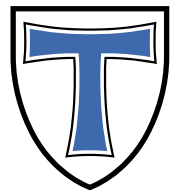


JUSTUS-LIEBIG-



UNIVERSITÄT
GIESSEN

**Die Rolle von Autophagie und die
Membrandynamik-regulierenden Proteinen im
Kontext der Coronavirus-Infektion**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Dort, Franziska Maria**
aus Gießen

Gießen 2026

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Glebe

Tag der Disputation: 06.07.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Humane Coronaviren	1
1.1.1. Ursprung und Epidemiologie humaner Coronaviren.....	1
1.1.2. Klinische Symptome und Krankheitsverläufe von CoV-Infektionen.....	2
1.1.3. Der Aufbau von Coronaviren	3
1.1.4. Der Replikationszyklus von Coronaviren	5
1.1.5. Pharmakologische Hemmung der Coronavirusreplikation und Therapie von COVID-19.....	7
1.2. Die Rolle der Autophagie im Zellmetabolismus.....	9
1.2.1. Induktion von Autophagie	10
1.2.2. Autophagie-Biogenese: Vom Phagophor zur Autolysosomenbildung	11
1.2.3. Spezifische oder selektive Autophagie	12
1.2.4. Quantifizierung des autophagischen Fluxes	13
1.2.5. Autophagie im Kontext der Virusinfektion	16
1.3. SEC24A-abhängige Regulation von intrazellulären Transportvesikeln	17
1.4. Caveolae in der Membranorganisation	18
1.5. Phosphoinositide	18
1.5.1. Struktur, Synthese und Funktion von Phosphoinositiden	18
1.5.2. Die Rolle von PIP4K2 in der nicht-kanonische Bildung von PI(4,5)P ₂	22
1.5.3. Pharmakologische Inhibition der Phosphoinositidkinasen.....	23
1.6. Zielsetzung.....	24
2. Material	25
2.1. Zelllinien	25
2.2. Bakterienstämme	26
2.3. Chemikalien	27
2.4. Reagenzien und Kits	27
2.5. Verbrauchsmaterialien	29
2.6. Expressionsplasmide	29
2.7. Taqman-Sonden	29
2.8. Oligonukleotide und Primer	29
2.8.1. Primer zur Sequenzierung	29
2.8.2. Primer zur Rekonfiguration des Vektorgerüsts des ER-Phagie-Reporters.....	30
2.8.3. CRISPR-Cas9 sgRNAs	30
2.9. Antikörper	31
2.9.1. Primärantikörper.....	31
2.9.2. Sekundärantikörper	31
2.10. Enzyme und Inhibitoren	32
2.11. Puffer und Medien	32
2.11.1. Zusammensetzung von Medien	32
2.11.2. SDS-PAGE und Western-Blot.....	33
2.11.3. Gelelektrophorese	33

2.11.4. Transiente Transfektion	34
2.11.5. Markierung naszierender Proteine	34
2.11.6. PLA.....	34
2.12. Geräte	34
2.13. Software	35
3. Methoden.....	36
3.1. Arbeiten mit Virus	36
3.1.1. Herstellung von lentiviralen Überständen	36
3.1.2. Lentivirale Transduktion	37
3.1.3. Reduktion der biologischen Sicherheitsstufe von transduzierten Zelllinien.....	37
3.1.4. Propagation von HCoV-229E.....	37
3.1.5. Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay.....	38
3.1.6. Virustiterbestimmung mittels TCID ₅₀	39
3.2. Zellbiologische Methoden	41
3.2.1. Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	41
3.2.2. Kultivierung von adhärenenten Zellen	41
3.2.3. Aussaat von Zellen.....	41
3.2.4. Behandlung von Zellen	42
3.2.5. Hungerversuche mit HBSS	42
3.2.6. Transiente Transfektion mit Calcium-Phosphat.....	42
3.2.7. Zellviabilitäts-Assay (MTS-Assay)	43
3.2.8. Fluoreszenz-basierte Zellsortierung im BD FACSAria Cell Sorter	43
3.2.9. Quantifizierung von Autophagie und ER-Phagie im BD LSRFortessa	44
3.3. Mikrobiologische Methoden.....	46
3.3.1. Transformation von Bakterien (XL1-Blue E.coli oder TOP10 E.coli)	46
3.3.2. Kultivierung und Lagerung von Bakterien	46
3.4. Molekularbiologische Methoden	46
3.4.1. Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen	46
3.4.2. Messung der Nukleinsäurekonzentration.....	47
3.4.3. Reverse Transkription (RT).....	47
3.4.4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	47
3.4.5. Agarose-Gelelektrophorese	49
3.4.6. Rekonstruktion des ER-Phagie-Reporters pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL	50
3.4.7. Design von sgRNAs	52
3.4.8. Klonierung von sgRNAs in LentiCRISPR-v2.....	52
3.4.9. Sanger-Sequenzierung	54
3.5. Proteinbiochemische Methoden.....	54
3.5.1. Zellyse	54
3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	54
3.5.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli	54
3.5.4. Western-Blot (<i>semi-dry</i>)	55
3.5.5. Metabolische Markierung mittels OPP.....	56
3.6. Mikroskopische Methoden	58
3.6.1. Indirekte Immunfluoreszenz	58
3.6.2. Mikroskopische Erfassung von Tandem-Reportern.....	59

3.6.3. <i>Proximity ligation assay</i> mit Puromycin-Markierung (Puro-PLA)	59
3.7. Grafische Auswertung und statistische Analysen	60
3.7.1. Segmentierung von Zellen durch Cellpose	60
3.7.2. Erfassung von mittleren zellulären Fluoreszenzsignalen.....	61
3.7.3. Kolokalisation von dsRNA und mCherry-eGFP-LC3B	62
3.7.4. Bildüberlagerung nach einem Live-Cell-Imaging in Kombination mit einer indirekter Immunfluoreszenz	63
3.7.5. Analyse subzellulärer Strukturen mittels Cellprofiler und Excel.....	64
3.7.6. Statistische Auswertung mit Graphpad Prism.....	68
4. Ergebnisse	69
4.1. Etablierung eines Reportersystems zur Messung der Autophagie und ER-Phagie	69
4.1.1. Transiente Transfektion der Autophagie- und ER-Phagie-Reporter.....	69
4.1.2. Generierung und Optimierung von stabil transduzierten ER-Phagie-Reporterzelllinien	73
4.1.3. Indirekte Erfassung von ER-Phagie über die Reporterdegradation	80
4.1.4. Charakterisierung von stabil transduzierten Autophagie-Reporterzelllinien	84
4.1.5. Rekonstruktion des ER-Phagie-Reporters in ein neues Vektorgerüst zur verbesserten Transduktion	88
4.2. Der Einfluss von HCoV-229E auf Autophagie/ER-Phagie	92
4.2.1. Modulation von ER-Phagie durch eine HCoV-229E-Infektion	92
4.2.2. Veränderung der unspezifischen Autophagie nach HCoV-229E-Infektion	99
4.2.3. Rekrutierung des Autophagie-Reporters von HCoV-229E in DMVs	107
4.2.4. Abhängigkeit der HCoV-229E-Replikation vom Autophagieprozess	108
4.3. Wechselwirkung von SEC24A und Thapsigargin auf Autophagie.....	111
4.3.1. Validierung von SEC24A-defizienten Zellen und Transduktion mit dem Autophagie-Reporter.....	111
4.3.2. Bestimmung von Autophagie in SEC24A knockout-Zellen nach Thapsigargin-Behandlung	115
4.4. PIP4K2 und MURC/CAVIN-4 als neue Zielstrukturen von HCoV-229E	118
4.4.1. Beeinflussung der naszierenden Proteine durch HCoV-229E.....	120
4.4.2. Erfassung der Synthese von PIP4K2B und MURC durch eine Puromycin-Markierung	122
4.4.3. CRISPR-Cas9-basierte Generierung von PIP4K2- und MURC-defizienten Zelllinien und Einfluss auf die virale Replikation	124
4.4.4. Überexpression von katalytisch aktiven und inaktiven PIP4K2	134
4.4.5. Veränderungen des autophagischen Fluxes in PIP4K2- und MURC-defizienten Zellen.....	139
4.5. Einfluss von PIP4K2-Inhibitoren auf die Virusreplikation.....	145
4.5.1. Erfassung der antiviralen Wirkung von PIP4K2-Inhibitoren.....	145
4.5.2. Postinfektiöse Behandlung mit CC260 und THZ-P1-2	149
4.5.3. Einfluss der PIP4K2-Inhibitoren auf den Autophagieprozess	151
4.5.4. Lokalisation von PI(4,5)P ₂ nach einer HCoV-229E-Infektion und Behandlung mit PIP4K2-Inhibitoren	156
5. Diskussion.....	161
5.1. Die Rolle von Autophagie in der Replikation von HCoV-229E	161
5.1.1. Induktion der unspezifischen Autophagie durch HCoV-229E.....	161

5.1.2. Virale Modulation der ER-Phagie.....	165
5.2. SEC24A als Faktor in der Wirkung von Thapsigargin.....	166
5.2.1. Modulation von Autophagie durch SEC24A.....	166
5.2.2. Einfluss von SEC24A auf die Inhibition der Autophagie durch Thapsigargin	167
5.3. Charakterisierung von Proteinen mit erhaltener Resttranslation in HCoV-229E-infizierten Zellen	168
5.3.1. CoV-induzierte Regulation von Caveolae-assoziierten Proteinen am Beispiel von MURC/CAVIN-4	169
5.3.2. Einfluss einer MURC/CAVIN-4-Depletion auf Autophagie und HCoV-229E	170
5.3.3. PIP4K2 als neue Zielstruktur der Virusreplikation	171
5.3.4. Relevanz der PI(4,5)P ₂ -Synthese für die Replikation von HCoV-229E	173
5.3.5. Zellflächenregulation durch PIP4K2.....	175
5.3.6. Die Rolle von PI(4,5)P ₂ im Autophagieprozess	176
5.4. Pharmakologische Inhibition von PIP4K2	177
5.4.1. Der multifaktorielle antivirale Wirkmechanismus von CC260	177
5.4.2. THZ-P1-2 als Inhibitor der HCoV-229E-Replikation mit begrenztem Selektivitätsindex	180
5.4.3. Fehlende Hemmung der HCoV-229E-Replikation durch den PIP4K2-Inhibitor BAY-091	182
5.4.4. Differenzielle Modulation von Autophagie durch PIP4K2-Inhibitoren	182
5.5. Schlussfolgerung, Limitationen und Aussichten	185
I. Zusammenfassung	189
II. Abstract.....	191
III. Abkürzungsverzeichnis.....	193
IV. Abbildungsverzeichnis.....	195
V. Codeverzeichnis	197
VI. Literaturverzeichnis.....	198
VII. Anhang	218
VIII. Publikationsverzeichnis.....	232
IX. Ehrenwörtliche Erklärung	233
X. Danksagung	234
XI. Lebenslauf.....	235

1. Einleitung

1.1. Humane Coronaviren

Coronaviren (CoV) sind umhüllte Viren mit einem großen, als positiver Einzelstrang orientiertem RNA-Genom, welche erstmals in den 1960er Jahren beschrieben wurden (Kahn & McIntosh, 2005). Bis zum Jahr 2025 wurden sieben humanpathogene Coronaviren identifiziert (Gorbalenya et al., 2020). Taxonomisch werden diese in die Familie der Coronaviridae, Subfamilie Coronavirinae und Gattung der Alphacoronaviren (HCoV-229E, HCoV-NL63) oder Betacoronaviren (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2) eingeordnet (Abb. 1 A) (Lefkowitz et al., 2018).

1.1.1. Ursprung und Epidemiologie humaner Coronaviren

Im Jahre 1966 wurde HCoV-229E als erstes humanpathogenes Alphacoronavirus identifiziert und isoliert (Hamre & Procknow, 1966). Darauf folgte ein Jahr später die Entdeckung des Betacoronavirus HCoV-OC43 im Nasenrachenraum erkälteter Patienten (McIntosh et al., 1967). HCoV-NL63 wurde 2004 in den Niederlanden aus einem Kind, welches die Symptome einer Bronchiolitis mit Fieber, Rhinitis und Konjunktivitis aufwies, isoliert (van der Hoek et al., 2004). Ein Jahr später wurde in Isolat aus einem in Hongkong an Pneumonie erkrankten Patienten gezeigt, dass das ursprünglich aus Mäusen stammende HCoV-HKU1 sich an Menschen adaptiert hatte (Vabret et al., 2006; Woo et al., 2010).

SARS-CoV (*severe acute respiratory syndrome*) wurde als erstes hochpathogenes CoV eingestuft, welches zunächst in Fledermäusen zirkulierte, bevor 2003 erstmalig eine Übertragung auf den Menschen nachgewiesen wurde (Drosten et al., 2003; Wong et al., 2019). Zwischen November 2002 und Februar 2003 kam es zu 305 Erkrankungsfällen in der Guangdong Provinz in China, gefolgt von einer transnationalen Ausbreitung nach Hongkong, Singapur, Toronto und Hanoi (Centers for Disease Control and Prevention, 2003). Das Virus wurde im März 2003 isoliert, und Sequenzierungen des Genoms konnten den Ursprung auf Larvenroller und Marderhunde zurückverfolgen (Guan et al., 2003). Eine schnelle weitere Ausbreitung von SARS-CoV in 29 verschiedene Länder verursachte die erste eindeutig dokumentierte globale Pandemie durch ein Coronavirus (Cherry & Krogstad, 2004).

Das MERS-CoV (*middle east respiratory syndrome*) wurde 2012 in Saudi-Arabien isoliert, zeigte eine endemische Ausbreitung und kann Menschen sowie Kamele infizieren, wobei Letztgenannte heutzutage einen Hauptwirt und Ausgangspunkt für weitere zu

erwartende MERS-CoV Ausbrüche darstellen (Rahman & Sarkar, 2022). Im Jahr 2015 reiste ein infizierter Patient nach Südkorea und es kam zur anschließenden Infektion von 186 Menschen mit 36 Toten. Bis zum Jahr 2018 wurden über 2.000 Infektionen mit MERS-CoV in 27 verschiedenen Ländern gemeldet, wobei 80 % der Fälle in Saudi-Arabien beschrieben wurden und in der Regel Gruppen von weniger als 300 Menschen betrafen (Al-Omari et al., 2019). Offenbar spielt die Mensch-zu-Mensch-Übertragung des MERS-CoV bisher eine eher untergeordnete Rolle und hat nach heutigem Stand nur ein begrenztes epidemisches Potential (World Health Organization, 2018).

Das im Jahr 2019 in Wuhan, China, zuerst identifizierte SARS-CoV-2 löste nachfolgend eine weltweite Pandemie aus, deren Ursprung auf einen dortigen Tiermarkt zurückgeführt wurde, mit anschließender Ausbreitung 2019 in Asien (Holmes et al., 2021). Anfang des Jahres 2020 kam er zur globalen Transmission und serologische Nachweise des Virus wurden in nahezu jedem Land erbracht (World Health Organization, 2023). Der genaue Ausgangspunkt des Virus ist aktuell ungeklärt, wobei eine Zoonose mit Ursprung in Fledermäusen und Schuppentieren als Zwischenwirt vermutet wird (World Health Organization, 2021). Bis Januar 2026 wurden weltweit über 770 Millionen nachgewiesene SARS-CoV-2-Infektionen mit mehr als 7 Millionen Todesfällen erfasst, welches einer globalen Sterblichkeitsrate von etwa 0,9 % entspricht. In Deutschland wurden über 38 Millionen Infektionen und rund 175 Tausend Verstorbene dokumentiert, wodurch sich eine Sterblichkeitsrate von 0,5 % ergibt (World Health Organization, 2023).

1.1.2. Klinische Symptome und Krankheitsverläufe von CoV-Infektionen

Schätzungsweise 7 % bis 16 % aller grippalen, saisonal in den Wintermonaten auftretenden Infekte werden durch Coronaviren verursacht und gehen auf die Stämme HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 und HCoV-HUK1 zurück (Erdwiens et al., 2025). Die Erkrankungen verlaufen in der Regel ohne Komplikationen, außer bei Kleinkindern sowie älteren und immunsupprimierten Personen, und zeichnen sich durch akute Symptome des oberen Respirationstrakts, wie Schnupfen, Husten, Atembeschwerden (Dyspnoe) und Fieber aus (Gagneur et al., 2002; Wilson et al., 2024).

Viele Infektionen mit MERS-CoV, SARS-CoV und SARS-CoV-2 verlaufen dagegen klinisch deutlich schwerer, erreichen auch den unteren Respirationstrakt und verursachen dort durch die Schädigung des respiratorischen Epithels eine Reduktion der Sauerstoffaufnahme (Lamers & Haagmans, 2022). Zudem besteht eine erhöhte Komplikationsrate bei Vorliegen von Komorbiditäten, wie beispielsweise Herz-Kreislauferkrankungen, Diabetes oder bestimmten Risikofaktoren wie fortgeschrittenem

Lebensalter (Lu et al., 2020). Die Infektion umfasst zunächst das Auftreten von Fieber, Schnupfen, Husten, Riechstörungen, Rachen- und Gliederschmerzen (Lamers & Haagmans, 2022). Bei schwereren Krankheitsverläufen kommt es zu akuter Dyspnoe und respiratorischer Insuffizienz bis hin zu einem *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), thromboembolischen Komplikationen und Multiorganversagen (Harb et al., 2020). Diese Symptomkomplexe sind häufig zusätzlich mit einem „Zytokinsturm“ und umfassender Organschädigung assoziiert und die Patienten benötigen eine Beatmung mit entsprechender intensivmedizinischer Behandlung (Lu et al., 2020). Die Mortalitätsraten von hospitalisierten Patienten wurden in epidemiologischen Studien mit 10 % (SARS-CoV), 44 % (MERS-CoV) und 16 % (SARS-CoV-2) angegeben (Arabi et al., 2020; Baptista et al., 2023; Lew et al., 2003). Eine zusätzliche gesundheitliche Belastung ist das Manifestieren eines Long COVID/Post-COVID-Syndroms infolge einer Erkrankung mit SARS-CoV-2 (National Academies of Sciences Engineering and Medicine, 2024). Das Robert-Koch-Institut differenziert in einer S1-Leitlinie Long COVID als das Persistieren der Symptome über 4 Wochen nach Infektion, während als Post-COVID-Syndrom das Anhalten für über 12 Wochen nach Infektion definiert wird (Koczulla et al., 2024). Charakteristisch hierbei sind chronische Müdigkeit (*fatigue*), Kurzatmigkeit, sowie geistige Leistungseinschränkungen mit Konzentrations- und Gedächtnisstörungen und einem erhöhten Risiko für metabolisch und autoimmun bedingte Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1/2 oder ein Guillain-Barré-Syndrom (Davis et al., 2023; Debuysschere et al., 2024). Die Inzidenz des Long COVID/Post-COVID-Syndroms wurde im Jahr 2024 durch eine Online-Umfrage auf 6,8 % der US-amerikanischen Bevölkerung geschätzt (National Academies of Sciences Engineering and Medicine, 2024).

