die Heparin-Affinitätschromatographie wurde im Anschluss an den Thrombin-Verdau vollzogen, um den His<sub>6</sub>-Tag und das Thrombin von den Proteinfraktionen mit eIF4A1(19-406) abzutrennen. Nach Äquilibrierung der HiTrap™ Heparin HP-Säule (1 mL oder 5 mL, GE Healthcare) mit mindestens 10 CV Thrombin-Cleavage-Puffer (Salzgehalt: 150 mM KCl) wurde die Säule mit der Proteinprobe mit einer Flussrate von 0,5 mL/min (1 mL Säule) bzw. 1 – 2 mL/min (5 mL Säule) gemäß Herstellerangaben beladen. Gewaschen wurde mit Thrombin-Cleavage-Puffer, bis eine stabile Basislinie erreicht wurde, mindestens jedoch über 10 CV. Sowohl der Durchfluss beim Beladen der Säule als auch die Waschfraktionen wurden aufgefangen und auf einem SDS-Gel analysiert (vgl. Abbildung B.7 im Anhang). Zur Elution von eIF4A1(19-406) wurde ein linearer Kaliumchlorid-Gradient angelegt, der bei einer Flussrate von 1 mL/min (1 mL Säule) bzw. 2 – 5 mL/min (5 mL Säule) über 10 CV von 150 mM KCl bis 1 M KCl mit Heparin-Elutionspuffer aufgebaut wurde und für weitere 10 CV aufrecht erhalten wurde. Die Elutionsfraktionen wurden in 2 mL- bzw. 5 mL-Fraktionen gesammelt und ebenfalls auf einem SDS-Gel analysiert (vgl. Abbildung B.6 und Abbildung B.7 im Anhang). Danach wurde die HiTrap™ Heparin HP-Säule gemäß der Herstellerangaben gespült und in 20 %iger Ethanollösung bei Raumtemperatur gelagert. Zum Entsalzen der identifizierten Proteinfraktionen wurde eine Dialyse gegen Storage-Puffer (Iwasaki *et al.*, 2019) im Anschluss an die Heparin-Affinitätschromatographie durchgeführt.

### 3.3.7 Protein-Massenspektrometrie

Als Qualitätskontrolle des Aufreinigungserfolges, zur Überprüfung der *Affinitäts-Tag*-Spaltung oder zum Nachweis von posttranslationalen Modifikationen kann die Proteinmasse unter denaturierenden Bedingungen bestimmt werden. Dabei wird das Protein über eine RP-HPLC-Säule unter denaturierenden Bedingungen entsalzt und mittels Electrospray-Ionisation (ESI) ionisiert. Das ionisierte Protein kann dann mit hochauflösender Massenspektrometrie vermessen werden, wobei die Massengenauigkeit bei einem 100 kDa-Protein i.d.R. eine maximale Abweichung von 1 Da aufweist. Durch Dekonvolution kann aus der erhaltenen Ladungsserie (etwa 1 Ladung pro 1 kDa) die Proteinmasse berechnet werden und mit dem zu erwartenden Molekulargewicht abgeglichen werden (*Serviceabteilung-Massenspektrometrie-und-Elementaranalytik*, o. J.). Die massenspektrometrische Analyse von gereinigtem eIF4A1(19-406) wurde vom Gerätezentrum für Massenspektrometrie und Elementaranalytik des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Es wurden 20 µL einer 5 µM Proteinlösung von eIF4A1(19-406) (Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin) nach Thrombin-Verdau, Heparin-Affinitätschromatographie und Dialyse zur Analyse abgegeben. Die Entsalzung erfolgte mit 1 – 10 µL der Proteinprobe an einem ACQUITY H-Class HPLC-System (*Waters*). Danach wurde das entsalzte Protein mit einem Acetonitril/Methansäure-Gradienten (Puffer A: Wasser/0,05 % Methansäure, Puffer B: Acetonitril/0,045 % Methansäure) bei einer Säulentemperatur von 60 °C und einer Flussrate von 0,1 mL/min in die ESI-Quelle eines Synapt G2Si Massenspektrometers (*Waters*) eluiert. Die detektierten Spektren, in denen Kationen in einem Bereich zwischen 500 – 5000 m/z erfasst werden können, wurden nach einer Basislinienkorrektur gemittelt und dekonvolutiert (vgl. Abbildung B.9 im Anhang) (*Serviceabteilung-Massenspektrometrie-und-Elementaranalytik*, o. J.).

### 3.3.8 HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) bezeichnet ein chromatographisches Trennverfahren zur Reinheits- und Produktkontrolle von Protein- oder Substanzgemischen. Die Auftrennung beruht auf verschiedenen Polaritäten der stationären und mobilen Phase. Dabei wird die zu untersuchende Substanz mit einem Laufmittel durch eine Trennsäule gepumpt und die Retentionszeiten der einzelnen Komponenten bestimmt. Diese können dann mithilfe

eines geeigneten Detektors detektiert und durch Vergleich mit einem bekannten Standard zugeordnet werden. So kann beispielsweise auch eine Konzentrationsbestimmung erfolgen (*Aced & Möckel, Hermann, 1992*).

Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration von neu angesetzten Silvestrol- und CR-31-B-Stammlösungen wurde eine HPLC durchgeführt. Dafür wurde eine Referenzprobe der entsprechenden Verbindung hergestellt, die mit DMSO auf eine Konzentration von 0,1 mg/mL bei einem Volumen von 100 µL eingestellt wurde. Gleichermaßen wurde mit der Probe unbekannter Konzentration oder Reinheit verfahren. Die HPLC wurde im Arbeitskreis von PROF. DR. TORSTEN STEINMETZER mit dem HPLC-System Primaide™ (*Hitachi*) durchgeführt. Nach chromatographischer Auftrennung der Referenzprobe wurde direkt im Anschluss die zu untersuchende Probe analysiert. Durch einen Vergleich der Retentionszeiten wurden die Konzentrationen berechnet und die Reinheit anhand des erhaltenen Chromatogramms überprüft.

### 3.3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) nach ULRICH K. LAEMMLI stellt eine Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts dar (*Laemmli, 1970*). Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine komplexiert und erhalten eine konstante negative Ladungsverteilung, wodurch sie sich im elektrischen Feld proportional zu ihrem Molekulargewicht zur Anode orientieren. Das SDS-Gel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen, wobei das Sammelgel wegen seiner grobporigeren Beschaffenheit, des niedrigeren pH-Werts sowie der geringeren Leitfähigkeit eine Konzentrierung der Proteine ermöglicht. Bei Erreichen des Trenngels werden die Proteinkomplexe dann entsprechend ihrer Masse aufgetrennt (*Spektrum-Akademischer-Verlag, 1999*). Die Detektion der Proteine kann durch Anfärben des SDS-Gels mit Coomassie-Brillant-Blau G-250 erfolgen. Neuere Techniken nutzen Trihalogenverbindungen, die die Fluoreszenz von Tryptophanen bei Anregung durch UV-Licht stimulieren (*Bio-Rad, o. J.*).

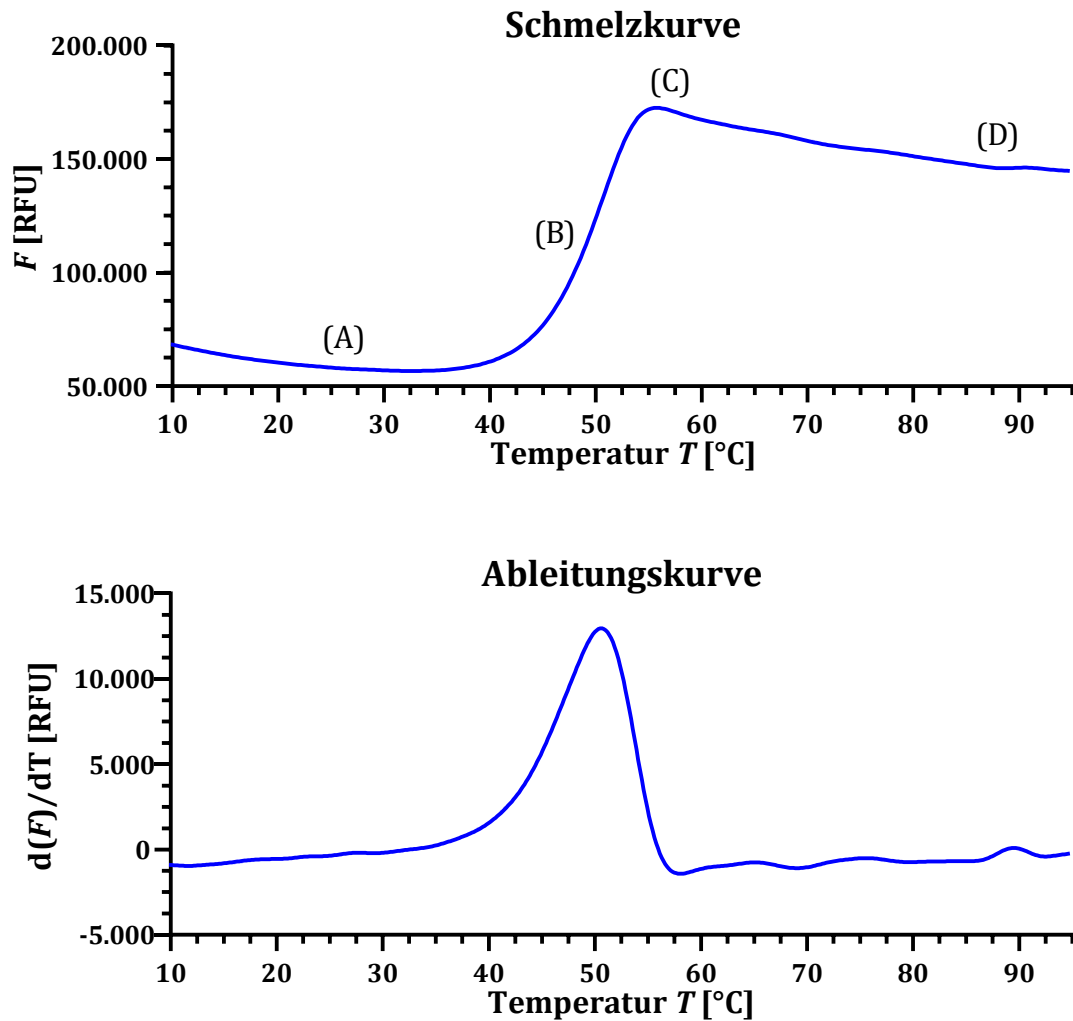
Zur Kontrolle der Expression, des Zellaufschlusses oder der Aufreinigung von eIF4A1 bzw. eIF4A1(19-406) wurden 10 %ige TGX Stain-Free™ FastCast™-Gele (*Bio-Rad*) der Größe 0,75 mm verwendet. Die TGX-Gele (*Tris-Glycine eXtended*) wurden nach Herstellerangaben gegossen und bis zu 4 Wochen in einem feuchten Milieu bei 4 °C

gelagert. Die zu analysierenden Proben wurden mit 4× Laemmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Pro Tasche eines 15-Well-Kamms wurden 5 µL Probe aufgetragen. Das gleiche Volumen wurde ebenfalls für den Proteinstandard Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard (*Bio-Rad*) eingesetzt. Nach Beladung des Gels wurde die Elektrophorese bei 280 V für etwa 25 Minuten durchgeführt. Als Laufpuffer wurde Rotiphorese® 1× SDS-PAGE-Laufpuffer (*Carl Roth*) verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem ChemiDoc™ Imaging System (*Bio-Rad*) bei 5-minütiger Photoaktivierung.

### 3.3.10 Thermal-Shift-Assay (TSA)

Für die thermodynamische Untersuchung von Bindungsaffinitäten wurden Thermal-Shift-Assays (TSA, auch Thermofluor-Assay oder *Differential-Scanning-Fluorimetry*, DSF, genannt) durchgeführt. Diese können sowohl Aufschluss über Protein-Ligand-Interaktionen als auch Protein-Nukleinsäure- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen geben. Außerdem können verschiedene Puffersysteme oder Additive getestet werden und so die Stabilität eines Proteins beeinflusst werden (*Grøftheauge et al., 2015*). Ein großer Vorteil des Thermal-Shift-Assays liegt in dem geringen Materialeinsatz und der schnellen Durchführbarkeit, was ein Hochdurchsatz-Screening ermöglicht. Das Prinzip beruht auf der Messung einer Schmelztemperaturverschiebung des Proteins, die durch einen fluoreszierenden Farbstoff reflektiert wird (*Huynh & Partch, 2016*). Der Farbstoff weist hierbei ein geringes Fluoreszenzsignal in polarer Umgebung auf, während das Fluoreszenzsignal mit zunehmender Hydrophobie der Proteinlösung steigt (*Pantoliano et al., 2001*). Durch Erhitzen der Proteinlösung kommt es zur Entfaltung und schließlich zur Denaturierung des Proteins, wodurch hydrophobe Seitenketten exponiert werden. Mit diesen hydrophoben Seitenketten kann der Farbstoff interagieren, sodass eine Schmelzkurve des denaturierenden Proteins über das steigende Fluoreszenzsignal des Farbstoffs gemessen werden kann. Der Zustand, bei dem die Hälfte des Proteins entfaltet vorliegt, entspricht dem Schmelzpunkt  $T_m$  des Proteins (*Grøftheauge et al., 2015*). Durch Auftragung der ersten Ableitung der Schmelzkurve kann der Schmelzpunkt  $T_m$  des Proteins am Minimum des Peaks abgelesen werden (abhängig von der Auftragung der ersten Ableitung kann der Schmelzpunkt  $T_m$  auch als Maximum dargestellt werden) (*Huynh & Partch, 2016*). Veranschaulicht ist dieses Prinzip in Abbildung 15.





**Abbildung 15: Schematische Darstellung des Thermal-Shift-Assays.** Oben: Auftragung der Fluoreszenzintensität  $F$  [RFU] gegen die Temperatur  $T$  [°C] zur Darstellung der Schmelzkurve. (A): Natives Protein, Farbstoff kann nicht interkalieren (B): Teils denaturiertes Protein, Farbstoff interkaliert mit hydrophoben Seitenketten (C): Vollständig denaturiertes Protein, maximale Fluoreszenzintensität (D): Proteinaggregation und Farbstoffdissoziation. Unten: Auftragung der ersten Ableitung der Fluoreszenzintensität  $d(F)/dT$  [RFU] gegen die Temperatur  $T$  [°C] zur Darstellung der Ableitungskurve. Das Maximum der Ableitungskurve gibt den Schmelzpunkt  $T_m$  des Proteins an. Für die Berechnung der ersten Ableitung wurde die Protein Thermal Shift™ Software v1.4 (Applied Biosystems®) genutzt. Die Abbildung wurde basierend auf eigenen Messwerten in Anlehnung an (Biotium, 2018) erstellt.

Für die Thermal-Shift-Assays wurde der Farbstoff SYPRO® Orange (Sigma-Aldrich) verwendet. In einem ersten Experiment wurde das optimale Verhältnis zwischen Farbstoff und Protein titriert. Diese Parameter wurden für alle weiteren Experimente beibehalten. In Tabelle 26 ist ein Beispiel der Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes aufgelistet. Die einzelnen Komponenten wurden bei Raumtemperatur zusammengegeben, wobei der Farbstoff SYPRO® Orange stets zuletzt hinzugegeben wurde, um zu vermeiden, dass sich beim Mischen hydrophobe Aggregate ausbilden. Für jede Bedingung wurden jeweils drei technische Replikate vermessen.

**Tabelle 26: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Thermal-Shift-Assay.**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	finale Konzentration
eIF4A1(19-406) (100 $\mu\text{M}$ )	1	5 $\mu\text{M}$
RNA (AG) <sub>5</sub> (1 mM Stock)	1	50 $\mu\text{M}$
AMP-PNP (100 mM Stock)	0,2	1 mM
Inhibitor/Ligand (10 mM Stock)	0,2	100 $\mu\text{M}$
SYPRO® Orange Protein Gel Stain	0,3	-
Storage-Puffer nach ( <i>Iwasaki et al.</i> , 2019)	auf 20	-
	$\Sigma$ 20	

Die Messung wurde im QuantStudio3™ Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*) in einer 96-Well Platte durchgeführt. Die zugehörigen Messparameter können in Tabelle 27 eingesehen werden, der Aufbau der Schmelzkurve ist in Tabelle 28 dargestellt.

**Tabelle 27: Einstellungen am QuantStudio3™ Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*) zur Messung des Thermal-Shift-Assays.**

Messparameter	Einstellung
Block-Typ	96-Well Block (0,1 mL)
Experiment-Typ	Schmelzkurve
Reagenz	Andere
Rampengeschwindigkeit	Schnell
Reaktionsvolumen	20 $\mu\text{L}$
Modus	Standard
Filtereinstellungen	x4(580 $\pm$ 10) · m4(623 $\pm$ 14)
Passive Referenz	keine
Reporter	Rox
Quencher	Keiner
Rampenmodus	Kontinuierlich

**Tabelle 28: Aufbau der Schmelzkurve zur Messung des Thermal-Shift-Assays am QuantStudio3™ Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*).**

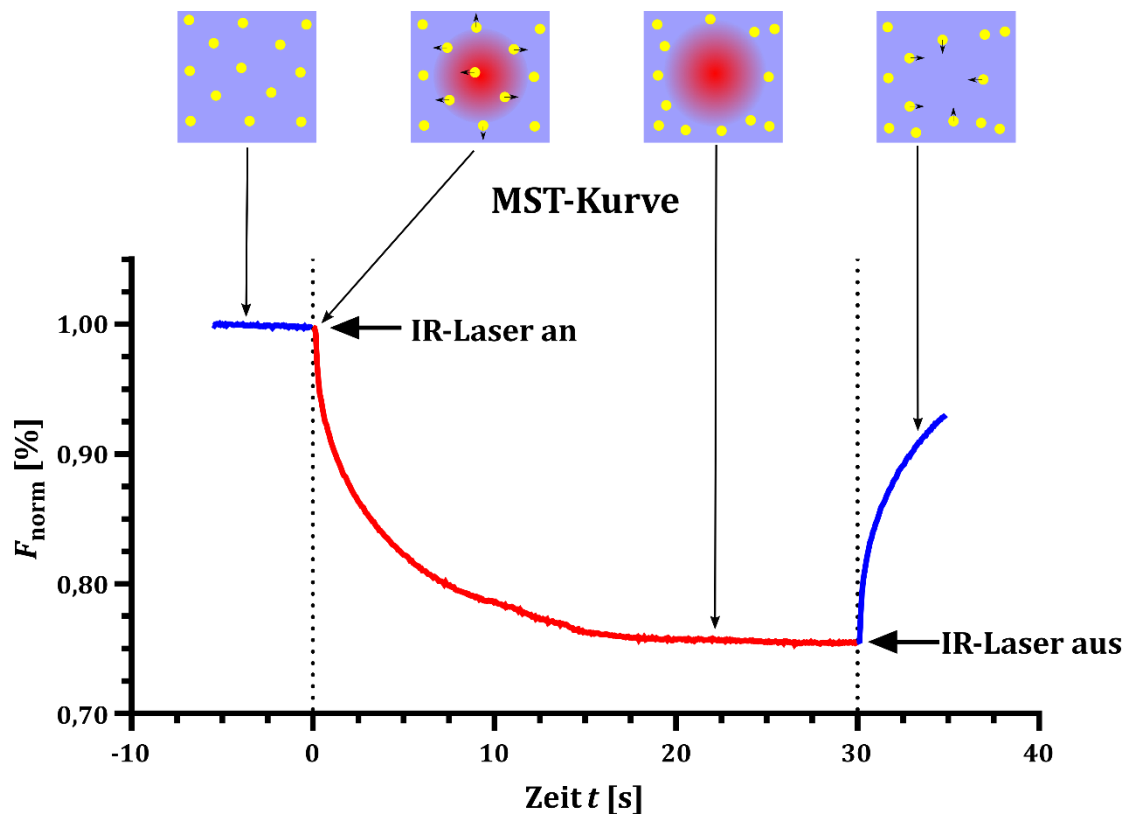
Phase	Temperatur	Rampenrate	Zeit
1	10 °C	1,6 °C/s	120 s
2: Dissoziation	95 °C	0,05 °C/s	60 s
3	10 °C	1,6 °C/s	60 s

Die Auswertung erfolgte mit der Protein Thermal Shift™ Software v1.4 (*Applied Biosystems*).

### 3.3.11 Microscale-Thermophoresis-Assay (MST)

Mit dem Microscale-Thermophoresis-Assay (Microscale Thermophorese, MST) können quantitative Affinitätsbestimmungen zwischen verschiedensten Biomolekülen, z. B. Protein-Ligand-Interaktionen, gemessen werden (*Seidel et al.*, 2013). Das Prinzip beruht

auf der Thermophorese, – auch Thermodiffusion oder Ludwig-Soret-Effekt genannt – bei der mithilfe eines Infrarot-Lasers (IR-Laser) mit einer Wellenlänge von 1.480 nm ein definierter Temperaturgradient innerhalb einer Glaskapillare induziert wird (Seidel *et al.*, 2013). Die zunächst gleichmäßig in der Glaskapillare verteilten Moleküle bewegen sich durch den angelegten Temperaturgradienten innerhalb von kürzester Zeit von höheren Temperaturen hin zu niedrigeren Temperaturen, bis sich erneut ein Gleichgewicht einstellt. Sobald der IR-Laser wieder ausgeschaltet wird, erfolgt eine Rückdiffusion, angetrieben durch die Massendiffusion der Biomoleküle (vgl. Abbildung 16). Die Detektion erfolgt beim MST-Assay über die Fluoreszenz eines Biomoleküls, welches entweder eine Autofluoreszenz aufweist oder einer Fluoreszenzmarkierung unterzogen wurde (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2014).

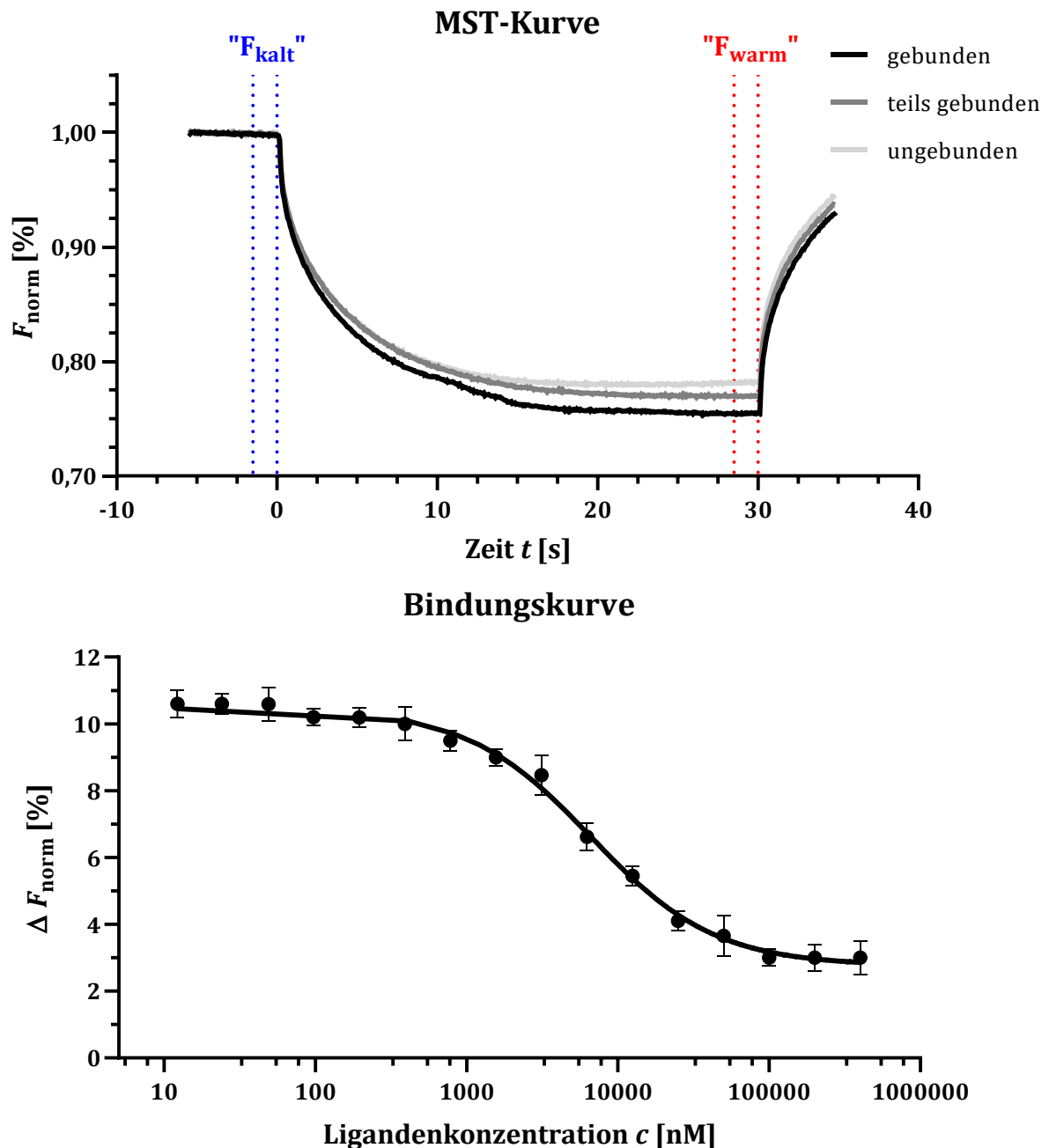


**Abbildung 16: Prinzip des Microscale-Thermophoresis-Assays.** Zu Beginn der Messung sind die Moleküle gleichmäßig in der Kapillare verteilt und die Fluoreszenz ist konstant ( $t \leq 0$ ). Mit Einschalten des IR-Lasers ( $\lambda$ : 1.480 nm) wird ein Temperaturgradient erzeugt, der einen sogenannten *T-Jump* (Temperatur-Sprung) verursacht. Hierbei ist ein rapider Abfall der Fluoreszenz, ausgelöst durch die Temperaturänderung, zu beobachten ( $0 < t < 5$  s). Die fluoreszenzmarkierten Moleküle bewegen sich weg von dem erhitzten Bereich hin zu kühleren Bereichen innerhalb der Kapillare, bis sich erneut ein konstantes Fluoreszenzsignal einstellt ( $20 < t < 30$  s). Sobald der IR-Laser ausgeschaltet wird, kann ein *inverser T-Jump* detektiert werden, der mit einer Rückdiffusion der fluoreszenzmarkierten Moleküle einhergeht ( $t \geq 30$  s). Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2014) basierend auf eigenen Messwerten erstellt.

Um Bindungsaffinitäten zwischen Protein und Ligand zu bestimmen, kann die MST-Messung mit verschiedenen Konzentrationen des Liganden bei gleichbleibender Proteinkonzentration wiederholt werden. Bei geringen Ligandenkonzentrationen entspricht das Thermophorese-Profil dem des ungebundenen Proteins, während höhere Ligandenkonzentrationen das Profil des Protein-Ligand-Komplexes reflektieren. Aus diesen Profilunterschieden kann durch Auftragung des Fluoreszenzsignals gegen die Ligandenkonzentration direkt eine Bindungskurve abgeleitet werden, aus der die Gleichgewichts-dissoziationskonstante  $K_D$  ermittelt werden kann (vgl. Abbildung 17) (Wienken *et al.*, 2010).

Die Messungen wurden mit dem Monolith NT.115 (*NanoTemper Technologies GmbH*) durchgeführt. Für die Fluoreszenzmarkierung wurde zunächst das Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS (*NanoTemper Technologies GmbH*) verwendet. Spätere Fluoreszenzmarkierungen erfolgten mit dem Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation (*NanoTemper Technologies GmbH*). Die Fluoreszenzmarkierung wurde gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe des fluoreszenzmarkierten Proteins in HEPES-Puffer A0 (50 mM HEPES, pH 7,4; 100 mM NaCl, 0,05 % Tween-20) angesetzt und ein Kapillar-Scan in Premium-Kapillaren (Monolith NT.115 Premium Capillaries (*NanoTemper Technologies GmbH*)) zur Bestimmung der optimalen Konzentration am Monolith NT.115 vermessen. Gemäß Herstellerangaben wurde eine Konzentration mit einer Fluoreszenzintensität zwischen 300 und 1.000 Fluoreszenzeinheiten gewählt. Die finale Proteinkonzentration betrug zwischen 400 nM und 500 nM. Sobald die optimale Konzentration bestimmt wurde, wurde die Bindungsaffinität von Silvestrol und CR-31-B (-) zu eIF4A1(19-406) in Gegenwart von Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> und AMP-PNP vermessen. Dafür wurde zuerst die Verdünnungsreihe der Liganden in HEPES-Puffer A0 angesetzt und anschließend zu jedem Ansatz ein Mastermix, bestehend aus fluoreszenzmarkiertem eIF4A1(19-406) ( $c_{\text{final}}$ : 400 - 500 nM), RNA ( $c_{\text{final}}$ : 15  $\mu$ M) und AMP-PNP ( $c_{\text{final}}$ : 1 mM) dazugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 40  $\mu$ L erhalten wurde. RNA und AMP-PNP wurden im Überschuss hinzugefügt, um eine Sättigung zu gewährleisten und ausschließlich die Bindungsaffinität der eIF4A-Inhibitoren bestimmen zu können. Um einen möglichst breiten Konzentrationsbereich abdecken zu können, wurde eine 1 : 2-Verdünnung ausgehend von einer Startkonzentration von 100  $\mu$ M gewählt. Die Anzahl der Proben war hierbei auf 16 beschränkt, da maximal 16 Kapillaren im Schlitten des Monolith NT.115 platziert

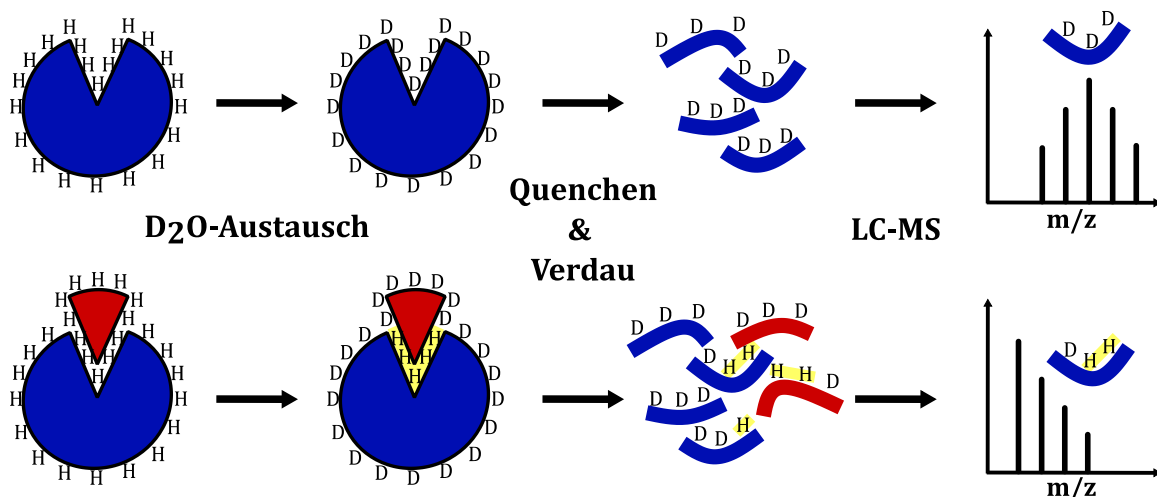
werden können. Nachdem sämtliche Proben für 5 Minuten zentrifugiert wurden, erfolgte die Messung im Monolith NT.115. Bei einer LED-Power von 30 % und einer MST-Power von 80 % konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Die Auswertung wurde mit dem Programm NT Analysis (*NanoTemper Technologies GmbH*) durchgeführt.



**Abbildung 17: MST-Kurven bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen (oben) und daraus resultierende Bindungskurve (unten).** Durch Interaktion des fluoreszenzmarkierten Proteins mit einem Liganden ändert sich die Thermophorese des Komplexes, was sich in einer Verschiebung der MST-Kurven bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen äußert (oben). Wird die normalisierte Fluoreszenzänderung ( $\Delta F_{\text{norm}}$ ), die sich aus dem Quotienten der gemittelten Fluoreszenz in den Bereichen ( $\Delta F_{\text{warm}}/\Delta F_{\text{kalt}}$ ) ergibt, gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen, kann eine Bindungskurve erhalten werden. Die daraus resultierende Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  erlaubt eine Affinitätsbestimmung des verwendeten Liganden. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (*Jerabek-Willemsen et al., 2014*) erstellt.

### 3.3.12 HDX-Massenspektrometrie (HDX-MS)

Die Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (*hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry*, HDX-MS) erlaubt die Untersuchung der Dynamik von Proteinen und kann Auskünfte über die Struktur oder Konformation eines Proteins geben oder Ligandenbindungsstellen bzw. Protein-Ligand-Interaktionsflächen identifizieren (Steinchen *et al.*, 2017). Dabei nutzt die HDX-MS die Eigenschaft von Proteinen, Amidprotonen mit den Protonen des umgebenden Lösungsmittels auszutauschen. Durch Inkubation des Proteins in einem deuterierten Lösungsmittel (D<sub>2</sub>O) können Wasserstoffatome durch Deuterium ersetzt werden. Das Herabsetzen des pH-Werts sowie das Senken der Temperatur quencht diese Reaktion, sodass nach einem Proteaseverdau des deuterierten Proteins Peptidfragmente mittels HPLC getrennt und anschließend deren Deuteriumgehalt massenspektrometrisch analysiert und visualisiert werden kann (vgl. Abbildung 18) (Steinchen *et al.*, 2017).



**Abbildung 18: Prinzip der HDX-MS zur Identifikation von Protein-Ligand-Interaktionsflächen.** Das Protein (blau) wird in An- und Abwesenheit des Liganden (rot) in einem deuterierten Puffer inkubiert. Nachdem diese Reaktion gestoppt wurde, werden die deuterierten Ansätze z. B. durch Pepsin verdaut und die erhaltenen Peptidfragmente nach Auftrennung mittels HPLC massenspektrometrisch untersucht. Die Abbildung wurde nach (Underbakke-Lab, o. J.) verändert.

Beim Vergleich des Ligand-gebundenen Zustands mit dem ungebundenen Apozustand des Proteins können Unterschiede in den H/D-Austauschmustern die Interaktionsfläche zwischen Protein und Ligand widerspiegeln (Steinchen *et al.*, 2017). Die experimentelle Durchführung sowie die Auswertung der HDX-Massenspektrometrie wurde von DR. WIELAND STEINCHEN (Gerätezentrum Massenspektrometrie und Elementaranalytik, Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Es wurden drei

verschiedene Ansätze mit jeweils 200 µL einer 50 µM Proteinlösung von eIF4A1(19-406) zur Analyse in Auftrag gegeben. Die Zusammensetzung der Ansätze ist Tabelle 29 zu entnehmen, wobei die Unterschiede lediglich in der Zugabe von RNA und Ligand zu finden sind.

**Tabelle 29: Zusammensetzung der mittels HDX-MS untersuchten Ansätze von eIF4A1(19-406).**

	eIF4A1(19-406)	RNA (AG) <sub>5</sub>	Ligand	Puffer
<b>Ansatz 1</b>	50 µM	-	DMSO	Storage-Puffer
<b>Ansatz 2</b>	50 µM	150 µM	150 µM Silvestrol	Storage-Puffer
<b>Ansatz 3</b>	50 µM	150 µM	150 µM CR-31-B (-)	Storage-Puffer

Als Apozustand wurde eIF4A1(19-406) in Storage-Puffer (nach *Iwasaki et al*, 2019) gewählt. Anstelle des Liganden wurde die gleiche Menge an DMSO zum Ansatz hinzugegeben. Verglichen wurde dieser Zustand mit den Ligand-gebundenen Ansätzen von eIF4A1(19-406) mit einer Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> und Silvestrol bzw. CR-31-B (-). Der H/D-Austausch wurde in deuteriertem Storage-Puffer (20 mM HEPES-K pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,1 mM ETDA, 2,5 % (v/v) DMSO) bei 25 °C durchgeführt. Da die Ansätze während des H/D-Austausches präzipitiert sind, konnten zur Auswertung lediglich die Zeitpunkte nach 10 s, 30 s und 95 s Inkubation analysiert werden. Das Quenching erfolgte mit 400 mM Kaliumphosphat und 2 M Guanidinhydrochlorid bei einem pH-Wert von 2,2 und einer Temperatur von 1 °C. Der Pepsinverdau wurde bei 12 °C ausgeführt.

### 3.3.13 Molekulares Docking

Mit molekularem Docking kann die Bindung von Liganden an ein Zielprotein oder Bindungsmodi von Proteininteraktionspartnern bioinformatisch vorhergesagt werden (*Juhl & Pleiss*, 2007). Idealerweise können dabei auch Aussagen über die Bindungsenergie der Interaktionspartner getroffen werden. So können nicht nur neue Wirkstoffkandidaten gescreent und identifiziert werden, sondern auch Mutationsvorhersagen gemacht werden (*Roy et al.*, 2015). Beim einfachsten Ansatz wird das Bindungsverhalten von starren Molekülen untersucht. Dem gegenüber steht beispielsweise das Ligandendocking, bei dem mindestens ein Interaktionspartner, häufig der Ligand, flexibel modelliert wird. Berechnet wird dann der Zustand, in dem Protein und Ligand so orientiert sind, dass eine größtmögliche Bindungsenergie erhalten wird (*Waßmer & Maelicke*, o. J.).

Für das molekulare Docking wurde mit AutoDock Vina (*Trott & Olson, 2010*), was Teil der Software MGLTools (*Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute*) ist, gearbeitet. Zunächst wurde die 3D-optimierte Struktur des Liganden in ACD/ChemSketch (*Advanced Chemistry Development*) erstellt und in das PDB-Format konvertiert. Als Rezeptor wurde die Kristallstruktur von eIF4A1(19-406) im Komplex mit der Substrat-RNA (AG)<sub>5</sub> und RocA (PDB: 5ZC9) verwendet (*Iwasaki et al., 2019*). In der Docking-Software AutoDock v4.2 (*The Scripps Research Institute*) (*Morris et al., 2009*) wurde der Rezeptor zuerst mit sämtlichen Wasserstoffatomen gesättigt, wobei unpolare Wasserstoffatome zusammengeführt wurden. Dann wurden die Ladungen gemäß der Gasteiger-Methode berechnet. Nachdem die Torsionswinkel für den Liganden fixiert wurden, wurde die Gitterbox (*grid box*) mit einer Größe von 60 × 60 × 60 und 3,75 Å um das aktive Zentrum (Interaktionsfläche von RocA mit der RNA und eIF4A1(19-406)) des Rezeptors gesetzt. Dann wurden mit AutoGrid (*The Scripps Research Institute*) die Wechselwirkungsenergien zwischen verschiedenen Atomtypen (z. B. aliphatische oder aromatische Kohlenstoffe, wasserstoffbindende Sauerstoffatome, etc.) mit den Makromolekülen (Protein und RNA) vorberechnet. Diese Berechnungen wurden für die Docking-Berechnungen mit AutoDock (*The Scripps Research Institute*) verwendet, um die gesamte Wechselwirkungsenergie des Liganden mit dem Protein zu bestimmen. Um die beste Docking-Konformation zu erhalten, wurde der *Lamarckian Genetic-Algorithmus* (*Morris et al., 1998*) verwendet. Insgesamt wurden jeweils zwei Docking-Ansätze durchgeführt und die mittlere Bindungsenergie berechnet. Das Docking-Ergebnis mit der höchsten Bindungsaffinität wurde mithilfe der Software UCSF Chimera (*The Regents of the University of California*) visualisiert.

### 3.4 Zellkultur-Methoden

In dieser Arbeit wurde überwiegend mit HepG2-Zellen gearbeitet. Bei den HepG2-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie aus dem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen kaukasischen Jungen (*Aden et al., 1979*). HepG2-Zellen sind adhärent und wachsen in epithelartigen Einzelschichten. Wegen ihrer hohen Proliferationsrate eignet sich die Zelllinie besonders gut zur Untersuchung der Zytotoxizität von Wirkstoffen (*HepG2 (Liver Hepatocellular Carcinoma) Cell Line, o. J.*).



### 3.4.1 Kultivierung von HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen wurden in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (*Gibco*), supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS, Fetal Bovine Serum) (*Sigma Aldrich*), in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einem 5 %igen CO<sub>2</sub>-Anteil bei 37 °C in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Sobald eine Konfluenz von 70 – 80 % erreicht wurde, wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden sie mit PBS (*Gibco*) gewaschen und für 5 – 7 Minuten mit 5 mL einer 0,1 %igen Trypsin-EDTA-Lösung (*Biochrom*) im Brutschrank inkubiert. Nach Abstoppen der Trypsinaktivität durch Zugabe des gleichen Volumenanteils an Kulturmedium wurden die Zellen für 5 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in einer Zählkammer (Neubauer-improved bright-line, *Marienfeld-Superior*) ausgezählt. Für die weitere Kultivierung wurde eine 1 : 5-Verdünnung der Zellen in 25 mL IMDM, supplementiert mit 10 % FBS, angesetzt und in eine neue T75-Zellkulturflasche ausgesät. Diese wurde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Sobald eine Passage von 25 erreicht wurde, wurden die Zellen verworfen und neue Zellen aufgetaut.

### 3.4.2 Kryokonservierung und Auftauen der HepG2-Zellen

Zur Kryokonservierung der HepG2-Zellen wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen einer möglichst frühen Passage in 1 mL Kulturmedium, supplementiert mit 10 % DMSO, resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (*Sarstedt*) überführt. Dieses wurde für 12 bis 16 Stunden in einem auf 4 °C vorgekühlten Isopropanol-Bad bei -80 °C gelagert, um ein schonendes, gleichmäßiges Einfrieren der Suspension zu gewährleisten. Die auf diese Weise eingefrorenen Zellen konnten im Anschluss in einem Stickstofftank bei etwa -200 °C zur langfristigen Verwahrung gelagert werden.

Das Auftauen der HepG2-Zellen erfolgte im Wasserbad. Hierfür wurde ein aus dem Stickstofftank entnommenes Kryoröhrchen kurz im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Nach Überführen der Zellsuspension in ein mit 9 mL Kulturmedium befülltes Schraubröhrchen wurden die Zellen für 5 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 mL Kulturmedium resuspendiert und komplett in eine T25-Zellkulturflasche ausgesät. So wurden die Zellen für 24 Stunden unter den zuvor bereits genannten Bedingungen kultiviert und am nächsten Tag nach einem Waschschrift mit PBS durch Trypsin-Behandlung (siehe Kapitel 3.4.1) abgelöst und gemäß oben aufgeführter Passagierung unverdünnt in eine T75-Zellkulturflasche überführt.

### 3.4.3 Transfektion

Die Transfektion dient dem Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. Dabei wird zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden (Mülhardt, 2009). Da in dieser Arbeit lediglich die transiente Transfektion Anwendung gefunden hat, wird auf die stabile Transfektion nicht weiter eingegangen. Neben physikalischen Verfahren, wie beispielsweise der Elektroporation, gibt es auch chemischen Verfahren, wie die Calcium-Phosphat-Präzipitation, die an die Transformation einer Bakterienzelle erinnert. In dieser Arbeit wurde die zu den chemischen Verfahren zählende Methode der Lipofektion angewandt: Kationische Lipide wechselwirken mit dem negativ geladenen Phosphodiesterückgrat der DNA und bilden Lipidvesikel, die von den eukaryontischen Zellen über Endozytose aufgenommen und exprimiert werden können (Mülhardt, 2009). Als Transfektionsreagenz wurde zunächst Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) verwendet, später wurde zu Lipofectamine 3000 (Invitrogen™) gewechselt, wobei sich das Transfektionsprotokoll bei letzterem lediglich durch die Zugabe von P3000 zum Transfektionsansatz unterscheidet. Das Protokoll wurde gemäß Herstellerangaben (vgl. *Lipofectamine 3000 Reagent - User Guide*, 2016) durchgeführt.

Am Tag vor der Transfektion wurden  $2 \cdot 10^4$  Zellen in 200  $\mu\text{L}$  Kulturmedium pro Well einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Vor Beginn der Transfektion wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 100  $\mu\text{L}$  Opti-MEM™ Reduced Serum Media (Gibco) ersetzt. Für die Herstellung des DNA-Lipidkomplexes wurde zunächst eine 1 : 25-Verdünnung der benötigten Menge an Lipofectamine™ 2000 oder 3000 in Opti-MEM™ angesetzt. Pro Well wurden insgesamt 0,2  $\mu\text{L}$  Lipofectamine™ eingesetzt. Die einzubringende Plasmid-DNA wurde ebenfalls in Opti-MEM™ verdünnt, wobei pro Well 100 ng benötigt wurden, die in 5  $\mu\text{L}$  Opti-MEM™ verdünnt wurden. Im Falle des Lipofectamine™ 3000 wurden zur DNA-Verdünnung zusätzlich 2  $\mu\text{L}$  P3000™ Reagenz (Invitrogen) pro  $\mu\text{g}$  DNA hinzugegeben. Sodann wurden gleiche Anteile an Lipofectamine™-Verdünnung und DNA-Verdünnung vereint und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  des DNA-Lipidkomplexes zu den vorgelegten 100  $\mu\text{L}$  Opti-MEM in jedes Well der 96-Well Platte pipettiert. Dies entspricht den vorher genannten 100 ng Plasmid-DNA und 0,2  $\mu\text{L}$  Lipofectamine™ pro Well. Die Zellen wurden für 5 – 6 Stunden mit dem DNA-Lipidkomplex bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, ehe das Medium abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt wurde. In einigen Fällen wurde an dieser Stelle das

Kulturmedium mit in DMSO-gelösten Substanzen wie Silvestrol versetzt (vgl. Kapitel 3.4.4), um beispielsweise Effekte auf die Translationseffizienz in einem Dual-Luciferase-Reporter-Assay abzuleiten (vgl. Kapitel 3.4.6).

#### **3.4.4 Behandlung von HepG2-Zellen**

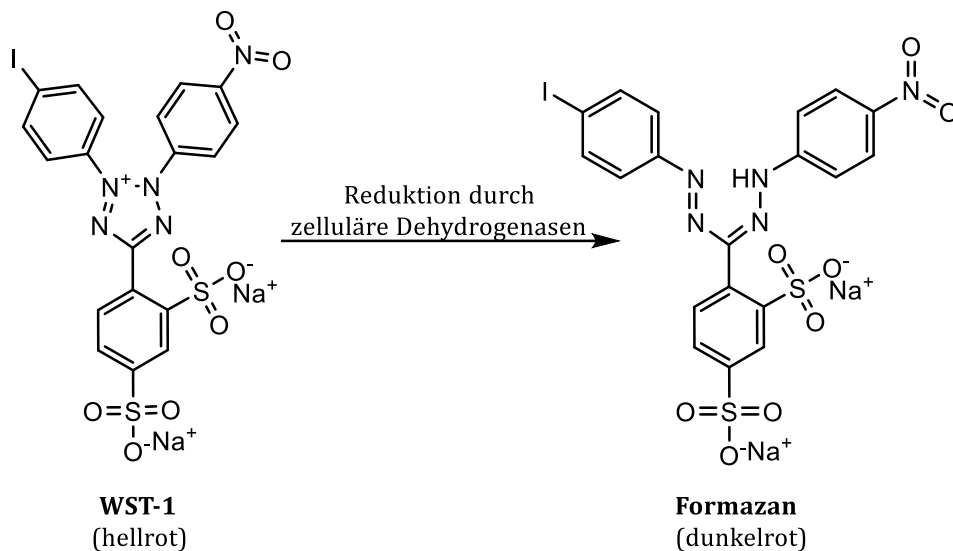
Die Behandlung bezeichnet in diesem Kontext die Inkubation der HepG2-Zellen mit verschiedenen Substanzen, zur Untersuchung der Zytotoxizität im Rahmen eines WST-1-Assays (vgl. Kapitel 3.4.5) oder des Effektes auf die Translationseffizienz im Dual-Luciferase-Reporter-Assay (vgl. Kapitel 3.4.6).

Die Behandlung der Zellen erfolgte 48 Stunden vor Messung des jeweiligen Assays. Hierfür wurde zunächst eine Arbeitslösung der Stammlösungen angesetzt. Als Stammlösung wird die Lösung der jeweiligen Substanz in DMSO bezeichnet, die in Konzentrationen zwischen 1 mM bis 20 mM vorlagen. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde im ersten Schritt eine 1:500-Verdünnung der Stammlösung in Kulturmedium vorgenommen. Diese Arbeitslösung wurde als Ausgangslösung für alle weiteren Verdünnungen verwendet und konnte über einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden. Aus der Arbeitslösung wurden im nächsten Schritt die entsprechenden zu testenden Konzentrationen durch erneutes Verdünnen mit Kulturmedium hergestellt. Die so erstellten Verdünnungen wurden in einem Volumen von 200 µL zu den Zellen, die am Tag zuvor in 96-Well Platten ausgesät wurden (vgl. Kapitel 3.4.3 Transfektion), gegeben. Im Falle des Dual-Luciferase-Reporter-Assays wurden die Zellen zuvor transfiziert, beim WST-1-Assay wurde die Behandlung direkt ohne vorangestellte Transfektion durchgeführt. Wie bereits oben erwähnt, wurden die Zellen für 48 Stunden mit dem mit Substanzen supplementierten Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, ehe der Assay durchgeführt wurde. Als Kontrolle wurde eine mit der entsprechenden Menge an DMSO versetzte Probe vermessen.

#### **3.4.5 WST-1-Assay**

Zur Bestimmung der Toxizität einer Verbindung wurden WST-1-Assays (*water soluble tetrazolium assay*) durchgeführt. Das Prinzip des WST-1-Assays beruht auf der Reduktion von Tetrazoliumsalzen zu farbigen Formazanen (vgl. Abbildung 19). Diese Reaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert und kann daher nur von lebensfähigen Zellen umgesetzt werden. Durch eine spektralphotometrische Messung kann der Anteil

an gebildetem Formazan quantifiziert werden und so die relative Anzahl der noch lebenden Zellen im Vergleich zu einer Kontrolle bestimmt werden (*Sigma-Aldrich*, o. J.).



**Abbildung 19: Reaktionsprinzip des WST-1-Assays.** Die Reduktion des Tetrazoliums Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene sulfonate) zu Formazan, die durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen katalysiert wird, ist photometrisch durch einen Farbumschlag von hellrot nach dunkelrot messbar. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (*Sigma-Aldrich*, o. J.) erstellt.

Für die WST-1-Assays wurde das Cell Proliferation Reagent WST-1 (*Roche*) verwendet. Da dieses Reagenz sehr lichtsensitiv ist, wurden alle Arbeiten damit im Dunkeln durchgeführt. Es wurden  $2 \cdot 10^4$  HepG2-Zellen pro Well einer transparenten 96-Well Platte (Cellstar® 96-Well Microplate, flat bottom clear polystyrene wells, sterile, *Greiner Bio-One*) ausgesät und diese, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, mit den zu testenden Verbindungen behandelt. Nach einer 48 stündigen Inkubation der Zellen mit den Verbindungen wurde die relative Anzahl der noch lebenden Zellen an einem Mikrotiterplatten-Reader (SAFIRE II, *Tecan*) in Relation zu einer DMSO-Kontrolle bestimmt. Dafür wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die benötigte Menge an WST-1-Reagenz 1 : 11 in PBS verdünnt und jeweils 110  $\mu\text{L}$  der Verdünnung in jedes Well der 96-Well Platte pipettiert. Pro Well wurden somit 10  $\mu\text{L}$  WST-1-Reagenz und 100  $\mu\text{L}$  PBS eingesetzt. Nach einer zweistündigen Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  wurde die photometrische Messung am Mikrotiterplatten-Reader durchgeführt. Die entsprechenden Messparameter sind in Tabelle 30 aufgeführt.

**Tabelle 30: Einstellungen am Mikrotiterplatten-Reader SAFIRE II (Tecan) zur Messung des WST-1-Assays.**

Messparameter	Einstellung
Modus	Absorption
Wellenlänge	450 nm
Referenzwellenlänge	600 nm
Anzahl der Reads	10
Plattenbezeichnung	GRE96ft.pdf
Schütteldauer (kreisförmig, medium)	10 s
Einschwingzeit	1 s
Temperatur	37 °C

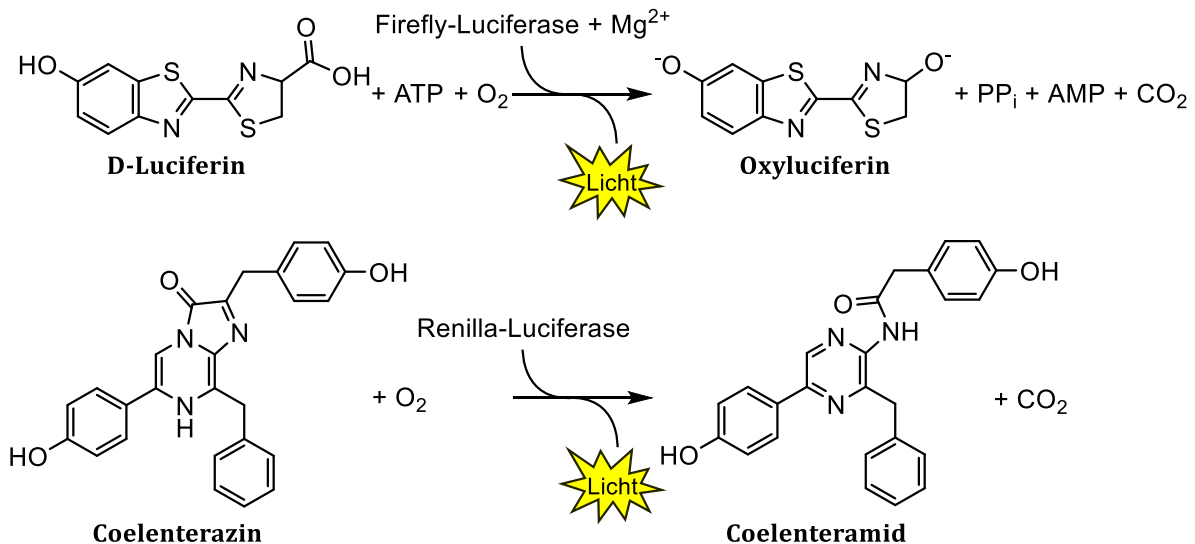
Für die Auswertung wurde eine Normalisierung auf eine mitgeführte DMSO-Kontrolle durchgeführt. Die Toxizität ist dargestellt als Mittelwert mehrerer biologischer Replikate ( $n \geq 3$ ), die pro Bedingung jeweils mehrere technische Replikate ( $n \geq 3$ ) enthalten. Werte über 1,0 entsprechen keiner Zytotoxizität bezogen auf die DMSO-Kontrolle, Werte unter 1,0 bedeuten, dass eine Toxizität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle vorliegt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

### 3.4.6 Dual-Luciferase-Assay

Der Dual-Luciferase-Assay (DLA) ermöglicht die sequenzielle Messung der Biolumineszenz-Aktivität zweier Luciferasen innerhalb einer Probe. In dieser Arbeit wurde er sowohl zum Screening potentieller eIF4A-Inhibitoren verwendet als auch zur Untersuchung verschiedener mRNA-Strukturen und -Sequenzen hinsichtlich ihrer Translationseffizienz bei gleichzeitiger Inhibition von eIF4A. Da der Assay im 96-Well Format durchgeführt werden kann, eignet er sich besonders gut zum Hochdurchsatz-Screening (*High-throughput screening*, HTS) von potentiellen Inhibitoren. Zugleich gewährleistet er eine hochempfindliche Detektion der Luciferase-Aktivitäten (*Bioscience*, 2016). Der DLA wurde in HepG2-Zellen durchgeführt, die mit dem Dual-Luciferase-Plasmid pFR\_HCV\_xb transfiziert wurden (vgl. Kapitel 2.6.1 pFR\_HCV\_xb), das für eine Firefly- und eine Renilla-Luciferase codiert. Durch Zugabe der Luciferase-Substrate zu den lysierten Zellen kann die Lumineszenz bestimmt werden. Da die beiden Luciferasen unterschiedliche Reaktionen katalysieren (siehe Abbildung 20), kann die Lumineszenz der einzelnen Luciferasen nacheinander und unabhängig voneinander bestimmt werden (*Thorne et al.*, 2010). Eine Gegenüberstellung der Eigenschaften der Firefly- und der Renilla-Luciferase ist in Tabelle 31 zusammengefasst.

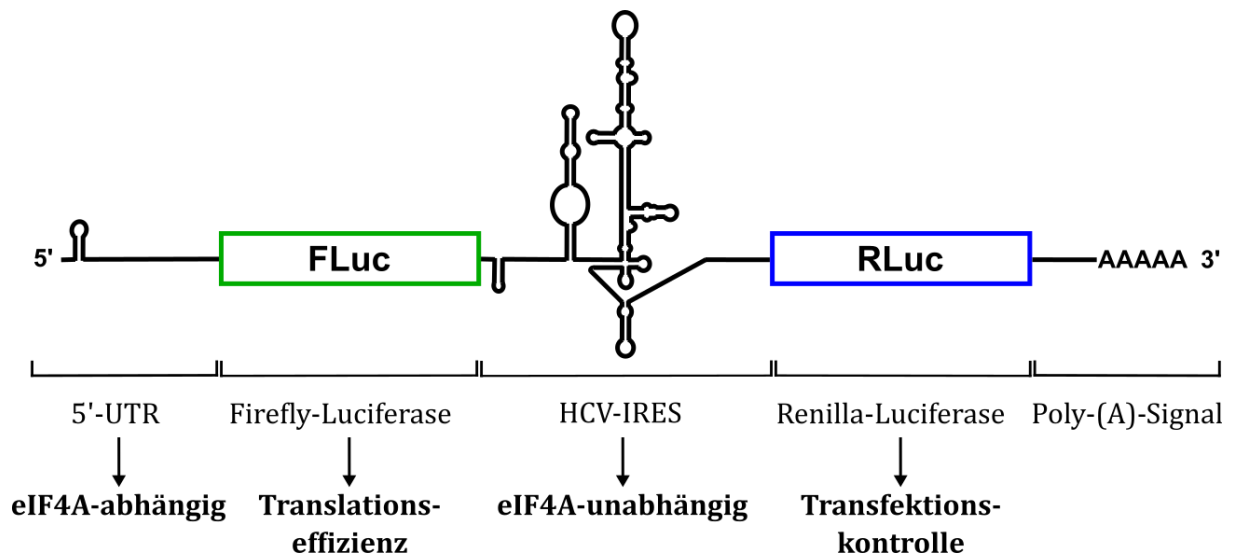
**Tabelle 31: Gegenüberstellung der Eigenschaften der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase hinsichtlich ihres Anwendungsbereichs.** Die Tabelle wurde verändert nach (Thorne et al., 2010).

Luciferase	Spezies	MW	Emission	ATP-abhängig	Substrat	Halbwertszeit $t_{1/2}$
Firefly (FLuc)	<i>Photinus pyralis</i>	62 kDa	550 - 570 nm	Ja	D-Luciferin/ ATP	3 Std.
Renilla (RLuc)	<i>Renilla reniformas</i>	36 kDa	480 nm	Nein	Coelenterazin	4,5 Std.



**Abbildung 20: Reaktionsprinzip der Biolumineszenzreaktionen der Firefly- und der Renilla-Luciferase.** Oben: Die Firefly-Luciferase katalysiert die ATP-abhängige Umsetzung von D-Luciferin zu Oxyluciferin unter Erzeugung von Lumineszenz. Unten: Die Renilla-Luciferase katalysiert die Umsetzung von Coelenterazin zu Coelenteramid unter Bildung von Licht. Während die Reaktion der Firefly-Luciferase ATP-abhängig abläuft, benötigt die Renilla-Luciferase kein ATP zur Erzeugung der Biolumineszenz. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Bioscience, 2016) erstellt.

Das Prinzip des Vektors pFR\_HCV\_xb ist bereits in Kapitel 2.6.1 beschrieben, die entsprechende bicistronische mRNA ist schematisch in Abbildung 21 dargestellt. Die Firefly-Luciferase wird eIF4A-abhängig translatiert und kann als Reporter der Translationseffizienz verschiedener mRNAs, die durch entsprechend variierende 5'-UTRs repräsentiert werden, genutzt werden. Die Translation der Renilla-Luciferase hingegen wird durch eine HCV-IRES reguliert und verläuft demnach eIF4A-unabhängig. Daher kann die Reporteraktivität der Renilla-Luciferase als Transfektionskontrolle zur Normalisierung der Translationseffizienz eingesetzt werden.



**Abbildung 21: Schematische Darstellung der bicistronischen mRNA des Dual-Luciferase-Reporter-Plasmids pFR\_HCV\_xb.** Die Cap-abhängige Translation der Firefly-Luciferase ist eIF4A-abhängig und wird zur Messung der Translationseffizienz unterschiedlicher mRNAs, repräsentiert durch variierende 5'-UTRs, genutzt. Die durch die HCV-IRES regulierte, Cap-unabhängige Translation der Renilla-Luciferase geschieht eIF4A-unabhängig und kann daher als Transfektionskontrolle herangezogen werden.

Die Dual-Luciferase-Reporter-Assays wurden unter Zuhilfenahme des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (*Promega*) durchgeführt. Zunächst wurden  $2 \cdot 10^4$  HepG2-Zellen pro Well einer schwarzen 96-Well Platte (*Cellstar*® 96-Well Microplate, flat bottom black polystyrene wells, sterile, *Greiner Bio-One*) ausgesät. Diese wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit dem entsprechenden Konstrukt des DLA-Plasmids pFR\_HCV\_xb gemäß Kapitel 3.4.3 transfiziert. Fünf bis sechs Stunden nach Transfektion wurde eine Behandlung der Zellen mit einem eIF4A-Inhibitor oder einem zu testenden potentiellen eIF4A-Inhibitor entsprechend der in Kapitel 3.4.4 erläuterten Angaben angeschlossen. Der DLA wurde 48 Stunden nach Behandlung gestartet. Hierfür wurden die Zellen eines jeden Wells mit 20 µL 1× Lysepuffer durch 20-minütiges Schütteln bei 37 °C lysiert. Anschließend wurden 50 µL des LAR II-Reagenzes, welches das Substrat für die Firefly-Luciferase enthält, mit einer 8-Kanal-Pipette zunächst in eine Richtung in jedes Well pipettiert. Dieser Pipettiervorgang wurde in umgekehrter Richtung wiederholt, um zu verhindern, dass einhergehende Pipettierverzögerungen die Reporteraktivität verfälschen. Dann wurde die Lumineszenz der Firefly-Luciferase am SAFIRE II (*Tecan*) vermessen. Sobald die Messung beendet war, wurde das Stop & Glo®-Reagenz nach gleichem Prinzip mit einer 8-Kanal-Pipette zu den lysierten Zellen gegeben und die Renilla-Aktivität vermessen. Neben dem Substrat für die Renilla-Luciferase enthält das Stop & Glo®-Reagenz außerdem einen Quencher, der die Reaktion der Firefly-Luciferase

abstoppt und so die ausschließliche Messung der Renilla-Aktivität ermöglicht. Die für den DLA verwendeten Messparameter können in Tabelle 32 eingesehen werden.

**Tabelle 32: Einstellungen am Mikrotiterplatten-Reader SAFIRE II (Tecan) zur Messung des Dual-Luciferase-Assays.**

Messparameter	Einstellung
Modus	Lumineszenz
Integrationszeit	1000 ms
Plattenbezeichnung	GRE96fb.pdf
Schütteldauer (kreisförmig, medium)	5 s
Einschwingzeit	2 s
Temperatur	37 °C

Für die Auswertung der Reporteraktivitäten wurde sowohl eine Normalisierung auf die Transfektionskontrolle (FLuc-Aktivität/RLuc-Aktivität) als auch auf eine mitgeführte DMSO-Kontrolle vorgenommen. Die Translationseffizienzen sind jeweils als Mittelwerte mehrerer biologischer Replikate ( $n \geq 3$ ), die wiederum pro Versuchstag mehrere technische Replikate ( $n \geq 4$ ) enthalten, dargestellt. Eine Translationseffizienz über eins entspricht demnach einer erhöhten Translation gegenüber der DMSO-Kontrolle, während eine Translationseffizienz unter eins eine Verminderung bezogen auf die DMSO-Kontrolle bedeutet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).



## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Untersuchung von RNA-Sequenz- und -Strukturelementen zur Vorhersage der eIF4A-Abhängigkeit

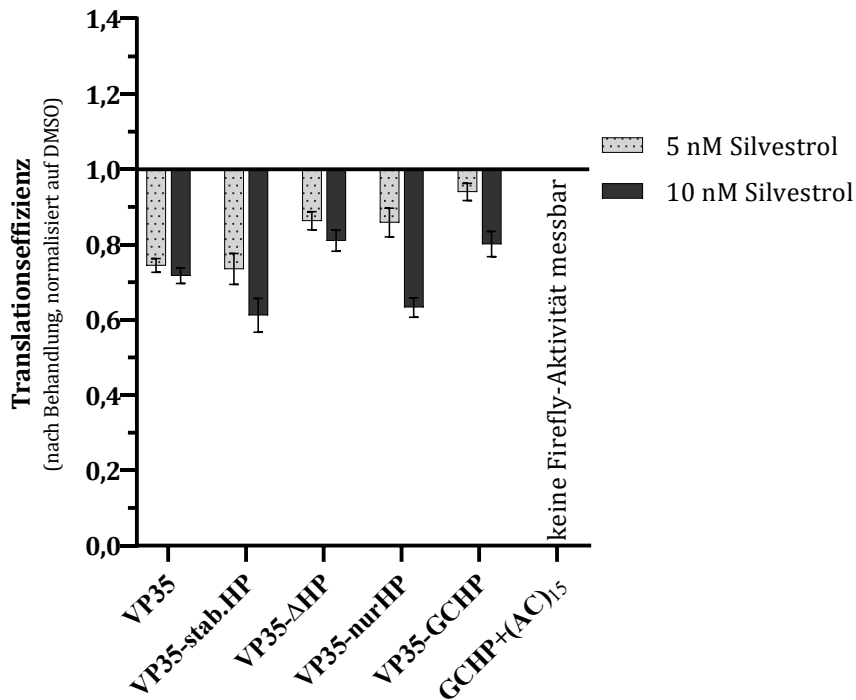
Anknüpfend an die Ergebnisse vorheriger Studien (*Obermann, 2017; Schulte, 2019*) sollten mithilfe des Dual-Luciferase-Assays (DLA) weitere RNA-Sequenz- und Strukturelemente untersucht werden. Dazu wurde der selektive eIF4A-Inhibitor Silvestrol eingesetzt, um eine Aussage über eine mögliche eIF4A-Abhängigkeit der viralen Proteinsynthese treffen zu können. Aus den vorangegangenen Studien war bekannt, dass die 5'-UTRs einiger Ebolavirus-mRNAs eine eIF4A-abhängige Translation bedingen. Im DLA äußerte sich dies in einer Reduktion der Translationseffizienz (TE) um durchschnittlich etwa 25 % bei Behandlung der Zellen mit Silvestrol (*Müller et al., 2018*). Weiterhin wurde bereits untersucht, welchen Einfluss der Austausch, die Deletion, die Insertion oder die gezielte Modifikation von Haarnadelstrukturen auf die Translationseffizienz haben. Dabei wurde festgestellt, dass eine Deletion der 5'-terminalen Haarnadelstruktur den durch Silvestrol hervorgerufenen Effekt der Reduktion der Translationseffizienz abschwächt (VP35- $\Delta$ HP). Wenn die Gesamtlänge und Komplexität der 5'-UTR im Verhältnis zur Haarnadelstruktur deutlich überwiegen, scheint der Einfluss des *Hairpins* auf die Translationseffizienz vernachlässigbar zu sein (NP- $\Delta$ HP). Durch Einfügen einer viralen Haarnadelstruktur in die 5'-UTR von  $\beta$ -Globin konnte außerdem eine Reduktion der Translationseffizienz mit Silvestrol induziert werden. Dieser Effekt zeichnete sich deutlicher ab, wenn der *Hairpin* an das 5'-terminale Ende statt an das 3'-terminale Ende der 5'-UTR positioniert wurde ( $\beta$ -Globin+5'-VP35-HP *versus*  $\beta$ -Globin+3'-VP35-HP). Eine Modifikation der Haarnadelstruktur wurde durch Stabilisierung der Stammregion in der 5'-UTR von VP35 bewerkstelligt. Diese Modifikation resultierte in einer verstärkten Reduktion der Translationseffizienz gegenüber dem unveränderten Konstrukt (VP35-stab.HP).

