



Artikel

Intrazelluläre Reverse Transkription von Pfizer BioNTech COVID-19-mRNA-Impfstoff BNT162b2 in vitro in der menschlichen Leber Zelllinie

Markus Aldén ¹, Francisco Olofsson Herbst ¹, Daowei Yang ¹, Mohammad Barghouth ¹, Cheng Luan ¹, Magnus Rasmussen ² und Yang De Marinis ^{1,*}

¹ Abteilung für klinische Wissenschaften, Universität Lund, 20502 Malmö, Schweden; ma7440al-s@student.lu.se (MA); francisko.olofsson@gmail.com (FOF); daowei.yang@med.lu.se (DY); mohammad.barghouth@med.lu.se (MB); cheng.luan@med.lu.se (CL)
² Infektionsmedizin, Abteilung für klinische Wissenschaften, Universität Lund, 22362 Lund, Schweden; magnus.rasmussen@med.lu.se * Korrespondenz: yang.de_marinis@med.lu.se

Zusammenfassung: Präklinische Studien des von Pfizer und BioNTech entwickelten COVID-19-mRNA-Impfstoffs BNT162b2 zeigten reversible Auswirkungen auf die Leber bei Tieren, denen die BNT162b2-Injektion verabreicht wurde. Darüber hinaus zeigte eine aktuelle Studie, dass SARS-CoV-2-RNA revers transkribiert und in das Genom menschlicher Zellen integriert werden kann. In dieser Studie untersuchten wir die Wirkung von BNT162b2 auf die menschliche Leberzelllinie Huh7 in vitro. Huh7-Zellen wurden BNT162b2 ausgesetzt und eine quantitative PCR wurde mit aus den Zellen extrahierter RNA durchgeführt. Wir haben hohe Konzentrationen von BNT162b2 in Huh7-Zellen und Veränderungen in der Genexpression von long interspersed nuklearem Element-1 (LINE-1) festgestellt, einer endogenen Reversen Transkriptase. Die Immunhistochemie unter Verwendung der Antikörperbindung an das offene Leserahmen-1-RNA-Bindungsprotein (ORFp1) von LINE-1 auf mit BNT162b2 behandelten Huh7-Zellen zeigte eine erhöhte Zellkernverteilung von LINE-1. PCR an genomischer DNA von Huh7-Zellen, die BNT162b2 ausgesetzt waren, amplifizierte die für BNT162b2 einzigartige DNA-Sequenz. Unsere Ergebnisse deuten auf eine schnelle Aufnahme von BNT162b2 in die menschliche Leberzelllinie Huh7 hin, was zu Veränderungen in der Expression und Verteilung von LINE-1 führt. Wir zeigen auch, dass BNT162b2-mRNA nach BNT162b2-Exposition in nur 6 Stunden intrazellulär in DNA revers transkribiert wird.

Schlüsselwörter: COVID-19-mRNA-Impfstoff; BNT162b2; Leber; Reverse Transkription; LINIE 1; Huh7



Zitat: Aldén, M.; Olofsson Falla,

F.; Yang, D.; Barghouth, M.; Luan, C.; Rasmussen, M.; Die Marinis, Y.

Intrazelluläre Reverse Transkription von Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Impfstoff BNT162b2 in vitro beim Menschen Leberzelllinie. Curr. Ausgaben Mol. Biol.

2022, 44, 1115–1126.

<https://doi.org/10.3390/cimb44030073>

cimb44030073

Wissenschaftlicher Herausgeber: Stephen Malnick

Eingegangen: 18. Januar 2022

Angenommen: 23. Februar 2022

Veröffentlicht: 25. Februar 2022

Anmerkung des Herausgebers: MDPI bleibt in

Bezug auf Zuständigkeitsansprüche in

veröffentlichten Karten und institutionellen Zugehörigkeiten neutralen Positionen.



Urheberrecht: © 2022 bei den Autoren.

Lizenznehmer MDPI, Basel, Schweiz.

Bei diesem Artikel handelt es sich um einen Open-Access-Artikel unter den Bedingungen verteilt und

Bedingungen der Creative Commons

Namensnennungslizenz (CC BY)

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Einleitung

Die durch das schwere akute respiratorische Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) verursachte Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) wurde am 11. März 2020 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als globale Pandemie angekündigt und entwickelte sich zu einer verheerenden Gesundheitskrise. Bis Februar 2022 hat COVID-19 weltweit zu über 430 Millionen gemeldeten Infektionsfällen und 5,9 Millionen Todesfällen geführt [1]. Wirksame und sichere Impfstoffe werden dringend benötigt, um die mit COVID-19 verbundenen Morbiditäts- und Mortalitätsraten zu senken.

Es wurden mehrere Impfstoffe gegen COVID-19 entwickelt, mit besonderem Schwerpunkt auf mRNA- Impfstoffen (von Pfizer-BioNTech und Moderna), replikationsdefekten rekombinanten adenoviralen Vektorimpfstoffen (von Janssen-Johnson und Johnson, Astra-Zeneca, Sputnik-V und CanSino.) und inaktivierte Impfstoffe (von Sinopharm, Bharat Biotech und Sinovac). Der mRNA-Impfstoff hat den Vorteil, dass er flexibel und effizient bei der Entwicklung und Herstellung von Immunogenen ist. Derzeit befinden sich zahlreiche Impfstoffkandidaten in verschiedenen Entwicklungs- und Anwendungsstadien. Insbesondere wurde der von Pfizer und BioNTech entwickelte COVID-19-mRNA-Impfstoff BNT162b2 in erfolgreichen klinischen Studien evaluiert [2–4] und in nationalen COVID-19-Impfkampagnen in verschiedenen Regionen auf der ganzen Welt verabreicht.

BNT162b2 ist ein in Lipidnanopartikeln (LNP) eingekapselter, nukleosidmodifizierter RNA-Impfstoff (modRNA) und kodiert für das modifizierte SARS-CoV-2-Spike (S)-Protein in voller Länge

durch zwei Prolinmutationen, um eine antigenisch optimale Präfusionskonformation sicherzustellen, die das intakte Virus nachahmt und virusneutralisierende Antikörper hervorruft [3]. In Übereinstimmung mit randomisierten klinischen Studien zeigte BNT162b2 eine hohe Effizienz bei einer Vielzahl von COVID-19-bezogenen Ergebnissen in einer realen Umgebung [5]. Dennoch bleiben viele Herausforderungen bestehen, einschließlich der Überwachung der langfristigen Sicherheit und Wirksamkeit des Impfstoffs. Dies erfordert weitere Auswertungen und Untersuchungen. Das Sicherheitsprofil von BNT162b2 ist derzeit nur aus kurzfristigen klinischen Studien verfügbar. Weniger häufige Nebenwirkungen von BNT162b2 wurden berichtet, darunter Perikarditis, Arrhythmie, tiefe Venenthrombose, Lungenembolie, Myokardinfarkt, intrakranielle Blutung und Thrombozytopenie [4,9–20]. Es gibt auch Studien, die über unerwünschte Nebenwirkungen bei anderen Arten von Impfstoffen berichten [21–24]. Um die Mechanismen, die impfbedingten Nebenwirkungen zugrunde liegen, besser zu verstehen, sind klinische Untersuchungen sowie zelluläre und molekulare Analysen erforderlich.