1.1.3. Der Aufbau von Coronaviren

Die Namensgebung der Coronaviren, *corona*, lateinisch für Kranz oder Krone, wurde 1968 durch das charakteristische Erscheinungsbild der Viren nach elektronenmikroskopischer Betrachtung geprägt (Almeida et al., 1968). Coronaviren sind sphärische Partikel mit einem üblichen Durchmesser von 80 nm bis 120 nm und 17 nm bis 20 nm langen keulenartigen Ausläufern an der Oberfläche, welche als Dornen oder *spikes* bezeichnet werden (Masters, 2006). Zusätzlich finden sich für HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 weitere Ausläufer, welche kürzer sind und aus dem Hämagglutininesterase Protein (HE Protein) bestehen (Desforges et al., 2013; Huang et al., 2015). Die Virushülle setzt sich aus drei in einer Lipiddoppelschicht verankerten Proteinen (exklusive HE Protein) zusammen. Das *spike* Glykoprotein S ist verantwortlich für die

stachelartigen Ausläufer der Hülle und essentiell für die Bindung sowie Infektion von Zellen (V'Kovski et al., 2021). Das Membran Glykoprotein M ist der Hauptbaustein von Coronaviren und formt die Hülle. Es ist innerhalb einer Coronavirusspezies konserviert, zeigt jedoch deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Virusstämmen (Masters, 2006). Das Hüllprotein E ist ein kleines Polypeptid, welches niedrig abundant in der Virushülle vorkommt und eine Rolle in der Virusassemblierung sowie Virulenz spielt (Schoeman & Fielding, 2019). Im Inneren des Virus befindet sich das Nukleokapsidprotein N, welches die virale RNA bindet. Coronavirus-RNA kann durch Ribonukleasen leicht gespalten werden, wohingegen ein Komplex mit N Protein wesentlich stabiler ist (Masters, 2006). Es handelt sich um eine nicht-segmentierte positiv einzelsträngige RNA mit einer Länge zwischen 25,4 kb (*porcine coronavirus HKU15*) bis 31,4 kb (Murines Hepatitisvirus, MHV), wobei die erwähnten Strukturproteine nur 1/3 dieser ausmachen (Woo et al., 2012). Das restliche Genom besteht aus Abschnitten, welche sowohl die offenen Leseraster *ORF1a* und *ORF1b* (*open reading frame*) enthalten, die eine Reihe an nicht-strukturellen Proteinen (nsp) kodieren, als auch Bereiche für die Expression CoV-spezifischer akzessorischer Proteine (Yan et al., 2022). Der Aufbau des Virus und Genoms ist für HCoV-229E schematisch in Abb. 1 B, C gezeigt.

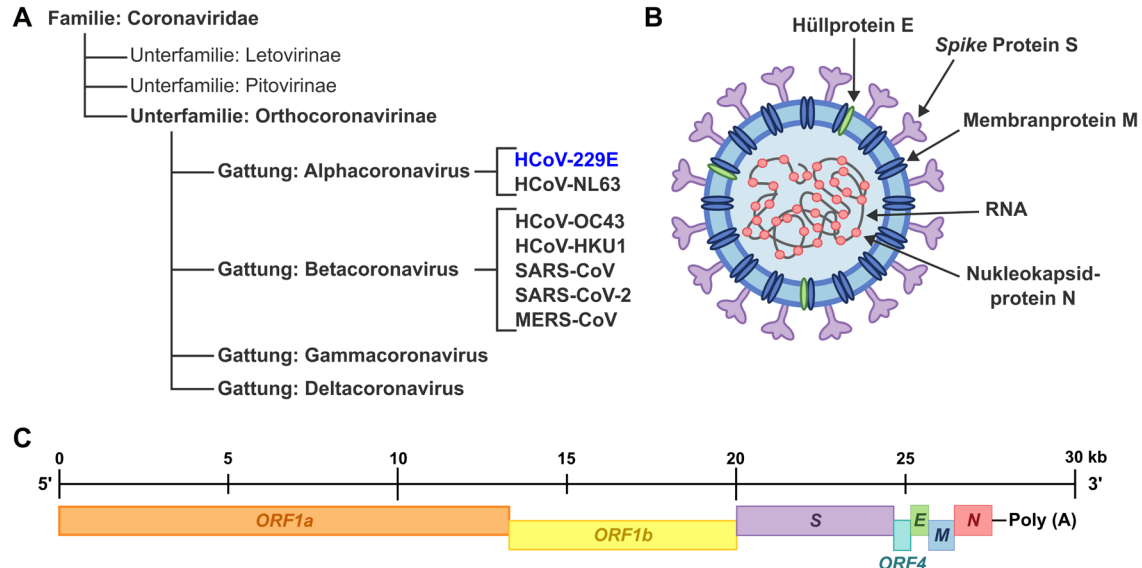


Abb. 1 Taxonomie und Aufbau von HCoV-229E

(A) Darstellung eines Ausschnittes aus der Systematik der sieben humanpathogenen Coronaviren. (B) Struktureller Aufbau von HCoV-229E mit Hüllprotein E, spike Protein S, Membranprotein M sowie der viralen RNA im Komplex mit dem Nukleokapsidprotein N. (C) Zusammensetzung des RNA-Genoms von HCoV-229E. ORF1a und ORF1b kodieren für nicht-strukturelle, die u.a. eine Rolle bei der Replikation spielen. ORF4 kodiert für ein akzessorisches Protein. Die Abb. wurde in Anlehnung an Wang et al. (2022) und Yan et al. (2022) erstellt.

1.1.4. Der Replikationszyklus von Coronaviren

Die Replikation der Viren beginnt mit der Aufnahme in die Zelle durch die Bindung von S Protein an Wirtszellrezeptoren wie Aminopeptidase N (APN; HCoV-229E), *angiotensin-converting-enzyme-2* (ACE-2; HCoV-NL63, SARS-CoV, SARS-CoV-2) oder Dipeptidylpeptidase-4 (DPP4; MERS-CoV) (V'Kovski et al., 2021) (Abb. 2). Der Prozess beeinflusst den weiteren Infektionsverlauf und das Krankheitsbild, wobei die Abwesenheit der genannten Oberflächenproteine eine Resistenz gegen die Virusinfektion verursachen kann (Mossel et al., 2005; Whitworth et al., 2019). Zum Eintreten in die Zelle wird das S Protein durch membranständige Wirtszellproteasen wie TMPRSS2 proteolytisch gespalten und es kommt zur direkten Membranfusion oder es erfolgt eine Endozytose mittels Cathepsinen (Bertram et al., 2013).

Nachdem das virale Genom in der Zelle freigesetzt wurde, findet die Translation der Gene *ORF1a* und *ORF1b* statt, welche die Polyproteine pp1a und pp1ab durch das ribosomale *frameshifting* unter Beteiligung von nsp11 produzieren (Rohaim et al., 2021). Hierbei essentiell ist die *slippery sequence* U_UUA_AAC zwischen *ORF1a* und *ORF1b*, welche an einen Pseudoknoten gekoppelt ist (Bhatt, 2022). Als Konsequenz dessen wird die Translation verlangsamt oder gestoppt, und es kommt in 25 % bis 75 % der Fälle zu einer Verschiebung des Leserasters um -1, welches zur weiteren Translation von *ORF1b* und der Bildung des Polyproteins pp1ab führt (Bhatt, 2022). Die Polyproteine pp1a und pp1ab werden autoproteolytisch durch die Cysteinproteasen *papain-like protease* (PL^{pro}, nsp3) und *chymotrypsin-like protease* (*main protease* M^{pro}, nsp5) in die nicht-strukturellen Proteine nsp1 – 11 (ausgehend von pp1a) sowie nsp1 – 10 und nsp12 – 16 (ausgehend von pp1ab) gespalten (V'Kovski et al., 2021). Infolge der Proteinsynthese kann der virale *replication-transcription complex* (RTC) gebildet werden, welcher zuständig ist für die Replikation der viralen RNA, die Transkription weiterer struktureller und nicht-struktureller Proteine sowie *proofreading* (Rohaim et al., 2021). Ein zentraler Bestandteil hiervon ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase nsp12 mit den Kofaktoren nsp7 und nsp8 sowie die RNA-Helikase nsp13 (Rohaim et al., 2021). Zudem beteiligt ist nsp10 mit einer Helferfunktion für nsp14, eine Exoribonuklease mit *proofreading*-Funktion sowie Methyltransferase zur Cap-Methylierung der viralen RNA, und nsp16, eine 2'-O-Methyltransferase, welche zum Schutz der viralen RNA vor Wirtsfaktoren dient und deren Stabilität erhöht (Yan et al., 2022). Assoziiert mit dem RTC ist die Endoribonuklease nsp15, welche an der Prozessierung von RNA beteiligt ist (Arevalo et al., 2023).

Infolge der Interaktion von nsp3, nsp4 und nsp6 mit Wirtszellfaktoren bilden sich Replikationsorganellen, u.a. sogenannte *double membrane vesicles* (DMVs), vermutlich ausgehend vom endoplasmatischen Retikulum (ER), welche die doppelsträngige RNA (dsRNA) vor zytosolischen, antiviral aktiven Wirtsfaktoren schützen (Angelini et al., 2013; Wolff et al., 2020). Zudem hemmen bestimmte nicht-strukturelle Proteine (nsp1, nsp2, nsp3) die angeborene Immunantwort (Islam et al., 2023). Des Weiteren agiert nsp9 als RNA-bindendes Protein und assoziiert Signalerkennungspartikel der Wirtszelle, welches zu einer Störung des Transports von Membranproteinen führt (Arevalo et al., 2023). Die Assemblierung der neuen Virionen findet am *ER-to-golgi intermediate compartment* (ERGIC) mit Hilfe des N Proteins statt (Yan et al., 2022). Die Viren werden zur weiteren Modifikation zum Golgi-Apparat translokalisiert (Steiner et al., 2024). Für SARS-CoV-2 konnte gezeigt werden, dass die Viren durch einen lysosomalen Transport zur Peripherie der Zelle gebracht werden und diese unter Beteiligung des SNARE-Komplexes (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) mittels Exozytose verlassen (Steiner et al., 2024).

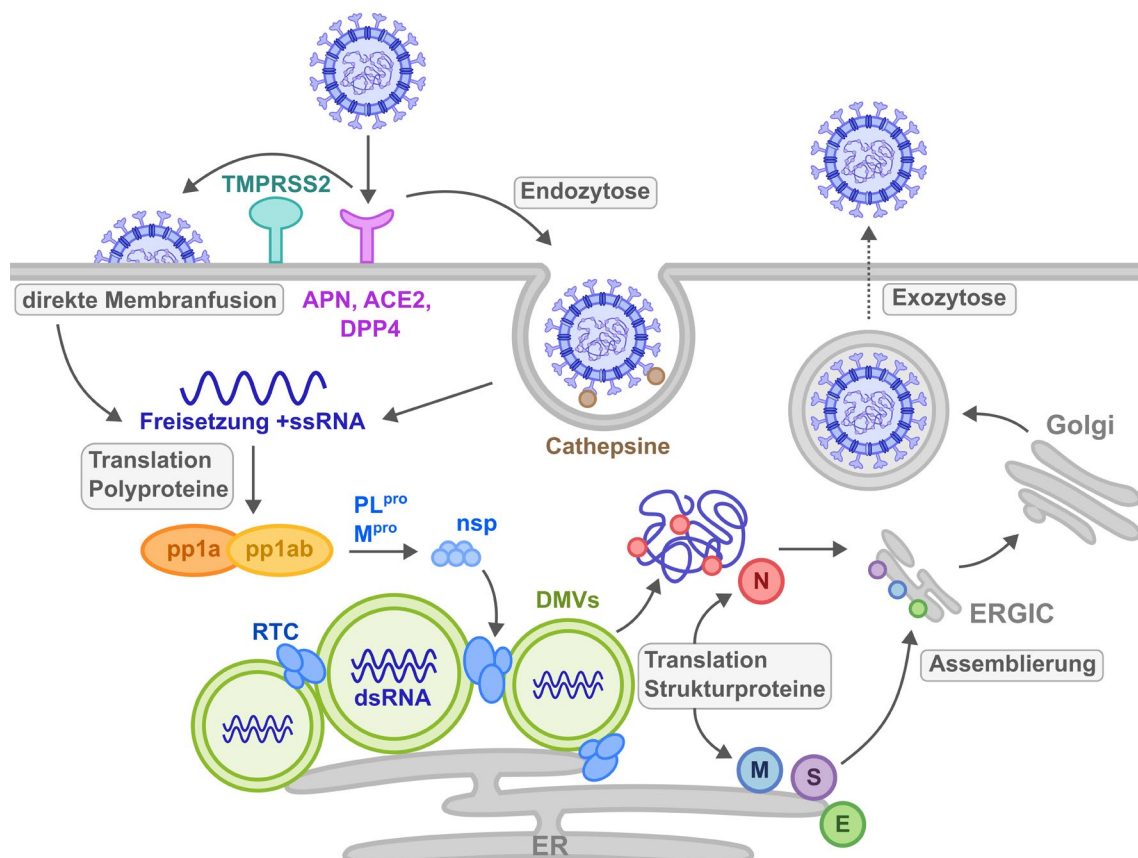


Abb. 2 Der Replikationszyklus von Coronaviren

Schematische Darstellung der Replikation von Coronaviren. Die Viren docken speziesspezifisch an membranständige Wirtszellfaktoren wie APN, ACE2 oder DPP4 an. Das S Protein wird hierbei durch TMPRSS2 gespalten und es kommt zur direkten Membranfusion der Virushülle mit der Plasmamembran oder einer Cathepsin-vermittelten Endozytose. Infolge der Freisetzung der positiven einzelsträngigen RNA (ssRNA) folgt die Translation der Polyproteine pp1a und pp1ab,

welche proteolytisch zu den verschiedenen nicht-strukturellen Proteinen gespalten werden und den RTC zusammensetzen. DMVs werden vermutlich ausgehend vom ER zur Replikation der Proteine und RNA geformt. Die strukturellen Proteine werden synthetisiert und neue Viren werden am ERGIC assembliert. Nach der Translokation zum Golgi-Apparat zur weiteren Reifung der Viren verlassen diese die Zelle mittels Exozytose. Die Abb. wurde in Anlehnung an Yan et al. (2022) erstellt.

1.1.5. Pharmakologische Hemmung der Coronavirusreplikation und Therapie von COVID-19

Zur Prävention von SARS-CoV-2-Infektionen sind diverse Impfstoffe verfügbar, welche vor allem schwere Krankheitsverläufe reduzieren, allerdings jeweils spezifisch für die Virusvarianten sind und in immunsupprimierten Personen oftmals nur eingeschränkt wirksam sind (Bettini & Locci, 2021; DeWolf et al., 2022). Es ist daher nach wie vor sehr wichtig, zusätzlich antivirale Wirkstoffe zur Verfügung zu haben, die unterschiedliche Angriffspunkte nutzen und auch bei Erstkontakt mit dem Virus, rasch und nebenwirkungsarm die Replikation hemmen können (Chan et al., 2024). Prinzipiell können bei der Entwicklung von antiviralen Medikamenten entweder zellfremde virale Strukturen oder aber die für den Replikationszyklus relevanten Wirtszellfaktoren moduliert werden (von Delft et al., 2023). Die Mehrheit aller heute zugelassenen Virostatika interferiert direkt mit der Aktivität von Virusfaktoren, wie zum Beispiel die antiretroviralen Medikamente aus der Gruppe der Nukleosidanaloga, welche das Enzym reverse Transkriptase des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) inhibieren (Chaudhuri et al., 2018). Für SARS-CoV-2-Infektionen stehen bislang nur wenige Therapeutika zur Verfügung, welche im Folgenden anhand der in der EU bis Januar 2026 zugelassenen Wirkstoffe ausführlich dargestellt werden (Chan et al., 2024).

Remdesivir, ein Inhibitor von viralen RNA-Polymerasen wie z.B. nsp12 von SARS-CoV-2, wurde als erste Substanz während der COVID-19-Pandemie zur Behandlung von schweren Verläufen zugelassen (von Delft et al., 2023). Remdesivir wirkt als Substratanalogon und wird anstelle von Adenosintriphosphat (ATP) in die RNA eingebaut, wodurch es zu einem verzögerten Kettenabbruch kommt (Kokic et al., 2021). Nachfolgend erhielt Molnupiravir als weiteres Ribonukleosidanalogen, welches ursprünglich zur Behandlung von Influenza entwickelt wurde, aufgrund einer antiviralen Wirkung gegen SARS-CoV, MERS-CoV und SARS-CoV-2 eine Notfallzulassung zur Therapie von COVID-19. Nach einer Nutzen-Risiko-Abwägung wurde diese später widerrufen (European Medicines Agency, 2023; von Delft et al., 2023).

Während der COVID-19-Pandemie entwickelte Medikamente wie Nirmatrelvir, Ensitrelvir und Pomotrelvir inhibieren die virale Protease M^{pro} (nsp5), die strukturell sowie

mechanistisch gut untersucht ist und sich von zelleigenen Cysteinproteasen unterscheidet (von Delft et al., 2023). Nirmatrelvir wird in Kombination mit dem Cytochrom P450 A-Inhibitor Ritonavir als Fertigarzneimittel unter dem Namen Paxlovid in Deutschland vertrieben und ist für Erwachsene, die keine zusätzliche Sauerstoffzufuhr benötigen und ein erhöhtes Risiko für schwere Krankheitsverläufe haben, zugelassen (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 2022).