Aufbauend auf diese Erkenntnisse sollten mithilfe des Dual-Luciferase-Assays (DLA) weitere Veränderungen der 5'-terminalen Haarnadelstruktur der VP35-mRNA des Ebolavirus hinsichtlich der Translationseffizienz untersucht werden. Den Messungen vorangestellt waren die Klonierungen der entsprechenden Dual-Luciferase-Reporter-Konstrukte, die PCR-basiert erstellt wurden (detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 2.6.1 und Kapitel 3.4.6). Die im DLA gemessenen Translationseffizienzen wurden sowohl auf

die Aktivität der Renilla-Luciferase als Transfektionskontrolle als auch auf eine mit DMSO behandelte Kontrolle normiert. In den folgenden Abbildungen sind jeweils die Translationseffizienzen der unterschiedlichen Konstrukte dargestellt, die 48 Stunden nach Behandlung mit Silvestrol gemessen und auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen der jeweiligen Konstrukte normalisiert wurden. Eine Translationseffizienz von eins deutet demnach auf eine eIF4A-unabhängige Translation hin, da die durch Silvestrol induzierte Inhibition von eIF4A keine Auswirkungen auf die Translationseffizienz verglichen mit der DMSO-Kontrolle hat. Liegt die Translationseffizienz unter eins, ist die Translation der entsprechenden Reporter-mRNA durch die Inkubation der Zellen mit Silvestrol gegenüber der DMSO-Kontrolle vermindert, was eine eIF4A-Abhängigkeit vermuten lässt. Sämtliche Mittelwerte der gemessenen Translationseffizienzen sowie eine Übersicht über die RNA-Sekundärstrukturvorhersagen der im DLA getesteten 5'-UTRs inklusive einiger sequenzspezifischer Eigenschaften sind Tabelle A.1 und Tabelle A.5 des Anhangs zu entnehmen.

Da sich in den vorangegangenen Arbeiten abgezeichnet hat, dass mit zunehmender Gesamtlänge sowie Komplexität der untersuchten 5'-UTRs weniger Aussagen über den Einfluss einzelner RNA-Struktur- oder -Sequenzelemente getroffen werden können (vgl. NP- $\Delta$ HP, NP-*NheI* oder NP- $\Delta$ HP- $\Delta$ 3'-HP), wurde der Fokus auf die verhältnismäßig kurze 5'-UTR von VP35 der Ebolavirus-mRNA gelegt, die eine Gesamtlänge von 97 bp aufweist, darunter die 22 bp lange Haarnadelstruktur mit einem Stamm bestehend aus einem 7 bp langen Duplexbereich. Anknüpfend an die Erkenntnisse hinsichtlich der Deletion sowie der Stabilisierung des VP35-*Hairpins*, war zu erwarten, dass für eine eIF4A-abhängige Translation der *Hairpin* alleine vermutlich bereits ausreicht, sodass die Reporter-mRNA-Spiegel durch Silvestrol in Gegenwart des VP35-*Hairpins* reduziert werden. Das würde erklären, warum die Deletion des *Hairpins* eine erhöhte Translationseffizienz gegenüber der nativen VP35-5'-UTR zeigt, während die Stabilisierung eine geringere Translations-effizienz aufweist (vgl. Abbildung 22) (Obermann, 2017; Schulte, 2019). Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Reporter-Konstrukt die 22 bp lange Haarnadelstruktur im DLA vermessen (VP35-nurHP). Außerdem wurde der Stammbereich des VP35-*Hairpins* durch einen GC-Stretch mit einem Duplexbereich von 11 bp ersetzt (VP35-GCHP), um den Einfluss stabiler GC-Basenpaare auf die Entwindungsaktivität von eIF4A ableiten zu können. Damit außerdem potentiell strukturierte Bereiche innerhalb der restlichen

5'-UTR von VP35, die den *Hairpin* flankieren, vernachlässigt werden können, wurde zudem ein alternierender Purin-Pyrimidin-Stretch mit einer Länge von 30 bp (AC)<sub>15</sub> an das 3'-Ende des erwähnten VP35-GC-*Hairpins* angehängt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 22 dargestellt.

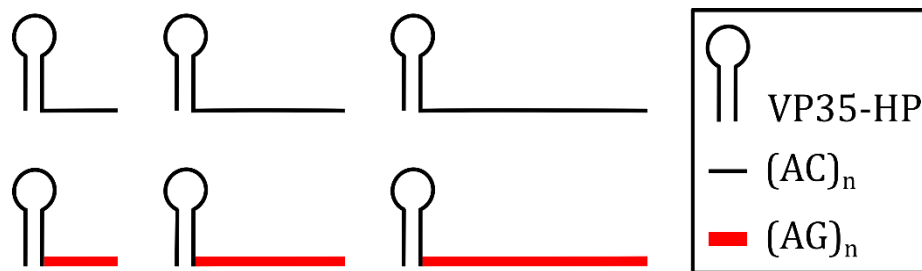


**Abbildung 22: DLA in HepG2-Zellen zur Untersuchung des Einflusses von Modifikationen der VP35-Haarnadelstruktur des Ebolavirus.** Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Wie zu erwarten wird die Translationseffizienz von VP35-nurHP durch Silvestrolbehandlung herunterreguliert. Das lässt darauf schließen, dass die Haarnadelstruktur eine eIF4A-abhängige Translation bedingt. Die Substitution des Stammereichs des VP35-*Hairpins* durch einen stabilisierenden GC-Stretch verursacht eine Abschwächung des durch Silvestrol hervorgerufenen Effektes. Dies könnte mit der erhöhten Gibbs-Energie (freie Enthalpie), die durch die stabilen GC-Basenpaarungen hervorgerufen wird, zu begründen sein (Özeş *et al.*, 2011). Die erhöhte Stabilität der Haarnadelstruktur trägt dazu bei, dass eine Entwindung durch eIF4A sehr energieaufwändig ist. In diesem Kontext konnten Özeş und Kollegen feststellen, dass mit Erhöhung des GC-Gehalts innerhalb des Duplexbereiches die Entwindungsrate von eIF4A im Komplex mit eIF4G und eIF4B reduziert wird (Özeş *et al.*, 2011). Sobald dieser GC-*Hairpin* von einem alternierenden

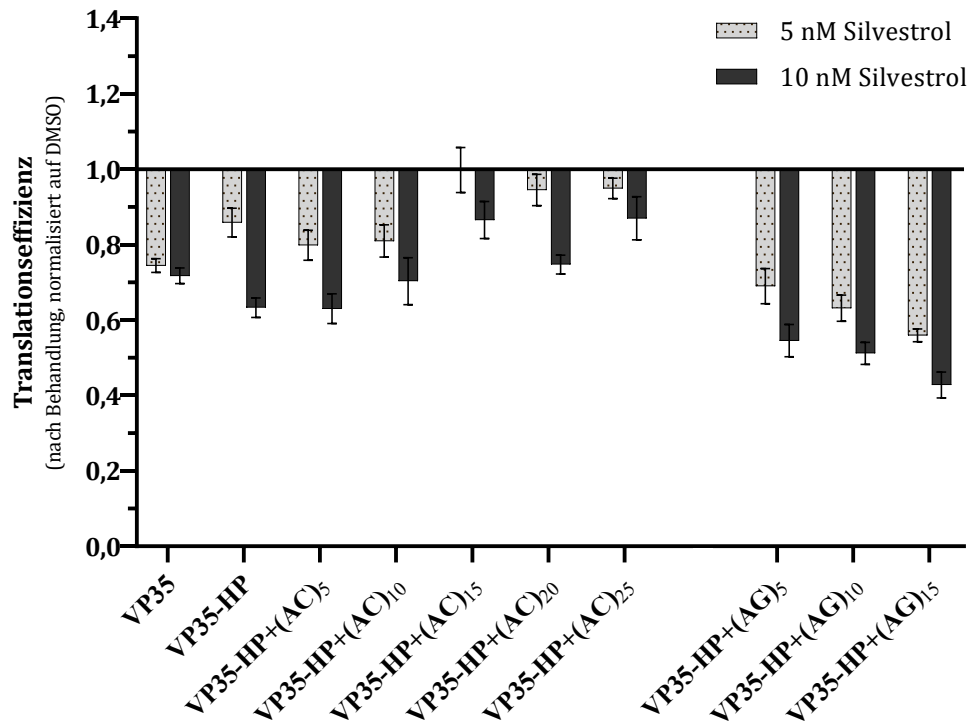
Purin-Pyrimidin-Stretch mit einer Gesamtlänge von 30 bp (GCHP+(AC)<sub>15</sub>) flankiert wird, ist weder mit den mit Silvestrol behandelten Proben noch mit den DMSO-Kontrollen eine Firefly-Reporteraktivität zu messen. Das deutet darauf hin, dass der GC-Duplexbereich in Kombination mit dem unstrukturierten Purin-Pyrimidin-Stretch (AC)<sub>15</sub> nicht mehr durch eIF4A entwunden werden kann oder anderweitig eine Rekrutierung des 43S-Präinitiationskomplexes verhindert wird, wodurch die Translation des Firefly-Luciferase-Gens vollständig unterbunden wird. Die Gründe hierfür sind unklar, da diese vollständige Inhibition der Translation ungewöhnlich ist.

Um abseits des GC-Hairpins den Einfluss des Purin-Pyrimidin-Stretches zu charakterisieren, wurden an die native VP35-Haarnadelstruktur alternierende Purin-Pyrimidin-Sequenzen unterschiedlicher Länge angehängt (VP35-HP+(AC)<sub>n</sub>). Die kürzeste Sequenz, bestehend aus der alternierenden Anordnung der Purinbase Adenin und der Pyrimidinbase Cytosin, wies dabei eine Länge von 10 bp auf ((AC)<sub>5</sub>), die längste erstreckte sich über 50 bp ((AC)<sub>25</sub>). Da aus einigen Studien hervorgeht, dass Rocaglamid-Derivate die Bindung von eIF4A an Polypurin-Sequenzen fixieren, wurden außerdem Polypurin-Stretches, bestehend aus Adenin- und Guaninbasen, mit einer Länge von 10 bp, 20 bp und 30 bp (VP35-HP+(AG)<sub>n</sub>) an die Haarnadelstruktur angehängt (vgl. Abbildung 23) (Iwasaki *et al.*, 2016).



**Abbildung 23: Schematische Darstellung der Konstrukte VP35-HP+(AC)<sub>n</sub> und VP35-HP+(AG)<sub>n</sub>.** In Schwarz: Alternierende Purin-Pyrimidin-Sequenzen (AC)<sub>n</sub>, in Rot: Polypurin-Sequenzen (AG)<sub>n</sub>.

Generell kann festgehalten werden, dass mit zunehmender Länge des Purin-Pyrimidin-Stretches die Translationseffizienz durch Silvestrol weniger beeinflusst wird (vgl. Abbildung 24). Demnach scheint die eIF4A-Abhängigkeit mit zunehmender Länge der unstrukturierten Purin-Pyrimidin-Sequenz vermindert zu werden.

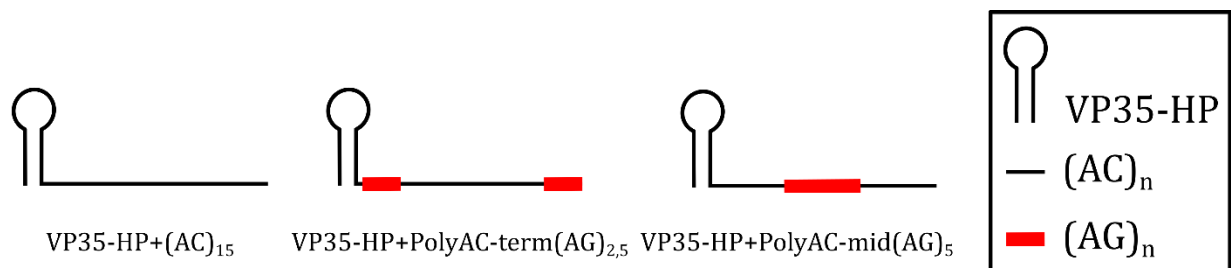


**Abbildung 24:** DLA in HepG2-Zellen zur Untersuchung des Einflusses von alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenzen (AC)<sub>n</sub> oder Polypurin-Sequenzen (AG)<sub>n</sub> in Kombination mit der VP35-Haarnadelstruktur der Ebolavirus-mRNA. Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen (n ≥ 3).

Ein Minimum ist bei einer Länge von 30 bp erreicht (vgl. VP35-HP+(AC)<sub>15</sub>). Hier ist die Translationseffizienz bei Behandlung mit 5 nM Silvestrol nicht von der DMSO-Kontrolle zu unterscheiden (TE: 1,00 ± 0,05), was darauf hindeutet, dass die Translationsinitiation ohne eIF4A abläuft. Möglicherweise stellt der unstrukturierte Purin-Pyrimidin-Stretch eine „Landeplattform“ für den 43S-PIC dar, sodass die Entwindungsaktivität von eIF4A nicht benötigt wird, wie es in einer Publikation von HINNEBUSCH über den Scanvorgang des 43S-PIC und die Erkennung des Startcodons zusammengefasst wird (Hinnebusch, 2011). Im Gegensatz zu den unstrukturierten Purin-Pyrimidin-Sequenzen, ist in Anwesenheit der Polypurin-Sequenz ein gegenteiliger Effekt zu beobachten: Mit zunehmender Länge des Polypurin-Stretches wird auch die Translationseffizienz zunehmend durch Silvestrol reduziert. Dies steht im Einklang mit bereits publizierten Daten, die zeigen, dass Rocaglamid-Derivate die Affinität von eIF4A zu Purin-reichen RNAs erhöhen, die Bindung von eIF4A an die Polypurin-RNA fixieren und so den Scanvorgang des 43S-PIC verhindern (Chu et al., 2020; Iwasaki et al., 2016). Dieser Effekt soll jedoch stärker bei Rocaglamid-Derivaten ohne Dioxan-Rest ausgeprägt sein, wohingegen Silvestrol vor allem die

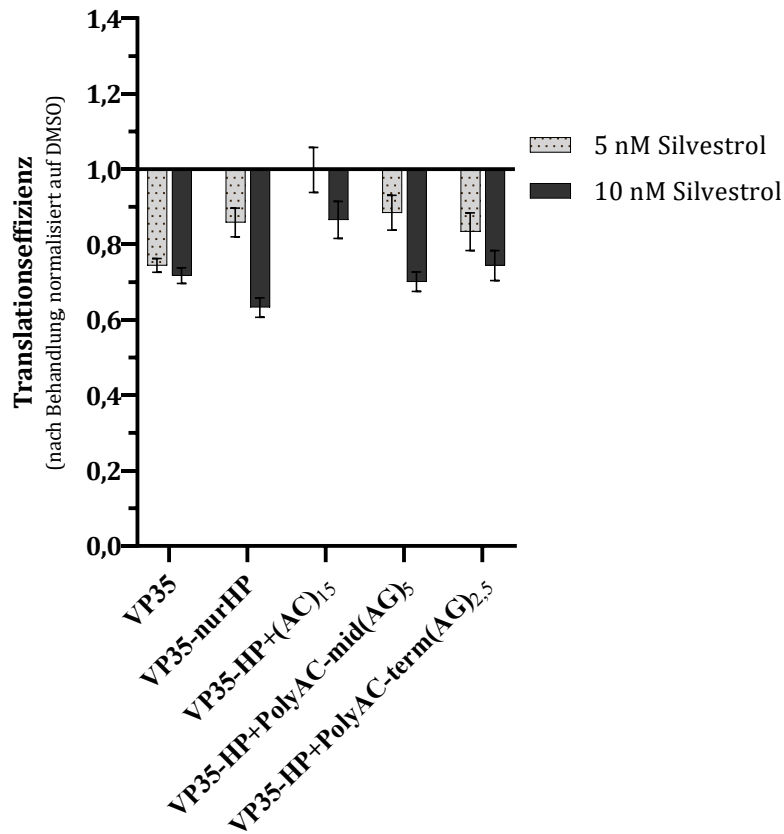
Translation von strukturierten Sequenzen mit G-Quadruplexen und RNAs mit geringem GC-Gehalt inhibieren soll (Rubio et al., 2014; Wolfe et al., 2014). Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse des DLAs, dass die Translationseffizienz mit steigender Länge der Polypurin-Sequenz zunehmend durch Silvestrol reduziert wird. Das lässt vermuten, dass auch Silvestrol die Bindung von eIF4A an Polypurin-Sequenzen festklemmt und so den Scanvorgang des 43S-PICs verhindert. Dies wiederum äußert sich in einer verminderten Expression des Reportergens.

Während mit Silvestrol demnach gegenüber alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenzen keine eIF4A-Abhängigkeit zu beobachten ist (vgl. VP35-HP+(AC)<sub>15</sub>), wirkt sich die Inhibition von eIF4A mit Silvestrol in Gegenwart von Polypurin-Sequenzen in einer verminderten Translationseffizienz aus. Um diese beiden Effekte zu vereinen, wurde die 30 bp lange Purin-Pyrimidin-Sequenz (AC)<sub>15</sub> durch einen 5 bp langen Polypurin-Stretch (AG)<sub>2,5</sub> unterbrochen. Hier wurde zwischen einer mittigen Positionierung der Polypurin-Sequenz (VP35-HP+PolyAC-mid(AG)<sub>5</sub>) und einer terminalen Positionierung am 3'- und 5'-Ende des Purin-Pyrimidin-Stretches (VP35-HP+PolyAC-term(AG)<sub>2,5</sub>) unterschieden (vgl. Abbildung 25). Die Gesamtlänge von 30 bp wurde dabei beibehalten.



**Abbildung 25: Schematische Darstellung der Konstrukte VP35-HP+(AC)<sub>15</sub>, VP35-HP+PolyAC-mid(AG)<sub>5</sub> und VP35-HP+PolyAC-term(AG)<sub>2,5</sub>.** In Schwarz: Alternierende Purin-Pyrimidin-Sequenzen (AC)<sub>n</sub>, in Rot: Polypurin-Sequenzen (AG)<sub>n</sub>.

Wie zu erwarten, wird die Translationseffizienz durch Einfügen der Polypurin-Sequenz im Vergleich mit dem reinen Purin-Pyrimidin-Stretch mit Silvestrol herunterreguliert (vgl. Abbildung 26). Die Positionierung der Purin-Sequenz spielt dabei eine untergeordnete Rolle, da die Translationseffizienzen der Konstrukte mit terminaler Positionierung sowie mittiger Positionierung des Polypurin-Stretches in einem ähnlichen Bereich liegen und sich nicht signifikant voneinander unterscheiden (vgl. auch Tabelle A.1 im Anhang).



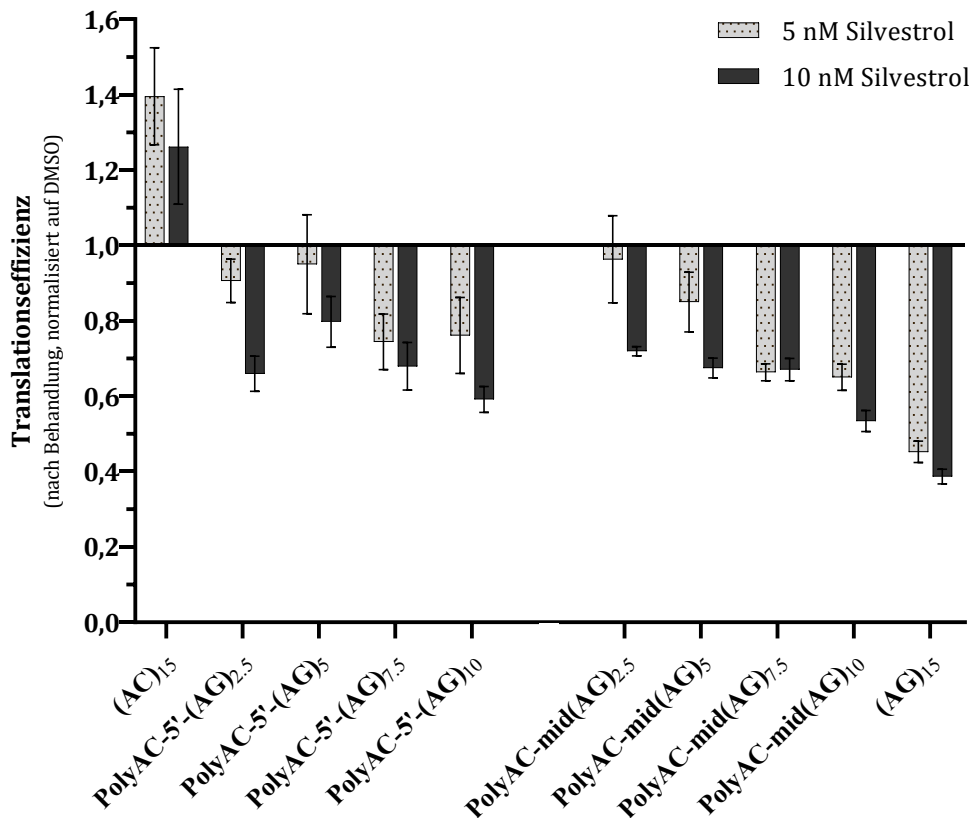
**Abbildung 26:** DLA in HepG2-Zellen zur Untersuchung des Einflusses der Positionierung von unstrukturierten, einzelsträngigen Bereichen, die die VP35-Haarnadelstruktur des Ebolavirus flankieren. Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Eine Eigenschaft, die alle bisher getesteten Konstrukte zur Untersuchung des Einflusses von Purin- oder Purin-Pyrimidin-Sequenzen gemein haben, ist die 5'-terminale Haarnadelstruktur von VP35. Um die unstrukturierten Sequenzabfolgen separat betrachten zu können, wurde in einem nächsten Ansatz der VP35-Hairpin deletiert. Neben einer 30 bp langen Polypurin-Sequenz ((AG)<sub>15</sub>) und einer alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenz ((AC)<sub>15</sub>) gleicher Länge wurde die Purin-Pyrimidin-Sequenz außerdem sowohl 5'-terminal (PolyAC-5'-(AG)<sub>n</sub>) als auch mittig (PolyAC-mid(AG)<sub>n</sub>) durch eine Polypurin-Sequenz mit zunehmender Länge ersetzt (vgl. Abbildung 27). Die Gesamtlänge von 30 bp wurde abermals nicht verändert.



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der Konstrukte  $(AC)_{15}$  und  $PolyAC-5'-(AG)_n$  (links) sowie  $PolyAC-mid(AG)_n$  und  $(AG)_{15}$  (rechts).** In Schwarz: Alternierende Purin-Pyrimidin-Sequenzen  $(AC)_n$ , in Rot: Polypurin-Sequenzen  $(AG)_n$ .

Wie sich auch schon in den vorherigen Untersuchungen abgezeichnet hat, wird der Einfluss von Silvestrol auf die Translationseffizienz mit Zunahme des Polypurin-Anteils stärker (vgl. Abbildung 28). Grundlegend kann der Trend beobachtet werden, dass mit steigendem Polypurin-Gehalt auch die Translationseffizienz stärker herunterreguliert wird. Dieses Phänomen scheint für die zentrale Positionierung der Polypurin-Sequenz ( $PolyAC-mid(AG)_n$ ) etwas stärker ausgeprägt zu sein als für die Positionierung am 5'-Terminus ( $PolyAC-term(AG)_n$ ).



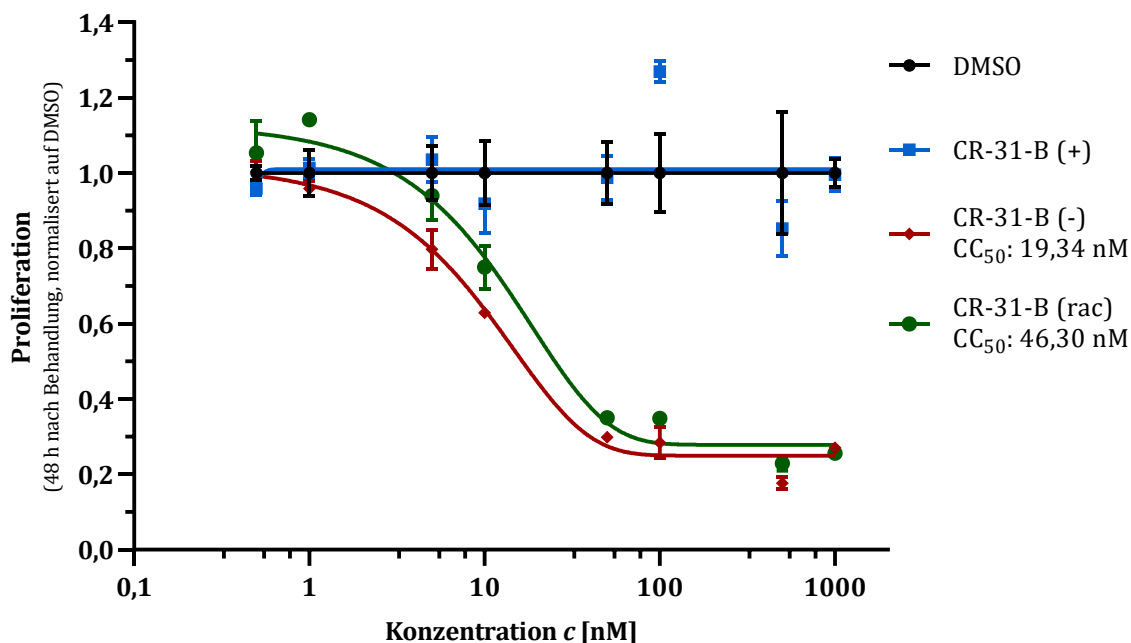
**Abbildung 28: DLA in HepG2-Zellen zur Untersuchung des Einflusses der Positionierung von Polypurin-Sequenzen zunehmender Länge innerhalb einer alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenz (PolyAC).** Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ). Innerhalb einer alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenz wurden sowohl 5'-terminal als auch mittig Polypurin-Sequenzen unterschiedlicher Länge eingefügt, wobei eine Gesamtlänge von 30 bp beibehalten wurde.



Die stärkste Reduktion der Translationseffizienz ist mit dem ausschließlich aus Purinbasen bestehenden Konstrukt (AG)<sub>15</sub> zu erkennen. Die Translationseffizienz der alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenz (AG)<sub>15</sub> wird im Gegensatz dazu gegenüber der DMSO-Kontrolle hochreguliert. Der Effekt, der bei den Polypurin-Sequenzen zu beobachten ist, könnte erneut mit dem bereits erwähnten „Festklemmen“ von eIF4A an Polypurin-Regionen durch Silvestrol zu erklären sein (*Iwasaki et al., 2016, 2019*). Die Hochregulation des Purin-Pyrimidin-Stretches (AC)<sub>15</sub> könnte dadurch verursacht werden, dass eIF4A-abhängige mRNAs durch die Silvestrol-induzierte Inhibition der Helikase vermindert translatiert werden. Das wiederum könnte zur Folge haben, dass mehr 43S-PICs für die Translation eIF4A-unabhängiger mRNAs zur Verfügung stehen, was in einer Erhöhung der Translationseffizienz gegenüber der DMSO-Kontrolle resultieren würde. Ein ähnlicher Effekt ist auch bei der in den vorherigen Arbeiten verwendeten Negativkontrolle in Form der 5'-UTR von  $\beta$ -Globin zu beobachten. Auch hier wirkt sich die Behandlung mit Silvestrol in einer Zunahme der Translationseffizienz aus (*Obermann, 2017; Schulte, 2019*).

### 4.2 Vergleich der Wirkungsweise des Naturstoffs Silvestrol mit dem synthetischen Rocaglamid-Derivat CR-31-B (-)

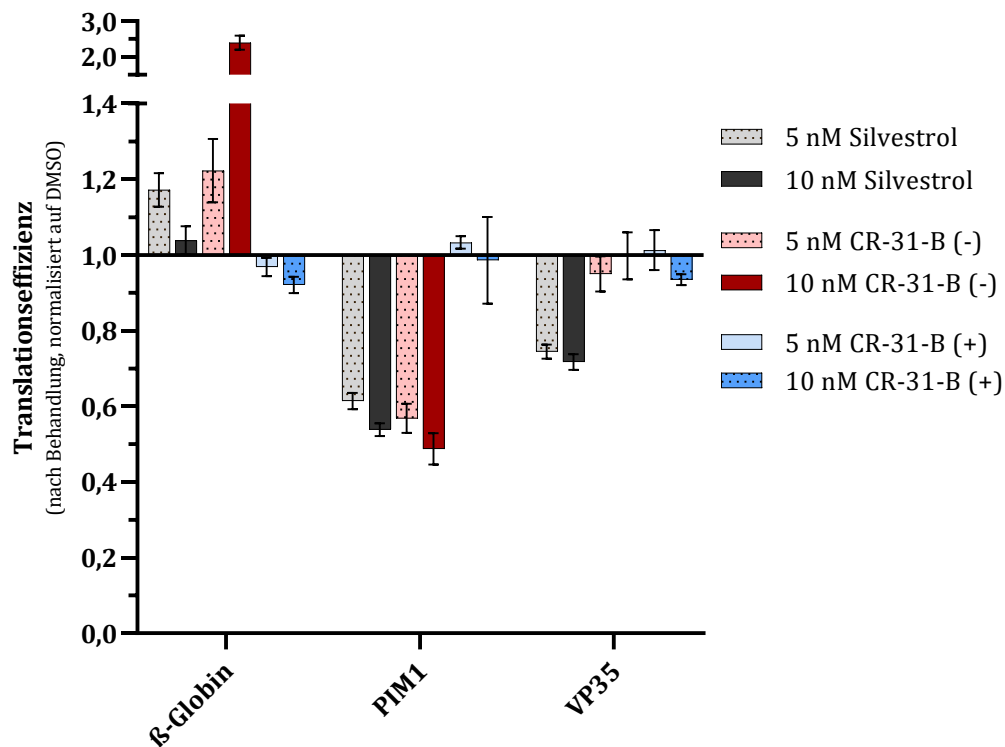
In vorangegangenen Studien wurde die eIF4A-Abhängigkeit durch Messung der Translationseffizienz verschiedener Reporter-mRNAs nach Inhibition von eIF4A mit dem Naturstoff Silvestrol untersucht (Obermann, 2017; Schulte, 2019). In der Arbeitsgruppe um PROF. DR. HANS-GUIDO WENDEL (MSKCC, New York) ist neben Silvestrol auch das synthetische Rocaglamid-Derivat CR-31-B (-) als eIF4A-Inhibitor in der Krebstherapie etabliert (Wolfe et al., 2014). Um zu überprüfen, ob ein synthetisches, weniger komplex strukturiertes Rocaglamid-Derivat einen ähnlichen Effekt auf die Translationseffizienz hat, wie der Naturstoff Silvestrol, sollte daher das synthetische CR-31-B (-) im DLA neben Silvestrol getestet werden. Da der DLA in der Krebszelllinie HepG2 durchgeführt wird, war es notwendig, zuerst die zytotoxischen Eigenschaften von CR-31-B in dieser Zelllinie zu analysieren. Weil Rocaglamid-Derivate für ihre antitumorale Wirkung bekannt sind, ist mit einer Hemmung der Zellproliferation bei geringen Konzentrationen zu rechnen (Hwang et al., 2004). Aus diesem Grund wurden mithilfe eines WST-1-Assays die CC<sub>50</sub>-Werte (*cytotoxic concentration of half-maximal reduction of cell viability*) der beiden Enantiomere sowie des racemischen Gemischs von CR-31-B bestimmt, um im Dual-Luciferase-Assay eine Konzentration, bei der die zytotoxischen Eigenschaften noch unbedenklichen sind, einsetzen zu können (vgl. Abbildung 29). Das inaktive (+)-Enantiomer von CR-31-B zeigt wie zu erwarten kaum zytotoxische Eigenschaften im getesteten Konzentrationsbereich von 0,5 nM bis 1 µM. Bei CR-31-B (-) hingegen sind bereits bei 19,34 nM 50 % der HepG2-Zellen abgetötet. Das racemische Gemisch CR-31-B (rac) ist erwartungsgemäß etwas weniger toxisch als das reine (-)-Enantiomer, liegt mit einem CC<sub>50</sub>-Wert von 46,30 nM jedoch auch noch im niedrigen nanomolaren Bereich. Für Silvestrol wurde in vorherigen Experimenten ein CC<sub>50</sub>-Wert von 19,22 nM in HepG2-Zellen bestimmt, daher war damit zu rechnen, dass sich der CC<sub>50</sub>-Wert des Rocaglamid-Derivats CR-31-B (-) in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wiederfindet (Schulte, 2019). Auch stehen die erhaltenen Ergebnisse im Einklang mit bereits publizierten Studien aus der Krebsforschung, bei denen CR-31-B (-) bereits im niedrigen nanomolaren Bereich (~25 nM) eine antitumorale Wirkung zeigte (Wolfe et al., 2014).



**Abbildung 29: WST-1-Assay von CR-31-B (+), CR-31-B (-) und CR-31-B (rac) in HepG2-Zellen zur Bestimmung der  $CC_{50}$ -Werte.** Die Proliferation der HepG2-Zellen wurde 48 Stunden nach Behandlung der HepG2-Zellen mit dem jeweiligen Rocaglamid-Derivat mithilfe eines WST-1-Assays bestimmt. Der  $CC_{50}$ -Wert entspricht der Konzentration, bei der 50 % der Zellen abgetötet sind. Während das (+)-Enantiomer im getesteten Konzentrationsbereich nahezu keine Zytotoxizität aufweist, liegt der  $CC_{50}$ -Wert des (-)-Enantiomers bei 19,34 nM. Das racemische Gemisch CR-31-B (rac) ist mit einem  $CC_{50}$ -Wert von 46,30 nM etwas weniger toxisch.

Da der  $CC_{50}$ -Wert von CR-31-B (-) im gleichen Konzentrationsbereich wie der von Silvestrol liegt, wurden für den DLA die bereits für Silvestrol bewährten Konzentrationen von 5 nM und 10 nM gewählt. Um im nächsten Schritt die eIF4A-Spezifität von CR-31-B (-) zu überprüfen, wurde zunächst die Translationseffizienz der bereits etablierten Positiv- und Negativkontrollen im DLA vermessen. Als Positivkontrolle diente die 5'-UTR des Protoonkogens *PIM1*, für das bereits eine durch Silvestrol induzierte Inhibition von eIF4A beschrieben werden konnte (Schatz *et al.*, 2011). Als Negativkontrolle wurde die 5'-UTR von  $\beta$ -Globin eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Haushaltsgen, das konstitutiv exprimiert wird und dessen Translationsinitiation eIF4A-unabhängig abläuft (Thellin *et al.*, 1999). Um auch die antivirale Aktivität von Silvestrol und CR-31-B (-) im DLA vergleichen zu können, wurde die 5'-UTR von VP35 der Ebolavirus-mRNA als Modellsystem gewählt, da diese verhältnismäßig kurz ist und auch in den vorherigen Studien zur Testung von Variationen der Haarnadelstruktur im DLA eine moderate Herunterregulation der Translationseffizienz bei Inhibition von eIF4A mit Silvestrol gezeigt hat. Die gemessenen Translationseffizienzen in Gegenwart der 5'-UTRs

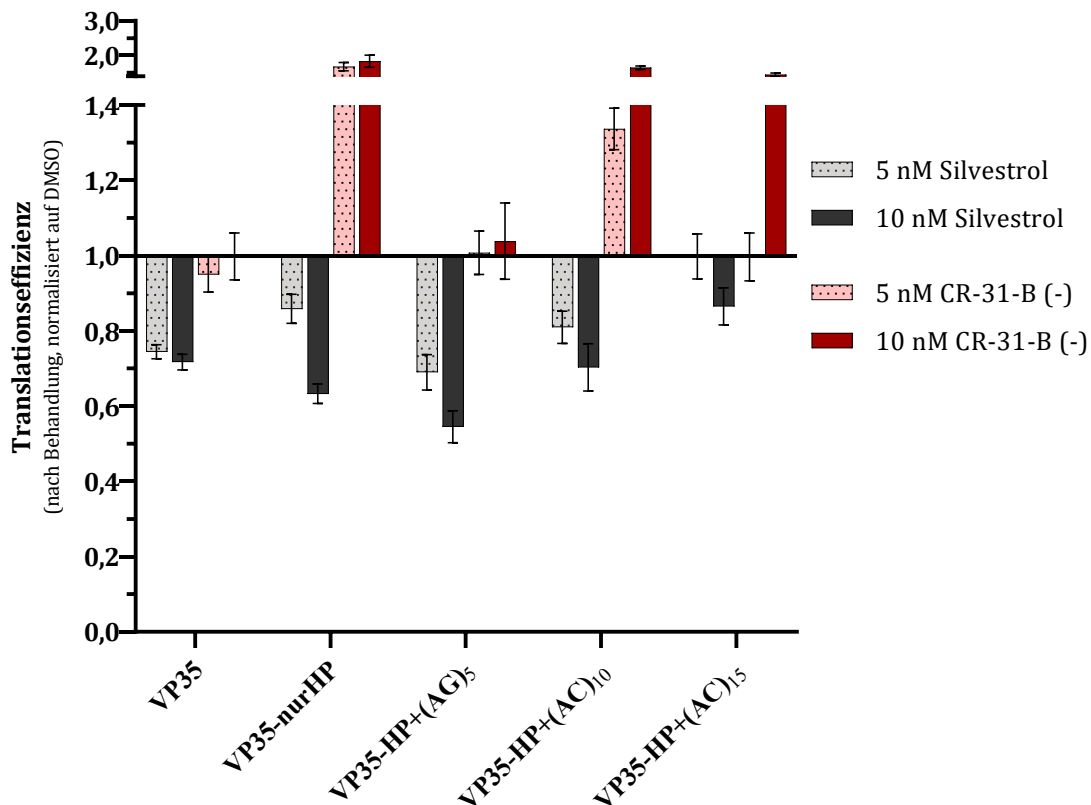
von  $\beta$ -Globin, PIM1 und VP35 zum Vergleich der Aktivitäten von Silvestrol und CR-31-B sind in Abbildung 30 dargestellt. Die Mittelwerte der gemessenen Translationseffizienzen sowie eine Übersicht über die RNA-Sekundärstrukturvorhersagen der getesteten 5'-UTRs inklusive einiger sequenzspezifischer Eigenschaften sind in Tabelle A.1 und Tabelle A.2 des Anhangs zu finden.



**Abbildung 30:** DLA in HepG2-Zellen mit den 5'-UTRs von  $\beta$ -Globin, PIM1 und VP35 zum Vergleich der Aktivitäten des Naturstoffs Silvestrol (grau) mit dem synthetischen Rocaglamid-Derivat CR-31-B (-) (rot) und dessen inaktivem Enantiomer CR-31-B (+) (blau). Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol, CR-31-B (-) oder CR-31-B (+), normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Zunächst ist zu erkennen, dass CR-31-B (+) keinen Effekt auf die Translationseffizienz ausübt. Sowohl mit der Negativkontrolle  $\beta$ -Globin als auch der Positivkontrolle PIM1 sowie der viralen 5'-UTR von VP35 sind kaum Unterschiede in der Translationseffizienz verglichen mit der DMSO-Kontrolle zu detektieren. Die Werte der Translationseffizienzen liegen für alle Konstrukte im Bereich von eins. Daraus ist abzuleiten, dass CR-31-B (+) keine Inhibition von eIF4A induziert. Andernfalls wäre eine Herunterregulation der Negativkontrollen, wie sie mit Silvestrol zu beobachten ist, zu erwarten. Das (-)-Enantiomer hingegen zeigt eine Hochregulation der Translationseffizienz im Kontext

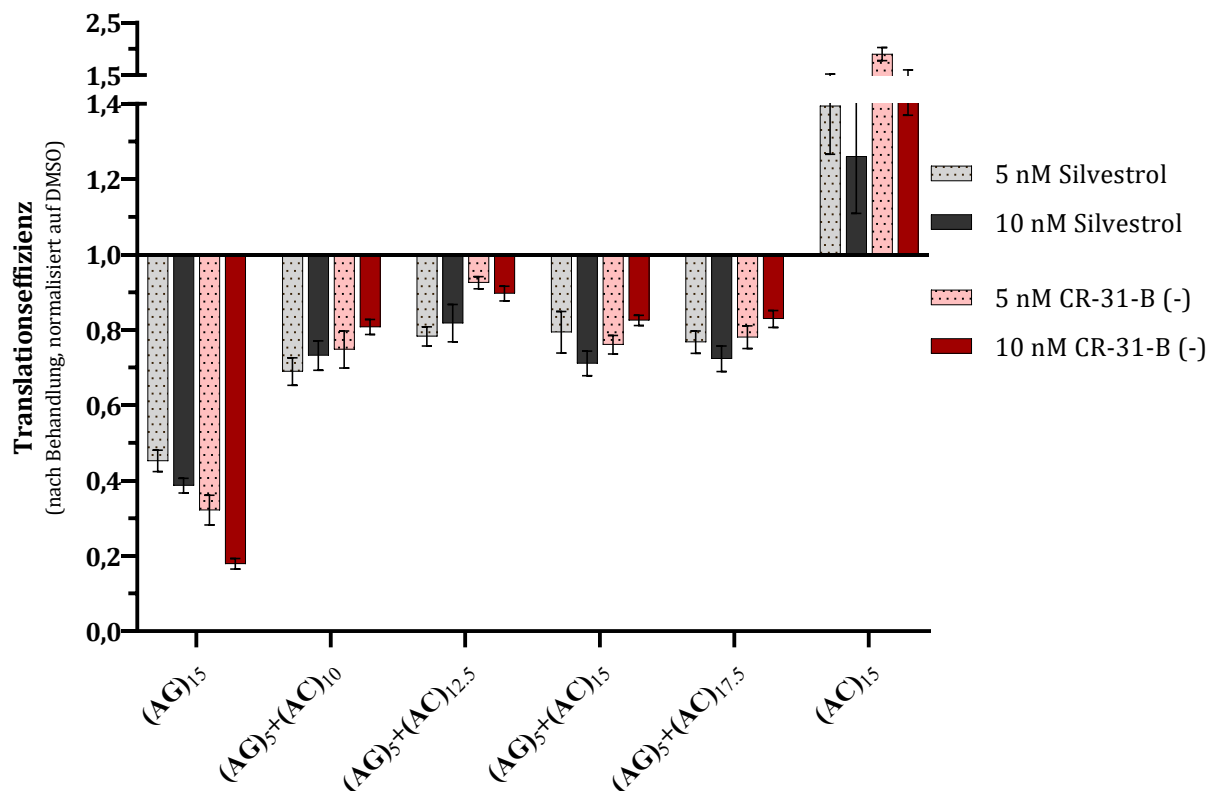
der  $\beta$ -Globin-5'-UTR, gleichzeitig wird die Translationseffizienz der Positivkontrolle PIM1 um etwa 50 % herunterreguliert. Das deutet darauf hin, dass auch CR-31-B (-) in diesem Assay eine eIF4A-inhibierende Wirkung zeigt, da die eIF4A-abhängige Translation von PIM1 in Gegenwart von CR-31-B (-) vermindert ist. Ein Unterschied zwischen dem natürlichen und dem synthetischen eIF4A-Inhibitor ist im Falle der viralen 5'-UTR von VP35 zu beobachten. Während mit Silvestrol eine moderate Reduktion der Translationseffizienz um 25 – 30 % gemessen werden kann, wird die durch die VP35-5'-UTR vermittelte Translationseffizienz in Gegenwart von CR-31-B (-) kaum beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass die beiden Rocaglamid-Derivate sich in ihrer Wirkweise unterscheiden und ggf. unterschiedliche RNA-Substrate für eine effiziente Inhibition von eIF4A bevorzugen. Um diesem Phänomen weiter nachzugehen, wurden einige der zuvor bereits mit Silvestrol untersuchten Varianten des VP35-Hairpins, flankiert mit einer Polypurin-Sequenz oder einer alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenz, gleichermaßen im DLA in Gegenwart von CR-31-B (-) vermessen (vgl. Abbildung 31).



**Abbildung 31: DLA in HepG2-Zellen mit Variationen der VP35-Haarnadelstruktur zum Vergleich der Aktivitäten von CR-31-B (-) und Silvestrol.** Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol oder CR-31-B (-), normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Hier ist zu erkennen, dass weder die Translationseffizienz durch die Haarnadelstruktur alleine (VP35-nurHP) noch durch die Haarnadelstruktur in Kombination mit einer 10 bp langen Polypurin-Sequenz (VP35-HP+(AG)<sub>5</sub>) von CR-31-B (-) herunterreguliert wird. Jedoch ist in Gegenwart des Polypurin-Stretches kein Anstieg der Translationseffizienz gegenüber der DMSO-Kontrolle zu vermerken, wie es für VP35-nurHP der Fall ist. Dennoch ist es verwunderlich, dass mit CR-31-B (-) trotz des Polypurin-Stretches keine Verminderung der Translationseffizienz beobachtet werden kann. Eine Begründung hierfür könnte die fehlende Dioxan-Gruppe sein, die nur bei Silvestrol zu finden ist, nicht aber bei CR-31-B. Möglicherweise kann CR-31-B (-) in Gegenwart der Haarnadelstruktur wegen des fehlenden Dioxan-Rings keine stabile Fixierung der Bindung von eIF4A an die RNA ermöglichen. Silvestrol hingegen könnte mit der Dioxan-Gruppe eine zusätzliche Interaktion ausbilden und so auch RNA-Strukturen direkt an eIF4A fixieren (*Müller, Obermann, Schulte, et al., 2020*). Um diese Hypothese zu bekräftigen, bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen, weshalb diese Annahme in einem späteren Kapitel nochmals ausführlicher und anschaulicher diskutiert wird (vgl. Kapitel 4.7). Da mit dem Anhängen alternierender Purin-Pyrimidin-Sequenzen an den VP35-Hairpin in Gegenwart von Silvestrol bereits eine Neutralisation der Translationseffizienz hin zur DMSO-Kontrolle registriert wurde, war nicht zu erwarten, dass mit CR-31-B (-) eine Herunterregulation zu erkennen ist. Dies spiegeln auch die gemessenen Translationseffizienzen, vermittelt durch VP35-HP+(AC)<sub>10</sub> und VP35-HP+(AC)<sub>15</sub>, wider. Hier zeigt sich erneut eine Hochregulation der Translationseffizienz, die vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass andere durch CR-31-B (-) inhibierte, eIF4A-abhängige mRNAs nicht mehr translatiert werden können, was sich in einer Zunahme der Translationseffizienz der untersuchten Konstrukte äußert, deren Translation nicht auf eIF4A angewiesen ist. Damit auch mit CR-31-B (-) eine isolierte Aussage über den Einfluss von Polypurin-Sequenzen bzw. alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenzen getroffen werden kann, wurden die 30 bp langen Sequenzen (AG)<sub>15</sub> und (AC)<sub>15</sub> in Gegenwart des synthetischen Rocaglamid-Derivats im DLA vermessen. Da zuvor beobachtet werden konnte, dass mit dem Anhängen eines Purin-Pyrimidin-Stretches die vorhergesagte eIF4A-Abhängigkeit verloren geht, wurde diesmal eine alternierende Purin-Pyrimidin-Sequenz mit zunehmender Länge an eine 10 bp lange Polypurin-Sequenz angefügt ((AG)<sub>5</sub>+(AC)<sub>n</sub>) (vgl. Abbildung 32). Erwartungsgemäß sollte hierbei eine Normalisierung der Translationseffizienz in Richtung der DMSO-Kontrolle erfolgen. Ähnlich wie mit Silvestrol ist in Gegenwart der

Polypurin-Sequenz (AG)<sub>15</sub> eine deutliche Reduktion der Translationseffizienz um über 80 % auf einen Wert von 0,18 (± 0,01) mit 10 nM CR-31-B (-) zu erkennen. Die Sequenz, bestehend aus den alternierenden Purin- und Pyrimidinbasen Adenin und Cytosin (AC)<sub>15</sub>, zeigt ebenfalls den erwarteten Effekt der Hochregulation der Translationseffizienz.



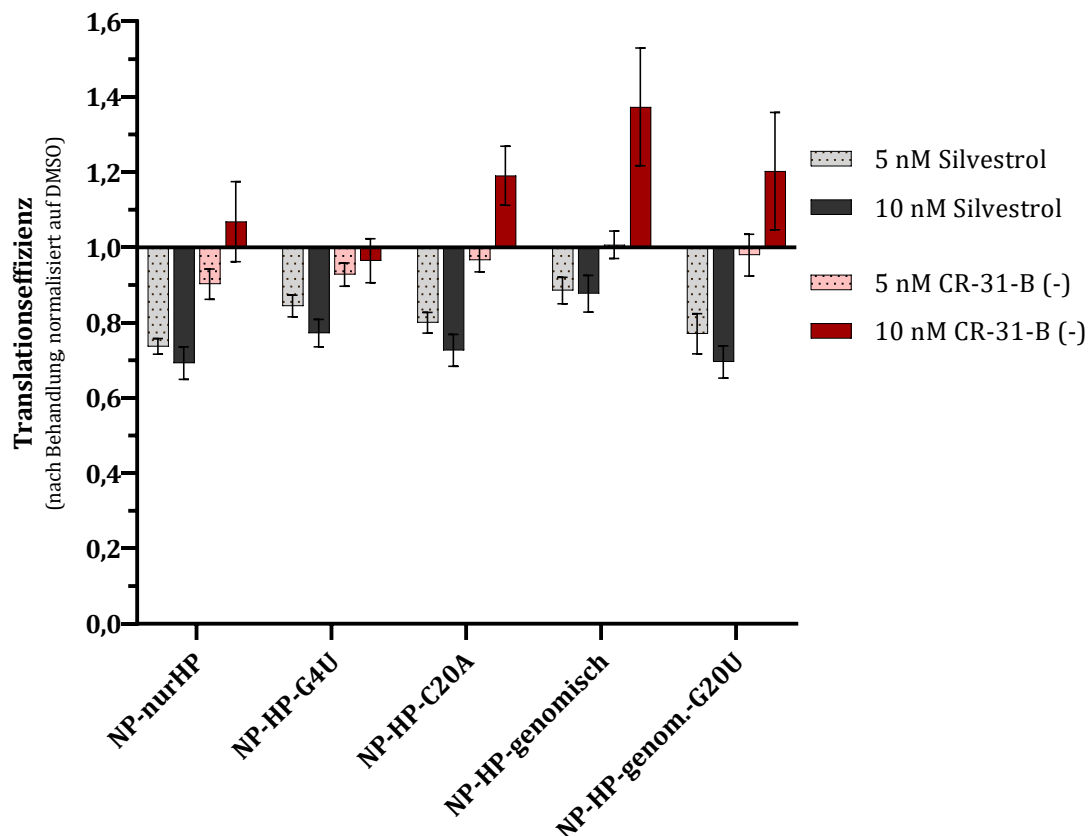
**Abbildung 32: DLA in HepG2-Zellen mit Polypurin- und alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenzen zum Vergleich der Aktivität von CR-31-B (-) und Silvestrol.** Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol oder CR-31-B (-), normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen (n ≥ 3).

Für die 10 bp lange Polypurin-Sequenz, die von einem AC-Stretch zunehmender Länge flankiert wird, sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Zwar wird die Translationseffizienz für den 25 bp langen AC-Stretch (AG)<sub>5</sub>+(AC)<sub>12.5</sub> sowohl mit Silvestrol als auch mit CR-31-B (-) am wenigsten durch die Rocaglamid-Derivate beeinflusst, jedoch lässt sich kein eindeutiger Trend für eine Zunahme oder Abnahme der Länge des Purin-Pyrimidin-Stretches abzeichnen. Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Konstrukten mit dem 5'-terminalen VP35-Hairpin unterscheiden sich die Effekte von CR-31-B (-) und Silvestrol in dieser Serie nur marginal. Auch ist mit CR-31-B (-) diesmal eine Herunterregulation der Translationseffizienz trotz Anhängen

des AC-Stretches zu sehen, was die Hypothese bekräftigt, dass die Unterschiede zwischen Silvestrol und CR-31-B (-) in der Affinität gegenüber RNA-Substraten mit Duplex-Bereichen zu finden sein könnten. In diesem Kontext wurde eine weitere Haarnadelstruktur des Ebolavirus-Genoms, der NP-*Hairpin*, als Modellsystem gewählt. Da in den vorherigen Arbeiten mit der 5'-UTR von NP, die eine Gesamtlänge von 414 bp aufweist, wenig Rückschlüsse in Bezug auf einzelne Sequenz- bzw. Strukturveränderungen gezogen werden konnten, wurde in diesem Falle die Haarnadelstruktur isoliert von der restlichen NP-5'-UTR betrachtet (Obermann, 2017; Schulte, 2019). Da in der Arbeitsgruppe HARTMANN auch die Transkription und Replikation des Ebolavirus erforscht wird, wurde zudem nicht nur die NP-Haarnadelstruktur auf mRNA-Ebene (NP-nurHP) inspiziert, sondern zusätzlich auch die genomische Sequenz des NP-*Hairpins* (NP-HP-genomisch), die zwar komplementär zur mRNA ist, aber eine andere Sekundärstruktur ausbildet, im DLA vermessen. Hinzu kommen die Mutationen an Position 4 (NP-HP-G4U) und an Position 20 (NP-HP-C20A bzw. NP-HP-genom.-G20U), die eine Destabilisierung bzw. vollständige Auflösung der Haarnadelstruktur bewirken (vgl. Tabelle A.5 im Anhang). Wie in Abbildung 33 zu erkennen ist, sind abermals Unterschiede zwischen Silvestrol und CR-31-B (-) zu beobachten. Während mit Silvestrol in Gegenwart aller Variationen des NP-*Hairpins* eine verminderte Translationseffizienz gegenüber der DMSO-Kontrolle erfasst werden kann, hat CR-31-B (-) entweder nahezu keinen Effekt auf die Translationseffizienz oder verursacht eine Zunahme dieser. Interessanterweise übt Silvestrol in Gegenwart der unstrukturierten Modifikation NP-HP-genom.-G20U einen stärkeren Effekt auf die Translationseffizienz aus als in Gegenwart der nativen genomischen Haarnadelstruktur (NP-HP-genomisch). Diese Reduktion der Translationseffizienz, die durch Silvestrol verursacht wird, kann demnach nicht ausschließlich auf die Sekundärstruktur zurückzuführen sein, sondern muss außerdem durch sequenzspezifische Parameter hervorgerufen werden. Bezüglich der Mutationen an Position 4 und an Position 20 des NP-*Hairpins* auf mRNA-Ebene ist eine leichte Abschwächung der durch Silvestrol induzierten Herunterregulation der Translationseffizienz zu erkennen. Da die Haarnadelstruktur bei beiden Modifikationen bestehen bleibt und lediglich der Stammbereich an wenigen Positionen durch einen *internal loop* unterbrochen wird, sollte die durch Silvestrol verursachte Reduktion der Translationseffizienz auch für die Mutationen in einem ähnlichen Ausmaß bestehen bleiben. Angesichts dieser Vermutung, entsprechen die Ergebnisse der Mutationen NP-HP-G4U und NP-HP-C20A also den



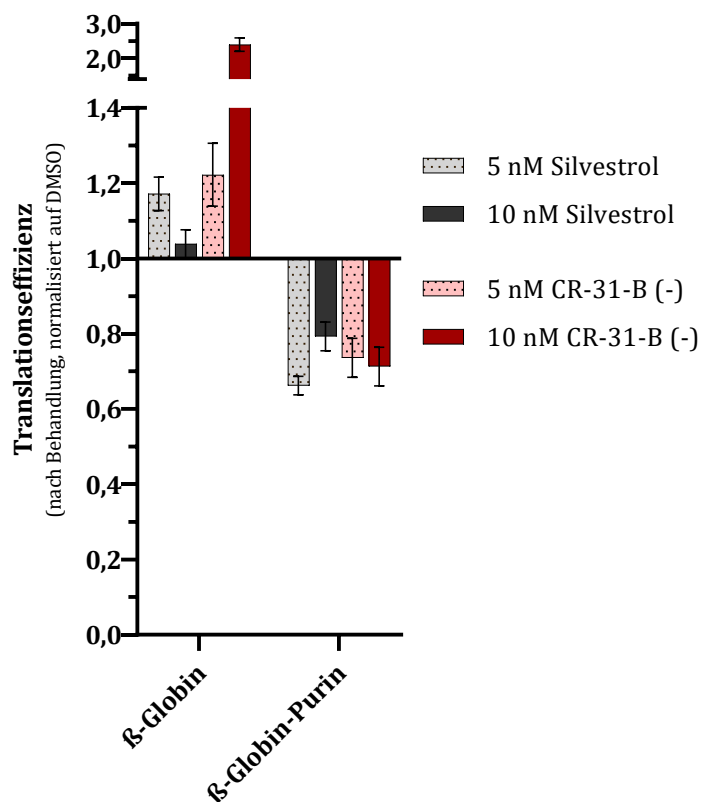
Erwartungen. Was CR-31-B (-) angeht, sind Aussagen hinsichtlich der Affinität zu unterschiedlichen Sequenz- oder Strukturelementen, die innerhalb der NP-Konstrukte zu finden sind, nur begrenzt abzuleiten. Zwar kann mit 5 nM CR-31-B (-) für die NP-Haarnadelstrukturen auf mRNA-Ebene eine minimale Reduktion der Translations-effizienz um maximal 10 % festgestellt werden, jedoch sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Variationen auszumachen.



**Abbildung 33: DLA in HepG2-Zellen mit Variationen des NP-Hairpins zum Vergleich der Aktivität von CR-31-B (-) und Silvestrol gegenüber Sekundärstrukturen.** Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol oder CR-31-B (-), normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Aus diesem Grund wurde mit einem neuen Ansatz fortgefahren, der sich mit einer künstlich herbeigeführten eIF4A-Abhängigkeit beschäftigen sollte. Hier sollte überprüft werden, ob durch das Einfügen einer Polypurin-Sequenz in eine 5'-UTR, die weder durch Silvestrol noch durch CR-31-B (-) beeinflusst wird, eine eIF4A-Abhängigkeit induziert werden kann. Als Modellsystem wurde auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Globin zurückgegriffen. Um die Sequenz und die damit einhergehenden Eigenschaften wie Stabilität oder Länge

weitestgehend beizubehalten, wurden lediglich vier Positionen am 5'-Ende sowie eine Position am 3'-Ende der 5'-UTR von  $\beta$ -Globin mutiert. Daraus ergibt sich ein 7 bp langer Polypurin-Stretch am 5'-Ende sowie ein 5 bp langer AG-Stretch am 3'-Ende der 5'-UTR ( $\beta$ -Globin-Purin). Die Gesamtlänge von 50 bp bleibt bestehen und auch die minimale freie Energie (*minimum free energy*, MFE) verändert sich von ursprünglich -10,10 kcal/mol auf -10,30 kcal/mol kaum. Ein Unterschied in der Translationseffizienz sollte somit hauptsächlich auf die Sequenzänderung zurückzuführen sein.

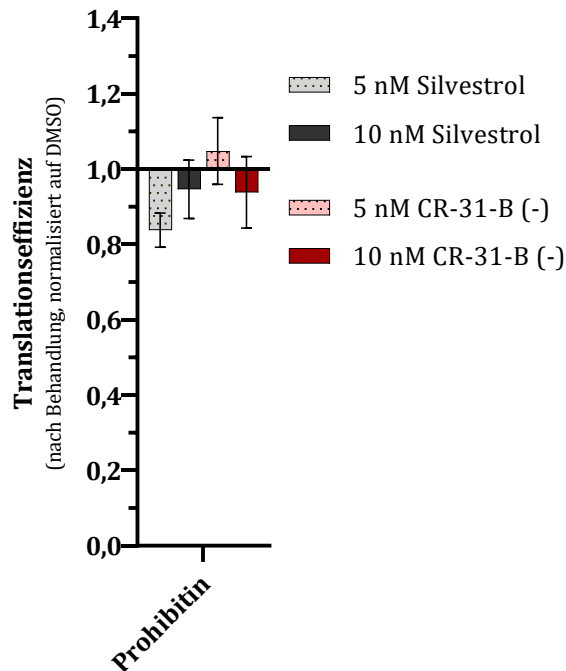


**Abbildung 34: DLA in HepG2-Zellen zur Untersuchung des Einflusses von Polypurin-Sequenzen innerhalb eIF4A-unabhängiger RNA-Strukturen.** Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol oder CR-31-B (-), normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Erwartungsgemäß kann für die Polypurin-angereicherte Variante von  $\beta$ -Globin eine signifikante Herunterregulation der Translationseffizienz mit beiden Rocaglamid-Derivaten beobachtet werden (vgl. Abbildung 34). Das lässt erneut Grund zu der Annahme, dass die Rocaglamid-Derivate mit erhöhter Affinität die Bindung von eIF4A an Polypurin-Sequenzen fixieren, wie es auch in einer Publikation von PELLETIER und PORCO

beschrieben wurde (*Chu et al.*, 2019). Dieser Effekt soll jedoch ausgeprägter für Derivate wie CR-31-B (-) sein, die nicht über den Dioxan-Rest verfügen.

Abseits von der Inhibition von eIF4A und den daraus abgeleiteten Affinitäten zu bestimmten RNA-Sequenz- oder -Strukturelementen wird den Rocaglamid-Derivaten auch eine Bindung an Prohibitine (PHB) nachgesagt. Diese resultiert in einer Inhibition des Raf-MEK-ERK-Signalwegs, welcher wiederum mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht wird (*Polier et al.*, 2012). Hier stellte sich die Frage, ob die Inhibition von Prohibitin tatsächlich direkt über die Bindung des Rocaglamid-Derivats an Prohibitin stattfindet oder ob es sich ggf. um eine indirekte Inhibition handelt, die auf eine eIF4A-abhängige Translation der *Prohibitin*-mRNA zurückzuführen ist. Wenn Prohibitin eIF4A-abhängig translatiert werden würde, könnte eine Rocaglamid-induzierte Inhibition von eIF4A die Translation hemmen und somit die Prohibitin-Level in der Zelle senken. Daher wurde die 5'-UTR von Prohibitin im DLA mit Silvestrol und CR-31-B (-) untersucht. Sollte eine Herunterregulation der Translationseffizienz zu beobachten sein, wäre dies ein Grund zu der Annahme, dass die postulierte Inhibition von Prohibitin durch die Rocaglamid-Derivate indirekt über eine Inhibition von eIF4A herbeigeführt wird. Entgegen der Vermutung kann weder mit Silvestrol noch mit CR-31-B (-) eine Verminderung der Translationseffizienz von Prohibitin detektiert werden (vgl. Abbildung 35). Die Translationseffizienzen unterscheiden sich nur minimal von den DMSO-Kontrollen und lassen daher keine eIF4A-Abhängigkeit von Prohibitin vermuten. Die postulierte Bindung der Rocaglamid-Derivate an Prohibitin könnte demnach tatsächlich auf Protein-Ebene stattfinden. Eine andere mögliche Erklärung könnte eine indirekte Senkung der Prohibitin-Spiegel durch eIF4A-sensitive mRNAs bzw. Proteine sein. Eine Behandlung mit Rocaglamid-Derivaten würde demnach eine verminderte Translation eIF4A-sensitiver mRNAs zur Folge haben. Diese eIF4A-sensitiven mRNAs könnten für Proteine codieren, die wiederum in die Regulation bestimmter Stoffwechselwege oder Funktionskaskaden von Prohibitinen involviert sind und könnten somit eine Hemmung von Prohibitin hervorrufen. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen indirekten Effekt handelt, jedoch scheint dieser nicht in einer eIF4A-abhängigen Translation von Prohibitin begründet zu sein.



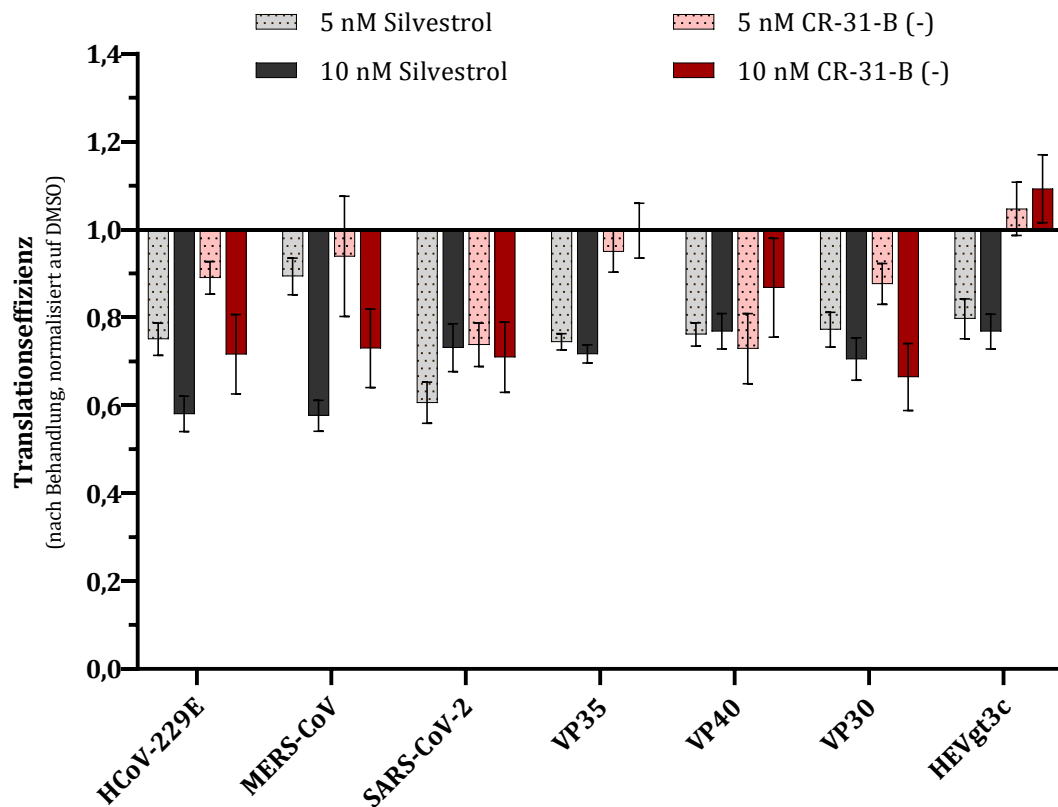
**Abbildung 35: DLA in HepG2-Zellen zur Untersuchung der Translationseffizienz vermittelt durch die 5'-UTR von Prohibitin in Gegenwart der eIF4A-Inhibitoren Silvestrol und CR-31-B (-).** Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol oder CR-31-B (-), normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen (n ≥ 3).

Davon abgesehen weist die 5'-UTR von Prohibitin interessanterweise einen sehr hohen Purin-Gehalt von 69 % auf. Darunter ist unter anderem auch ein 9 bp langer Polypurin-Stretch am 3'-Ende der 5'-UTR zu finden. Aufgrund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse über durch Polypurin-Sequenzen induzierte Bindungen von Rocaglamid-Derivaten an eIF4A wäre auch in dieser Hinsicht mit einer eIF4A-Abhängigkeit von Prohibitin zu rechnen gewesen. Damit scheint es sich bei der Identifikation von RNA-Sequenz- und -Strukturelementen in der 5'-UTR von Prohibitin im Kontext der Inhibition von eIF4A mit Rocaglamid-Derivaten doch eher um ein komplexeres Zusammenspiel bestimmter RNA-Beschaffenheiten zu handeln, als dass die beobachteten Effekte in diesem Falle auf eine definierte Sequenz oder Struktur zurückgeführt werden können.