Eine aktuelle Studie zeigte, dass SARS-CoV-2-RNAs revers transkribiert und in das Genom menschlicher Zellen integriert werden können [25]. Dies wirft die Frage auf, ob dies auch bei BNT162b2 auftreten kann, das für partielle SARS-CoV-2-RNA kodiert. In pharmakokinetischen Daten, die Pfizer der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zur Verfügung gestellt hat, wurde die Bioverteilung von BNT162b2 bei Mäusen und Ratten durch intramuskuläre Injektion mit radioaktiv markiertem LNP und Luciferase-modRNA untersucht. Radioaktivität wurde in den meisten Geweben ab dem ersten Zeitpunkt (0,25 Stunden) nachgewiesen, und die Ergebnisse zeigten, dass die Injektionsstelle und die Leber die Hauptverteilungsorte waren, wobei maximale Konzentrationen 8–48 Stunden nach der Dosis beobachtet wurden [26]. Darüber hinaus wurden bei Tieren, die die BNT162b2-Injektion erhielten, reversible Auswirkungen auf die Leber beobachtet, darunter eine vergrößerte Leber, Vakuolisierung, erhöhte Gamma-Glutamyltransferase (γ GT)-Spiegel und erhöhte Werte von Aspartat-Transaminase (AST) und alkalischer Phosphatase (ALP) [26]. Über vorübergehende Lebereffekte, die durch LNP-Abgabesysteme hervorgerufen werden, wurde bereits berichtet [27–30]. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass leeres LNP ohne modRNA allein keine signifikante Leberschädigung hervorruft [27]. Daher wollen wir in dieser Studie die Wirkung von BNT162b2 auf eine menschliche Leberzelllinie *in vitro* untersuchen und untersuchen, ob BNT162b2 durch endogene Mechanismen revers in DNA transkribiert werden kann.

2. Materialien und Methoden

2.1. Zellkultur

Huh7-Zellen (JCRB Cell Bank, Osaka, Japan) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit DMEM-Medium (HyClone, HYCLSH30243.01), ergänzt mit 10 % (v/v) fötalem Rinderserum (Sigma-Aldrich, F7524-), kultiviert. 500 ml, Burlington, MA, USA) und 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (HyClone, SV30010, Logan, UT, USA). Für die BNT162b2-Behandlung wurden Huh7-Zellen mit einer Dichte von 200.000 Zellen/Well in 24-Well-Platten ausgesät. Der mRNA-Impfstoff BNT162b2 (Pfizer BioNTech, New York, NY, USA) wurde mit steriler 0,9 %iger Natriumchlorid-Injektion, USP, auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt, wie in der Richtlinie des Herstellers beschrieben [31]. Anschließend wurde die BNT162b2-Suspension dem Zellkulturmedium zugesetzt, um Endkonzentrationen von 0,5, 1,0 oder 2,0 µg/ml zu erreichen. Huh7-Zellen wurden mit oder ohne BNT162b2 6, 24 und 48 Stunden lang inkubiert. Die Zellen wurden gründlich mit PBS gewaschen, durch Trypsinisierung geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.2. REAL-TIME RT-QPCR-

RNA aus den Zellen wurde mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 74134, Hilden, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Die RT-PCR wurde mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, K1622, Waltham, MA, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Echtzeit-qPCR wurde unter Verwendung von Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, K0222, Waltham, MA, USA) mit Primern für BNT162b2, LINE-1 und den Housekeeping-Genen ACTB und GAPDH durchgeführt (T

Tabelle 1. Primersequenzen von RT-qPCR und PCR.

Ziel	Reihenfolge
ACTB vorwärts	CCTCGCCTTTGCCGATCC
ACTB umgekehrt	GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC
GAPDH vorwärts	CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC
GAPDH umgekehrt	TAAAAGCAGCCCTGGTGAC
LINE-1 vorwärts	IHRE UNTERSTÜTZUNG AGGTGC
ZEILE-1 rückwärts	GATAATATCCTGCAGAGGTGT
BNT162b2 vorwärts	CGAGGTGGCCAAGAATCTGA
BNT162b2 umgekehrt	TAGGCTAAGCGTTTTGAGCTG

2.3. Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Bildgebung

Huh7-Zellen wurden in Objektträgern mit acht Kammern (LAB-TEK, 154534, Santa Cruz, CA, USA) mit einer Dichte von 40.000 Zellen/Well, mit oder ohne BNT162b2 (0,5, 1 oder 2 µg/ml) kultiviert) für 6 Stunden. Die Immunhistochemie wurde unter Verwendung des primären monoklonalen Anti-LINE-1-ORF1p -Maus-Antikörpers (Merck, 3574308, Kenilworth, NJ, USA), des sekundären Anti-Maus-Antikörpers Cy3 Donkey (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) und von Hoechst (Life) durchgeführt Technologies, 34850, Carlsbad, CA, USA), nach dem Protokoll von Thermo Fisher (Waltham, MA, USA). Zwei Bilder pro Zustand wurden mit einem Zeiss LSM 800 und einem 63X-Ölimmersionsobjektiv aufgenommen und die Färbungsintensität wurde auf der einzelnen gesamten Zellfläche und der Zellkernfläche auf 15 Zellen pro Bild mit ImageJ 1.53c quantifiziert. Die Intensität der LINE-1-Färbung für das Zytosol wurde durch Subtrahieren der Intensität des Zellkerns von der gesamten Zelle berechnet. Allen Bildern der Zellen wurde eine Zufallszahl zugewiesen, um Verzerrungen zu vermeiden. Um die Kerne (bestimmt durch die Hoechst-Färbung) und die gesamten Zellen (bestimmt durch die Grenzen der LINE-1-Fluoreszenz) zu markieren, wurde das Freehand-Auswahlwerkzeug verwendet. Diese Bereiche wurden dann gemessen und die mittlere Intensität zum Vergleich der Gruppen verwendet.

2.4. Genomische DNA-Reinigung, PCR-Amplifikation, Agarose-Gel-Reinigung und Sanger-

Sequenzierung Genomische DNA wurde aus Zellpellets mit PBNB-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,45 % NP-40, 0,45 % Tween) extrahiert (-20) gemäß dem zuvor beschriebenen Protokoll [32]. Um restliche RNA aus der DNA-Präparation zu entfernen, wurde RNase (100 µg/ml, Qiagen, Hilden, Deutschland) zur DNA-Präparation gegeben und 3 Stunden lang bei 37 °C inkubiert, gefolgt von 5 Minuten bei 95 °C. Anschließend wurde eine PCR unter Verwendung von Primern durchgeführt, die auf BNT162b2 abzielten (Sequenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt), mit dem folgenden Programm: 5 Minuten bei 95 °C, 35 Zyklen von 95 °C für 30 Sekunden, 58 °C für 30 Sekunden und 72 °C für 1 Minute; schließlich 72 °C für 5 Min. und 12 °C für 5 Min. PCR-Produkte wurden auf 1,4 % (w/v) Agarosegel laufen gelassen. Banden, die den Amplikons der erwarteten Größe (444 bps) entsprachen, wurden ausgeschnitten und die DNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, 28104, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die Sequenz des DNA-Amplikons wurde durch Sanger-Sequenzierung (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) bestimmt.

Statistiken

Statistische Vergleiche wurden mithilfe des zweiseitigen Student-t-Tests und der ANOVA durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM oder ± SD ausgedrückt. Unterschiede mit $p < 0,05$ gelten als signifikant.

2.5. Ethische Aussagen

Die Huh7-Zelllinie wurde von der Zellbank der Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) bezogen.

Die maximale biologische Wirksamkeit von LNP zwischen 4 und 7 Stunden beobachtet [33]. Daher wurden in unserer Studie Huh7-Zellen mit oder ohne steigende Konzentrationen von BNT162b2 (0,5, 1,0 und 2,0 µg/ml) für 6, 24 und 48 Stunden kultiviert. RNA wurde aus Zellen extrahiert und eine quantitative Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) in Echtzeit unter Verwendung von Primern durchgeführt, die auf die BNT162b2-Sequenz abzielen, wie in Abbildung 1 dargestellt. Die vollständige Sequenz von BNT162b2 ist öffentlich verfügbar [34] und enthält eine Zwei-Nukleotid-Kappe; 5'-untranslatierte Region (UTR), die die 5'-UTR eines menschlichen γ -Globin-Gens enthält; die **3. Ergebnisse**

Vollständiges SARS-CoV-2-S-Protein mit zwei Prolinmutationen; 3'-UTR, das 3.1 enthält. BNT162b2 dringt mit hoher Effizienz in die Zellen der menschlichen Leberzelllinie Huh7 ein das menschliche mitochondriale 12S-rRNA-Segment (mtRNR1) und das menschliche AES/TLE5-Gensegment. Um festzustellen, ob BNT162b2 in menschliche Leberzellen gelangt, haben wir menschliche Leberzellen exponiert mit zwei CyU-Mutationen; Poly(A)-Schwanz. Detaillierte Analyse der S-Protein-Sequenzlinie Huh7 bis BNT162b2. In einer früheren Studie zur Aufnahmekinetik der LNP-Abgabe in BNT162b2 wurden 124 Sequenzen gefunden, die zu 100% mit menschlichen Genomsequenzen in Huh7-Zellen identisch sind. Die maximale biologische Wirksamkeit von LNP wurde zwischen 4 und 7 Stunden beobachtet [33].