Ebenso sind eine Reihe an monoklonalen Antikörpern entwickelt worden, welche durch Bindung des S Proteins von SARS-CoV-2 zu dessen Neutralisierung führen. Beispiele hierfür sind Bamlanivimab, Casirivimab/Imdevimab und Etesevimab. Aufgrund von Mutationen des S Proteins hat die Wirksamkeit dieser Medikamente im Laufe der COVID-19-Pandemie rasch abgenommen (Doggrell, 2021).

Schwere Krankheitsverläufe von SARS-CoV-2 sind vor allem durch starke Immun- und Entzündungsreaktionen bis hin zum Zytokinsturm gekennzeichnet, die zu Multiorganversagen führen können (Harb et al., 2020). Zur Therapie werden daher immunmodulatorische und/oder immunsuppressiv wirkende Medikamente wie das Glukokortikoid Dexamethason oder der anti-IL-6R-Antikörper Tocilizumab empfohlen (Kluge et al., 2024). Wie insbesondere in der *recovery* Studie Horby et al. (2021) gezeigt wurde, kann Dexamethason in Dosen von 6 mg pro Tag die Sterblichkeit von beatmeten und intensivpflichtigen COVID-19-Patienten um etwa 36 % senken.

Bis heute gibt es kein zur Replikationshemmung von Coronaviren zugelassenes Medikament, dessen primärer Wirkmechanismus auf der Modulation von durch das Virus benötigten Wirtszellfaktoren beruht. Dieser Ansatz hätte den Vorteil einer geringeren Abhängigkeit von den hohen viralen Mutationsraten, allerdings um den Preis ungewollter toxischer Effekte und einer daraus resultierenden geringeren therapeutischen Breite (Schreiber & Ludwig, 2025).

Während der COVID-19-Pandemie wurde für Hydroxychloroquin/Chloroquin *in vitro* eine antivirale Wirkung nachgewiesen, welche durch Hemmung der Endozytose, Blockade von Sialinsäure-Rezeptoren und Reduktion der Aktivität von ACE2 das Eindringen von SARS-CoV-2 in die Zelle verhindern kann (Satarker et al., 2020). Jedoch zeigten klinische Studien eine erhöhte Sterblichkeit, vermutlich aufgrund von QT-Zeitverlängerungen, welche durch die hohen benötigten Dosen bedingt war, und es wurde keine Zulassung für diese Indikation erteilt (Horby et al., 2020).

Interferone sind seit langem genutzte antivirale Wirkstoffe, die ein essentieller Bestandteil der zellulären Immunantwort sind und multiple antivirale Mechanismen aktivieren, z.B. durch die transkriptionell induzierte Synthese von antiviralen Wirtsfaktoren (Friedman & Contente, 2010; Hoang et al., 2023). In klinischen COVID-19-Studien reduzierte PEGyliertes λ -Interferon bei Patienten mit erhöhtem Risiko für schwere Krankheitsverläufe die Anzahl an stationäre Behandlungen (Reis et al., 2023).

Camostat Mesylat ist ein *in vitro* wirksamer antiviraler Inhibitor der Protease TMPRSS2, welche eine essentielle Funktion bei der Aufnahme der Viren in die Zelle besitzt (Hoffmann et al., 2021). Zudem wurde bereits für weitere Vertreter der TMPRSS2-Inhibitoren die effektive Hemmung des Influenza Virus beobachtet (Meyer et al., 2013; Shen et al., 2017). Jedoch konnten in mehreren klinischen Studien für Camostat Mesylat zum Einsatz gegen SARS-CoV-2 keine Verbesserung im Hinblick auf Infektionsdauer, Schweregrad und Mortalität nach Infektion gegenüber Placebo nachweisen werden (Khan et al., 2024).

Das aus der Pflanze *Thapsia garganica* isolierte Sesquiterpenlacton Thapsigargin zeigte *in vitro* und im Tiermodell eine erfolgreiche Hemmung der Replikation von HCoV-229E, MERS-CoV und SARS-CoV-2 sowie einer Reihe von anderen umhüllten RNA-Viren (Al-Beltagi, Goulding, et al., 2021; Al-Beltagi, Preda, et al., 2021; Li et al., 2024). Es ist als ein allosterischer, irreversibler Inhibitor der *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} ATPase (SERCA) bekannt, wodurch es zu einem Anstieg der zytosolischen sowie einer Depletion der ER-lokalisierten Ca^{2+} -Konzentration kommt (Lytton et al., 1991). Der genaue antivirale Wirkmechanismus ist nicht bekannt, aber Proteom-weite Studien konnten zeigen, dass Thapsigargin multiple metabolische Stoffwechselwege in infizierten Zellen reprogrammiert (Shaban et al., 2022; Shaban et al., 2021; Y. X. Zhang et al., 2020). Zudem kommt es durch Veränderungen des Ca^{2+} -Haushaltes zu einer Hemmung von Autophagieprozessen (Ganley et al., 2011).

1.2. Die Rolle der Autophagie im Zellmetabolismus

Im Zusammenhang mit der Entdeckung der Lysosomen und deren funktioneller Bedeutung wurde der Begriff Autophagie in den 1990er Jahren erstmals in Hefezellen beschrieben (Tsukada & Ohsumi, 1993). Es handelt sich um einen Prozess in eukaryotischen Zellen, welcher unter Stressbedingungen für den Abbau und das Recycling von Makromolekülen, Proteinaggregaten und Organellen sorgt (Berthet & De Duve, 1951). Makroautophagie, im Weiteren als Autophagie bezeichnet, hebt sich von den verwandten Prozessen Mikroautophagie und *chaperon-mediated autophagy* durch

die Bildung von Autophagosomen ab und kann unterteilt werden in unspezifische Autophagie und spezifische bzw. selektive Autophagie (Parzych & Klionsky, 2014).

1.2.1. Induktion von Autophagie

Als Stress werden alle Auswirkungen auf Zellen klassifiziert, welche außerhalb der tolerierbaren Grenzen liegen und zelluläre Funktionen oder Überleben gefährden (He & Klionsky, 2009). Externe Einflüsse wie Temperatur, energiereiche Strahlung (z.B. UV-Licht) und Veränderungen in der Zusammensetzung des Nährmediums (Ionenkonzentrationen, pH-Wert, Metabolite) können Stress induzieren, welches in einer Aktivierung von Autophagie resultiert. Der potenteste Induktor ist Nährstoffmangel, wie beispielsweise die Abwesenheit von bestimmten Aminosäuren, Glukose oder Wachstumsfaktoren (Kroemer et al., 2010). Innerhalb weniger Minuten kommt es zur Stimulation des Vorgangs durch Proteinkinasen wie mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) und AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Mandic et al., 2025). Hierbei überwacht AMPK das AMP:ATP-Verhältnis einer Zelle (Calabrese et al., 2014). Durch Phosphorylierung von AMPK durch LKB1 (*liver kinase B1*), TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*) oder CaMKK2 (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2*) wird diese aktiviert, und es entsteht eine positive Rückkopplung mit Sirtuin-1 (Sirt1/AMPK Zyklus), welche durch eine NAD (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid)-abhängige Deacetylierung von unter anderem FOXO1/3 (*forkhead box protein O1*) die Transkription autophagierelevanter Gene fördert (Mandic et al., 2025). AMPK kann infolgedessen mTORC1 (*mTOR complex 1*) hemmen, welches die Bildung von Autophagosomen antreibt. Zusätzlich kann mTORC1 durch die Abnahme von Wachstumsfaktoren wie Insulin oder *insulin-like growth factor* inhibiert werden (Kroemer et al., 2010).

Ein weiterer häufiger Induktor von Autophagievorgängen ist die Infektion mit Pathogenen, wie Bakterien und Viren. Die Bindung von zellulären PRRs (*pattern recognition receptors*) wie TLRs (*intracellular endosomal toll-like receptors*) an virale/bakterielle PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) führt über diverse Mechanismen zur Freisetzung von Beclin-1 sowie Aktivierung des Interferon-Signalwegs mit erhöhter Genexpression von ATGs (*autophagy-related genes*), welche der Ausgangspunkt für die Induktion von Autophagie sind (Choi et al., 2018).

Des Weiteren besteht eine wichtige Verbindung zwischen der Autophagie und der *unfolded protein response* (UPR) (Wilson & McCormick, 2025). Diverse Stressoren, unter anderem auch die oben genannten, führen zu einer Akkumulation von fehlgefalteten oder ungefalteten Proteinen im ER, welche dessen Funktion beeinträchtigt

und über die in der ER-Membran integrierten Sensorproteine PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*), IRE1 (*inositol-requiring enzyme-1*) und ATF6 (*activating transcription factor-6*) ER-Stress Signalwege aktiviert (Cherubini & Zito, 2022). In der Folge kommt es zu einer transkriptionellen Aktivierung von verschiedenen Genen, deren Produkte die ER-Homöostase wiederherstellen können. Unter anderem führt PERK hierbei zu einer Aktivierung von ATF4 und CHOP, welche die Genexpression von *ATG5* und *ATG12* fördern, während IRE1 und ATF6 indirekt zu einer Freisetzung von Beclin-1 führen (Chipurupalli et al., 2021; Rashid et al., 2015).

1.2.2. Autophagie-Biogenese: Vom Phagophor zur Autolysosomenbildung

Im basalen Zustand der Zelle hemmt mTORC1 den ULK1-Komplex, bestehend aus ATG13, der Proteinkinase ULK1 (*Unc-51-like kinase 1*), FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD*) sowie ATG101 durch Phosphorylierung von ULK1. Kommt es zur Einwirkung von Stressfaktoren, wird mTORC1 gehemmt, wodurch die Repression des ULK1-Komplexes aufgehoben wird (Parzych & Klionsky, 2014). Nachfolgend bindet der ULK1-Komplex an den PI3K-Komplex, bestehend auf Beclin-1, ATG14, der Phosphatidylinositol-3-Kinase VPS34 (*vacuolar protein sorting*) und VPS15. Durch die Bildung von PI3P (Phosphatidylinositol-3-phosphat) und Einwirkung von VMP1 (*vacuole membrane protein 1*) sowie ATG9 kann am ER eine Ausstülpung, bezeichnet als Omegasom, gebildet werden, welche als Ausgangspunkt für die Formation des Phagophors, der sogenannten Isolationsmembran, dient (Liang et al., 2021). PI3P rekrutiert DFCP1 (*double FYVE containing protein 1*) und WIPIs (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*) und unterstützt hierdurch die weitere Expansion des Phagophors (Kroemer et al., 2010). Zudem spaltet ATG4B proteolytisch pro-LC3 (*pro microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) in LC3-I. WIPI2 und FIP200 interagieren mit ATG16L1, welches einen Ubiquitin E3-ähnlichen-Ligase-Komplex mit ATG5 und ATG12 bildet, der die Lipidierung von LC3-I durch Konjugation mit Phosphatidylethanolamin (PE) zur Entstehung von LC3-II katalysiert und in das Phagophor eingelagert wird (Mizushima et al., 2011). Es kommt zur Expansion der Membran und Umhüllung von Strukturen, die zur Degradation vorgesehen sind. Das fertig geformte Autophagosom kann sich von der ER-Membran ablösen (Parzych & Klionsky, 2014). Durch die Fusion mit Lysosomen unter Einwirkung von LAMP2 (*lysosome-associated membrane protein 2*), RAB-Proteinen (*Ras-related in brain*) und SNARE-Komplexen, bilden sich Autolysosomen. Die in Lysosomen enthaltenen Enzyme wie Proteasen, Lipasen und Nukleasen führen zum Abbau der Autolysosomen-assoziierten Strukturen in deren Grundkomponenten, welche typischerweise in das

Zytosol freigegeben werden (Yin et al., 2016). Diese Vorgänge sind in Abb. 3 schematisch zusammengefasst.

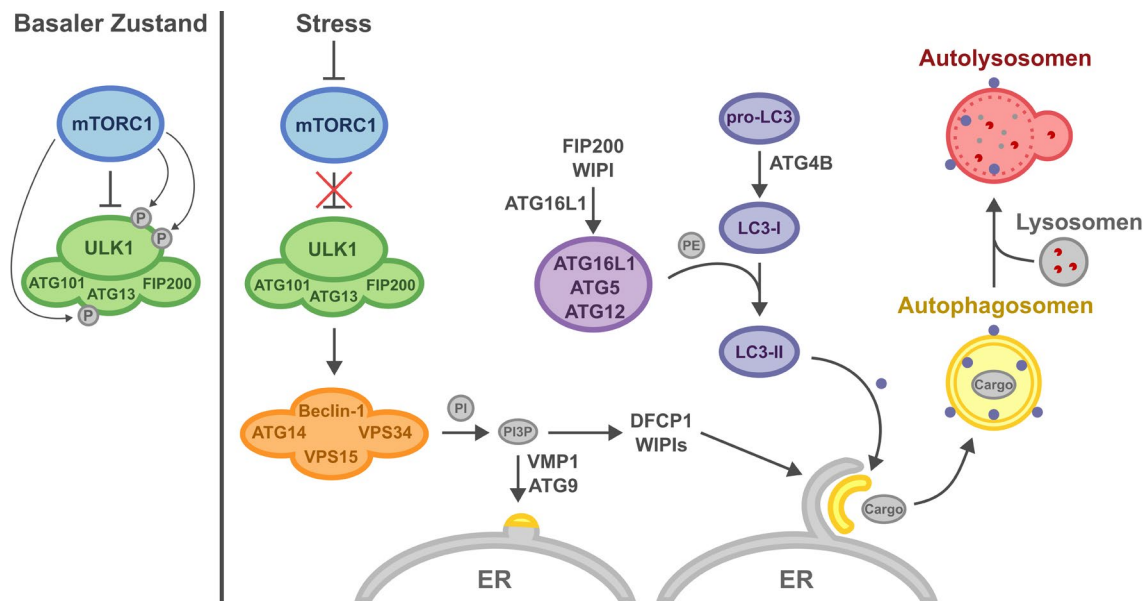


Abb. 3 Aktivierung von Autophagie mit Bildung von Autophagosomen und Autolysosomen
Im basalen Zustand wird die Aktivität des ULK1-Komplexes (ULK1, ATG101, ATG13, FIP200) durch die mTORC1-abhängige Phosphorylierung gehemmt. Unter Einwirkung von Stress wird mTORC1 inhibiert und der aktive ULK1-Komplex bindet an den PI3K-Komplex (Beclin-1, ATG14, VPS15, VPS34), welcher PI (Phosphatidylinositol) zu PI3P phosphoryliert. PI3P bildet mit VMP1 und ATG9 das Omegasom am ER. Zudem rekrutiert es DFCP1 und WIPIs, welche die Bildung des Phagophors forcieren. Pro-LC3 wird durch ATG4B zu LC3-I gespalten, welches durch den mittels FIP200, WIPI und ATG16L1 gebildeten ATG16L1-ATG5-ATG12-Ligase-Komplex unter Verwendung von Phosphatidylethanolamin (PE) zu LC3-II umgewandelt wird. LC3-II wird in die Phagophormembran eingelagert. Es kommt zur Expansion mit Umhüllung des zellulären Materials in Autophagosomen. Nachfolgend fusionieren die Vesikel mit Lysosomen und bilden Autolysosomen, welche den Inhalt degradieren. Die Abb. wurde in Anlehnung an Dossou and Basu (2019) und Mandic et al. (2025) erstellt.

1.2.3. Spezifische oder selektive Autophagie

Im Autophagieprozess können neben der unspezifischen Degradation von Zellbestandteilen durch Verwendung von sogenannten Cargo-Rezeptoren bestimmte Strukturen gezielt gebunden und degradiert werden. In Abhängigkeit der Zielstrukturen wird die spezifische Autophagie in beispielweise ER-Phagie, Mitophagie und Xenophagie unterteilt (Lamark & Johansen, 2021). Cargo-Rezeptoren besitzen eine *short sequence motif LC3-interacting region* (LIR), welche an LC3-II assoziiert, sowie weitere Bindungsstellen für die jeweiligen Autophagiesubstrate, welche somit in das Autophagosomen rekrutiert werden können (Wilkinson, 2019). Es gibt eine Reihe an bekannten Cargo-Rezeptoren, wobei p62/SQSTM1 (*sequestosome-1*) als erster charakterisiert wurde und unter anderem eine wichtige Rolle für Mitophagie und Virophagie spielt (Lamark & Johansen, 2021)(Abb. 4).

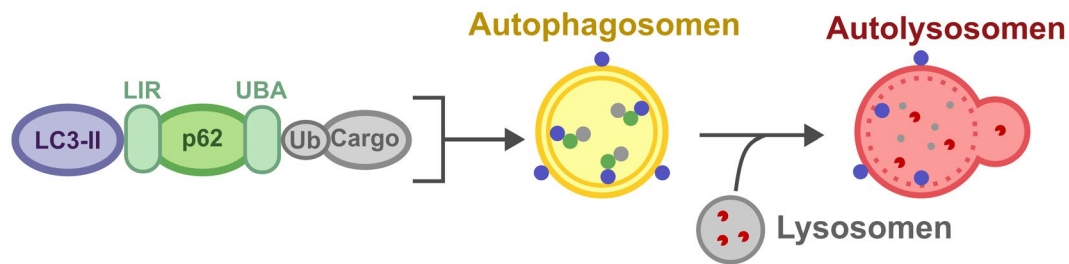


Abb. 4 Selektive Autophagie durch den Cargo-Rezeptor p62

Der Cargo-Rezeptor p62 bindet durch seine ubiquitin-associated domain (UBA) selektiv an zu degradierende, ubiquitinierte (Ub) Strukturen (Cargo) und über die LIR an LC3-II. Nach der Induktion von Autophagie wird der Komplex in Autophagosomen umschlossen und infolge der Fusion mit Lysosomen in Autolysosomen degradiert.

Eine besondere Relevanz im Fokus dieser Arbeit kommt dem Vorgang der ER-Phagie zu, welche auch als Retikulophagie bezeichnet wird (Wilson & McCormick, 2025). Durch Stressfaktoren kommt es neben der Ansammlung von fehlgefalteten Proteinen, auch zu einer (kompensatorischen) Expansion des ERs (Reggiori & Molinari, 2022). Fehlgefaltete Proteine können entweder durch UPR-Vorgänge korrigiert oder mittels der *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation* (ERAD) proteosomal abgebaut werden (Cherubini & Zito, 2022). Eine dritte Möglichkeit zur Wiederherstellung der ER-Homöostase besteht in der Aktivierung der sogenannten ER-Phagie, welche zudem einen alternativen Abbauweg für ERAD-resistente, ungefaltete Protein bildet (Wilkinson, 2019). Als Cargo-Rezeptoren für ER-Phagie fungieren in der ER-Membran residente Proteine wie FAM134B (*family with sequence similarity 134 member b*), SEC62, RTN3 (*reticulon-3*), CCPG1 (*cell cycle progression protein 1*), ATL3 (*atlastin-3*) und TEX264 (*testis-expressed protein 264*), welche intensiv im Zusammenhang mit metabolischen und neurologischen Erkrankungen untersucht werden (Reggiori & Molinari, 2022).