### 4.3 eIF4A als antivirale Zielstruktur

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits gezeigt werden konnte, lassen sich mithilfe des Dual-Luciferase-Assays relativ zuverlässig Aussagen über eine potentielle eIF4A-Abhängigkeit der untersuchten RNA-Strukturen oder -Sequenzen treffen. Aus diesem Grund sollte dieser Assay genutzt werden, um eine eIF4A-Abhängigkeit verschiedener RNA-Viren vorherzusagen. Anstelle der sonst größtenteils artifiziellen Konstrukte soll daher in diesem Abschnitt das Spektrum viraler 5'-UTRs erweitert werden, um so potentiell eIF4A-abhängige Virus-Spezies zu identifizieren, für die eine Validierung von Silvestrol oder CR-31-B (-) als antiviraler Wirkstoff in Frage kommen könnte. Während zuvor bereits über 5'-UTR-Sequenzen aus dem Ebolavirus-Genom sowie über die 5'-UTRs von HCoV-229E und MERS-CoV eine Herunterregulation der Translationseffizienz im DLA mit Silvestrol beobachtet werden konnte, sollten diese Vertreter gleichermaßen hinsichtlich einer potentiellen CR-31-B (-)-Sensitivität getestet werden. Hinzu kommt das neuartige SARS-CoV-2, das einige Ähnlichkeiten zum MERS-CoV aufweist und daher ebenfalls potentiell eIF4A-abhängig translatiert werden könnte. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Silvestrol eine antivirale Aktivität gegenüber Hepatitis-E-Viren ausübt. Diese äußerte sich u. a. in einer Inhibition der Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln, weshalb der in dieser Studie verwendete Genotyp 3c des Hepatitis-E-Virus (HEVgt3c) im Reporter-Assay mit Silvestrol und CR-31-B (-) analysiert werden sollte (Glitscher *et al.*, 2018). Was die 5'-UTRs der humanpathogenen Coronaviren HCoV-229E, MERS-CoV und SARS-CoV-2 angeht, kann sowohl mit Silvestrol als auch mit CR-31-B (-) eine Reduktion der Translationseffizienz registriert werden (vgl. Abbildung 36). Größtenteils ist hier die Herunterregulation der Translationseffizienz mit Silvestrol ausgeprägter als mit CR-31-B (-). Für die 5'-UTR von MERS-CoV fluktuiert die Translationseffizienz trotz mehrerer biologischer Replikate mit 5 nM CR-31-B (-) sehr stark, was sich in den hohen Fehlerbalken ausdrückt (TE:  $0,94 \pm 0,14$ ), weshalb hier keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Interessant ist, dass auch die 5'-UTR von SARS-CoV-2 sensitiv gegenüber der Behandlung mit den Rocaglamid-Derivaten reagiert, was die weitere Testung der antiviralen Aktivität der Rocaglamid-Derivate gegen SARS-CoV-2 vielversprechend aussehen lässt. Tatsächlich konnten diese Vermutungen in einer Kooperation mit DR. CHRISTIN MÜLLER (AG ZIEBUHR, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) bestätigt werden. In SARS-CoV-2-infizierten Vero E6-Zellen konnte mit CR-31-B (-) die Virusreplikation mit einem EC<sub>50</sub>-Wert (*half maximal*

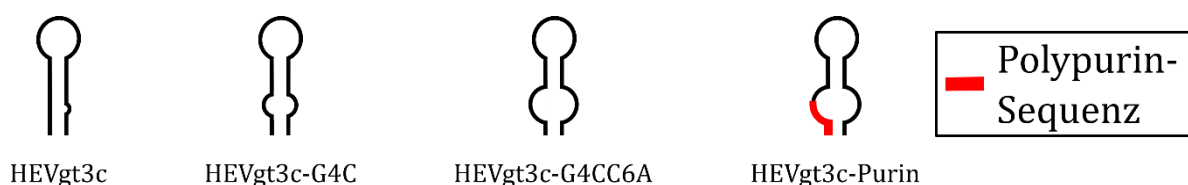
effective concentration) von 1,8 nM inhibiert werden (Müller, Obermann, Karl, et al., 2020 unter Begutachtung). Außerdem konnte der Virustiter in einem *ex vivo* Infektionsmodell mit humanen Atemwegsepithelzellen mit CR-31-B (-) auf nahezu nicht detektierbare Level herabgesetzt werden.



**Abbildung 36: DLA in HepG2-Zellen zur Abschätzung der antiviralen Aktivität von Silvestrol und CR-31-B (-) gegenüber RNA-Viren.** Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol oder CR-31-B (-), normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

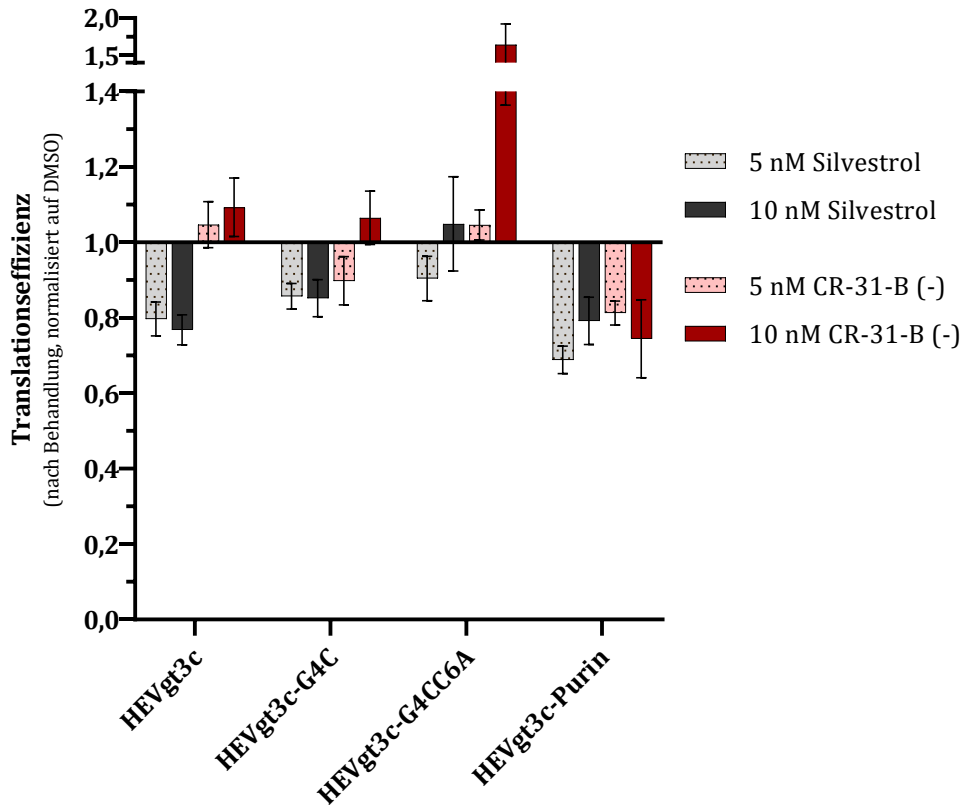
Wie bereits zuvor festgestellt wurde, kann für die 5'-UTR von VP35 des Ebolavirus-Genoms mit CR-31-B (-) im Gegensatz zu Silvestrol keine signifikante Verminderung der Translationseffizienz im DLA observiert werden. Dem entgegen zeigen die 5'-UTRs von VP30 und VP40 des Ebolavirus-Genoms mit CR-31-B (-) eine Reduktion der Translationseffizienz um 12 % – 34 % (vgl. Tabelle A.1 im Anhang). Bezüglich der 5'-UTR von HEVgt3c ist ein divergenter Effekt zu registrieren. Während die Translationseffizienz durch die 5'-UTR von HEVgt3c in Gegenwart von Silvestrol moderat herabgesenkt wird, hat die Behandlung mit CR-31-B (-) fast keine Auswirkungen auf die Translationseffizienz verglichen mit der DMSO-Kontrolle. Da die 5'-UTR von HEVgt3c mit 25 bp relativ kurz ist und eine Haarnadelstruktur ausbildet, könnte diesem Ergebnis ein ähnlicher Effekt

zugrunde liegen, wie er auch beim NP-*Hairpin* oder dem VP35-*Hairpin* beobachtet wurde. Die Unterschiede zwischen Silvestrol und CR-31-B (-) machen sich somit vor allem in Gegenwart kurzer, strukturierter Haarnadelstrukturen bemerkbar, die gegenüber Silvestrol sensitiv, aber gegenüber CR-31-B (-) resistent zu reagieren scheinen. Dies bekräftigt abermals, dass die Inhibition von eIF4A mit Silvestrol auch in Gegenwart von Duplexstrukturen möglich sein könnte. Mit CR-31-B (-) dagegen scheinen überwiegend einzelsträngige RNA-Strukturen, bevorzugt mit Polypurin-Sequenzen, an eIF4A festgeklemmt zu werden, wie es in der Kristallstruktur von eIF4A im Komplex mit der Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub>, dem ATP-Analog AMP-PNP und dem Rocaglamid-Derivat RocA gezeigt ist (vgl. PDB: 5ZC9) (Iwasaki et al., 2019; Müller, Obermann, Schulte, et al., 2020). Auch die Haarnadelstruktur von HEVgt3c kann mit wenigen Mutationen destabilisiert werden (vgl. Abbildung 37). So führt die Substitution des Guanins an Position 4 durch ein Cytosin (HEVgt3c-G4C) beispielsweise zu einer Abnahme der MFE von -11,10 kcal/mol auf -8,30 kcal/mol. Wird zusätzlich das Cytosin an Position 6 durch ein Adenin ersetzt (HEVgt3c-G4CC6A) beträgt die MFE nur noch -3,30 kcal/mol und der Duplexbereich der Haarnadelstruktur wird durch einen großen *internal loop* unterbrochen. Sofern der Duplexbereich für die mit Silvestrol beobachtete Herunterregulation der Translations-effizienz also von Bedeutung ist, sollte mit den Destabilisierungen des Stammbereichs eine Abnahme des Silvestroreffektes zu beobachten sein. Um die erhöhte Affinität von CR-31-B (-) zu Polypurin-Sequenzen zu bestätigen, wurden abermals Mutationen an drei Positionen eingeführt, die in einem 8 bp langen Polypurin-Stretch am 5'-Ende der 5'-UTR von HEVgt3c resultieren (HEVgt3c-Purin). Die Gesamtlänge von 25 bp wurde beibehalten, die MFE liegt mit -3,80 kcal/mol in einem ähnlichen Bereich wie die von HEVgt3c-G4CC6A (vgl. Tabelle A.5 im Anhang).



**Abbildung 37: Schematische Darstellung der Variationen der HEVgt3c-Konstrukte.** In Rot: Polypurin-Sequenz.

Wie zu erwarten normalisiert sich die durch Silvestrol verursachte Reduktion der Translationseffizienz mit zunehmender Destabilisierung der Haarnadelstruktur in Richtung der DMSO-Kontrolle (vgl. Abbildung 38).



**Abbildung 38: DLA in HepG2-Zellen mit Modifikationen der 5'-UTR von HEVgt3c zum Vergleich der Aktivität von CR-31-B (-) und Silvestrol gegenüber Sekundärstrukturen.** Dargestellt ist die Translationseffizienz nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol oder CR-31-B (-), normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Mit CR-31-B (-) ist wie zu erwarten kein Effekt auf die Translationseffizienz von HEVgt3c-G4C oder HEVgt3c-G4CC6A zu detektieren, abgesehen von einer Hochregulation der Translationseffizienz von HEVgt3c-G4CC6A mit 10 nM CR-31-B (-). Die Translationseffizienz von HEVgt3c-Purin wird sowohl mit Silvestrol als auch mit CR-31-B (-) inhibiert, was sich in einer Reduktion um bis zu 31 % gegenüber der DMSO-Kontrolle äußert. Dies bekräftigt die Vermutung, dass CR-31-B (-) eine Polypurin-Sequenz innerhalb der RNA zur Inhibition von eIF4A benötigt. Silvestrol dagegen kann wahrscheinlich auch in Gegenwart von Haarnadelstrukturen an eIF4A binden. Werden diese Sekundärstrukturen destabilisiert, scheint die Bindung von Silvestrol an eIF4A abgeschwächt zu werden.

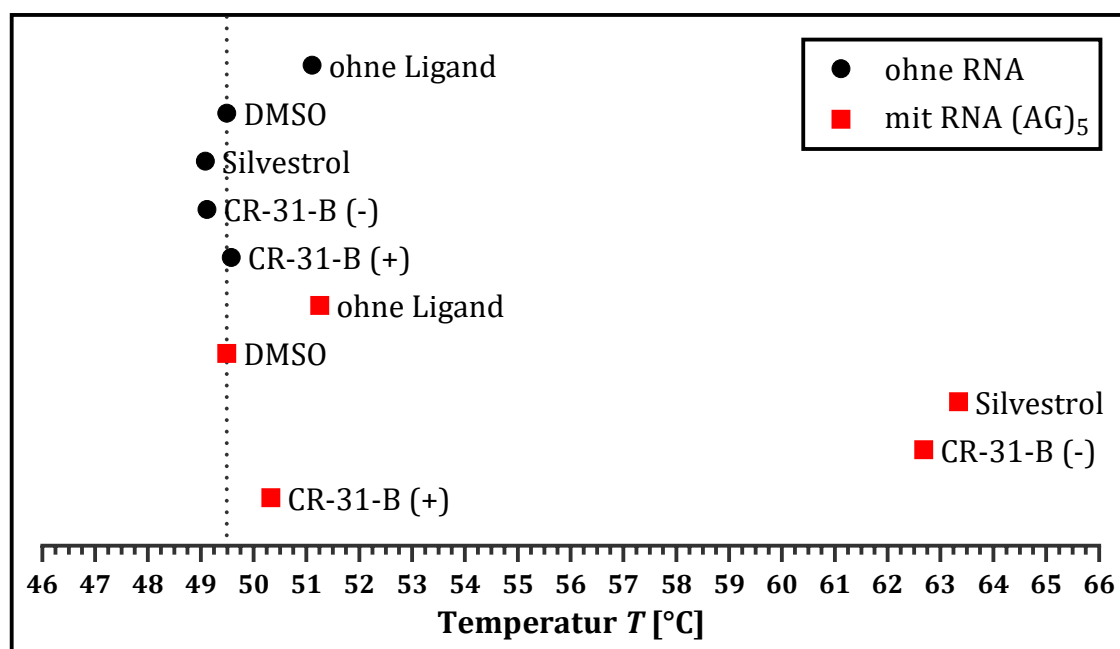


## 4.4 Biochemische Charakterisierung der Interaktion von Rocaglamid-Derivaten mit eIF4A

Für die Entwicklung neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren ist es von Vorteil, den Wirkmechanismus bekannter eIF4A-Inhibitoren zu kennen. So können beispielsweise gezielt Aminosäuren adressiert werden, die an der Interaktion beteiligt sind. Dementsprechend spielt sowohl die biochemische Charakterisierung der RNA-Helikase als auch die Aufklärung des Mechanismus der Interaktion mit dem Inhibitor eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuer eIF4A-Inhibitoren. Aus diesem Grund sollte mit verschiedenen biochemischen Methoden – darunter ein Thermal-Shift-Assay (TSA), ein Microscale-Thermophoresis-Assay (MST) sowie die Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS) – die Bindung von Silvestrol und CR-31-B (-) an eIF4A untersucht und charakterisiert werden. Für die Durchführung der erwähnten Assays sollte aufgereinigtes humanes eIF4A eingesetzt werden. Wegen des flexiblen *N*-Terminus, der die Stabilität des Proteins beeinträchtigt, wurde statt des Vollängen-Proteins eine trunkierte Version (eIF4A1(19-406)) rekombinant in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen produziert und aufgereinigt (vgl. Kapitel 3.3.1 – 3.3.7). Der Aufreinigungserfolg ist im Anhang B zusammengefasst. Alle Assays wurden mit gereinigtem eIF4A1(19-406) ohne His<sub>6</sub>-Tag durchgeführt (nachfolgend nur noch eIF4A genannt) (vgl. Abbildung B.8 und Abbildung B.9 im Anhang).

### 4.4.1 Untersuchung der Proteinstabilität mithilfe des Thermal-Shift-Assays

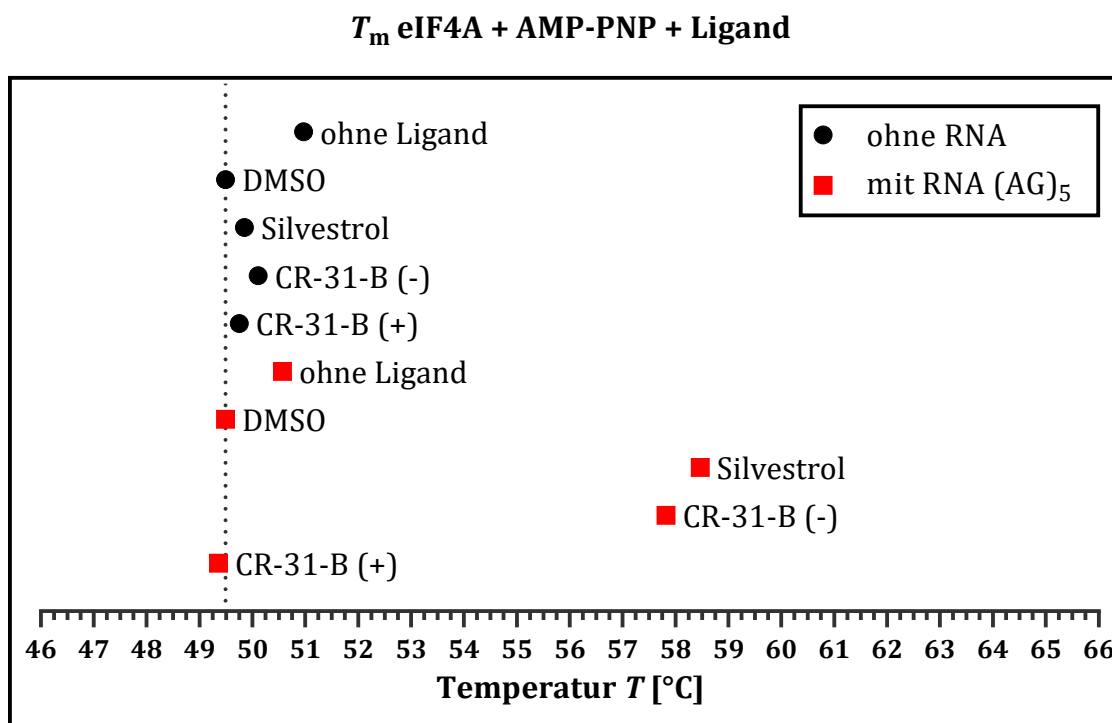
Mithilfe des Thermal-Shift-Assays kann u. a. analysiert werden, welche Faktoren einen Einfluss auf die Stabilität eines zu untersuchenden Proteins haben. Basierend auf der publizierten Kristallstruktur von eIF4A (vgl. PDB: 5ZC9), die eIF4A in der geschlossenen Konformation zeigt, sowie dem für eIF4A prognostizierten Konformationszyklus, war anzunehmen, dass ein RNA-Substrat für die Bindung von Rocaglamid-Derivaten an eIF4A benötigt würde (Andreou & Klostermeier, 2012; Iwasaki et al., 2019). Um diese Theorie zu bestätigen, wurde der Einfluss eines Polypurin-RNA-Substrats (AG)<sub>5</sub> auf die Bindung von Silvestrol und CR-31-B (-) an eIF4A in einem Thermal-Shift-Assays untersucht (vgl. Abbildung 39). Eine tabellarische Übersicht über die Schmelztemperaturen sowie die einzelnen Schmelztemperaturverschiebungen sind Tabelle C.1 des Anhangs zu entnehmen.

$T_m$  eIF4A + Ligand

**Abbildung 39: Auswirkungen einer RNA-Zugabe auf die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A in Gegenwart verschiedener Liganden bzw. dem Lösungsmittel DMSO.** Vergleich der Schmelztemperaturen  $T_m$  von eIF4A ohne RNA (schwarz) und mit RNA (rot). Eine tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  sowie der Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$  ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle C.1 im Anhang).

Eine signifikante Schmelztemperaturverschiebung von etwa 13 °C verglichen mit der DMSO-Kontrolle ist nur durch Zugabe der Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> mit den Liganden Silvestrol und CR-31-B (-) zu beobachten. Mit dem inaktiven CR-31-B (+) ist durch Zugabe von RNA kein nennenswerter Stabilitätsgewinn im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu vermerken. Generell scheint die Stabilität von eIF4A durch DMSO beeinträchtigt zu werden, da der Schmelzpunkt in Gegenwart von DMSO etwa 1,7 °C unter dem von eIF4A ohne Ligand oder DMSO liegt. Die Zugabe von RNA verursacht in Abwesenheit von Liganden keinen zusätzlichen Stabilitätsgewinn. Daraus lässt sich schließen, dass die eIF4A-Inhibitoren Silvestrol und CR-31-B (-) nur in Anwesenheit von RNA an eIF4A binden können. Die Bindung scheint sehr stabil und energetisch günstig zu sein, da eine Erhöhung der Schmelztemperatur um über 13 °C zu beobachten ist. Für das inaktive (+)-Enantiomer von CR-31-B ist in Anwesenheit von RNA lediglich eine Verschiebung um 0,8 °C zu registrieren, die angesichts der Verschiebung um 13 °C mit einem eIF4A-Inhibitor zu vernachlässigen ist. Die erhaltenen Ergebnisse stehen somit mit den bisher erlangten Erkenntnissen aus den Dual-Luciferase-Assays mit Silvestrol, CR-31-B (-) und

CR-31-B (+) im Einklang. Außerdem sind sie mit dem für eIF4A prognostizierten Konformationszyklus vereinbar, da die geschlossene Konformation lediglich in Anwesenheit eines RNA-Substrats eingenommen werden kann und nur dann die Bindung der Rocaglamid-Derivate an eIF4A stattfindet. Ein Aspekt, der in dieser Untersuchung nicht einbezogen wurde, ist das für die Helikase-Aktivität benötigte ATP, was auch in der Kristallstruktur in Form des nicht hydrolysierbaren AMP-PNPs auftritt. Um die Bedeutung von ATP innerhalb dieses Komplexes herauszuarbeiten, wurde erneut ein TSA durchgeführt und diesmal das ATP-Analog AMP-PNP zum Ansatz hinzugegeben (vgl. Abbildung 40).



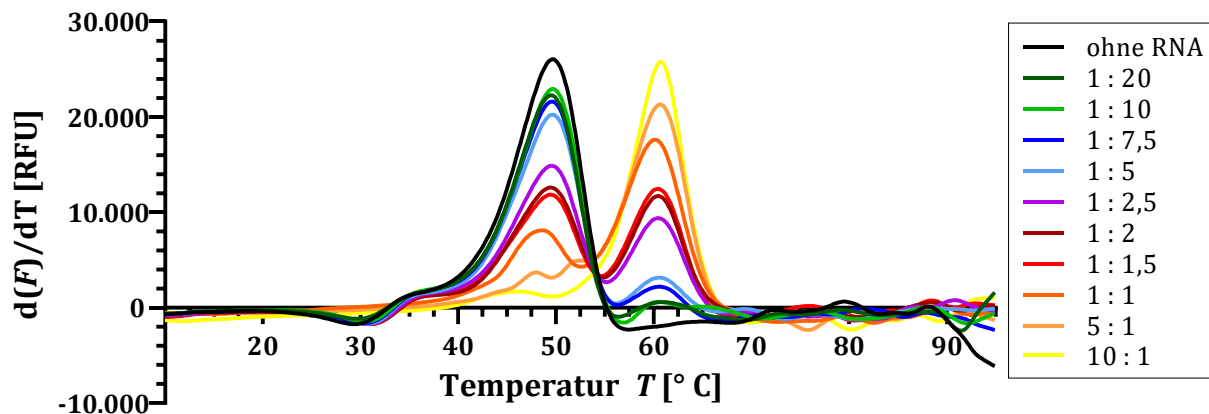
**Abbildung 40: Auswirkungen einer AMP-PNP-Zugabe auf die Schmelztemperaturen  $T_m$  von eIF4A in Gegenwart verschiedener Liganden bzw. dem Lösungsmittel DMSO.** Vergleich der Schmelztemperaturen  $T_m$  von eIF4A ohne RNA (schwarz) und mit RNA (rot) bei Zugabe des ATP-Analogs AMP-PNP. Eine tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  sowie der Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$  ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle C.2 im Anhang).

Die Zugabe des ATP-Analogs AMP-PNP bewirkt keine zusätzliche Schmelztemperaturerhöhung von eIF4A. Auffällig ist, dass die Verschiebung der Schmelztemperatur mit Silvestrol und CR-31-B (-) gegenüber der DMSO-Kontrolle in Gegenwart des ATP-Analogs und der RNA nur noch 8 – 9 °C beträgt. Wie zuvor ist bei allen anderen Bedingungen keine

signifikante Temperaturverschiebung zu beobachten. Das inaktive CR-31-B (+) zeigt auch unter diesen Bedingungen keine Änderung der Schmelztemperatur. Somit scheint das AMP-PNP für die Bindung der Rocaglamid-Derivate an eIF4A und damit die Ausbildung des Komplexes bestehend aus eIF4A, der RNA und dem Rocaglamid-Derivat auf Grundlage dieser Daten nicht essentiell zu sein. Wie in der von IWASAKI und Kollegen publizierten Kristallstruktur zu sehen ist, befindet sich die ATP-Bindetasche auf der gegenüberliegenden Seite der RNA-Bindestelle und somit auch der Rocaglamid-Interaktionsfläche (*Iwasaki et al.*, 2019). Dies könnte eine mögliche Erklärung für den registrierten Sachverhalt sein. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass bei der Aufreinigung von eIF4A potentiell gebundene ATP-Moleküle mitgeschleust wurden, welche im vorherigen TSA (vgl. Abbildung 39) den Konformationswechsel in die geschlossene Konformation ermöglicht haben könnten. Der tatsächliche Einfluss des ATPs kann demnach nur überprüft werden, wenn sichergestellt werden kann, dass sämtliche ATP-Moleküle aus dem Ansatz entfernt wurden. Um daraus resultierende Schwankungen zu vermeiden, die durch unterschiedliche Mengen an gebundenem ATP verursacht werden können, wurden alle weiteren TSAs unter Zugabe des AMP-PNPs durchgeführt.

Abseits davon stellte sich die Frage, in welchem Verhältnis die Bindung von eIF4A an das RNA-Substrat erfolgt. Daher wurde das Verhältnis von Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> zu eIF4A in einem Titrationsexperiment variiert und die damit einhergehenden Auswirkungen auf die Schmelzkurve bestimmt (vgl. Abbildung 41). Ohne RNA weist die Ableitungskurve lediglich einen Peak mit einem Maximum bei etwa 50 °C auf. Durch Zugabe von RNA lassen sich zwei Maxima, eines bei 50 °C und eines bei 60 °C erkennen. Bei 1,5-fachem bis 2-fachem Überschuss an Protein besteht ein Gleichgewicht zwischen den Peakhöhen der beiden Maxima. Dieses verschiebt sich mit zunehmender RNA-Konzentration in Richtung der höheren Temperatur. Bei einem 10-fachen Überschuss an RNA ist schließlich nur noch ein Peak mit einem Maximum bei 60 °C zu registrieren. Somit kann mit einem 10-fachen Überschuss an RNA gewährleistet werden, dass die gesamte Population an eIF4A in Gegenwart eines Liganden wie Silvestrol oder CR-31-B in die geschlossene Konformation übergehen kann. Für alle weiteren Untersuchungen wurde daher stets ein 10-facher Überschuss an RNA eingesetzt.

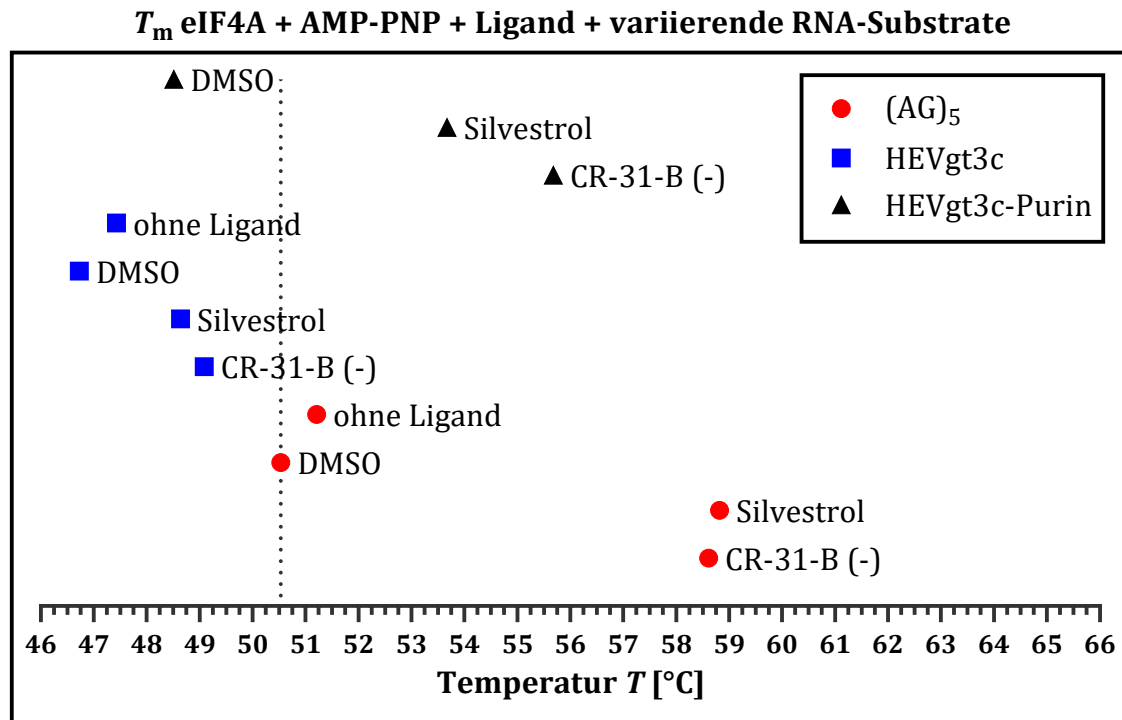
**Ableitungskurven von eIF4A + (AG)<sub>5</sub> + AMP-PNP + Silvestrol  
mit variierenden RNA : eIF4A-Verhältnissen**



**Abbildung 41: Ableitungen der Schmelzkurven von eIF4A in Gegenwart von Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub>, AMP-PNP und Silvestrol bei variierenden RNA : eIF4A-Verhältnissen.** Gestartet wurde mit einem 20-fachen Überschuss an Protein (1 : 20), geendet wurde mit einem 10-fachen Überschuss an RNA (10 : 1), wobei sich die erste Ziffer der Verhältnisangaben auf die RNA bezieht und die zweite auf eIF4A.

Wie in den DLAs bereits festgestellt werden konnte, scheint es Unterschiede in der Bindung von Silvestrol oder CR-31-B (-) an eIF4A zu geben, die mit dem von eIF4A-gebundenen RNA-Substrat zusammenhängen. Kurz zusammengefasst konnte mit Silvestrol eine Reduktion der Translationseffizienz sowohl in Gegenwart von Haarnadelstrukturen mit Duplexbereichen (z. B. HEVgt3c) wie auch in Gegenwart von RNA-Sequenzen mit Purin-reichen Regionen (z. B. HEVgt3c-Purin) oder reinen Polypurin-Sequenzen beobachtet werden. Mit CR-31-B (-) dagegen konnte keine Affinität gegenüber kurzen strukturierten *Hairpins* wie HEVgt3c oder dem NP-*Hairpin* beobachtet werden. Sobald eine gewisse Anzahl an aufeinanderfolgenden Polypurin-Basen innerhalb der RNA-Sequenz vorhanden war, konnte auch mit CR-31-B (-) eine Herunterregulation der Translationseffizienz im DLA nachgewiesen werden, die auf eine Bindung des Rocaglamid-Derivats an eIF4A schließen lässt. Um diese festgestellten Unterschiede im TSA zu überprüfen, wurden verschiedene RNA-Substrate in Gegenwart von eIF4A mit Silvestrol und CR-31-B (-) untersucht (vgl. Abbildung 42). Neben der bereits zuvor verwendeten Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> wurde die RNA-Sequenz von HEVgt3c als Vertreter einer doppelsträngigen Haarnadelstruktur sowie die Sequenz von HEVgt3c-Purin als Beispiel für einen künstlich eingeführten Polypurin-Stretch, bei ansonsten größtenteils gleichbleibenden Eigenschaften der RNA ausgewählt (vgl. Tabelle A.5 im Anhang). Angesichts der Ergebnisse des DLAs war zu erwarten, dass mit Silvestrol eine Erhöhung

der Temperatur sowohl mit HEVgt3c als auch mit HEVgt3c-Purin erkennbar ist. Mit CR-31-B (-) sollte nur in Gegenwart von HEVgt3c-Purin eine Temperaturerhöhung nachweisbar sein. Verglichen mit einer ausschließlich aus Purinbasen bestehenden RNA (AG)<sub>5</sub> sollten die Temperaturverschiebungen generell geringer ausfallen, da auch im DLA die Herunterregulation der Translationseffizienz in Gegenwart der Polypurin-Sequenz (AG)<sub>15</sub> am stärksten ausgeprägt war.



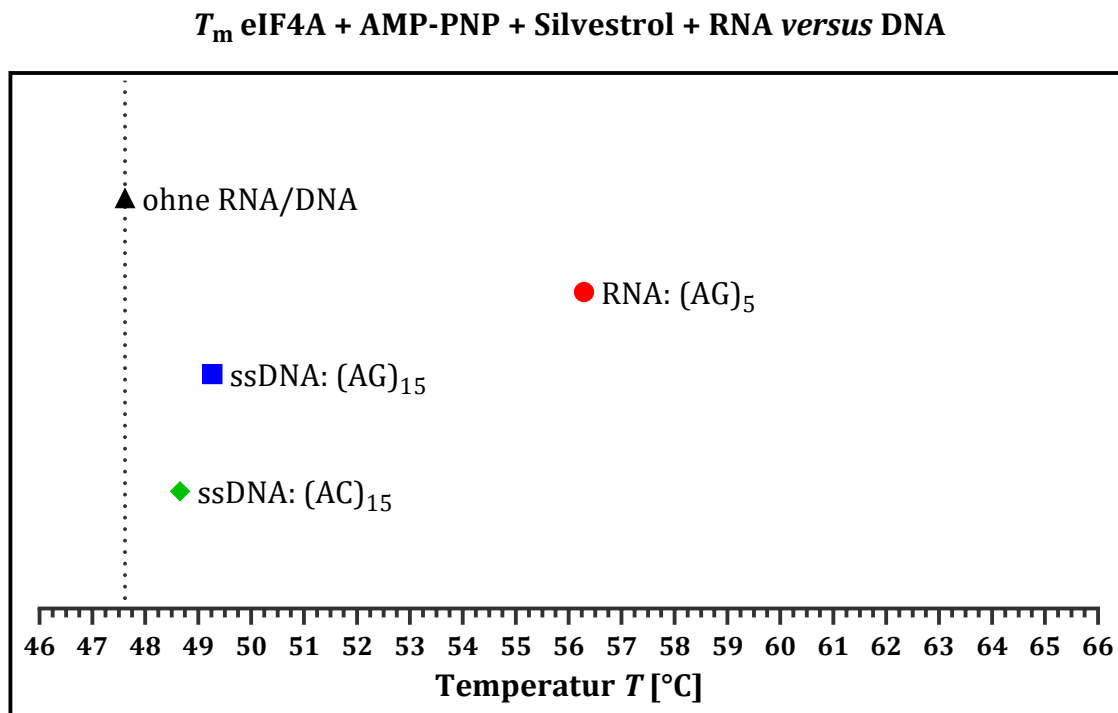
**Abbildung 42: Effekt verschiedener RNA-Substrate auf die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A in Gegenwart verschiedener Liganden bzw. dem Lösungsmittel DMSO unter AMP-PNP-Zugabe.** Eine tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  sowie der Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 5$  ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle C.3 im Anhang).

Die geringste Affinität gegenüber eIF4A zeigt die 5'-UTR des Hepatitis-E-Virus (HEVgt3c, blau). Hier ist auch mit der DMSO-Kontrolle die geringste Schmelztemperatur zu beobachten. Verglichen mit der DMSO-Kontrolle in Gegenwart der Polypurin-Sequenz (AG)<sub>5</sub> liegt die Schmelztemperatur sogar um 3,8 °C darunter. Überraschenderweise ist die Schmelztemperatur mit CR-31-B (-) in Gegenwart von HEVgt3c etwas höher als mit Silvestrol. Hierbei handelt es sich jedoch nur um 0,45 °C, weshalb nicht unbedingt von einer höheren Affinität von CR-31-B (-) zum eIF4A-HEVgt3c-Komplex ausgegangen werden kann. Die erwartete Temperaturverschiebung mit Silvestrol bleibt aus. Dies kann

aber auch in der experimentellen Umsetzung begründet sein. Während des TSAs wird die Temperatur sukzessive erhöht, um das Protein zu denaturieren und so den Schmelzpunkt zu bestimmen. Durch die Temperaturerhöhung könnten eventuell vorhandene RNA-Sekundärstrukturen, wie die Haarnadelstruktur von HEVgt3c, aufgelöst werden, sodass die RNA einzelsträngig vorliegt. Somit sind die Gegebenheiten anders als im DLA, was die ausbleibende Bindung von Silvestrol an eIF4A in Gegenwart von HEVgt3c erklären würde. Das Einfügen der 8 bp langen Polypurin-Sequenz in HEVgt3c (HEVgt3c-Purin, schwarz) zeigt vor allem für CR-31-B (-), aber auch für Silvestrol eine Schmelzpunkterhöhung um 5,15 °C bzw. 3,14 °C verglichen mit der DMSO-Kontrolle in Gegenwart der Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub>. Angesichts der Tatsache, dass die Schmelztemperatur von eIF4A mit HEVgt3c-Purin und DMSO nur bei 48,51 °C liegt, wird die Schmelztemperatur mit CR-31-B (-) und Silvestrol im direkten Vergleich mit der DMSO-Kontrolle in Gegenwart von HEVgt3c sogar um 7,17 °C und 5,16 °C erhöht. Wie erwartet kann der für die Polypurin-RNA ((AG)<sub>5</sub>, rot) erzielte Anstieg der Schmelztemperatur um etwa 8 °C nicht durch die anderen RNA-Substrate erreicht oder gar übertroffen werden. Zusammenfassend haben Polypurin-Sequenzen demnach einen großen Einfluss auf die Interaktion von Rocaglamid-Derivaten mit eIF4A. Die im DLA beobachtete Inhibition von eIF4A mit Silvestrol in Gegenwart von kurzen strukturierten Haarnadelstrukturen wie HEVgt3c konnte im TSA nicht bestätigt werden. Das kann aber durchaus an der erläuterten Umsetzung liegen, die die Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen erschwert. Um diese Beobachtung auch im TSA zu überprüfen, müsste daher eine stabilisierte HEVgt3c-Haarnadelstruktur verwendet werden, die auch bei höheren Temperaturen ihre Sekundärstruktur beibehält.

Unter einem letzten Aspekt sollte mithilfe des TSAs kontrolliert werden, ob die Bindung von Rocaglamid-Derivaten wie Silvestrol an eIF4A ausschließlich in Gegenwart von RNA-Substraten stattfindet oder ob auch einzelsträngige DNA als Substrat akzeptiert wird. Zwar ist bekannt, dass eIF4A eine RNA-Helikase ist und somit die Affinität zu RNA größer sein sollte, jedoch wäre, basierend auf der publizierten Kristallstruktur von eIF4A·RNA·AMP·PNP·RocA, denkbar, dass die gezeigten Wechselwirkungen von RocA auch mit Purinbasen eines einzelsträngigen DNA-Moleküls ausgebildet werden (*Iwasaki et al.*, 2019). Daher wurden anstelle der Polypurin-RNA im TSA sowohl eine einzelsträngige Polypurin-DNA (AG)<sub>15</sub> als auch eine einzelsträngige alternierende Purin-Pyrimidin-DNA (AC)<sub>15</sub> eingesetzt (vgl. Abbildung 43). Letztere soll das analoge DNA-Substrat zur im DLA verwendeten Negativkontrolle, der (AC)<sub>15</sub>-RNA-Sequenz, darstellen.

Während mit der Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> für eIF4A mit Silvestrol erneut eine Temperaturerhöhung um fast 9 °C beobachtet werden kann, zeigt die Zugabe einzelsträngiger DNA (ssDNA) nur geringe Auswirkungen auf die Schmelztemperatur. Insgesamt ist mit der Polypurin-Sequenz ssDNA: (AG)<sub>15</sub> eine Erhöhung um 1,65 °C zu sehen, die ssDNA: (AC)<sub>15</sub> bewirkt eine Temperaturerhöhung um 1,04 °C.



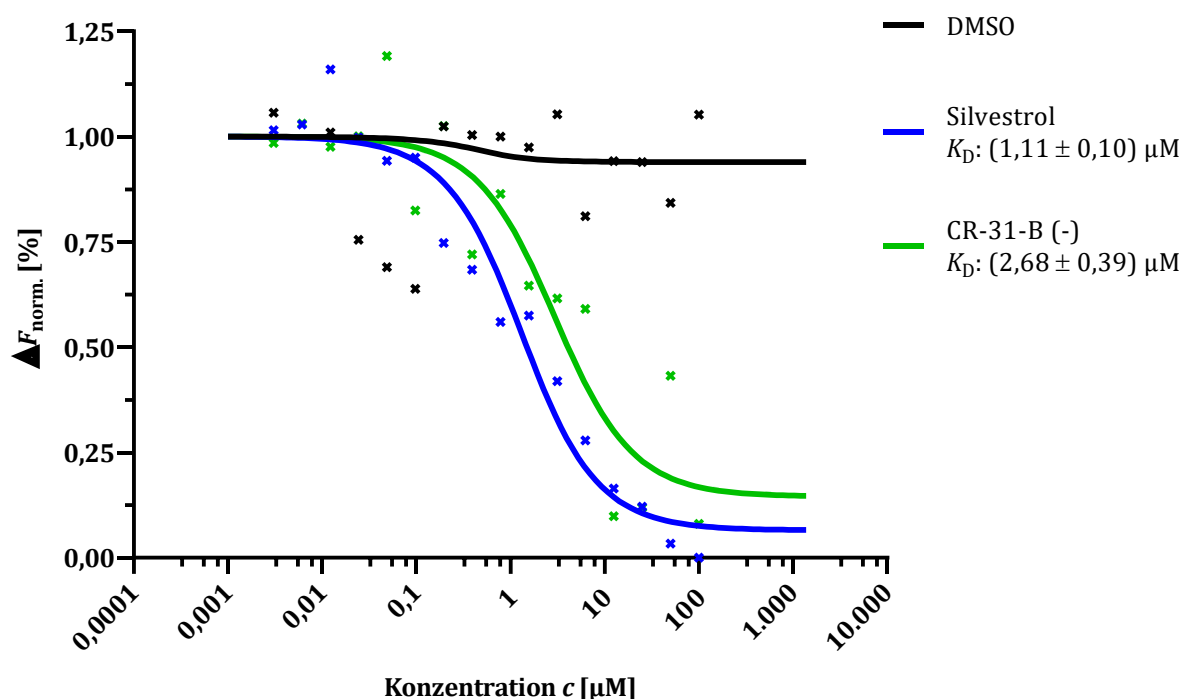
**Abbildung 43: Einfluss von einzelsträngiger DNA (ssDNA) auf die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A in Gegenwart von AMP-PNP und Silvestrol.** Eine tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  sowie der Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$  ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle C.4 im Anhang).

Generell scheint sich die Anwesenheit von ssDNA somit positiv auf die Stabilität von eIF4A in Gegenwart von Silvestrol auszuwirken. Da der Temperaturunterschied im Vergleich zur Referenz ohne RNA bzw. DNA jedoch nur sehr gering ist, ist nicht davon auszugehen, dass die Temperaturerhöhung durch Bindung von Silvestrol an den eIF4A-DNA-Komplex zustande kommt. Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich um die generell leicht erhöhte Stabilität von eIF4A in Gegenwart von Nucleinsäuren, die auf die RNA- bzw. Nucleinsäure-bindenden Eigenschaften der Helikase zurückzuführen ist. Ein ähnlicher Sachverhalt konnte auch bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens von eIF4A an Nucleinsäuren in Gegenwart des Rocaglamid-Derivats eFT226 festgestellt werden (*Ernst et al.*, 2020). Auch hier konnte keine Bindung von eIF4A an DNA detektiert werden.



#### 4.4.2 Bestimmung von Bindungsaffinitäten mithilfe des MST-Assays

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität von Silvestrol und CR-31-B (-) an eIF4A sollte ein Microscale-Thermophoresis-Assay (MST) durchgeführt werden. Nachdem zuvor mithilfe des Thermal-Shift-Assays bereits die Bedingungen für die Bindung der Rocaglamid-Derivate an eIF4A optimiert werden konnten, sollten diese Bedingungen genutzt werden, um die Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Interaktion der beiden Liganden mit eIF4A zu bestimmen. Um sicherzustellen, dass ausreichend Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> und AMP-PNP für den zu bildenden Komplex zur Verfügung steht, wurden diese Komponenten in deutlichem Überschuss eingesetzt. Die erhaltenen Bindungskurven lassen erkennen, dass beide Rocaglamid-Derivate eine ähnliche Affinität gegenüber eIF4A aufweisen (vgl. Abbildung 44). Beide  $K_D$ -Werte liegen im niedrigen mikromolaren Bereich.



**Abbildung 44:** Mithilfe des MST-Assays erhaltene Bindungskurven zur Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  der Interaktion von Silvestrol und CR-31-B (-) mit eIF4A. Dargestellt ist die normalisierte Fluoreszenzänderung  $\Delta F_{\text{norm.}}$  [%] in Abhängigkeit der Konzentration von Silvestrol und CR-31-B (-) sowie DMSO. Die Messung erfolgte bei einer LED-Power von 30 % und einer MST-Power von 80 %. Die Auswertung wurde mit NT Analysis (*NanoTemper Technologies*) mit der Methode *Thermophoresis + T-Jump* durchgeführt.

Mit Silvestrol konnte ein  $K_D$ -Wert von 1,11  $\mu\text{M}$  ermittelt werden, CR-31-B (-) weist einen  $K_D$ -Wert von 2,68  $\mu\text{M}$  für die Bindung an eIF4A in Gegenwart von (AG)<sub>5</sub> auf. Da in den anderen Assays, wie dem DLA oder dem WST-1-Assay, bereits Effekte im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich beobachtet werden konnten, erscheinen die im

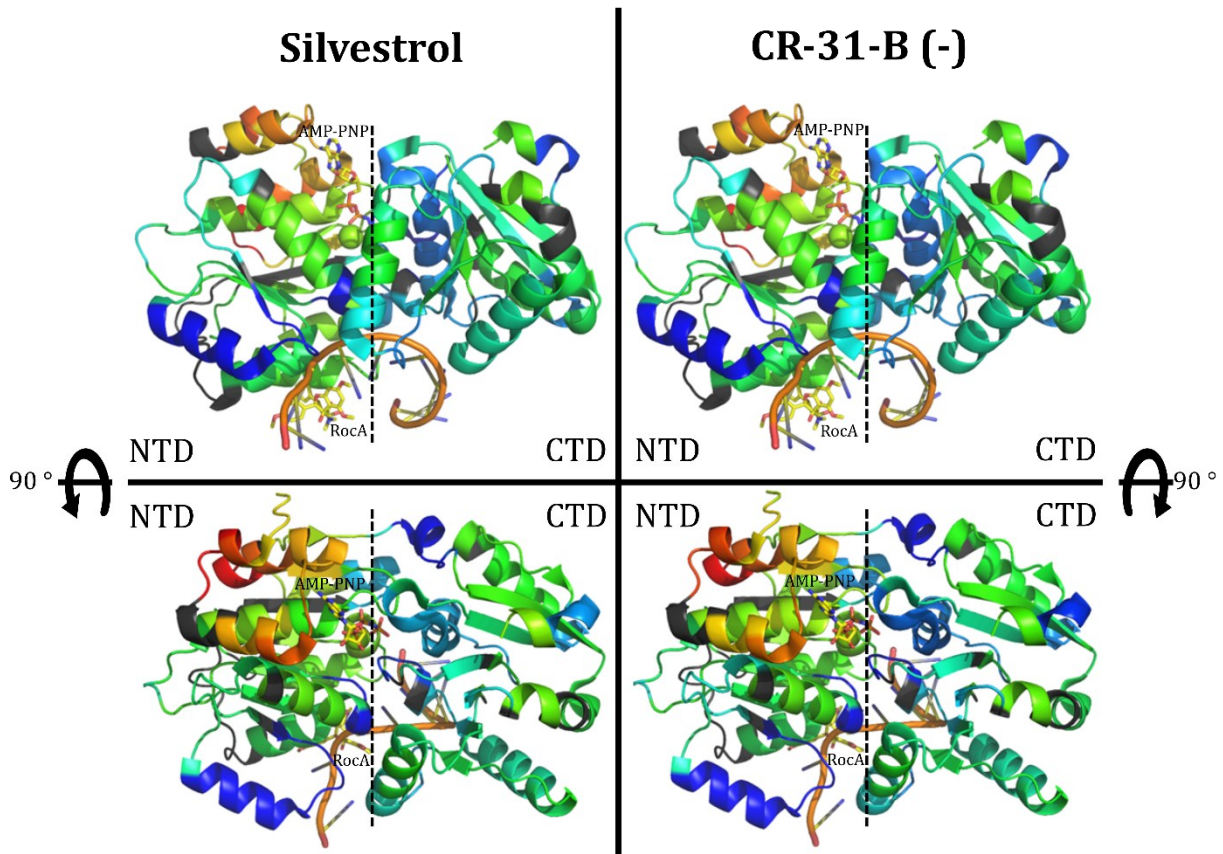
MST-Assay erhaltenen Bindungskonstanten relativ hoch. Jedoch ist anzumerken, dass es sich bei den erwähnten Assays um *in vitro*-Assays in Zellkultur handelt, die sich deutlich vom Protein-basierten MST-Assay, bei dem deutlich höhere Proteinkonzentrationen in äquimolaren Mengen eingesetzt werden, unterscheiden. Nach aktuellem Stand scheint es keine vergleichbaren Untersuchungen zur Bestimmung der Dissoziationskonstante von Rocaglamid-Derivaten an eIF4A zu geben. Das Team um JUSTIN T. ERNST hat mit einer ähnlichen Strategie die Bindung von RNA-Substraten an eIF4A in Gegenwart des synthetischen Rocaglamid-Derivats eFT226 mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) analysiert (Ernst et al., 2020). In dieser Studie wurden 18 bp lange RNA-Oligonukleotide, darunter auch eine Polypurin-Sequenz (AG)<sub>9</sub>, auf einem SPR-Sensor-Chip immobilisiert. Anschließend wurde der Chip mit eIF4A, eFT226 und ATP inkubiert, sodass sich ein Komplex bestehend aus eIF4A, der RNA, eFT226 und ATP ausbilden konnte. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante wurde der Chip mit Puffer gewaschen, sodass eIF4A, ATP und eFT226 sukzessive vom Chip heruntergespült wurden. Daraus ergab sich in Gegenwart der Polypurin-RNA eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von 21 nM. In Abwesenheit des eIF4A-Inhibitors eFT226 lag der  $K_D$ -Wert bei ansonsten gleichem Vorgehen im mikromolaren Bereich bei 8  $\mu$ M. Gleichermäßen wurde auch der  $K_D$ -Wert der Interaktion zwischen eIF4A und (AG)<sub>9</sub> in Gegenwart von RocA und ATP bestimmt. Dieser lag bei 156 nM (Ernst et al., 2020). Es fällt demnach auf, dass die mithilfe der SPR-Spektroskopie ermittelten  $K_D$ -Werte für die Bindung von eIF4A an das RNA-Substrat deutlich niedriger sind, als die mithilfe des MST-Assays bestimmten  $K_D$ -Werte für die Bindung von Silvestrol und CR-31-B (-) an eIF4A. Das mag zum einen daran liegen, dass die Bindung von eIF4A an die RNA nicht mit der Bindung der Rocaglamid-Derivate an eIF4A gleichzusetzen ist. Außerdem wurden unterschiedliche Methoden angewandt, denen verschiedene Prinzipien zugrunde liegen. Im direkten Vergleich der SPR-Spektroskopie mit dem MST-Assay scheint der MST-Assay vermutlich weniger verlässlich zu sein. Eine ineffiziente Fluoreszenzmarkierung des Proteins kann beispielsweise dazu führen, dass deutlich höhere Dissoziationskonstanten ermittelt werden, da lediglich die Bindung an das fluoreszenzmarkierte Protein, nicht aber an nicht-markierte Protein-Fractionen registriert wird. Ein weiteres Problem stellen die geringen einzusetzenden Mengen im Bereich von wenigen Mikrolitern dar, die zwar Ressourcen einsparen, gleichzeitig aber deutlich fehleranfälliger sind, da sich Pipettierungenauigkeiten wesentlich stärker auf den Kurvenverlauf auswirken. Somit

sind die im MST-Assay ermittelten Dissoziationskonstanten für Silvestrol und CR-31-B (-) kritisch anzusehen, wenn sie aufgrund von fehlenden Vergleichsstudien auch nicht gänzlich zu verwerfen sind und zumindest einen Anhaltspunkt für die Affinität zu eIF4A darstellen.

#### 4.4.3 Identifikation der Interaktionsfläche von Rocaglamid-Derivaten an eIF4A mittels HDX-MS

Ein weiterer Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Rocaglamid-Derivaten sollte mithilfe der Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (*Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry, HDX-MS*) geliefert werden. Unter den zuvor bestimmten Bedingungen sollte die Interaktionsfläche von eIF4A mit der Substrat-RNA (AG)<sub>5</sub> und den eIF4A-Inhibitoren Silvestrol und CR-31-B (-) auf Proteinebene analysiert werden. Die experimentelle Umsetzung und Auswertung der HDX-MS-Untersuchungen wurde zu großen Teilen von DR. WIELAND STEINCHEN (Gerätezentrum Massenspektrometrie und Elementaranalytik, Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Der Vergleich der HDX-Raten des ungebundenen Apozustands (DMSO-Kontrolle) und der Ligand-gebundenen Zustände mit Silvestrol und CR-31-B (-) lässt erkennen, dass die beiden Rocaglamid-Derivate das gleiche H/D-Austauschmuster aufweisen (vgl. Abbildung D.3 – Abbildung D.5 im Anhang). Eine Übertragung des H/D-Austauschmusters auf die 3D-Kristallstruktur von eIF4A im Komplex mit der RNA (AG)<sub>15</sub>, dem AMP-PNP und RocA zeigt, welche Bereiche des Komplexes von der Bindung der Rocaglamid-Derivate beeinflusst werden (vgl. Abbildung 45). Blaue Bereiche deuten dabei auf unzugänglichere Regionen hin, da an diesen Aminosäuren in Gegenwart der Rocaglamid-Derivate weniger Wasserstoff durch Deuterium ausgetauscht wird als in der DMSO-Kontrolle ohne Inhibitor. Rot gekennzeichnete Bereiche signalisieren eine höhere Flexibilität in Anwesenheit der Liganden, die durch einen vermehrten Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium repräsentiert werden. Es fällt auf, dass die Interdomäne, die in der Kristallstruktur die Interaktionsfläche von eIF4A mit der RNA und RocA darstellt, verminderte H/D-Austauschraten aufweist. Dies bestätigt die in der Kristallstruktur abgebildete Bindestelle für Rocaglamid-Derivate. Durch Bindung von RNA und Silvestrol oder CR-31-B (-) an eIF4A sind diese Regionen für das Deuterium nicht mehr zugänglich. Daher findet an diesen Aminosäuren kein Austausch des Wasserstoffs statt. Diese Beobachtung steht außerdem im Einklang mit der Ausbildung der geschlossenen

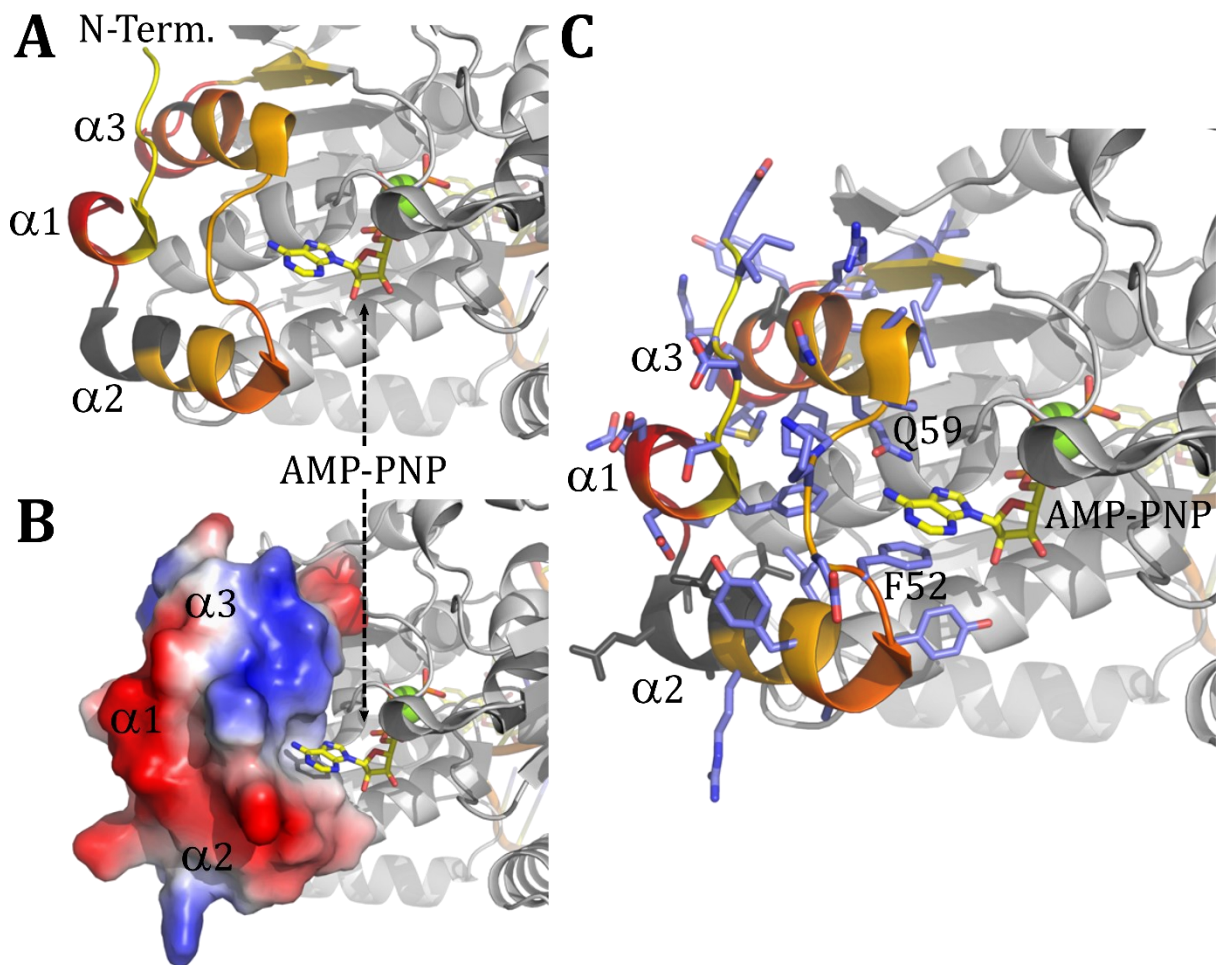
Konformation in Gegenwart der RNA und des Inhibitors. Die geschlossene Konformation bewirkt eine Assoziation des *N*-Terminus mit dem *C*-Terminus, wodurch die Interdomäne von der Oberfläche abgeschirmt wird, was abermals die reduzierten H/D-Austauschraten in diesem Bereich erklärt.



**Abbildung 45: Unterschiede im H/D-Austausch zwischen der DMSO-Kontrolle und Silvestrol (links) und der DMSO-Kontrolle und CR-31-B (-) (rechts).** Blau: Bereiche mit geringerem H/D-Austausch in Anwesenheit des Liganden, Rot: Bereiche mit höherem H/D-Austausch in Anwesenheit des Liganden. Silvestrol und CR-31-B (-) vermitteln das gleiche H/D-Austauschmuster. (PDB: 5ZC9).

Dem gegenüber weisen drei  $\alpha$ -Helices nahe des *N*-Terminus deutlich erhöhte H/D-Austauschraten auf. Interessanterweise befinden sich diese in unmittelbarer Nähe des im Komplex gebundenen AMP-PNPs (vgl. Abbildung 46). Die erhöhte Flexibilität in diesem Bereich könnte demnach auf eine Ausdehnung der  $\alpha$ -Helices zurückzuführen sein. Diese könnte mit der ATP-Koordination oder -Hydrolyse in Zusammenhang stehen. Bei genauerer Betrachtung der Interaktionen der drei  $\alpha$ -Helices mit dem AMP-PNP auf molekularer Ebene scheinen besonders das Phenylalanin an Position 52 sowie das Glutamat an Position 59 für die Koordination des AMP-PNPs von Bedeutung zu sein (vgl. Abbildung 46 C). Interessanterweise wurden für die Untersuchungen der Interaktions-

fläche von Silvestrol oder CR-31-B (-) mit eIF4A mittels HDX-MS weder ATP noch das nicht-hydrolysierbare Analogon eingesetzt. Die beobachtete erhöhte Motilität in diesem Bereich könnte also durch die Hydrolyse oder Freisetzung eines bereits während der Präparation von eIF4A gebundenen ATP-Moleküls zustande gekommen sein. Demnach hätte die Bindung von Silvestrol oder CR-31-B (-) an eIF4A einen Einfluss auf die ATP-Bindetasche. Dieses Phänomen könnte mit dem für eIF4A postulierten Konformationszyklus begründet werden (vgl. Konformationszyklus in Abbildung 3 in der Einleitung).



**Abbildung 46: Unterschiede im H/D-Austausch im Bereich der ATP-Koordination.** A und C: Blau: Bereiche mit geringerem H/D-Austausch in Anwesenheit der Liganden, Rot: Bereiche mit höherem H/D-Austausch in Anwesenheit der Liganden. B: Einfärbung der Oberfläche der trihelikalen Struktur gemäß dem elektrostatischen Potential (Blau: positiv, Rot: negativ). (PDB: 5ZC9).

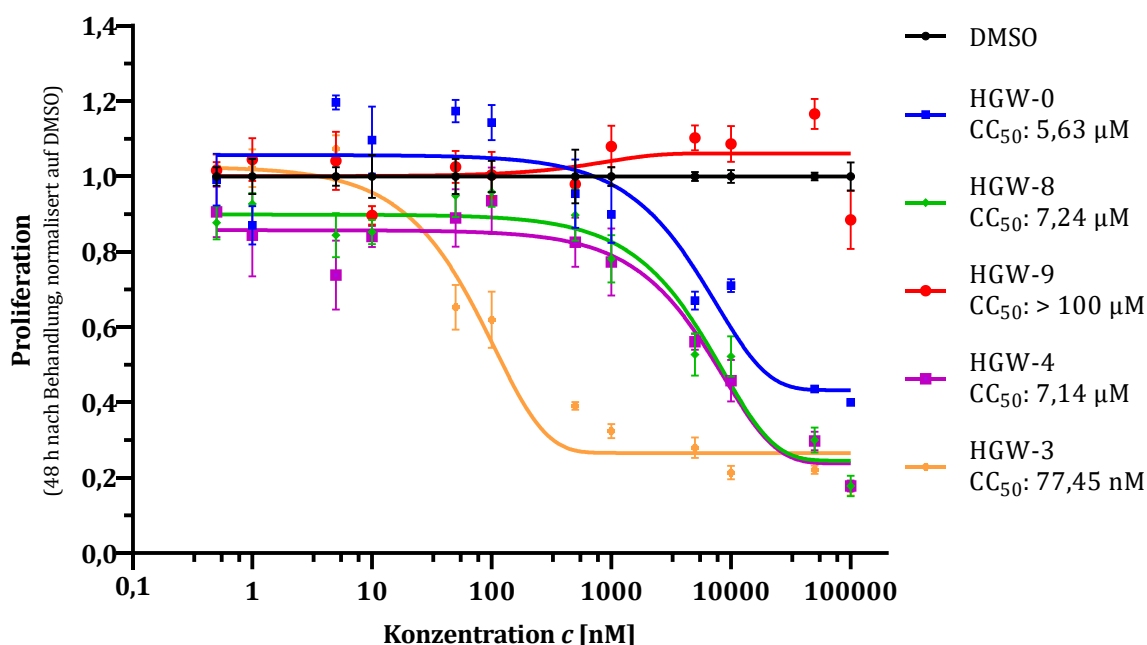
Unter der Annahme, dass in der Präparation von eIF4A auch ATP vorhanden war, sollte eIF4A durch kooperative Bindung von ATP und dem RNA-Substrat von einer halboffenen in die geschlossene Konformation wechseln (vgl. Abbildung 3, Schritt 1). Diese Annahme konnte angesichts der reduzierten H/D-Austauschraten in der Interdomäne, die durch

Assoziation des *N*-Terminus mit dem *C*-Terminus von der Oberfläche abgeschirmt wird, bestätigt werden. In diesem Zustand sollte die Bindung von Silvestrol oder CR-31-B (-) an den Komplex stattgefunden haben. Auch dies ist durch die geringere Deuteriumaufnahme, die in der Kristallstruktur im Bereich der Interaktionsfläche von RocA mit eIF4A und der RNA wiederzufinden ist, in den Ergebnissen der HDX-MS zu beobachten (vgl. Abbildung 45). In Gegenwart eines doppelsträngigen RNA-Substrats würde der Zyklus mit der Entwindung der Duplex-RNA und der Dissoziation des ersten Stranges fortgesetzt werden. Da in dieser Untersuchung eine einzelsträngige Polypurin-RNA als Substrat eingesetzt wurde, können diese Schritte nicht stattfinden. Unter der Annahme, dass die Entwindung und Dissoziation des ersten Stranges übersprungen werden, würden im nächsten Schritt die ATP-Hydrolyse und Freisetzung des abgespaltenen Phosphats folgen (vgl. Abbildung 3, Schritt 4 und 5). Dieser Zustand würde die erhöhte Deuteriumaufnahme im Bereich der drei ATP-koordinierenden Helices nahe des *N*-Terminus erklären. Wegen der Bindung der Inhibitoren an den eIF4A-RNA-ATP-Komplex sollte die im nächsten Schritt folgende Dissoziation des RNA-Substrats unterbunden werden. Demnach müsste auch der Übergang von der geschlossenen Konformation in die halboffene Konformation blockiert sein, sodass der Komplex in diesem Zustand fixiert wäre. Zusammengefasst sollte die einzig mögliche Aktivität in diesem Zustand die Hydrolyse des ATPs und ggf. die Freisetzung des Phosphats sein. Diese Hypothese kann mit den HDX-Daten bekräftigt werden, in denen lediglich im Bereich der ATP-Bindestelle eine erhöhte Aktivität zu beobachten ist (vgl. Abbildung 46). Final kann somit festgehalten werden, dass die in den HDX-MS beobachteten Einflüsse der Bindung von Silvestrol und CR-31-B (-) an den eIF4A-RNA-Komplex mit dem für eIF4A vorgeschlagenen Konformationszyklus zu vereinbaren sind. Die Rocaglamid-Derivate fixieren eIF4A in der geschlossenen Konformation und unterbinden somit vermutlich die Helikase-Aktivität. Die ATPase-Aktivität dagegen scheint von der Bindung der Rocaglamid-Derivate stimuliert zu werden.



#### 4.5 Validierung der eIF4A-Spezifität weiterer Rocaglamid-Derivate

Im Rahmen einer bestehenden Kooperation mit PROF. DR. HANS-GUIDO WENDEL (MSKCC, New York) wurden neben CR-31-B (-) weitere chemische Verbindungen mit einem Cyclopenta[*b*]benzofuran-Grundgerüst hinsichtlich ihrer eIF4A-Spezifität charakterisiert. Bei diesen Verbindungen handelt es sich zum Teil um Nebenprodukte, die bei der Synthese von CR-31-B (-) anfallen und sich in den Seitengruppen der Phenylreste der Ringe A und B oder in der Amidgruppe vom CR-31-B-Grundgerüsts unterscheiden. Da sowohl die physikochemischen Eigenschaften als auch die vom *Tri-Institutional Therapeutics Discovery Institute* mit PROF. DR. HANS-GUIDO WENDEL als Hauptinvestor erhobenen Daten zur Validierung dieser Rocaglamid-Derivate bisher unveröffentlicht sind, wird in dieser Arbeit nicht genauer auf die Derivate eingegangen, sondern lediglich die Ergebnisse der in dieser Arbeit erhobenen Daten dargestellt. Insgesamt handelt es sich um fünf Verbindungen, HGW-0, HGW-8, HGW-9, HGW-4 und HGW-3, die hinsichtlich ihrer eIF4A-spezifischen Inhibition untersucht werden sollten. Wie bereits zuvor mit CR-31-B, wurden auch hier zunächst die CC<sub>50</sub>-Werte in HepG2-Zellen mithilfe eines WST-1-Assays bestimmt (vgl. Abbildung 47).