Zusätzlich wurden die steigende Konzentrationen von BNT162b2 (0,5, 1,0 und 2,0 µg/ml) für 6, 24 und 48 Stunden in Huh7-Zellen beobachtet. RNA wurde mit einer Zellkonzentration von BNT162b2 (0,5, 1,0 und 2,0 µg/ml) für 6, 24 und 48 Stunden in Huh7-Zellen beobachtet. RT-qPCR wurde durchgeführt, um die BNT162b2-Sequenz zu identifizieren. Die BNT162b2-Sequenz wurde durch RT-qPCR-Analyse dargestellt, die die vollständige Sequenz von BNT162b2 ist öffentlich verfügbar [34] und enthält eine Zwei-Nukleotid-Kappe; 5 – untranslatierte Region (UTR), die die 5-UTR eines menschlichen γ -Globin-Gens enthält. Die RT-qPCR-Ergebnisse zeigten, dass mit BNT162b2 behandelte Huh7-Zellen hohe Mengen an SARS-CoV-2 S-Protein in voller Länge mit zwei Prolinmutationen aufwiesen; 3 -UTR, das enthält BNT162b2-mRNA im Vergleich zu Housekeeping-Genen nach 6, 24 und 48 Stunden (Abbildung 2 zeigt das humane mitochondriale 12S-rRNA-Segment (mtRNR1) und das humane AES/TLE5-Gen in protokolliert 2 \times CT aufgrund außergewöhnlich hoher Werte). Die drei BNT162b2-Konzentrationen führten zum Segment mit zwei CyU-Mutationen, Poly(A)-Schwanz. Detaillierte Analyse der S-Protein-Sequenz zu ähnlichen intrazellulären BNT162b2-mRNA-Spiegeln zu den verschiedenen Zeitpunkten, mit der Ausnahme, dass in BNT162b2 124 Sequenzen entdeckt wurden, die zu 100% mit menschlichen Genomsequenzen identisch sind.

Der signifikante Unterschied zwischen 1,0 und 2,0 µg/ml wurde nach 48 Stunden beobachtet. BNT162b2 und drei Sequenzen mit nur zwei Mutationen. Die BNT162b2-RNA-Spiegel sanken zuweilen ab, stiegen jedoch wieder an. Die Werte waren nach 24 Stunden im Vergleich zu 6 Stunden deutlich gesunken, stiegen jedoch nach 48 Stunden wieder an.

Dies ermöglicht den Nachweis von PCR-Amplikons, die nur für BNT162b2 gelten, ohne unspezifische Bindung der Primer auf menschliche Genomregionen.

BNT162b2 sequence (4284 bases)



PCR amplicon (444 bases)

Abbildung 1. PCR-Primer-Set zum Nachweis des mRNA-Spiegels und der reversen Transkription von BNT162b2. Illustration der BNT162b2-Sequenz mit dem PCR-Primer-Set zum Nachweis des mRNA-Spiegels und der reversen Transkription von BNT162b2. Die Behandlung von BNT162b2 wurde aus zuvor beschriebener Literatur übernommen [34].

RT-qPCR-Ergebnisse zeigten, dass mit BNT162b2 behandelte Huh7-Zellen hohe Werte aufwiesen BNT162b2-mRNA im Verhältnis zu Housekeeping-Genen nach 6, 24 und 48 Stunden (Abbildung 2, dargestellt in protokolliert 2 \times CT aufgrund außergewöhnlich hoher Werte). Die drei BNT162b2-Konzentrationen führten zu ähnlichen intrazellulären BNT162b2-mRNA-Spiegeln zu den verschiedenen Zeitpunkten, mit der Ausnahme, dass die Nach 48 Stunden wurde ein signifikanter Unterschied zwischen 1,0 und 2,0 µg/ml beobachtet. BNT162b2-mRNA Die Werte waren nach 24 Stunden im Vergleich zu 6 Stunden deutlich gesunken, stiegen jedoch nach 48 Stunden wieder an.

Als nächstes untersuchten wir die Wirkung von BNT162b2 auf den LINE-1-Proteinspiegel. Die abendfüllende LINE-1 in voller Länge besteht aus einer 5' untranslatierten Region (UTR), zwei offenen Leserähmen (ORFs), ORF1 und ORF2 und ein 3' UTR, von dem ORF1 ein RNA-bindendes Protein mit Chaperon-Aktivität ist. Es wurde gezeigt, dass die Retrotranspositionsfähigkeit von LINE-1 eine ORF1-Translokation in den Zellkern beinhaltet [35]. Huh7-Zellen, die 6 Stunden lang mit oder ohne BNT162b2 (0,5, 1,0, 1,0 und 2,0 µg/ml) behandelt wurden, wurden fixiert und mit antikLINE-1- und antikDAPI gefärbt. ORF1 und DNA-spezifische Sonden wurden zur Visualisierung des Zellkerns (Abbildung 4a) verwendet. Die Quantifizierung der Intensität der Immunfluoreszenz ergab, dass BNT162b2 die Konzentrationen von LINE-1 im gesamten Zellbereich sowie im Zellkern erhöht (Abbildung 4b-d).