1.2.4. Quantifizierung des autophagischen Fluxes

Trotz umfassender Aufklärung des Mechanismus des Autophagieprozesses ist die Messung seiner Aktivität eine nicht triviale Aufgabe. Als autophagischer Flux wird der vollständige Prozess von der Formation der Autophagosomenmembran, Umschließung der zu degradierenden Strukturen bis hin zur Fusion mit Lysosomen und dem Abbau der Autophagiesubstrate in Autolysosomen bezeichnet (Mizushima & Murphy, 2020). Diese Dynamik wird in Zellpopulationen durch Quantifizierung von klassischen Autophagie-assoziierten Proteinen durch biochemische Methoden (Western-Blot-Analysen) vor und nach pharmakologischer Inhibition des Lysosoms erfasst (Yoshii & Mizushima, 2017). Alternativ kann die Anzahl und Größe von Autophagosomen und Autolysosomen mittels zellbiologischer Verfahren auf Einzelzellniveau quantifiziert werden. Hierfür werden Transmissionselektronenmikroskopie, die indirekte Immunfluoreszenz, fluoreszierende

Reportersysteme, *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) oder Durchflusszytometrie verwendet (Klionsky et al., 2021).

Aufgrund der zentralen Rolle von LC3-II im Autophagieprozess wird dieses häufig zur Quantifizierung der autophagischen Aktivität genutzt (Mizushima, 2025). Änderungen der LC3-Proteinmenge sowie LC3 Modifikationen können mittels Western-Blot-Analysen bestimmt werden, welche zusammen mit einer Lysosomeninhibition einen schnellen sowie simplen Nachweis des autophagischen Fluxes *in vitro* bieten (Mizushima & Murphy, 2020). Eine Limitation ist die starke Gewebe- und Zelltypabhängigkeit der Proteinlevel, so korreliert bspw. die hohe Abundanz von LC3-II in HeLa Zellen nicht obligat mit der Formation von Autophagosomen (Tanida et al., 2005). Zudem ist LC3-II auch in nicht Autophagie-relevanten Strukturen vorhanden, wie z.B. in Autophagosom-ähnlichen Strukturen nach einer Infektion mit Herpes-simplex-Virus 1 oder an der Plasmamembran durch Relokalisierung von LC3 infolge einer Influenza A-Infektion (Beale et al., 2014; English et al., 2009). Für die korrekte Interpretation bei der Bestimmung des Autophagiefluxes ist die Hinzunahme eines lysosomalen Inhibitors oder eines Autophagosom-Lysosom Fusionsinhibitors erforderlich (Mizushima, 2025). Bafilomycin A1 ist ein V-Typ ATPase(V-ATPase)-Inhibitor, welcher die Ansäuerung von Lysosomen und die Ca-p60A/SERCA-abhängige Fusion von Autophagosomen und Lysosomen verhindert (Mauvezin & Neufeld, 2015). Die Quantifizierung des autophagischen Fluxes anhand der LC3B-Proteinlevel ist schematisch in Abb. 5 gezeigt. Diese erfolgt hierbei über das Verhältnis der LC3B-II-Proteinmengen in der An- bzw. Abwesenheit von Bafilomycin A1. Kommt es bei der zu untersuchenden Kondition zur Steigerung von Autophagie so ist nach der Hinzugabe eines Lysosomeninhibitors ein erhöhtes Verhältnis der LC3B-II-Proteinmenge messbar (Mizushima & Murphy, 2020).

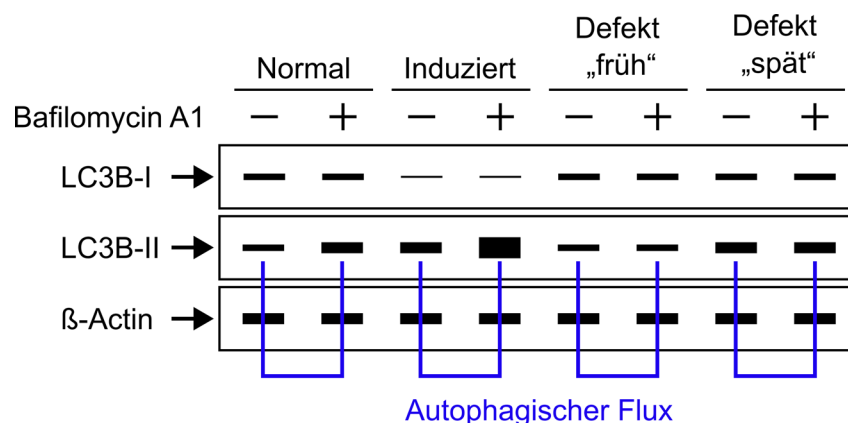


Abb. 5 Bestimmung des autophagischen Fluxes mittels Western-Blot-Analyse unter Hinzunahme eines Lysosomen- bzw. Fusionsinhibitors

Schematische Darstellung der Proteinmengenbestimmung von LC3B-I/II nach der Western-Blot-Analyse. Der basale Flux wird aus der Differenz der LC3B-II-Proteinmengen von

unbehandelten Zellen gegenüber Bafilomycin A1-Behandlung berechnet. Ein induzierter Flux wird z.B. unter Hungerbedingungen anhand der Differenz mit und ohne Bafilomycin A1-Behandlung beobachtet. Unveränderte basale LC3B-II-Proteinlevel deuten auf eine Störung früher Autophagieschritte hin, während ein erhöhtes LC3B-II-Niveau auf einen Defekt in späten Phasen hinweist. Die Abb. wurde adaptiert von Yoshii and Mizushima (2017).

Eine weitere Messmethode der Autophagieaktivität ist die Verwendung eines sogenannten Tandem-Reporters (Abb. 6 A). Dabei handelt es sich um Fusionsproteine, welche aus zwei fluoreszierenden Proteinen und einem Autophagie-Marker bestehen. Gut etablierte Kombinationen sind (ss)RFP(*signal sequence red fluorescent protein*)/mCherry zusammen mit (e)GFP (*enhanced green fluorescent protein*) fusioniert an LC3 als konventioneller Marker für unspezifische Autophagie (Wulansari et al., 2021). Der spezialisierte Prozess der ER-Phagie kann über die ER-lokalisierten Proteine RAMP4, CLIMP63, REEP5 oder die Signalsequenz KDEL (Lysin-Aspartat-Glutamat-Leucin), die den retrograden Golgi-zu-ER-Transport von Proteinen vermittelt, visualisiert werden (Chino et al., 2019; Liang et al., 2020). Die Erfassung des Tandem-Reporters erfolgt über eine fluoreszenzbasierte Quantifizierung beider Proteine, welche schematisch in Abb. 6 B dargestellt ist. Im basalen Zustand der Zelle wird der Reporter vollständig exprimiert und beide Fluoreszenzen sind detektierbar. Lokalisiert der Reporter in ein Milieu mit erniedrigtem pH-Wert, wie in diesem Fall in Autolysosomen, wird (e)GFP chemisch *gequencht*, während die Fluorophore (ss)RFP oder mCherry pH-stabil sind (Mizushima & Murphy, 2020). Bei der Durchflusszytometrie-basierten Messung der Gesamtzellfluoreszenz gibt daher das Verhältnis beider Fluorophore Aufschluss über die Autophagieaktivität, wobei Zellen mit einem hohen Vorkommen an Autolysosomen folglich ein reduziertes (e)GFP-Signal aufweisen (Liang et al., 2018). Zudem kann bei der mikroskopischen Betrachtung eine subzelluläre Analyse durch Zählung der „roten“ Autolysosomen und „gelben“ Autophagosomen erfolgen (Yoshii & Mizushima, 2017). Ein Nachteil dieser Messung ist, dass Fixierungsmittel in der Regel pH-neutral oder schwache Basen sind, welche bei einer Fixierung der Zellen den pH-Wert von Autolysosomen erhöhen und somit das GFP *quenching* maskieren. Dieses Problem kann durch ein Live-Cell-Imaging umgangen werden (Klionsky et al., 2021).

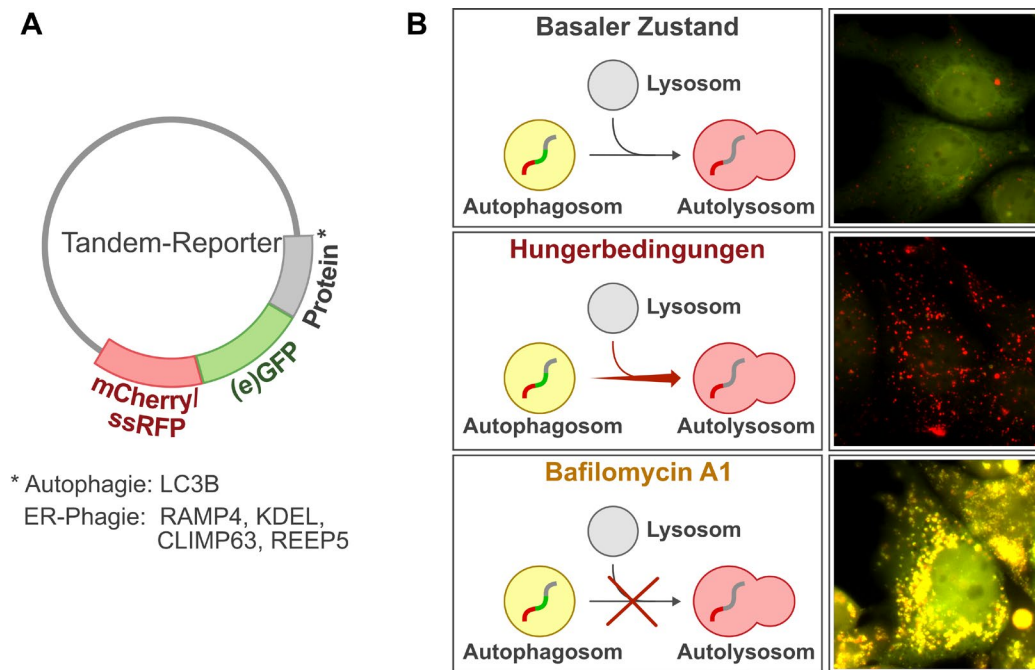


Abb. 6 Bestimmung des autophagischen Fluxes mittels Tandem-Reporter

(A) Schematischer Aufbau eines Tandem-Reportervektors bestehend aus für mCherry/ssRFP-(e)GFP-Proteine-kodierenden Sequenzen. Die Art der eingefügten cDNA für zelluläre Proteine (grauer Anteil der Expressionskassette) bestimmt die zu messende Form der Autophagie: unspezifische Autophagie wird über LC3B erfasst, während ER-Phagie in dieser Arbeit über RAMP4, CLIMP63, REEP5 oder KDEL bestimmt wurde. (B) Der Reporter wird infolge von Autophagie in Autophagosomen translokalisiert, welche in der Mischfluoreszenz gelb erscheinen. Durch die Fusion mit Lysosomen wird (e)GFP gequencht und die rötliche Fluoreszenz von mCherry/ssRFP überwiegt. Hungerbedingungen fördern die Produktion von Autolysosomen, während Bafilomycin A1 die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen hemmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder eigener in dieser Arbeit erhobenen Daten, welche Huh7 Zellen zeigen, die für 16 h gehungert oder mit 100 nM Bafilomycin A1 behandelt wurden. Die Abb. wurde in Anlehnung an Audesse et al. (2019) erstellt.

1.2.5. Autophagie im Kontext der Virusinfektion

Autophagieprozesse werden auch im Zuge der angeborenen Immunantwort aktiviert und dienen unter anderem der Beseitigung von Viren und deren Komponenten sowie der Antigenprozessierung für die adaptive Immunantwort (Liang et al., 2021). Aufgrund dieser antiviralen Funktion haben Viren Strategien erworben Autophagieprozesse zu umgehen, wie bspw. durch das Herpes-simplex-Virus 1 assoziierte Protein ICP34.5 (*infected cell protein 34.5*), welches Beclin-1 und TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) hemmt, wodurch es zu einer Blockade der Initiation von Autophagie kommt (Orvedahl et al., 2007). Ein weiteres Beispiel sind die vom humanen Cytomegalievirus gebildeten Proteine TRS1 und IRS1 (*insulin receptor substrate-1*), welche ebenfalls über die Bindung von Beclin-1 die Autophagosomenformation inhibieren (Chen et al., 2023). γ -Herpesviren wie KSHV (*kaposi sarcoma associated herpesvirus*) bilden neben ORF16, welches Beclin-1 hemmt, das virale K7 Protein, dass durch eine Blockade von VPS34 die Autophagosomen-Lysosomen-Fusion behindert (Liang et al., 2013; Münz, 2011).

Demgegenüber können andere Viren den Autophagieprozess proviral nutzen, indem gebildete Energiedonoren wie ATP die Replikation unterstützen oder Autophagosomen als Replikationsorte verwendet werden, aufgrund des durch Endomembranen geschützten, vom Rest der Zelle separierten Bereiches (Chen et al., 2023). Für Polioviren wurde gezeigt, dass eine Induktion von Autophagie mit Rapamycin die Replikation der Viren steigert und die viralen Proteine 2BC und 3A eine LC3-Lipidierung fördern sowie LC3-haltige, Autophagosomen-ähnliche DMVs bilden (Taylor & Kirkegaard, 2007). Ferner verursacht das Maul-und-Klauenseuche-Virus eine Ansammlung von LC3 und Autophagosomen (Berryman et al., 2012). Eine unvollständige Aktivierung von Autophagie wurde für HCV (Hepatitis-C-Virus) beobachtet, welches durch eine Interaktion von NS5B mit ATG5 früh in der Replikation zu einer Zunahme von Autophagosomen führt, während die Fusion mit Lysosomen gehemmt ist (Guevin et al., 2010). Hierbei induziert NS4B das Autophagie-hemmende Protein Rubicon, welches die weitere Prozessierung der Autophagosomen behindert (Wang & Ou, 2015). Das taxonomisch verwandte Zika-Virus verursacht durch NS4A und NS4B eine Autophagieaktivierung zur Bildung des Replikationskomplexes ausgehend vom ER, welche die AKT(Proteinkinase B, PKB)-Phosphorylierungen reduziert und dadurch zu einer Inhibierung von mTOR führt (Chiramel & Best, 2018). Zudem spaltet die virale Protease NS3 den Cargo-Rezeptor FAM134B, welcher ein wichtiger Faktor für ER-Phagie ist und diesen Prozess hierbei unterdrückt (Choi et al., 2018).

1.3. SEC24A-abhängige Regulation von intrazellulären Transportvesikeln

COPII-Vesikel transportieren neusynthetisierte Proteine vom ER zum Golgi-Apparat und werden unter Beteiligung von SEC12, SEC23-SEC24 und SEC13-SEC31 gebildet (Zanetti et al., 2013). Zudem kooperieren COPII-Vesikel mit Cargo-Rezeptoren im Prozess der ER-Phagie (Cui et al., 2019). Ein für diese Arbeit relevantes Protein ist SEC24A, welches durch seine zahlreichen Bindungsstellen spezifisch Proteine wie z.B. E-Cadherin und Prokollagen erkennen kann und sich von den drei weiteren Isoformen (SEC24B-D) durch seine Bindungsdomänen unterscheidet (Chatterjee et al., 2021; McCaughey & Stephens, 2018; Omari et al., 2018). In einem CRISPR-Cas9-basierten genomweiten *loss-of-function screen* wurde SEC24A als dereguliertes Protein nach HCoV-229E-Infektion und Thapsigargin-Behandlung identifiziert (Albert, 2023). Zudem zeigten SEC24A-defiziente Zellen nach 96 h Infektion mit zusätzlicher Thapsigargin-Behandlung einen erhöhten viralen Titer und eine verbesserte Zellviabilität. Daher wurde SEC24A eine Rolle in der antiviralen Wirkung von Thapsigargin sowie seiner

Zytotoxizität zugeordnet und dieser Faktor ist daher eine wichtige Komponente für die weitere Aufklärung des Wirkmechanismus des Inhibitors (Albert, 2023; Chidawanyika et al., 2018).

1.4. Caveolae in der Membranorganisation

Caveolae sind spezialisierte *lipid rafts*, welche an der Plasmamembran lokalisiert sind und Auswölbungen bilden (Chidlow & Sessa, 2010). Sie sind an verschiedenen molekularen Zellvorgängen beteiligt wie der Lipid-Regulation, Signaltransduktion und Membranprozessen. Caveolin-1 – 3 (*coat proteins*) bilden hierbei ein Grundgerüst für die Caveolae, während CAVIN-1 – 4 (*support/adapter proteins*) die Regulation der Caveolae, Caveoline und Membranumbauprozesse beeinflussen (Chidlow & Sessa, 2010). Die Rolle der Caveolae oder der beteiligten Proteine in Bezug auf Autophagie ist weitestgehend unerforscht. Ein Mangel an Caveolin-1 aktiviert die Autophagosomen-Lysosomen-Fusion und induziert dadurch eine Erhöhung der basalen und stressinduzierten Autophagie, jedoch war dies Caveolae-unabhängig (Shi et al., 2015). Im Kontext von Virusinfektionen wurde CAVIN-3 eine essentielle Rolle in der Replikation des Humanen Parainfluenza Virus Typ 2 zugeordnet (Ohta et al., 2020). Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Fokus auf MURC/CAVIN-4 gelegt, welches erstmals in Herz- und Skelettmuskelzellen entdeckt wurde und im Vergleich zu den weiteren CAVIN-Proteinen nur gering erforscht ist (Ogata et al., 2008).