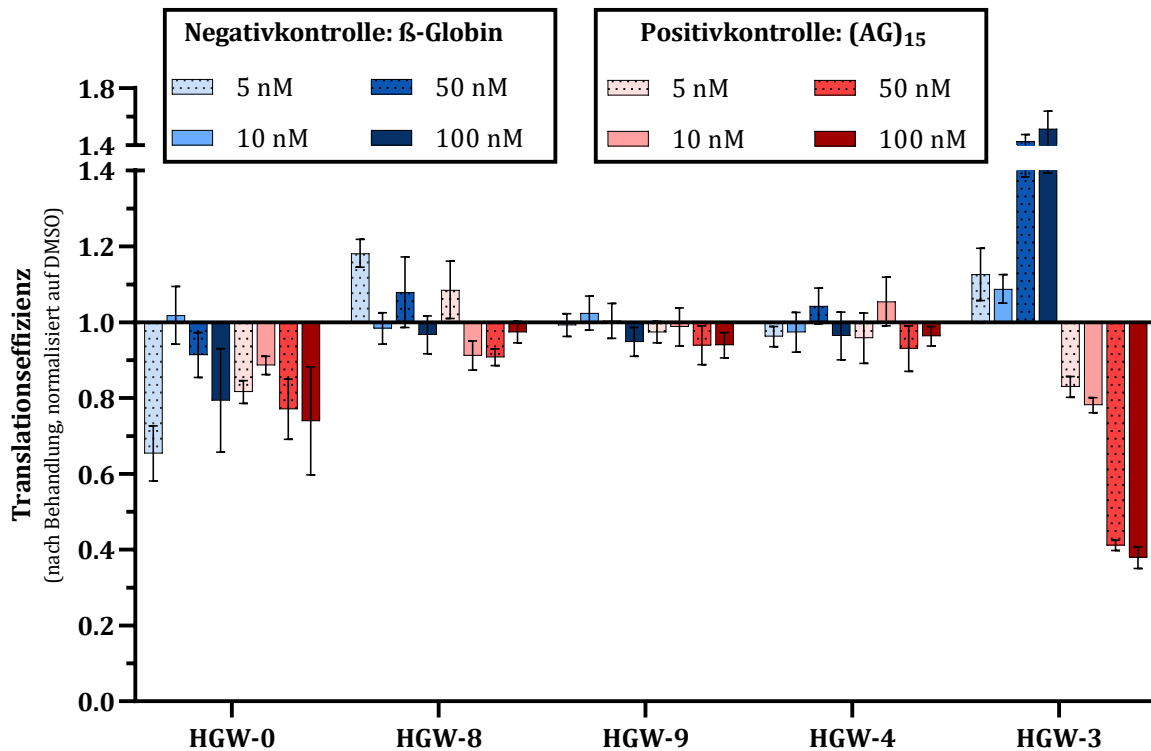


**Abbildung 47: WST-1-Assay von Rocaglamid-Derivaten in HepG2-Zellen zur Bestimmung der CC<sub>50</sub>-Werte.** Die Proliferation der HepG2-Zellen wurde 48 Stunden nach Behandlung der HepG2-Zellen mit dem jeweiligen Rocaglamid-Derivat mithilfe eines WST-1-Assays bestimmt. Der CC<sub>50</sub>-Wert entspricht der Konzentration, bei der 50 % der Zellen abgetötet sind.

Mit HGW-9 ist keine Zytotoxizität innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches von 0,5 nM – 100 µM in der Krebszelllinie wahrzunehmen. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei vermutlich nicht um einen eIF4A-Inhibitor handelt, da andernfalls eine antitumorale Wirkung, die sich z. B. in einer Inhibition der Proliferation der HepG2-Zellen geäußert hätte, zu erwarten wäre. HGW-8 und HGW-4 verhalten sich im WST-1-Assay relativ ähnlich. Hierfür lassen sich  $CC_{50}$ -Werte im Bereich von 7 µM errechnen. Auch mit HGW-0 kann mit 5,63 µM ein  $CC_{50}$ -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich erfasst werden. Einzig das Rocaglamid-Derivat HGW-3 zeigt eine deutliche Hemmung der Proliferation im nanomolaren Bereich. Der  $CC_{50}$ -Wert liegt hier bei 77,45 nM. Verglichen mit Silvestrol und CR-31-B (-) liegen alle  $CC_{50}$ -Werte der HGW-Verbindungen über denen der bereits etablierten eIF4A-Inhibitoren, deren halbmaximale zytotoxische Konzentration in HepG2-Zellen bei etwa 20 nM zu finden ist. Demnach ist wahrscheinlich erst bei höheren Konzentrationen mit einer eIF4A-Inhibition zu rechnen. Für den Dual-Luciferase-Assay werden daher zusätzlich zu den sonst verwendeten Konzentrationen von 5 nM und 10 nM auch die Konzentrationen 50 nM und 100 nM gewählt. Zur Abschätzung der eIF4A-Abhängigkeit wurde als Negativkontrolle die 5'-UTR von  $\beta$ -Globin verwendet, als Positivkontrolle diente die 30 bp lange Polypurin-Sequenz (AG)<sub>15</sub>, die mit Silvestrol und CR-31-B (-) die stärkste Herunterregulation der Translationseffizienz hervorgerufen hat. Ein potentieller eIF4A-Inhibitor sollte keinen Effekt auf die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin ausüben, bzw. allenfalls eine Hochregulation verursachen, während die Translationseffizienz der Polypurin-Sequenz nach Behandlung gegenüber der DMSO-Kontrolle reduziert werden sollte (vgl. hierfür auch Abbildung 30 und Abbildung 32 als Beispiele für den zu erwartenden Effekt mit einem eIF4A-Inhibitor). Der DLA der HGW-Verbindungen lässt erkennen, dass HGW-8, HGW-9 und HGW-4 zwar keinen Effekt auf die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin ausüben, gleichermaßen kann aber auch kein Effekt auf die Polypurin-Sequenz registriert werden (vgl. Abbildung 48). Diese Ergebnisse waren abzusehen, da die Toxizität im WST-1-Assay erst im niedrigen mikromolaren Bereich auftritt bzw. für HGW-9 gar keine Toxizität zu sehen ist, wohingegen im DLA eine maximale Konzentration von 100 nM eingesetzt wurde. Dementsprechend ist im DLA im nanomolaren Bereich nicht mit einem für einen eIF4A-Inhibitor spezifischen Effekt zu rechnen, allenfalls wäre dieser Effekt bei höheren Konzentrationen zu erwarten. Gleiches gilt somit auch für HGW-0 mit einem  $CC_{50}$ -Wert von 5,63 µM. Dennoch zeichnet sich hier ein anderes Bild ab. Zwar ist die gewünschte



Inhibition der Translation der Polypurin-Sequenz erkennbar, der gleiche Effekt ist aber auch mit der Negativkontrolle  $\beta$ -Globin zu beobachten. HGW-0 scheint also eine eIF4A-unspezifische Wirkung auf die Translation auszuüben, die anhand dieses Reporter-Assays nicht weiter charakterisiert werden kann.

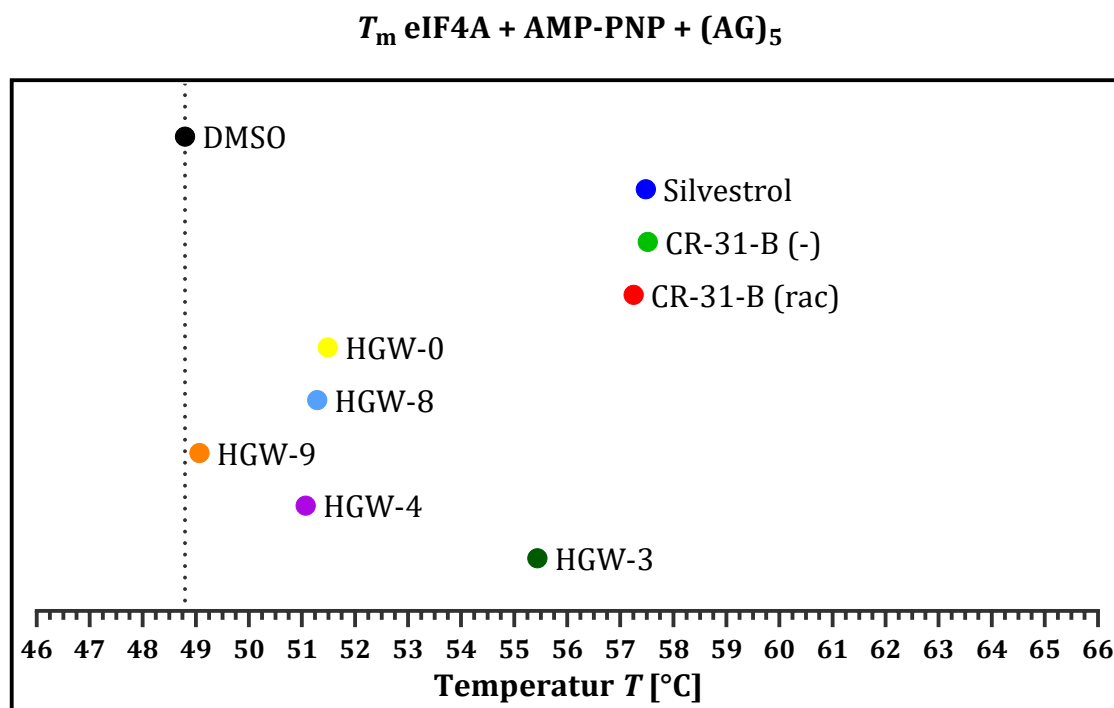


**Abbildung 48: DLA in HepG2-Zellen mit den HGW-Verbindungen zur Identifikation neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren.** In Blau: Effekt mit unterschiedlichen Konzentrationen der HGW-Verbindungen auf die 5'-UTR von  $\beta$ -Globin als Negativkontrolle, in Rot: Effekt unterschiedlicher Konzentrationen der HGW-Verbindungen auf die Polypurin-Sequenz  $(AG)_{15}$  als Positivkontrolle. Dargestellt ist die Translationseffizienz 48 Stunden nach Behandlung mit 5, 10, 50 und 100 nM der HGW-Verbindungen, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Basierend auf den Ergebnissen des WST-1-Assays erscheint HGW-3 als der vielversprechendste Kandidat für einen potentiellen eIF4A-Inhibitor. Diese Erwartungen können im Hinblick auf die im DLA erhaltenen Ergebnisse erfüllt werden. Wie es für einen eIF4A-Inhibitor charakteristisch ist, wird die Translationseffizienz von  $(AG)_{15}$  deutlich gemindert, gleichzeitig wird die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin nicht beeinflusst oder hochreguliert. Wie bereits zuvor erläutert könnte die Inhibition der Translation eIF4A-abhängiger mRNAs u. a. dazu führen, dass mehr freie 43S-PICs für die Translation eIF4A-unabhängiger mRNAs zur Verfügung stehen, was in einer Erhöhung der Translationseffizienz resultieren würde. Zwar liegt die für HGW-3 höchste getestete Konzentration

von 100 nM bereits über dem kritischen  $CC_{50}$ -Wert, jedoch kann bereits mit 50 nM der gleiche Effekt beobachtet werden. Außerdem ist der Trend in abgeschwächter Form auch mit 5 und 10 nM zu erkennen, weshalb ein unspezifischer Effekt, der auf eine toxische Wirkung zurückzuführen ist, eher unwahrscheinlich ist.

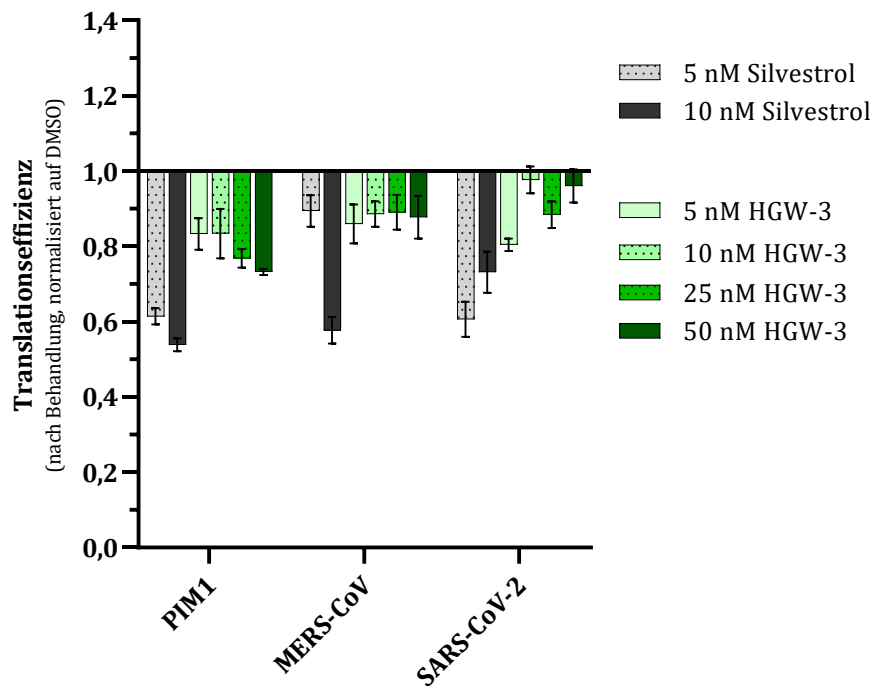
In einem letzten Experiment zur Validierung des Potentials der HGW-Verbindungen als eIF4A-Inhibitoren wurde die Bindung der Liganden an den eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplex untersucht. Dies wurde mithilfe des in dieser Arbeit etablierten Thermal-Shift-Assays bewerkstelligt (vgl. Abbildung 49).



**Abbildung 49: Thermal-Shift-Assay zur Validierung der HGW-Verbindungen als potentielle eIF4A-Inhibitoren.** Dargestellt ist die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A in Gegenwart einer Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> und AMP-PNP sowie der Liganden. Eine tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  sowie der Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$  ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle C.5 im Anhang).

In Gegenwart eines eIF4A-bindenden Liganden sollte demnach eine Erhöhung der Schmelztemperatur  $T_m$  des eIF4A-(AG)<sub>5</sub>-AMP-PNP-Komplexes zu messen sein, während ein nicht bindender Ligand keinen Einfluss auf die Schmelztemperatur haben sollte. Als Kontrollen wurden DMSO sowie Silvestrol, CR-31-B (-) und CR-31-B (rac) eingesetzt. Die Mittelwerte der Schmelztemperaturen inklusive der Standardabweichungen können Tabelle C.5 des Anhangs entnommen werden. Mit Silvestrol und CR-31-B ist eine

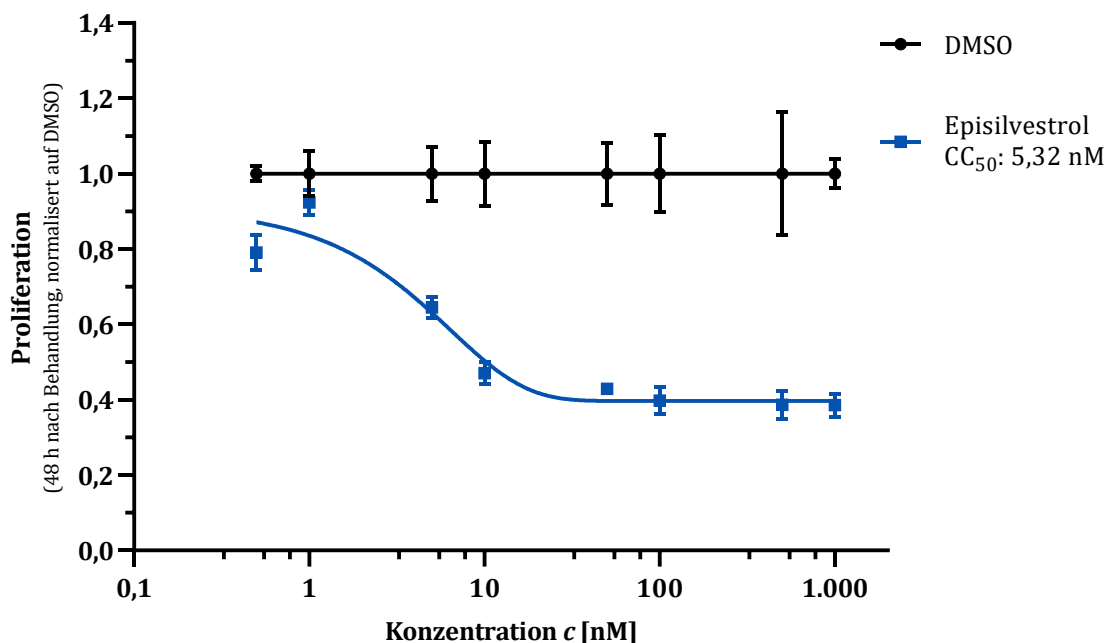
Verschiebung der Schmelztemperatur  $T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle um fast 9 °C zu beobachten. Wie sich auch schon in den vorherigen Experimenten abgezeichnet hat, hat HGW-9 keinen Einfluss auf die Schmelztemperatur von eIF4A (vgl. Abbildung 49). HGW-9 kann somit als potentieller eIF4A-Inhibitor ausgeschlossen werden, da in keinem der drei voneinander unabhängigen Experimente ein für einen eIF4A-Inhibitor charakteristischer Effekt beobachtet werden konnte. Anders sieht dies für HGW-0, HGW-8 und HGW-4 aus. Alle Verbindungen wiesen im WST-1-Assay einen  $CC_{50}$ -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich auf. Im Thermal-Shift-Assay ist eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 2,27 – 2,69 °C zu vermerken. Das könnte bedeuten, dass eine Bindung an eIF4A stattfindet, durch die die Stabilität des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes erhöht wird, was sich in der gestiegenen Schmelztemperatur äußert. Demnach sind die drei HGW-Verbindungen, trotz der fehlenden Wirkung im DLA nicht gänzlich zu verwerfen. Möglicherweise hätte im DLA eine höhere Konzentration eingesetzt werden müssen, die näher am  $CC_{50}$ -Wert liegt, damit eine Inhibition von eIF4A bewirkt worden wäre. Zwar ist dann in einer weiteren Validierung der Verbindungen nicht mit einer Wirksamkeit im niedrigen nanomolaren Bereich wie bei Silvestrol oder CR-31-B (-) zu rechnen, jedoch könnte sich diese Einbuße mit einer deutlich geringeren Zytotoxizität auszahlen. Im Gegensatz dazu hat HGW-3 im DLA bereits im nanomolaren Bereich eine vielversprechende Wirkung auf die Translationseffizienz verursacht. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch im TSA wider. Mit einer Verschiebung der Schmelztemperatur um 6,64 ( $\pm 0,12$ ) °C scheint die Bindung an eIF4A zwar nicht ganz so stark wie mit Silvestrol oder CR-31-B (-) zu sein, dieses Resultat steht jedoch im Einklang mit den zuvor gewonnen Erkenntnissen des WST-1-Assays sowie des DLAs. Um abseits der Kontrollen zu überprüfen, ob HGW-3 auch einen Effekt in Gegenwart viraler 5'-UTRs ausübt, wurde ein weiterer DLA mit HGW-3 und den 5'-UTRs von MERS-CoV und SARS-CoV-2 sowie der zusätzlichen Positivkontrolle PIM1 durchgeführt (vgl. Abbildung 50). In einem getesteten Konzentrationsbereich zwischen 5 und 50 nM ist für PIM1 und MERS-CoV eine schwache Herunterregulation der Translationseffizienzen unabhängig von der eingesetzten Konzentration zu beobachten. Für SARS-CoV-2 ist mit der geringsten Konzentration von 5 nM die höchste Reduktion der Translationseffizienz zu vermerken. Zwar sind die Effekte nicht so stark ausgeprägt wie mit Silvestrol, dennoch scheint HGW-3 einen Einfluss auf die Translationseffizienzen der Reporter-mRNAs in Gegenwart der viralen 5'-UTRs zu haben.



**Abbildung 50: DLA in HepG2-Zellen zum Vergleich der inhibitorischen Effekte von Silvestrol und HGW-3 auf die Reporteraktivität in Gegenwart der PIM1-5'-UTR sowie der viralen 5'-UTRs von MERS-CoV und SARS-CoV-2.** Dargestellt ist die Translationseffizienz 48 Stunden nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol bzw. 5, 10, 25 und 50 nM HGW-3, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Kombination aus dem WST-1-Assay, dem Dual-Luciferase-Assay und dem Thermal-Shift-Assay eine sehr zuverlässige Vorhersage über das Potential einer Verbindung als eIF4A-Inhibitor liefert. Die unabhängig voneinander erhobenen Daten stellen ein schlüssiges Gesamtbild dar, das HGW-3 als potentiellen eIF4A-Inhibitor mit einer Wirksamkeit im mittleren nanomolaren Bereich im DLA identifizieren konnte. In einer Kooperation mit DR. CHRISTIN MÜLLER (AG ZIEBUHR, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) konnte in einem *ex vivo* Atemwegsinfektionsmodell eine Reduktion der SARS-CoV-2-Titer mit 500 nM HGW-3 beobachtet werden. Dies ist ein erstes Indiz für eine antivirale Aktivität des Rocaglamid-Derivats. Für die weitere Validierung von HGW-0, HGW-8 und HGW-4 müssten im DLA die Konzentration in den niedrigen mikromolaren Bereich angehoben werden. Möglicherweise kann sich dann die im TSA beobachtete Schmelztemperaturerhöhung von eIF4A, die vermutlich auf eine Bindung der Liganden an die Helikase zurückzuführen ist, auch im DLA bestätigen. In Bezug auf HGW-9 sind alle erhobenen Daten eindeutig und schließen eine Inhibition von eIF4A aus. Eine Validierung von HGW-9 als potentielles antivirales Breitbandmedikament mit eIF4A als Target ist demnach vermutlich nicht aussichtsreich.

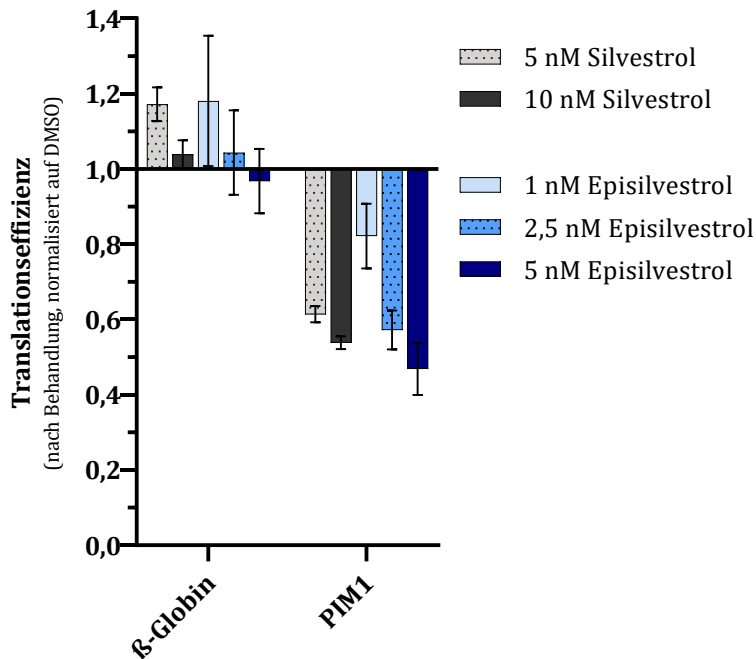
Neben Silvestrol ist auch Episilvestrol ein Vertreter der natürlich vorkommenden Rocaglamid-Derivate, für das eine antitumorale Wirkung festgestellt werden konnte, die auf die Inhibition von eIF4A zurückzuführen ist (Hwang *et al.*, 2004). Um diese eIF4A-Inhibition zu bestätigen, sollte Episilvestrol im DLA vermessen werden. Zuerst wurde der  $CC_{50}$ -Wert in HepG2-Zellen mithilfe eines WST-1-Assays bestimmt (vgl. Abbildung 51).



**Abbildung 51: WST-1-Assay von Episilvestrol in HepG2-Zellen zur Bestimmung des  $CC_{50}$ -Werts.** Die Proliferation der HepG2-Zellen wurde 48 Stunden nach Behandlung der HepG2-Zellen mit Episilvestrol mithilfe eines WST-1-Assays bestimmt. Der  $CC_{50}$ -Wert entspricht der Konzentration, bei der 50 % der Zellen abgetötet sind.

Wie in Abbildung 51 erkennbar ist, wird mit der geringsten getesteten Konzentration von 0,5 nM noch kein Plateau im Bereich um 1 erreicht, bei dem die Proliferation der Zellen nicht durch Episilvestrol gehemmt wird. Für eine exakte Kalkulation des  $CC_{50}$ -Werts müsste demnach der Konzentrationsbereich um niedrigere Konzentrationen erweitert werden. Dennoch kann der  $CC_{50}$ -Wert von Episilvestrol angenähert werden. Zudem ist bereits zu erkennen, dass dieser niedriger als der von Silvestrol oder CR-31-B (-) sein muss. Der mithilfe einer logarithmischen Fitfunktion berechnete  $CC_{50}$ -Wert für Episilvestrol in der Leberkarzinom-Zelllinie liegt bei 5,32 nM. Damit ist dieser etwa um das 4-Fache niedriger als für Silvestrol ( $CC_{50}$ : 19,22 nM). Für die im DLA verwendeten Konzentrationen werden somit 1 nM, 2,5 nM und 5 nM gewählt, um unterhalb des  $CC_{50}$ -Wertes zu bleiben. Zur Validierung der eIF4A-Spezifität von Episilvestrol im DLA

werden als Negativkontrolle  $\beta$ -Globin und als Positivkontrolle PIM1 verwendet. Mit allen drei Konzentrationen des Episilvestrols ist wie zu erwarten kein signifikanter Effekt auf die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin im DLA zu registrieren (vgl. Abbildung 52).

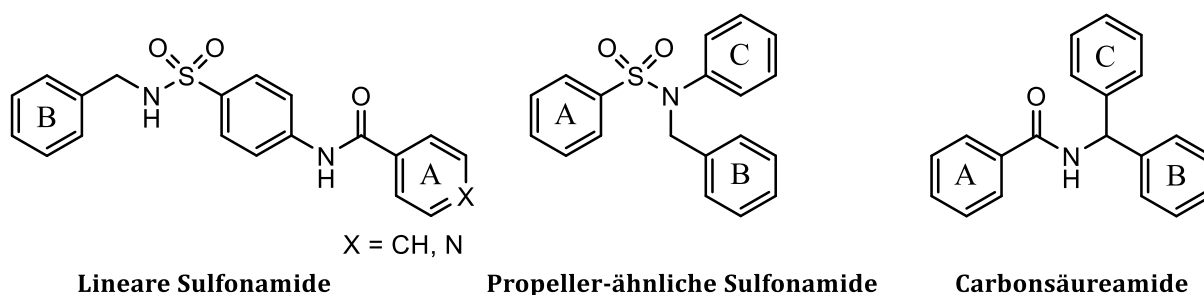


**Abbildung 52: DLA in HepG2-Zellen zum Vergleich der inhibitorischen Effekte von Silvestrol und Episilvestrol auf die Reporteraktivität der Positiv- und Negativkontrollen mit den 5'-UTRs von  $\beta$ -Globin und PIM1.** Dargestellt ist die Translationseffizienz 48 Stunden nach Behandlung mit 5 und 10 nM Silvestrol bzw. 1, 2,5 oder 5 nM Episilvestrol, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 3$ ).

Die Translation von PIM1 wird dagegen mit zunehmender Konzentration an Episilvestrol stärker inhibiert. Mit 5 nM Episilvestrol ist eine Reduktion der Translationseffizienz um über 50 % zu detektieren, mit 2,5 nM um 43 %. Die für einen eIF4A-Inhibitor charakteristische Wirkung ist mit Episilvestrol somit bereits in einem geringeren Konzentrationsbereich zu beobachten. Gleichmaßen ist die Zytotoxizität aber auch höher, was den Einsatz höherer Konzentrationen einschränkt. Basierend auf den Ergebnissen des WST-1-Assays und des DLAs scheint das Episilvestrol also in einem niedrigeren Konzentrationsbereich als Silvestrol wirksam zu sein. Einen weiteren Hinweis bezüglich des Potentials als eIF4A-Inhibitor könnte ein Thermal-Shift-Assay mit eIF4A liefern. Sollte auch hier eine stärkere Erhöhung des Schmelzpunktes im Vergleich zu Silvestrol zu messen sein, würde dies die Annahme bekräftigen, dass Episilvestrol bereits bei niedrigeren Konzentrationen eine eIF4A-inhibitorische Wirkung zeigt.

## 4.6 Screening neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren

Mit Silvestrol als Naturstoff und CR-31-B (-) als synthetisches Analogon sind in dieser Arbeit bereits zwei potente eIF4A-Inhibitoren mit einer antiviralen Wirksamkeit im niedrigen nanomolaren Bereich charakterisiert worden. Eine Schwierigkeit stellen die limitierte Isolierung von Silvestrol aus Pflanzen der Gattung *Aglaia* sowie die komplexe Synthese von CR-31-B (-) oder anderen Rocaglamid-Derivaten dar, was den Einsatz dieser Molekülklasse für ein breites Patientenspektrum erschwert. Aus diesem Grund sollte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PROF. DR. MARTIN SCHLITZER (Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) nach neuen einfacheren Molekülen gesucht werden, die eine Inhibition von eIF4A bewirken. Zunächst wurde mit einem Liganden-basierten Design der Moleküle begonnen. Als Leitstruktur hierfür diente das Silvestrol, dessen elektronische Eigenschaften und 3D-Ausrichtung als Anhaltspunkt für die Synthese neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren genutzt wurden. Eine aus diesen Überlegungen resultierende Molekülklasse stellen die linearen Sulfonamide dar (vgl. Abbildung 53). Nachdem die Kristallstruktur von eIF4A im Komplex mit der Polypurin-RNA, RocA und AMP-PNP veröffentlicht wurde (*Iwasaki et al., 2019*), wurde zu einem Struktur-basierten Design der neuen Moleküle gewechselt. Dabei wurde versucht, die Interaktionen von RocA mit den beiden Purinbasen der RNA sowie die Wechselwirkung mit dem Phenylalanin an Position 163 zu imitieren und mit den neuen Molekülen zu adressieren. Durch molekulares Docking wurde dann überprüft, ob eine Bindung der designten Moleküle an den eIF4A-RNA-Komplex stattfindet. Aus diesem Ansatz resultierten im Wesentlichen Derivate der Propeller-ähnlichen Sulfonamide sowie der Carbonsäureamide (vgl. Abbildung 53).

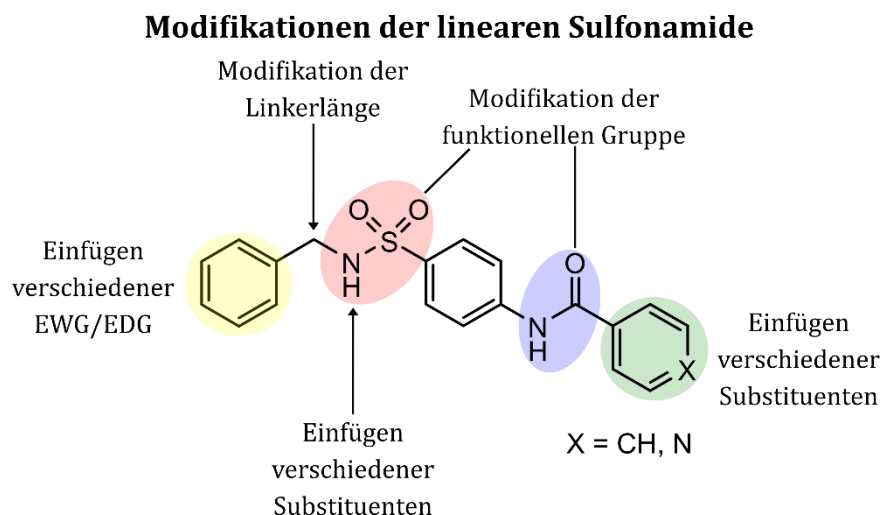


**Abbildung 53: Übersicht der Leitstrukturen des Liganden-basierten sowie des Struktur-basierten Designs zur Identifikation neuer einfacher zu synthetisierender eIF4A-Inhibitoren.** A, B und C kennzeichnen jeweils die im Docking vorhergesagten Bindetaschen, wobei A einer Interaktion mit A7 der Purin-RNA, B einer Interaktion mit G8 der Purin-RNA und C einer Interaktion mit Phe163 entspricht.

Das Design sowie die Synthese der potentiellen eIF4A-Inhibitoren wurde von THI LAN PHUONG PHAM, Doktorandin der Arbeitsgruppe SCHLITZER, durchgeführt. Die Testung der Verbindungen hinsichtlich ihrer eIF4A-inhibitorischen Eigenschaften erfolgte im Rahmen dieser Arbeit. Ähnlich zum Vorgehen mit CR-31-B (-) oder den HGW-Verbindungen, wurde zunächst mithilfe eines WST-1-Assays die Zytotoxizität der Verbindungen in HepG2-Zellen untersucht. Da es sich um insgesamt 149 Verbindungen handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht für jede Verbindung der CC<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden. Es wurde daher bei der Testung der Zytotoxizität mit zwei Konzentrationen, 100 µM und 10 µM begonnen. Bei bestehender Zytotoxizität bei 10 µM wurde der WST-1-Assay mit geringeren Konzentrationen bei 1 µM und ggf. 100 nM wiederholt, bis eine Konzentration gefunden wurde, die zu keiner Zytotoxizität in den HepG2-Zellen führte (vgl. Tabelle E.1 – Tabelle E.8 im Anhang). Mit der höchsten nicht-toxischen Konzentration wurde anschließend ein Dual-Luciferase-Assay mit β-Globin als Negativkontrolle und PIM1 oder der Polypurin-Sequenz (AG)<sub>15</sub> als Positivkontrolle durchgeführt. Ein eIF4A-spezifischer Inhibitor sollte wie bereits erwähnt keinen Effekt auf die Translations-effizienz von β-Globin haben, während die Translationseffizienz von PIM1 oder (AG)<sub>15</sub> herunterreguliert werden sollte. Mit Molekülen, die diese Kriterien erfüllten, wurde ein Thermal-Shift-Assay angeschlossen, um deren Bindung an den eIF4A-RNA-Komplex zu validieren. Da das auf diese Weise durchgeführte Screening potentieller eIF4A-Inhibitoren in Zellkulturexperimenten sehr arbeits- und zeitaufwändig ist, wurde für die Messung der letzten Testreihe mit einem Thermal-Shift-Assay begonnen, um Substanzen, die keine Affinität gegenüber eIF4A aufweisen bereits vorab aussortieren zu können. Sämtliche Messwerte der einzelnen Assays sowie die Strukturformeln aller getesteten Verbindungen sind im Anhang E zu finden.

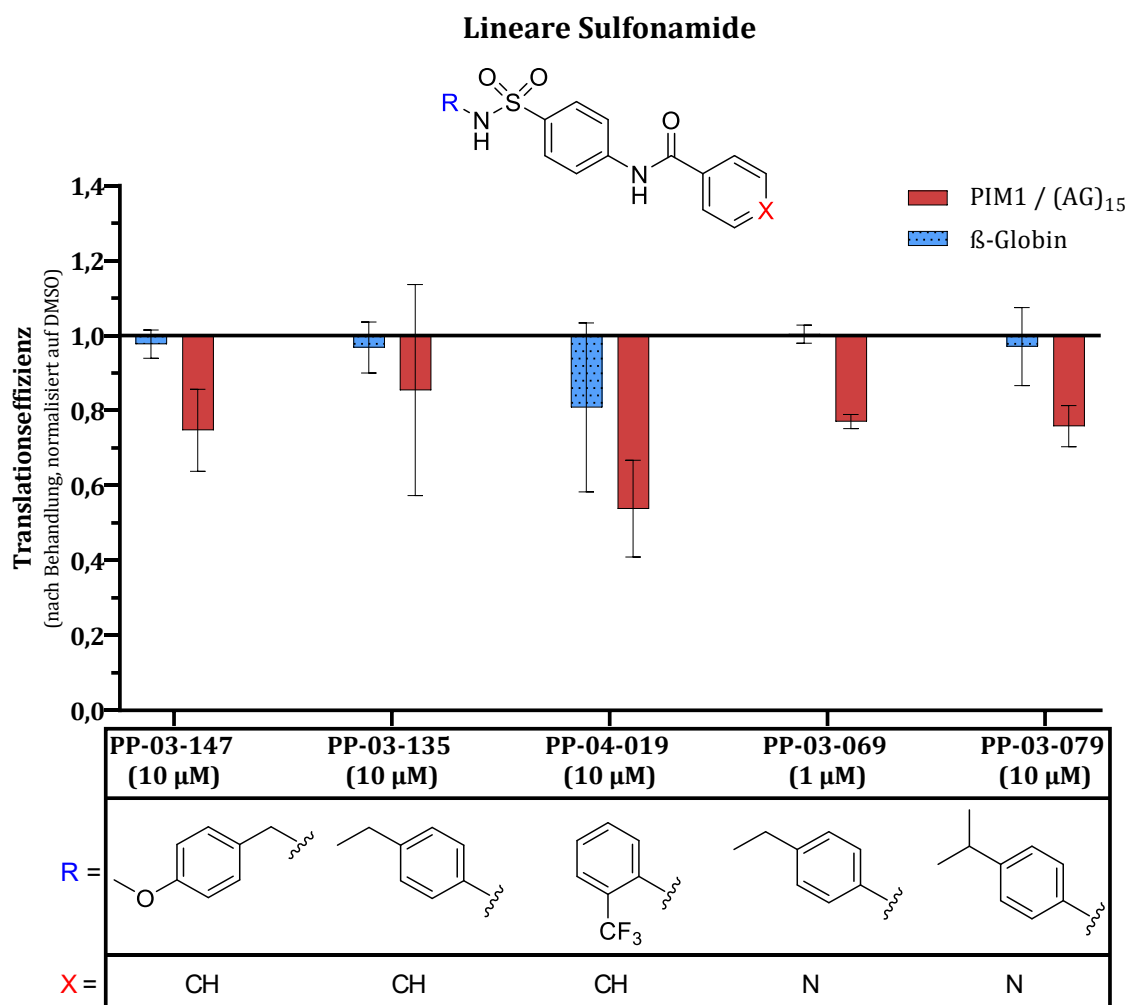
Innerhalb der ersten Testreihen wurden Modifikationen der linearen Sulfonamide, die mithilfe des Liganden-basierten Designs entwickelt wurden, hinsichtlich ihrer eIF4A-inhibitorischen Eigenschaften untersucht. Unter anderem wurde die Linkerlänge variiert, die funktionellen Gruppen modifiziert, unterschiedliche elektronenziehende oder elektronenschiebende Gruppen eingefügt oder verschiedene Substituenten eingebracht (vgl. Abbildung 54).





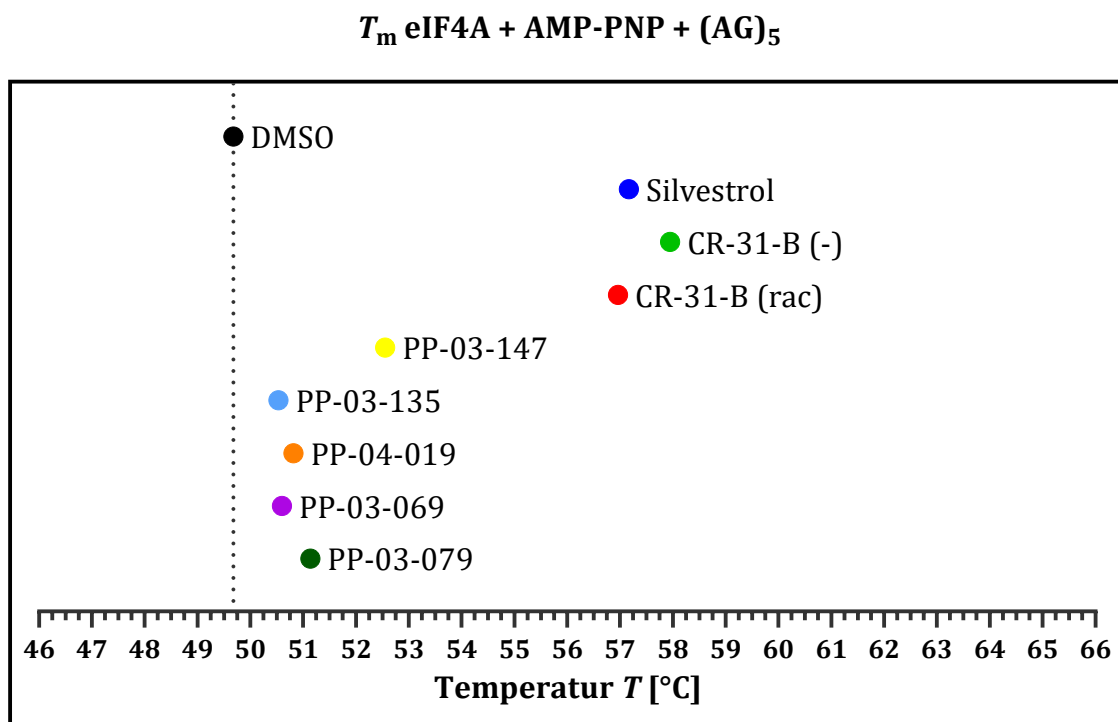
**Abbildung 54: Untersuchte Modifikationen der linearen Sulfonamide zur Identifikation neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren.** EWG: Elektronenziehende Gruppe (*electron withdrawing group*), EDG: Elektronenschiebende Gruppe (*electron donating group*) Das Design sowie die Synthese der Verbindungen wurde von THI LAN PHUONG PHAM, Doktorandin der AG SCHLITZER, durchgeführt.

Insgesamt wurden 42 modifizierte lineare Sulfonamide getestet (vgl. Tabelle E.1 im Anhang). Zwei dieser Verbindungen, PP-01-135 und PP-01-127, zeigen auch bei einer Konzentration von 10 nM noch zytotoxische Effekte, weshalb diese beiden Substanzen nicht im DLA untersucht wurden. Einige Verbindungen sind in höheren Konzentrationsbereichen unlöslich. In diesen Fällen wurde für den DLA die höchste nicht toxische Konzentration, bei der die Verbindung vollständig gelöst war, eingesetzt. Ein Großteil der linearen Sulfonamide zeigt im DLA eine unspezifische Herunterregulation der Translationseffizienz, die sowohl in Gegenwart der PIM1-5'-UTR bzw. (AG)<sub>15</sub>-Sequenz als auch in Gegenwart der  $\beta$ -Globin-5'-UTR auftritt. Mit 15 Verbindungen ist nahezu kein Effekt bzw. allenfalls eine Hochregulation der Translationseffizienz der Kontroll-5'-UTRs im DLA zu beobachten. Für 5 Substanzen kann mit der höchsten nicht toxischen Konzentration ein für einen eIF4A-Inhibitor spezifischer Effekt im DLA registriert werden (vgl. Abbildung 55). Hier ist jedoch anzumerken, dass die Translationseffizienzen von PP-03-135 und PP-04-019 sehr starke Fluktuationen aufweisen, weshalb kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativ- und der Positivkontrolle ausgemacht und somit auch nicht von einem für einen eIF4A-Inhibitor spezifischen Effekt ausgegangen werden kann. Die übrigen drei Verbindungen zeigen eine maximale Herunterregulation der Translationseffizienz der Positivkontrolle um 25 %. Verglichen mit den Effekten, die mit Rocaglamid-Derivaten erzielt werden konnten, ist die Wirkung der linearen Sulfonamide auf die Translationseffizienz eher gering.



**Abbildung 55: DLA zur Untersuchung des Effekts der modifizierten linearen Sulfonamide auf die Translationseffizienzen, die durch die 5'-UTRs von  $\beta$ -Globin (blau) und PIM1 bzw. (AG)<sub>15</sub> (rot) vermittelt werden, zur Charakterisierung der eIF4A-Spezifität.** Dargestellt ist die Translationseffizienz 48 Stunden nach Behandlung mit 10 oder 1  $\mu$ M der linearen Sulfonamide, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 1$ ).

Da im WST-1-Assay keine  $CC_{50}$ -Werte der Verbindungen bestimmt wurden, ist es denkbar, dass die Verbindungen bei einer höheren Konzentration einen stärkeren Effekt auf die Translationseffizienz ausüben könnten. Um die fünf linearen Sulfonamide hinsichtlich ihrer eIF4A-bindenden Eigenschaften zu validieren, wurde daher ein Thermal-Shift-Assay mit dem eIF4A-(AG)<sub>15</sub>-AMP-PNP-Komplex durchgeführt (vgl. Abbildung 56). Da einige der Verbindungen die Hintergrundfluoreszenz des Farbstoffs SYPRO® Orange drastisch erhöhten und dadurch falsch positive Temperaturverschiebungen hervorgerufen werden könnten, wurde das Detergens Tween-20 zu dem im TSA verwendeten Puffer hinzugegeben. So konnte die Hintergrundfluoreszenz minimiert werden.

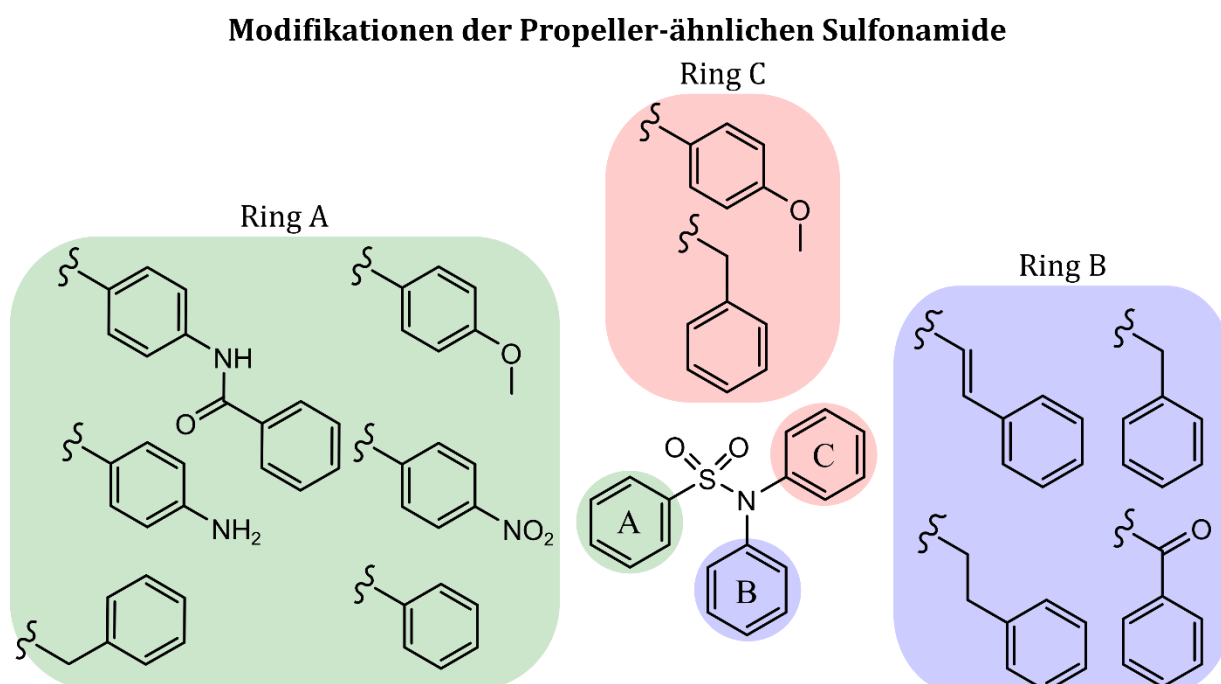


**Abbildung 56: Thermal-Shift-Assay zur Validierung der eIF4A-bindenden Eigenschaften der linearen Sulfonamide.** Dargestellt ist die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A in Gegenwart einer Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> und AMP-PNP sowie der zu untersuchenden Liganden. Eine tabellarische Auflistung der Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$  ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle E.1 im Anhang).

Interessanterweise kann mit allen Verbindungen eine Erhöhung der Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes im Vergleich zur DMSO-Kontrolle detektiert werden. Die geringsten Schmelztemperaturerhöhungen liegen knapp unter einem Grad und betragen 0,85 °C für PP-03-135 und 0,92 °C für PP-03-069. Die Verbindungen PP-04-019 und PP-03-079 verschieben den Schmelzpunkt um 1,15 °C bzw. um 1,46 °C. Die höchste Verschiebung der Schmelztemperatur ist mit PP-03-147 zu beobachten. Hier liegt die Zunahme der Schmelztemperatur von eIF4A in Gegenwart des linearen Sulfonamids bei 2,87 °C. An dieser Stelle ist aber anzumerken, dass PP-03-147 eine der Verbindungen war, die bereits ohne Zugabe des Proteins eine Farbänderung des Fluoreszenzfarbstoffs SYPRO® Orange hervorgerufen haben. Zwar ist diese durch die Zugabe von Tween-20 minimiert worden, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dennoch ein geringer Anteil der beobachteten Schmelztemperaturerhöhung auf den Farbumschlag von SYPRO® Orange und der damit einhergehenden steigenden Hintergrundfluoreszenz zurückzuführen ist. Auch wenn die Temperaturverschiebungen im Vergleich zu den zuvor untersuchten Rocaglamid-Derivaten noch relativ gering erscheinen, können die identifizierten Strukturen als Anhaltspunkt für die Synthese neuer

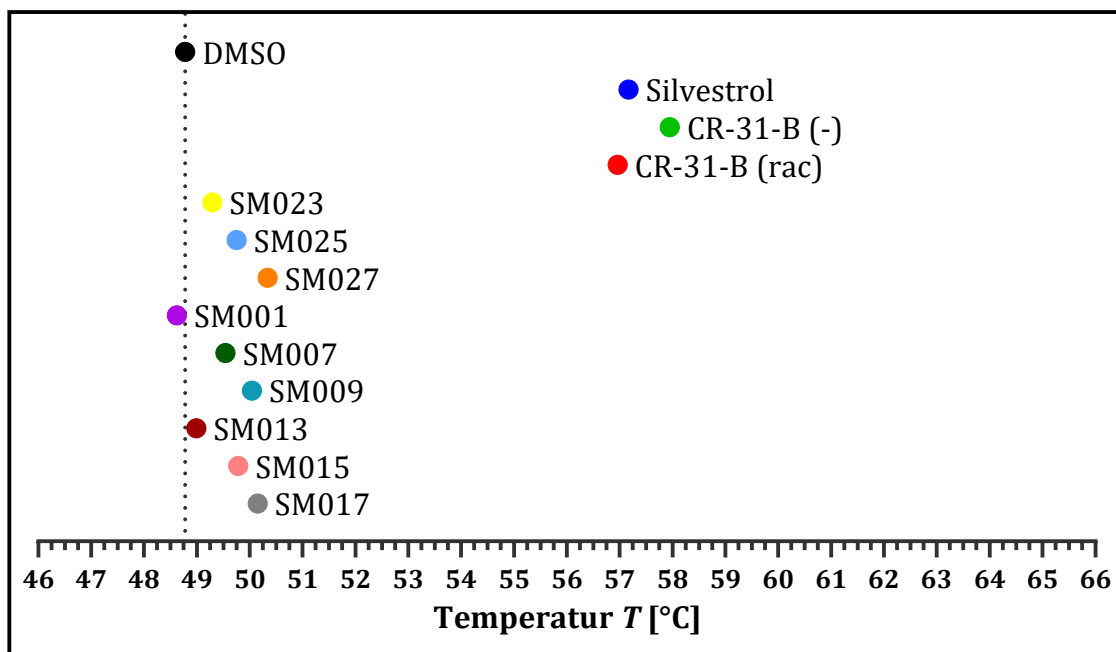
eIF4A-Inhibitoren verwendet werden. Es fällt z. B. auf, dass fast alle der fünf vielversprechendsten Verbindungen über Alkylreste an Ring B verfügen. Diese Erkenntnis kann für das Design neuer zu testender Kandidaten in Betracht gezogen werden.

Neben den linearen Sulfonamiden wurden außerdem Propeller-ähnliche Sulfonamide getestet. Diese Serie umfasst 17 verschieden modifizierte Moleküle, von denen acht mithilfe des WST-1-Assays und anschließendem DLA untersucht wurden. Die übrigen neun Substanzen wurden ausschließlich im Thermal-Shift-Assay vermessen.



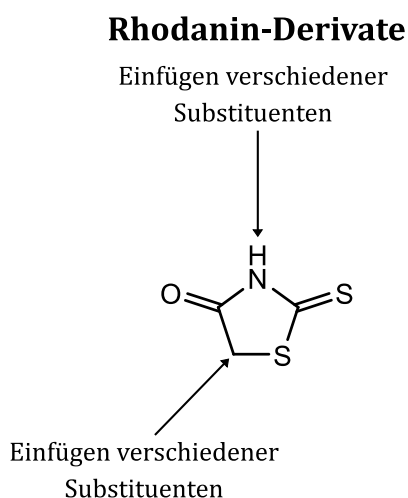
**Abbildung 57: Untersuchte Modifikationen der Propeller-ähnlichen Sulfonamide zur Identifikation neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren.** Das Design sowie die Synthese der Verbindungen wurde von THI LAN PHUONG PHAM durchgeführt.

Unter den acht in Zellkultur-Experimenten getesteten Propeller-ähnlichen Sulfonamiden ist überwiegend kein Effekt auf die Translationseffizienz zu beobachten. Zwei Verbindungen zeigen eine unspezifische Herunterregulation von  $\beta$ -Globin und PIM1 bzw. (AG)<sub>15</sub>. Aus diesem Grund wird auf diese Verbindungen nicht näher eingegangen. Die übrigen neun Moleküle, die im TSA vermessen wurden, zeigen einen maximalen Temperaturanstieg von bis zu 1,56 °C (vgl. Abbildung 58). Eine annähernd ausgeprägte Erhöhung der Schmelztemperatur wie sie mit Silvestrol oder HGW-3 zu beobachten ist, kann nicht erreicht werden.

$T_m$  eIF4A + AMP-PNP + (AG)<sub>5</sub>

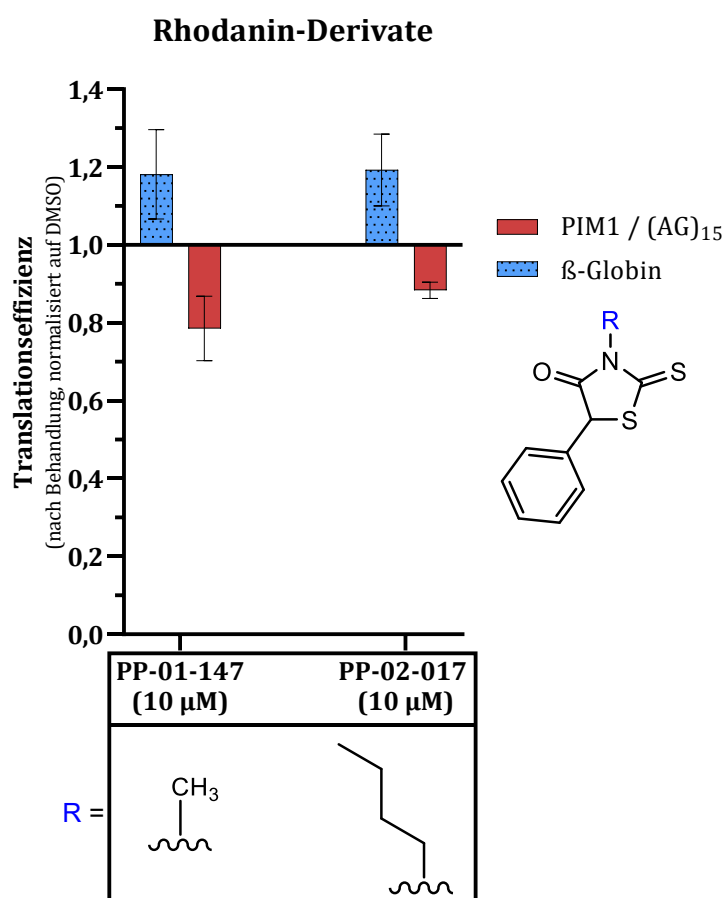
**Abbildung 58: Thermal-Shift-Assay zur Validierung der eIF4A-bindenden Eigenschaften der Propeller-ähnlichen Sulfonamide.** Dargestellt ist die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A in Gegenwart der Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> und AMP-PNP sowie der zu untersuchenden Liganden. Eine tabellarische Auflistung der Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$  ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle E.3 im Anhang).

In einer anderen Testreihe wurden Rhodanin-Derivate untersucht. Insgesamt handelt es sich um sechs Verbindungen, die sich in den Substituenten an Position 5 und an der Aminogruppe des Thiazolidin-Grundgerüsts unterscheiden (vgl. Abbildung 59).



**Abbildung 59: Leitstruktur der Rhodanin-Derivate, deren Modifikationen hinsichtlich ihrer Aktivität als eIF4A-Inhibitoren analysiert wurden.** Das Design sowie die Synthese der Verbindungen wurde von THI LAN PHUONG PHAM durchgeführt.

Innerhalb dieser Testreihe sind zwei Verbindungen bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  nicht löslich (vgl. Tabelle E.2). Generell ist in einem Konzentrationsbereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  keine Zytotoxizität in den HepG2-Zellen zu beobachten. Im DLA zeigen vier der sechs Rhodanin-Derivate keine Hemmung der Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin oder PIM1 bzw. (AG)<sub>15</sub>. Die Verbindungen PP-01-147 und PP-02-017 verursachen einen für einen eIF4A-Inhibitor spezifischen Effekt (vgl. Abbildung 60). Allerdings wird besonders für PP-02-017 die Translationseffizienz der Positivkontrolle nur in sehr geringem Maße herunterreguliert (TE:  $0,88 \pm 0,02$ ).

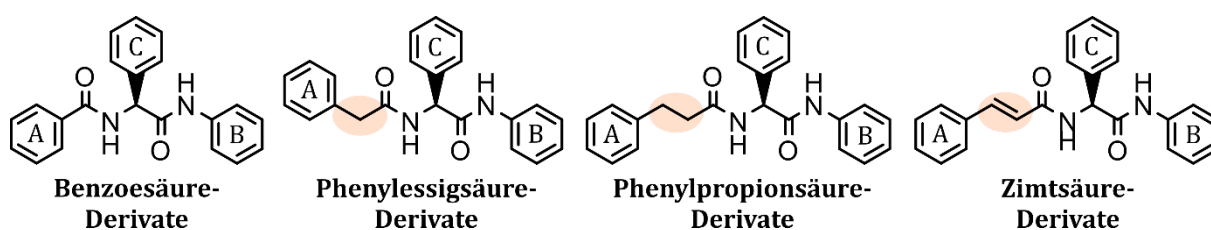


**Abbildung 60:** DLA zur Untersuchung des Effekts der Rhodanin-Derivate auf die Translationseffizienzen, die durch die 5'-UTRs von  $\beta$ -Globin (blau) und PIM1 bzw. (AG)<sub>15</sub> (rot) vermittelt werden, zur Charakterisierung der eIF4A-Spezifität. Dargestellt ist die Translationseffizienz 48 Stunden nach Behandlung mit 10 oder 1  $\mu\text{M}$  der Rhodanin-Derivate, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen ( $n \geq 1$ ).

Zur Validierung dieser beiden Rhodanin-Derivate wurde ein Thermal-Shift-Assay mit eIF4A durchgeführt (vgl. Tabelle E.2 im Anhang). Entgegen eines erwarteten Temperaturanstiegs in Gegenwart der Substanzen ist hier jedoch eine Verringerung der Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes um 1,54  $^{\circ}\text{C}$  (PP-02-017) bzw.

um 1,77 °C (PP-01-147) gegenüber der DMSO-Kontrolle zu vernehmen. Somit scheint unter den Rhodanin-Derivaten kein vielversprechender potentieller eIF4A-Inhibitor zu sein und die im DLA beobachteten Effekte müssen auf eine anderweitig hervorgerufene Auswirkung der Substanzen auf die HepG2-Zellen ausgelöst worden sein.

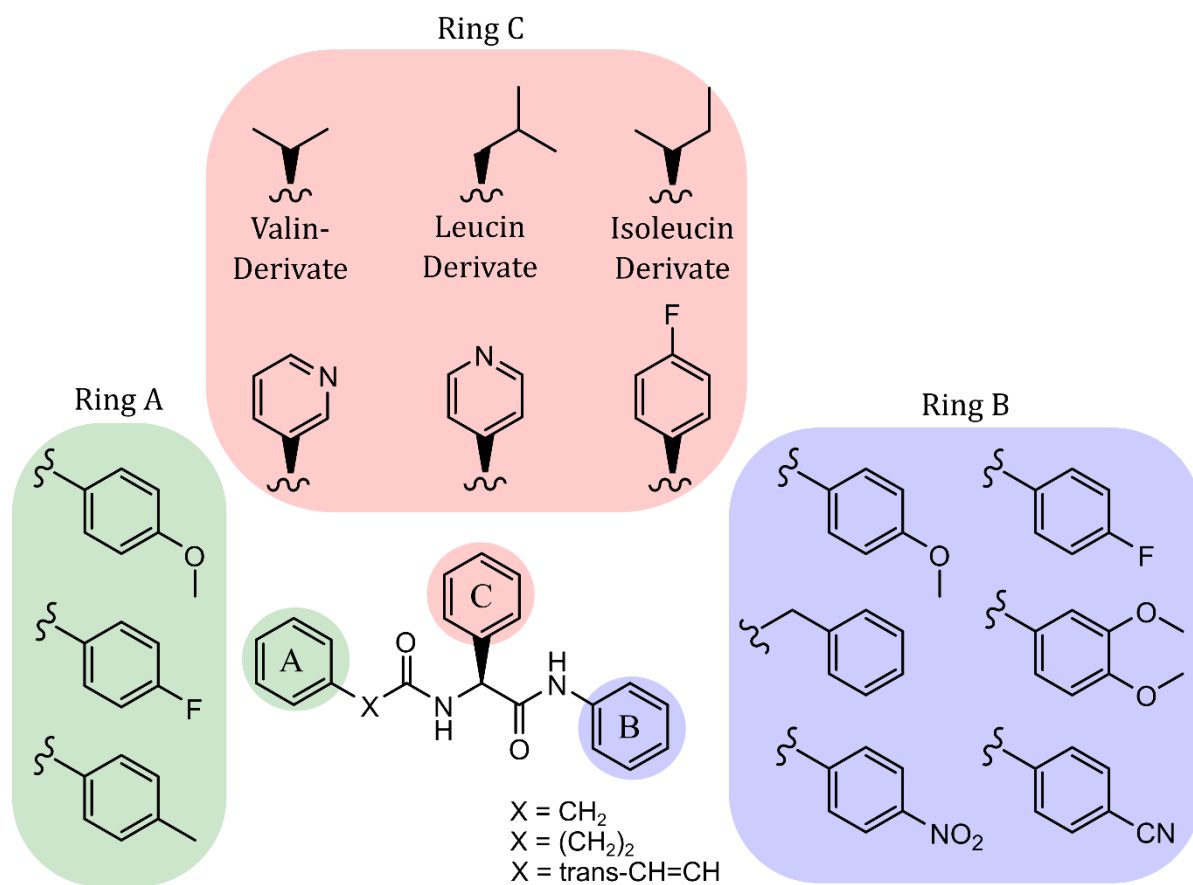
Die nächste untersuchte Substanzklasse beinhaltet Derivate der Dicarbonsäureamide. Diese sind aus dem Struktur-basierten Design neuer eIF4A-Inhibitoren hervorgegangen. Zur besseren Unterscheidung werden die Derivate basierend auf den Ausgangssäuren in vier Unterkategorien klassifiziert: Benzoesäure-, Phenyllessigsäure-, Phenylpropionsäure- und Zimtsäure-Derivate (vgl. Abbildung 61).



**Abbildung 61: Modifikationen der Dicarbonsäureamide: Benzoesäure-, Phenyllessigsäure-, Phenylpropionsäure- und Zimtsäure-Derivate.** Das Design sowie die Synthese der Verbindungen wurde von THI LAN PHUONG PHAM durchgeführt.

Innerhalb dieser Unterkategorien sind verschiedenste Modifikationen an Ring A, Ring B und Ring C durchgeführt worden (vgl. Abbildung 62). Von den fünf Benzoesäure-Derivaten wurden drei im WST-1-Assay und im DLA getestet, die übrigen zwei Derivate wurden mithilfe des Thermal-Shift-Assays untersucht. Im DLA zeigt keine der drei Verbindungen eine spezifische Wirkung auf die Translationseffizienz (vgl. Tabelle E.4 im Anhang). Die im Thermal-Shift-Assay analysierten Verbindungen PP-05-123 und PP-05-125 verursachen eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 1,34 °C bzw. 1,12 °C. Im Hinblick darauf, dass mit den Rocaglamid-Derivaten HGW-0, HGW-8 und HGW-4, deren  $CC_{50}$ -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich liegt, ein Temperaturanstieg von 2 – 3 °C hervorgerufen wird, liegt bei diesen geringen Temperaturerhöhungen unter 1,5 °C vermutlich keine starke Bindung der Substanz an den eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplex vor.

## Modifikationen der Dicarbonsäureamide



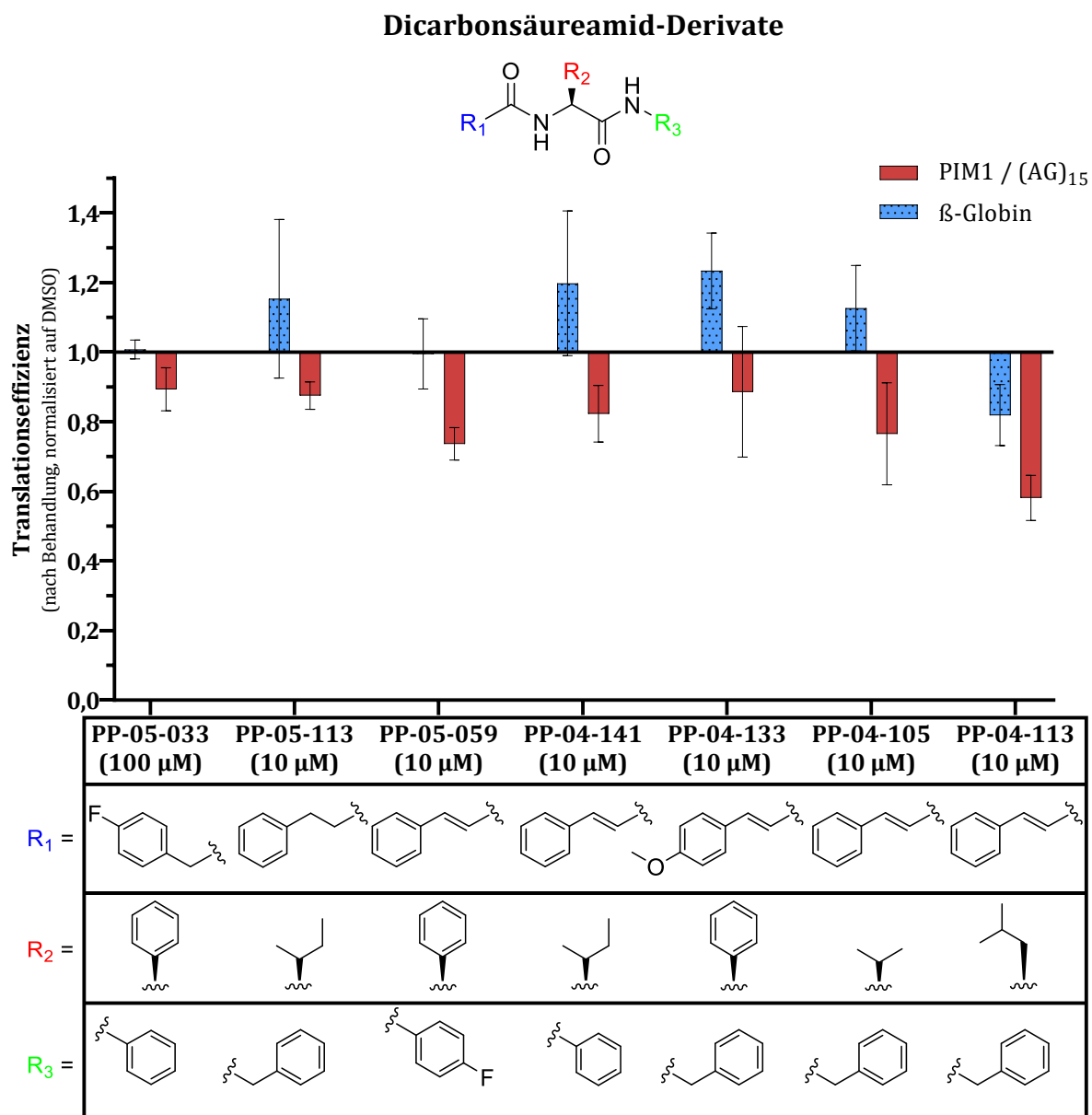
**Abbildung 62: Beispiele für untersuchte Modifikation der Dicarbonsäureamide.** Das Design sowie die Synthese der Verbindungen wurde von THI LAN PHUONG PHAM durchgeführt.