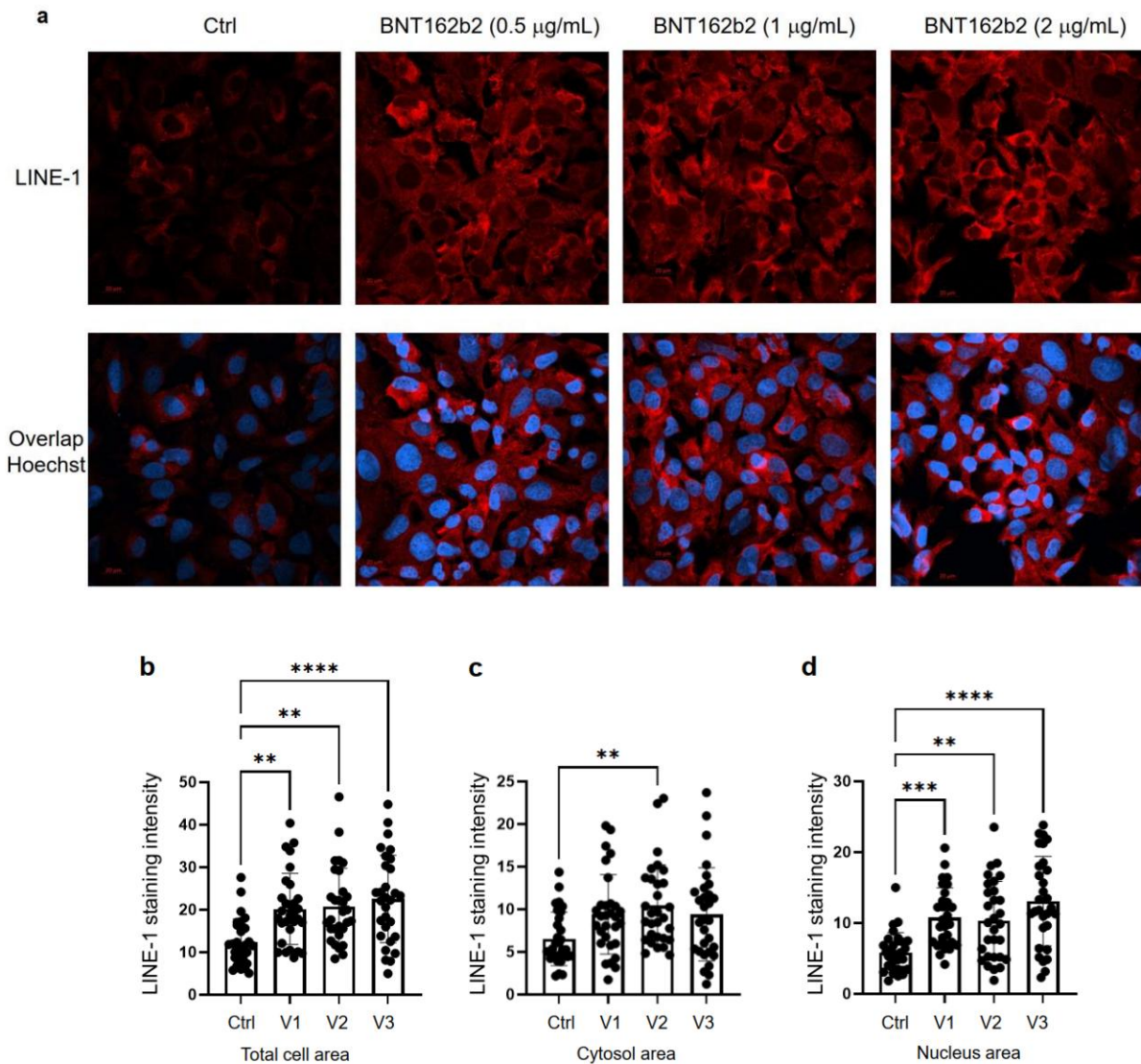


Abbildung 4. Immunhistochemie von mit BNT162b2 behandelten Huh7-Zellen auf der LINE-1-Proteinverteilung. Huh7-Zellen wurden 6 Stunden lang ohne (Strg) oder mit 0,5, 1, und 2 µg/ml BNT162b2 behandelt. Zellen waren fixiert und mit antikLINE-1- und antikDAPI gefärbt, um die LINE-1- und DNA-spezifischen Sonden zur Visualisierung des Zellkerns (a) und die LINE-1-Replicative Intermediate-Bildung (b) in Huh7-Zellen ohne BNT162b2-Behandlung (b) und die Quantifizierung von LINE-1-Protein in Zellkern (c) und Cytoplasma (d) zu zeigen. Alle Daten wurden mit Hilfe einer einfaktoriellem ANOVA und Diagramm (b) wurden mit GraphPad Prism V.9.2 erstellt. Alle Daten werden als Mittelwert ± SD (** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 wie angegeben).

6, 24 und 48 Stunden lang mit 0,5 µg/ml BNT162b2 behandelt. Gereinigte DNA wurde mit RNase behandelt, um RNA zu entfernen, und einer PCR unter Verwendung von Primern unterzogen, die auf BNT162b2 abzielten, wie in Abbildung 1 dargestellt. Amplifizierte DNA-Fragmente wurden dann durch Elektrophorese sichtbar gemacht und gelgereinigt (Abbildung 5). Zu allen drei Zeitpunkten wurden BNT162b2-DNA-Amplifikate nachgewiesen (6, 24 und 48 Stunden). Die Sanger-Sequenzierung bestätigte, dass die DNA-Amplifikate identisch waren die von den Primern flankierte BNT162b2-Sequenz (Tabelle 2). Um sicherzustellen, dass die DNA-Amplifikate von DNA, aber nicht von BNT162b2-RNA stammten, führten wir auch eine PCR mit RNA 3.3 durch. Nachweis von BNT162b2-DNA-Amplifikaten in Huh7-Zellen, die mit 0,5 µg/ml BNT162b2 behandelt wurden, mit oder ohne RNase-Behandlung (Strg5 und Strg6) bestätigte, dass die DNA-Amplifikate nicht durch Reverse Transkription [35]. Im beschriebenen Immunfluoreszenz-Färbungsexperiment oben wurden bereits am niedrigsten erhöhte LINE-1-Spiegel im Zellkern beobachtet (Tabelle 2). Sanger-Sequenzierung des BNT162b2-Amplifiers

CGAGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAAGTGGGAAGT
 ACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTG
 GCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGA
 AGGGCGTGAAACTGCACTACACATGATGACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTA
 GCTGCCCTTTCCCGTCTGGGTACCCCGAGTCTCCCGGACCTCGGGTCCCAGGTATGC
 TCCACCTCCACCTGCCCACTACACCTCTGCTAGTCCAGACACCTCCCAAGCAGCGC
 AGCAATGCAGCTCAAACGCTTAGCCCTA

in DNA, wenn LINE-1 erhöht ist, haben wir gereinigte genomische DNA aus behandelten Huh7-Zellen mit 0,5 µg/ml BNT162b2 für 6, 24 und 48 Stunden. Gereinigte DNA wurde mit RNase behandelt und einer PCR unter Verwendung von Primern unterzogen, die auf BNT162b2 abzielen, wie dargestellt und über ein Gel gereinigt (Abbildung 5). BNT162b2-DNA-Amplifikate wurden zu allen drei Zeitpunkten nachgewiesen (6, 24 und 48 h). Die Sanger-Sequenzierung bestätigte, dass die DNA-Amplifikate mit denen identisch waren, die in Abbildung 1 und Tabelle 2 gezeigt werden. Um sicherzustellen, dass die DNA-Amplifikate nicht von BNT162b2-RNA abgeleitet sind, führten wir auch eine PCR mit gereinigter RNA durch (Strg5 und Strg6) und in den untersuchten RNA-Proben wurde kein Amplifikat nachgewiesen zur PCR.