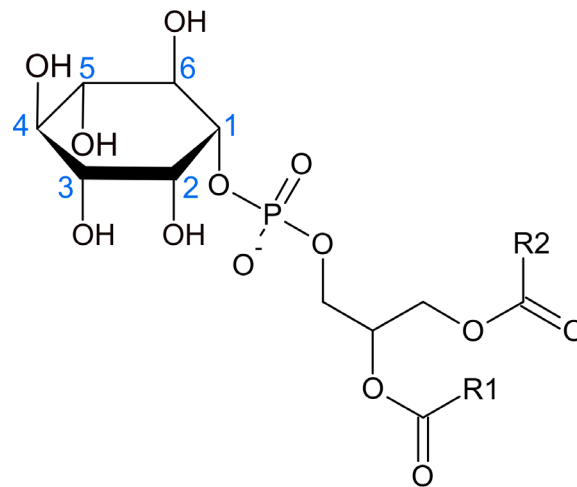
1.5. Phosphoinositide

Phosphoinositide sind essentielle Lipide, welche an Vesikeltransport, Budding, Membranfusionen und der Zytoskelett-Dynamik beteiligt sind (Posor et al., 2022). Dysregulationen der zur Synthese von Phosphoinositiden benötigten Kinasen oder Phosphatasen stehen in Verbindung mit verschiedenen Tumorerkrankungen, Myopathien und Neuropathien (Burke et al., 2023). Das Hauptvorkommen von Phosphoinositiden findet sich in der Plasmamembran, wo sie neben Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Sphingomyelin die Lipiddoppelschicht bilden, deren genaue Komposition je nach Zelltyp und Stresszustand der Zelle variiert (Ingólfsson et al., 2014; Vigh et al., 2007).

1.5.1. Struktur, Synthese und Funktion von Phosphoinositiden

Phosphoinositide machen mit etwa 1 % nur einen geringen Anteil der Phospholipide einer Zelle aus (Stephens et al., 1993). Ihre chemische Struktur umfasst einen Inositolring, der an ein Glycerol-Gerüst gekoppelt ist, welches zwei Fettsäuren konjugiert, die für Säugetiere meistens Stearinsäure und Arachidonsäure sind (Abb. 7) (Broekman

et al., 1981). Variable Phosphorylierungen an den Kohlenstoffatomen C₃, C₄ und C₅ des Inositolrings ermöglichen die Bildung von sieben verschiedenen Phosphoinositiden: PI3P, PI4P, PI5P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃ (Falkenburger et al., 2010).



*R = Fettsäurereste bspw. Arachidonyl, Stearyl

Abb. 7 Strukturformel von Phosphatidylinositol

Durch Phosphorylierung an den blau gekennzeichneten Kohlenstoffatomen entstehen verschiedene Phosphoinositide. Am Glycerol-Gerüst gibt R eine undefinierte Fettsäurestruktur an.

PI4P macht etwa 45 % der in Zellen vorkommenden Phosphoinositide aus. Die Synthese findet hauptsächlich im Golgi-Apparat statt, wo es seine Hauptfunktion in dem Transport von Vesikeln und Proteinen ausübt (De Craene et al., 2017). Es wird durch die Phosphorylierung von PI mittels PI4-Kinasen (PI4K α und PI4K β) gebildet oder durch die Dephosphorylierung von PI(4,5)P₂ mittels PI5-Phosphatasen (ORCL1, INPP5B, INPP5E) oder von PI(3,4)P₂ mittels PI3-Phosphatase (PTEN) (Abb. 8) (Hou et al., 2025). Mutationen der Phosphatasen stehen in Verbindung mit Erkrankungen wie Cowden-Syndrom, Tumorerkrankungen, Lowe-Syndrom, Ziliopathien und Morbus Parkinson (Volpatti et al., 2019).

PI3P spielt mit einem Anteil von 15 % der zellulären Phosphoinositide eine wichtige Rolle in der Formation der präautosomalen Strukturen am ER, welche zur Formation von Autophagosomen nach Aktivierung von Autophagie benötigt werden (De Craene et al., 2017). Die Synthese erfolgt durch die Phosphorylierung von PI am C₃-Atom, welche durch 8 verschiedene Kinasen initiiert werden kann. Die Hauptfunktion der Klasse 1 PI3KC ist die Phosphorylierung von PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃ während Klasse 2 PI3KC PI4P in PI(3,4)P₂ umwandelt. Die Klasse 3 PI3KC (VPS34) ist für die Synthese von PI3P aus PI verantwortlich und die Hauptquelle des Phosphoinositids. Die Bildung durch Dephosphorylierung wird mit den Phosphatasen FIG4/SAC3 aus PI(3,5)P₂ und INPP4A/B aus PI(3,4)P₂ katalysiert (Sasaki et al., 2009).

PI5P wurde als letztes monophosphoryliertes Phosphoinositid mit 100-fach niedrigeren Konzentrationen als PI4P entdeckt (Hasegawa et al., 2017; Rameh et al., 1997). Seine Synthese erfolgt aus PI mittels PIKfyve (*phosphoinositide kinase, FYVE-type zinc finger containing*) oder aus PI(3,5)P₂ mittels Myotubularin 3-Phosphatasen (MTMs) (De Craene et al., 2017). PI5P kann in der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat, dem sarkoplasmatischen Retikulum und zellzyklus- sowie stressabhängig im Nukleus detektiert werden. Seine genaue Funktion ist Gegenstand der Forschung (Grainger et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass die Zugabe des Phosphoinositids zu Zellen die Formation von Autophagosomen steigert und den Ablauf der Autophagie nach Inhibierung von VPS34 aufrechterhält (Vicinanza et al., 2015).

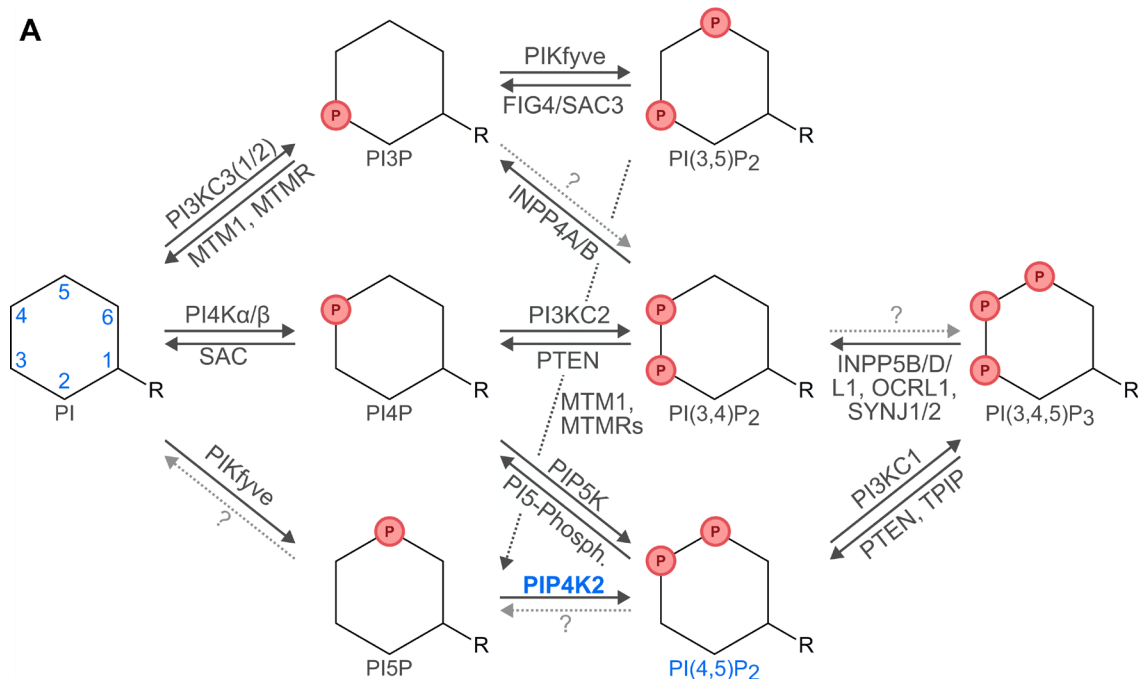
PI(3,4)P₂ ist ausschließlich in Säugetierzellen nachweisbar und seine intrazellulären Level können durch Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert werden (De Craene et al., 2017). Es dient als *second messenger* durch die Aktivierung der Proteinkinasen AKT und PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*). Mutationen von AKT1 stehen in Verbindung mit verschiedenen Tumorerkrankungen und führen zu der Annahme, dass PI(3,4)P₂ eine wichtige Funktion in der Regulation des Zellzyklus, Zellüberlebens, Angiogenese und Glukosemetabolismus besitzt (Falkenburger et al., 2010; Hers et al., 2011). Der Hauptsyntheseweg findet durch die Phosphorylierung von PI4P mittels PI3KC2 statt. Einen alternativen Weg bildet die Dephosphorylierung von PI(3,4,5)P₃ durch INPP5D, INPPL1, OCRL1, INPP5B und SYNJ1/2 (Sasaki et al., 2009).

PI(3,5)P₂ befindet sich primär in Endosomen und Lysosomen. Ähnlich wie PI5P sind die Konzentrationen des Phosphoinositids sehr niedrig und zeigen eine starke Variabilität durch Stresseinwirkungen (Hasegawa et al., 2017). Nach derzeitigem Forschungsstand ist die Synthese nur durch die Phosphorylierung von PI3P mittels PIKfyve möglich (Posor et al., 2022). Ein vollständiger *knockout* von *Pikfyve* in Mäusen ist im frühen embryonalen Stadium letal (Ikonomov et al., 2011). PI(3,5)P₂ und PI5P spielen eine Rolle in zentralen zellulären Prozessen, wie der Signaltransduktion, der Endosomen-Prozessierung und der lysosomalen Homöostase (Hasegawa et al., 2017).

PI(4,5)P₂ ist mit einem Vorkommen von bis zu 45 % neben PI4P das prävalenteste Phosphoinositid (De Craene et al., 2017). Die Synthese an der Plasmamembran erfolgt aus PI4P durch Typ 1 PIP5KA/B/C oder am Golgi-Apparat aus PI5P durch Typ 2 PIP4KA/B/C (Fiume et al., 2015). Für PIP5Ks wurde die Formation von Homo- oder Heterodimeren an der Membran gezeigt, welche essentiell für die Lokalisation und Funktion der Enzyme sind (Lacalle et al., 2015). Eine Dephosphorylierung von PI(3,4,5)P₃ zu PI(4,5)P₂ wird durch PTEN und TPIPα/β/γ katalysiert (Sasaki et al., 2009).

Die Funktion von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ an der Plasmamembran umfasst die Regulation des Zytoskeletts und der Endozytose (Hou et al., 2025). Seltener lokalisiert es in den Nukleus, wo es an der Regulation von prä-mRNA-Splicing und der Poly(A)Polymerase-Aktivität involviert ist (Li et al., 2013; Osborne et al., 2001).

$\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ ist im basalen Zustand der Zelle niedrig abundant, jedoch unterliegen seine Konzentrationen starken Schwankungen mit bis zu 100-fachen Zunahmen (Milne et al., 2005). Die Synthese erfolgt vornehmend an der Plasmamembran durch die Klasse 1 PI3KC aus $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (Sasaki et al., 2009). Es fungiert als wichtiger Regulator für die Zellproliferation, den Zellzyklus, Apoptose und Membranveränderungen. Zudem zeigt es eine Involvierung in dem PI3K/AKT-Signalweg und spielt eine essentielle Rolle für Diabetes, Tumorigenese und kardiovaskuläre Erkrankungen (Hammond & Burke, 2020).



B

Kinasengruppe	Genname	Proteinname, Aliasse	Substrate	Reaktionsprodukte
PI3K (Typ I)	PIK3C1A/B/G/D	PI3KCa/β/γ/δ	$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$	$\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$
PI3K (Typ II)	PIK3C2A/B/G	PI3KC2α/β/γ	PI_4P	$\text{PI}(3,4)\text{P}_2$
PI3K (Typ III)	PIK3C3	PI3KC3, Vps34	PI	PI_3P
PI4K (Typ II)	PI4K2A/B	PI4KI1α/β	PI	PI_4P
PI4K (Typ III)	PI4KA/B	PI4Kα/β	PI	PI_4P
PIPK (Typ I)	PIP5K1A/B/C	PI4P5KI1α/β/γ	PI_4P	$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$
PIPK (Typ II)	PIP4K2A/B/C	PI5P4KI1α/β/γ	PI_5P	$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$
PIPK (Typ III)	PIKFYVE, PIP5K3	PI3P5K, PIKfyve	PI_3P , PI	$\text{PI}(3,5)\text{P}_2$, PI_5P

Abb. 8 Syntheschemata von Phosphoinositiden (PI) und Klassifizierung der PI-Kinasen
 (A) Darstellung der Synthesewege der Phosphoinositide mit den beteiligten Kinasen und Phosphatasen. R bezeichnet die restliche Struktur der Phosphoinositide mit dem Glycerolgerüst und den Fettsäureresten. (B) Auflistung der an der Synthese von Phosphoinositiden beteiligten

Kinasen mit den zugehörigen Substraten und Reaktionsprodukten. In dieser Arbeit wurde PIP4K2 mit seinem Produkt PI(4,5)P₂, in blau hervorgehoben, näher untersucht. Die Abb. wurde in Anlehnung an Hou et al. (2025) erstellt.

1.5.2. Die Rolle von PIP4K2 in der nicht-kanonische Bildung von PI(4,5)P₂

Typ 2 PIP4K (PIP4K2) spielen eine untergeordnete Rolle in der Synthese von PI(4,5)P₂ und sind ausschließlich in komplexen Eukaryoten wie Würmern, Fliegen oder Säugetieren zu finden (Sasaki et al., 2009). Ihr Expressionslevel ist vergleichbar oder erhöht gegenüber Typ 1 PIP5K und abhängig vom Zelltyp sowie eventuellen Stresszuständen (Nagaraj et al., 2011). Die Limitation der PI(4,5)P₂-Synthese über diese Kinasen ist bedingt durch die geringe Konzentration des Substrates PI5P (Emerling et al., 2013). Die Rolle der Redundanz der Produktion von PI(4,5)P₂ über PIP5K und PIP4K2 ist weitestgehend ungeklärt (Jin & Xue, 2023). Die Expression der drei Isoformen zeigt gewebeabhängige Unterschiede. So wird PIP4K2A vor allem in peripheren Blutzellen, PIP4K2B primär in Muskelzellen und PIP4K2C in Nierengewebe gebildet (Fiume et al., 2015). Des Weiteren besitzen die Kinasen eine enzymatisch-unabhängige Funktion als negative Regulatoren von PIP5K, indem PIP4K2 bei einem erhöhten PI(4,5)P₂-Level an die Plasmamembran translokalisieren und an PIP5K binden, welches zu einer Senkung der PI(4,5)P₂-Produktion führt (Wills et al., 2023). Die Aktivität der drei Isoformen unterscheiden sich erheblich, so zeigt PIP4K2A eine höhere enzymatische Aktivität *in vitro* als PIP4K2B (Fiume et al., 2015). In einer Studie mit rekombinanten Proteinen war PIP4K2C 2.000-fach geringer aktiv als PIP4K2A (Clarke & Irvine, 2013). Neben der regulatorischen Funktion bildet PIP4K2 eine Subpopulation von PI(4,5)P₂, welche außerhalb der Plasmamembran an Endomembranen beispielsweise des ERs oder des Golgi-Apparates lokalisiert (Sarkes & Rameh, 2010). In Mäusen zeigte der *knockout* von *Pip4k2a* und *Pip4k2b* kurz nach der Geburt letale Effekte, während die pränatale Entwicklung unverändert stattfand (Emerling et al., 2013). Des Weiteren besitzt PIP4K2A protektive Funktionen gegen Leukämie, wobei nach einem *knockdown* der Kinase die Proliferation von Leukämiezellen reduziert ist, während gesunde Zellen nicht betroffen sind (Jude et al., 2015). In Brustkrebsgewebe konnte eine Überexpression von PIP4K2A identifiziert werden, welche mit einer verringerten Bildung von p53 korrelierte. Aufgrund des Sachverhaltes, dass 70 % aller Tumore Mutationen von p53 aufweisen, ist PIP4K2A daher ein vielversprechender Angriffspunkt in der Tumorthherapie (Fiume et al., 2015). Zudem konnte für PIP4K2 eine Verbindung zu Autophagieprozessen beobachtet werden, wobei der *knockout* von *Pip4k2a* und *Pip4k2b* in der Leber von Mäusen zu einer Akkumulation von Lipidtropfen und autophagischen

Vesikeln nach Fastenbedingungen führte, welche auf eine Abnahme der mTORC1-Aktivität zurückzuführen ist (Lundquist et al., 2018).

1.5.3. Pharmakologische Inhibition der Phosphoinositidkinasen

Die Kinasen der Phosphoinositid-Synthese können durch eine Vielzahl an Inhibitoren gehemmt werden, deren therapeutisches Potential für bspw. Autoimmunerkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen oder virale Infektionen erforscht wird (Burke et al., 2023). In Deutschland für die Krebsbehandlung bereits zugelassene Medikamente sind PI3K-Inhibitoren wie Idelalisib, Alpelisib und Duvelisib, welche bei bestimmten Mutationen in der Erstlinientherapie, ansonsten vor allem bei Rezidiven verschiedener Leukämieformen sowie beim Mammakarzinom zum Einsatz kommen (Yu et al., 2023).

Für PIKfyve befinden sich zwei Wirkstoffe in klinischen Studien: ESK981 und Apilimod (Burke et al., 2023). In einem *screening* für die Behandlung eines Prostatakarzinoms wurde ESK981 entdeckt und befindet sich aktuell in klinischen Studien der Phase 2 für das kastrationsresistente Prostatakarzinom (Heath et al., 2024). Apilimod wurde initial als Interleukin-12/23-Inhibitor identifiziert (Wada et al., 2012). Vor diesem Hintergrund erfolgten klinische Studien für Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis und Psoriasis, wobei es nur zu einer begrenzten Verbesserung kam (Cai et al., 2013). Als weitere Zielstruktur des Inhibitors wurde PIKfyve entdeckt, welches Autophagie blockiert und die lysosomale Homöostase dysreguliert (Burke et al., 2023). Infolgedessen zeigen sich antiproliferatorische Effekte für das B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Gayle et al., 2017). Zudem besitzt Apilimod eine antivirale Wirkung gegen Ebola-, Marburg-Virus und SARS-CoV-2. Der Mechanismus basiert auf der Hemmung des Eintrittes der Viren in die Zelle aufgrund der Blockade des Endolysosomen-Transports (Nelson et al., 2017; Riva et al., 2020). Für Apilimod und den nur *in vitro* getesteten Inhibitor YM201636 wurden ebenfalls starke antivirale Effekte mit geringer Toxizität für HCoV-229E und HCoV-OC43 beobachtet (Baker et al., 2023). Eine postinfektiöse Zugabe von PIKfyve-Inhibitoren zeigte weiterhin eine antivirale Wirkung gegen SARS-CoV-2 in Abhängigkeit vom *in vitro* Modell, welche jedoch abgeschwächt war und daher neben dem Viruseintritt eine Beteiligung an weiteren Schritten im Replikationszyklus von Coronaviren vermuten lässt (Logue et al., 2022).