Die insgesamt 30 Phenyllessigsäure-Derivate, darunter vier Valin-Derivate, zwei Leucin-Derivate und zwei Isoleucin-Derivate, üben keinen spezifischen Einfluss auf die Translationseffizienz aus (vgl. Tabelle E.5 im Anhang). Lediglich eine Verbindung, PP-05-033, reduziert die Translationseffizienz von (AG)<sub>15</sub> um 11 %, während  $\beta$ -Globin nicht beeinflusst wird (vgl. Abbildung 61). Auch mit den im TSA untersuchten Substanzen der Phenyllessigsäure-Derivate ist ein maximaler Anstieg der Temperatur um 0,6 °C zu registrieren. Basierend auf diesen Messdaten scheinen die Phenyllessigsäure-Derivate demnach eher nicht für die Entwicklung neuer eIF4A-Inhibitoren in Frage zu kommen. Die nächste Testreihe widmete sich den Phenylpropionsäure-Derivaten, darunter drei Valin-, zwei Leucin- und zwei Isoleucin-Derivate. Innerhalb der insgesamt 18 Verbindungen ist bei einer Vielzahl der Verbindungen keine Zytotoxizität bei 100  $\mu$ M im WST-1-Assay festzustellen (vgl. Tabelle E.6 im Anhang). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Verbindungen keine Inhibition der RNA-Helikase hervorrufen. Diese Vermutung bestätigt sich im DLA. Überwiegend ist hier kein Effekt auf die



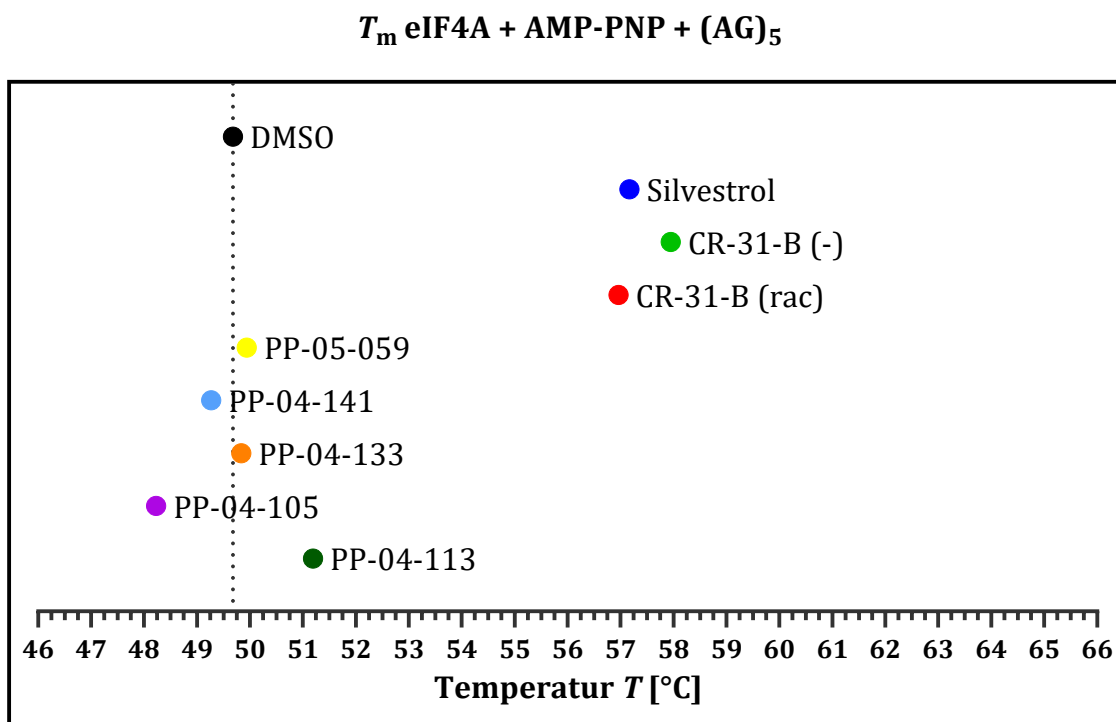
Translationseffizienz zu vermerken. Nur ein Isoleucin-Derivat, PP-05-113, zeigt eine schwache Herunterregulation der Translationseffizienz der Positivkontrolle (vgl. Abbildung 63). Für die Negativkontrolle kann mit dieser Verbindung jedoch kein stabiler Wert erhalten werden, was sich in den prominenten Fehlerbalken widerspiegelt. Im Thermal-Shift-Assay verursacht lediglich ein Derivat, PP-06-055, einen Temperaturanstieg um 0,81 °C. Alle anderen Verbindungen beeinflussen den Schmelzpunkt des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes nahezu gar nicht (vgl. Tabelle E.6 im Anhang).

Die letzte Unterkategorie der Carbonsäureamide stellen die Zimtsäure-Derivate dar. Diese verfügen bei gleicher Kettenlänge im Gegensatz zu den Phenylpropionsäure-Derivaten über eine Doppelbindung. Von den 22 Verbindungen, bei denen es sich um drei Valin-, zwei Leucin- und zwei Isoleucin-Derivate handelt, wurden 17 Substanzen mithilfe des WST-1-Assays und des DLAs getestet. Die fünf übrigen Verbindungen wurden ausschließlich im TSA untersucht (vgl. Tabelle E.7 im Anhang). Im WST-1-Assay sind mit den Zimtsäure-Derivaten generell häufiger Löslichkeitsprobleme bei einer Konzentration von 100 µM zu beobachten. Gleichzeitig weist ein Großteil der Zimtsäure-Derivate eine höhere Zytotoxizität in den HepG2-Zellen auf. Dementsprechend wurden für den DLA meist Konzentrationen zwischen 1 µM und 10 µM eingesetzt. Im DLA haben neun Verbindungen keine Auswirkungen auf die Translationseffizienz. Für drei Verbindungen ist eine unspezifische Reduktion der Translationseffizienz zu vermerken. Insgesamt fünf Zimtsäure-Derivate, PP-05-059, PP-04-141, PP-04-133, PP-04-105 und PP-04-133 zeigen einen für einen eIF4A-Inhibitor spezifischen Effekt auf die Translationseffizienz der beiden Kontrollen (vgl. Abbildung 63). Die stärkste Verminderung der Translationseffizienz der Positivkontrolle (AG)<sub>15</sub> ist mit PP-04-113 zu vermerken (TE: 0,58±0,06). Gleichmaßen wird hier allerdings auch die Translationseffizienz von β-Globin um 18 % herunterreguliert. Das wiederum deutet eher auf einen unspezifischen Effekt hin. Anders sieht dies bei PP-04-133 aus. Hier ist zwar keine Reduktion der Translationseffizienz von β-Globin zu beobachten, dafür fällt aber auch die Verminderung der Translationseffizienz von (AG)<sub>15</sub> nur schwach aus. Zudem treten starke Fluktuationen auf, weshalb auch hier keine eindeutige Aussage bezüglich einer eIF4A-Spezifität getroffen werden kann. Ähnliches ist mit PP-04-141 und PP-04-105 zu beobachten. Am vielversprechendsten könnte der Effekt von PP-05-059 beurteilt werden. Bei einer Reduktion der Translationseffizienz von (AG)<sub>15</sub> um 26 % wird die Negativkontrolle β-Globin nahezu nicht beeinflusst.



**Abbildung 63: DLA zur Untersuchung des Effekts der Dicarbonsäureamid-Derivate auf die Translationseffizienzen von β-Globin (blau) und PIM1 bzw. (AG)<sub>15</sub> (rot) zur Charakterisierung der eIF4A-Spezifität.** Dargestellt ist die Translationseffizienz 48 Stunden nach Behandlung mit 10 oder 1 μM der Dicarbonsäureamid-Derivate, normalisiert auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen (n ≥ 1).

Für die weitere Validierung der vielversprechendsten Zimtsäure-Derivate wurde abermals mit einem TSA fortgefahren (vgl. Abbildung 64). Wie es auch schon im DLA hinsichtlich der Translationseffizienz zu beobachten war, hat PP-04-113 auch im TSA den größten Einfluss auf die Schmelztemperatur von eIF4A. Die Temperatur wird in Gegenwart des Zimtsäure-Derivats um 1,51 °C erhöht. Die übrigen Verbindungen zeigen im TSA keinen nennenswerten Einfluss auf die Schmelztemperatur. Dem entgegen wird die Schmelztemperatur mit PP-04-105 und PP-04-141 sogar herabgesetzt.



**Abbildung 64: Thermal-Shift-Assay zur Validierung der eIF4A-bindenden Eigenschaften der Dicarbonsäureamid-Derivate.** Dargestellt ist die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A in Gegenwart einer Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> und AMP-PNP sowie der zu untersuchenden Liganden. Eine tabellarische Auflistung der Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$  ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle E.7 im Anhang).

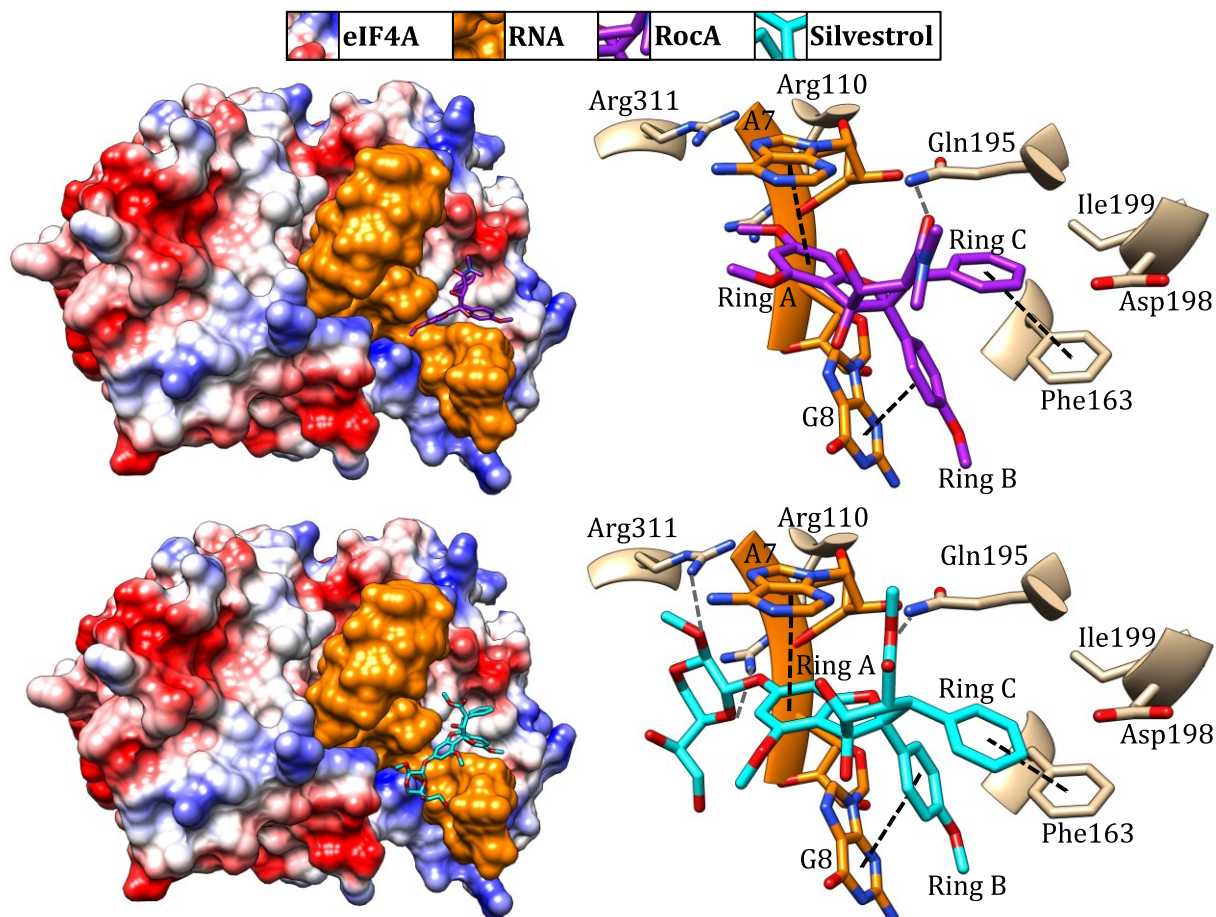
Zusammenfassend haben einige Substanzen zwar einen starken Einfluss auf die Translationseffizienz, dieser scheint aber oftmals nicht eIF4A-spezifisch zu sein. Diejenigen Kandidaten, die im DLA einen für einen eIF4A-Inhibitor spezifischen Effekt hervorgerufen haben, haben im TSA maximal eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 2,87 °C bewirkt. Dies entspricht zwar noch nicht der angestrebten Wirkung, jedoch können strukturelle Eigenschaften genutzt werden, um das Design neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren anzupassen. Zudem eignet sich das bisher angewandte Verfahren zur Validierung der eIF4A-Spezifität nicht besonders gut, wenn Substanzen in großem Maßstab gescreent werden sollen. Um eine verlässliche Aussage treffen zu können, müsste zunächst der  $CC_{50}$ -Wert einer jeden Verbindung bestimmt werden und anschließend der DLA in einem darauf angepassten Konzentrationsbereich durchgeführt werden. Besser geeignet wäre somit ein Helikase-Assay, bei dem potentielle Inhibitoren im 96-Well Format getestet werden können. Hier könnten die Inhibitoren im Überschuss eingesetzt werden, ohne dass zuvor eine optimale Konzentration bestimmt werden müsste. Für vielversprechende Kandidaten könnte dann der  $CC_{50}$ -Wert bestimmt und mit dem DLA fortgefahren werden.

### **4.7 Molekulares Docking zur Abschätzung der Bindungseffizienz neuer eIF4A-Inhibitoren sowie zur Vorhersage von Rocaglamid-sensitiven oder -resistenten eIF4A-Varianten**

Die Veröffentlichung der Kristallstruktur von eIF4A im Komplex mit einer Polypurin-RNA, dem ATP-Analog AMP-PNP sowie RocA hat einen großen Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Rocaglamid-Derivaten geleistet. Seither ist es möglich, mithilfe von molekularem Docking den Bindungsmodus sowie die Bindungsenergie von potentiellen oder bekannten eIF4A-Inhibitoren an den Protein-RNA-Komplex vorherzusagen. Diese Vorhersagen basieren auf molekularen Docking-Algorithmen, die atomare Van-der-Waals-Radien und Ladungen, Flexibilität oder Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen von Ligand und Rezeptor berücksichtigen (*Dias & de Azevedo Jr., 2008*).

Da Silvestrol im Gegensatz zu den anderen Rocaglamid-Derivaten wie RocA oder CR-31-B über eine zusätzliche Dioxan-Gruppe an Ring A verfügt, stellte sich die Frage, wie sich diese auf die Interaktion mit eIF4A und der gebundenen RNA auswirkt. Aus diesem Grund wurden der Bindungsmodus und die Bindungsenergie der Interaktion von Silvestrol mit dem eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplex mit molekularem Docking vorhergesagt und mit der publizierten Kristallstruktur, die die Interaktion von RocA mit eIF4A zeigt, verglichen (vgl. Abbildung 65). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, beruht die Bindung von RocA hauptsächlich auf  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit den Purinbasen der RNA sowie dem Phenylalanin an Position 163 (vgl. Abbildung 9 in der Einleitung). Das lässt vermuten, dass für eine stabile Interaktion Purinbasen auf der Seite des RNA-Substrats benötigt werden. Angesichts der Docking-Vorhersagen scheint Silvestrol die gleichen Interaktionen mit den Purinbasen und dem Phenylalanin 163 einzugehen wie RocA (vgl. Abbildung 65). Aufgrund des zusätzlichen Dioxan-Rings könnten außerdem Wasserstoffbrückenbindungen mit Argininen auf der gegenüberliegenden Seite über die RNA hinweg ausgebildet werden. Diese zusätzlichen Interaktionen könnten die beobachteten Unterschiede zwischen Silvestrol und CR-31-B (-) im DLA erklären. Während CR-31-B (-) überwiegend einen Einfluss auf die Translationseffizienz von RNA-Substraten mit Polypurin-Sequenzen gezeigt hat, war mit Silvestrol auch eine Reduktion der Translationseffizienz von RNAs mit doppelsträngigen Haarnadelstrukturen zu detektieren. Möglicherweise lässt eine zusätzliche Interaktion von Silvestrol mit eIF4A, die über den Dioxan-Ring ausgebildet wird, das Festklemmen

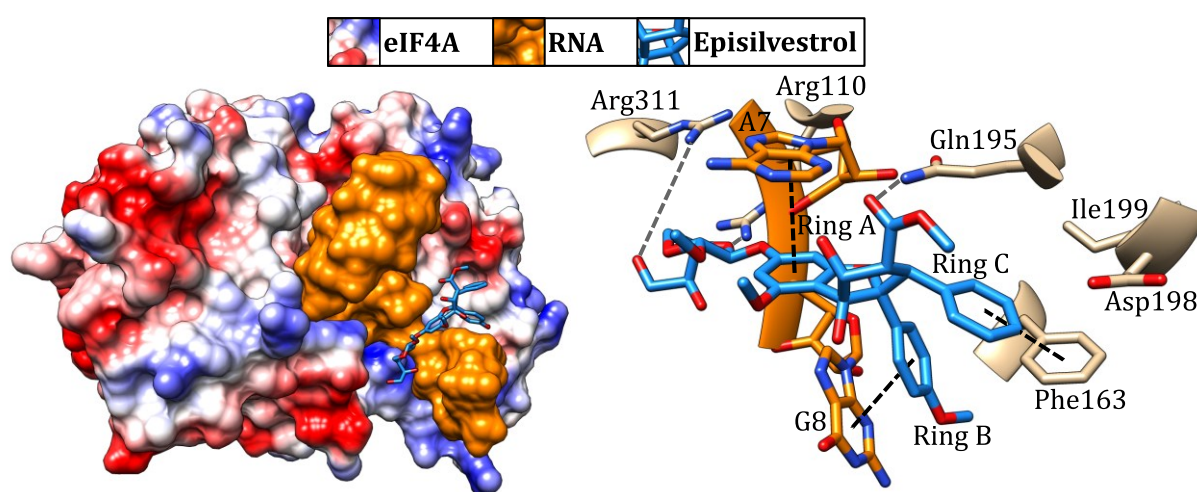
von RNA-Substraten zu, die nicht zwingend aus Polypurinbasen bestehen. Ferner ist in den Docking-Vorhersagen zu erkennen, dass Silvestrol im Gegensatz zu RocA die Polypurin-RNA vollständig überquert. Somit scheint die RNA in Gegenwart von Silvestrol fest fixiert zu sein, wohingegen RocA die RNA nur von einer Seite kommend festklemmt.



**Abbildung 65: Vergleich der Bindungen von RocA an eIF4A (oben, kristallografische Daten) mit der Bindung von Silvestrol an eIF4A (unten, Docking-Vorhersage).** Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (RBVI) angefertigt. Die Farbgebung der Oberfläche von eIF4A resultiert aus dem elektrostatischen Potential (Blau: positives Potential, Rot: negatives Potential). Legende: Beige: eIF4A, Orange: Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub>, Violett: RocA, Cyan: Silvestrol, schwarz-gestrichelte Linien:  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, hellgrau-gestrichelte Linien: mögliche Wasserstoffbrückenbindungen. Für Silvestrol berechnete Bindungsaffinität: -9,4 kcal/mol. (PDB: 5ZC9) (Iwasaki *et al.*, 2019).

Angesichts der Tatsache, dass Silvestrol und sein Diastereomer Episilvestrol sich lediglich im Stereozentrum der Hydroxygruppe des Dioxan-Rings unterscheiden, ist davon auszugehen, dass der Bindungsmodus von Episilvestrol ähnlich aussieht. Tatsächlich weicht der in den Docking-Untersuchungen vorhergesagte Bindungsmodus im Wesentlichen in der Ausrichtung der Dioxan-Gruppe von Silvestrol ab (vgl. Abbildung 66). Somit sind Änderungen in der Affinität der beiden natürlichen Rocaglamid-Derivate

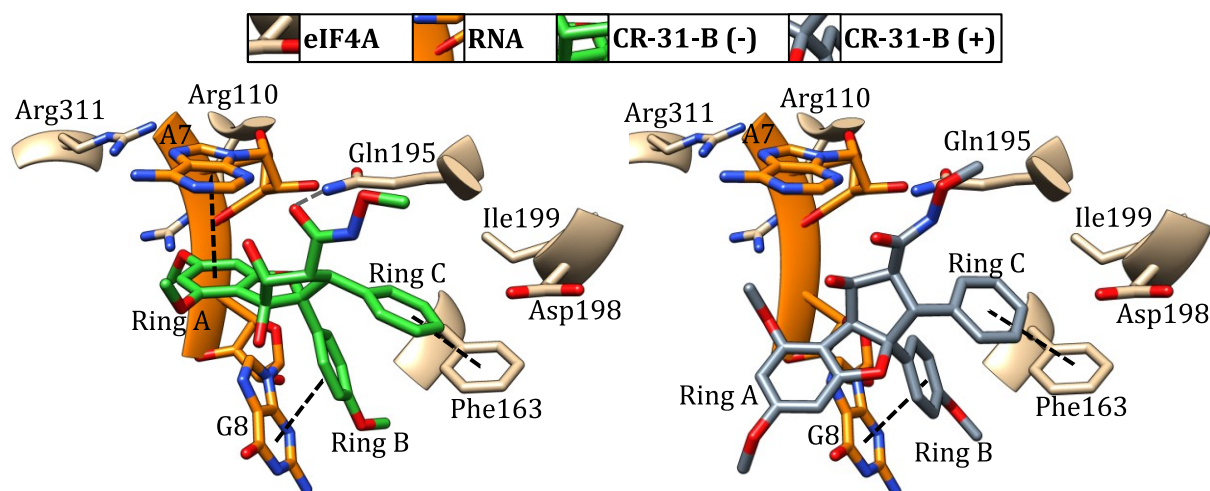
vermutlich auf die Interaktionen der Helikase mit dem Dioxan-Ring zurückzuführen. Es scheint, als wäre die Dioxan-Einheit bei Episilvestrol für mögliche Interaktionen mit Argininen oder anderen Wasserstoffbrückenbildnern besser zugänglich. Ein Vergleich der Ausrichtung der Dioxan-Gruppen zeigt, dass in der Docking-Vorhersage von Silvestrol die Dioxan-Gruppe eher vom Komplex weg orientiert ist, während die Dioxan-Einheit von Episilvestrol mehr zum Komplex hingeneigt ist. Inwieweit diese minimalen Änderungen in den Docking-Vorhersagen jedoch auf den tatsächlichen Bindungsmodus und damit einhergehende Unterschiede schließen lassen, ist kritisch zu hinterfragen und nur durch Ermittlung der jeweiligen Kristallstrukturen eindeutig zu klären.



**Abbildung 66: Vorhersage der Bindung von Episilvestrol an den eIF4A-RNA-Komplex.** Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (*RBVI*) angefertigt. Die Farbgebung der Oberfläche von eIF4A resultiert aus dem elektrostatischen Potential (Blau: positives Potential, Rot: negatives Potential). Legende: Beige: eIF4A, Orange: Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub>, Blau: Episilvestrol, schwarz-gestrichelte Linien:  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, hellgrau-gestrichelte Linien: mögliche Wasserstoffbrückenbindungen. Für Episilvestrol berechnete Bindungsaffinität: -9,4 kcal/mol. (PDB: 5ZC9) (*Iwasaki et al.*, 2019).

In einer nächsten Docking-Berechnung sollte überprüft werden, wie die Bindung von CR-31-B, einem Rocaglamid-Derivat ohne Dioxan-Ring, an den eIF4A-RNA-Komplex aussehen könnte. Da RocA und CR-31-B (-) sich lediglich in der Carboxamid-Gruppe unterscheiden, die für die wesentlichen  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen nicht von Bedeutung ist, ist davon auszugehen, dass die Interaktion von CR-31-B (-) mit eIF4A ähnlich wie die Interaktion von RocA mit eIF4A aussieht (vgl. Abbildung 8). Angesichts der beobachteten Effekte im WST-1-Assay und im DLA scheint das inaktive (+)-Enantiomer keine Inhibition von eIF4A auszuüben, was wiederum auf das Ausbleiben der Bindung an eIF4A zurückzuführen sein muss. Um dies zu überprüfen, wurde in einem Docking-Experiment die Bindung beider Enantiomere an eIF4A vorhergesagt (vgl. Abbildung 67).



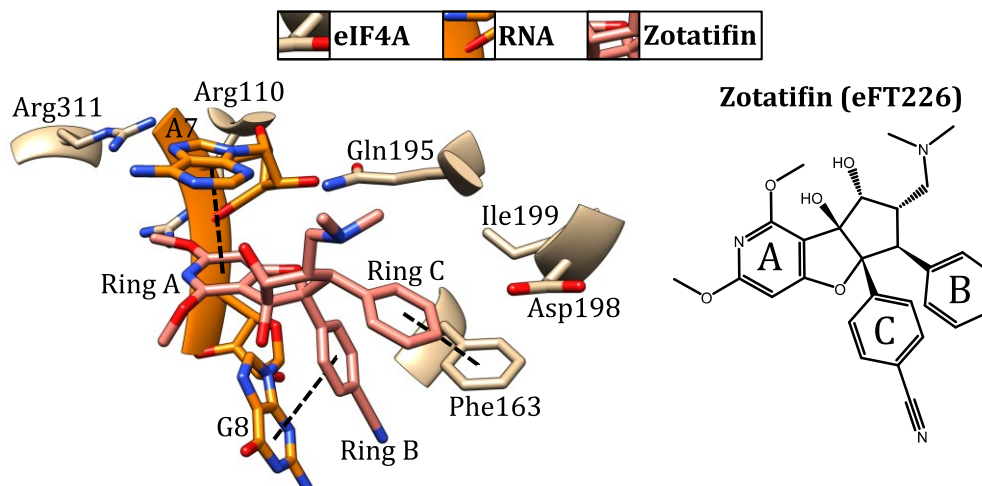


**Abbildung 67: Vergleich der mithilfe von molekularem Docking vorhergesagten Bindung von CR-31-B (-) und CR-31-B (+) an den eIF4A-RNA-Komplex.** Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (RBVI) angefertigt. Legende: Beige: eIF4A, Orange: Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub>, Grün: CR-31-B (-), Grau: CR-31-B (+), schwarz-gestrichelte Linien:  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, hellgrau-gestrichelte Linien: mögliche Wasserstoffbrückenbindungen. Für CR-31-B (-) berechnete Bindungsaffinität: -10,1 kcal/mol; für CR-31-B (+) berechnete Bindungsaffinität: -9,3 kcal/mol. (PDB: 5ZC9) (Iwasaki *et al.*, 2019).

Wie erwartet sind die Interaktionen von CR-31-B (-) mit eIF4A kaum von denen von RocA mit der RNA-Helikase zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu führt die umgekehrte Stereochemie im Falle von CR-31-B (+) dazu, dass die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen von Ring A mit dem Adenin an Position 7 der Polypurin-RNA nicht ausgebildet werden können. Das erklärt, warum CR-31-B (+) weder im DLA noch im TSA oder im WST-1-Assay einen eIF4A-inhibitorischen Effekt gezeigt hat. Zudem deutet es darauf hin, dass alle drei  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen essentiell für eine stabile Bindung an eIF4A zu sein scheinen. Offensichtlich reicht es nicht aus, wenn lediglich zwei der drei möglichen  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen ausgebildet werden können, wie es laut Docking-Ergebnissen für CR-31-B (+) vorhergesagt ist.

Mit Zotatfin, auch eFT226, wird aktuell ein vielversprechendes Rocaglamid-Derivat des Unternehmens *eFFECTOR Therapeutics* bereits in der klinischen Phase 1/2 gegen fortgeschrittene bösartige Tumoren in der Krebsforschung getestet (Thompson *et al.*, 2019). Weiterhin soll das Molekül parallel auch als potentielles antivirales Medikament gegen SARS-CoV-2 untersucht werden (Gordon *et al.*, 2020). Der eIF4A-Inhibitor weist statt der in RocA und CR-31-B vorhandenen Carboxamid-Gruppe eine Dimethylaminomethyl-Gruppe auf. Außerdem befindet sich an Ring B statt eines Methoxyphenyl-Restes eine Benzotrifluorid-Gruppe (vgl. Abbildung 68). Welche Unterschiede diese Modifikationen auf den Bindungsmodus haben, sollte in einem weiteren Docking-Experiment analysiert

werden. Hier ist zu erkennen, dass die vorhergesagte Bindung von Zotatifin an eIF4A im Wesentlichen auf denselben Interaktionen beruht, die bereits zuvor mit CR-31-B (-) und RocA beobachtet werden konnten (vgl. Abbildung 68).



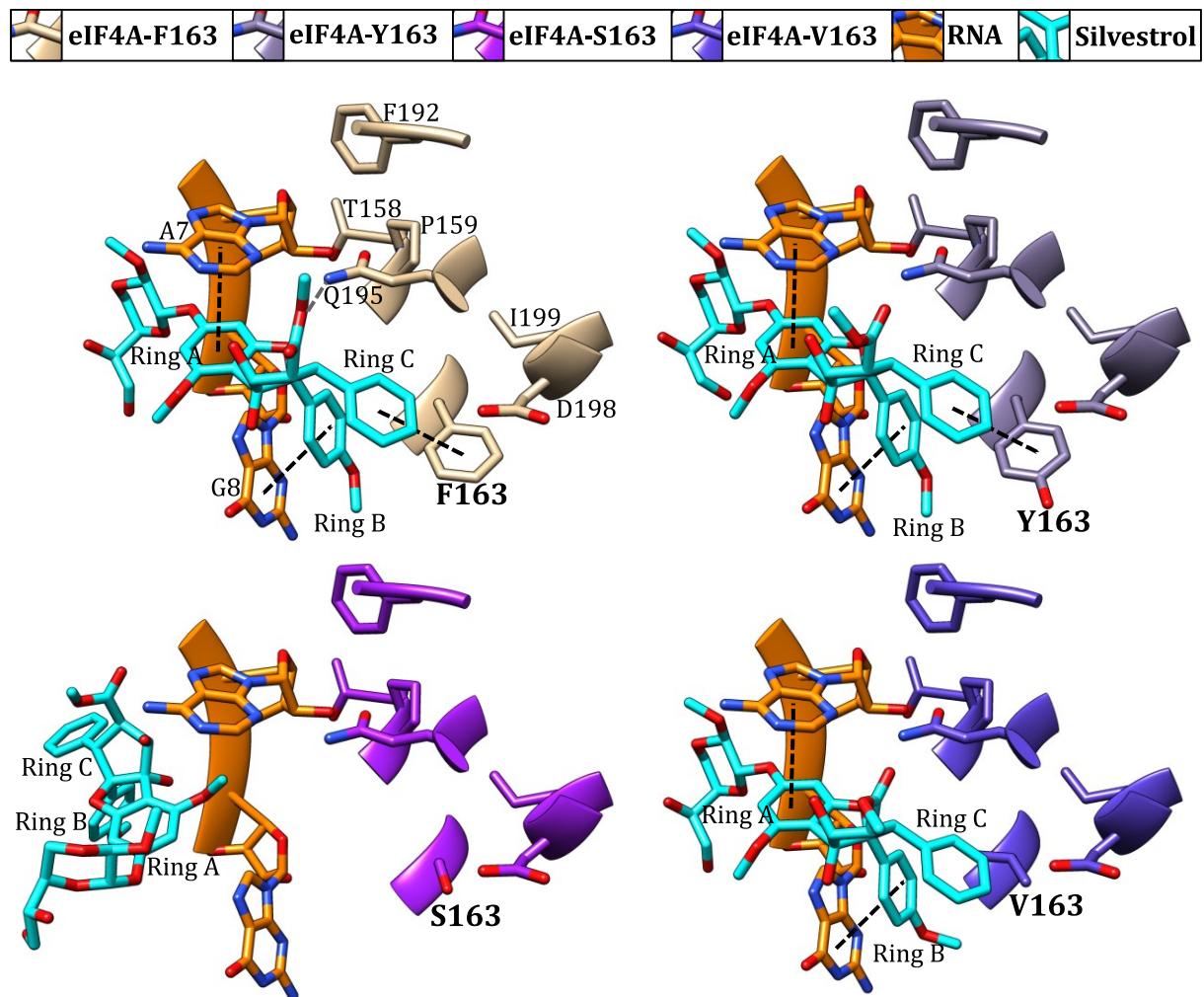
**Abbildung 68: Vorhersage der Bindung des Rocaglamid-Derivats Zotatifin (eFT226) an den eIF4A-RNA-Komplex.** Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (*RBVI*) angefertigt. Legende: Beige: eIF4A, Orange: Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub>, Rosa: Zotatifin (eFT226), schwarz-gestrichelte Linien:  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen. Für Zotatifin berechnete Bindungsaffinität: -8,6 kcal/mol. (PDB: 5ZC9) (*Iwasaki et al.*, 2019).

Wegen des elektronenziehenden mesomeren Effekts der Nitrilgruppe sollte die Elektronendichte im aromatischen  $\pi$ -System des Rings B verringert werden. Daraus resultierend sollten die elektronischen Wechselwirkungen zwischen dem elektronenarmen Aromaten des Benzonnitrils mit der elektronenreichen Purinbase Guanin verbessert werden, was durch die Grenzorbital-Theorie (*Frontier Molecular Orbital Theory*, FMO-Theorie) erklärt werden kann. Die Affinität von Zotatifin gegenüber eIF4A könnte somit, verglichen mit anderen Rocaglamid-Derivaten wie CR-31-B (-), erhöht sein. Zwar liegt die berechnete Bindungsaffinität von Zotatifin mit -8,6 kcal/mol unter der von CR-31-B (-) mit -10,1 kcal/mol, jedoch werden mit dem den Berechnungen zugrundeliegenden Docking-Algorithmus vermutlich keine dieser Molekülorbital-Theorien berücksichtigt. Somit ist es denkbar, dass Zotatifin verglichen mit CR-31-B (-) eine höhere Affinität gegenüber dem eIF4A-RNA-Komplex aufweist. Jedoch ist damit zu rechnen, dass eine Polypurin-Abhängigkeit für die Ausbildung stabiler Interaktionen besteht, da basierend auf den Bindungsvorhersagen keine zusätzlichen Interaktionen mit eIF4A ausgebildet werden, die die Purin-Abhängigkeit abschwächen könnten.



Neben der Vorhersage von Bindungsaffinitäten für Liganden an humanes eIF4A können mithilfe von Docking-Analysen auch Vorhersagen über die Bindung von Rocaglamid-Derivaten an nicht humane eIF4A-Varianten gemacht werden. Die Arbeitsgruppe um DR. CHARLIE YEO (CEO, *Sarawak Biodiversity Centre*, Borneo) konnte in einer Sequenzanalyse von eIF4A-Isoformen feststellen, dass insbesondere das Phenylalanin an Position 163 eine hohe Variation innerhalb der untersuchten Organismen, darunter auch einige humanpathogene Spezies, aufweist. Interessanterweise verfügen die Pflanzen der Gattung *Aglaia*, die Silvestrol synthetisieren, an genannter Position über ein Leucin anstelle des Phenylalanins. Diese Modifikation macht die Pflanzen resistent gegenüber Silvestrol, während Fressfeinde, die nicht über diese Modifikation verfügen, durch das produzierte Silvestrol beeinträchtigt werden. Um vorhersagen zu können, welche Variationen der Position 163 sensitiv bzw. resistent gegenüber Rocaglamid-Derivaten sind, wurde mithilfe der Software PyMol (*Schrödinger, LLC.*) eine virtuelle Mutation des entsprechenden Phenylalanins an Position 163 innerhalb der publizierten Kristallstruktur des humanen eIF4A-RNA-Komplexes durchgeführt (*Iwasaki et al., 2019*). Anschließend wurde die Bindung von Silvestrol an diese unterschiedlichen eIF4A-Varianten mithilfe von molekularem Docking untersucht (vgl. Abbildung 69). Für die eIF4A-Variante mit einem Tyrosin an Position 163 lassen die Docking-Vorhersagen vermuten, dass über Ring C des Silvestrols gleichermaßen die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit dem Tyrosin ausgebildet werden können. Da sich Tyrosin lediglich durch die zusätzliche Hydroxygruppe von Phenylalanin unterscheidet, erscheint es wahrscheinlich, dass eIF4A-Varianten mit einem Tyrosin an Position 163 Rocaglamid-sensitiv sind. In der Sequenzanalyse des *Sarawak Biodiversity Centre* konnten unter den Protisten beispielsweise Spezies der Gattung *Plasmodium* mit einer solchen Tyrosin-Modifikation identifiziert werden. Unter den Pilzen scheint z. B. *Candida tropicalis* ein Vertreter einer solchen eIF4A-Variante zu sein. Tatsächlich konnte in einer Studie zur Untersuchung der antiplasmodialen Aktivität von Rocaglamid-Derivaten beobachtet werden, dass CR-31-B (-) die Assoziation von *Plasmodium falciparum* eIF4A an die RNA hemmt (*Langlais et al., 2018*). Außerdem wurde *in vivo* eine antiplasmodiale Wirkung mit CR-31-B (-) in mit *Plasmodium* infizierten Mäusen registriert. Bezugnehmend auf *Candida tropicalis* konnte in einem Dosis-Wirkungsbeziehungs-Assay eine antifungale Aktivität gegenüber *C. tropicalis* mit einem Rocaglamid-Derivat beobachtet werden (*Iyer et al., 2020*). Hier ist anzumerken, dass die Abnahme der Bioaktivität von *C. tropicalis* nicht in

gleichem Maße ausgeprägt war wie der antifungale Effekt des Rocaglamid-Derivats gegenüber *C. auris*, einem Vertreter mit einem Phenylalanin an der relevanten Position. Dennoch scheinen diese Erkenntnisse zu bestätigen, dass die Rocaglamid-Sensitivität mit einer eIF4A-Variante mit einem Tyrosin statt eines Phenylalanins an besagter Position bestehen bleibt, wie es in den Docking-Untersuchungen vorhergesagt wurde.



**Abbildung 69: Vorhersage des Bindungsmodus von Silvestrol an unterschiedliche eIF4A-Varianten.** Die Abbildung wurde mit UCSF Chimera (*RBVI*) angefertigt. Legende: Beige: eIF4A-F163, Schiefergrau: eIF4A-Y163, Violett: eIF4A-S163, Schieferblau: eIF4A-V163, Orange: Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub>, Cyan: Silvestrol, schwarz-gestrichelte Linien:  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen. Bindungsaffinitäten von Silvestrol an die eIF4A-Varianten: eIF4A-F163: -9,4 kcal/mol, eIF4A-Y163: -9,0 kcal/mol, eIF4A-S163: -6,9 kcal/mol, eIF4A-V163: -8,6 kcal/mol. (PDB: 5ZC9) (*Iwasaki et al.*, 2019).

Wird das Phenylalanin an Position 163 durch ein Serin ersetzt kann laut Docking-Vorhersage keine Bindung von Silvestrol an die in der Kristallstruktur gezeigte Bindestelle stattfinden (vgl. Abbildung 69). Wegen der fehlenden aromatischen Ringstruktur können keine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Serin und Silvestrol

zustande kommen. Zudem verhindert die polare Hydroxygruppe die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen mit Ring C. Eine eIF4A-Variante mit Serin an Position 163 scheint demnach resistent gegenüber Rocaglamid-Derivaten zu sein. Ein Vertreter einer solchen Modifikation sind z. B. Protozoen der Gattung *Leishmania*. Da es bisher noch keine Studien zur Behandlung von Leishmaniose mit Rocaglamid-Derivaten gibt, könnte eine solche Untersuchung in Betracht gezogen werden, um die in der Docking-Untersuchung vorhergesagte Rocaglamid-Resistenz zu überprüfen. Für den Austausch von Phenylalanin durch Valin lässt sich keine eindeutige Aussage bezüglich der Bindung von Silvestrol an eIF4A-V163 treffen. Ring C von Silvestrol könnte über hydrophobe Wechselwirkungen mit Valin163 interagieren. Es ist jedoch nicht klar, ob diese Interaktionen stark genug sind und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen zwei Aromaten ersetzen können. Eine Vielzahl an Spezies der Gattung *Trypanosoma* verfügt über eine solche Valin-Modifikation. In einer Kooperation mit PROF. DR. ANA RODRIGUEZ (NYU Grossman School of Medicine, New York), deren Arbeitsgruppe Parasiten der Spezies *Trypanosoma* und *Plasmodium* erforscht, soll daher der Effekt von Silvestrol auf mit den Parasiten infizierte Zellen untersucht werden.

Neben den beispielhaft gezeigten Bindungsvorhersagen von Silvestrol an verschiedene eIF4A-Varianten wurde die Docking-Untersuchung mit einigen weiteren eIF4A-Varianten durchgeführt (vgl. Tabelle 33).

**Tabelle 33: Anhand des computerbasierten Dockings von Silvestrol an eIF4A-Varianten vorhergesagte Rocaglamid-Sensitivität bzw. Rocaglamid-Resistenz.**

Docking-Vorhersage	eIF4A-Variante (Aminosäure an Position 163)
Rocaglamid-sensitiv	Phenylalanin, Tyrosin, Histidin
Rocaglamid-resistent	Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Serin, Tryptophan
uneindeutig	Valin

Generell scheinen lediglich aromatische Aminosäuren sensitiv gegenüber Rocaglamid-Derivaten zu sein. So konnte für eIF4A mit Tyrosin oder Histidin an Position 163 eine stabile Bindung von Silvestrol in den Docking-Experimenten beobachtet werden. Die Aminosäure Tryptophan scheint eine Ausnahme darzustellen. Hier konnte trotz der aromatischen Eigenschaften in den Docking-Vorhersagen keine Bindung von Silvestrol zustande kommen, da Ring C des Silvestrols von dem Indol-Ringsystem des Tryptophans aus der Bindetasche verdrängt wird. Dies könnte daran liegen, dass das humane eIF4A für die Docking-Vorhersagen nur an Position 163 virtuell mutiert wurde. Sämtliche

benachbarte Aminosäuren des humanen eIF4A sind für die Docking-Berechnungen nicht verändert worden. Es wäre aber denkbar, dass in einer eIF4A-Variante mit Tryptophan nicht nur die Position 163 verändert vorliegt, sondern auch weitere die Rocaglamid-Bindetasche umgebende Aminosäuren von der Aminosäurekomposition des humanem eIF4A abweichen. Diese veränderte Umgebung könnte die Bindetasche für Rocaglamid-Derivate wieder zugänglich machen, sodass bei eIF4A-W163 nicht zwingend von einer Rocaglamid-Resistenz auszugehen ist. Polare Aminosäuren ohne aromatische Ringstruktur wie Serin, Asparagin, Glutamin, Glycin oder Cystein scheinen dagegen sehr wahrscheinlich Rocaglamid-resistent zu sein. Gleiches gilt für saure oder basische Aminosäuren ohne Aromaten. Mit Leucin konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden, dass nicht nur in Pflanzen der Gattung *Aglaia* mit dieser eIF4A-Variante eine Rocaglamid-Resistenz vermittelt wird, sondern auch durch Substitution des Phenylalanins an Position 163 durch ein Leucin eine Resistenz gegenüber Rocaglamid-Derivaten in eIF4A anderer Organismen eingeführt werden kann (Chu *et al.*, 2016; Iwasaki *et al.*, 2019). In diesem Zusammenhang konnte in den Docking-Vorhersagen auch keine Bindung von Silvestrol an eIF4A mit einem Isoleucin an Position 163 registriert werden. Gleichmaßen ist auch in Gegenwart eines Alanins mit einer Rocaglamid-Resistenz zu rechnen. Zwar wurden diesbezüglich keine Docking-Berechnungen durchgeführt, jedoch ist anzunehmen, dass die Hydrophobizität der Methylgruppe des Alanins nicht ausreicht, um eine stabile Interaktion mit Ring C des Rocaglamid-Derivats auszubilden. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass innerhalb der untersuchten Aminosäuren lediglich Tyrosin und Histidin, die wie Phenylalanin über aromatische Ringstrukturen verfügen, eine Sensitivität gegenüber Rocaglamid-Derivaten vermitteln könnten. Eine Interaktion mit Tryptophan sollte nur stattfinden, wenn die Aminosäurekomposition in benachbarten Bereichen angepasst würde, sodass Ring C nicht aus sterischen Gründen aus der Bindetasche verdrängt wird. Eine eIF4A-Variante mit Valin könnte über die Methylgruppen hydrophobe Wechselwirkungen ausüben und so eine Rocaglamid-Sensitivität vermitteln. Angesichts der ähnlichen Eigenschaften von Valin und Leucin ist es jedoch auch denkbar, dass Valin genau wie Leucin eine Resistenz vermittelt. Valin unterscheidet sich von Leucin lediglich in der Kettenlänge um eine Methylgruppe, somit ist eher davon auszugehen, dass auch mit Valin keine Inhibition von eIF4A mit Rocaglamid-Derivaten beobachtet werden kann.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Neben dem Naturstoff Silvestrol konnte CR-31-B (-) als synthetisches Rocaglamid-Derivat mit einer hochwirksamen antiviralen Aktivität identifiziert werden. Mithilfe des Dual-Luciferase-Assays konnten außerdem Unterschiede in der Wirkweise der beiden eIF4A-Inhibitoren festgestellt werden. Durch die Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie wurde die bereits für RocA postulierte Interaktionsfläche der Rocaglamid-Derivate mit eIF4A und der Polypurin-RNA bestätigt. Zwar waren hier keine Unterschiede zwischen dem Bindungsmodus von Silvestrol und CR-31-B (-) an den eIF4A-RNA-Komplex zu vermerken, jedoch konnte basierend auf Docking-Vorhersagen eine Bindetasche bestehend aus Arginin-Resten identifiziert werden. Über diese könnte eine zusätzliche Interaktion mit der Dioxan-Gruppe von Silvestrol ausgebildet werden, die Unterschiede in der Wirkweise der beiden Rocaglamid-Derivate erklären würde. Während mit CR-31-B (-) im DLA überwiegend die Translationseffizienz Polypurin-haltiger RNA-Substrate herunterreguliert wurde, zeigte Silvestrol auch einen Einfluss auf kurze doppelsträngige Haarnadelstrukturen. Dies lässt vermuten, dass die für CR-31-B (-) vorhergesagten  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Ring A und Ring B essentiell zu sein scheinen. Mit Silvestrol besteht diese Purin-Abhängigkeit in Anbetracht der im DLA beobachteten Effekte auf die Duplexstrukturen ohne Polypurin-Sequenzen womöglich nicht.

Innerhalb verschiedener voneinander unabhängiger Experimente zur Validierung der eIF4A-Spezifität konnte HGW-3 als neuer eIF4A-Inhibitor mit einer Wirksamkeit im mittleren nanomolaren Bereich identifiziert werden. Erste Untersuchungen in einem *ex vivo* Infektionsmodell mit SARS-CoV-2-infizierten humanen Lungenepithelzellen lassen vermuten, dass das Rocaglamid-Derivat auch eine antivirale Aktivität ausübt.

In einem nächsten Schritt hinsichtlich der Weiterentwicklung der untersuchten Rocaglamid-Derivate als potentielle Medikamente zur Behandlung von Virusinfektionen müsste die antivirale Aktivität dieser Moleküle in geeigneten *in vivo* Modellen untersucht werden. Im Hinblick auf pharmakokinetische Eigenschaften wurden im Rahmen der Validierung von CR-31-B (-) im onkologischen Kontext vom *Tri-Institutional Therapeutics Discovery Institute* zusammen mit PROF. DR. HANS-GUIDO WENDEL bereits sämtliche

Parameter zur Genotoxizität, Adsorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination oder zur Bioverfügbarkeit erhoben. Da es sich bei CR-31-B (-) jedoch um ein sogenanntes *Public Domain Molecule* handelt, werden bei einer potentiellen Anwendung grundsätzlich öffentlich-private Partnerschaften benötigt. Zudem ist die Handlungsfreiheit mit einem solchen Molekül eingeschränkt. Daher ist die Identifikation neuer eIF4A-Inhibitoren mit antiviraler Aktivität, wie sie mit HGW-3 beobachtet werden konnte, noch immer von Bedeutung. Die Tatsache, dass das Molekül Zotatifin der Firma *eFFECTOR Therapeutics* aktuell bereits in der klinischen Phase 1/2 im Krebskontext untersucht wird, lässt die weitere Entwicklung dieser Substanzklasse hin zu einem geeigneten Wirkstoff hoffnungsvoll erscheinen. Während bei der Anwendung der Rocaglamid-Derivate im Krebskontext aufgrund der Behandlung über einen sehr langen Zeitraum mit Resistenzen zu rechnen ist, sollte diese Problematik im Kontext einer antiviralen Therapie wahrscheinlich kein Problem darstellen.

Aufgrund der bestehenden Problematik der komplexen Synthese von Rocaglamid-Derivaten bzw. der Limitationen natürlich vorkommender Derivate besteht weiterhin das Ziel, neue einfachere Moleküle mit eIF4A-inhibitorischen Effekten zu entwickeln. Ausgehend von einem Liganden-basierten und einem Struktur-basierten Design wurde in diesem Kontext im Rahmen dieser Arbeit eine Vielzahl an Verbindungen hinsichtlich einer potentiellen Inhibition von eIF4A getestet. Zwar konnte unter diesen Molekülen kein Kandidat identifiziert werden, der in allen drei Assays zur Validierung der eIF4A-Spezifität eine eindeutige Inhibition von eIF4A vermuten ließ, dennoch können strukturelle Eigenschaften als Anhaltspunkt für die Synthese weiterer Verbindungen genutzt werden. Innerhalb der Carbonsäureamide konnten unter anderem mit den Zimtsäure-Derivaten vielversprechendere Effekte erzielt werden als mit den Benzoesäure-, den Phenylelessigsäure- oder den Phenylpropionsäure-Derivaten. Unter den Sulfonamiden zeigten besonders mit Alkylgruppen derivatisierte Verbindungen einen spezifischen Effekt im DLA. Auf diese Erkenntnisse könnte bei dem Design neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren aufgebaut werden. Zudem würde die Etablierung eines Helikase-Assays das Testverfahren neuer eIF4A-Inhibitoren vereinfachen und auch ein Hochdurchsatz-Screening in größerem Maßstab erlauben. Ein relativ einfach umzusetzender Ansatz könnte beispielsweise ein fluoreszenzbasierter Helikase-Assay sein. In ersten Untersuchungen mit einem solchen Helikase-Assays zeichnete sich jedoch

ab, dass das Lösungsmittel DMSO die zu messende Fluoreszenz beeinflusst, weshalb diesbezüglich vermutlich ein anderer Ansatz verfolgt werden muss.

Zuletzt konnten im Rahmen dieser Arbeit mithilfe von Docking-Experimenten potentiell Rocaglamid-sensitive und Rocaglamid-resistente eIF4A-Spezies identifiziert werden. Um diese Vorhersagen zu bestätigen, könnten Untersuchungen in entsprechenden Vertretern ebendieser eIF4A-Varianten angestellt werden. Wie bereits erwähnt, könnte in Spezies der Gattung *Trypanosoma* der Effekt von Rocaglamid-Derivaten auf eine eIF4A-Variante mit Valin überprüft werden. In *Plasmodium* könnte eine Tyrosin-Variante der Helikase getestet werden. Neben der Untersuchung der Rocaglamid-Resistenz oder -Sensitivität in humanpathogenen Organismen könnte zudem eine Mutationsanalyse von rekombinant aufgereinigten eIF4A-Varianten durchgeführt werden. Über PCR-basierte ortsspezifische Mutagenese könnte das Phenylalanin an Position 163 des humanen eIF4A durch andere Aminosäuren ersetzt werden. Diese Varianten könnten ebenfalls rekombinant aufgereinigt und unter anderem im TSA hinsichtlich einer Temperaturverschiebung mit Rocaglamid-Derivaten untersucht werden.

Abschließend ist zu erwähnen, dass die RNA-Helikase eIF4A in der Krebsforschung zwar ein vielfach charakterisiertes und adressiertes Zielmolekül darstellt, jedoch ist die Validierung der Helikase als Target einer antiviralen Therapie noch sehr unvollständig. Neben der in dieser Arbeit bereits adressierten Frage des Wirkmechanismus der Rocaglamid-Derivate, sollten daher die globalen Effekte einer eIF4A-Inhibition in infizierten Zellen untersucht werden. Dies könnte beispielsweise mit *Ribosomal Profiling*-Experimenten angegangen werden. Auch die präklinische Validierung sowie die Einflüsse auf das Immunsystem sollten beleuchtet werden. Zudem könnte überprüft werden, ob Virusresistenzen in Gegenwart von eIF4A-Inhibitoren auftreten, um zu verifizieren, ob eIF4A ein geeignetes Zielmolekül für die Entwicklung eines Breitband-Virostatikums darstellt.





## Literaturverzeichnis

- Abdelkrim, Y. Z., Harigua-Souiai, E., Barhoumi, M., Banroques, J., Blondel, A., Guizani, I., & Tanner, N. K. (2018). The steroid derivative 6-aminocholestanol inhibits the DEAD-box helicase eIF4A (LieIF4A) from the Trypanosomatid parasite *Leishmania* by perturbing the RNA and ATP binding sites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *226*, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.10.001>
- Aced, G., & Möckel, Hermann, J. (1992). Liquidchromatographie — Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC. *Angewandte Chemie*, *104*(86). <https://doi.org/10.1002/jobm.3620320603>
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., & Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line [15]. *Nature*, *282*(5739), 615–616. <https://doi.org/10.1038/282615a0>
- Agostini, M. L., Andres, E. L., Sims, A. C., Graham, R. L., Sheahan, T. P., Lu, X., Smith, E. C., Case, J. B., Feng, J. Y., Jordan, R., Ray, A. S., Cihlar, T., Siegel, D., Mackman, R. L., Clarke, M. O., Baric, R. S., & Denison, M. R. (2018). Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease. *mBio*, *9*(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00221-18>
- Andreou, A. Z., & Klostermeier, D. (2012). Conformational changes of DEAD-Box helicases monitored by single molecule fluorescence resonance energy transfer. In *Methods in Enzymology* (1. Aufl., Bd. 511). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396546-2.00004-8>
- Andreou, A. Z., & Klostermeier, D. (2013). The DEAD-box helicase eIF4A: Paradigm or the odd one out? *RNA Biology*, *10*(1), 19–32. <https://doi.org/10.4161/rna.21966>
- Andreou, A. Z., & Klostermeier, D. (2014). EIF4B and eIF4G jointly stimulate eIF4A ATPase and unwinding activities by modulation of the eIF4A conformational cycle. *Journal of Molecular Biology*, *426*(1), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.027>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2018). Stryer Biochemie. In *Stryer Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54620-8>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2013). Proteinsynthese. In *Stryer Biochemie* (S. 899–932). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6_30)
- Biedenkopf, N., Lange-Grünweller, K., Schulte, F. W., Weißer, A., Müller, C., Becker, D., Becker, S., Hartmann, R. K., & Grünweller, A. (2017). The natural compound silvestrol is a potent inhibitor of Ebola virus replication. *Antiviral Research*, *137*, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.011>
- Bio-Rad. (o. J.). *Stain-Free Imaging Technology*. Abgerufen 28. August 2020, von <https://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/stain-free-imaging-technology?ID=NZ0G1815>
- Bioscience. (2016). *Dual Luciferase (Firefly-Renilla) Assay System*. <https://bpsbioscience.com/dual-luciferase-firefly-renilla-luciferase-assay-system-60683>
- Biotium. (2018). *Protein Thermal Stability*. <https://biotium.com/wp-content/uploads/2018/03/Glomelt-flyer.pdf>

- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6).
- Bolten, S. N., Rinas, U., & Scheper, T. (2018). Heparin: role in protein purification and substitution with animal-component free material. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(20), 8647–8660. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9263-3>
- Bordeleau, M.-E., Cencic, R., Lindqvist, L., Oberer, M., Northcote, P., Wagner, G., & Pelletier, J. (2006). RNA-Mediated Sequestration of the RNA Helicase eIF4A by Pateamine A Inhibits Translation Initiation. *Chemistry and Biology*, 13(12), 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.10.005>
- Bordeleau, M.-E., Matthews, J., Wojnar, J. M., Lindqvist, L., Novac, O., Jankowsky, E., Sonenberg, N., Northcote, P., Teesdale-Spittle, P., & Pelletier, J. (2005). Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10460–10465. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504249102>
- Bordeleau, M.-E., Mori, A., Oberer, M., Lindqvist, L., Chard, L. S., Higa, T., Belsham, G. J., Wagner, G., Tanaka, J., & Pelletier, J. (2006). Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nature Chemical Biology*, 2(4), 213–220. <https://doi.org/10.1038/nchembio776>
- Bordeleau, M.-E., Robert, F., Gerard, B., Lindqvist, L., Chen, S. M. H., Wendel, H.-G., Brem, B., Greger, H., Lowe, S. W., Porco, J. A., & Pelletier, J. (2008). Therapeutic suppression of translation initiation modulates chemosensitivity in a mouse lymphoma model. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI34753>
- Brina, D., Grosso, S., Miluzio, A., & Biffo, S. (2011). Translational control by 80S formation and 60S availability: The central role of eIF6, a rate limiting factor in cell cycle progression and tumorigenesis. *Cell Cycle*, 10(20), 3441–3446. <https://doi.org/10.4161/cc.10.20.17796>
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2006). *Biologie* (6. Aufl.). Pearson Studium.
- Cencic, R., Galicia-Vázquez, G., & Pelletier, J. (2012). Inhibitors of translation targeting eukaryotic translation initiation factor 4A. *Methods in Enzymology*, 511, 437–461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396546-2.00020-6>
- Cencic, R., & Pelletier, J. (2016). Hippuristanol - A potent steroid inhibitor of eukaryotic initiation factor 4A. *Translation*, 4(1), e1137381. <https://doi.org/10.1080/21690731.2015.1137381>
- Chan, K., Robert, F., Oertlin, C., Kapeller-Libermann, D., Avizonis, D., Gutierrez, J., Handly-Santana, A., Doubrovin, M., Park, J., Schoepfer, C., Da Silva, B., Yao, M., Gorton, F., Shi, J., Thomas, C. J., Brown, L. E., Porco, J. A., Pollak, M., Larsson, O., ... Chio, I. I. C. (2019). eIF4A supports an oncogenic translation program in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13086-5>
- Chu, J., Galicia-Vázquez, G., Cencic, R., Mills, J. R., Katigbak, A., Porco, J. A., & Pelletier, J. (2016). CRISPR-Mediated Drug-Target Validation Reveals Selective Pharmacological Inhibition of the RNA Helicase, eIF4A. *Cell Reports*, 15(11), 2340–2347. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.005>
- Chu, J., Zhang, W., Cencic, R., Devine, W. G., Beglov, D., Henkel, T., Brown, L. E., Vajda, S., Porco, J. A., & Pelletier, J. (2019). Amidino-Rocaglates: A Potent Class of eIF4A Inhibitors. *Cell Chemical Biology*, 26(11), 1586–1593.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.08.008>

- Chu, J., Zhang, W., Cencic, R., O'Connor, P. B. F., Robert, F., Devine, W. G., Selznick, A., Henkel, T., Merrick, W. C., Brown, L. E., Baranov, P. V., Porco, J. A., & Pelletier, J. (2020). Rocaglates Induce Gain-of-Function Alterations to eIF4A and eIF4F. *Cell Reports*, *30*(8), 2481-2488.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.002>
- Cigan, A., Feng, L., & Donahue, T. (1988). tRNAi(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science*, *242*(4875), 93-97. <https://doi.org/10.1126/science.3051379>
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., & Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, *367*(1-2), 17-37. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.019>
- Corman, V. M., Lienau, J., & Witznath, M. (2019). Coronaviren als Ursache respiratorischer Infektionen. *Der Internist*, *60*(11), 1136-1145. <https://doi.org/10.1007/s00108-019-00671-5>
- Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S., & Kim, J. F. (2009). Tracing Ancestors and Relatives of *Escherichia coli* B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, *394*(4), 634-643. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.022>
- Dias, R., & de Azevedo Jr., W. (2008). Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets*, *9*(12), 1040-1047. <https://doi.org/10.2174/138945008786949432>
- Elgner, F., Sabino, C., Basic, M., Ploen, D., Grünweller, A., & Hildt, E. (2018). Inhibition of zika virus replication by silvestrol. *Viruses*, *10*(4), 1-14. <https://doi.org/10.3390/v10040149>
- Eliseev, B., Yeramala, L., Leitner, A., Karupphasamy, M., Raimondeau, E., Huard, K., Alkalaeva, E., Aebersold, R., & Schaffitzel, C. (2018). Structure of a human cap-dependent 48S translation pre-initiation complex. *Nucleic Acids Research*, *46*(5), 2678-2689. <https://doi.org/10.1093/nar/gky054>
- Ernst, J. T., Thompson, P. A., Nilewski, C., Sprengeler, P. A., Sperry, S., Packard, G., Michels, T., Xiang, A., Tran, C., Wegerski, C. J., Eam, B., Young, N. P., Fish, S., Chen, J., Howard, H., Staunton, J., Molter, J., Clarine, J., Nevarez, A., ... Reich, S. H. (2020). Design of Development Candidate eFT226, a First in Class Inhibitor of Eukaryotic Initiation Factor 4A RNA Helicase. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00182>
- Galicia-Vazquez, G., Cencic, R., Robert, F., Agenor, A. Q., & Pelletier, J. (2012). A cellular response linking eIF4AI activity to eIF4AII transcription. *RNA*, *18*(7), 1373-1384. <https://doi.org/10.1261/rna.033209.112>
- Galicia-Vázquez, G., Chu, J., & Pelletier, J. (2015). eIF4AII is dispensable for miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, *21*(10), 1826-1833. <https://doi.org/10.1261/rna.052225.115>
- GE-Healthcare. (2007). *HiTrap™ Heparin HP. 1*, 1-4. [www.gehealthcare.com/hitrap](http://www.gehealthcare.com/hitrap)
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, *6*(5), 343-345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Glitscher, M., Himmelsbach, K., Woytinek, K., Johne, R., Reuter, A., Spiric, J., Schwaben, L., Grünweller, A., & Hildt, E. (2018). Inhibition of hepatitis E virus spread by the natural compound silvestrol. *Viruses*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/v10060301>
- Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., O'Meara, M. J., Rezelj, V. V., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Fournier, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., ... Krogan, N. J. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals

- targets for drug repurposing. *Nature*, 583(7816), 459–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
- Grabley, S., & Thiericke, R. (1999). *Drug Discovery from Nature*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Grøftehaug, M. K., Hajizadeh, N. R., Swann, M. J., & Pohl, E. (2015). Protein-ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71, 36–44. <https://doi.org/10.1107/S1399004714016617>
- Groß, U. (2009). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (2. Aufl.). Georg Thieme Verlag KG.
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neubock, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server), W70–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- Harms, U., Andreou, A. Z., Gubaev, A., & Klostermeier, D. (2014). EIF4B, eIF4G and RNA regulate eIF4A activity in translation initiation by modulating the eIF4A conformational cycle. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7911–7922. <https://doi.org/10.1093/nar/gku440>
- Hemschemeier, S. K., & Maelicke, A. (o. J.). *Fällung von Proteinen*. Abgerufen 1. September 2020, von [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/proteinfaellung.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden\\_protein/fallung\\_dialyse.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/proteinfaellung.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden_protein/fallung_dialyse.vscml.html)
- Henss, L., Scholz, T., Grünweller, A., & Schnierle, B. (2018). Silvestrol Inhibits Chikungunya Virus Replication. *Viruses*, 10(11), 592. <https://doi.org/10.3390/v10110592>
- HepG2 (Liver Hepatocellular Carcinoma) Cell Line. (o. J.). Abgerufen 12. August 2020, von <https://www.hepg2.com/>
- Hershey, J. W. B., Sonenberg, N., & Mathews, M. B. (2012). Principles of translational control: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), 1–10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009829>
- Hinnebusch, A. G. (2011). Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(3), 434–467. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00008-11>
- Huynh, K., & Partch, C. L. (2016). Current Protocols in Protein Science: Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr Protoc Protein Sci*, 1–19. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2809s79>
- Hwang, B. Y., Su, B.-N., Chai, H., Mi, Q., Kardono, L. B. S., Afriastini, J. J., Riswan, S., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D., Wild, R., Fairchild, C. R., Vite, G. D., Rose, W. C., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Swanson, S. M., & Kinghorn, A. D. (2004). Silvestrol and Episilvestrol, Potential Anticancer Rocaglate Derivatives from *Aglaia silvestris*. *The Journal of Organic Chemistry*, 69(10), 3350–3358. <https://doi.org/10.1021/jo040120f>
- iGEM WHU-China, 2013. (2013). *Gibson Assembly Protocol*. <http://2013.igem.org/Team:WHU-China/noteProtocol#gibson>
- Iwasaki, S., Floor, S. N., & Ingolia, N. T. (2016). Rocaglates convert DEAD-box protein eIF4A into a sequence-selective translational repressor. *Nature*, 534(7608), 558–561. <https://doi.org/10.1038/nature17978>
- Iwasaki, S., Iwasaki, W., Takahashi, M., Sakamoto, A., Watanabe, C., Shichino, Y., Floor, S. N., Fujiwara, K., Mito, M., Dodo, K., Sodeoka, M., Imataka, H., Honma, T., Fukuzawa, K., Ito, T., & Ingolia, N. T. (2019). The

- Translation Inhibitor Rocaglamide Targets a Bimolecular Cavity between eIF4A and Polypurine RNA. *Molecular Cell*, 73(4), 738-748.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.026>
- Iyer, K. R., Whitesell, L., Porco, J. A., Henkel, T., Brown, L. E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2020). Translation Inhibition by Rocaglates Activates a Species-Specific Cell Death Program in the Emerging Fungal Pathogen *Candida auris*. *mBio*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.03329-19>
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113-127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P., & Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*, 1077, 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>
- Jiang, C., Tang, Y., Ding, L., Tan, R., Li, X., Lu, J., Jiang, J., Cui, Z., Tang, Z., Li, W., Cao, Z., Schneider-Poetsch, T., Jiang, W., Luo, C., Ding, Y., Liu, J., & Dang, Y. (2019). Targeting the N Terminus of eIF4AI for Inhibition of Its Catalytic Recycling. *Cell Chemical Biology*, 26(10), 1417-1426.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.07.010>
- Jin, C., Rajabi, H., Rodrigo, C. M., Porco, J. A., & Kufe, D. (2013). Targeting the eIF4A RNA helicase blocks translation of the MUC1-C oncoprotein. *Oncogene*, 32(17), 2179-2188. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.236>
- Joycharat, N., Greger, H., Hofer, O., & Saifah, E. (2008). Flavaglines and triterpenoids from the leaves of *Aglaia forbesii*. *Phytochemistry*, 69(1), 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.016>
- Juhl, B., & Pleiss, J. (2007). Molekulares Docking von Substraten und Enzymen. *BIOspektrum*, 15(07), 765-767.
- Kapp, L. D., & Lorsch, J. R. (2004). The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 657-704. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419>
- Kim, S., Bang, Y. H., Su, B. N., Chai, H., Mi, Q., Kinghorn, A. D., Wild, R., & Swanson, S. M. (2007). Silvestrol, a potential anticancer rocaglate derivative from *Aglaia foveolata*, induces apoptosis in LNCaP cells through the mitochondrial/apoptosome pathway without activation of executioner caspase-3 or -7. *Anticancer Research*, 27(4 B), 2175-2183.
- Kim, W. J., Kim, J. H., & Jang, S. K. (2007). Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *EMBO Journal*, 26(24), 5020-5032. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601920>
- King, M. L., Chiang, C.-C., Ling, H.-C., Fujita, E., Ochiai, M., & McPhail, A. T. (1982). X-Ray Crystal Structure of Rocaglamide, a Novel Antileukemic 1H-Cyclopenta[b]benzofuran from *Aglaia elliptifolia*. *Journal of the Chemical Society*, 260(20), 1150-1151.
- Kisselev, L., Ehrenberg, M., & Frolova, L. (2003). Termination of translation: Interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO Journal*, 22(2), 175-182. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg017>
- Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature Methods*, 11(3), 319-324. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2834>
- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences*, 82(2), 488–492. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.2.488>
- Kwong, A. D., Rao, B. G., & Jeang, K. T. (2005). Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(10), 845–853. <https://doi.org/10.1038/nrd1853>
- Laemmli, U. K. (MRC L. of M. B. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Langlais, D., Cencic, R., Moradin, N., Kennedy, J. M., Ayi, K., Brown, L. E., Crandall, I., Tarry, M. J., Schmeing, M., Kain, K. C., Porco, J. A., Pelletier, J., & Gros, P. (2018). Rocaglates as dual-targeting agents for experimental cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), E2366–E2375. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713000115>
- Lawson, T. G., Ray, B. K., Dodds, J. T., Grifo, J. A., Abramson, R. D., Merrick, W. C., Betsch, D. F., Weith, H. L., & Thach, R. E. (1986). Influence of 5' proximal secondary structure on the translational efficiency of eukaryotic mRNAs and on their interaction with initiation factors. *Journal of Biological Chemistry*, 261(30), 13979–13989.
- Lehman, I. R. (1974). DNA Ligase: Structure, Mechanism, and Function. *Science*, 186(4166), 790–797. <https://doi.org/10.1126/science.186.4166.790>
- Li, F., & Mullins, J. I. (2002). Site-Directed Mutagenesis Facilitated by DpnI Selection on Hemimethylated DNA. In *In Vitro Mutagenesis Protocols* (S. 19–27). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-194-9:019>
- Lindqvist, L., Oberer, M., Reibarkh, M., Cencic, R., Bordeleau, M.-E., Vogt, E., Marintchev, A., Tanaka, J., Fagotto, F., Altmann, M., Wagner, G., & Pelletier, J. (2008). Selective pharmacological targeting of a DEAD box RNA helicase. *PLoS ONE*, 3(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001583>
- Lipofectamine 3000 Reagent - User Guide*. (2016). Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/product-brand/lipofectamine/lipofectamine-3000.html>
- Lo, M. K., Feldmann, F., Gary, J. M., Jordan, R., Bannister, R., Cronin, J., Patel, N. R., Klena, J. D., Nichol, S. T., Cihlar, T., Zaki, S. R., Feldmann, H., Spiropoulou, C. F., & de Wit, E. (2019). Remdesivir (GS-5734) protects African green monkeys from Nipah virus challenge. *Science Translational Medicine*, 11(494), eaau9242. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau9242>
- Lüllmann, H., Mohr, K., & Hein, L. (2010). *Pharmakologie und Toxikologie* (17. Aufl.). Georg Thieme Verlag KG.
- Madhugiri, R., Fricke, M., Marz, M., & Ziebuhr, J. (2016). Coronavirus cis-Acting RNA Elements. In *Advances in Virus Research* (S. 127–163). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.007>
- McCormick, C., & Khaperskyy, D. A. (2017). Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. *Nature Reviews Immunology*, 17(10), 647–660. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.63>
- Milo, R., & Phillips, R. (2016). A Quantitative Miscellany. In *Cell Biology by the numbers* (S. 313–334). Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. <http://book.bionumbers.org/how-many-virions-result-from-a-single-viral-infection/>
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2010). *Molekulare Virologie* (3. Aufl.). Spektrum Akademischer Verlag.