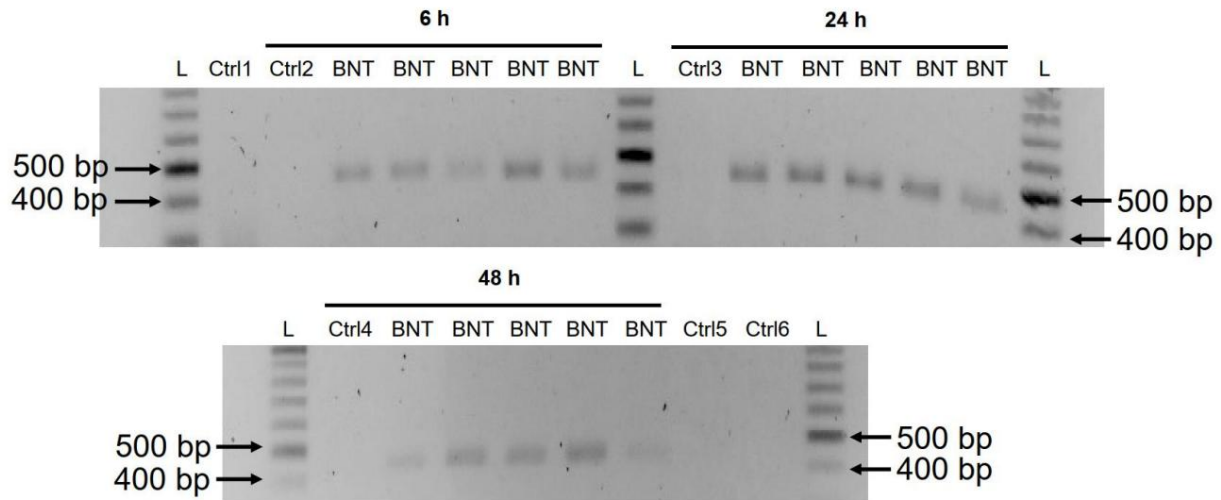


Abbildung 5. Nachweis von DNA-Amplifikons von BNT162b2 in mit BNT162b2 behandelten Huh7-Zellen. Huh7-Zellen wurden für 6, 24 und 48 Stunden lang ohne BNT162b2 (Strg1) oder mit 0,5 µg/ml BNT162b2 (Strg2) behandelt. Genomische DNA wurde gereinigt. Primern 100 ng gel. RNase-Behandlung. Die PCR wurde in einer PCR-Mischung mit 100 µg/ml RNase durchgeführt. BNT162b2-DNA-Amplifikate wurden durch Elektrophorese sichtbar gemacht. Strg1: Kultivierte Huh7-Zellen; Strg2: Huh7-Zellen ohne BNT162b2; Strg3: Huh7-Zellen ohne BNT162b2-Behandlung, gesammelt nach 6 Stunden; Strg4: Huh7-Zellen ohne BNT162b2-Behandlung, gesammelt nach 24 Stunden; Strg5: Huh7-Zellen ohne BNT162b2-Behandlung, gesammelt nach 48 Stunden; Strg6: RNA aus Huh7-Zellen ohne BNT162b2-Behandlung, gesammelt nach 6 Stunden; Strg7: RNA aus Huh7-Zellen, behandelt mit 0,5 µg/ml BNT162b2 für 6 Stunden; Strg8: RNA aus Huh7-Zellen, behandelt mit 0,5 µg/ml BNT162b2 für 6 Stunden, verdaut mit RNase.

Tabelle 2. Sanger-Sequenzierungsergebnis des BNT162b2-Amplifikons.

CGAGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAAGTGGGAAGT
 ACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTG
 CCATCGTGATGGTACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGG
 GCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGA
 AGGGCGTGAAACTGCACTACACATGATGACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTA
 GCTGCCCTTTCCCGTCTGGGTACCCCGAGTCTCCCGGACCTCGGGTCCCAGGTATGC
 TCCACCTCCACCTGCCCACTACACCTCTGCTAGTCCAGACACCTCCCAAGCAGCGC
 AGCAATGCAGCTCAAACGCTTAGCCCTA

4. Diskussion

In dieser Studie legen wir Beweise dafür vor, dass der COVID-19-mRNA-Impfstoff BNT162b2 in vitro in die menschliche Leberzelllinie Huh7 eindringen kann. BNT162b2-mRNA wird bereits 6 Stunden nach der BNT162b2-Exposition intrazellulär revers in DNA transkribiert. Ein möglicher Mechanismus für die Reverse Transkription ist die endogene Reverse Transkriptase LINE-1, und die Kernproteinverteilung von LINE-1 wird durch BNT162b2 erhöht.

Eine intrazelluläre Akkumulation von LNP in Hepatozyten wurde in vivo nachgewiesen [36]. Eine präklinische Studie zu BNT162b2 zeigte, dass BNT162b2 in die Zellen der menschlichen Zelllinie HEK293T eindringt und zu einer robusten Expression des BNT162b2-Antigens führt [37]. Daher untersuchten wir in dieser Studie zunächst den Eintritt von BNT162b2 in die Zellen der menschlichen Leberzelllinie Huh7. Die Wahl der in dieser Studie verwendeten BNT162b2-Konzentrationen bedarf einer Erklärung. BNT162b2 wird in einer Reihe von zwei Dosen im Abstand von drei Wochen verabreicht, und jede Dosis enthält 30 µg BNT162b2 in einem Volumen von 0,3 ml, wodurch die lokale Konzentration an der Injektionsstelle höchstens 100 µg/ml beträgt [31]. Eine frühere Studie zu mRNA-Impfstoffen gegen die Influenzaviren H10N8 und H7N9 unter Verwendung eines ähnlichen LNP-Abgabesystems zeigte, dass sich der mRNA-Impfstoff eher unspezifisch auf mehrere Organe wie Leber, Milz, Herz, Niere, Lunge und Gehirn verteilen kann und dass die Konzentration in den Leberzellen etwa 100-mal niedriger als die der intramuskulären Injektionsstelle [38]. Im Bewertungsbericht zu BNT162b2, der der EMA von Pfizer vorgelegt wurde, zeigten die pharmakokinetischen Verteilungsstudien an Ratten, dass sich ein relativ großer Anteil (bis zu 18 %) der Gesamtdosis in der Leber verteilt [26]. Wir entschieden uns daher für die Verwendung von 0,5, 1 und 2 µg/ml Impfstoff in unseren Experimenten an den Leberzellen.

Allerdings sollte die Wirkung eines breiteren Spektrums niedrigerer und höherer Konzentrationen von BNT162b2 auch in zukünftigen Studien überprüft werden.

In der aktuellen Studie verwendeten wir eine menschliche Leberzelllinie für die In-vitro-Untersuchung. Es lohnt sich zu untersuchen, ob die Leberzellen auch das aus dem Impfstoff stammende SARS-CoV-2-Spike-Protein aufweisen, was die Leberzellen möglicherweise zu Zielen für zuvor vorbereitete Spike-Protein-reaktive zytotoxische T-Zellen machen könnte. Es liegen Fallberichte über Personen vor, die nach der BNT162b2-Impfung eine Autoimmunhepatitis entwickelten [39]. Um ein besseres Verständnis der möglichen Auswirkungen von BNT162b2 auf die Leberfunktion zu erhalten, sind In-vivo-Modelle für zukünftige Studien wünschenswert.

Im BNT162b2-Toxizitätsbericht wurden weder Genotoxizitäts- noch Karzinogenitätsstudien vorgelegt [26]. Unsere Studie zeigt, dass BNT162b2 in der Leberzelllinie Huh7 revers in DNA transkribiert werden kann, und dies könnte Anlass zur Sorge geben, ob von BNT162b2 abgeleitete DNA in das Wirtsgenom integriert werden und die Integrität der genomischen DNA beeinträchtigen könnte, was möglicherweise genotoxisch sein könnte Nebenwirkungen. Zum jetzigen Zeitpunkt wissen wir nicht, ob die von BNT162b2 revers transkribierte DNA in das Zellgenom integriert ist. Weitere Studien sind erforderlich, um die Wirkung von BNT162b2 auf die genomische Integrität zu belegen, einschließlich der Sequenzierung des gesamten Genoms von Zellen, die BNT162b2 ausgesetzt waren, sowie von Geweben von menschlichen Probanden, die eine BNT162b2-Impfung erhalten haben.

Das menschliche autonome Retrotransposon LINE-1 ist eine zelluläre endogene Reverse-Transkriptase und das einzige verbleibende aktive Transposon beim Menschen, das sich selbst und andere nichtautonome Elemente retrotransponieren kann [40,41], und ~17 % des menschlichen Genoms bestehen aus LINE-1-Sequenzen [42]. Die nichtautonomen Alu-Elemente, kurze, eingestreute Nukleotidelemente (SINEs), Variable-Number-of-Tandem-Repeats (VNTR) sowie zelluläre mRNA-prozessierte Pseudogene werden durch die in trans wirkenden LINE-1-Retrotranspositionsproteine retrotransponiert [43,44]. Eine aktuelle Studie zeigte, dass endogenes LINE-1 die reverse Transkription und Integration von SARS-CoV-2-Sequenzen in das Genom infizierter menschlicher Zellen vermittelt [25]. Darüber hinaus ist die Expression von endogenem LINE-1 häufig bei einer Virusinfektion, einschließlich einer SARS-CoV-2-Infektion, erhöht [45–47]. Frühere Studien zeigten, dass die Retrotranspositionsaktivität von LINE-1 durch den RNA-Metabolismus [48,49], die Reaktion auf DNA-Schäden [50] und die Autophagie [51] reguliert wird. Eine effiziente Retrotransposition von LINE-1 ist häufig mit dem Zellzyklus und dem Abbau der Kernhülle während der Mitose [52,53] sowie mit exogenen Retroviren [54,55] verbunden, was den Eintritt von LINE-1 in den Zellkern fördert. In unserer Studie beobachteten wir eine erhöhte LINE-1-ORF1p-Verteilung, wie durch immunhistochemische Untersuchungen bestimmt.