Eine weitere Zielstruktur im Kontext der Virusinfektion sind Typ 3 PI4K. Die Isoform PI4KA ist beteiligt an der Formation der Replikationsorganellen von HCV und Enzephalomyokarditis-Virus, welche eine Anreicherung von PI4P zeigen (Berger et al., 2011; Dorobantu et al., 2015). Enviroxime ist ein selektiver Inhibitor von PI4KB und

verhindert *in vivo* die Replikation des Poliovirus (Phillpotts et al., 1983). In klinischen Studien der Phase 2 gegen Enterovirus-Infektionen zeigte der Wirkstoff nur einen geringen, nicht effektiv nutzbaren therapeutischen Effekt (van der Schaar et al., 2013). Weitere Inhibitoren der Kinase zur Therapie von Virusinfektionen sind in Entwicklung (Burke et al., 2023).

Für PIP4K2 sind Inhibitoren erhältlich, welche sich in ihrer Isoformenspezifität unterscheiden. THZ-P1-2, ein kovalenter Inhibitor aller Isoformen, wird zur Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie untersucht (Lima et al., 2024; Sivakumaren et al., 2020). CC260 ist ein dualer Inhibitor von PIP4K2A und PIP4K2B mit geringer unspezifischer Aktivität gegen PIP5K, jedoch moderaten Effekten auf PIKfyve ($K_i \sim 200$ nM), PI3K- γ ($K_i \sim 200$ nM) und PI3K- δ ($K_i \sim 120$ nM) (Lima et al., 2024). BAY-091 wurde als potenter Inhibitor für PIP4K2A durch ein *high throughput screening* entwickelt, während seine Affinität zu den anderen Isoformen unbekannt ist (Wortmann et al., 2021).

1.6. Zielsetzung

Publizierte und bislang nicht veröffentlichte Multi-omics Daten der AG Kracht haben zur Identifikation einer Reihe an Wirtszellproteinen geführt, welche infolge einer HCoV-229E-Infektion dereguliert werden. Diese sind beteiligt an Prozessen wie der UPR, ERAD oder Autophagie, insbesondere der ER-Phagie. Während eine Modulation der Autophagie bereits für andere Viren als essentieller für die Replikation erforderlicher Prozess identifiziert werden konnte, sind die Rollen von Autophagie und ER-Phagie bei der Coronavirus-Infektion inkomplett untersucht und haben zu teils kontroversen Befunden geführt.

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit verbesserten zellbiologischen Methoden eine systematische Quantifizierung der Autophagie und ER-Phagie in HCoV-229E-infizierten Zellen zu implementieren, um die Hypothese zu überprüfen, dass Coronaviren diese Prozesse für ihre Replikation benötigen. Hierbei soll ein Schwerpunkt auf die automatisierte Quantifizierung von Veränderungen einzelner Zellen und subzellulärer Strukturen mittels KI-basierter Verfahren erfolgen, um die zelluläre Heterogenität einer infizierten Zellpopulation genauer abzubilden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit besteht darin, mittels pharmakologischer und genetischer Ansätze die Funktion ausgewählter Kandidatenproteine (SEC24A, PIP4K2, MURC/CAVIN-4) im viralen Replikationszyklus und im Kontext der Autophagieprozesse zu überprüfen, um neue potentielle Zielstrukturen funktionell zu validieren und so innovative auf die Wirtszelle abzielende antivirale Ansätze zu charakterisieren.

2. Material

2.1. Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	parental/genetisch verändert
A549	Adenokarzinomzelllinie die von alveolaren Epithelzellen abstammt (ATCC, S1)	Parental
A549 ++	A549 Zellen mit Überexpression von CD13 und TMPRSS2 (Lie et al., 2023)	genetisch verändert
A549_pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
A549++_LentiCRISPRV2	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
A549++_LentiCRISPRV2_MURC	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
A549++_LentiCRISPRV2_PIP4K2A	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
A549++_LentiCRISPRV2_PIP4K2AB	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
A549++_LentiCRISPRV2_PIP4K2ABC	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
A549++_LentiCRISPRV2_PIP4K2AC	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
A549++_LentiCRISPRV2_PIP4K2B	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
A549++_LentiCRISPRV2_PIP4K2BC	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
A549++_LentiCRISPRV2_PIP4K2C	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
HCT116	Humane Kolonkrebszelllinie (ATCC)	Parental
HCT116_pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
HEK293FT	Humane embryonale Nierenzellen (Thermo Fisher Scientific, #R7000)	Parental
HeLa	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (ATCC, S1)	Parental
HeLa_pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
HeLa_pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
HeLa_TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7	Humane Hepatomzellen (Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) cell bank (Nakabayashi et al., 1982)), S1	Parental, von Prof. John Ziebuhr
Huh7_LentiCRISPRV2	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_mCherry-eGFP-LC3B	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_MURC	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_MURC_mCherry-eGFP-LC3B	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert

Huh7_LentiCRISPRV2_PIP4K2A	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_PIP4K2A_mCherry-eGFP-LC3B	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_PIP4K2AB	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_PIP4K2AB_mCherry-eGFP-LC3B	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_PIP4K2ABC	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_PIP4K2ABC_mCherry-eGFP-LC3B	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_PIP4K2B	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_PIP4K2B_mCherry-eGFP-LC3B	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_PIP4K2C	hergestellt durch Franziska Dort	CRISPR-Cas9 verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_SEC24a_sg1	hergestellt durch Benadict Vincent Albert (Albert, 2023)	CRISPR-Cas9 verändert
Huh7_LentiCRISPRV2_SEC24a_sg1_mCherry-eGFP-LC3B	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_pCDH-EF1a-ssRFP-GFP-KDEL	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_TetOn-CLIMP63-mCherry-eGFP	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert
Huh7_TetOn-REEP5-mCherry-eGFP	hergestellt durch Franziska Dort	genetisch verändert

2.2. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Herkunft	Genotyp
XL1-Blue E.coli	Thermo Fisher Scientific	F' Tn10(Tetr) proA +B + lacIqΔ(lacZ)M15I recA1 gyrA96 (Nalr) tbi-1bsdR17 (r-k m-k) glnV44 relA1 lac
TOP10 E.coli	Thermo Fisher Scientific	F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
DH5α E. coli (Plasmide von Addgene enthalten)	Addgene #202726, #202727, #202729, #202731	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1

NEB® Stable E. coli (Plasmide von Addgene enthalten)	Addgene #170446, #109014, #128257	F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzzf::Tn10 (TetR)/Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14-Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr hsdRMS-mcrBC)
--	-----------------------------------	--

2.3. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von folgenden Herstellern erworben, sofern nicht anders angegeben: Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen/ThermoFisherScientific, Merck, Pharmacia, Promega, Roche, Roth, Serva, Sigma Aldrich

2.4. Reagenzien und Kits

Kit	Hersteller
Quick RNA Viral (TM) Kit	Biozol, #ZYM-R1034
Mycoplasma Detection Kit Venor GeM Classic	Minavera biolabs, #11-1025
NucleoBond Xtra Midi Kit für Plasmid DNA	Macherey-Nagel, #740410
NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel, #740609
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, #740588
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel, #740955

Bezeichnung	Hersteller
10X FastDigest Buffer	Thermo Fisher Scientific, #B64
4X Roti-Load	Roth, #K929.2
5 ml Falcons mit Zellsieb für FACS	Corning, #352235
5X Phusion GC reaction buffer	Thermo Fisher Scientific, #F-530XL
5X Phusion HF reaction buffer	Thermo Fisher Scientific, #F-530XL
5X Reaction Buffer	Thermo Fisher Scientific, #EP0441
Adenosin-5'-triphosphat Magnesiumsalz	Sigma-Aldrich, #A9187
Amersham ECL™ Western-Blotting-Reagenzien	Merck, #GERPN2106
Ampicillin Natriumsalz	Roth, #K029.2
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck Millipore, #101201
Avicel®	FMC Biopolymer, #RC591
Biotin-Azide	Cayman Chemicals, #Cay13040
BSA (Albumin, Rind, Fraktion V)	Serva, #11930.04
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega, #G3582
Coomassie Brilliant Blau R-250	Serva, #35051
Cytiva Amersham™ Protran™ NC Nitrocellulose-Membranen: Rollen	Cytiva Amersham, #10600006
DMEM High Glucose	anprotec, #AC-LM-0012
DMSO	Roth, #4720.4
DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Fisher Scientific, #R0611
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, #R0193
Doxycyclin -hyclat	Sigma-Aldrich, #D9891
DPBS	Anprotec, #AC-BS-0002
Duolink® In Situ PLA Sonde Anti-Kaninchen PLUS	Sigma-Aldrich, #DUO92002
Duolink® In Situ PLA® Sonde Anti-Maus MINUS	Sigma-Aldrich, #DUO92004
Duolink® In Situ Waschpuffer, Fluoreszenz	Sigma-Aldrich, #DUO82049
Duolink® In-situ-Detektionsreagenzien Orange	Sigma-Aldrich, #DUO92007
Ethidiumbromidlösung 1 %	Roth, #2218.2

Material

Falcon™ Rundboden-Teströhrchen aus Polystyrol mit Schnappverschluss und Zellsieb	Thermo Fisher Scientific, #10585801
FBS good forte	anprotec, #AC-SM-0143
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific, #SM0331
Geneticin	Sigma-Aldrich, #G8168-10ml
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	PAN-biotech, #P04-32505
High Capacity Streptavidin Agarose Resin	Thermo Fisher Scientific, #20361
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, #301704
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, #H3570
ibiTreat µ-Slide VI 0.4	ibidi, #80606
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Merck Millipore, #WBKL50500
Immobilon-P Membran, PVDF	Merck Millipore, #IPVH00010
Kanamycin	Carl Roth, #T832.3
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck Millipore, #102790
LB broth	BD, #244610
L-Glutamine	PAN-biotech, #P04-80100
Lipofectamine LTX and PLUS reagent	Invitrogen, #15338-100
Magermilchpulver	Sucofin
MEM (Temin's modification) (2X)	Gibco, #21935-028
Methylenblau	Sigma-Aldrich, #M4259
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid) (25 mM)	Thermo Fisher Scientific, #R0971
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco, #11360-039
Non-Essential amino acids 100X	Gibco, #11140050
Normal Donkey Serum	Biozol, #LIN-END9010
O-propargyl-puromycin (OPP)	MedChemExpress, #HY-15680
OptiMEM medium	Gibco, #51985-026
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, #26616
Paraformaldehyde solution 4% in PBS	Santa Cruz, #sc-281692
Penicillin-Streptomycin	PAN-biotech, #P06-07100
Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, #23200
Polybrene (hexadimethrine bromide)	MedChemExpress, #HY-112735
Ponceau S	Sigma, #P7170
Puromycin-dihydrochlorid	Sigma, #P8833
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, #S0142
Rotiphorese Gel 30	Roth, #3029.1
Roti-Quant Bradford kit	Roth, #K015.1
Saponin	Sigma-Aldrich, #S4521-10G
Standard-I-Nähragar	Merck Millipore, #1.07881.0500
Streptavidin Agarose Resin	Thermo Fisher Scientific, #20353
SYBR™ Green Universal Master Mix	Applied biosystems, #4309155
SYTOX™ Blue Nukleinsäurefärbemittel	Thermo Fisher Scientific, #S11348
T4 Ligase Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, #EL0014
T4 PNK buffer A	Thermo Fisher Scientific, #EK0031
TaqMan Fast Advanced PCR Master Mix	Applied Biosystems, #4444556
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine)	Sigma-Aldrich, #T9281-25ML
Tetracycline-free FBS	PAN Biotech, #P30-3602
Tris(2-carboxyethyl)phosphin -hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich, #C4706
Tris[(1-Benzyl-1H-1,2,3-Triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA)	Sigma-Aldrich, #678937
Trypsin / EDTA	Anprotec, #AC-EZ-0009
Whatman gel blotting paper	Whatman
Zeba™ Spin Desalting Plates, 7K MWCO	Thermo Fisher Scientific, #89882

2.5. Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen erworben, sofern nicht anders vermerkt: Ansell, appliedbiosystems, Biozym, Brand, Braun, Eppendorf, Greiner, Ibidi, Integra, Neolab, nerbeplus, Nerbe-Plus, Nunc, Omnilab, Roth, Sarstedt, VWR.

2.6. Expressionsplasmide

Name	Hersteller/Herkunft
FUW-mCherry-GFP-LC3	Addgene #110060
LentiCRISPR-v2	Addgene #52961
LentiCRISPR-v2_MURC_sg1-3	Franziska Dort
LentiCRISPR-v2_PIP4K2A_sg1-3	Franziska Dort
LentiCRISPR-v2_PIP4K2B_sg1-3	Franziska Dort
LentiCRISPR-v2_PIP4K2C_sg1-3	Franziska Dort
LentiCRISPR-v2_SEC24A_sg1	Benadict Vincent Albert
LentiGuide-TagBFP-2A	Addgene #167929
pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B	Addgene #170446
pCDH-EF1a-ssRFP-GFP-KDEL	Franziska Dort
pcDNA 3.1	AG Kracht
pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL	Addgene #128257
peGFP-C1	AG Kracht
pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4	Addgene #118391
pMD2.G	Addgene #12259
psPAX2	Addgene #12260
TagBFP2-PIP4K2A	Addgene #202726
TagBFP2-PIP4K2AD273K	Addgene #202727
TagBFP2-PIP4K2B	Addgene #202728
TagBFP2-PIP4K2BD278K	Addgene #202729
TagBFP2-PIP4K2C	Addgene #202730
TagBFP2-PIP4K2CD280K	Addgene #202731
TetOn-CLIMP63-mCherry-eGFP	Addgene #139871
TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4	Addgene #109014
TetOn-REEP5-mCherry-eGFP	Addgene #139870

2.7. Taqman-Sonden

Sonde	Produktgröße	RefSeq	Hersteller, Assay-ID
ACTB	171 bp	NM_001101.3	Thermo Fisher Scientific, #Hs99999903_m1
GUSB	81 bp	NM_000181.3	Thermo Fisher Scientific, #Hs99999908_m1
MURC	155 bp	NM_001018116.2	Thermo Fisher Scientific, #Hs02386565_m1

2.8. Oligonukleotide und Primer

Alle Primer wurden von Microsynth (<https://www.microsynth.com>) hergestellt. Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung angegeben.

2.8.1. Primer zur Sequenzierung

Alle Sequenzierungen erfolgten durch Microsynth (<https://www.microsynth.com>).

Bezeichnung	Sequenz (in 5' zu 3' Orientierung)
EF1alpha	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC (Standardprimer Microsynth)
hPKG_rev-Primer	CTTGCGAATGCGGAACAC
hU6-fwd	GAGGGCCTATTTCCCATGATT (Standardprimer Microsynth)
hUBCpro-F	TGAAGCTCCGGTTTTGAACT
LNCX-Primer	AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC
mCherry-F	CCCCGTAATGCAGAAGAAGA
pCDH-EF1a_Primer-5'	GGATCTCGACGGTATCGG
SV40pA-R	GAAATTTGTGATGCTATTGC
WPRE-R	CATAGCGTAAAAGGAGCAACA

2.8.2. Primer zur Rekonfiguration des Vektorgerüsts des ER-Phagie-Reporters

Bezeichnung	Sequenz (in 5' zu 3' Orientierung)
KDEL_SALI_rev	TAATGTGCGACCGGATCCTTAGAGCTCATCTTTC
NheI_KDEL_fwd	TAATGCTAGCATCCACGCTGTTTTGACCTC
SwaI_KDEL_fwd_1	TAATATTTAAATATCCACGCTGTTTTGACCTC

Zur Klonierung Restriktion wurden die Primer mit den Sequenzen „TAATGTGCGAC“ für SALI, „TAATGCTAGC“ für NheI und „TAATATTTAAAT“ für SwaI ergänzt.

2.8.3. CRISPR-Cas9 sgRNAs

Bezeichnung	Sequenz (in 5' zu 3' Orientierung)
MURC-sgRNA1_as	AAACGTCGAGTGTTACAGAAGATGC
MURC-sgRNA1_se	CACCGCATCTTCTGTAACACTCGAC
MURC-sgRNA2_as	AAACGTTGAAGCTTTCACAGTCGCC
MURC-sgRNA2_se	CACCGGCGACTGTGAAAGCTTCAAC
MURC-sgRNA3_as	AAACCCAGTAGATCTGTCTTCGGAC
MURC-sgRNA3_se	CACCGTCCGAAGACAGATCTACTGG
PIP4K2A-sgRNA1_as	AAACGGGGAGTTCGATCCGAACATC
PIP4K2A-sgRNA1_se	CACCGATGTTCCGGATCGAACTCCCC
PIP4K2A-sgRNA2_as	AAACCGGGAATACACTGAACAGCTC
PIP4K2A-sgRNA2_se	CACCGAGCTGTTCAGTGTATTCCCG
PIP4K2A-sgRNA3_as	AAACCCGTGAACCCAGAACAGTATC
PIP4K2A-sgRNA3_se	CACCGATACTGTTCTGGGTTACCGG
PIP4K2B-sgRNA1_as	AAACCCCTACGACCGGCGCTTTGTCC
PIP4K2B-sgRNA1_se	CACCGGACAAAGCGCCGGTCGTAGG
PIP4K2B-sgRNA2_as	AAACTCCACGGTCAGGCGGTACATC
PIP4K2B-sgRNA2_se	CACCGATGTACCGCCTGACCGTGGA
PIP4K2B-sgRNA3_as	AAACCACGCCATACGATACAAAGAC
PIP4K2B-sgRNA3_se	CACCGTCTTTGTATCGTATGGCGTG
PIP4K2C-sgRNA1_as	AAACGAGCAGTATGCTAAGCGATTC
PIP4K2C-sgRNA1_se	CACCGAATCGCTTAGCATACTGCTC
PIP4K2C-sgRNA2_as	AAACGCCACGGTATCGGCGGCGACC
PIP4K2C-sgRNA2_se	CACCGGTGCGCGCCGATACCGTGGC
PIP4K2C-sgRNA3_as	AAACCCGTGATCGATTTGGCATTGC
PIP4K2C-sgRNA3_se	CACCGCAATGCCAAATCGATCACGG

Zur Restriktion wurden den sense (se) Oligonukleotiden „CACCG“ vorangesetzt. Den antisense (as) Oligonukleotiden wurde „AAAC“ zu Beginn und „C“ am Ende der Sequenz angefügt.