- Montero, H., García-Román, R., & Mora, S. (2015). eIF4E as a Control Target for Viruses. *Viruses*, 7(2), 739–750. <https://doi.org/10.3390/v7020739>
- Montero, H., Pérez-Gil, G., & Sampieri, C. L. (2019). Eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) during viral infections. *Virus Genes*, 55(3), 267–273. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01641-7>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639–1662. <https://dasher.wustl.edu/chem430/readings/jcc-19-1639-98.pdf>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mülhardt, C. (2009). Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. In *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2158-6>
- Müller, C., Obermann, W., Karl, N., Wendel, H.-G., Taroncher-Oldenburg, G., Pleschka, S., Hartmann, R. K., Ziebuhr, J., & Grünweller, A. (2020). The rocaglate CR-31-B (-) inhibits SARS-CoV-2 replication at non-cytotoxic, low nanomolar concentrations in vitro and ex vivo. *Antiviral Research*.
- Müller, C., Obermann, W., Schulte, F. W., Lange-Grünweller, K., Oestereich, L., Elgner, F., Glitscher, M., Hildt, E., Singh, K., Wendel, H.-G., Hartmann, R. K., Ziebuhr, J., & Grünweller, A. (2020). Comparison of broad-spectrum antiviral activities of the synthetic rocaglate CR-31-B (-) and the eIF4A-inhibitor Silvestrol. *Antiviral Research*, 175, 104706. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104706>
- Müller, C., Schulte, F. W., Lange-Grünweller, K., Obermann, W., Madhugiri, R., Pleschka, S., Ziebuhr, J., Hartmann, R. K., & Grünweller, A. (2018). Broad-spectrum antiviral activity of the eIF4A inhibitor silvestrol against corona- and picornaviruses. *Antiviral Research*, 150(December 2017), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.12.010>
- Naineni, S. K., Maiga, R. I., Cencic, R., Putnam, A. A., Amador, L. A., Rodriguez, A. D., Jankowsky, E., & Pelletier, J. (2020). A comparative study of small molecules targeting eIF4A. *Rna*, 26(5), 541–549. <https://doi.org/10.1261/rna.072884.119>
- NEB. (o. J.). *Site Directed Mutagenesis*. Abgerufen 20. August 2020, von <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/site-directed-mutagenesis>
- Noll, S., Reyelt, J., Rysiok, T., Kellner, R., Güssow, D., Jäkel, S., Hager, S., & Kranz, H. (2013). Gezielte Optimierung von *Escherichia coli* BL21(DE3). *BIOspektrum*, 19(2), 211–213. <https://doi.org/10.1007/s12268-013-0292-2>
- Northcote, P. T., Blunt, J. W., & Munro, M. H. G. (1991). Pateamine: a potent cytotoxin from the New Zealand Marine sponge, *mycale* sp. *Tetrahedron Letters*, 32(44), 6411–6414. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80182-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80182-6)
- Novac, O., Guenier, A. S., & Pelletier, J. (2004). Inhibitors of protein synthesis identified by a high throughput multiplexed translation screen. *Nucleic Acids Research*, 32(3), 902–915. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh235>

- Novagen. (1998). Thrombin Cleavage Kit. *Novagen TB188 8/98*, 8, 1–6.
- Novagen. (1999). *pET System Manual*. TB055.  
[https://www.academia.edu/40465375/pET\\_System\\_Manual\\_Novagen\\_1](https://www.academia.edu/40465375/pET_System_Manual_Novagen_1)
- Obermann, W. (2017). *Analyse viraler und zellulärer 5'-UTRs zur Untersuchung der Silvestrol-abhängigen Inhibition der eIF4A-Helikase*. Philipps-Universität Marburg.
- Özeş, A. R., Feoktistova, K., Avanzino, B. C., & Fraser, C. S. (2011). Duplex unwinding and ATPase activities of the DEAD-box helicase eIF4A are coupled by eIF4G and eIF4B. *Journal of Molecular Biology*, 412(4), 674–687. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.08.004>
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P., & Salemme, F. R. (2001). Pantoliano et al - High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery - 2001.pdf. *Journal of Biomolecular Screening*, 6(6), 429–440. <https://doi.org/10.1177/108705710100600609>
- Pellett, P. E., Mitra, S., & Holland, T. C. (2014). Basics of virology. In A. C. Tselis & J. Booss (Hrsg.), *Handbook of Clinical Neurology* (Bd. 123, Nummer 3, S. 45–66). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00002-X>
- Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I., & Hellen, C. U. T. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7029–7036. <https://doi.org/10.1073/pnas.111145798>
- Peters, T. L., Tillotson, J., Yeomans, A. M., Wilmore, S., Lemm, E., Jiménez-Romero, C., Amador, L. A., Li, L., Amin, A. D., Pongtornpipat, P., Zerio, C. J., Ambrose, A. J., Paine-Murrieta, G., Greninger, P., Vega, F., Benes, C. H., Packham, G., Rodríguez, A. D., Chapman, E., & Schatz, J. H. (2018). Target-Based Screening against eIF4A1 Reveals the Marine Natural Product Elatol as a Novel Inhibitor of Translation Initiation with In Vivo Antitumor Activity. *Clinical Cancer Research*, 24(17), 4256–4270. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3645>
- Petersen, C. P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., & Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell*, 21(4), 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.031>
- Polier, G., Neumann, J., Thuaud, F., Ribeiro, N., Gelhaus, C., Schmidt, H., Giaisi, M., Köhler, R., Müller, W. W., Proksch, P., Leippe, M., Janssen, O., Désaubry, L., Krammer, P. H., & Li-Weber, M. (2012). The Natural Anticancer Compounds Rocaglamides Inhibit the Raf-MEK-ERK Pathway by Targeting Prohibitin 1 and 2. *Chemistry & Biology*, 19(9), 1093–1104. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.012>
- Rehm, H., & Letzel, T. (2016). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. In *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48851-5>
- Richardson, C. C. (1965). Phosphorylation of nucleic acid by an enzyme from T4 bacteriophage-infected *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(1), 158–165. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.1.158>
- RKI. (2020). *SARS-CoV-2 Steckbrief zur Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19)* (Robert-Koch-Institut (Hrsg.)).



- Rogers, G. W., Komar, A. A., & Merrick, W. C. (2002). eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 72, 307–331. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(02\)72073-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(02)72073-4)
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801505-6.00010-7>
- Rubio, C. A., Weisburd, B., Holderfield, M., Arias, C., Fang, E., DeRisi, J. L., & Fanidi, A. (2014). Transcriptome-wide characterization of the eIF4A signature highlights plasticity in translation regulation. *Genome Biology*, 15(10), 476. <https://doi.org/10.1186/PREACCEPT-1707497119127922>
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
- Sanchez, A., Kiley, M. P., Holloway, B. P., & Auperin, D. D. (1993). Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Research*, 29(3), 215–240. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(93\)90063-S](https://doi.org/10.1016/0168-1702(93)90063-S)
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- SantaLucia, J., & Hicks, D. (2004). The Thermodynamics of DNA Structural Motifs. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33(1), 415–440. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800>
- Schartl, M., Gessler, M., & von Eckardstein, A. (2009). *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen* (1.). Elsevier, Urban & Fischer.
- Schatz, J. H., Oricchio, E., Wolfe, A. L., Jiang, M., Linkov, I., Maragulia, J., Shi, W., Zhang, Z., Rajasekhar, V. K., Pagano, N. C., Porco, J. A., Teruya-Feldstein, J., Rosen, N., Zelenetz, A. D., Pelletier, J., & Wendel, H. G. (2011). Targeting cap-dependent translation blocks converging survival signals by AKT and PIM kinases in lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*, 208(9), 1799–1807. <https://doi.org/10.1084/jem.20110846>
- Schlereth, J., Grünweller, A., Biedenkopf, N., Becker, S., & Hartmann, R. K. (2016). RNA binding specificity of Ebola virus transcription factor VP30. *RNA Biology*, 13(9), 783–798. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1194160>
- Schulte, F. W. (2019). *Untersuchung der antiviralen Wirkung des Naturstoffs Silvestrol - Etablierung der Helikase eIF4A als neue antivirale Zielstruktur*. Philipps-Universität Marburg.
- Schulz, G., Victoria, C., Kirschning, A., & Steinmann, E. (2020). Rocaglamide and silvestrol: a long story from anti-tumor to anti-coronavirus compounds. *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/d0np00024h>
- Seidel, S. A. I., Dijkman, P. M., Lea, W. A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazic, A., Joseph, J. S., Srinivasan, P., Baaske, P., Simeonov, A., Katritch, I., Melo, F. A., Ladbury, J. E., Schreiber, G., Watts, A., Braun, D., & Duhr, S. (2013). Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under

- previously challenging conditions. *Methods*, 59(3), 301–315.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.12.005>
- Serviceabteilung-Massenspektrometrie-und-Elementaranalytik. (o. J.). *Massenbestimmung intakter Proteine und Proteinkomplexe* (P.-U. M. Fachbereich Chemie (Hrsg.)). Abgerufen 28. August 2020, von <https://www.uni-marburg.de/de/fb15/fachbereich/infrastruktur/servicelabors/massenspektrometrie-und-elementaranalytik/bioanalytik/massenbestimmung-intakter-proteine-und-proteinkomplexe>
- Shabman, R. S., Hoenen, T., Groseth, A., Jabado, O., Binning, J. M., Amarasinghe, G. K., Feldmann, H., & Basler, C. F. (2013). An Upstream Open Reading Frame Modulates Ebola Virus Polymerase Translation and Virus Replication. *PLoS Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003147>
- Shen, L., & Pelletier, J. (2020). Selective targeting of the DEAD-box RNA helicase eukaryotic initiation factor (eIF) 4A by natural products. *Natural product reports*, 37(5), 609–616.  
<https://doi.org/10.1039/c9np00052f>
- Sigma-Aldrich. (o. J.). *Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability*. Abgerufen 17. August 2020, von <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html>
- Smith, R. W. P., & Gray, N. K. (2010). Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *Biochemical Journal*, 426(1), 1–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20091571>
- Spektrum-Akademischer-Verlag (Hrsg.). (1999). *Lexikon der Biologie*.
- Steinchen, W., Linne, U., & Bange, G. (2017). HDX-MS in den Lebenswissenschaften. *BIOspektrum*, 23(7), 772–775. <https://doi.org/10.1007/s12268-017-0871-8>
- Studier, W. F., & Moffatt, B. A. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., & Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75(2–3), 291–295. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00163-7)
- Thompson, P. A., Eam, B., Young, N. P., Fish, S., Chen, J., Barrera, M., Howard, H., Sung, E., Parra, A., Staunton, J., Chiang, G. G., Wegerski, C. J., Nevarez, A., Clarine, J., Sperry, S., Xiang, A., Tran, C., Nilewski, C., Packard, G. K., ... Webster, K. R. (2019). eFT226, a potent and selective inhibitor of eIF4A, is efficacious in preclinical models of lymphoma. *Experimental and Molecular Therapeutics*, 2698–2698. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-2698>
- Thorne, N., Inglese, J., & Auld, D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology*, 17(6), 646–657.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.05.012>
- Tillotson, J., Kedzior, M., Guimarães, L., Ross, A. B., Peters, T. L., Ambrose, A. J., Schmidlin, C. J., Zhang, D. D., Costa-Lotufo, L. V., Rodríguez, A. D., Schatz, J. H., & Chapman, E. (2017). ATP-competitive, marine derived natural products that target the DEAD box helicase, eIF4A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(17), 4082–4085. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.045>
- Trost, B. M., Greenspan, P. D., Yang, B. V., & Saulnier, M. G. (1990). An unusual oxidative cyclization. A

- synthesis and absolute stereochemical assignment of (-)-rocaglamide. *Journal of the American Chemical Society*, 112(24), 9022–9024. <https://doi.org/10.1021/ja00180a081>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.AutoDock
- Underbakke-Lab. (o. J.). *HDX-MS*. Abgerufen 31. August 2020, von <https://www.underbakkkelab.org/techniques>
- Villa, N., & Fraser, C. S. (2014). Mechanism of Translation in Eukaryotes. In A. Parsyan (Hrsg.), *Translation and Its Regulation in Cancer Biology and Medicine: Bd. (5)2* (Nummer 2, S. 7–27). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9078-9>
- Walsh, D. (2010). Manipulation of the host translation initiation complex eIF4F by DNA viruses. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1511–1516. <https://doi.org/10.1042/BST0381511>
- Warren, T. K., Jordan, R., Lo, M. K., Ray, A. S., Mackman, R. L., Soloveva, V., Siegel, D., Perron, M., Bannister, R., Hui, H. C., Larson, N., Strickley, R., Wells, J., Stuthman, K. S., Van Tongeren, S. A., Garza, N. L., Donnelly, G., Shurtleff, A. C., Retterer, C. J., ... Bavari, S. (2016). Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature*, 531(7594), 381–385. <https://doi.org/10.1038/nature17180>
- Waßmer, T., & Maelicke, A. (o. J.). *Strukturbasiertes Wirkstoffdesign*. Abgerufen 31. August 2020, von [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/drug\\_design/strukturbasiert.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/drug\\_design/docking.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/drug_design/strukturbasiert.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/drug_design/docking.vscml.html)
- Waugh, D. S. (2011). An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.005>
- WHO. (2020a). *Ebola virus disease*. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease>
- WHO. (2020b). *WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard* (World-Health-Organization (Hrsg.)). <https://covid19.who.int/>
- Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., & Duhr, S. (2010). Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature Communications*, 1(7). <https://doi.org/10.1038/ncomms1093>
- Williams-Hill, D. M., Duncan, R. F., Nielsen, P. J., & Tahara, S. M. (1997). Differential Expression of the Murine Eukaryotic Translation Initiation Factor Isogenes eIF4A1 and eIF4AIII Is Dependent upon Cellular Growth Status. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 338(1), 111–120. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9804>
- Wolfe, A. L., Singh, K., Zhong, Y., Drewe, P., Rajasekhar, V. K., Sanghvi, V. R., Mavrikakis, K. J., Jiang, M., Roderick, J. E., Van der Meulen, J., Schatz, J. H., Rodrigo, C. M., Zhao, C., Rondou, P., de Stanchina, E., Teruya-Feldstein, J., Kelliher, M. A., Speleman, F., Porco, J. A., ... Wendel, H. G. (2014). RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature*, 513(7516), 65–70. <https://doi.org/10.1038/nature13485>
- Zhang, W., Chu, J., Cyr, A. M., Yueh, H., Brown, L. E., Wang, T. T., Pelletier, J., & Porco, J. A. (2019). Intercepted Retro-Nazarov Reaction: Syntheses of Amidino-Rocaglate Derivatives and Their Biological Evaluation as eIF4A Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 141(32), 12891–12900.



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der eukaryontischen Translationsinitiation. ....	3
Abbildung 2: Aufbau der konservierten Motive von DEAD-Box-Proteinen. ....	4
Abbildung 3: Konformationszyklus von eIF4A. ....	5
Abbildung 4: Virale Replikationsstrategien nach dem Baltimore-Schema. ....	7
Abbildung 5: Genomorganisation des Ebolavirus am Beispiel des <i>Zaire-Ebolavirus</i> . ....	10
Abbildung 6: Genomorganisation der Coronaviren am Beispiel von SARS-CoV-2. ....	11
Abbildung 7: Strukturformeln der eIF4A-Inhibitoren. ....	12
Abbildung 8: Natürliche und chemisch synthetisierte Rocaglamid-Derivate. ....	14
Abbildung 9: Kristallstruktur des eIF4A1·AMP·PNP·RocA·Polypurin-RNA-Komplexes. ....	15
Abbildung 10: Schematische Plasmidkarte von pFR_HCV_xb. ....	25
Abbildung 11: Schematische Plasmidkarte von pET-28a(+)_eIF4A1(19-406). ....	26
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Gibson Assembly®-Reaktion. ....	40
Abbildung 13: Strategien der ortsspezifischen Mutagenese. ....	41
Abbildung 14: Schematischer Aufbau des Expressionsvektors pET-28a(+). ....	46
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Thermal-Shift-Assays. ....	55
Abbildung 16: Prinzip des Microscale-Thermophoresis-Assays. ....	57
Abbildung 17: MST-Kurven und Bindungskurve. ....	59
Abbildung 18: Prinzip der HDX-MS. ....	60
Abbildung 19: Reaktionsprinzip des WST-1-Assays. ....	66
Abbildung 20: Reaktionsprinzip der Firefly- und der Renilla-Luciferase. ....	68
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Reporter-Plasmids pFR_HCV_xb. ....	69
Abbildung 22: DLA: Modifikationen der VP35-Haarnadelstruktur. ....	73
Abbildung 23: Schematische Darstellung von VP35-HP+(AC) <sub>n</sub> und VP35-HP+(AG) <sub>n</sub> . ....	74
Abbildung 24: DLA: (AC) <sub>n</sub> oder (AG) <sub>n</sub> in Kombination mit der VP35-Haarnadelstruktur. ....	75
Abbildung 25: Schematische Darstellung von VP35-HP+(AC) <sub>15</sub> , VP35-HP+PolyAC-mid(AG) <sub>2,5</sub> und VP35-HP+PolyAC-term(AG) <sub>2,5</sub> . ....	76
Abbildung 26: DLA: Positionierung von unstrukturierten, einzelsträngigen Bereichen, die die VP35-Haarnadelstruktur des Ebolavirus flankieren. ....	77
Abbildung 27: Schematische Darstellung von (AC) <sub>15</sub> und PolyAC-5'-(AG) <sub>n</sub> sowie PolyAC-mid(AG) <sub>n</sub> und (AG) <sub>15</sub> . ....	78

Abbildung 28: DLA: Positionierung von Polypurin-Sequenzen zunehmender Länge innerhalb einer alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenz (PolyAC). .....	78
Abbildung 29: WST-1-Assay von CR-31-B (+), CR-31-B (-) und CR-31-B (rac) .....	81
Abbildung 30: DLA: 5'-UTRs von $\beta$ -Globin, PIM1 und VP35 zum Vergleich der Aktivitäten von Silvestrol und CR-31-B.....	82
Abbildung 31: DLA: Variationen der VP35-Haarnadelstruktur zum Vergleich der Aktivitäten von CR-31-B (-) und Silvestrol.....	83
Abbildung 32: DLA: Polypurin- und alternierende Purin-Pyrimidin-Sequenzen zum Vergleich der Aktivität von CR-31-B (-) und Silvestrol. ....	85
Abbildung 33: DLA: Variationen des <i>NP-Hairpins</i> zum Vergleich der Aktivität von CR-31-B (-) und Silvestrol gegenüber Sekundärstrukturen. ....	87
Abbildung 34: DLA: Polypurin-Sequenzen innerhalb eIF4A-unabhängiger RNAs. ....	88
Abbildung 35: DLA: 5'-UTR von Prohibitin mit Silvestrol und CR-31-B (-).....	90
Abbildung 36: DLA: Antivirale Aktivität von Silvestrol und CR-31-B (-).....	92
Abbildung 37: Schematische Darstellung der Variationen der HEVgt3c-Konstrukte. ....	93
Abbildung 38: DLA: Variationen von HEVgt3c zum Vergleich der Aktivität von Silvestrol und CR-31-B (-). ....	94
Abbildung 39: Auswirkungen einer RNA-Zugabe auf eIF4A. ....	96
Abbildung 40: Auswirkungen einer AMP-PNP-Zugabe eIF4A. ....	97
Abbildung 41: Schmelzkurven bei variierenden RNA : eIF4A-Verhältnissen.....	99
Abbildung 42: Effekt verschiedener RNA-Substrate auf eIF4A.....	100
Abbildung 43: Einfluss von einzelsträngiger DNA (ssDNA) auf eIF4A.....	102
Abbildung 44: Mithilfe des MST-Assays erhaltene Bindungskurven zur Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_D$ der Interaktion von Silvestrol und CR-31-B (-) mit eIF4A...103	
Abbildung 45: Unterschiede im H/D-Austausch zwischen der DMSO-Kontrolle und Silvestrol und der DMSO-Kontrolle und CR-31-B (-).....	106
Abbildung 46: Unterschiede im H/D-Austausch im Bereich der ATP-Koordination.....	107
Abbildung 47: WST-1-Assay von Rocaglamid-Derivaten. ....	109
Abbildung 48: DLA mit den HGW-Verbindungen zur Identifikation potentieller neuer eIF4A-Inhibitoren.....	111
Abbildung 49: Thermal-Shift-Assay zur Validierung der HGW-Verbindungen als potentielle eIF4A-Inhibitoren.....	112
Abbildung 50: DLA: Vergleich der inhibitorischen Effekte von Silvestrol und HGW-3. .114	

---

Abbildung 51: WST-1-Assay von Episilvestrol zur Bestimmung des CC <sub>50</sub> -Werts.....	115
Abbildung 52: DLA: Vergleich der Effekte von Silvestrol und Episilvestrol.....	116
Abbildung 53: Übersicht der Leitstrukturen des Liganden-basierten sowie des Struktur-basierten Designs zur Identifikation neuer eIF4A-Inhibitoren.....	117
Abbildung 54: Untersuchte Modifikationen der linearen Sulfonamide. ....	119
Abbildung 55: DLA: Effekts der modifizierten linearen Sulfonamide.....	120
Abbildung 56: Thermal-Shift-Assay mit den linearen Sulfonamiden. ....	121
Abbildung 57: Modifikationen der Propeller-ähnlichen Sulfonamide .....	122
Abbildung 58: Thermal-Shift-Assay mit den Propeller-ähnlichen Sulfonamiden.....	123
Abbildung 59: Leitstruktur der Rhodanin-Derivate.....	123
Abbildung 60: DLA: Effekt der modifizierten Rhodanin-Derivate. ....	124
Abbildung 61: Modifikationen der Dicarbonsäureamide.....	125
Abbildung 62: Beispiele für untersuchte Modifikation der Dicarbonsäureamide.....	126
Abbildung 63: DLA: Effekt der Dicarbonsäureamid-Derivate .....	128
Abbildung 64: Thermal-Shift-Assay mit den Dicarbonsäureamid-Derivaten.....	129
Abbildung 65: Vergleich der Bindungen von RocA und Silvestrol an eIF4A.....	131
Abbildung 66: Vorhersage der Bindung von Episilvestrol an eIF4A.....	132
Abbildung 67: Vergleich Bindung von CR-31-B (-) und CR-31-B (+) an eIF4A.....	133
Abbildung 68: Vorhersage der Bindung von Zotatfin (eFT226) an eIF4A.....	134
Abbildung 69: Vorhersage der Bindung von Silvestrol an unterschiedliche eIF4A-Varianten. ....	136





## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.....	20
Tabelle 3: Zusammensetzung der Kulturmedien.....	21
Tabelle 4: Konzentrationen der verwendeten Stammlösungen. ....	22
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kits. ....	22
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Größenstandards.....	23
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Farbstoffe.....	23
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Enzyme und Mastermixe.....	23
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Reagenzien.....	24
Tabelle 10: Auflistung der Sequenzierungsprimer inklusive Sequenz.....	27
Tabelle 11: Auflistung der Gibson Assembly®-Primerpaare.....	27
Tabelle 12: Auflistung der Mutagenese-Primerpaare.....	30
Tabelle 13: Auflistung der synthetisch hergestellten RNA-Oligonukleotide. ....	33
Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.....	34
Tabelle 15: Übersicht über die eingesetzten Geräte.....	34
Tabelle 16: Übersicht über die verwendete Software.....	36
Tabelle 17: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der PCR.....	38
Tabelle 18: PCR-Reaktionszyklen.....	38
Tabelle 19: Übersicht der Agarosekonzentration im Gel.....	39
Tabelle 20: Zusammensetzung der Gibson Assembly®-Reaktion.....	39
Tabelle 21: Zusammensetzung der Phosphorylierungs-Reaktion.....	41
Tabelle 22: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den <i>DpnI</i> -Verdau.....	42
Tabelle 23: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Ligation.....	42
Tabelle 24: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Kolonie-PCR.....	44
Tabelle 25: Einstellungen des Thermocyclers bei der Kolonie-PCR.....	44
Tabelle 26: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Thermal-Shift-Assay.....	56
Tabelle 27: Einstellungen zur Messung des Thermal-Shift-Assays.....	56
Tabelle 28: Aufbau der Schmelzkurve zur Messung des Thermal-Shift-Assays.....	56
Tabelle 29: Zusammensetzung der mittels HDX-MS untersuchten Ansätze von eIF4A ..	61
Tabelle 30: Einstellungen zur Messung des WST-1-Assays.....	67
Tabelle 31: Eigenschaften der Firefly- und der Renilla-Luciferase .....	68

Tabelle 32: Einstellungen zur Messung des Dual-Luciferase-Assays..... 70

Tabelle 33: Anhand des computerbasierten Dockings von Silvestrol an eIF4A-Varianten  
vorhergesagte Rocaglamid-Sensitivität bzw. Rocaglamid-Resistenz.....137

# Anhang A: Dual-Luciferase-Assay

## Plasmidsequenz von pFR\_HCV\_xb\_β-Globin

AGATCTAAATGAGTCTTCGGACCTCGCGGGGGCCGCTTAAGCCGGTGGTTAGGTTTTGTCTGACGCGGGGGGAGGGGGAAGGAACG 85  
AAACACTCTCATTTCGGAGGCGGCTCGGGGTTTTGGTCTTGGTGGCCACGGGCACGCAGAAAGAGCGCCCGGATCCTCTTAAGCACCC 170  
CCCCGCCCTCCGTGGAGGCGGGGTTTTGGTTCGGCGGGTGGTAACTGGCGGGCCGCTGACTCGGGCGGGTGCAGCGCCAGAGTGT 255  
TGACTTTTTCCGCTGCTCGCAGACCCCGGGCGGCCCGCCGCGCGCAGCGGCTCGCTGGGTCTAGGCTCCATGGGAC 340  
GTATACGTGGACAGGCTCTGGAGCATCCGCACGACTCGCGGTGATATTACCGGACACCTCTCGGGACGAGCGGGTACGCGGC 425  
TGACGCGGAGCGTCCGTTGGGCGACAAACACCCAGGACGGGACACAGTACACTATCTTGTACCCCGAGGCGCGAGGGACTGCAG 510  
GAGCTTCAGGGAGTGGCGACGCTGCTTCATCCCCGTGGCCCGTGTCTCGCTTGTGGCGGTGTCCCCGGAAGAAATATATTTG 595  
CATGTCTTTAGTCTATGATGACACAAACCCCGCCAGCGTCTTGTCTTGGCAATTGCAACACGCAGATGCACTCGGGCGGC 680  
GCGGTCCCAGGTCGACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCCTCGAACACCCGAGCGACCCCTGACGCGACCCGCTTAAacattt 765  
gcttctgacacaactgtgttcaactagcaacctcaaacagacaccATGGAAAGCGCCAAAACATAAAGAAAGGCCCGGGCCATT 850  
CTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTCTCTGGAACAATTGCTTTT 935  
ACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATG 1020  
GGCTGAATACAAATACAGAAATCGTCTGATGCAAGTAAACCTCTCTCAATTCTTTATGCCGTTGTGGCGCGTATTTATCGG 1105  
AGTTGCAAGTTCGCGCCCGCAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTCCGACGCTACCGTGGTGT 1190  
GTTTCCAAAAGGGGTTGCAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAGGCTCCCAATCATCCAAAATTTATATCATGGATTCTAAAA 1275  
CGGATTACCAGGGATTTCACTCGATGTACACGTTCTGCACATCTCATCTACCTCCCGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGA 1360  
GTCCTTCGATAGGGACAGACAATTTGCATGATCATGAACTCCTCGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCTGCTCCGCTCAT 1445  
AGAAGTCCGCTGGTGAAGTCTCGCATGCCAGAGTCTATTTTTGGCAATCAAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAAGTGTG 1530  
TTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATAtgtggatttcgagtcgctctaatgtatagatttga 1615  
agaagagctgttctgaggagccttcaggattacaagattcaaaagtcgctgctggcgcaaccctattctctctcttcgcca 1700  
agcactctgatgacaatcagatttatctaatttacacgaaattgcttctggtggcgctccctctctaaaggaagtcgggaaag 1785  
cggttgcacaagaggttccatctgccaggtatcaggcaaggataggctcactgagactacatcagctattctgattacaccgga 1870  
gggggatgataaacggggcgcggtcggtaaagttgttccatttttgaagcgaaagttgtggatctggataccgggaaaaacgctg 1955  
ggcgtaaatcaagagggcgaactgtgtgagaggtcctatgatattctccggttatgtaaacaatccggaaagcgcaaacgctg 2040  
tgattgacaagaggtggatggctacattctggagacatagcttactggagcgaagacgaacactctctcatcgttgaccgctgaa 2125  
gtctctgatfaatagtaaaaggtatcagggtggctcccgctgaattggaaatccatcttgcctcaaacaccccaacatcttcgacgca 2210  
ggtgtcgcaggtcttcccagcagatgacgcccgtgaaactcccgcgcccgtgtgtgtttggagcacgaaagacgatgacggaaa 2295  
aagagatcgtggattcgtcgcaggtcaagtacaaccgcaaaaagttgcgcggaaggtttgtgtttgtggagcacgaaagacgatgacggaaa 2380  
AGGCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAATTC 2465  
TAGTGTACGTAAGCAGCCCGGATTTGGGGCGGACACTCCACCATTAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTACGCGAGAAA 2550  
GCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGAGTCTGCAGCCTCCAGGACCCCGCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTCGCGAACCGG 2635  
TGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTCCCGCCGCAA 2720  
GACTGCTAGCCGAGTATGTGGTGGCGAAAAGGCTTGTGGTACTGCTGATAGGGTGTTCGAGTGCCTCCCGGGAGGCTCTGCT 2805  
AGACCGTGCACCATGAGCAGCAATCCTAAACCTCAAAGAAAACCAAACTAACACCAACCGCCGCCACAGGACGCTCTTCATAT 2890  
GTCTAGCCACCATGACTTCGAAAGTTTATGATCCAGAAACAAAGAAAACGGATGATAACTGGTCCGCACTGGTGGCCAGATGATAA 2975  
ACAAATGAATGTTCTTGATTCAATTTAATTAATGATTGATTCAGAAAACATGCAGAAAATGCTGTTATTTTTTACATGGTAAC 3060  
CGCGCCTCTTCTATTTATGGCGACATGTTGCCACATTTGGCCAGTACGCCGCTGATTTATACCAGACTTTATGGTATGG 3145  
GCAAAATCAGGCAAAATCTGTAATGGTCTTATAGTTTACTTGATCATTACAATATCTTACTGCATGGTTTTGAACTTCTTAATTT 3230  
ACCAAAGAAAGATCATTTTTGTGGCCATGATTTGGGGTCTTGTGTTGGCATTTCATTATAGCTATGAGCATCAAGATAAGATCAA 3315  
AATAGTTACGCTGAAAGTGTAGTAGTGTGATTGAATCATGGGATGAATGGCCTGATTTGAAGAAGATATTGCGTTGATCA 3400  
AACTCTGAAGAAGGAGAAAATGGTTTTGGAGAATAACTTCTCGTGGAAACCATGTTGGATCAAAAATCATGAGAAAAGTTAGA 3485  
ACCAAGAAATTTGCAGCATATCTTGAACCATCAAAGAGAAAGGTGAAGTTCGTGCTCCAACATTCATGGCCTCGTGAATC 3570  
CCGTTAGTAAAAGGTGGTAAACCTGACGTTGTACAATTTGTAGGAATTTAATGCTTATCTACGTGCAAGTGTGATTTACCAA 3655  
AAATGTTTATTGAATCGACCCAGGATTTCTTTCCAATGCTATTGTGAAGGTGCAAGAAAGTTTCTAATACTGAATTTGTCAA 3740  
AGTAAAAGGTCTTCAATTTTTCGAAAGAAAGTGCACCTGATGAAATGGGAAAATATATAAATCGTTTCGTTGAGCGAGTTCTCAA 3825  
AATGAACAAATAATCTAGACTCGAGCCGGAAGTTTTCAAAAAGCTAACACCGGAAGTTTTCAAAAAGCTAACACCGGAAATTTCA 3910  
ACAAAAGCTAACACCGGAAGTTTTCAAAAAGCTAACACCGGAGTTTTCAAAAAGCTAACACCGGAAATTTCAAAAAGCTAACAC 3995  
GGATCGCGGGCCCTAGAGCGGCGCTTCGAGCAGACATGATAAGTACATTGATGAGTTTGGACAAAACCACTAGAATGCAGT 4080  
GAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAA 4165  
CAATTCGATTCATTTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTTGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGCTGAT 4250  
ATCGATAAGGATCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGT 4335  
ATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAAGATGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCG 4420  
CCTTATCCCTTTTTTCGGCATTGCTTCTCTGTTTTGCTTCAACCAAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAG 4505  
TTGGGTGACAGATGGGTTACATGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGTCTTGAAGATTTTCGCCCGAAGAAAGCTTTTCAA 4590  
TGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCGATTTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACA 4675  
CTATTCTCAGAATGACTTGGTGGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAAGAAATTTGCACT 4760  
GCTGCCATTAACCATGAGTATAACACTCGCGCCAACTTACTTGTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCGTTTTTGC 4845  
ACAAATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGTGTTGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC 4930  
GATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATAACTGGCGCACTACTACTGACTTCCCGGCAACAATTAATAGAC 5015  
TGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACGAGCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCGG 5100  
GTGAGCGTGGGTCTCGCGTATCATTGCAAGCACTGGGGCAGATGGTAAGCCCTCCGCTATCGTATGTTATCTACACGACGGGGAG 5185  
TCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGTAGGTCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACAGCAAGTT 5270  
TACTCATATATACTTTAGTTTAAACTTCAATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA 5355  
CCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGGATCCTTTTTT 5440  
TCTGCGGTAACTGCTGCTTCAAAAACAAAACACCAGCTACCAGCGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTT 5525  
TTTTCCGAAGGTAACTGGCTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGA 5610  
ACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTAACTGGCTGCTGCAAGTGGCGATAAAGTCTGCTTACCCGG 5695  
GTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGCGCAGCGGTGGGGCTGAAAGGGGGGTTGCTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGA 5780  
ACGAACTACCCGAACTGAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCCGACCGTTCCCGAAGGGGAGAAAGGGCGGACGGTATC 5865  
CGGTAAAGCGGACGGTTCGAAACAGGAGCGCACAGGGAGCTTCAAGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTT 5950  
TCGCGACCTCTGACTTGGCGTGCATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGCCTTT 6035  
TTACGGTTCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGGCTCGAC ••• 6081

Abbildung A.1: Plasmidsequenz von pFR\_HCV\_xb am Beispiel von pFR\_HCV\_xb+β-Globin. Das Farbschema entspricht der in Abbildung 10 gezeigten schematischen Illustration von pFR\_HCV\_xb.

## Translationseffizienzen

**Tabelle A.1: Translationseffizienzen der im Dual-Luciferase-Assay vermessenen Konstrukte 48 Stunden nach Behandlung mit Silvestrol oder CR-31-B (-), normalisiert auf DMSO. Mittel: Mittelwert, SEM: Standardabweichung des Mittelwerts für jeweils  $n \geq 3$  biologische Replikate mit jeweils 4 technischen Replikaten.**

	Translationseffizienz							
	Silvestrol				CR-31-B (-)			
	5 nM		10 nM		5 nM		10 nM	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
VP35	0,74	0,02	0,72	0,02	0,95	0,05	1,00	0,06
VP35-stab.HP	0,74	0,04	0,61	0,04	-	-	-	-
VP35-ΔHP	0,86	0,02	0,81	0,03	-	-	-	-
VP35-nurHP	0,86	0,04	0,63	0,03	1,68	0,12	1,83	0,17
VP35-GCHP	0,94	0,02	0,80	0,03	-	-	-	-
GCHP+(AC) <sub>15</sub>	x	x	x	x	-	-	-	-
VP35-HP+(AC) <sub>5</sub>	0,80	0,04	0,63	0,04	-	-	-	-
VP35-HP+(AC) <sub>10</sub>	0,81	0,04	0,70	0,06	1,33	0,06	1,65	0,05
VP35-HP+(AC) <sub>15</sub>	1,00	0,06	0,87	0,05	1,00	0,06	1,45	0,04
VP35-HP+(AC) <sub>20</sub>	0,94	0,04	0,75	0,02	-	-	-	-
VP35-HP+(AC) <sub>25</sub>	0,95	0,03	0,87	0,06	-	-	-	-
VP35-HP+(AG) <sub>5</sub>	0,69	0,05	0,55	0,04	1,012	0,06	1,04	0,10
VP35-HP+(AG) <sub>10</sub>	0,63	0,03	0,51	0,03	-	-	-	-
VP35-HP+(AG) <sub>15</sub>	0,56	0,01	0,43	0,03	-	-	-	-
VP35-HP+PolyAC-mid(AG) <sub>5</sub>	0,88	0,05	0,70	0,031	-	-	-	-
VP35-HP+PolyAC-term(AG) <sub>2,5</sub>	0,83	0,05	0,74	0,04	-	-	-	-
(AC) <sub>15</sub>	1,40	0,13	1,26	0,15	1,90	0,12	1,49	0,11
(AG) <sub>15</sub>	0,45	0,03	0,39	0,02	0,32	0,04	0,18	0,01
PolyAC-5'-(AG) <sub>2,5</sub>	0,91	0,06	0,66	0,05	-	-	-	-
PolyAC-5'-(AG) <sub>5</sub>	0,95	0,13	0,80	0,07	-	-	-	-
PolyAC-5'-(AG) <sub>7,5</sub>	0,74	0,07	0,68	0,06	-	-	-	-
PolyAC-5'-(AG) <sub>10</sub>	0,76	0,10	0,59	0,03	-	-	-	-
PolyAC-mid(AG) <sub>2,5</sub>	0,96	0,12	0,72	0,01	-	-	-	-
PolyAC-mid(AG) <sub>5</sub>	0,85	0,08	0,67	0,03	-	-	-	-
PolyAC-mid(AG) <sub>7,5</sub>	0,66	0,02	0,67	0,03	-	-	-	-
PolyAC-mid(AG) <sub>10</sub>	0,65	0,03	0,53	0,03	-	-	-	-
β-Globin	1,17	0,04	1,04	0,04	1,22	0,08	2,40	0,19
PIM1	0,61	0,02	0,54	0,02	0,57	0,04	0,49	0,042
(AG) <sub>5</sub> +(AC) <sub>10</sub>	0,69	0,04	0,73	0,04	0,75	0,05	0,81	0,02
(AG) <sub>5</sub> +(AC) <sub>12,5</sub>	0,78	0,03	0,82	0,05	0,93	0,02	0,90	0,02
(AG) <sub>5</sub> +(AC) <sub>15</sub>	0,79	0,06	0,71	0,03	0,76	0,02	0,82	0,01
(AG) <sub>5</sub> +(AC) <sub>17,5</sub>	0,77	0,03	0,72	0,03	0,78	0,03	0,83	0,02
NP-nurHP	0,74	0,02	0,69	0,04	0,90	0,04	1,071	0,10
NP-HP-G4U	0,84	0,03	0,77	0,04	0,93	0,03	0,96	0,06
NP-HP-C20A	0,80	0,03	0,73	0,04	0,97	0,03	1,19	0,08
NP-HP-genomisch	0,89	0,03	0,88	0,05	1,01	0,04	1,37	0,16
NP-HP-genom.-G20U	0,77	0,05	0,70	0,04	0,98	0,06	1,20	0,16
β-Globin-Purin	0,66	0,02	0,80	0,04	0,74	0,05	0,71	0,05
Prohibitin	0,84	0,05	0,95	0,08	1,05	0,09	0,94	0,10
HCoV-229E	0,75	0,04	0,59	0,04	0,89	0,04	0,72	0,09

MERS-CoV	0,89	0,04	0,58	0,03	0,94	0,14	0,73	0,09
SARS-CoV-2	0,61	0,05	0,73	0,05	0,74	0,05	0,71	0,08
VP40	0,76	0,03	0,77	0,04	0,73	0,08	0,87	0,11
VP30	0,77	0,04	0,71	0,05	0,88	0,05	0,66	0,08
HEVgt3c	0,80	0,05	0,77	0,04	1,05	0,06	1,09	0,08
HEVgt3c-G4C	0,86	0,03	0,85	0,05	0,90	0,06	1,07	0,07
HEVgt3c-G4CC6A	0,90	0,06	1,05	0,13	1,051	0,04	1,64	0,28
HEVgt3c-Purine	0,69	0,04	0,80	0,06	0,81	0,03	0,74	0,10
CHIVK	1,08	0,06	0,82	0,03	-	-	-	-
CHIKV-C18A	0,82	0,04	0,70	0,06	-	-	-	-

**Tabelle A.2: Translationseffizienzen der im Dual-Luciferase-Assay vermessenen Konstrukte 48 Stunden nach Behandlung mit CR-31-B (+), normalisiert auf DMSO.** Mittel: Mittelwert, SEM: Standardabweichung des Mittelwerts.

	Translationseffizienz									
	CR-31-B (+)				Episilvestrol					
	5 nM		10 nM		1 nM		2,5 nM		5 nM	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
$\beta$ -Globin	0,97	0,02	0,92	0,02	1,18	0,17	1,04	0,11	0,97	0,09
PIM1	1,03	0,02	0,99	0,11	0,82	0,09	0,57	0,05	0,47	0,07
VP35	1,01	0,05	0,93	0,01	-	-	-	-	-	-

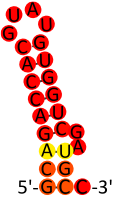
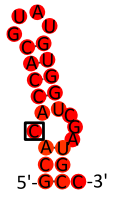
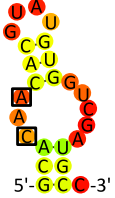
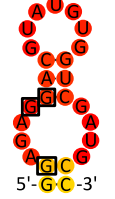
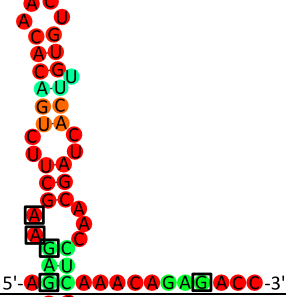
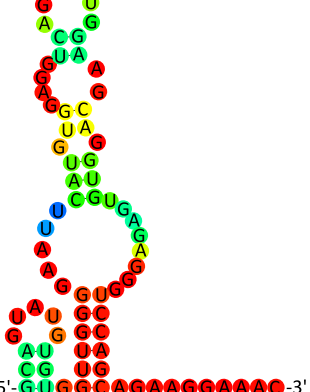
**Tabelle A.3: Translationseffizienzen von  $\beta$ -Globin 48 Stunden nach Behandlung mit den HGW-Verbindungen normalisiert auf DMSO.** Mittel: Mittelwert, SEM: Standardabweichung des Mittelwerts.

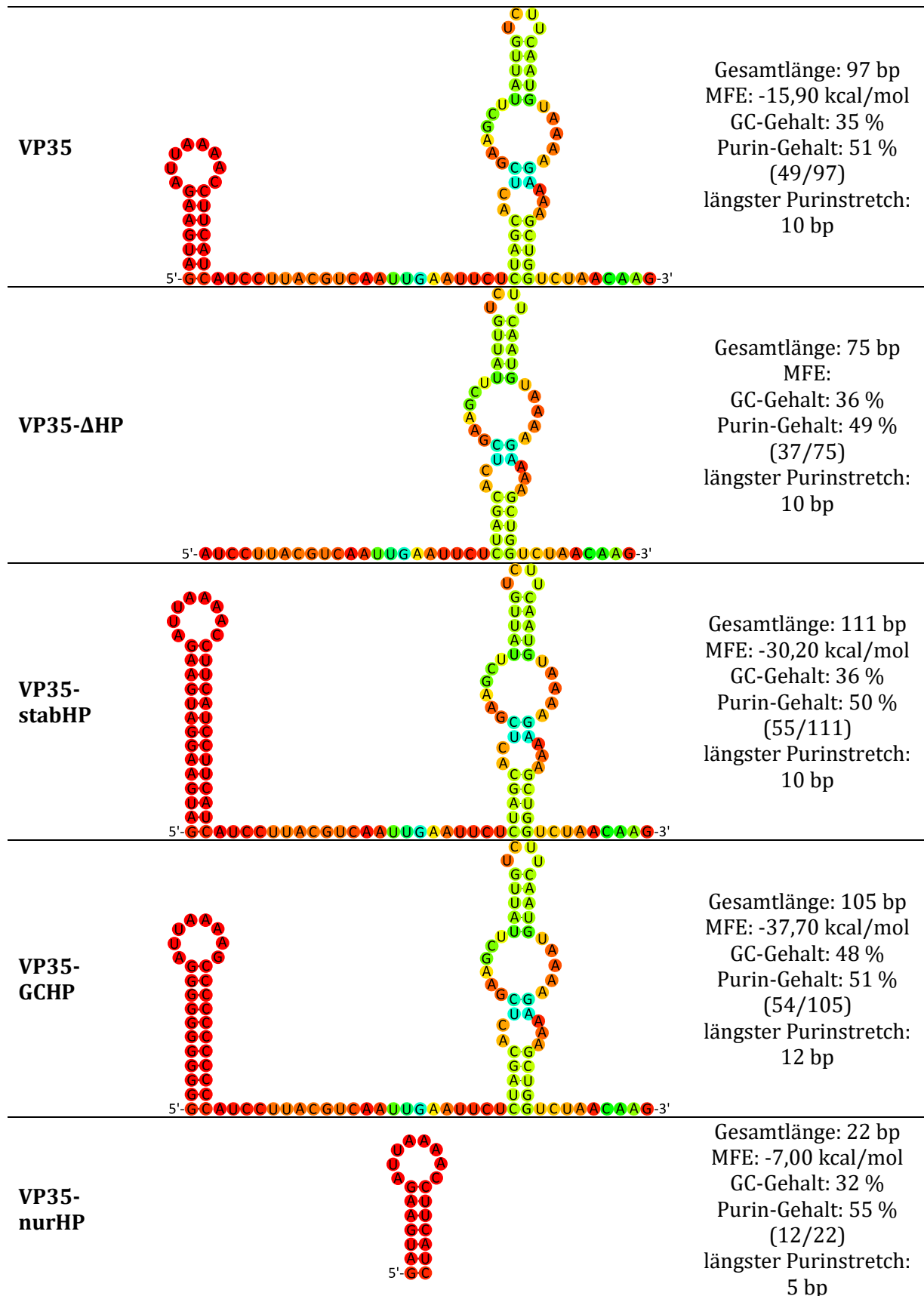
	Translationseffizienz: $\beta$ -Globin							
	5 nM		10 nM		50 nM		100 nM	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
HGW-0	0,66	0,07	1,02	0,08	0,91	0,06	0,80	0,14
HGW-8	1,18	0,04	0,98	0,04	1,08	0,09	0,97	0,05
HGW-9	0,99	0,03	1,02	0,05	1,00	0,05	0,95	0,04
HGW-4	0,96	0,03	0,97	0,05	1,04	0,05	0,96	0,06
HGW-3	1,13	0,07	1,09	0,04	1,43	0,05	1,52	0,12

**Tabelle A.4: Translationseffizienzen von (AG)<sub>15</sub> 48 Stunden nach Behandlung mit den HGW-Verbindungen normalisiert auf DMSO.** Mittel: Mittelwert, SEM: Standardabweichung des Mittelwerts.

	Translationseffizienz: (AG) <sub>15</sub>							
	5 nM		10 nM		50 nM		100 nM	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
HGW-0	0,82	0,03	0,89	0,02	0,77	0,08	0,74	0,14
HGW-8	1,09	0,08	0,91	0,04	0,91	0,02	0,97	0,02
HGW-9	0,97	0,03	0,99	0,05	0,94	0,05	0,94	0,03
HGW-4	0,96	0,07	1,05	0,06	0,93	0,06	0,96	0,03
HGW-3	0,83	0,031	0,78	0,02	0,41	0,01	0,38	0,03

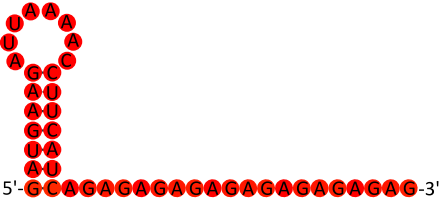
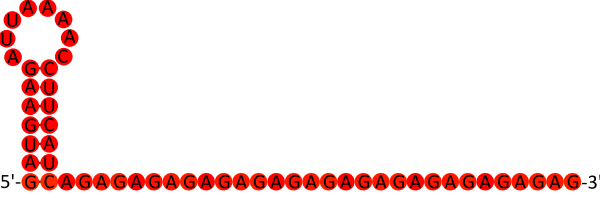


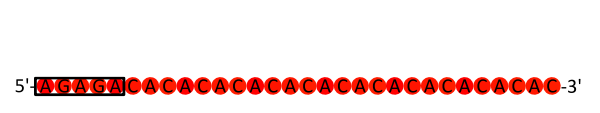
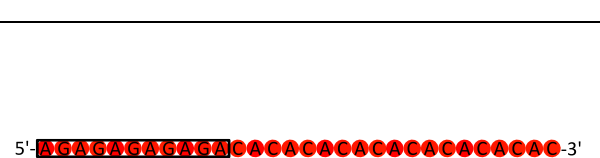
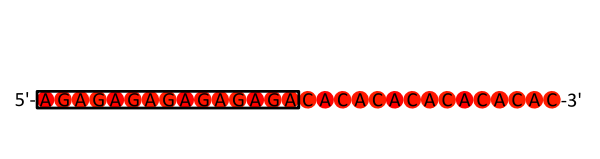


<b>HEVgt3c</b>		<p>Gesamtlänge: 25 bp                      MFE: -11,10 kcal/mol                      GC-Gehalt: 60 %                      Purin-Gehalt: 52 %                      (13/25)                      längster Purinstretch:                      3 bp</p>
<b>HEVgt3c-G4C</b>		<p>Gesamtlänge: 25 bp                      MFE: -8,30 kcal/mol                      GC-Gehalt: 60 %                      Purin-Gehalt: 48 %                      (12/25)                      längster Purinstretch:                      2 bp</p>
<b>HEVgt3c-G4CC6A</b>		<p>Gesamtlänge: 25 bp                      MFE: -3,30 kcal/mol                      GC-Gehalt: 56 %                      Purin-Gehalt: 52 %                      (13/25)                      längster Purinstretch:                      2 bp</p>
<b>HEVgt3c-Purin</b>		<p>Gesamtlänge: 25 bp                      MFE: -3,80 kcal/mol                      GC-Gehalt: 60 %                      Purin-Gehalt: 64 %                      (16/25)                      längster Purinstretch:                      8 bp</p>
<b>β-Globin-Purin</b>		<p>Gesamtlänge: 50 bp                      MFE: -10,30 kcal/mol                      GC-Gehalt: 46 %                      Purin-Gehalt: 54 %                      (27/50)                      längster Purinstretch:                      7 bp</p>
<b>Prohibitin</b>		<p>Gesamtlänge: 75 bp                      MFE: -10,50 kcal/mol                      GC-Gehalt: 53 %                      Purin-Gehalt: 69 %                      (52/75)                      längster Purinstretch:                      9 bp</p>



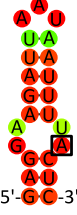
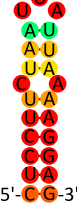




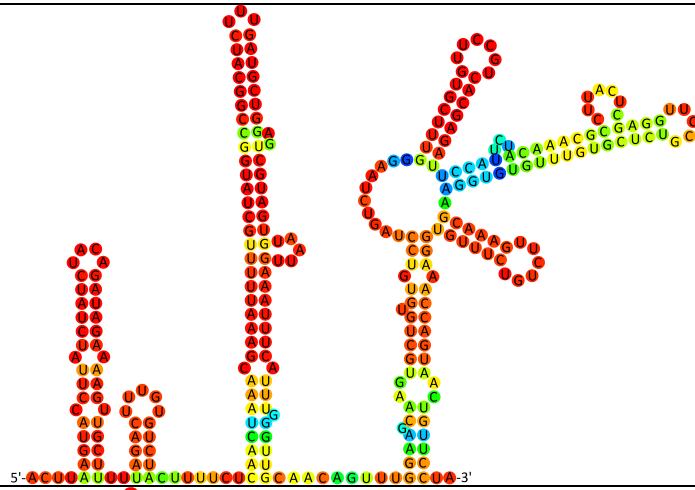
<b>GCHP+</b> <b>(AC)<sub>15</sub></b>		Gesamtlänge: 60 bp MFE: -30,50 kcal/mol GC-Gehalt: 63 % Purin-Gehalt: 53 % (32/60) längster Purinstretch: 12 bp
<b>VP35-HP</b> <b>+(AC)<sub>5</sub></b>		Gesamtlänge: 32 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 38 % Purin-Gehalt: 50 % (16/32) längster Purinstretch: 5 bp
<b>VP35-HP</b> <b>+(AC)<sub>10</sub></b>		Gesamtlänge: 42 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 40 % Purin-Gehalt: 52 % (22/42) längster Purinstretch: 5 bp
<b>VP35-HP</b> <b>+(AC)<sub>15</sub></b>		Gesamtlänge: 52 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 42 % Purin-Gehalt: 52 % (27/52) längster Purinstretch: 5 bp
<b>VP35-HP</b> <b>+(AC)<sub>20</sub></b>		Gesamtlänge: 62 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 44 % Purin-Gehalt: 52 % (32/62) längster Purinstretch: 5 bp
<b>VP35-HP</b> <b>+(AC)<sub>25</sub></b>		Gesamtlänge: 72 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 44 % Purin-Gehalt: 51 % (37/72) längster Purinstretch: 5 bp
<b>VP35-HP</b> <b>+(AG)<sub>5</sub></b>		Gesamtlänge: 32 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 38 % Purin-Gehalt: 69 % (22/32) längster Purinstretch: 10 bp

<b>VP35-HP +(AG)<sub>10</sub></b>	 <p>5'-<u>GCCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG</u>-3'</p>	Gesamtlänge: 42 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 40 % Purin-Gehalt: 76 % (32/42) längster Purinstretch: 20 bp
<b>VP35-HP +(AG)<sub>15</sub></b>	 <p>5'-<u>CCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG</u>-3'</p>	Gesamtlänge: 52 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 42 % Purin-Gehalt: 81 % (42/52) längster Purinstretch: 30 bp
<b>VP35-HP +PolyAC- mid(AG)<sub>5</sub></b>	 <p>5'-<u>CCACACACACACACAGAGAGAGAGACACACACACAC</u>-3'</p>	Gesamtlänge: 52 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 42 % Purin-Gehalt: 60 % (31/52) längster Purinstretch: 9 bp
<b>VP35-HP +PolyAC- 5'&amp;3'-(AG)</b>	 <p>5'-<u>CCACAGAGAGACACACACAGACACACACACAGAGAG</u>-3'</p>	Gesamtlänge: 52 bp MFE: -8,70 kcal/mol GC-Gehalt: 42 % Purin-Gehalt: 60 % (31/52) längster Purinstretch: 5 bp
<b>PolyAC- 5'-(AG)<sub>2,5</sub></b>	 <p>5'-<u>AGAGAGACACACACACACACACACACACACAC</u>-3'</p>	Gesamtlänge: 30 bp MFE: 0,00 kcal/mol GC-Gehalt: 50 % Purin-Gehalt: 57 % (17/30) längster Purinstretch: 5 bp
<b>PolyAC- 5'-(AG)<sub>5</sub></b>	 <p>5'-<u>AGAGAGAGAGAGACACACACACACACACACACAC</u>-3'</p>	Gesamtlänge: 30 bp MFE: 0,00 kcal/mol GC-Gehalt: 50 % Purin-Gehalt: 67 % (20/30) längster Purinstretch: 11 bp
<b>PolyAC- 5'-(AG)<sub>7,5</sub></b>	 <p>5'-<u>AGAGAGAGAGAGAGAGAGACACACACACACACACAC</u>-3'</p>	Gesamtlänge: 30 bp MFE: 0,00 kcal/mol GC-Gehalt: 50 % Purin-Gehalt: 73 % (22/30) längster Purinstretch: 15 bp



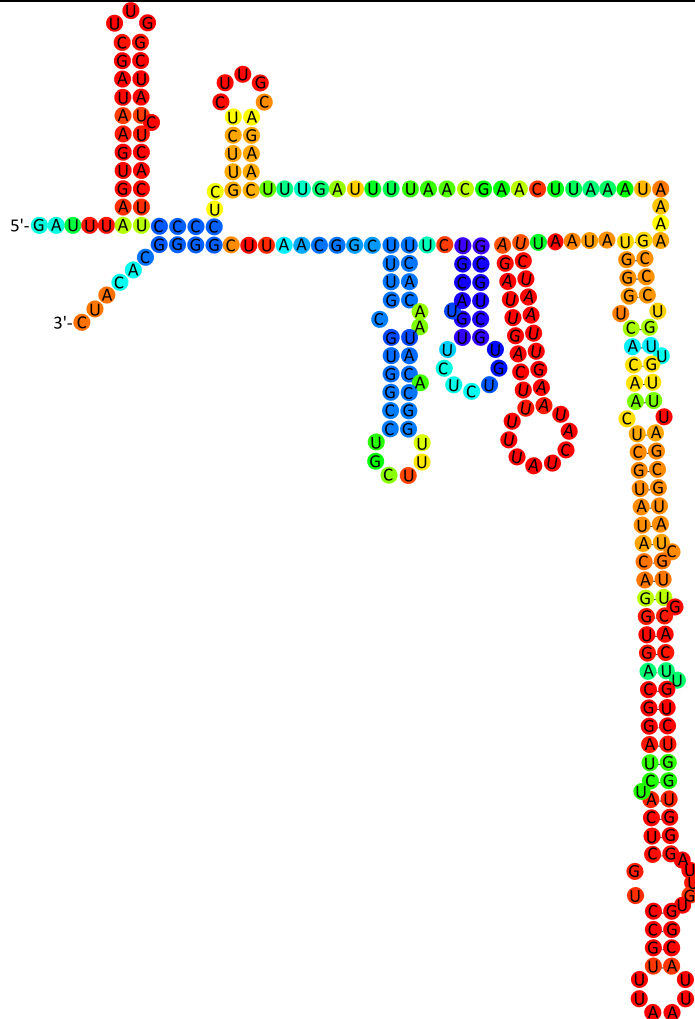
<b>(AG)<sub>5</sub>- (AC)<sub>15</sub></b>	5'-( <b>AG</b> ) <sub>5</sub> - ( <b>AC</b> ) <sub>15</sub> -3'	Gesamtlänge: 40 bp MFE: 0,00 kcal/mol GC-Gehalt: 50 % Purin-Gehalt: 63 % (25/40) längster Purinstretch: 11 bp
<b>(AG)<sub>5</sub>- (AC)<sub>17,5</sub></b>	5'-( <b>AG</b> ) <sub>5</sub> - ( <b>AC</b> ) <sub>17,5</sub> -3'	Gesamtlänge: 45 bp MFE: 0,00 kcal/mol GC-Gehalt: 49 % Purin-Gehalt: 62 % (28/45) längster Purinstretch: 11 bp
<b>NP-nurHP</b>		Gesamtlänge: 23 bp MFE: -9,10 kcal/mol GC-Gehalt: 30 % Purin-Gehalt: 52 % (12/23) längster Purinstretch: 8 bp
<b>NP-HP-G4U</b>		Gesamtlänge: 23 bp MFE: -2,20 kcal/mol GC-Gehalt: 26 % Purin-Gehalt: 48 % (11/23) längster Purinstretch: 4 bp
<b>NP-HP- C20A</b>		Gesamtlänge: 23 bp MFE: -2,80 kcal/mol GC-Gehalt: 26 % Purin-Gehalt: 57 % (13/23) längster Purinstretch: 8 bp
<b>NP-HP- genom.</b>		Gesamtlänge: 23 bp MFE: -5,20 kcal/mol GC-Gehalt: 30 % Purin-Gehalt: 48 % (11/23) längster Purinstretch: 8 bp
<b>NP-HP- genom.- G20U</b>	5'-CUC <b>C</b> UUCUAAUUAUUA <b>U</b> AA <b>U</b> GAG-3'	Gesamtlänge: 23 bp MFE: 0,00 kcal/mol GC-Gehalt: 26 % Purin-Gehalt: 43 % (10/23) längster Purinstretch: 4 bp

HCoV-229E



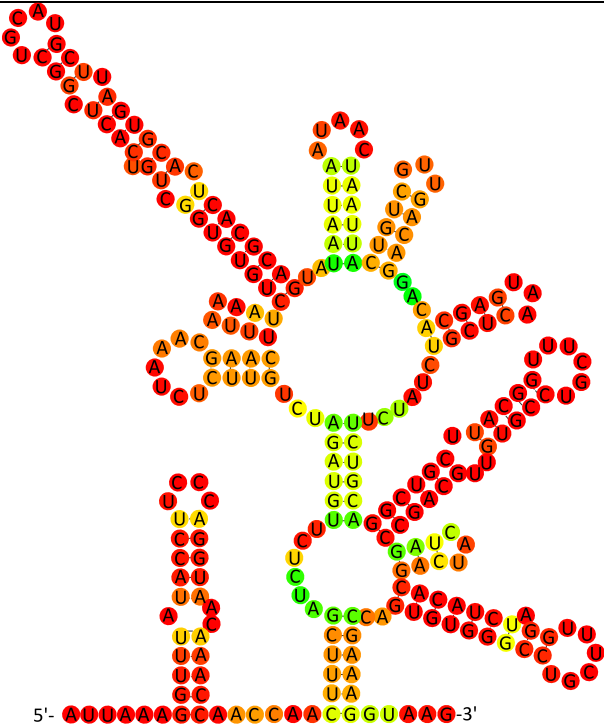
Gesamtlänge: 292 bp  
 MFE: -83,60 kcal/mol  
 GC-Gehalt: 41 %  
 Purin-Gehalt: 41 %  
 (132/292)  
 längster Purinstretch:  
 7 bp

MERS-CoV



Gesamtlänge: 278 bp  
 MFE: -85,70 kcal/mol  
 GC-Gehalt: 44 %  
 Purin-Gehalt: 44 %  
 (123/278)  
 längster Purinstretch:  
 5 bp

SARS-CoV-2



Gesamtlänge: 265 bp  
MFE: -82,10 kcal/mol  
GC-Gehalt: 45 %  
Purin-Gehalt: 46 %  
(122/265)  
längster Purinstretch:  
6 bp

# Anhang B: Proteinaufreinigung von eIF4A1(19-406)

## Plasmidsequenz von pET-28a(+)\_eIF4A1(19-406)

```
*** tggcgaatgggacgcccctgtagcggcgcataaagcggcggtgtggtggttaccgagcagcgtgaccgctacacttgccagcggcctagcgc 95
ccgctcctttcgctttcttcccttcttccgcaagcttccggcgttcccccgtcaagctctaaatcgggggcctccctttagggttccgattt 190
agtgctttacggcaactcgacccaaaaaacttgattagggtgaggttaccgagtgaggcctcgccctgatagcgggttttccgctttgac 285
gttggagtcacgcttcttaaatagtggaactctgttccaaactggaacaaactcaacctatctcggtctattcttttatttatttgaagggat 380
tggcgtttccggcctatgggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatlaacgcgaatttttaacaaatattaacggtttacaatttcagggtggc 475
actttccggggaaatgtgcccggaaacctatgtttatttttctaaatcaattcaaatatgattccgctcatgaattattcttagaaaaact 570
catcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatattttgaaaaagcgtttctgtaaggaaggagaaactca 665
ccgagggcagttccataggatggcaagatcctggtatcgggtcggactcggactcgtccaacatcaatcaacctatatttccccctcgtcaaa 760
aatagggttacaagtggaaatcaccatgagtgacgactgaatccgggtgacatggcaaaaagtttgcatttcttccagactgttccaacag 855
ggcagccattacgctcgtcatcaaatcactcgcatcaaccaaccgttattcatctggtgagtgccgctgagcggagacgaaatcggcgtcgtg 950
ttaaaggacaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaaactgcccagcgcatacaaatatttccactgaatcaggatattcttcc 1045
taatccctggactgtttccggggatcgaggtggtgagtaaccatgcatcaccaggtacggataaaaactgcttgaagcagcagtttattgctcag 1140
tfaatccgctcagccagtttattgctgaccatctcatctgtaaacatcatggcaacgctacctttgccattgttcagaaacaactctggcgcacg 1235
ggcttcccatcaatcgatagattgtcgacactgttcccggactattcggcagccatttatacccatataatcagcatccatgttggaaatt 1330
tfaatcggcggctagagcaagcgtttccgggtgaaatggctcaaacacctgtattactggttattgtaagcagcagtttattgctcagc 1425
acaaaaatcccttaacgtgagtttctgctccactgagcgtcagacccgtagaaaaagatcaaggatcttcttgagatccttttttctcggcgt 1520
aatctgctgcttgaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgcccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactgct 1615
tcagcagagcgcagatgcaaaatcctgcttctagtgagcgtgtagggcaccactcaagaactctgtagcaccgctacatccctcgtcggg 1710
ctgctaatcctgttaccagtggtgctgcccagtgccgataggctgcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataggcgcagcgg 1805
ctggggtgaacgggggggttctgacacagcccagcttggagcgaacgacctaccggaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcgg 1900
ccacgcttcccgaaggagaaagcggacaggtatccggtaagcagagcggcagcaggggagcttccagggggaaaccggc 1995
tggatctctttatagctcctgctgggtttccgcaactctgacttggcgtcagatttttggatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaacgc 2090
cagcaacggggccttttaccggttctggcctttgctggcctttgctcacatgtcttctcctcgttatcccctgatctgtggataaccgta 2185
ttaccgctttgagtgagctgataccgctcggcagcggcaacgaccgagcagcaggtcagtgagcaggaagcggaaagcggcctgatcggg 2280
tattttctccttaccgcatctgtcgggtattcacaccgcatatggtgcaactctcagtaaatctgctctgatgccgcatagttaggcagat 2375
ataactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctggcccgaaccgcaaacccgctgacgcccctgacgggctgtctgctcggcggca 2470
tccgcttaccagacaactgtgaccgctcggggagctgcatgtgctcagaggttttaccgctcatcaccgaaacggcggagggcagctgggt 2565
ctcatcagcgtggtcgtgaagcgtatcacagatgtctcctgttccaccgctcagctcgttggattctccagaagcgttaatgctggcttcc 2660
ctgataaagcggggcctgttaagggcgggtttttctcctgtttggctcaatgagcctcgttcaagggggatttctgttcaagggggat 2755
atgaaacgagagaggatgctcagatcggggttactgatgatgaacatgcccgggttactgaaactgtgaggggtaaacaactggcgggtatg 2850
gcccggggaccagagaaaaatcactcaggggtcaatgcccagcctcgttcaatcagatagtggtgttccacaggggtagccagcagatctc 2945
tgagatccggaaacataaatggtcagggcgtgacttccgctttccagactttacgaaacaggaaccgaaagaccattcatggttctcag 3040
gtcgcagagcgtttgacgagcagctcgttccagctcgtcgcgtatcgggtgatctatctgctaaaccagttaggcaaccggcagcctagccg 3135
ggtctcctcaacagagagcagcatcagcgcaccgctggggcggcctgcccggcagatgaatggcctgcttctcggcgaacgcttgggtggcgggac 3230
cagtgacgaaggttggagcagggcgtgcaagattccgaatccgcaaacggcagcagggcagatcagctcggcctcagcgaagggcgtcctc 3325
aaaaatgaccagagcggctgcccggcactgctcagagttgcatgataaagaagacagctcaataggcggggcagatagtcagcccggcaca 3420
ccggaagggagctgactgggttgaaggtctcaagggcagcggtcagatcccgggtgctaatgagtgagctaaactcaatgacttggcgttgc 3515
cactcaccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgcaactgcatattaatgaaatcgcccaacggcggggagagggcgtttgggtattggcggcag 3610
gggtggtttttcttcttccaccagtgagacgggcaacagctgattgcccctcaccgctggcctgagagagttgacgcaagcgggtccacgctg 3705
gtccaccagcaggcgaataatcctgttggatgggttgaacggggggtatgaacatgagctgtctcgggtatcgtcgtatcccactaccgagat 3800
tcaccaacggcagcccggactcggtaatggcgcagcttgcggcagcggcactcagctggtggcaaccagcagcagctgggagcagatccgct 3895
atcagcatttgcatggtttgtgaaaaaccggacatggcaactccagtcgcttcccgttccgctatcggctgaatttggatgagcagtgagat 3990
attgcccagccagcagacgagacggcggcggagacagaacttaatggcccggctaacagcggatttgctggtgacccaatgagcagcagatg 4085
ctcagccagtcggctaccgctctcatgggagaaaaatgaactgttggatgggtctggtcagagacatcaagaaataacggcggaaactatag 4180
ggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacggcttgcgcgagaagatgtgacccggcct 4275
ttacaggcttgaagcggctctgcttaccatcgacaccaccgctggcaccagctgagcggcggagatttaatcggcgggacaatttgcgac 4370
ggcggctgcaagggccagactggaggtggcaaccgcaatcagcaacgactggttggcggcagttgttggcaacgggttgaatgaatcag 4465
ctcggcatcggcgtctcacttttcccggttttccgagaaactggctggctggttaccaccggcgggaaacggctgatgaaagacaccgg 4560
ctactctcgacatcgtataacgttactggtttcaactcaccaccctgaatgactcttccggggcgtatcagccatccggcgaagggt 4655
ttggcctatcagtggtgtcgggactcagcgtctcccttaccgactcctgcataggaagcagcccagtagtaggttggggcgttggac 4750
ccgcccggcaaggatggtgcatgcaaggagatggcggcaaacgctcccggcagggggcctgcccactaccaccggcgaacaaagcgtc 4845
atgagcccgaagtggcagcccagcttccccactcgggtgagtgccggatattaggcggcagcaaccgcaactgtggcggcgtgatggcggc 4940
gatgctcggcgttagaggtcagatctcagcccggaaattaatagactcactataggggaattgtgagcggatcaaatccctctaga 5035
aatattttgttttaacttgaagaggagatatacctgggcaagcagcactatcatcatcaccagcagggcctggtggcggcggcagcagc 5130
ATGCCGGAAGGTGTTATTGAAAGCAACTGGAACGAAATCGTTGACAGCTTCGACGATATGAACTGAGCGAGAGCCTGCTGGTGTTATTACGC 5225
GTATGGCTTTGAAAGCCGAGCGCATCCAGCAACGTCGATCCTGCCGTGCATTAAGGTTACGACGTTATTGCGCAGGCCGAAAGCGGTACCG 5320
GCAAGACCGCGACTTCGCGATCAGCATTCTGACGAAATCGAGCTGGATCTGAAAGCGACCCAGGGCCTGGTGCTGGCGCCGACCCGTGAACTG 5415
GCGCAGCAAAATCAAAAGTGGTTATGGCGCTGGTGACTATATGGTGGCAGCTGCCATCGCTGCATCGGTGGCAACCACTGCTGGCGGAAG 5510
GCAGAACTGCAAAATGGAAGCGCCGCATCATTGTTGGTACCCGGGGCCTGTGTTGCATATGCTGAAACCGTCGTACCTGAGCCCGAAAGTATA 5605
TCAAAATGTTTCTGAGCAGGGCGGATGAAATGCTGAGCCGTGGTTCAAGGACAGATCTACGATATCTTCAAAAAGCTGAAACGCAACACC 5700
CAGGTGGTTCTGCTGAGCGCGACCATGCCGAGCAGCTGCTGAAAGTGAACCAAGAAATTCAGCTGATCCGATCCGATATTCTGGTTAAGAAAGA 5795
GAACTGACCCCTGGAGGCATCCGTGAGTTTACATTAACGTTGAAACGTTGAGGAAATGAAACTGGACACCCTGTGCATCTGTATGAAACCCCTGA 5890
CCATTACCAAGCGGTATCTTCAATTAACCCCGTGGTAAAGTGGACTGGCTGACCGAAAAATGCACGGCCTGATTTTACCGTGAGCGCATG 5985
CACGGTGACATGGATCAGAAAGGAGCGTGACGTTATCATGCTGAATTCGTAAGCGGTAGCAGCCGTGCTGATCACCACCGACTGCTGGCGCG 6080
TGGCATGATGTGACGAAAGTTAGCCTGGTATCAACTACGATCTGCCGACCAACCTGAAACTATATCCACCGTATTGGCCGTGGTGGCCGTT 6175
TTGGTCGTAAGGGCTGCGATTAACTGGTACCGGAGGAAAGCAAACTACCCCTGGTATCGAAACCTTCTATAATACCGCATGAGGAG 6270
ATGCCGCTGAACCTTCCGAGCCTGATTTAACTCGAGCaccaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagccgaaaggaagctgag 6365
tggctgctgcccaccgctgagcaataactagcataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttggctgaaagggaggaactatcc 6460
gat *** 6463
```

Abbildung B. 1: Plasmidsequenz von pET-28a(+)\_eIF4A1(19-406). Das Farbschema entspricht der in Abbildung 11 gezeigten schematischen Illustration von pET-28a(+).