Chemie im Zellkern durch BNT162b2 bei allen getesteten Konzentrationen (0,5, 1 und 2 µg/ml), während bei der höchsten BNT162b2-Konzentration (2 µg/ml) eine erhöhte LINE-1-Genexpression festgestellt wurde. Es ist erwähnenswert, dass die Gentranskription durch Chromatinmodifikationen, die Regulierung des Transkriptionsfaktors und die Geschwindigkeit des RNA-Abbaus reguliert wird, während die translationale Proteinregulierung die Rekrutierung von Ribosomen am Startcodon, die Modulation der Peptidverlängerung, die Beendigung der Proteinsynthese usw. umfasst Ribosomenbiogenese. Diese beiden Prozesse werden durch unterschiedliche Mechanismen gesteuert und zeigen daher möglicherweise nicht immer die gleichen Änderungsmuster als Reaktion auf externe Herausforderungen. Die genaue Regulierung der LINE-1-Aktivität als Reaktion auf BNT162b2 verdient weitere Untersuchungen.

Das Zellmodell, das wir in dieser Studie verwendet haben, ist eine Karzinomzelllinie mit aktiver DNA-Replikation, die sich von sich nicht teilenden somatischen Zellen unterscheidet. Es wurde auch gezeigt, dass Huh7-Zellen deutlich unterschiedliche Gen- und Proteinexpressionen aufweisen, einschließlich hochregulierter Proteine, die am RNA-Metabolismus beteiligt sind [56]. Die Zellproliferation ist jedoch auch in mehreren menschlichen Geweben wie dem Knochenmark oder den Basalschichten von Epithelzellen sowie während der Embryogenese aktiv. Daher ist es notwendig, die Wirkung von BNT162b2 auf die genomische Integrität unter solchen Bedingungen zu untersuchen. Darüber hinaus wurde auch über eine wirksame Retrotransposition von LINE-1 in sich nicht teilenden und terminal differenzierten Zellen wie menschlichen Neuronen berichtet [57,58].

Der EMA-Bewertungsbericht von Pfizer zeigte auch, dass sich BNT162b2 in der Milz (<0,1 %) und den Nebennieren (<0,1 %) verteilt und eine geringe und messbare Radioaktivität in den Eierstöcken und Hoden (<0,1 %) aufweist [26]. Darüber hinaus sind im Bewertungsbericht der EMA von Pfizer keine Daten zur Plazentaübertragung von BNT162b2 verfügbar. Unsere Ergebnisse zeigten, dass BNT162b2-mRNA leicht in Huh7-Zellen in einer Konzentration (0,5 µg/ml) eindringt, die 0,5 % der Konzentration an der lokalen Injektionsstelle entspricht, Veränderungen in der LINE-1-Gen- und Proteinexpression induziert und innerhalb von 6 Stunden die umgekehrte Transkription von BNT162b2 auslöst erkannt werden kann. Daher ist es wichtig, die Wirkung von BNT162b2 auf andere Zelltypen und Gewebe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weiter zu untersuchen.

5. Schlussfolgerungen

Unsere Studie ist die erste *In-vitro*-Studie zur Wirkung des COVID-19-mRNA-Impfstoffs BNT162b2 auf die menschliche Leberzelllinie. Wir präsentieren Beweise für den schnellen Eintritt von BNT162b2 in die Zellen und die anschließende intrazelluläre reverse Transkription von BNT162b2-mRNA in DNA.

Ergänzende Materialien: Die folgenden unterstützenden Informationen können heruntergeladen werden unter: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cimb44030073/s1>.

Autorenbeiträge: MA, FOF, DY, MB und CL führten *In-vitro*-Experimente durch. MA und FOF führten eine Datenanalyse durch. MR und YDM trugen zur Umsetzung der Forschung bei, konzipierten und überwachten die Studie. YDM hat den Artikel mit Beiträgen aller Autoren verfasst. Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und ihr zugestimmt.

Finanzierung: Diese Studie wurde vom schwedischen Forschungsrat, Strategic Research Area Exodiab, Dnr 2009-1039, dem schwedischen Regierungsfonds für klinische Forschung (ALF) und der Stiftung des Universitätskrankenhauses Skåne unterstützt.

Erklärung des Institutional Review Board: Nicht anwendbar.

Einverständniserklärung: Nicht anwendbar.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit: Alle Daten, die die Ergebnisse dieser Studie stützen, sind im Artikel und in den unterstützenden Informationen verfügbar.

Danksagungen: Die Autoren danken Sven Haidl, Maria Josephson, Enming Zhang, Jia-Yi Li, Caroline Haikal und Pradeep Bompada für ihre Unterstützung dieser Studie.

Interessenkonflikte: Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Verweise