2.9. Antikörper

2.9.1. Primärantikörper

Die Antikörper zur Western-Blot-Analyse wurden mit 0,02 % NaN_3 versetzt.

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Applikation und Verdünnung
Anti-double stranded RNA (J2)	Maus	SCICONS/Nordic-Mubio, #10010200	IF: 1:100
Anti-dsRNA [J2]	Kaninchen	Absolute Antibody, #Ab01299-23.0	IF 1:50
Anti-FLAG	Kaninchen	Merck Millipore, #F7425-.2MG	IF 1:300
Anti-GFP	Maus	Roche, #11814460001	WB: 1:1000 in TBS-T mit 5% Milch
Anti-HCoV-229E N Protein (1E7)	Maus	Eurofins/Ingenasa M.30.HCoV.B1E7; Batch 250609	WB: 1:500 in TBS-T mit 5% Milch
Anti-HCoV-229E nsp8	Kaninchen	Prof. John Ziebuhr	WB: 1:500 in TBS-T mit 5% Milch, IF: 1:100
Anti-LC3B (D11) XP®	Kaninchen	Cell Signaling, #3868	WB: 1:1000 in TBS-T mit 5% BSA + 0,1 % Tween
Anti-mCherry	Kaninchen	Abcam, #ab183628	WB: 1:1000 in TBS-T mit 5% Milch
Anti-MURC	Kaninchen	Proteintech, #55464-1-AP	WB: 1:500 in TBS-T mit 5% Milch, IF: 1:100, PLA: 1:100
Anti-p62/SQSTM1	Maus	Santa Cruz, #sc-28359	WB: 1:200 in TBS-T mit 5% Milch
Anti-PI(4,5)P ₂ [2C11]	Maus	Abcam, #ab11039	IF: 1:100
Anti-PIP4K2A (D83C1)	Kaninchen	Cell Signaling, #5527	WB: 1:500 in TBS-T mit 5% BSA, 0,1% Tween
Anti-PIP4K2B	Kaninchen	Cell signaling, #9694S	WB: 1:1000 in TBS-T mit 5% BSA + 0,1% Tween, PLA: 1:100
Anti-PIP4K2C	Kaninchen	Proteintech, #17077-1-AP	WB: 1:2000 in TBS-T mit 5% Milch
Anti-Puromycin	Maus	Kerafast Inc., #EQ0001	PLA 1:400
Anti-RAMP4	Kaninchen	Abcam, #ab184571	WB: 1:10000 in TBS-T mit 5% Milch
Anti-SEC24a	Kaninchen	Invitrogen, #PA5-58582	WB: 1:1000 in TBS-T mit 5% Milch
Anti-β-actin (C4)	Maus	Santa Cruz, #sc-47778	WB: 1:1000 in TBS-T mit 5% Milch

2.9.2. Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Applikation und Verdünnung
Anti-mouse Immunoglobilins/HRP	Ziege	Dako, #P0447	WB: 1:2000 in TBS-T mit 5% Milch

Anti-rabbit Immunglobulins/HRP	Ziege	Dako, #P0448	WB: 1:2000 in TBS-T mit 5% Milch
Cy3-coupled anti rabbit IgG	Esel	Merck Millipore, #AP182C	IF: 1:200
Dylight488-coupled anti mouse IgG	Maus	ImmunoReagent, #DkxMu-003- D488NHSX	IF: 1:200
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Cy5 ®) preadsorbed	Ziege	Abcam, #ab6563	IF: 1:2000

Zur Detektion von biotinylierten Proteinen nach der OPP-Markierung wurde Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP, PerkinElmer, #NEL750001EA) 1:5000 in TBS-T mit 5 % BSA verwendet.

2.10. Enzyme und Inhibitoren

Enzym	Hersteller
FastDigest Esp3I (IIs class)	Thermo Fisher Scientific, #FD0454
FastDigest NheI	Thermo Fisher Scientific, #FD0974
FastDigest Sall	Thermo Fisher Scientific, #FD0644
FastDigest SmlI	Thermo Fisher Scientific, #FD1244
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, #F-530XL
RevertAid Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, #EP0441
RNase A (10 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, #EN0531
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, #EL0014
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, #EL0014
T4 Polynucleotide Kinase	Thermo Fisher Scientific, #EK0031

Inhibitoren	Herkunft
Bafilomycin A1	Cayman Chemicals, #Cay11038-500
BAY-091	Tocris Bioscience, #7673
CC260	MedChemExpress, #HY-139188
cOmplete, EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail	Roche, #118735800001
Cycloheximid	Merck Millipore, #239764
Leupeptin hemisulfate	Roth, #CN33.2
MG-132	Calbiochen / Merck, #474790
Microcystin	Enzo, #ALX-350-012-M001
Pepstatin A	Applichem, #A2205
PMSF	Sigma, #P7626
Thapsigargin	Cayman chemicals, #10522
THZ-P1-2	MedChemExpress, #HY-136351

2.11. Puffer und Medien

Alle Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, in ddH₂O gelöst.

2.11.1. Zusammensetzung von Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM ++ (Vollmedium)	DMEM
	10 % (v/v) FBS (<i>filtrated bovine serum</i>) (ggf. Tetracyclin-frei)
	100 µg/ml Streptomycin
	100 U/ml Penicillin

DMEM +++++	DMEM
	10 % (v/v) FBS (ggf. tet-frei)
	2 mm L-Glutamin
	0,1 mm NEAA (<i>non essential amino acids</i>)
	1 mm Sodumpyruvat
Einfriermedium	DMEM ++
	40 % (v/v) FBS (ggf. Tetracyclin-frei)
	10 % DMSO
LB-Platten	18,5 g Standard I-Nähragar
	add 0,5 l ddH ₂ O und autoklavieren
	Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) Zugabe vor Plattengießung
LB-Medium	25 g LB-Bouillon, Miller (Luria-Bertani) von Becton Dickinson
	add 1 l ddH ₂ O und autoklavieren
	Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) Zugabe vor Kultivierung

2.11.2.SDS-PAGE und Western-Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer für Gesamtzellextrakt (Ganzzell-Lyse-Puffer)	30 mm Natriumpyrophosphat-Decahydrat
	50 mm NaCl
	1 % (v/v) Triton X-100
	2 mm Natriumorthovanadat
	50 mm Natriumfluorid
	20 mm β-Glycerophosphat
	10 mm Tris
	mit HCl auf pH 7,05
	Vor der Verwendung frisch hinzugeben:
	2,5 µg/ml Leupeptin
	1 µM Microcystin
	1 µg/ml Pepstatin
	0,5 mm PMSF
Laemmli-Laufpuffer (10x)	250 mm Tris
	1,92 M Glycin
	1 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	1 M Tris
	mit HCl auf pH 6,8
Trenngelpuffer	1 M Tris
	mit HCl auf pH 8,8
Blocklösung	5 % Milchpulver in TBS-T
Blotpuffer für Western-Blot	25 mm Tris
	192 mm Glycin
	20 % (v/v) Methanol
Ponceau S-Färbelösung	0,1 % (w/v) Ponceau S
	in 5 % (v/v) Essigsäure
TBS (10x)	100 mm Tris
	1,5 M NaCl
	mit HCl auf pH 7,4 einstellen
TBS-T	0,05 % (v/v) Tween 20 in TBS (1x)

2.11.3.Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE (50x)	5,7 % (v/v) Essigsäure

	50 mm EDTA
	2 M Tris
Methylenblau-Färbungslösung	0,2% Methylenblau in ddH ₂ O

2.11.4. Transiente Transfektion

Bezeichnung	Zusammensetzung
CaCl ₂ Lösung	2M CaCl ₂
2x HEBS	280 mm NaCl
	50 mm Hepes
	1,5 mm Na ₂ HPO ₄
	mit NaOH auf pH 7,12

2.11.5. Markierung naszierender Proteine

Bezeichnung	Zusammensetzung
CLICK Chemie Lyse-Puffer	100 mm Hepes (pH 7,5)
	150 mm NaCl
	1 % NP-40
	Vor der Verwendung frisch hinzugeben:
	2 mm PMSF
	1x cOmplete, EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail
CLICK Waschpuffer I	1 % NP-40
	0,1 % SDS
	in DPBS
CLICK Waschpuffer II	6 M Harnstoff
	in DPBS

2.11.6. PLA

Bezeichnung	Zusammensetzung
PLA Waschpuffer A	1 Beutel Wasch Buffer A (#DUO82046) in 1 l ddH ₂ O, steril filtrieren
PLA Waschpuffer A	1 Beutel Wasch Buffer B (#DUO82048) in 1 l ddH ₂ O, steril filtrieren

2.12. Geräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystem
766 pH meter Calimatic	Knick
BD FACSAria Cell Sorter	BD Biosciences
BD LSRFortessa Cell Analyzer	BD Biosciences
Beckman Allegra 6R Refrigerated Benchtop Centrifuge	Beckman Coulter
CH-4103 Shaker	Infors HT
Chemi Doc Touch Imaging System	Bio-Rad
CKX41	Olympus
CO ₂ -Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific
Eismaschine	Ziegler
Elektrophorese Powersupply EPS 600	Pharmacia Biotech
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf
Gel iX Imager UV-Transilluminator	INTAS
Hybridiser HB-1D	TECHNE
Intellimixer RM-2L	ELMI
Kühl- und Gefrierschränke	Heraeus, Bosch, Thermo Scientific, Siemens

Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Magnetic Stirrer MR 3001	Heidolph
Mettler Toledo Semi-Mikrowaage XP205	Mettler Toledo
Mikroskop DMI1	Leica
Mikroskop DMI8	Leica
Multikanalpipette Xplorer Plus	Eppendorf
Multipipette stream	Eppendorf
Multitron standard	Infors HT
Mupid-One electrophoresis system	Advance
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie
Nanodrop One	Thermo Scientific
Owl P9DS Dual Gel Elektrophorese System	Owl Separation Systems
Pipetboy	Integra
Schüttler	Edmund Bühler GmbH
Semi-Dry-Blotter	Peqlab Biotechnologie
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Scientific
Sorvall RC6+ Centrifuge	Thermo Scientific
SpectraMax Plus 384 Microplate-Reader	Molecular Devices
Thermocycler T Professional	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
TJ-25 Zentrifuge	Beckman Coulter
Vortex Mixer	NeoLabLine
Waage MP-3000	Chyo
Wasserbad	GFL

2.13. Software

Name	Version
ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012)	Version 2.14.0/1.54i
7500 Software Applied Biosystems	Version 1.4
BD FACSDiva	Version 8.0.2
Cellpose	Version 2.2.1
Cellprofiler	Version 4.2.6
ChopChop	https://chopchop.cbu.uib.no
Conda	v.4.5.4 or newer
DNASTAR SeqBuilder	Version 11.1.0.54
DNASTAR SeqMan Pro	Version 11.1.0.54
Endnote	Version 20.6
GraphPad Prism	Version 9.5.1
ImageLab	Version 6.0.1
Inkscape	Version 1.3.1
Leica LAS X	Versionen 3.7.0.20979 / 3.7.4.23463
Microsoft Office 2016	Professional Plus 2016
Primer3Plus	https://www.primer3plus.com
R	Version 4.5.0
RStudio	Version 2025.09.0+387
R package: dplyr (Wickham, François, et al., 2026)	Version 1.2.0
R package: ggplot2 (Wickham, 2016)	Version 4.0.2
R package: tidyr (Wickham, Vaughan, et al., 2026)	Version 1.3.2
R package: readxl (Wickham & Bryan, 2025)	Version 1.4.5

3. Methoden

3.1. Arbeiten mit Virus

3.1.1. Herstellung von lentiviralen Überständen

Die lentiviralen Überstände zur Generierung von stabilen *knockouts* oder Autophagie/ER-Phagie-Reporterzelllinien wurden durch die Transfektion von HEK293FT Zellen erzeugt. Hierzu wurde ein replikationsdefektes Lentivirussystem der zweiten Generation verwendet, bestehend aus drei Plasmiden: (1) pMD2.G kodiert für die Virushülle, (2) psPAX2 enthält Bestandteile für die Verpackung des Virus und (3) dem Transferplasmid mit den zu transduzierenden Komponenten sowie dem essentiellen Psi-Verpackungssignal. HEK293FT Zellen wurden eine Woche in DMEM +++++ und 500 µg/ml Geneticin kultiviert. Für jeden zu generierenden Lentivirusüberstand wurden 6×10^6 Zellen in eine 100 mm Schale mit 10 ml DMEM +++++ ausgesät und für 24 h bei 37°C belassen. Für die Transfektion wurden drei Falcons mit folgenden Zusammensetzungen erstellt:

Bezeichnung	Menge für 100 mm Schale
Opti-MEM	750 µl
pMD2.G	5,1 µg
psPAX2	7,8 µg
Transferplasmid	10,2 µg

Bezeichnung	Menge für 100 mm Schale
Opti-MEM	750 µl
PLUS Reagenz	100 µl

Bezeichnung	Menge für 100 mm Schale
Opti-MEM	1500 µl
Lipofectamine 2000	90 µl

Die Inhalte der Falcons wurden durch Vortexen gemischt und in einem 5 ml Eppendorfgefäß zusammengeführt, mehrmals invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der HEK293FT Zellen wurde auf 5 ml reduziert und der Inhalt des Eppendorfgefäßes langsam in die Schale hinzugegeben. 4 h nach Transfektion wurde das Medium entfernt und durch 10 ml frisches DMEM +++++ ersetzt. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium der Zellen in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 min mit 500 ×g bei RT (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine 10 ml Einmalspritze aufgenommen und durch eine 0,45 µm Filtereinheit zur Langzeitlagerung bei -80 °C oder zur direkten Nutzung für die lentiviralen Transduktion aliquotiert (3.1.2).

3.1.2. Lentivirale Transduktion

Alle lentiviralen Arbeiten erfolgten in der S2 Anlage des Rudolf-Buchheim-Institutes für Pharmakologie, Fachbereich 11, Justus-Liebig-Universität Gießen und waren zuvor behördlich durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt worden (Az. IV 44-53r 30.03.UGI 105.11.01, Az. IV 44-53 30.03.UGI 105.12.01, Az. IV 44-53 30.03.UGI 105.13.01). Die Generierung von Zelllinien mit einer stabilen Expression des Autophagie-Reportersystems, der ER-Phagie-Reportersysteme sowie der CRISPR-Cas9-vermittelten *knockouts* erfolgte durch die lentivirale Transduktion von Huh7, HeLa, HCT116 oder A549(++) Zellen. Es wurden 1 bis 3×10^5 Zellen in eine 6-Well Platte mit Vollmedium, welches ggf. Tetracyclin-frei war, ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium durch 4 µg/ml bis 8 µg/ml Polybrene (in Vollmedium) ersetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden 500 µl bis 1000 µl des lentiviralen Überstandes in das Medium pipettiert und durch sanftes Schwenken vermischt. 24 h nach Transduktion wurden die stabilen Zelllinien in 100 cm Schalen überführt und für sieben Tage kultiviert. Sofern eine Puromycin-Resistenz im Vektorsystem vorhanden war, wurde in diesem Zeitraum mit 1 µg/ml Puromycin selektiert. Die Überstände der Zellen wurden abgenommen und auf lentivirale Partikel getestet (3.1.3). Die Zellen wurden weggefroren und zur Testung durch einen Western-Blot (3.5.4) oder Mikroskopie genutzt (3.6.2).

3.1.3. Reduktion der biologischen Sicherheitsstufe von transduzierten Zelllinien

Zellen, welche in Kontakt mit Lentiviren kamen, sind durch das deutsche Gentechnikgesetz und die Gentechnik-Sicherheitsverordnung der biologischen Sicherheitsstufe 2 zuzuordnen. Zur Reduktion der biologischen Sicherheitsstufe wurden die Überstände von Zellen sieben Tage nach Transduktion auf das Vorhandensein von Lentiviren getestet. Hierzu wurde die RNA aus 200 µl des Zellüberstandes mit dem Quick-RNA™ Viral Kit nach Herstellerangaben isoliert. Zusätzlich wurde als Kontrolle die RNA aus 200 µl des lentiviralen Überstandes zur Transduktion aufgereinigt. Es folgte die Reverse Transkription (3.4.3) mit 10 ng RNA. Im Anschluss wurde eine qPCR (3.4.4) mit SYBR-Green-Assay durch Psi-Primer durchgeführt. Sofern der mittlere C_T -Wert über 30 und die Positivkontrolle unterhalb 25 lag, wurden die Zellen als freigetestet deklariert und nach den Vorgaben der biologischen Sicherheitsstufe 1 weiterverfahren.