**AS-Sequenz des Vollängen eIF4A1 inkl. His<sub>6</sub>-Tag**

```

      -10      0      10      20      30      40
MGSSHHHHHHH SSGLVPRGSH MSASQDSRSR DNGPDGMEPE GVIESNWN EI VDSFDDMNL S
      50      60      70      80      90      100
ESLLRGIYAY GF EKPSAIQQ RAILPCIKGY DVIAQAQSGT GKTATFAISI LQQIELDLKA
      110     120     130     140     150     160
TQALVLAPTR ELAQIQKV V MALGDYMGAS CHACIGGTNV RAEVQKLQME APHIIVGTPG
      170     180     190     200     210     220
RVFDMLNRRY LSPKYIKMFV LDEADEMLSR GF KDQIYDIF QKLNSNTQVV LLSATMPSDV
      230     240     250     260     270     280
LEVTKKFMRD PIRILVKKEE LTLEGIRQFY INVEREEWKL DTLCDLYETL TITQAVIFIN
      290     300     310     320     340     340
TRRKVDWLTE KMHARDFTVS AMHGDMDQKE RDVIMREFRS GSSRVLITTD LLARGIDVQQ
      350     360     370     380     390     400
VSLVINYDLP TNRENYIHRI GRGGRFGRKG VAINMVTEED KRTL RDIETF YNTSIEEMPL

NVADLI
    
```

**Tabelle B.1:** Mit ExPASy ProtPrm (*Swiss Institute of Bioinformatics, SIB*) berechnete physikochemische Eigenschaften des Vollängen eIF4A1 inkl. His<sub>6</sub>-Tag.

<b>Eigenschaft</b>	
Anzahl der Aminosäuren	426 AS
Molekulargewicht	48,317 kDa
Theoretischer pI	5,89
Anzahl der negativ geladenen Reste (Asp + Glu)	58
Anzahl der positiv geladenen Reste (Arg + Lys)	50
Extinktionskoeffizient (ox.)	34.630 1/M·cm
Extinktionskoeffizient (red.)	34.380 1/M·cm
Instabilitätsindex	48,59 (unstabil)
Aliphatischer Index	90,61



**AS-Sequenz des trunkierten eIF4A1(19-406) inkl. His<sub>6</sub>-Tag**

```

      -10           0           27           37           47           57
MGSSHHHHHHH SSSLVPRGSH MPEGVIESNW NEIVDSFDDM NLSESLLRGI YAYGFEEKPSA

      67           77           87           97           107          117
IQQRAILPCI  KGYDVIAQAQ  SGTGKTATFA  ISILQQIELD  LKATQALVLA  PTRELAQQIQ

      127          137          147          157          167          177
KVVMALGDYM  GASCHACIGG  TNVRAEVQKL  QMEAPHIIVG  TPGRVFDMLN  RRYLSPKYIK

      187          197          207          217          227          237
MFVLDEADEM  LSRGFKDQIY  DIFQKLSNT  QVLLSATMP  SDVLEVTKKF  MRDPirilVK

      247          257          267          277          287          297
KEELTLEGIR  QFYINVEREE  WKLDTLCDLY  ETLTITQAVI  FINTRRKVDW  LTEKMHARDF

      307          317          327          337          347          357
TVSAMHGDM  QKERDVIMRE  FRSGSSRVLI  TTDLLARGID  VQQVSLVINY  DLPTNRENYI

      367          377          387          397
HRIGRGRFG  RKGVAINMVT  EEDKRTLRI  ETFYNTSIEE  MPLNVADLI

```

**Tabelle B.2: Mit ExPASy ProtPrm (Swiss Institute of Bioinformatics, SIB) berechnete physikochemische Eigenschaften des trunkierten eIF4A1 inkl. His<sub>6</sub>-Tag.**

<b>Eigenschaft</b>	
Anzahl der Aminosäuren	409 AS
Molekulargewicht	46,526 kDa
Theoretischer pI	6,09
Anzahl der negativ geladenen Reste (Asp + Glu)	54
Anzahl der positiv geladenen Reste (Arg + Lys)	48
Extinktionskoeffizient (ox.)	34.630 1/M·cm
Extinktionskoeffizient (red.)	34.380 1/M·cm
Instabilitätsindex	46,85 (unstabil)
Aliphatischer Index	94,13

## AS-Sequenz des trunkierten eIF4A1(19-406) nach His<sub>6</sub>-Tag-Abspaltung

```

      24      34      44      54      64      74
GSHMPEGVIE SNWNEIVDSF DDMNLSESLI RGIYAYGF EK PS AIQQRAIL PCIKGYDVIA

      84      94     104     114     124     134
QAQSGTGKTA TFAISILQOI ELDL KATQAL VLAPTRELAQ QIQKVVMALG DYM GASCHAC

     144     154     164     174     184     194
IGGTNVRAEV QKLQMEAPHI IVGTPGRVFD MLNRRYLSPK YIKMFVLDEA DEMLSRGFKD

     204     214     224     234     244     254
QIYDIFQKLN SNTQVLLLSA TMPSDVLEVT KKFMRDPIRI LVKKEELTLE GIRQFYINVE

     264     274     284     294     304     314
REEWKLD TLC DLYETLTITQ AVIFINTRRK VD WLTEKMHA R DFTVSAMHG DMDQKERDVI

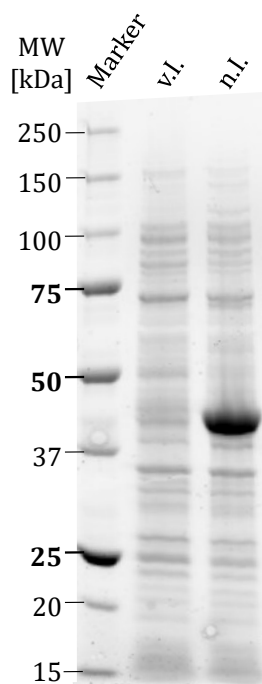
     324     334     344     354     364     374
MREFRSGSSR VLITDDLAR GIDVQQVSLV INYDLPTNRE NYIHRIGRGG RFGRKGVA IN

     384     394     404
MVTEEDKRTL RDIETFYNTS IEEMPLNVAD LI
    
```

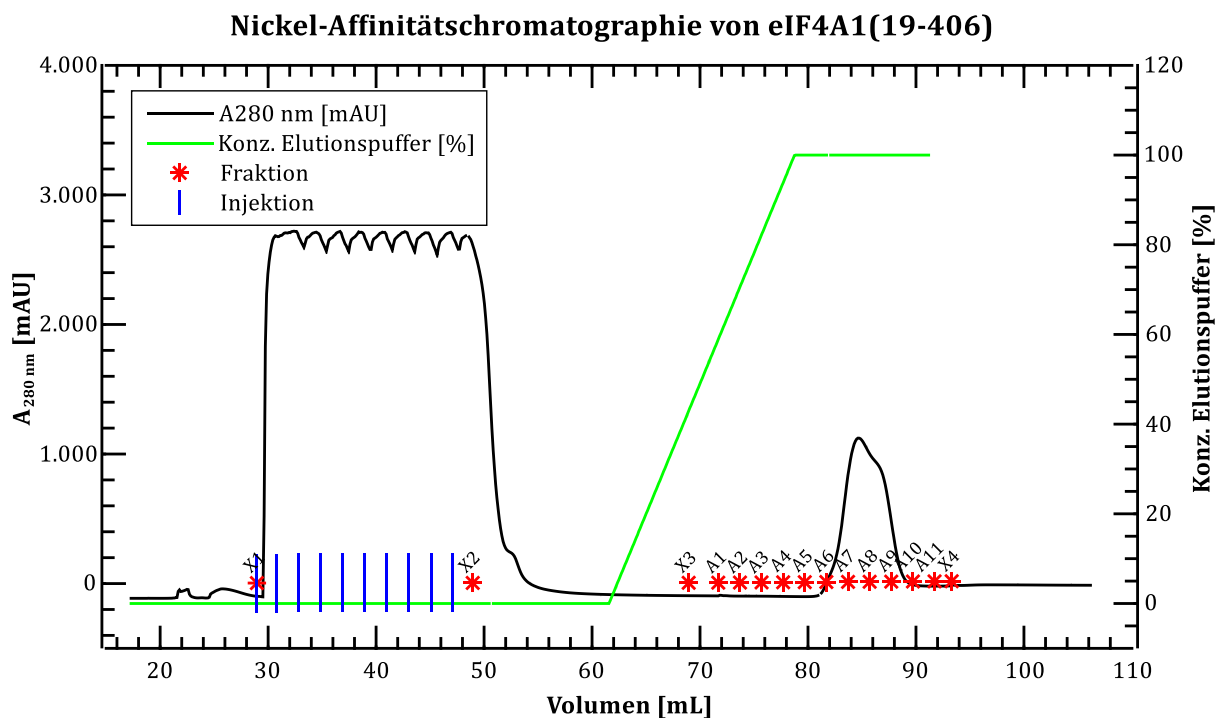
**Tabelle B.3:** Mit ExPASy ProtPrm (*Swiss Institute of Bioinformatics, SIB*) berechnete physikochemische Eigenschaften des trunkierten eIF4A1 nach His<sub>6</sub>-Tag-Abspaltung.

<b>Eigenschaft</b>	
Anzahl der Aminosäuren	392 AS
Molekulargewicht	44,644 kDa
Theoretischer pI	5,58
Anzahl der negativ geladenen Reste (Asp + Glu)	54
Anzahl der positiv geladenen Reste (Arg + Lys)	47
Extinktionskoeffizient (ox.)	34.630 1/M·cm
Extinktionskoeffizient (red.)	34.380 1/M·cm
Instabilitätsindex	47,38 (unstabil)
Aliphatischer Index	96,48

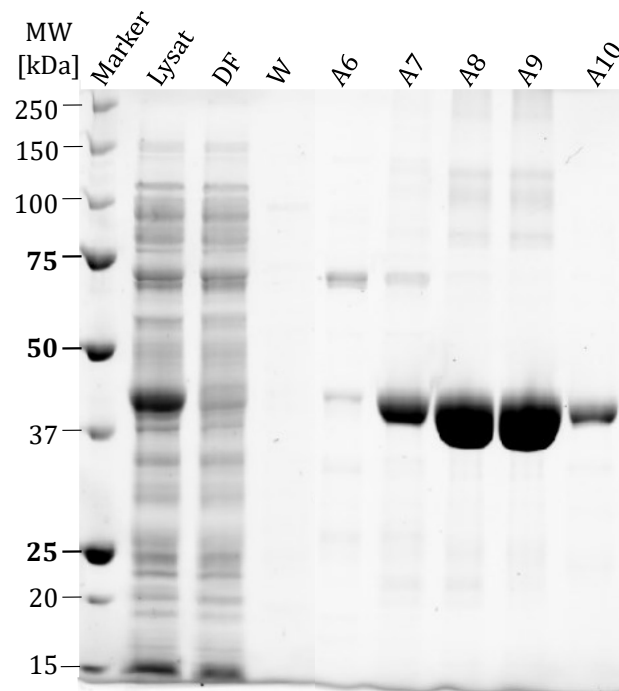
## TGX-Gelbilder und Chromatogramme



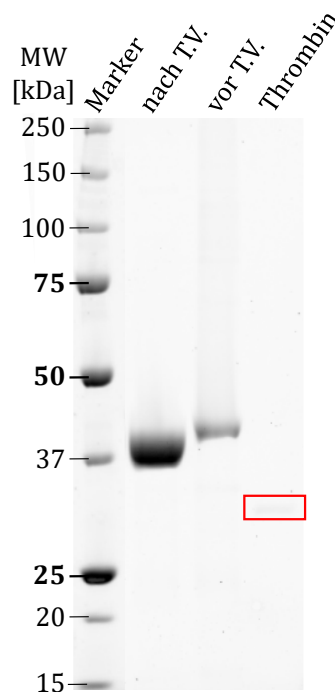
**Abbildung B.2:** TGX-Gel der Überexpression von humanem eIF4A1(19-406) in *E. coli* BL21(DE3). Von links: Marker: PreScission Plus Protein™ Unstained Protein Standard (Bio-Rad), v.l.: vor Induktion, n.l.: nach Induktion mit 0,5 mM IPTG.



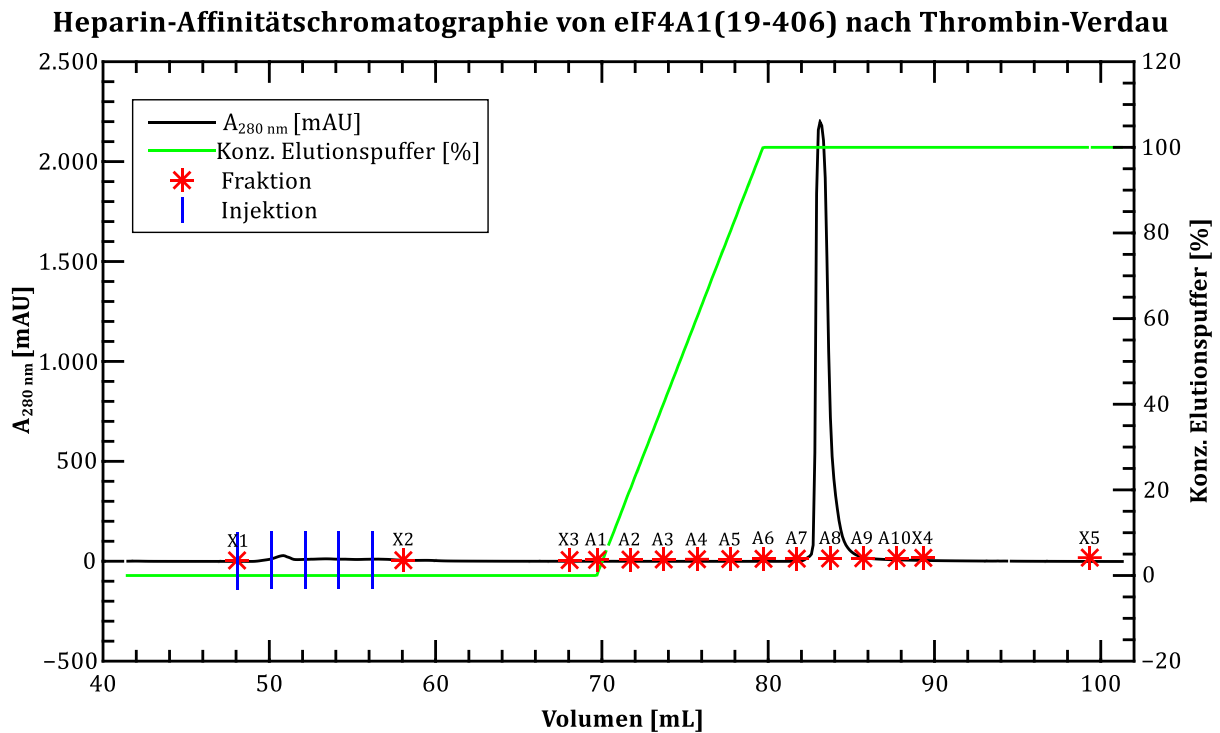
**Abbildung B.3:** Elutionsprofil der Nickel-Affinitätschromatographie von eIF4A1(19-406) nach Zellaufschluss. Die Beladung der HisTrap™ HP-Säule mit dem Lysat erfolgte mit einem 2 mL Loop (10 x 2 mL Injektion), X1 entspricht dem Durchfluss (DF), X2 - X3 sind Waschfraktionen (W) und A1 - A11 sind Elutionsfraktionen.



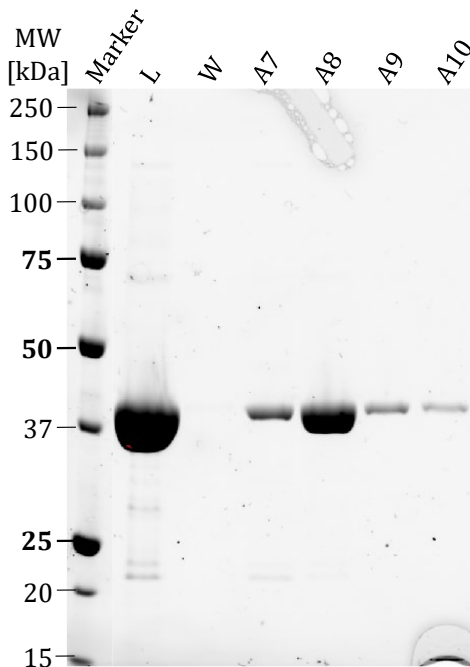
**Abbildung B.4: TGX-Gel der Nickel-Affinitätschromatographie von eIF4A1(19-406) mit der HisTrap™ HP 1 mL oder 5 mL Säule (GE Healthcare).** Von links: Marker: PreScission Plus Protein™ Unstained Protein Standard (Bio-Rad), Lysat: Lysat nach Zellaufschluss mit dem Ultraschall-Homogenisierer Sonifier 250 (Branson), DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, A6 – A10: Elutionsfraktionen.



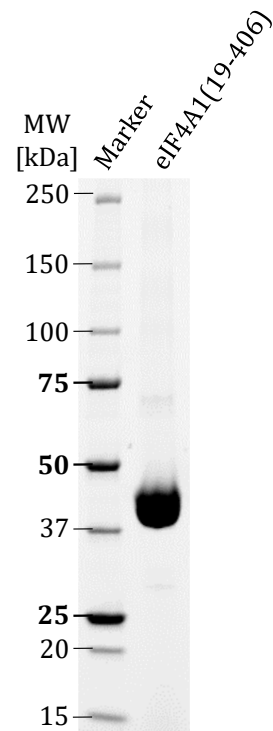
**Abbildung B.5: TGX-Gel des Thrombin-Verdau von eIF4A1(19-406).** Von links: Marker: PreScission Plus Protein™ Unstained Protein Standard (Bio-Rad), nach T.V.: eIF4A1(19-406)-ΔHis<sub>6</sub>-Tag nach Thrombin-Verdau, vor T.V.: eIF4A1(19-406)+His<sub>6</sub>-Tag vor Thrombin-Verdau, Thrombin: Thrombin-Kontrolle (0,25 U Thrombin).



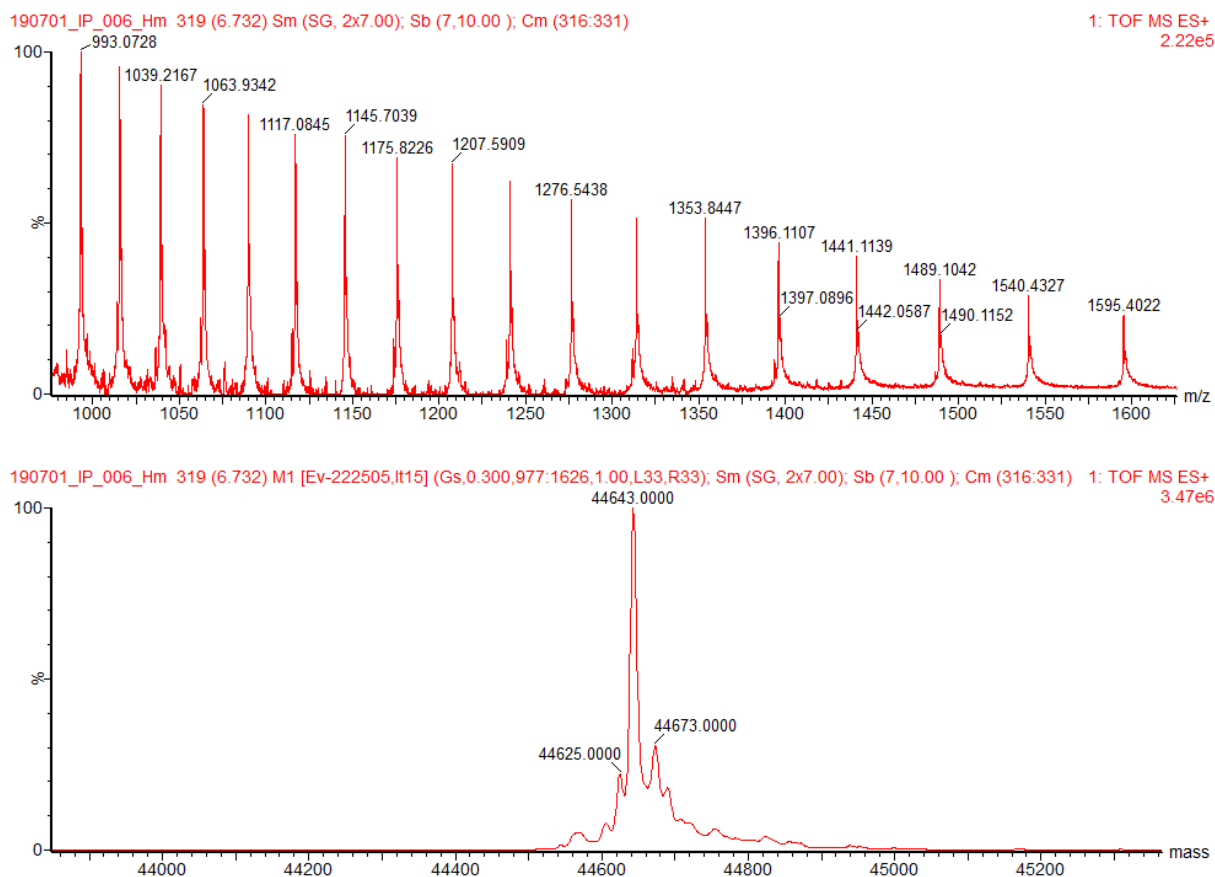
**Abbildung B.6: Elutionsprofil der Heparin-Affinitätschromatographie von eIF4A1(19-406) nach Thrombin-Verdau.** Die Beladung der HiTrap™ Heparin HP-Säule mit der Ladefraktion erfolgte mit einem 2 mL Loop (5 x 2 mL Injektion), X1 entspricht dem Durchfluss (DF), X2 - X3 sind Waschfraktionen (W) und A1 - A10 sind Elutionsfraktionen.



**Abbildung B.7: TGX-Gel der Heparin-Affinitätschromatographie von eIF4A1(19-406) mit der HiTrap™ Heparin HP 1 mL oder 5 mL Säule (GE Healthcare) nach His<sub>6</sub>-Tag-Abspaltung durch Thrombin.** Von links: Marker: PreScission Plus Protein™ Unstained Protein Standard (Bio-Rad), L: Ladefraktion, W: Waschfraktion, A7 - A10: Elutionsfraktionen.



**Abbildung B.8: TGX-Gel zur Reinheitsbestimmung von eIF4A1(19-406) nach Aufreinigung und Ankonzentrieren final in Storage-Puffer.** Von links: Marker: PreScission Plus Protein™ Unstained Protein Standard (*Bio-Rad*), eIF4A1(19-406); aufgereinigtes eIF4A1(19-406) final nach Ankonzentrieren in Storage-Puffer.



**Abbildung B.9: Massenspektrometrische Analyse von humanem eIF4A1(19-406) nach Aufreinigung und Thrombin-Verdau des His<sub>6</sub>-Tags zur Bestimmung der intakten Proteinmasse und als Qualitätskontrolle.** Oben: ESI-Spektrum von eIF4A1(19-406) nach Thrombin-Verdau, final; unten: Dekonvolviertes ESI-Spektrum von eIF4A1(19-406) nach Thrombin-Verdau, final. Die theoretische Masse von eIF4A1(19-406) nach Abspaltung des His<sub>6</sub>-Tags beträgt 44.644 Da, mit His<sub>6</sub>-Tag sollte das Molekulargewicht 46.526 Da betragen. Die massenspektrometrisch bestimmte Masse der analysierten Proteinprobe beträgt 44.643 Da, was somit eIF4A1(19-406) ohne His<sub>6</sub>-Tag zuzuweisen ist. Der Thrombin-Verdau kann also als erfolgreich angesehen werden.





## Anhang C: Thermal-Shift-Assay

**Tabelle C.1: Auswirkungen von RNA-Zugabe auf die Schmelztemperaturen  $T_m$  von eIF4A1(19-406) mit verschiedenen Liganden.** Tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  sowie Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$ .

Ligand	RNA	$T_m$ [° C]	$\Delta T_m$ [° C]	SEM [° C]
Ohne Ligand	-	51,11	1,62	$\pm 0,01$
	+	51,25	1,76	$\pm 0,02$
DMSO	-	49,49	-	$\pm 0,08$
	+	49,49	-	$\pm 0,13$
Silvestrol	-	49,09	-0,40	-
	+	63,34	13,85	$\pm 0,25$
CR-31-B (-)	-	49,12	-0,37	$\pm 0,05$
	+	62,68	13,19	$\pm 1,46$
CR-31-B (+)	-	49,58	0,09	$\pm 0,08$
	+	50,33	0,84	$\pm 0,15$

**Tabelle C.2: Auswirkungen von AMP-PNP-Zugabe auf die Schmelztemperaturen  $T_m$  von eIF4A1(19-406) mit verschiedenen Liganden.** Tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  von eIF4A1(19-406) bei Zugabe des ATP-Analogs AMP-PNP sowie Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$ .

Ligand	RNA	$T_m$ [° C]	$\Delta T_m$ [° C]	SEM [° C]
Ohne Ligand	-	50,97	1,48	$\pm 0,05$
	+	50,57	1,08	$\pm 0,39$
DMSO	-	49,49	-	$\pm 0,03$
	+	49,49	-	$\pm 0,05$
Silvestrol	-	49,85	0,36	$\pm 0,52$
	+	58,47	8,98	$\pm 0,44$
CR-31-B (-)	-	50,11	0,62	$\pm 0,19$
	+	57,82	8,33	$\pm 0,19$
CR-31-B (+)	-	49,75	0,26	$\pm 0,02$
	+	49,36	-0,13	$\pm 0,09$

**Tabelle C.3: Effekt verschiedener RNA-Substrate auf die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A1(19-406) mit verschiedenen Liganden unter AMP-PNP-Zugabe.** Tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  von eIF4A1(19-406)+AMP-PNP unter Zugabe verschiedener RNA-Substrate sowie Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit der Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 5$ . Ergänzend zum Kapitel 4.1 sind hier außerdem die Schmelztemperaturen von eIF4A1(19-406) mit den Liganden HGW-0 und HGW-3 gelistet.

Ligand	RNA	$T_m$ [° C]	$\Delta T_m$ [° C]	SEM [° C]
Ohne Ligand	(AG) <sub>5</sub>	51,21	0,68	-
	HEVgt3c	47,43	-3,10	-
	HEVgt3c-Purin	49,36	-1,17	-
DMSO	(AG) <sub>5</sub>	50,53	-	$\pm 0,06$
	HEVgt3c	46,73	-3,80	$\pm 0,27$
	HEVgt3c-Purin	48,51	-2,02	$\pm 0,31$

Silvestrol	(AG) <sub>5</sub>	58,82	8,30	± 0,64
	HEVgt3c	48,64	-1,88	± 0,17
	HEVgt3c-Purin	53,67	3,14	± 0,15
CR-31-B (-)	(AG) <sub>5</sub>	58,61	8,08	± 0,32
	HEVgt3c	49,09	-1,44	± 1,33
	HEVgt3c-Purin	55,68	5,15	± 0,82
HGW-0	(AG) <sub>5</sub>	53,15	2,63	± 0,38
	HEVgt3c	47,39	-3,14	± 0,11
	HEVgt3c-Purin	50,63	0,10	± 0,10
HGW-3	(AG) <sub>5</sub>	58,30	7,77	± 0,34
	HEVgt3c	48,23	-2,30	± 0,05
	HEVgt3c-Purin	54,18	3,65	± 0,05

**Tabelle C.4: Einfluss von einzelsträngiger DNA (ssDNA) auf die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A1(19-406) in Gegenwart von AMP-PNP und Silvestrol.** Tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  von eIF4A1(19-406) in Gegenwart von AMP-PNP und Silvestrol unter Zugabe von Polypurin-RNA im Vergleich zu Polypurin-ssDNA ((AG)<sub>15</sub>) und ssRNA mit einer (AC)<sub>15</sub>-Sequenz sowie Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$ .

Ligand	RNA/DNA	$T_m$ [° C]	$\Delta T_m$ [° C]	SEM [° C]
Silvestrol	-	47,62	-	± 0,07
	RNA: (AG) <sub>5</sub>	56,29	8,67	± 0,25
	ssDNA: (AG) <sub>15</sub>	49,27	1,65	± 0,61
	ssDNA: (AC) <sub>15</sub>	48,66	1,04	± 0,56

**Tabelle C.5: Einfluss verschiedener Rocaglate auf die Schmelztemperatur  $T_m$  von eIF4A1(19-406) mit Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> und AMP-PNP.** Tabellarische Auflistung der Schmelztemperaturen  $T_m$  von eIF4A1(19-406) mit Polypurin-RNA (AG)<sub>5</sub> und AMP-PNP unter Zugabe verschiedener Rocaglate sowie Änderung der Schmelztemperatur  $\Delta T_m$  gegenüber der DMSO-Kontrolle mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) für  $n \geq 3$ .

Ligand	RNA	$T_m$ [° C]	$\Delta T_m$ [° C]	SEM [° C]
DMSO	(AG) <sub>5</sub>	48,80	-	± 0,06
Silvestrol	(AG) <sub>5</sub>	57,48	8,68	± 0,54
CR-31-B (-)	(AG) <sub>5</sub>	57,52	8,72	± 0,02
CR-31-B (rac)	(AG) <sub>5</sub>	57,25	8,45	± 0,07
HGW-3	(AG) <sub>5</sub>	55,44	6,64	± 0,12
HGW-0	(AG) <sub>5</sub>	51,49	2,69	± 0,27
HGW-8	(AG) <sub>5</sub>	51,29	2,49	± 0,91
HGW-9	(AG) <sub>5</sub>	49,07	0,27	± 0,31
HGW-4	(AG) <sub>5</sub>	51,07	2,27	± 0,21

## Anhang D: HDX-MS

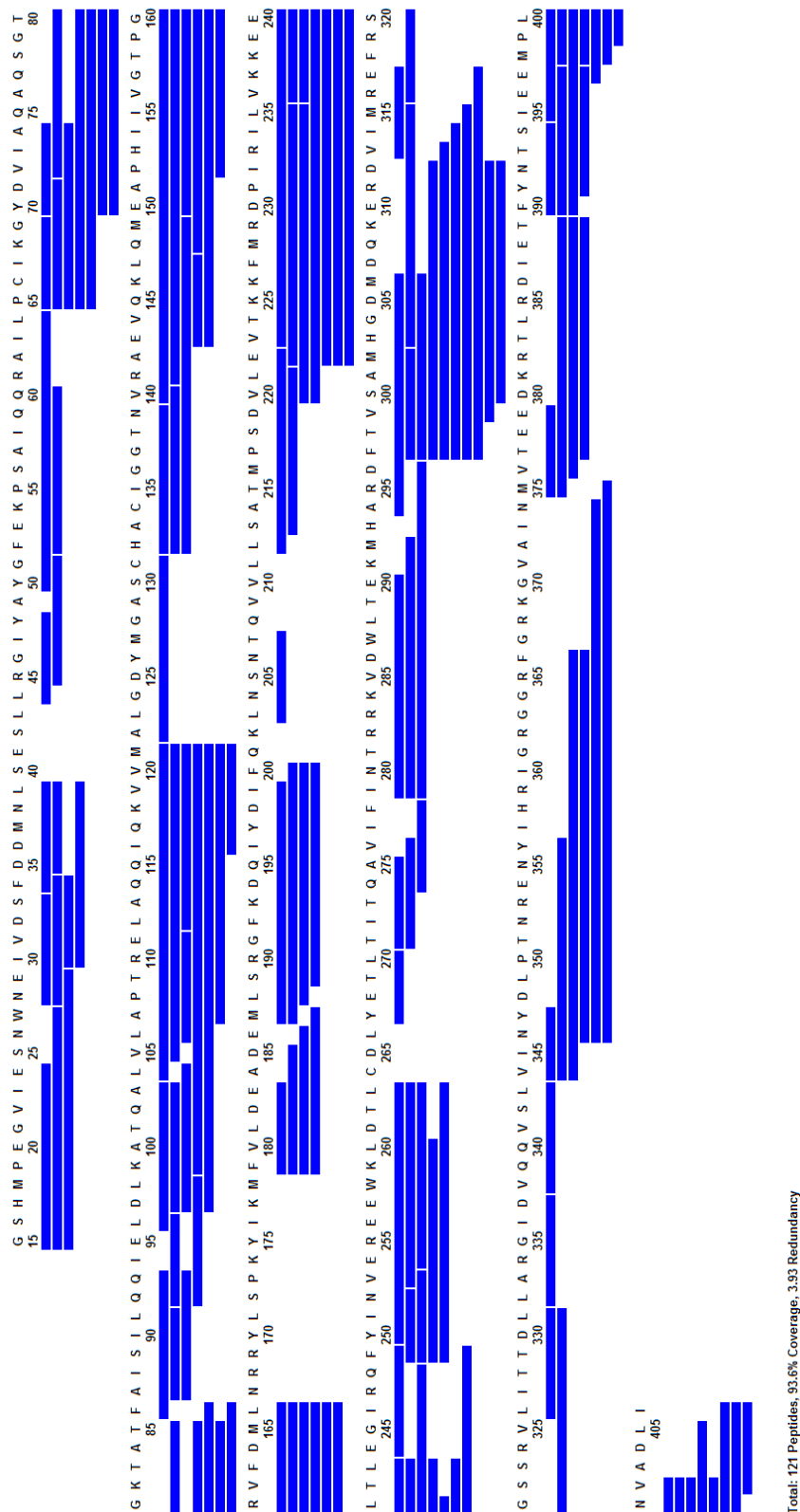
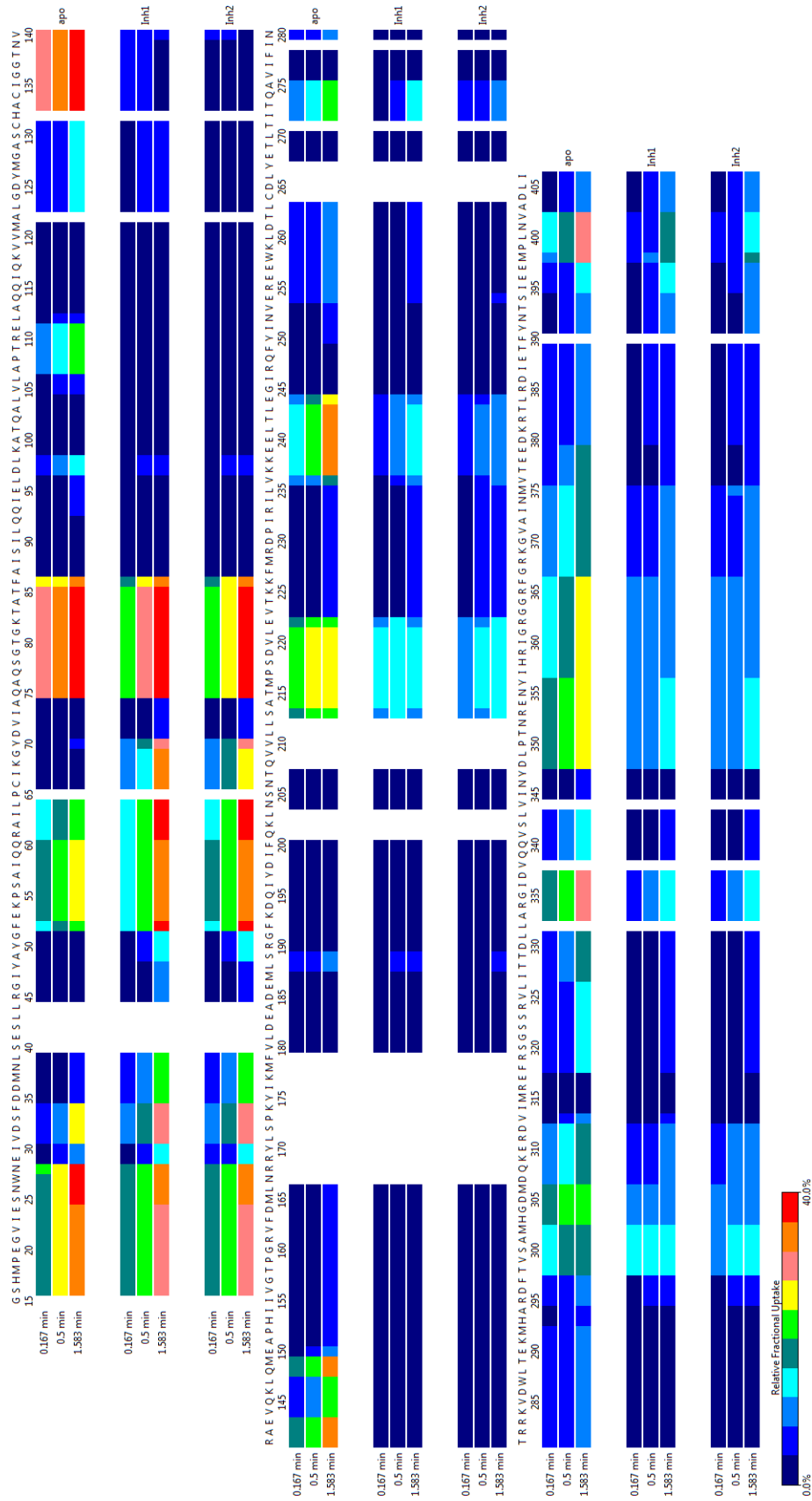
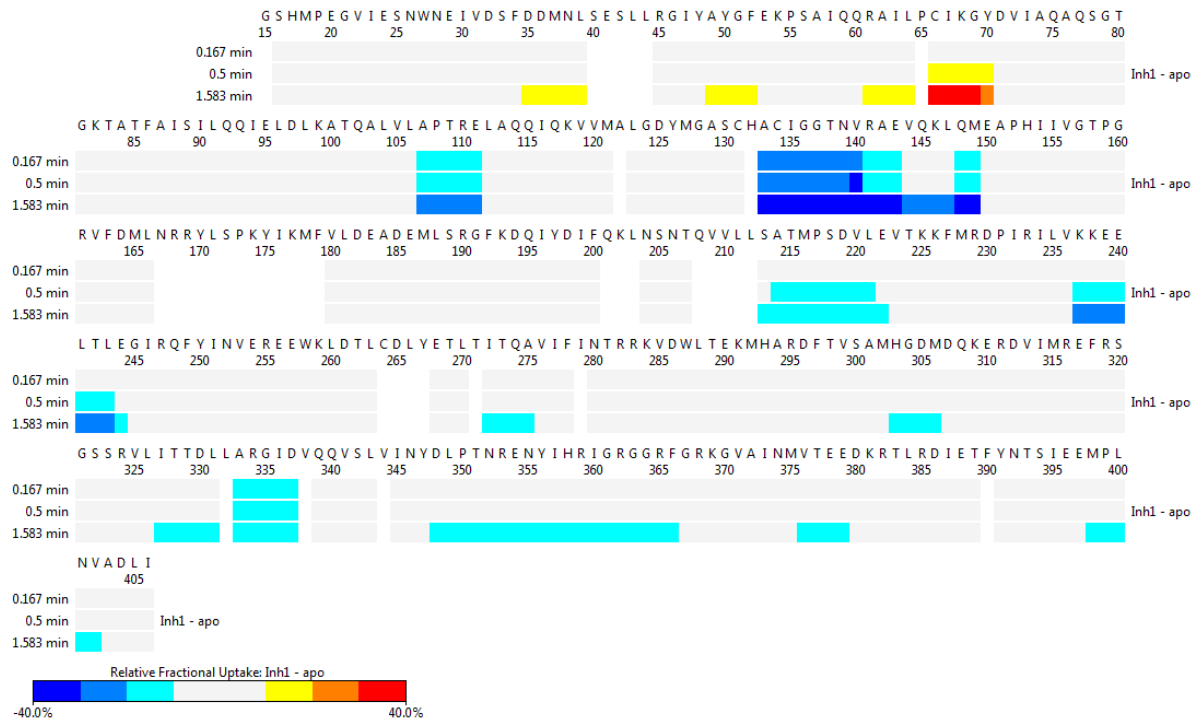


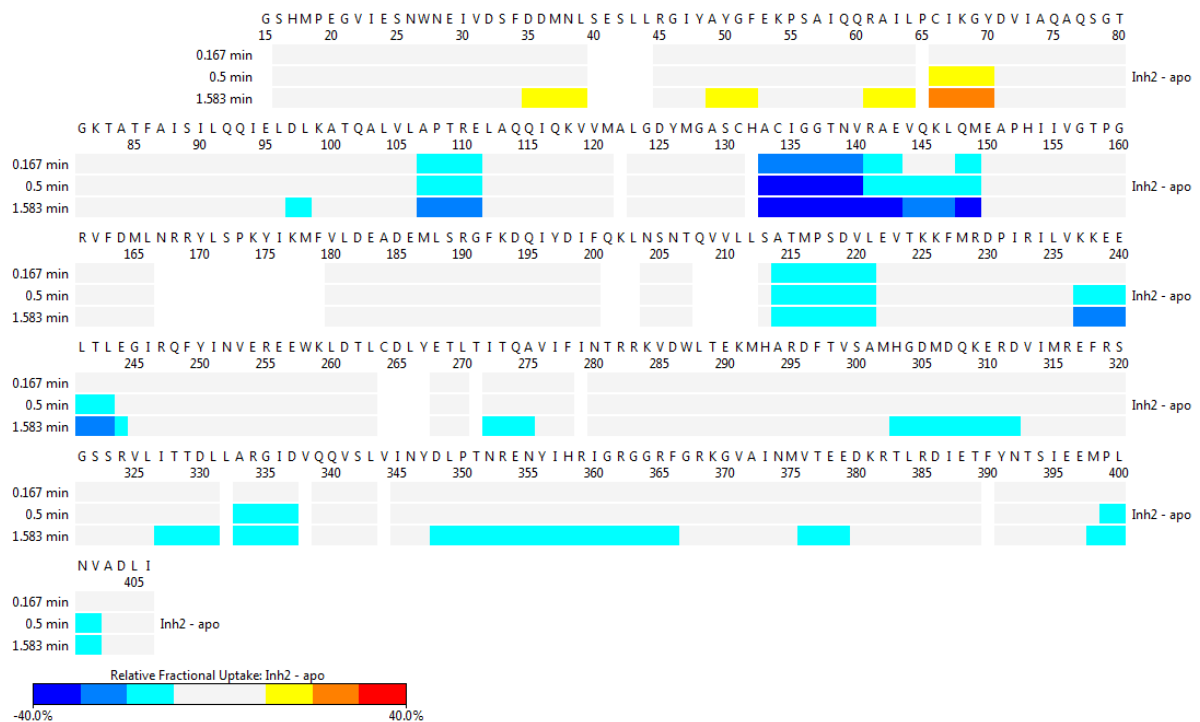
Abbildung D.1: Peptidkartierung (*Peptide coverage map*) der Aminosäuresequenz von eIF4A1(19-406). Die blauen Balken repräsentieren jeweils eine Peptidsequenz von eIF4A, die hinsichtlich ihrer Inkorporation von Deuterium untersucht wurde.



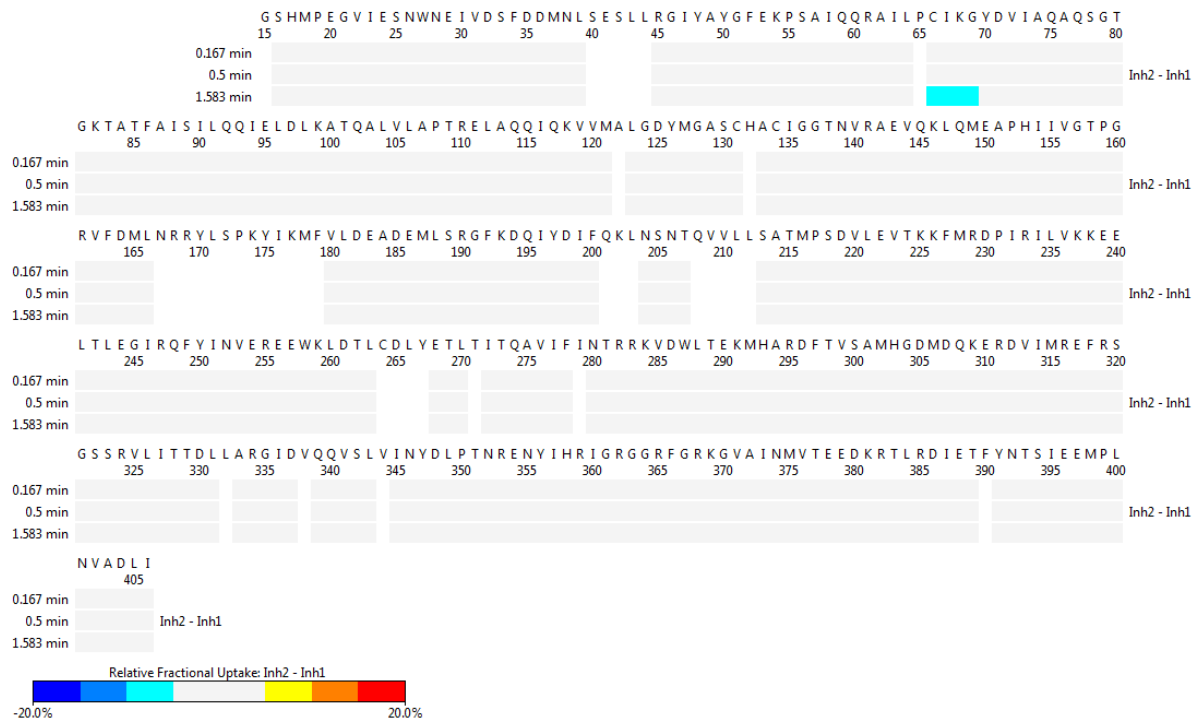
**Abbildung D.2: Relative Deuterium-Aufnahme von eIF4A zu verschiedenen Zeitpunkten.** Blau: 0 % D-Inkorporation, Rot: 40 % D-Inkorporation. Da die Auswertung nur bis zum Zeitpunkt  $t = 95$  s möglich war, fällt der H/D-Austausch generell gering aus.



**Abbildung D.3: Unterschiede in der Deuterium-Aufnahme zwischen Silvestrol und der DMSO-Kontrolle.** Blau: Bereiche mit geringerem H/D-Austausch in Anwesenheit von Silvestrol, Rot: Bereiche mit höherem H/D-Austausch in Anwesenheit von Silvestrol.



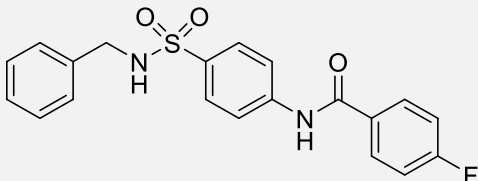
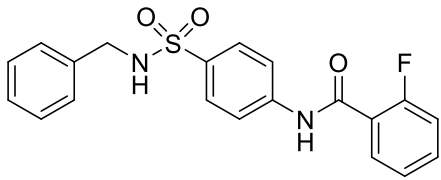
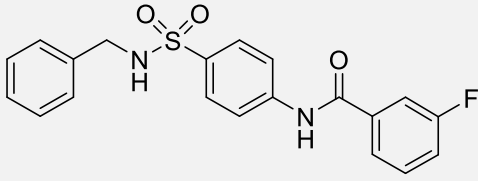
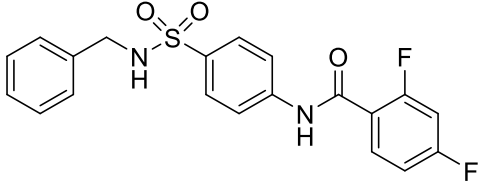
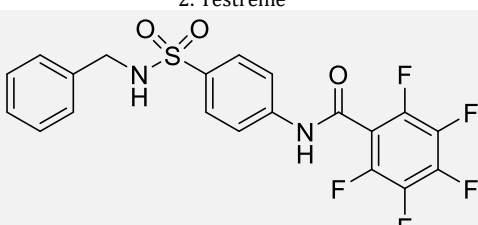
**Abbildung D.4: Unterschiede in der Deuterium-Aufnahme zwischen CR-31-B (-) und der DMSO-Kontrolle.** Blau: Bereiche mit geringerem H/D-Austausch in Anwesenheit von CR-31-B (-), Rot: Bereiche mit höherem H/D-Austausch in Anwesenheit von CR-31-B (-).

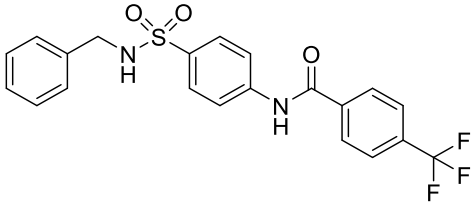
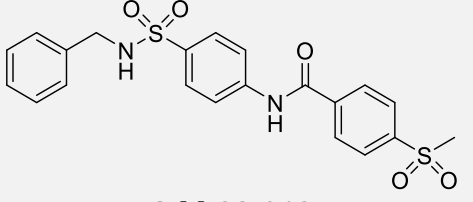
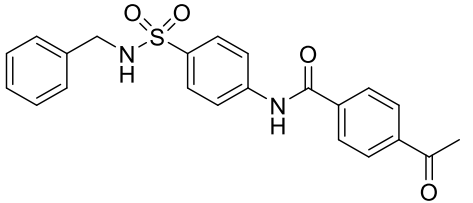
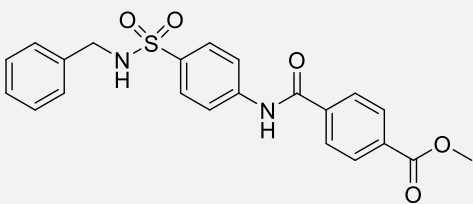
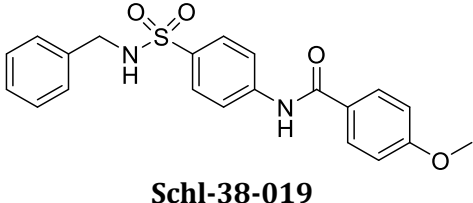
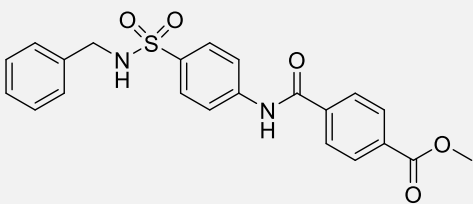
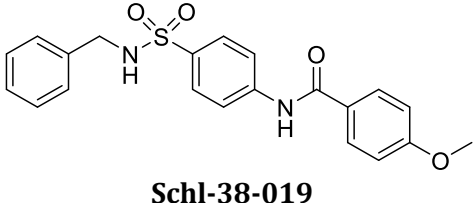
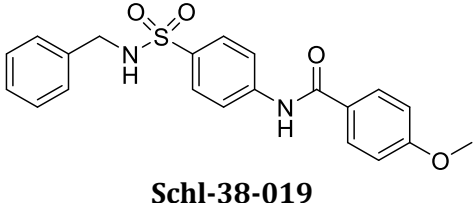


**Abbildung D.5: Unterschiede in der Deuterium-Aufnahme zwischen CR-31-B (-) und Silvestrol.** Blau: Bereiche mit geringerem H/D-Austausch in Anwesenheit von CR-31-B (-), Rot: Bereiche mit höherem H/D-Austausch in Anwesenheit von CR-31-B (-). Die beiden eIF4A-Inhibitoren Silvestrol und CR-31-B (-) zeigen das gleiche H/D-Austauschmuster.

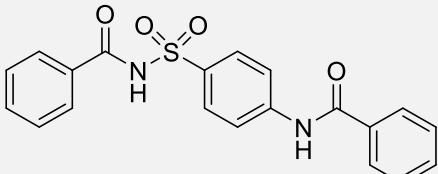
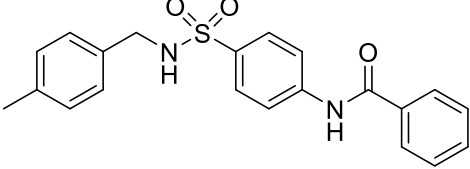
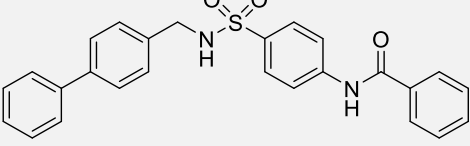
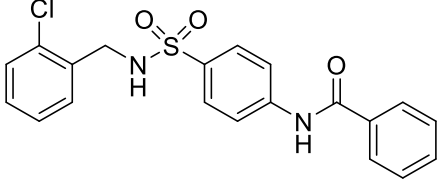
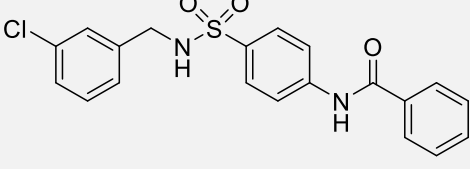
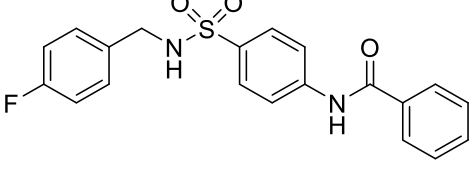
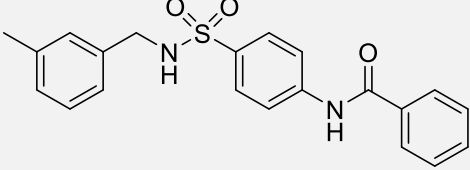
## Anhang E: Screening neuer eIF4A-Inhibitoren

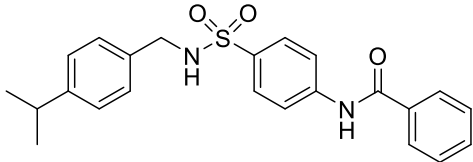
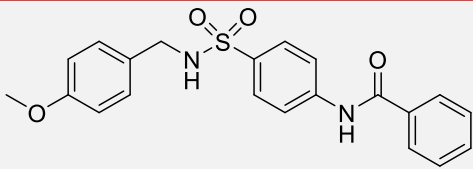
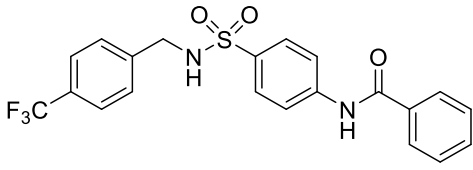
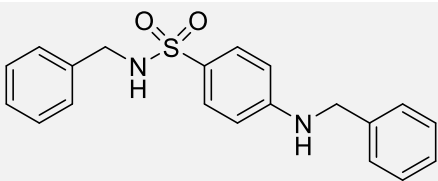
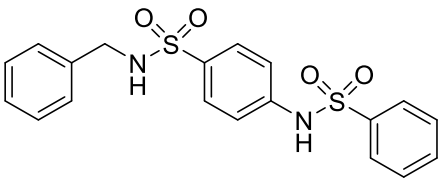
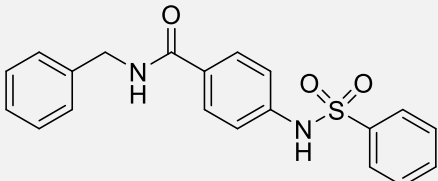
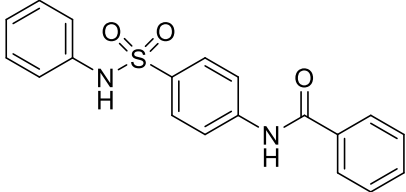
Tabelle E.1: Modifikationen der linearen Sulfonamide sowie deren Effekt auf die Proliferation (WST-1-Assay), auf die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin und PIM1 oder (AG)<sub>15</sub> (DLA) sowie ggf. auf die Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes (TSA). (n.l.: nicht löslich)

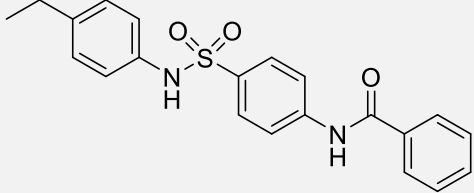
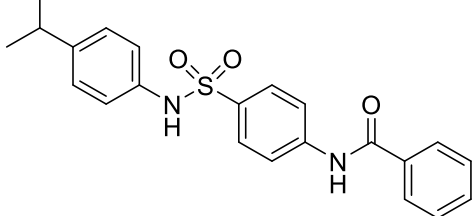
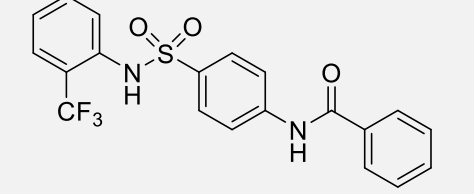
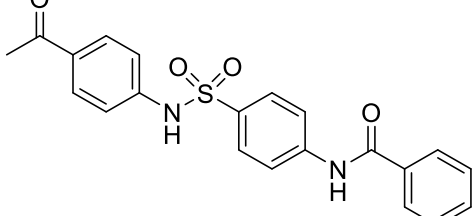
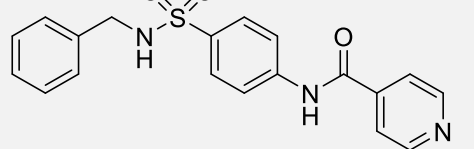
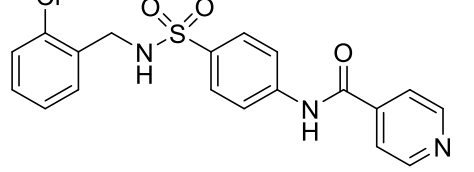
Lineare Sulfonamide	WST-1-Assay:	DLA: $\beta$ -Globin	DLA: PIM1/(AG) <sub>15</sub>	TSA $\Delta T_m$ [°C]
 <p><b>Schl-38-004</b> <b>PP-01-025</b> 2. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-	
	10 $\mu$ M: (0,52 $\pm$ 0,07)	-	-	
	1 $\mu$ M: (0,84 $\pm$ 0,15)	-	-	
	100 nM: (0,96 $\pm$ 0,15)	100 nM: (0,76 $\pm$ 0,04)	100 nM: (0,99 $\pm$ 0,07)	
 <p><b>Schl-38-006</b> <b>PP-01-035</b> 2. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-	
	10 $\mu$ M: (1,08 $\pm$ 0,05)	10 $\mu$ M: (0,30 $\pm$ 0,02)	10 $\mu$ M: (0,22 $\pm$ 0,01)	
 <p><b>Schl-38-008</b> <b>PP-01-053</b> 2. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-	
	10 $\mu$ M: (0,80 $\pm$ 0,01)	-	-	
	1 $\mu$ M: (0,89 $\pm$ 0,04)	-	-	
	100 nM: (0,91 $\pm$ 0,04)	100 nM: (0,72 $\pm$ 0,06)	100 nM: (1,03 $\pm$ 0,07)	
 <p><b>Schl-38-005</b> <b>PP-01-027</b> 2. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-	
	10 $\mu$ M: (1,14 $\pm$ 0,11)	10 $\mu$ M: (0,45 $\pm$ 0,03)	10 $\mu$ M: (0,32 $\pm$ 0,03)	
 <p><b>PP-03-113</b> 4. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,32 $\pm$ 0,06)	100 $\mu$ M: (0,56 $\pm$ 0,01)	100 $\mu$ M: (0,72 $\pm$ 0,02)	

 <p><b>Schl-38-009</b> <b>PP-01-055</b> 2. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (0,91±0,01)	10 µM: (0,49±0,05)	10 µM: (0,39±0,05)	
 <p><b>Schl-38-013</b> <b>PP-01-119</b> 2. Testreihe</p>	100 µM: (0,88±0,07)	-	-	
	10 µM: (0,93±0,03)	-	-	
 <p><b>Schl-38-014</b> <b>PP-01-135</b> 2. Testreihe</p>	100 µM: (0,65±0,05)			
	10 µM: (0,59±0,03)			
 <p><b>Schl-38-015</b> <b>PP-01-127</b> 2. Testreihe</p>	1 µM: (0,59±0,03)	tox.	tox.	1,18 (±0,08)
	100 nM: (0,59±0,03)			
 <p><b>Schl-38-019</b> <b>PP-01-031</b> 3. Testreihe</p>	10 nM: (0,58±0,01)			
	100 µM: (0,30±0,01)			
 <p><b>Schl-38-015</b> <b>PP-01-127</b> 2. Testreihe</p>	10 µM: (0,88±0,08)			
	1 µM: (0,78±0,02)	tox.	tox.	0,95 (±0,48)
 <p><b>Schl-38-019</b> <b>PP-01-031</b> 3. Testreihe</p>	100 nM: (0,733±0,02 )			
	10 nM: (0,70±0,03)			
 <p><b>Schl-38-019</b> <b>PP-01-031</b> 3. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (0,93±0,01)	10 µM: (0,55±0,04)	10 µM: (0,41±0,03)	1,78 (±0,35)

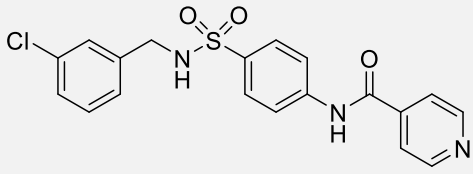
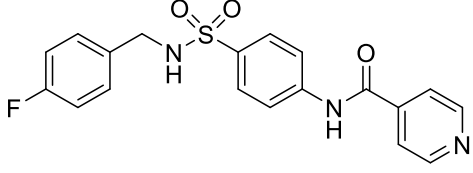
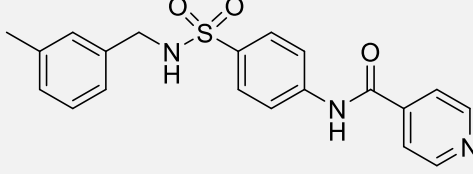
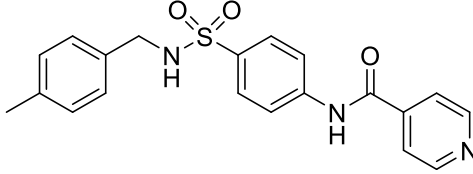
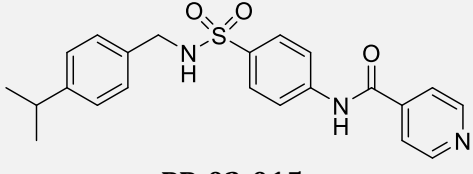
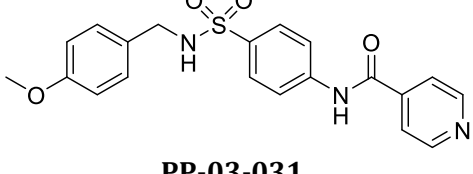
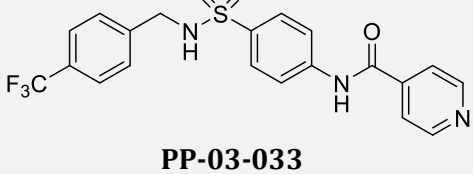