1. Weltgesundheitsorganisation. Coronavirus (COVID-19)-Dashboard. Online verfügbar: <https://covid19.who.int/> (abgerufen am 22. Februar 2022).
2. Mulligan, MJ; Lyke, ich; Kitchin, N.; Absalom, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Rabe, V.; Bailey, R.; Swanson, Kalifornien; et al. Phase-II-Studie zum COVID-19-RNA-Impfstoff BNT162b1 bei Erwachsenen. *Natur* **2020**, 586, 589–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Walsh, EE; Frenck, RW, Jr.; Falsey, AR; Kitchin, N.; Absalom, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Mulligan, MJ; Bailey, R.; et al. Sicherheit und Immunogenität von zwei RNA-basierten COVID-19-Impfstoffkandidaten. *N. engl. J. Med.* **2020**, 383, 2439–2450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalom, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, JL; Perez Marc, G.; Moreira, ED; Zerbini, C.; et al. Sicherheit und Wirksamkeit des BNT162b2-mRNA-COVID-19-Impfstoffs. *N. engl. J. Med.* **2020**, 383, 2603–2615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Harris, RJ; Hall, JA; Zaidi, A.; Andrews, NJ; Dunbar, JK; Dabrera, G. Auswirkung der Impfung auf die Übertragung von SARS-CoV-2 in England. *N. engl. J. Med.* **2021**, 385, 759–760. [[CrossRef](#)]
6. Hintern, AA; Omer, SB; Yan, P.; Shaikh, OS; Mayr, FB SARS-CoV-2-Impfstoffwirksamkeit in einer nationalen Hochrisikopopulation in einer realen Umgebung. *Ann. Praktikum. Med.* **2021**, 174, 1404–1408. [[CrossRef](#)]
7. Dagan, N.; Barda, N.; Kepten, E.; Miron, O.; Perchik, S.; Katz, MA; Hernan, MA; Lipsitch, M.; Reis, B.; Balicer, RD BNT162b2 mRNA Covid-19-Impfstoff in einer landesweiten Massenimpfungsumgebung. *N. engl. J. Med.* **2021**, 384, 1412–1423. [[CrossRef](#)]
8. Rossman, H.; Shilo, S.; Meir, T.; Gorfine, M.; Shalit, U.; Segal, E. COVID-19-Dynamik nach einem nationalen Impfprogramm in Israel. *Nacht. Mit.* **2021**, 27, 1055–1061. [[CrossRef](#)]
9. Fan, BE; Shen, JY; Lim, XR; Tu, TM; Chang, CCR; Khin, HSW; Koh, JS; Rao, JP; Lau, SL; Tan, GB; et al. Hirnvenenthrombose nach BNT162b2-mRNA-SARS-CoV-2-Impfung: Ein schwarzes Schwan-Ereignis. *Bin. J. Hämatol.* **2021**, 96, E357–E361. [[CrossRef](#)]
10. Larson, K.F.; Ammirati, E.; Adler, E.D.; Cooper, L.T., Jr.; Hong, K.N.; Saponara, G.; Couri, D.; Cereda, A.; Procopio, A.; Cavalotti, C.; et al. Myokarditis nach BNT162b2- und mRNA-1273-Impfung. *Auflage* **2021**, 144, 506–508. [[CrossRef](#)]
11. Menni, C.; Klaser, K.; May, A.; Polidori, L.; Capdevila, J.; Louca, P.; Sudre, CH; Nguyen, LH; Drew, DA; Merino, J.; et al. Impfnebenwirkungen und SARS-CoV-2-Infektion nach Impfung bei Nutzern der COVID Symptom Study App im Vereinigten Königreich: Eine prospektive Beobachtungsstudie. *Lanzetteninfektion. Dis.* **2021**, 21, 939–949. [[CrossRef](#)]
12. Hansen, T.; Titze, U.; Kulamadayil-Heidenreich, N.S.A.; Glombitza, S.; Tebbe, J.J.; Rocken, C.; Schulz, B.; Weise, M.; Wilkens, L. Erster Fall einer postmortalen Studie an einem gegen SARS-CoV-2 geimpften Patienten. *Int. J. Infizieren. Dis.* **2021**, 107, 172–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kadali, RAK; Janagama, R.; Peruru, S.; Malayala, SV Nebenwirkungen des mRNA-COVID-19-Impfstoffs BNT162b2: Eine randomisierte Querschnittsstudie mit detaillierten selbstberichteten Symptomen von Mitarbeitern des Gesundheitswesens. *Int. J. Infizieren. Dis.* **2021**, 106, 376–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Parkash, O.; Sharko, A.; Farooqi, A.; Ying, GW; Sura, P. Akute Pankreatitis: Eine mögliche Nebenwirkung des COVID-19-Impfstoffs. *Cureus* **2021**, 13, e14741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mazzatenta, C.; Piccolo, V.; Tempo, G.; Romano, I.; Argentiano, G.; Bassi, A. Purpurische Läsionen an den Augenlidern entwickelten sich nach der BNT162b2-mRNA-COVID-19-Impfung: Ein weiteres Teil des SARS-CoV-2-Hautpuzzles? *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2021**, 35, e543–e545. [[CrossRef](#)]
16. Lee, EJ; Cines, DB; Gernsheimer, T.; Kessler, C.; Michel, M.; Tarantino, MD; Sample, JW; Arnold, DM; Godeau, B.; Lambert, Abgeordneter; et al. Thrombozytopenie nach Pfizer- und Modern SARS-CoV-2-Impfung. *Bin. J. Hämatol. Rev.* **2021**, 96, 534–537. [[CrossRef](#)]
17. Ishay, Y.; Kenig, A.; Tsemach-Toren, T.; Amer, R.; Rubin, L.; Hershkovitz, Y.; Kharouf, F. Autoimmunphänomene im Folgenden SARS-CoV-2-Impfung. *Int. Immunopharmakol.* **2021**, 99, 107970. [[CrossRef](#)]
18. Das, BB; Kohli, U.; Ramachandran, P.; Nguyen, HH; Greil, G.; Hussain, T.; Tandon, A.; Kane, C.; Avula, S.; Duru, C.; et al. Myoperikarditis nach mRNA-COVID-19-Impfung bei Jugendlichen im Alter von 12 bis 18 Jahren. *J. Pädiatr.* **2021**, 238, 26–32.e1. [[CrossRef](#)]
19. McLaurin-Jiang, S.; Garner, CD; Krusch, K.; Hale, TW Symptome von Mutter und Kind nach der COVID-19-Impfung unter Stillende Mütter. *Stillen. Med.* **2021**, 16, 702–709. [[CrossRef](#)]
20. Barda, N.; Hagan, N.; Ben-Shlomo, Y.; Kapitän, E.; Waxman, J.; Ohana, R.; Hernan, MA; Lipsitch, M.; Kohane, I.; Netzer, D.; et al. Sicherheit des BNT162b2-mRNA-Covid-19-Impfstoffs in einer landesweiten Umgebung. *N. engl. J. Med.* **2021**, 385, 1078–1090. [[CrossRef](#)]
21. Baden, L.R.; El Sahly, HM; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, SA; Rouphael, N.; Creech, CB; et al. Wirksamkeit und Sicherheit des mRNA-1273 SARS-CoV-2-Impfstoffs. *N. engl. J. Med.* **2021**, 384, 403–416. [[CrossRef](#)]
22. Sadoff, J.; Gray, G.; Vandebosch, A.; Cardenas, V.; Shukarev, G.; Grinsztejn, B.; Göpfert, PA; Truyers, C.; Fennema, H.; Spiessens, B.; et al. Sicherheit und Wirksamkeit des Einzeldosis-Impfstoffs Ad26.COV2.S gegen Covid-19. *N. engl. J. Med.* **2021**, 384, 2187–2201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Eichinger, S.; Warkentin, TE; Greinacher, A. Thrombotische Thrombozytopenie nach ChAdOx1 nCoV-19-Impfung. *Antwort. N. engl. J. Med.* **2021**, 385, e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Doroffei, B.; Ciobica, A.; Ilie, OD; Maftei, R.; Ilea, C. Mini-Rezension über die Zuverlässigkeit und Effizienz von COVID-19-Impfstoffen. *Diagnostik* **2021**, 11, 579. [[CrossRef](#)]