 <b>Schl-38-017</b> <b>PP-01-159</b> 2. Testreihe	100 µM: n.l.  10 µM: (0,87±0,01)  1 µM: (0,97±0,05)	-  -  1 µM: (0,93±0,02)	-  -  1 µM: (1,12±0,07)
 <b>PP-03-087</b> 4. Testreihe	100 µM: n.l.  10 µM: n.l.  1 µM: (1,20±0,07)	-  -  1 µM: (1,15±0,02)	-  -  1 µM: (1,30±0,10)
 <b>PP-03-089</b> 4. Testreihe	100 µM: (1,41±0,03)	100 µM: (0,94±0,01)	100 µM: (1,28±0,07)
 <b>PP-03-117</b> 5. Testreihe	100 µM: n.l.  10 µM: (1,08±0,01)	-  10 µM: (0,26±0,03)	-  10 µM: (0,34±0,08)
 <b>PP-03-129</b> 4. Testreihe	100 µM: n.l.  10 µM: (1,23±0,05)	-  10 µM: (0,26±0,03)	-  10 µM: (0,29±0,03)
 <b>PP-03-137</b> 4. Testreihe	100 µM: n.l.  10 µM: n.l.  1 µM: (1,18±0,13)	-  -  1 µM: (0,63±0,02)	-  -  1 µM: (0,64±0,02)
 <b>PP-03-143</b> 4. Testreihe	100 µM: n.l.  10 µM: (1,34±0,12)	-  10 µM: (0,79±0,01)	-  10 µM: (0,72±0,22)

 <p><b>PP-03-145</b> 4. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (1,44±0,03)	10 µM: (1,45±0,18)	10 µM: (1,36±0,57)	
 <p><b>PP-03-147</b> 5. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	2,87 (±1,04)
	10 µM: (0,89±0,06)	10 µM: (0,98±0,04)	10 µM: (0,75±0,11)	
 <p><b>PP-03-149</b> 4. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (1,32±0,11)	10 µM: (1,24±0,11)	10 µM: (1,31±0,05)	
 <p><b>Schl-38-011</b> <b>PP-01-085</b> 2. Testreihe</p>	100 µM: (0,16±0,02)	-	-	
	10 µM: (0,96±0,08)	10 µM: (0,39±0,04)	10 µM: (0,31±0,03)	
 <p><b>Schl-38-010</b> <b>PP-01-067</b> 2. Testreihe</p>	100 µM: (0,30±0,02)	-	-	0,49 (±0,03)
	10 µM: (0,96±0,02)	10 µM: (0,38±0,03=)	10 µM: (0,29±0,02)	
 <p><b>Schl-38-007</b> <b>PP-01-039</b> 2. Testreihe</p>	100 µM: (0,82±0,09)	-	-	
	10 µM: (0,87±0,01)	-	-	
	1 µM: (0,98±0,06)	1 µM: (0,86±0,08)	1 µM: (1,18±0,05)	
 <p><b>PP-03-125</b> 4. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (1,27±0,08)	10 µM: (0,41±0,07)	10 µM: (0,58±0,15)	

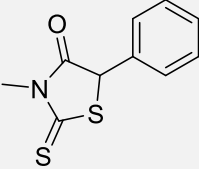
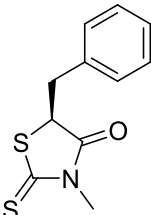
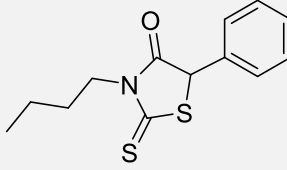
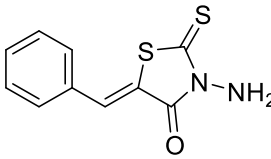
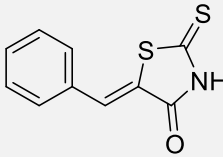
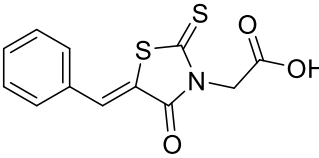
 <p><b>PP-03-135</b> 5. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	0,85 (±0,03)
	10 µM: (1,00±0,05)	10 µM: (0,97±0,07)	10 µM: (0,85±0,28)	
 <p><b>PP-03-139</b> 4. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: n.l.	-	-	
	1 µM: (1,27±0,10)	1 µM: (1,28±0,03)	1 µM: (1,36±0,07)	
 <p><b>PP-04-019</b> 5. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	1,15 (±0,06)
	10 µM: (0,88±0,03)	10 µM: (0,81±0,23)	10 µM: (0,54±0,13)	
 <p><b>PP-03-157</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: (0,12±0,02)	-	-	
	10 µM: (0,64±0,03)	-	-	
	1 µM: (1,19±0,05)	1 µM: (1,76±0,13)	1 µM: (1,96±0,14)	
 <p><b>Schl-38-012</b> <b>PP-01-117</b> 2. Testreihe</p>	100 µM: (0,52±0,02)	-	-	
	10 µM: (0,63±0,01)	-	-	
	1 µM: (1,08±0,08)	1 µM: (0,34±0,03)	1 µM: (0,38±0,05)	
 <p><b>PP-03-007</b> 4. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: n.l.	-	-	
	1 µM: (1,33±0,06)	1 µM: (0,50±0,01)	1 µM: (0,53±0,03)	

## Anhang E: Screening neuer eIF4A-Inhibitoren

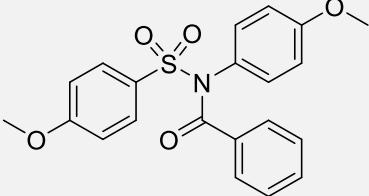
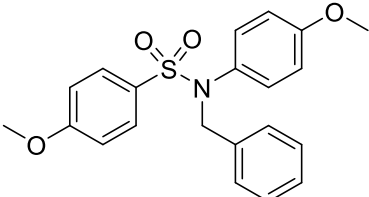
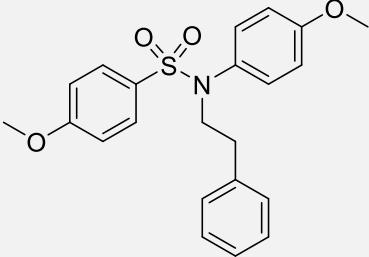
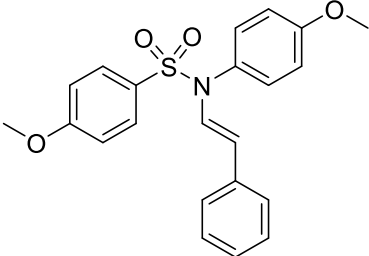
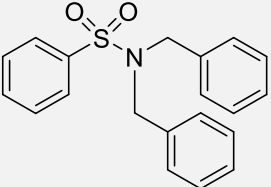
 <p><b>PP-03-013</b> 4. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-
	10 $\mu$ M: n.l.	-	-
	1 $\mu$ M: (1,33 $\pm$ 0,07)	1 $\mu$ M: (0,49 $\pm$ 0,02)	1 $\mu$ M: (0,49 $\pm$ 0,03)
 <p><b>PP-03-159</b> 4. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-
	10 $\mu$ M: (1,14 $\pm$ 0,09)	10 $\mu$ M: (0,22 $\pm$ 0,03)	10 $\mu$ M: (0,33 $\pm$ 0,09)
 <p><b>PP-03-017</b> 4. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-
	10 $\mu$ M: (1,00 $\pm$ 0,01)	10 $\mu$ M: (0,49 $\pm$ 0,06)	10 $\mu$ M: (0,34 $\pm$ 0,08)
 <p><b>PP-03-045</b> 4. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-
	10 $\mu$ M: (1,25 $\pm$ 0,05)	10 $\mu$ M: (0,67 $\pm$ 0,17)	10 $\mu$ M: (0,75 $\pm$ 0,09)
 <p><b>PP-03-015</b> 4. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-
	10 $\mu$ M: (1,38 $\pm$ 0,03)	10 $\mu$ M: (1,16 $\pm$ 0,05)	10 $\mu$ M: (1,18 $\pm$ 0,14)
 <p><b>PP-03-031</b> 4. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-
	10 $\mu$ M: n.l.	-	-
	1 $\mu$ M: (1,35 $\pm$ 0,04)	1 $\mu$ M: (1,02 $\pm$ 0,01)	1 $\mu$ M: (1,32 $\pm$ 0,03)
 <p><b>PP-03-033</b> 4. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-
	10 $\mu$ M: n.l.	-	-
	1 $\mu$ M: (1,25 $\pm$ 0,13)	1 $\mu$ M: (0,99 $\pm$ 0,05)	1 $\mu$ M: (1,07 $\pm$ 0,06)

	<p>100 <math>\mu</math>M: (1,54<math>\pm</math>0,11)</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,86<math>\pm</math>0,02)</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,91<math>\pm</math>0,02)</p>	
<p><b>PP-03-047</b> 4. Testreihe</p>				
	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,57<math>\pm</math>0,02)</p>	<p>- -</p>	<p>- -</p>	
<p><b>PP-03-057</b> 4. Testreihe</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (1,01<math>\pm</math>0,03)</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (0,67<math>\pm</math>0,03)</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (0,57<math>\pm</math>0,03)</p>	
	<p>100 <math>\mu</math>M: n.l.</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	
<p><b>PP-03-069</b> 4. Testreihe</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (0,71<math>\pm</math>0,04)</p>	<p>- -</p>	<p>- -</p>	<p>0,92 (<math>\pm</math>0,03)</p>
	<p>1 <math>\mu</math>M: (1,17<math>\pm</math>0,05)</p>	<p>1 <math>\mu</math>M: (1,00<math>\pm</math>0,02)</p>	<p>1 <math>\mu</math>M: (0,77<math>\pm</math>0,02)</p>	
	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,04<math>\pm</math>0,01)</p>	<p>- -</p>	<p>- -</p>	<p>1,46 (<math>\pm</math>0,07)</p>
<p><b>PP-03-079</b> 4. Testreihe</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (1,04<math>\pm</math>0,02)</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (0,97<math>\pm</math>0,10)</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (0,76<math>\pm</math>0,06)</p>	
	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,43<math>\pm</math>0,01)</p>	<p>- -</p>	<p>- -</p>	
<p><b>PP-04-013</b> 5. Testreihe</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (0,72<math>\pm</math>0,06)</p>	<p>- -</p>	<p>- -</p>	
	<p>1 <math>\mu</math>M: (1,22<math>\pm</math>0,06)</p>	<p>1 <math>\mu</math>M: (0,95<math>\pm</math>0,01)</p>	<p>1 <math>\mu</math>M: (0,95<math>\pm</math>0,08)</p>	

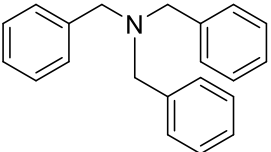
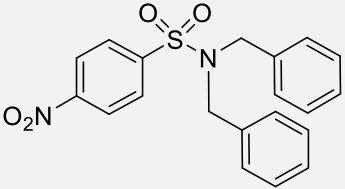
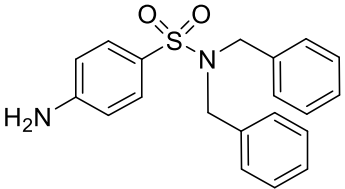
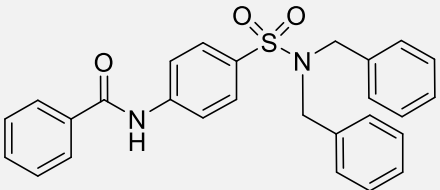
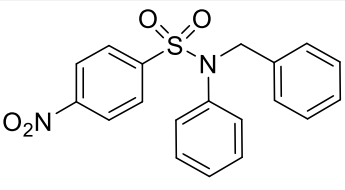
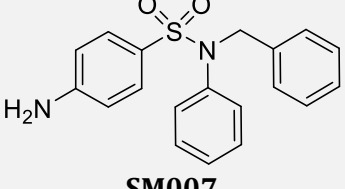
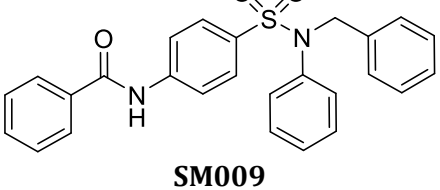
Tabelle E.2: Modifikationen der Rhodanin-Derivate sowie deren Effekt auf die Proliferation (WST-1-Assay), die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin und PIM1/(AG)<sub>15</sub> (DLA) sowie ggf. auf die Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes (TSA).

Rhodanin-Derivate	WST-1-Assay:	DLA: $\beta$ -Globin	DLA: PIM1/(AG) <sub>15</sub>	TSA $\Delta T_m$ [°C]
 <b>Schl-38-016</b> <b>PP-01-147</b> 2. Testreihe	100 $\mu$ M: (0,46 $\pm$ 0,13)  10 $\mu$ M: (0,91 $\pm$ 0,01)	- -  10 $\mu$ M: (1,18 $\pm$ 0,11)	- -  10 $\mu$ M: (0,79 $\pm$ 0,08)	-1,77 ( $\pm$ 0,67)
 <b>Schl-38-018</b> <b>PP-01-169</b> 3. Testreihe	100 $\mu$ M: (0,29 $\pm$ 0,04)  10 $\mu$ M: (0,87 $\pm$ 0,02)  1 $\mu$ M: (1,06 $\pm$ 0,01)	- -  -  1 $\mu$ M: (1,41 $\pm$ 0,19)	- -  -  1 $\mu$ M: (1,03 $\pm$ 0,11)	-0,69 ( $\pm$ 0,09)
 <b>Schl-38-020</b> <b>PP-02-017</b> 3. Testreihe	100 $\mu$ M: (0,64 $\pm$ 0,04)  10 $\mu$ M: (0,99 $\pm$ 0,01)	- -  10 $\mu$ M: (1,19 $\pm$ 0,09)	- -  10 $\mu$ M: (0,88 $\pm$ 0,02)	-1,54 ( $\pm$ 0,28)
 <b>Schl-38-024</b> <b>PP-02-125</b> 3. Testreihe	100 $\mu$ M: n.l.  10 $\mu$ M: (1,07 $\pm$ 0,01)	- -  10 $\mu$ M: (1,20 $\pm$ 0,15)	- -  10 $\mu$ M: (1,01 $\pm$ 0,13)	
 <b>Schl-38-025</b> <b>PP-02-133</b> 3. Testreihe	100 $\mu$ M: (0,13 $\pm$ 0,01)  10 $\mu$ M: (0,94 $\pm$ 0,02)	- -  10 $\mu$ M: (1,21 $\pm$ 0,11)	- -  10 $\mu$ M: (1,19 $\pm$ 0,06)	
 <b>Schl-38-026</b> <b>PP-02-135</b> 3. Testreihe	100 $\mu$ M: n.l.  10 $\mu$ M: (1,06 $\pm$ 0,02)	- -  10 $\mu$ M: (1,09 $\pm$ 0,09)	- -  10 $\mu$ M: (0,99 $\pm$ 0,04)	

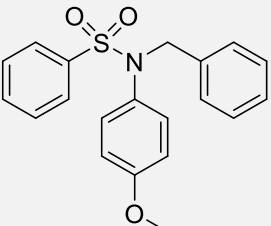
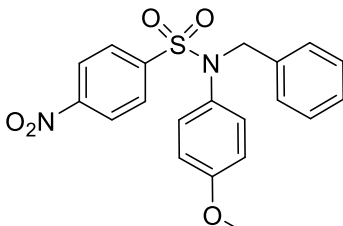
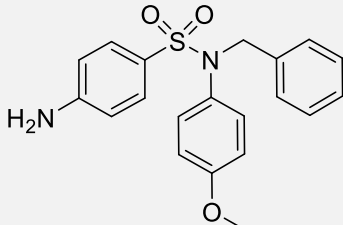
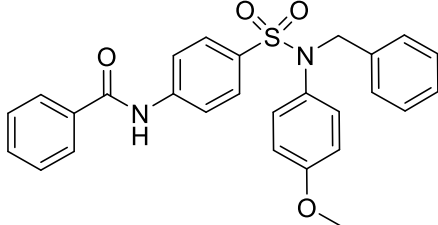
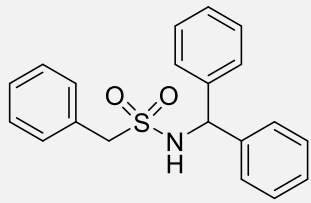
**Tabelle E.3: Modifikationen der Propeller-ähnlichen Sulfonamide sowie deren Effekt auf die Proliferation (WST-1-Assay), die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin und PIM1/(AG)<sub>15</sub> (DLA) sowie ggf. auf die Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes (TSA).**

Propeller-ähnliche Sulfonamide	WST-1-Assay:	DLA: $\beta$ -Globin	DLA: PIM1/(AG) <sub>15</sub>	TSA $\Delta T_m$ [°C]
 <p><b>PP-04-007</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,44 $\pm$ 0,01)  10 $\mu$ M: (0,84 $\pm$ 0,03)  1 $\mu$ M: (1,23 $\pm$ 0,03)	- - -  1 $\mu$ M: (1,04 $\pm$ 0,05)	- - -  1 $\mu$ M: (1,09 $\pm$ 0,02)	
 <p><b>PP-03-037</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.  10 $\mu$ M: n.l.  1 $\mu$ M: (1,17 $\pm$ 0,11)	- - 1 $\mu$ M: (1,09 $\pm$ 0,04)	- - 1 $\mu$ M: (1,18 $\pm$ 0,05)	
 <p><b>PP-04-057</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,33 $\pm$ 0,02)  10 $\mu$ M: (0,69 $\pm$ 0,02)  1 $\mu$ M: (1,13 $\pm$ 0,06)	- - -  1 $\mu$ M: (1,16 $\pm$ 0,07)	- - -  1 $\mu$ M: (1,14 $\pm$ 0,09)	
 <p><b>PP-04-077</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,23 $\pm$ 0,04)  10 $\mu$ M: (0,14 $\pm$ 0,01)  1 $\mu$ M: (1,13 $\pm$ 0,01)	- - -  1 $\mu$ M: (0,99 $\pm$ 0,05)	- - -  1 $\mu$ M: (1,00 $\pm$ 0,06)	
 <p><b>PP-05-127</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,75 $\pm$ 0,01)  10 $\mu$ M: (1,01 $\pm$ 0,02)	- - 10 $\mu$ M: (0,41 $\pm$ 0,01)	- - 10 $\mu$ M: (0,42 $\pm$ 0,02)	

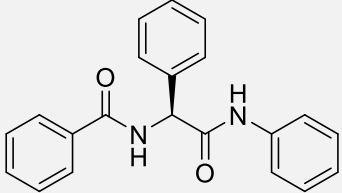
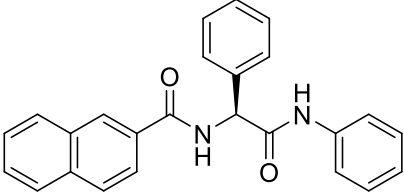
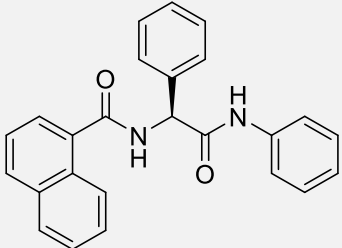
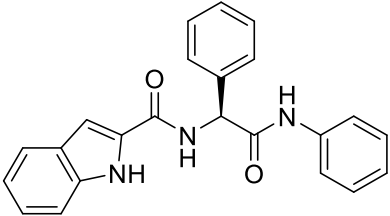
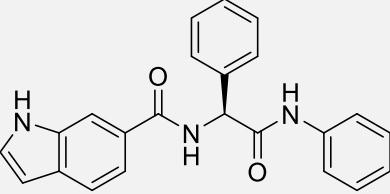
## Anhang E: Screening neuer eIF4A-Inhibitoren

	100 $\mu$ M: (0,63 $\pm$ 0,06)	-	-	
	10 $\mu$ M: (0,83 $\pm$ 0,01)	-	-	
<b>PP-04-081</b> 6. Testreihe	1 $\mu$ M: (1,26 $\pm$ 0,02)	1 $\mu$ M: (1,06 $\pm$ 0,08)	1 $\mu$ M: (0,96 $\pm$ 0,03)	
	-	-	-	0,51 ( $\pm$ 0,08)
<b>SM023</b> 8. Testreihe				
	-	-	-	0,97 ( $\pm$ 0,05)
<b>SM025</b> 8. Testreihe				
	-	-	-	1,56 ( $\pm$ 0,11)
<b>SM027</b> 8. Testreihe				
	-	-	-	-0,16 ( $\pm$ 0,03)
<b>SM001</b> 8. Testreihe				
	-	-	-	0,76 ( $\pm$ 0,04)
<b>SM007</b> 8. Testreihe				
	-	-	-	1,26 ( $\pm$ 0,10)
<b>SM009</b> 8. Testreihe				

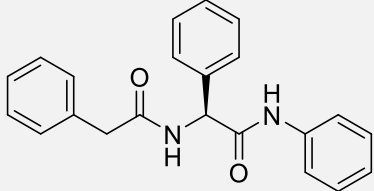
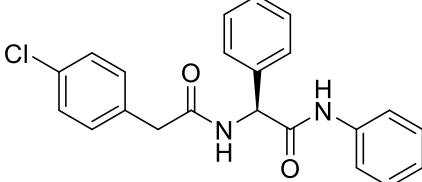
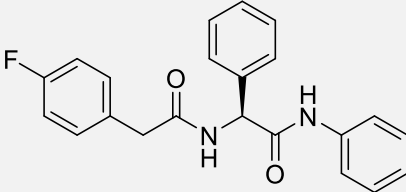
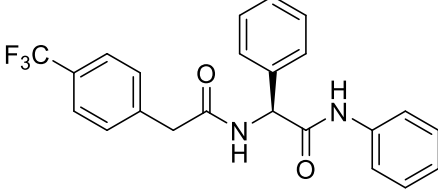
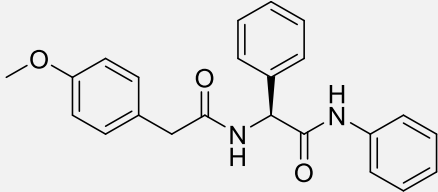
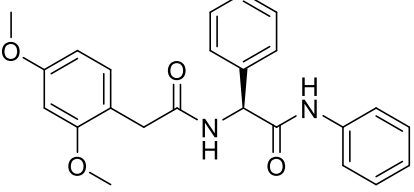


 <p><b>PP-05-133</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (n.l.) (0,23 $\pm$ 0,02)	-	-	
	10 $\mu$ M: (n.l.) (0,20 $\pm$ 0,01)	-	-	
	1 $\mu$ M: (0,71 $\pm$ 0,03)	-	-	
	100 nM: (0,88 $\pm$ 0,06)	100 nM: (1,09 $\pm$ 0,04)	100 nM: (1,18 $\pm$ 0,07)	
 <p><b>SM013</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,21 ( $\pm$ 0,42)
 <p><b>SM015</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	1,00 ( $\pm$ 0,06)
 <p><b>SM017</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	1,37 $\pm$ (0,02)
 <p><b>PP-05-135</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,10 $\pm$ 0,01)	-	-	
	10 $\mu$ M: (0,99 $\pm$ 0,02)	10 $\mu$ M: (0,55 $\pm$ 0,02)	10 $\mu$ M: (0,67 $\pm$ 0,05)	

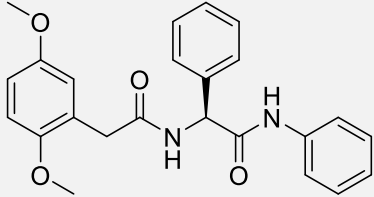
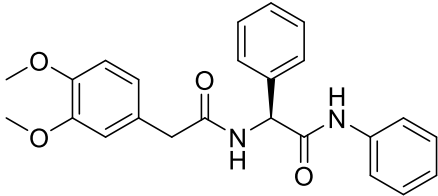
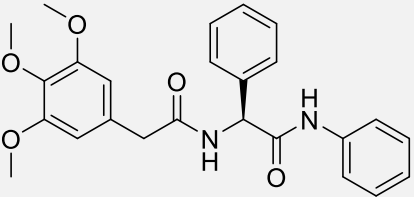
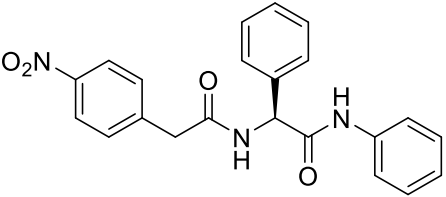
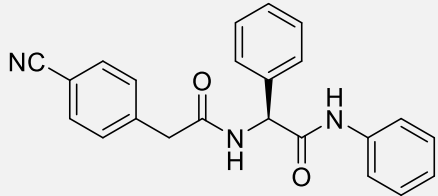
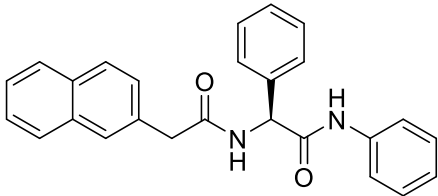
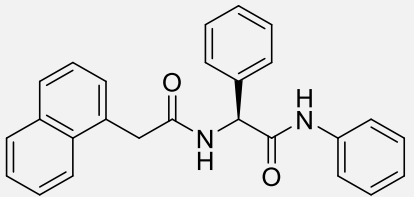
**Tabelle E.4: Modifikationen der Benzoesäure-Derivate sowie deren Effekt auf die Proliferation (WST-1-Assay), die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin und PIM1 oder (AG)<sub>15</sub> (DLA) sowie ggf. auf die Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes (TSA).**

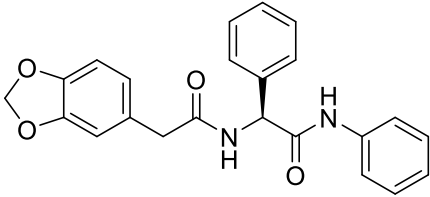
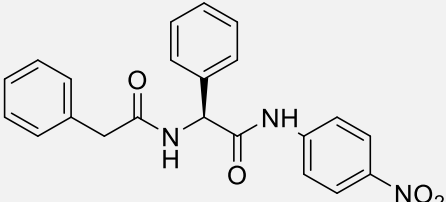
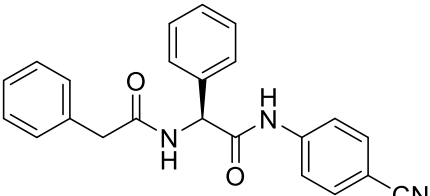
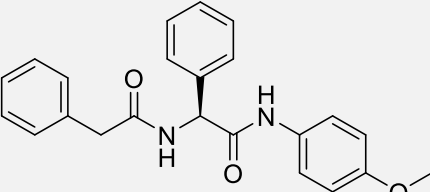
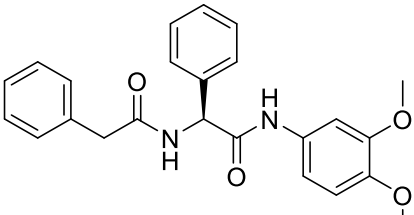
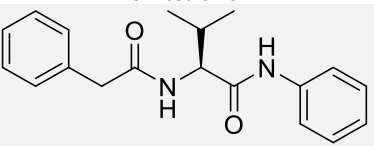
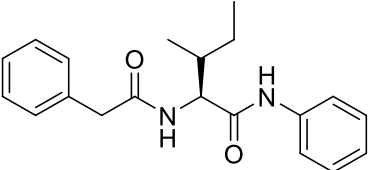
Dicarbonsäureamide Benzoesäure-Derivate	WST-1- Assay:	DLA: $\beta$ -Globin	DLA: PIM1/(AG) <sub>15</sub>	TSA $\Delta T_m$ [° C]
 <p><b>PP-03-151</b> 4. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.  10 $\mu$ M: (1,21 $\pm$ 0,05)	-	-	
 <p><b>PP-03-169</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,99 $\pm$ 0,11)	100 $\mu$ M: (0,81 $\pm$ 0,02)	100 $\mu$ M: (1,13 $\pm$ 0,05)	1,20 ( $\pm$ 0,06)
 <p><b>PP-03-171</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,05 $\pm$ 0,01)	100 $\mu$ M: (0,89 $\pm$ 0,13)	100 $\mu$ M: (0,97 $\pm$ 0,06)	
 <p><b>PP-05-123</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	1,34 ( $\pm$ 0,02)
 <p><b>PP-05-125</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	1,12 ( $\pm$ 0,05)

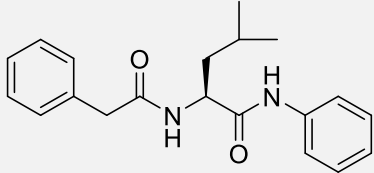
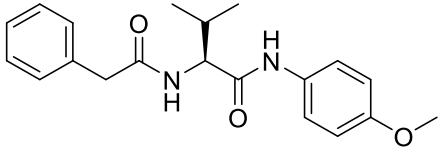
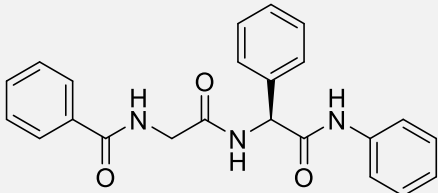
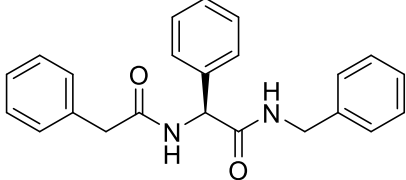
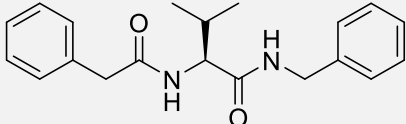
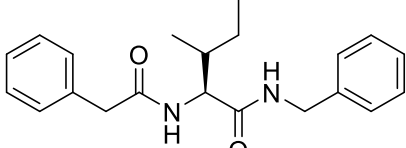
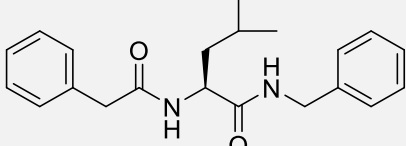
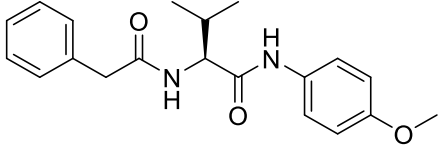
**Tabelle E.5: Modifikationen der Phenyllessigsäure-Derivate sowie deren Effekt auf die Proliferation (WST-1-Assay), die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin und PIM1 oder (AG)<sub>15</sub> (DLA) sowie ggf. auf die Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes (TSA).**

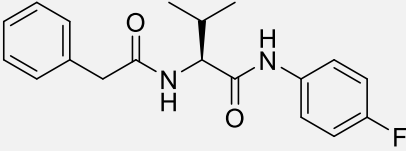
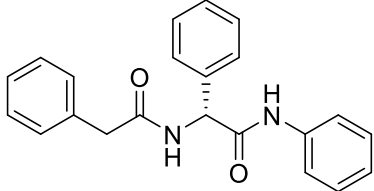
Dicarbonsäureamide: Phenyllessigsäure-Derivate	WST-1- Assay:	DLA: $\beta$ -Globin	DLA: PIM1/(AG) <sub>15</sub>	TSA $\Delta T_m$ [°C]
 <p><b>PP-03-177</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,00 $\pm$ 0,05)	100 $\mu$ M: (0,57 $\pm$ 0,03)	100 $\mu$ M: (0,80 $\pm$ 0,08)	-0,37 ( $\pm$ 0,40)
 <p><b>MB002</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,19 $\pm$ 0,01)	100 $\mu$ M: (1,09 $\pm$ 0,07)	100 $\mu$ M: (1,11 $\pm$ 0,05)	
 <p><b>PP-05-033</b> 6. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,06 $\pm$ 0,02)	100 $\mu$ M: (1,01 $\pm$ 0,03)	100 $\mu$ M: (0,89 $\pm$ 0,06)	
 <p><b>PP-05-053</b> 6. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.  10 $\mu$ M: (0,88 $\pm$ 0,08)	-  10 $\mu$ M: (1,00 $\pm$ 0,10)	-  10 $\mu$ M: (1,11 $\pm$ 0,11)	
 <p><b>MB003</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,99 $\pm$ 0,04)	100 $\mu$ M: (0,85 $\pm$ 0,01)	100 $\mu$ M: (0,99 $\pm$ 0,03)	
 <p><b>MB010</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,24 ( $\pm$ 0,06)

## Anhang E: Screening neuer eIF4A-Inhibitoren

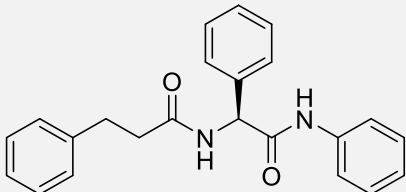
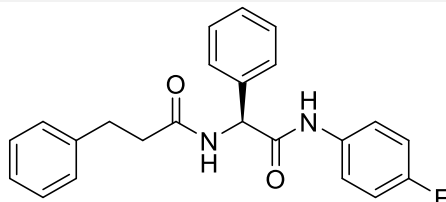
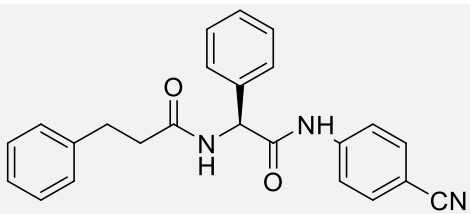
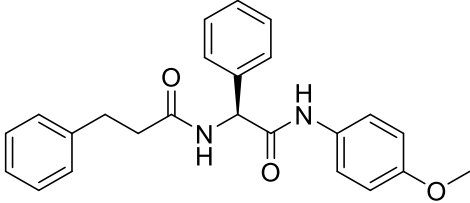
 <p><b>MB013</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,14 $\pm$ 0,05)	100 $\mu$ M: (0,88 $\pm$ 0,07)	100 $\mu$ M: (1,05 $\pm$ 0,04)	
 <p><b>MB012</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,48 $\pm$ 0,07)	-	-	
 <p><b>PP-05-035</b> 6. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,14 $\pm$ 0,04)	100 $\mu$ M: (0,77 $\pm$ 0,10)	100 $\mu$ M: (0,88 $\pm$ 0,04)	-0,58 ( $\pm$ 0,29)
 <p><b>MB008 F2</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,05 $\pm$ 0,01)	100 $\mu$ M: (0,93 $\pm$ 0,05)	100 $\mu$ M: (0,97 $\pm$ 0,03)	
 <p><b>MB009</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,04 $\pm$ 0,02)	100 $\mu$ M: (1,04 $\pm$ 0,04)	100 $\mu$ M: (1,04 $\pm$ 0,03)	
 <p><b>PP-03-173</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-	
	10 $\mu$ M: (0,67 $\pm$ 0,10)	-	-	
	1 $\mu$ M: (1,34 $\pm$ 0,07)	1 $\mu$ M: (0,90 $\pm$ 0,01)	1 $\mu$ M: (1,12 $\pm$ 0,09)	
 <p><b>PP-03-175</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.	-	-	
	10 $\mu$ M: n.l.	-	-	
	1 $\mu$ M: (1,30 $\pm$ 0,06)	1 $\mu$ M: (0,98 $\pm$ 0,02)	1 $\mu$ M: (1,13 $\pm$ 0,09)	

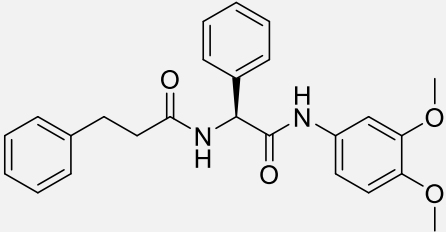
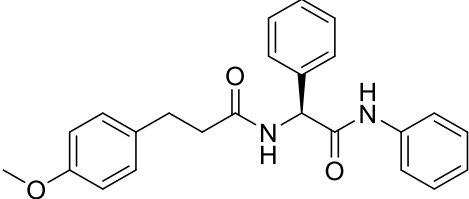
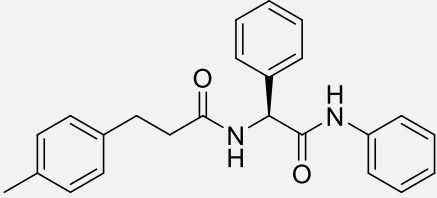
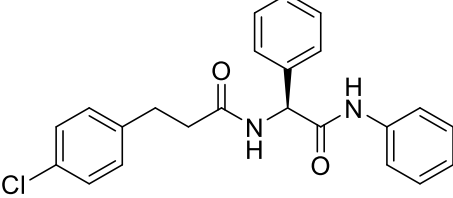
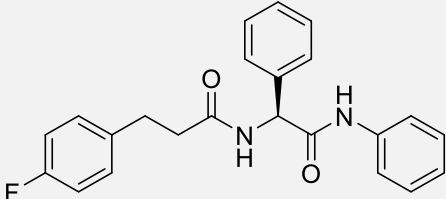
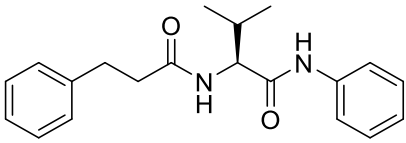
 <p><b>MB011</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,18 (±0,01)
 <p><b>PP-06-051</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,28 (±0,06)
 <p><b>PP-06-057</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,50 (±0,14)
 <p><b>PP-05-037</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: (0,95±0,04)	100 µM: (0,53±0,15)	100 µM: (0,81±0,10)	
 <p><b>PP-06-041</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	-0,14 (±0,12)
 <p><b>MB006</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: (0,97±0,03)	100 µM: (0,61±0,02)	100 µM: (0,70±0,02)	
 <p><b>MB005</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: (0,85±0,05)  10 µM: (0,92±0,04)	-  10 µM: (0,76±0,02)	-  10 µM: (0,78±0,04)	

 <p><b>MB007</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: (1,09±0,01)	100 µM: (0,45±0,01)	100 µM: (0,53±0,04)	
 <p><b>PP-05-069</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,13 (±0,07)
 <p><b>PP-05-077</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	-0,60 (±0,53)
 <p><b>PP-05-039</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: (0,86±0,04)	-	-	
	10 µM: (0,85±0,02)	-	-	
	1 µM: (1,18±0,14)	1 µM: (1,20±0,02)	1 µM: (1,41±0,12)	
 <p><b>PP-05-117</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (0,12±0,01)	10 µM: (0,77±0,02)	10 µM: (0,87±0,04)	
 <p><b>PP-05-119</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (1,21±0,01)	10 µM: (0,68±0,04)	10 µM: (0,73±0,01)	
 <p><b>PP-05-121</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: (1,18±0,02)	100 µM: (0,34±0,01)	100 µM: (0,36±0,02)	
 <p><b>PP-06-071</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,08 (±0,06)

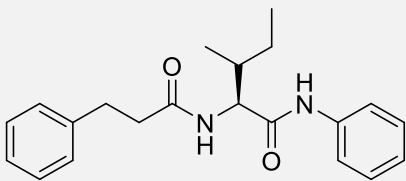
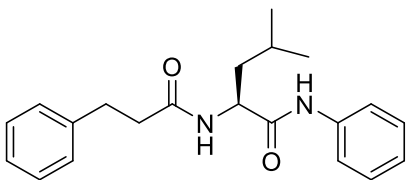
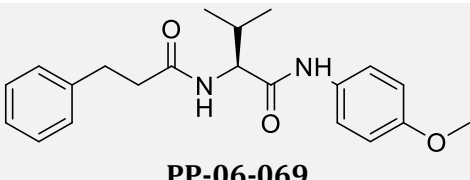
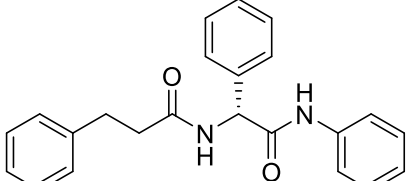
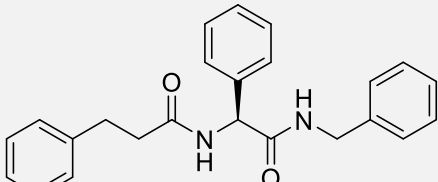
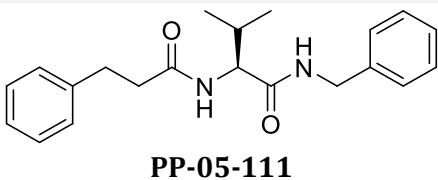
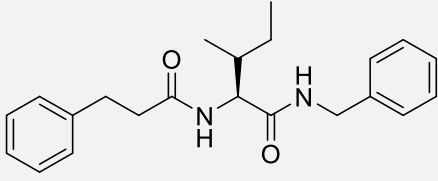
 <p><b>PP-06-081</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,06 (±0,09)
 <p><b>PP-06-003</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	-0,02 (±0,04)

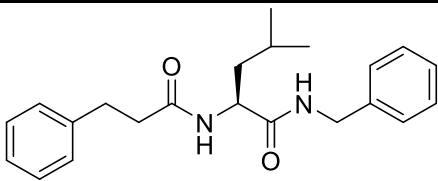
**Tabelle E.6: Modifikationen der Phenylpropionsäure-Derivate sowie deren Effekt auf die Proliferation (WST-1-Assay), die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin und PIM1 oder (AG)<sub>15</sub> (DLA) sowie ggf. auf die Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes (TSA).**

Dicarbonsäureamide: Phenylpropionsäure-Derivate	WST-1- Assay:	DLA: $\beta$ -Globin	DLA: PIM1/(AG) <sub>15</sub>	TSA $\Delta T_m$ [°C]
 <p><b>PP-03-165</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,44±0,03)	100 $\mu$ M: (0,63±0,01)	100 $\mu$ M: (0,82±0,03)	-0,63 (±0,05)
 <p><b>PP-05-057</b> 6. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.  10 $\mu$ M: (0,97±0,03)	-  10 $\mu$ M: (0,85±0,06)	-  10 $\mu$ M: (0,80±0,05)	
 <p><b>PP-06-055</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,81 (±0,05)
 <p><b>PP-05-107</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (1,20±0,02)	100 $\mu$ M: (0,91±0,03)	100 $\mu$ M: (0,97±0,03)	

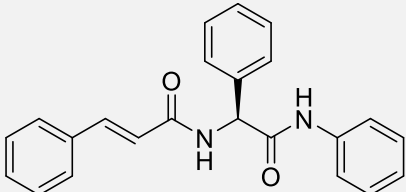
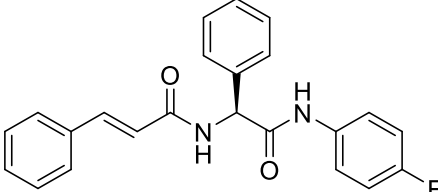
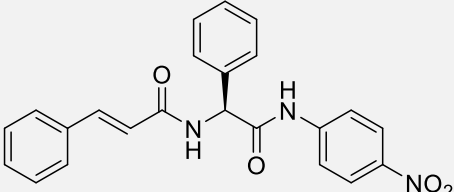
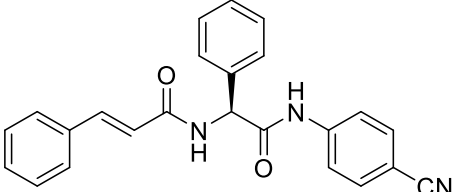
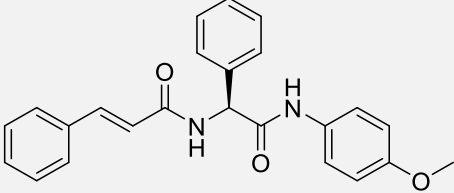
 <p><b>PP-06-039</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	-0,09 (±0,12)
 <p><b>PP-05-019</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: (1,03±0,04)	100 µM: (1,06±0,10)	100 µM: (1,21±0,11)	
 <p><b>PP-05-021</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: (0,96±0,02)	100 µM: (0,98±0,23)	100 µM: (1,44±0,16)	
 <p><b>PP-05-015</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: (1,09±0,04)	100 µM: (0,90±0,05)	100 µM: (1,04±0,04)	
 <p><b>PP-05-023</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: (1,22±0,03)	100 µM: (1,30±0,04)	100 µM: (1,37±0,08)	
 <p><b>PP-05-009</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: (0,87±0,01)	-	-	
	10 µM: (0,77±0,05)	-	-	
	1 µM: (1,15±0,21)	1 µM: (1,05±0,04)	1 µM: (1,25±0,09)	

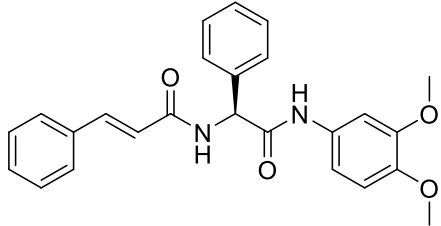
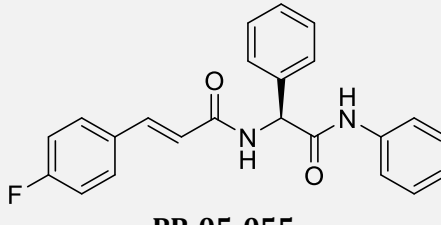
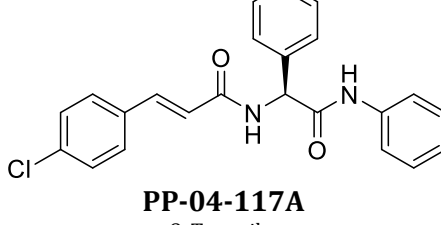
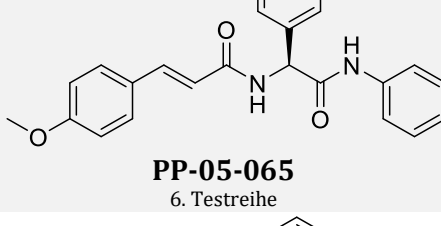
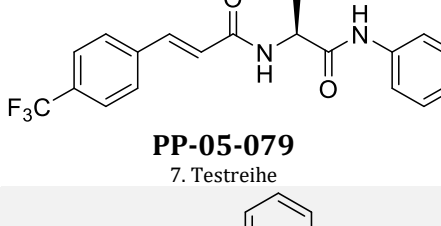
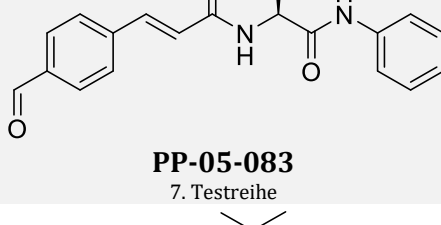
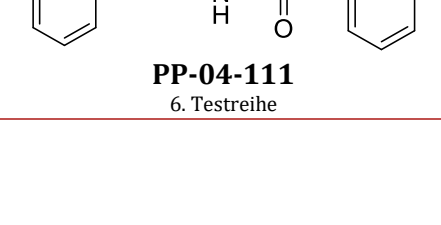


 <p><b>PP-05-011</b> 6. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,78 $\pm$ 0,02)	-	-	
	10 $\mu$ M: (0,82 $\pm$ 0,04)	-	-	
	1 $\mu$ M: (1,22 $\pm$ 0,05)	1 $\mu$ M: (1,91 $\pm$ 0,10)	1 $\mu$ M: (1,62 $\pm$ 0,18)	
	100 $\mu$ M: (0,67 $\pm$ 0,02)	-	-	
 <p><b>PP-05-013</b> 6. Testreihe</p>	10 $\mu$ M: (0,83 $\pm$ 0,02)	-	-	
	1 $\mu$ M: (1,12 $\pm$ 0,09)	1 $\mu$ M: (1,06 $\pm$ 0,06)	1 $\mu$ M: (1,15 $\pm$ 0,05)	
	-	-	-	0,07 ( $\pm$ 0,03)
	-	-	-	-0,06 ( $\pm$ 0,07)
 <p><b>PP-06-069</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	-0,01 ( $\pm$ 0,06)
	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
 <p><b>PP-06-005</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	-0,01 ( $\pm$ 0,06)
	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
 <p><b>PP-06-011</b> 8. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (n.l.) (0,74 $\pm$ 0,04)	-	-	
	10 $\mu$ M: (1,04 $\pm$ 0,02)	10 $\mu$ M: (0,89 $\pm$ 0,02)	10 $\mu$ M: (0,96 $\pm$ 0,03)	
	100 $\mu$ M: (n.l.) (0,11 $\pm$ 0,01)	-	-	
	10 $\mu$ M: (1,23 $\pm$ 0,01)	10 $\mu$ M: (1,15 $\pm$ 0,23)	10 $\mu$ M: (0,88 $\pm$ 0,04)	
 <p><b>PP-05-111</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (n.l.) (0,11 $\pm$ 0,01)	-	-	
	10 $\mu$ M: (1,23 $\pm$ 0,01)	10 $\mu$ M: (1,15 $\pm$ 0,23)	10 $\mu$ M: (0,88 $\pm$ 0,04)	
	100 $\mu$ M: (n.l.) (0,11 $\pm$ 0,01)	-	-	
	10 $\mu$ M: (1,23 $\pm$ 0,01)	10 $\mu$ M: (1,15 $\pm$ 0,23)	10 $\mu$ M: (0,88 $\pm$ 0,04)	
 <p><b>PP-05-113</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (n.l.) (0,11 $\pm$ 0,01)	-	-	
	10 $\mu$ M: (1,23 $\pm$ 0,01)	10 $\mu$ M: (1,15 $\pm$ 0,23)	10 $\mu$ M: (0,88 $\pm$ 0,04)	
	100 $\mu$ M: (n.l.) (0,11 $\pm$ 0,01)	-	-	
	10 $\mu$ M: (1,23 $\pm$ 0,01)	10 $\mu$ M: (1,15 $\pm$ 0,23)	10 $\mu$ M: (0,88 $\pm$ 0,04)	

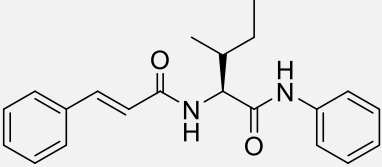
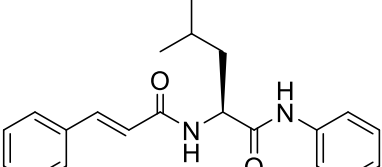
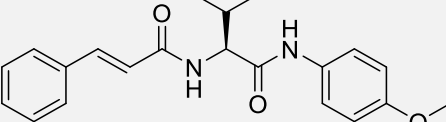
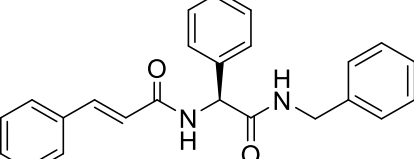
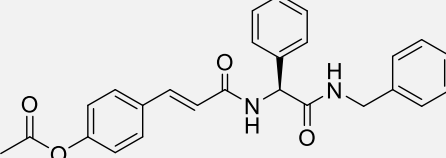
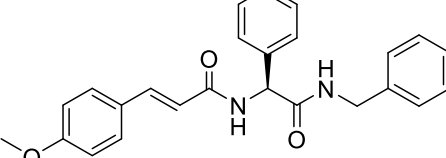
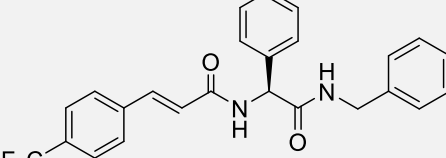
 <p><b>PP-05-115</b> 7. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: (0,86 $\pm$ 0,03)	-	-
	10 $\mu$ M: (1,19 $\pm$ 0,01)	10 $\mu$ M: (0,66 $\pm$ 0,01)	10 $\mu$ M: (0,73 $\pm$ 0,03)

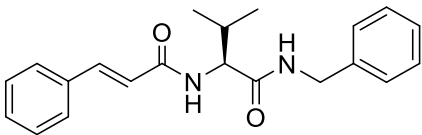
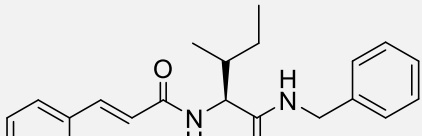
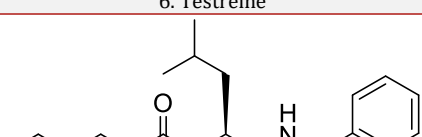
**Tabelle E.7: Modifikationen der Zimtsäure-Derivate sowie deren Effekt auf die Proliferation (WST-1-Assay), die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin und PIM1 oder (AG)<sub>15</sub> (DLA) sowie ggf. auf die Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes (TSA).**

Dicarbonyl- amide: Zimtsäure- Derivate	WST-1- Assay:	DLA: $\beta$ -Globin	DLA: PIM1/(AG) <sub>15</sub>	TSA $\Delta T_m$ [° C]
 <p><b>PP-03-153</b> 5. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.  10 $\mu$ M: n.l.  1 $\mu$ M: (1,26 $\pm$ 0,06)	-  -  1 $\mu$ M: (0,91 $\pm$ 0,01)	-  -  1 $\mu$ M: (0,97 $\pm$ 0,05)	
 <p><b>PP-05-059</b> 6. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.  10 $\mu$ M: (0,87 $\pm$ 0,15)	-  10 $\mu$ M: (0,99 $\pm$ 0,10)	-  10 $\mu$ M: (0,74 $\pm$ 0,05)	0,26 ( $\pm$ 0,04)
 <p><b>PP-06-047</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	1,11 ( $\pm$ 0,06)
 <p><b>PP-06-053</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,69 ( $\pm$ 1,22)
 <p><b>PP-05-043</b> 6. Testreihe</p>	100 $\mu$ M: n.l.  10 $\mu$ M: (0,29 $\pm$ 0,01)  1 $\mu$ M: (1,05 $\pm$ 0,07)	-  -  1 $\mu$ M: (1,25 $\pm$ 0,03)	-  -  1 $\mu$ M: (1,01 $\pm$ 0,13)	

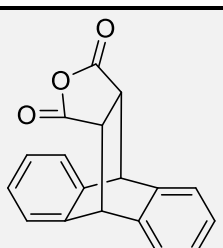
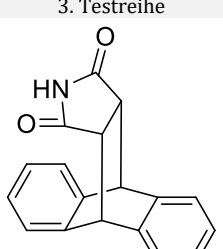
 <p><b>PP-06-037</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,06 (±0,06)
 <p><b>PP-05-055</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (0,63±0,03)	-	-	
	1 µM: (1,16±0,04)	1 µM: (1,28±0,07)	1 µM: (1,01±0,09)	
 <p><b>PP-04-117A</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,05 (±0,02)
 <p><b>PP-05-065</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (0,22±0,10)	-	-	
	1 µM: (0,98±0,08)	1 µM: (1,95±0,20)	1 µM: (1,36±0,23)	
 <p><b>PP-05-079</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: (1,12±0,01)	100 µM: (1,76±0,03)	100 µM: (1,94±0,09)	
 <p><b>PP-05-083</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (1,14±0,02)	10 µM: (0,74±0,02)	10 µM: (0,71±0,02)	
 <p><b>PP-04-111</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: n.l.	-	-	
	1 µM: (1,22±0,06)	1 µM: (1,81±0,09)	1 µM: (1,41±0,14)	

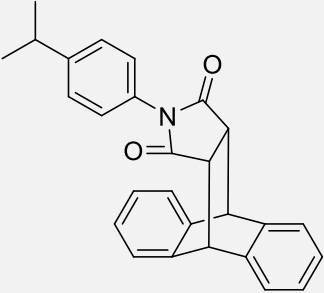
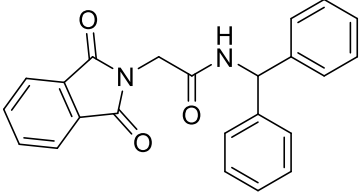
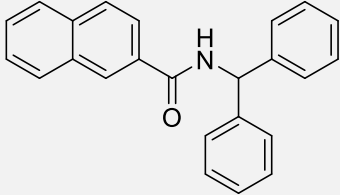
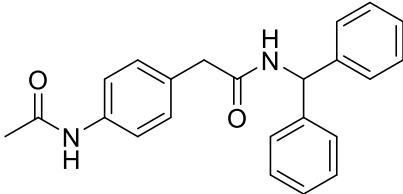
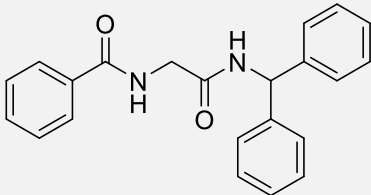
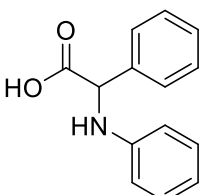
## Anhang E: Screening neuer eIF4A-Inhibitoren

 <p><b>PP-04-141</b> 6. Testreihe</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,86<math>\pm</math>0,04)</p> <p>10 <math>\mu</math>M: (0,99<math>\pm</math>0,04)</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (1,20<math>\pm</math>0,21)</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (0,82<math>\pm</math>0,08)</p>	<p>-0,40 (<math>\pm</math>0,09)</p>
 <p><b>PP-04-107</b> 6. Testreihe</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,89<math>\pm</math>0,03)</p> <p>10 <math>\mu</math>M: (0,89<math>\pm</math>0,01)</p> <p>1 <math>\mu</math>M: (1,23<math>\pm</math>0,02)</p>	<p>-</p> <p>-</p> <p>1 <math>\mu</math>M: (0,94<math>\pm</math>0,01)</p>	<p>-</p> <p>-</p> <p>1 <math>\mu</math>M: (1,05<math>\pm</math>0,04)</p>	
 <p><b>PP-06-067</b> 8. Testreihe</p>				<p>0,14 (<math>\pm</math>0,09)</p>
 <p><b>PP-04-103</b> 6. Testreihe</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (1,08<math>\pm</math>0,03)</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,84<math>\pm</math>0,10)</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (1,24<math>\pm</math>0,10)</p>	
 <p><b>PP-04-129</b> 6. Testreihe</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (1,23<math>\pm</math>0,03)</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,33<math>\pm</math>0,06)</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (0,31<math>\pm</math>0,05)</p>	
 <p><b>PP-04-133</b> 6. Testreihe</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: n.l.</p> <p>10 <math>\mu</math>M: (1,04<math>\pm</math>0,06)</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (1,23<math>\pm</math>0,11)</p>	<p>10 <math>\mu</math>M: (0,89<math>\pm</math>0,19)</p>	<p>0,16 (<math>\pm</math>0,27)</p>
 <p><b>PP-04-145</b> 6. Testreihe</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (1,15<math>\pm</math>0,01)</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (1,34<math>\pm</math>0,20)</p>	<p>100 <math>\mu</math>M: (1,26<math>\pm</math>0,20)</p>	

 <p><b>PP-04-105</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	-1,45 (±0,39)
	10 µM: (1,06±0,08)	10 µM: (1,13±0,12)	10 µM: (0,77±0,15)	
 <p><b>PP-04-139</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (1,01±0,03)	10 µM: (1,00±0,04)	10 µM: (1,08±0,07)	
 <p><b>PP-04-113</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	1,51 (±0,01)
	10 µM: (1,10±0,10)	10 µM: (0,82±0,09)	10 µM: (0,58±0,06)	

**Tabelle E.8: Modifikationen sonstiger Derivate sowie deren Effekt auf die Proliferation (WST-1-Assay), die Translationseffizienz von  $\beta$ -Globin und PIM1/(AG)<sub>15</sub> (DLA) sowie ggf. auf die Schmelztemperatur des eIF4A-RNA-AMP-PNP-Komplexes (TSA).**

Sonstige	WST-1-Assay:	DLA: $\beta$ -Globin	DLA: PIM1/(AG) <sub>15</sub>	TSA $\Delta T_m$ [° C]
 <p><b>Schl-38-021</b> <b>PP-02-103</b> 3. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (0,95±0,02)	10 µM: (1,41±0,15)	10 µM: (1,02±0,05)	
 <p><b>Schl-38-022</b> <b>PP-02-107</b> 3. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (1,01±0,02)	10 µM: (1,18±0,11)	10 µM: (1,07±0,02)	

 <p><b>Schl-38-023</b> <b>PP-02-101</b> 3. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	-1,34 (±0,08)
	10 µM: (0,96±0,01)	10 µM: (1,18±0,20)	10 µM: (1,09±0,09)	
 <p><b>PP-05-155</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (1,01±0,01)	10 µM: (1,05±0,07)	10 µM: (1,11±0,02)	
 <p><b>PP-05-165</b> 8. Testreihe</p>	-	-	-	0,19 (±0,02)
 <p><b>PP-05-167</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (1,00±0,01)	10 µM: (0,81±0,02)	10 µM: (0,76±0,03)	
 <p><b>PP-05-157</b> 7. Testreihe</p>	100 µM: n.l.	-	-	
	10 µM: (0,99±0,02)	10 µM: (0,55±0,03)	10 µM: (0,57±0,02)	
 <p><b>PP-04-099</b> 6. Testreihe</p>	100 µM: (0,72±0,05)	-	-	
	10 µM: 0,78±0,05)	-	-	
	1 µM: (1,25±0,02)	1 µM: (1,08±0,01)	1 µM: (1,13±0,07)	

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
3'-UTR	3' untranslatierte Region
5'-UTR	5' untranslatierte Region
6-AC	6-Aminocholestanol
43S-PIC	43S-Präinitiationskomplex
A, Ala	Alanin
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMP-PNP	Adenylyl-Imidodiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C, Cys	Cystein
CC <sub>50</sub>	<i>Cytotoxic concentration of half-maximal reduction of cell viability</i>
CCHF	Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber-Virus
CHIKV	Chikungunya-Virus
CoV	Coronavirus
CV	<i>Column volumes</i>
D, Asp	Asparaginsäure/Aspartat
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEAD	Aminosäuremotiv: Aspartat (D)-Glutamat (E) -Alanin (A)-Aspartat (D)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DLA	Dual-Luciferase-(Reporter)-Assay
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA/dsRNA	<i>Double-stranded DNA/RNA</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E, Glu	Glutaminsäure/Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBOV	Ebolavirus
EDG	<i>Electron donating group</i>
eIF	Eukaryontischer Initiationsfaktor
eIF2-TC	eIF2-ternärer Komplex
EWG	<i>Electron withdrawing group</i>
F, Phe	Phenylalanin
FBS/FCS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FLuc	Firefly-Luciferase
G, Gly	Glycin
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>Hours</i>

H, His	Histidin
HCoV-229E	Humanes Coronavirus 229E
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCV-IRES	<i>Hepatitis C virus internal ribosome entry site</i>
HDX-MS	<i>Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry</i>
HEV	Hepatitis-E-Virus
His <sub>6</sub> -Tag	Polyhistidin-Tag
HP	<i>Hairpin</i>
HSV-1	Herpes-simplex Virus-1
HSV-TK	<i>Herpes simplex virus thymidine kinase</i>
HTS	<i>High-throughput screening</i>
I, Ile	Isoleucin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR-Laser	Infrarot-Laser
K, Lys	Lysin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
L, Leu	Leucin
LASV	Lassa-Virus
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
M, Met	Methionin
m <sup>7</sup> G	7-Methylguanosin
MFE	<i>Minimum free energy</i>
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSKCC	<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
MST	Microscale-Thermophoresis-Assay
MW	<i>Molecular weight</i>
N, Asn	Asparagin
n.l.	nicht löslich
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
ORI	<i>Origin of Replication</i>
P, Pro	Prolin
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
PatA	Pateamin A
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
prä-mRNA	<i>Precursor messenger ribonucleic acid</i>
Q, Gln	Glutamin
R, Arg	Arginin
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
RLuc	Renilla-Luciferase
RocA	Rocaglamid A
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur



---

S, Ser	Serin
SAN	Sanguinarine
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SBC	<i>Sarawak Biodiversity Centre</i>
SDM	<i>Site-directed Mutagenesis</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
ssDNA/ssRNA	<i>single-stranded DNA/RNA</i>
T, Thr	Threonin
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TE	Translationseffizienz
TGX	<i>Tris-Glycine extended</i>
tRNA	Transfer-RNA
TSA	Thermal-Shift-Assay
u. a.	unter anderem
V, Val	Valin
W, Trp	Tryptophan
WST	<i>Water soluble tetrazolium</i>
Y, Tyr	Tyrosin
ZIKV	Zika-Virus

---



# Wissenschaftliche Beiträge

## Publikationen in Fachzeitschriften

- Müller, C., Obermann, W., Karl, N., Wendel, H. G., Taroncher-Oldenburg, G., Pleschka, S., Hartmann, R. K., Ziebuhr, J., Grünweller, A. (2021). The rocaglate CR-31-B (-) inhibits SARS-CoV-2 replication at non-cytotoxic, low nanomolar concentrations *in vitro* and *ex vivo*. *Antiviral Research*, 105012
- Müller, C.\*, Obermann, W.\*, Schulte, F. W., Lange-Grünweller, K., Oestereich, L., Elgner, F., Glitscher, M., Hildt, E., Singh, K., Wendel, H.-G., Hartmann, R. K., Ziebuhr, J., Grünweller, A. (2020). Comparison of broad-spectrum antiviral activities of the synthetic rocaglate CR-31-B (-) and the eIF4A-inhibitor Silvestrol. *Antiviral Research*, 175, 104706.
- Müller, C., Schulte, F. W., Lange-Grünweller, K., Obermann, W., Madhugiri, R., Pleschka, S., Ziebuhr, J., Hartmann, R. K., & Grünweller, A. (2018). Broad-spectrum antiviral activity of the eIF4A inhibitor silvestrol against corona- and picornaviruses. *Antiviral Research*, 150, 123–129.
- Peiffer, K. H., Spengler, C., Basic, M., Jiang, B., Kuhnhen, L., Obermann, W., Zahn, T., Glitscher, M., Loglio, A., Facchetti, F., Carra, G., Kubesch, A., Vermehren, J., Knop, V., Graf, C., Dietz, J., Finkelmeier, F., Herrmann, E., Trebicka, J., Grünweller, A., Zeuzem, S., Sarrazin, C., Lampertico, P., Hildt, E. (2020). GCAC1890-1812TTCT acts as a novel biomarker in European HBV carriers. *JCI Insight*, 19, 5 (22)
- Manuskript in Bearbeitung: Obermann W., *et al.* Physicochemical characterization of the RNA helicase eIF4A and mechanistic insights into the mode of action of Rocaglates in the context of an antiviral approach.
- Manuskript in Bearbeitung: Taroncher-Oldenburg, G. *et al.* Cross-kingdom sensitivity analysis to silvestrol reveals the hallmark of eIF4A inhibitors and its potential medical application against drug-resistance.

## Beiträge zu Konferenzen/Symposien

- Poster: Obermann W., Schulte, F. W., Müller, C., Lange-Grünweller, K., Ziebuhr, J., Hartmann, R. K., Grünweller, A. Analyses of RNA structures and sequences that mediate eIF4A-dependent viral protein synthesis. *10<sup>th</sup> Meeting of the GBM Study Section RNA-Biochemistry*, 4. – 7. Oktober 2018, Bonn
- Poster: Obermann, W., Schulte, F. W., Hartmann, R. K., Grünweller, A. Analysis of RNA structures to characterize the RNA helicase eIF4A. *1<sup>st</sup> Retreat of the LOEWE Centre DRUID*, 26. – 27. Oktober 2018, Rauschholzhausen
- Poster: Obermann, W., Schulte, F. W., Hartmann, R. K., Grünweller, A. Characterization of the RNA helicase eIF4A. *Spring Symposium of the LOEWE Centre DRUID*, 18. – 19. Februar 2019, Marburg
- Poster: Grünweller, A., Obermann W., Müller, C., Oestereich, L., Schulte, F. W., Lange-Grünweller, K., Ziebuhr, J., Hartmann, R. K. The DEAD-Box RNA Helicase eIF4A as a novel broad-spectrum Antiviral Target, *29<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology*, 20. – 23. März 2019, Düsseldorf
- Vortrag: Obermann, W. The DEAD-box RNA Helicase eIF4A as a broad-spectrum antiviral target. *Non-coding RNAs*, 31. März – 4. April 2019, Hirschegg, Österreich
- Poster: Müller, C., Obermann, W., Wendel, H. G., Grünweller, A., Ziebuhr, J. A New Antiviral Approach – Inhibition of RNA viruses depending on eIF4A-dependent translation by the natural compound silvestrol and synthetic analog. *Positive-Strand RNA Viruses, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology*, 9. – 13. Juni 2019, Killarney, Irland
- Vortrag: Grünweller A., Obermann, W. Understanding the mode of action of rocaglates to identify new eIF4A inhibitors. *2<sup>nd</sup> Retreat of the LOEWE Center DRUID*, 25. - 26. Oktober 2019, Rauschholzhausen
- Poster: Obermann, W., Müller, C., Hartmann, R. K., Ziebuhr, J., Grünweller, A. Understanding the Mode of Action of Rocaglates as potent eIF4A Inhibitors. *Spring Symposium of the LOEWE Center DRUID*, 3. – 4. Februar 2020, Frankfurt
- Vortrag: Obermann, W. eIF4A-specific RNA helicase inhibitors as potential broad-spectrum therapeutics against RNA viruses. *3<sup>rd</sup> Retreat of the LOEWE Center DRUID*, 26. – 27. Oktober 2020, virtuell

**Erklärung zum selbstständigen Verfassen einer Arbeit**

**ERKLÄRUNG**

**gemäß § 10 der Promotionsordnung des Fachbereichs Pharmazie  
(FB 16) der Philipps-Universität Marburg**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung der antiviralen Aktivität von Rocaglamid-Derivaten und Validierung der humanen RNA-Helikase eIF4A als Target“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

Marburg, den 28.10.2020

.....

(Wiebke Obermann)