25. Zhang, L.; Richards, A.; Barrasa, MI; Hughes, SH; Jung, RA; Jaenisch, R. Reverse transkribierte SARS-CoV-2-RNA kann sich in das Genom kultivierter menschlicher Zellen integrieren und in vom Patienten stammenden Geweben exprimiert werden. *Proz. Natl. Acad. Wissenschaft. USA* **2021**, 118, e2105968118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Online verfügbar: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_de.pdf (abgerufen am 24. Februar 2022).
27. Tanaka, H.; Takata, N.; Sakurai, Y.; Yoshida, T.; Inoue, T.; Tamagawa, S.; Nakai, Y.; Tange, K.; Yoshioka, H.; Maeki, M.; et al. Abgabe von Oligonukleotiden mithilfe eines selbstabbaubaren lipidähnlichen Materials. *Pharmazie* **2021**, 13, 544. [[CrossRef](#)]
28. Sedic, M.; Senn, JJ; Lynn, A.; Laska, M.; Smith, M.; Platz, SJ; Bolen, J.; Hoge, S.; Bulychev, A.; Jacquinet, E.; et al. Sicherheitsbewertung von mit Lipid-Nanopartikeln formulierter modifizierter mRNA bei Sprague-Dawley-Ratten und Cynomolgus-Affen. *Tierarzt. Pathol.* **2018**, 55, 341–354. [[CrossRef](#)]
29. Sato, Y.; Matsui, H.; Yamamoto, N.; Sato, R.; Munakata, T.; Kohara, M.; Harashima, H. Die hochspezifische Abgabe von siRNA an Hepatozyten umgeht die durch Endothelzellen vermittelte Toxizität, die mit Lipid-Nanopartikeln verbunden ist, was zu einer sicheren und wirksamen Verringerung des Hepatitis-B-Virus führt. *J. Kontrolle. Veröffentlichung* **2017**, 266, 216–225. [[CrossRef](#)]
30. Heidel, JD; Yu, Z.; Liu, JY; Rele, SM; Liang, Y.; Zeidan, RK; Kornbrust, DJ; Davis, ME Verabreichung steigender intravenöser Dosen gezielter Nanopartikel, die siRNA der Ribonukleotidreduktase-Untereinheit M2 enthalten, an nichtmenschliche Primaten. *Proz. Natl. Acad. Wissenschaft. USA* **2007**, 104, 5715–5721. [[CrossRef](#)]
31. Online verfügbar: <https://www.cvdvaccine-us.com/> (abgerufen am 24. Februar 2022).
32. Online verfügbar: [http://bridgeslab.sph.umich.edu/protocols/index.php/Preparation_of_Tail_Samples_\(for_Genotyping\)](http://bridgeslab.sph.umich.edu/protocols/index.php/Preparation_of_Tail_Samples_(for_Genotyping)) (abgerufen am 24. Februar 2022).
33. Gallud, A.; Munson, MJ; Liu, K.; Idström, A.; Barriga, HM; Tabaei, S.; Aliakbarinodehi, N.; Ojansivu, M.; Lubart, Q.; Douth, JJ; et al. Die zeitliche Entwicklung der PEG-Ausscheidung und der Serumprotein-Koronierung bestimmt die Zellaufnahmekinetik und die Abgabe von Lipid-Nanopartikeln. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
34. Messenger-RNA der Weltgesundheitsorganisation, die für das SARS-CoV-2-Spike-Glykoprotein voller Länge kodiert. 2020. Online verfügbar: <https://web.archive.org/web/20210105162941/https://mednet-communities.net/inn/db/media/docs/11889.doc> (abgerufen am 24. Februar 2022).
35. Meter, P.; Wudzinska, A.; Sun, X.; Andrade, J.; Nayak, S.; Kahler, DJ; Badri, S.; LaCava, J.; Überheide, B.; Yun, CY; et al. LINIE 1 Proteinlokalisierung und funktionelle Dynamik während des Zellzyklus. *Elife* **2018**, 7, e30058. [[CrossRef](#)]
36. Sato, Y.; Kinami, Y.; Hashiba, K.; Harashima, H. Unterschiedliche Kinetiken für die hepatische Aufnahme von Lipid-Nanopartikeln zwischen dem Apolipoprotein E/Low Density Lipoprotein-Rezeptor und dem N-Acetyl-d-Galactosamin/Asialoglycoprotein-Rezeptorweg. *J. Kontrolle. Veröffentlichung* **2020**, 322, 217–226. [[CrossRef](#)]
37. Vogel, AB; Kanevsky, I.; Che, Y.; Swanson, KA; Muik, A.; Vormehr, M.; Kranz, LM; Walzer, KC; Hein, S.; Güler, A.; et al. BNT162b-Impfstoffe schützen Rhesusaffen vor SARS-CoV-2. *Natur* **2021**, 592, 283–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bahl, K.; Senn, JJ; Yuzhakov, O.; Bulychev, A.; Brito, LA; Hassett, KJ; Laska, ME; Smith, M.; Almarsson, O.; Thompson, J.; et al. Präklinischer und klinischer Nachweis der Immunogenität von mRNA-Impfstoffen gegen die Influenzaviren H10N8 und H7N9. *Mol. Dort.* **2017**, 25, 1316–1327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Brill, F.; Al Diffalha, S.; Dean, M.; Fettig, DM Autoimmunhepatitis entwickelt sich nach Coronavirus-Erkrankung 2019 (COVID-19) Impfstoff: Kausalität oder Unfall? *J. Hepatol.* **2021**, 75, 222–224. [[CrossRef](#)]
40. Kazazian, HH, Jr.; Moran, JV Mobile DNA in Gesundheit und Krankheit. *N. engl. J. Med.* **2017**, 377, 361–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sarg, JM; Fan, H. Die Entdeckung der Reverse Transkriptase. *Annu. Rev. Virol.* **2016**, 3, 29–51. [[CrossRef](#)]
42. Lander, ES; Linton, LM; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, MC; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; et al. Erste Sequenzierung und Analyse des menschlichen Genoms. *Nature* **2001**, 409, 860–921. [[CrossRef](#)]
43. Ostertag, EM; Goodier, JL; Zhang, Y.; Kazazian, HH, Jr. SVA-Elemente sind nichtautonome Retrotransposons, die beim Menschen Krankheiten verursachen. *Hum. Genet.* **2003**, 73, 1444–1451. [[CrossRef](#)]
44. Hancks, DC; Kazazian, HH, Jr. Aktive menschliche Retrotransposons: Variation und Krankheit. *Curr. Meinung. Genet. Entwickler* **2012**, 22, 191–203. [[CrossRef](#)]
45. Jones, RB; Lied, H.; Xu, Y.; Garrison, KE; Buzdin, AA; Anwar, N.; Hunter, DV; Mujib, S.; Mihajlovic, V.; Martin, E.; et al. Die DNA des retrotransponierbaren LINE-1-Elements reichert sich in HIV-1-infizierten Zellen an. *J. Virol.* **2013**, 87, 13307–13320. [[CrossRef](#)]
46. Macchietto, MG; Langlois, RA; Shen, SS Virusinduzierte Hochregulierung der Expression transponierbarer Elemente bei Mensch und Maus Wirtszellen. *Lebenswissenschaft. Allianz* **2020**, 3, e201900536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Yin, Y.; Liu, XZ; Er, X.; Zhou, LQ Exogenes Coronavirus interagiert mit endogenem Retrotransposon in menschlichen Zellen. *Vorderseite. Zellinfektion. Mikrobiol.* **2021**, 11, 609160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Belancio, Vizepräsident; Roy-Engel, AM; Deininger, P. Der Einfluss mehrerer Spleißstellen in menschlichen L1-Elementen. *Gene* **2008**, 411, 38–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Dai, L.; Taylor, MS; O'Donnell, KA; Boeke, JD Poly(A)-bindendes Protein C1 ist für eine effiziente L1-Retrotransposition und essentiell beeinflusst die L1-RNP-Bildung. *Mol. Zellbiol.* **2012**, 32, 4323–4336. [[CrossRef](#)]
50. Servant, G.; Strevva, V.A.; Derbes, R.S.; Wijetunge, M.I.; Neeland, M.; White, T.B.; Belancio, V.P.; Roy-Engel, A.M.; Deininger, P.L. Der Nukleotidexzisions-Reparaturweg begrenzt die L1-Retrotransposition. *Genetics* **2017**, 205, 139–153. [[CrossRef](#)]
51. Guo, H.; Chitiprolu, M.; Gagnon, D.; Meng, L.; Perez-Iratxeta, C.; Lagace, D.; Gibbings, D. Autophagie unterstützt die genomische Stabilität durch den Abbau von Retrotransposon-RNA. *Nat. Komm.* **2014**, 5, 5276. [[CrossRef](#)]

52. Xie, Y.; Mates, L.; Ivics, Z.; Izsvak, Z.; Martin, SL; Eine, W. Zellteilung fördert eine effiziente Retrotransposition in einem stabilen L1-Reporter Zelllinie. *Mob. DNA* **2013**, 4, 10. [\[CrossRef\]](#)
53. Shi, X.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. Für die L1-Retrotransposition sind Zellteilungen erforderlich. *Mol. Zellbiol.* **2007**, 27, 1264–1270. [\[CrossRef\]](#)
54. Goff, SP Von Retroviren ausgenutzte Wirtsfaktoren. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, 5, 253–263. [\[CrossRef\]](#)
55. Suzuki, Y.; Craigie, R. Der Weg zum Chromatin – Nuklearer Eintritt von Retroviren. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, 5, 187–196. [\[CrossRef\]](#)
56. Shi, J.; Wang, X.; Lyu, L.; Jiang, H.; Zhu, HJ Vergleich der Proteinexpression zwischen menschlichen Lebern und den Leberzelllinien HepG2, Hep3B und Huh7 mittels SWATH- und MRM-HR-Proteomik: Schwerpunkt auf Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen. *Arzneimittel-Metabol. Pharmakokinet.* **2018**, 33, 133–140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Kubo, S.; Seleme, MC; Soifer, HS; Perez, JL; Moran, JV; Kazazian, HH, Jr.; Kasahara, N. L1-Retrotransposition bei Nichtteilung und primäre menschliche Körperzellen. *Proc. Natl. Acad. Wissenschaft. USA* **2006**, 103, 8036–8041. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Macia, A.; Widmann, T.J.; Heras, SR; Ayllon, V.; Sanchez, L.; Benkaddour-Boumzaouad, M.; Munoz-Lopez, M.; Rubio, A.; Amador-Cubero, S.; Blanco-Jimenez, E.; et al. Gentechnisch veränderte LINE-1-Retrotransposition in sich nicht teilenden menschlichen Neuronen. *Genomes.* **2017**, 27, 335–348. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)