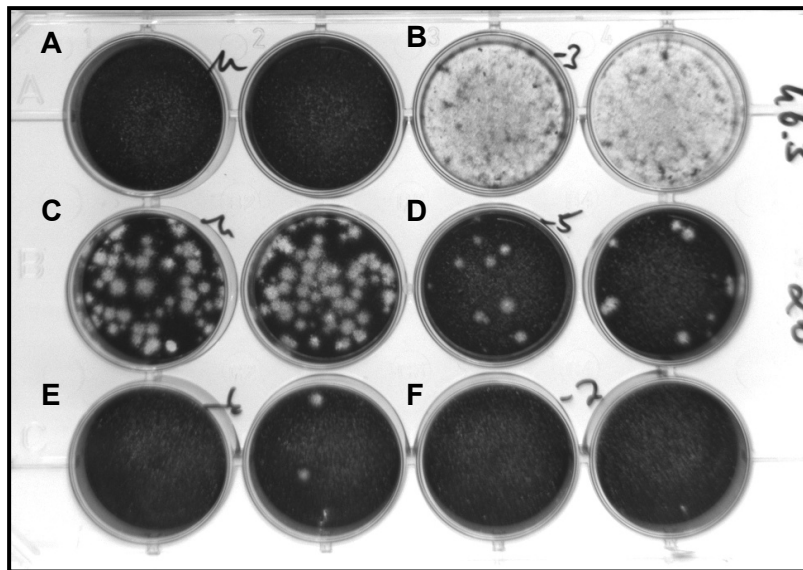
3.1.4. Propagation von HCoV-229E

Für die Propagation von HCoV-229E Viren wurden $2,8 \times 10^7$ Huh7 Zellen in eine 145 mm Zellkulturschale mit 20 ml Vollmedium ausgesät. Am nachfolgenden Tag wurden die

Zellen 30 min vor Infektion auf 33 °C temperiert. Die Infektion erfolgte mit 100 µl Virusüberstand, welcher einen niedrigen Titer besaß (etwa 3×10^6 TCID₅₀/ml). Nach einer Stunde bei 33 °C wurde das Medium durch 21 ml Vollmedium ersetzt. 48 h bis 52 h nach der Infektion erfolgte die visuelle Untersuchung der Zellen auf zytopathische Effekte und der Überstand wurde in ein 50 ml Falcon transferiert, für 10 min bei 4 °C mit 500 ×g zentrifugiert und zur Lagerung bei -80 °C aliquotiert oder zur Titerbestimmung mittels TCID₅₀ (3.1.6) sowie Plaque-Assay (3.1.5) verwendet.

3.1.5. Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay

Der Plaque-Assay wurde zur Titerbestimmung von Virusüberständen genutzt (Baer & Kehn-Hall, 2014). Hierbei wurden 2×10^5 Huh7 Zellen in einer 12-Well Platte mit jeweils zwei technischen Replikaten seriell mit 10^{-3} bis 10^{-7} verdünnten Virusüberständen infiziert. Nach 1 h wurde der Überstand entfernt und durch eine halbfeste Schicht, bestehend aus Cellulose (Avicel 1,25 %) und Medium (MEM mit 10 % FBS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml Penicillin) ersetzt. Die Platten wurden für drei Tage bei 33 °C gelagert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml Wasser gewaschen und 5 min mit einer 0,15 % Kristallviolettlösung (in 20 % EtOH) gefärbt, welche erneut mit Wasser abgewaschen wurde. Nach dem Abschluss eines Replikationszykluses mit Lyse der Zellen wurden die neuen Viruspartikel freigegeben. Durch die halbfesten Eigenschaften der Beschichtung, konnten Viruspartikel nur lateral befindliche benachbarte Zellen infizieren. Nach der Zugabe von Kristallviolett zeigte sich in nicht infizierten Zellen eine gefärbte Einzelschicht. Abhängig von der eingesetzten Verdünnung waren in *wells* mit hoher Viruslast keine gefärbten Zellen vorhanden, da diese quantitativ durch Viruspartikel lysiert worden waren. Bei Auftragen einer höheren Ausgangsverdünnung waren einzelne kreisförmige Regionen (Plaques) sichtbar, in welchen ein Viruspartikel benachbarte Zellen lysiert hatte. Es wurde angenommen, dass jeder Plaque durch ein Viruspartikel entstanden war, welcher als *plaque-forming unit* (PFU) bezeichnet wurde. Die Plaques wurden gezählt und die Berechnung erfolgte wie exemplarisch für Abb. 9 dargestellt:



- A: uninfectierter Zellen
 B: Verdünnung 1×10^{-3}
 C: Verdünnung 1×10^{-4}
 D: Verdünnung 1×10^{-5}
 E: Verdünnung 1×10^{-6}
 F: Verdünnung 1×10^{-7}

Abb. 9 Beispielaufnahme eines Kristallviolett gefärbten Plaque-Assays
 Die Verdünnung des Virus erfolgte wie angegeben für B – F.

Verdünnung	Plaques well 1	Plaques well 2	Mittelwert	PFU/well
1×10^{-3}	Alle verstorben	Alle verstorben	-	-
1×10^{-4}	Nicht zählbar	Nicht zählbar	-	-
1×10^{-5}	11	10	10,5	$1,05 \times 10^6$
1×10^{-6}	0	2	1	$1,00 \times 10^6$
1×10^{-7}	Alle lebend	Alle lebend	-	-

Die mittlere PFU/well berechnete sich somit als:

$$\frac{1,05 \cdot 10^6 + 1,00 \cdot 10^6}{2} = 1,025 \cdot 10^6 \text{ PFU/well}$$

Der virale Titer wurde in infektiöse Viruspartikel pro ml angegeben. Dies bedeutete, bei einer Infektion mit 500 µl Verdünnung pro well ergab sich ein Titer von:

$$1,025 \cdot 10^6 \cdot 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = 2,5 \cdot 10^6 \text{ PFU/ml}$$

3.1.6. Virustiterbestimmung mittels TCID₅₀

Die Virusverdünnung mit welcher 50 % der Zellen infiziert werden wird als *tissue culture infection dose 50* (TCID₅₀) bezeichnet und kann mittels einer Verdünnungsreihe ermittelt werden. Die TCID₅₀-Methode wurde zusätzlich zur Titerbestimmung von HCoV-229E verwendet und die Berechnung erfolgte durch die Reed-Muench-Methode (Reed & Muench, 1938). Hierzu wurden 12.000 Huh7 Zellen in 100 µl Volumen auf eine 96-Well Platte ausgesät und über Nacht bei 33 °C gelagert. Pro Virussuspension wurden als technische Replikate drei Platten angefertigt. Die Virussuspension wurde seriell von 10^{-2} bis 10^{-12} verdünnt und jeweils 100 µl zu acht wells hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte

für sechs Tage bei 33 °C. Zur Färbung wurde der Überstand entfernt und 50 µl einer 0,1 % Kristallviolettlösung (in 20 % EtOH) für 5 min hinzugegeben. Die Lösung wurde durch Invertieren entfernt. Die lysierten, ungefärbten *wells* wurden ausgezählt und die Berechnung des TCID₅₀ ist im Folgenden exemplarisch für Abb. 10 gezeigt:

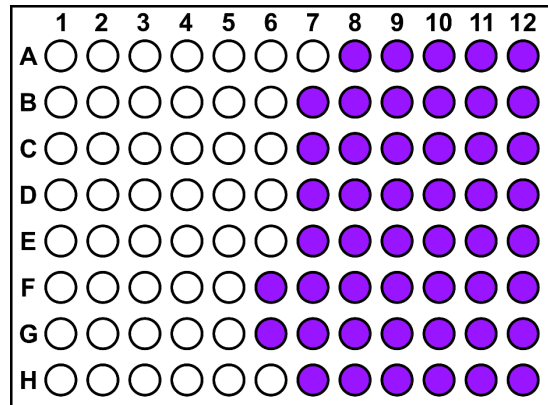


Abb. 10 Schematische Darstellung eines Kristallviolett gefärbten TCID₅₀-Assays

Die Kristallviolett färbung zeigt lebenden Zellen in lila gefärbten *wells* an, während eine fehlende Färbung auf tote Zellen hindeutet. In der Spalte 1 erfolgte die Zugabe von frischem Medium als Kontrolle. Für die Spalten 2 bis 12 wurde eine serielle Verdünnung des Virusüberstands startend mit 10⁻² in Spalte 2 bis 10⁻¹² in Spalte 12 durchgeführt. Es erfolgten in den *wells* von A bis H jeweils acht technischen Replikate.

$$\text{Mortalitätsrate} = \frac{\text{Anzahl an lysierten wells}}{8 * 100} \quad (1.1)$$

Proportionale Distanz (PD)

$$= \frac{(\% \text{ wells mit Mortalität} > 50 \% - 50 \%)}{(\% \text{ wells mit Mortalität} > 50 \% - (\% \text{ wells mit Mortalität} < 50 \%))} \quad (1.2)$$

$$\text{LogID}_{50} = \log(\text{Verdünnung mit Mortalität} > 50 \%) + PD * (-\log(\text{Verdünnungsfaktor})) \quad (1.3)$$

Für den in Abb. 10 gezeigten TCID₅₀ ergibt sich hierdurch folgenden Rechnung:

Verdünnung 10 ^{-x}	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mortalitätsrate %	100	100	100	100	75	12,5	0	0	0	0	0

$$PD = \frac{75 - 50}{75 - 12,5} = 0,4 \quad (1.4)$$

$$\text{LogID}_{50} = -6 + 0,4 * (-1) = -6,4 \quad (1.5)$$

$$ID_{50} = 10^{-6,4} \quad (1.6)$$

Die Angabe des Virustiters erfolgte als infektiöse Dosis pro Volumeneinheit. Da das Virusinokulum 200 µl betrug, war der Titer wie folgt:

$$\frac{1}{0,2 * 10^{-6,4}} = 1,26 * 10^7 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}. \quad (1.7)$$

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zellen wurden zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstofftanks aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, zu 20 ml vorgewärmten Vollmedium geben und bei 37 °C, 6 % CO₂ kultiviert. Zum Einfrieren wurde eine 80 % konfluente 145 mm Schale genutzt. Die Zellen wurden trypsiniert, in 8 ml Medium suspendiert und in ein 10 ml Falcon überführt. Es erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 500 ×g, 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 4 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und 1 ml in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden in ein Styroporbehältnis bei -80 °C wegefroren und nach Testung auf Mykoplasmenfreiheit in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.2.2. Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, in DMEM ++ ggf. mit Tetracyclin-freiem FBS bei 37 °C und 6 % CO₂ kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70 % bis 90 % wurden diese wie folgt umgesetzt: Es wurde zweimal mit PBS gewaschen und 0,5 ml bis 2 ml Trypsin/EDTA hinzugeben. Nach 2 min bis 5 min wurden die Zellen mit frischen DMEM ++ suspendiert. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:5 bis zu 1:20 verdünnt und auf eine neue Schale mit frischem Medium gegeben.

3.2.3. Aussaat von Zellen

Zur Aussaat von Zellen wurden 60 % bis 100 % konfluente Schalen trypsiniert und 10 µl der Zellsuspension oder einer ggf. angefertigten Verdünnung in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Es wurden vier Quadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellmenge ergab sich durch folgende Formel:

$$\text{Mittelwert der Zellen} * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellen/ml}$$

Die Aussaat für Experimente erfolgte in Vollmedium ggf. mit der Zugabe von Doxycyclin für Tetracyclin-abhängige ER-Phagie-Reporterzellen durch das Hinzugeben in Schalen

mit vorgelegtem Vollmedium. Im Falle der Aussaat von Ibidi μ -slides wurde das Volumen der Zellen auf 30 μ l ergänzt und nach 1 h bei 37 °C 100 μ l Vollmedium hinzugefügt.

3.2.4. Behandlung von Zellen

Die Behandlung mit Inhibitoren oder Doxycyclin erfolgte durch die direkte Zugabe dieser in das auf ein einheitliches Volumen eingestellte Medium der Zellen. Die Doxycyclin-Zugabe erfolgte 24 h vor weiteren Behandlungen oder der Infektion mit HCoV-229E. Für in DMSO gelöste Inhibitoren wurde eine Kontrollprobe mit der höchsten final verwendeten DMSO-Konzentration angefertigt. Folgende Inhibitoren wurden verwendet:

Inhibitor	Lösungsmittel	Stockkonzentration	Endkonzentration
CC260	DMSO	10; 50 mM	0,01 – 100 μ M
Cycloheximid	DMSO	100 mg/ml	10 μ g/ml
Bafilomycin A1	DMSO	1 mM	0,1 – 10 μ M
BAY-091	DMSO	10; 50 mM	0,01 – 50 μ M
Doxycyclin	H ₂ O	1 mg/ml	1; 4 μ g/ml
MG-132	DMSO	40 mM	0,1 – 25 μ M
Thapsigargin	DMSO	10 mM	1 μ M
THZ-P1-2	DMSO	10; 25; 50 mM	0,01 – 50 μ M

3.2.5. Hungerversuche mit HBSS

Als Positivkontrolle der Funktionalität der Tandem-Reportersysteme wurden Zellen in HBSS ohne Serum gehalten, welches ein starker Aktivator für Autophagie oder ER-Phagie durch den Nährstoffmangel war. Für die Durchführung der Versuche wurden 3.600 bis 11.400 Zellen in Ibidi μ -slides oder 300.000 bis 750.000 Zellen in 60 mm Schalen mit Vollmedium ausgesät und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Es wurde dreimal mit warmen HBSS gewaschen und die Zellen in diesem belassen. Für die Doxycyclin-abhängigen ER-Phagie-Reporter wurde 4 μ g/ml Doxycyclin (in HBSS) hinzugegeben. Die Zellen wurden für 16 h bis 24 h bei 33 °C oder 37 °C gehungert. Die Analyse der Autophagie- oder ER-Phagie-Aktivierung erfolgte über die Fluoreszenzmikroskopie (3.6.2), Western-Blot-Analyse (3.5.4) oder Durchflusszytometrie (3.2.9).

3.2.6. Transiente Transfektion mit Calcium-Phosphat

Die transiente Transfektion von Zellen erfolgte mittels der Bindung von Calciumionen an DNA und der Aufnahme über Endozytose in die Zelle. Zellen wurden in Ibidi μ -slides oder 60 mm Schalen mit Vollmedium ausgesät und bei 37 °C für 24 h belassen. Für jedes Plasmid wurde der folgende Ansatz hergestellt, gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert:

Reagenz	Volumen für 60 mm Schale	Volumen für Ibidi- μ -slides
ddH ₂ O	125 μ l	500 μ l
2x HEBS	112,5 μ l	450 μ l
Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l)	9 μ l	10 μ l
CaCl ₂ (2 M)	15,75 μ l	64 μ l

Zur Transfektion von Ibidi μ -slides wurden 30 μ l des Kammervolumens durch den Transfektionsansatz ersetzt und durch mehrmaliges Pipettieren vermischt. Für 60 mm Schalen wurde das Medium auf 3 ml reduziert und der komplette Transfektionsansatz hinzugegeben. Nach 6 h bei 37 °C erfolgte ein Glycerolschock für 3 min mit einer warmen 10 % Glycerol-Lösung (in Vollmedium) bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden zweimal mit warmen PBS gewaschen und frisches Vollmedium hinzugefügt. Die Schalen bzw. Ibidi μ -slides wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und ggf. weiterbehandelt. Der Nachweis der Transfektion erfolgte durch die Western-Blot-Methode (3.5.4) oder die Fluoreszenzmikroskopie (3.6.1, 3.6.2).

3.2.7. Zellviabilitäts-Assay (MTS-Assay)

Die Evaluation der Zellviabilität nach der Infektion mit HCoV-229E oder einer Inhibitorbehandlung erfolgte über die Reduktion des Tetrazolium-Farbstoffes MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Zu diesem Zweck wurden 12.000 Zellen in 100 μ l Vollmedium in eine 96-Well-Platte ausgesät (je drei bis vier technische Replikate) und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Es erfolgte die zu analysierende Behandlung für 24 h. Zur Auswertung wurden 4 μ l des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay dem Medium zugefügt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. In vitalen Zellen wurde der MTS-Farbstoff durch vorwiegend mitochondriale Reduktasen in wasserlösliches Formazan umgewandelt, dessen Absorption mit dem SpectraMax Plus 384 Microplate-Reader bei 490 nm gemessen wurde und sich proportional zur Menge an metabolisch aktiven Zellen verhielt. Die Ermittlung des Hintergrundsignals wurde durch die Messung eines *well*s mit Vollmedium ohne Zellen durchgeführt und von den Messwerten abgezogen.

3.2.8. Fluoreszenz-basierte Zellsortierung im BD FACSAria Cell Sorter

Die Selektion einer homogenen Zellpopulation der ER-Phagie-Reporter transduzierten Zellen wurden durch den BD FACSAria Cell Sorter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Susanne Herold (AG Herold, Universitätsklinik Gießen und Marburg) durchgeführt. Hierzu wurden fünf Tage nach der Transduktion 700.000 bis 1.000.000 Zellen in eine 10 cm Schale mit 4 μ g/ml Doxycyclin (in Vollmedium) ausgesät und für 48 h bei 37 °C kultiviert. Nach dem zweimaligen Waschen mit PBS und der Zugabe von Trypsin/EDTA

für 2 min bis 5 min wurden die Zellen in 8 ml Vollmedium suspendiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 500 ×g. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 ml warmen Vollmedium resuspendiert. Die Sortierung wurde für 160.000 Zellen durch die AG Herold durchgeführt und ist beispielhaft in Abb. 11 dargestellt.

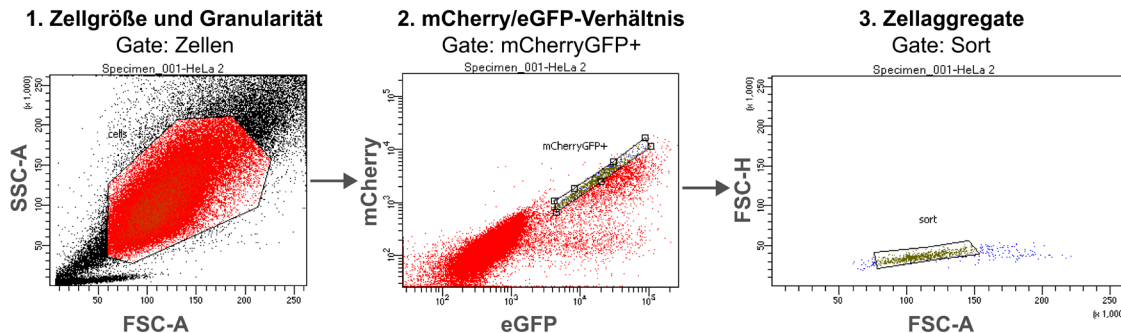


Abb. 11 Darstellung der Zellsortierungsstrategie am BD FACSaria Cell Sorter

Die Seitwärtsstreuung-Fläche (SSC-A) und Vorwärtsstreuung-Fläche (FSC-A) wurde gemessen und Zellen mit einer regulären Zellgröße und Granularität durch den Zellauswahlbereich (Gate) „Zellen“ erfasst. Im zweiten Schritt wurde das mCherry- und eGFP-Signal analysiert. Bei einer vergleichbaren, über der Autofluoreszenz befindlichen Intensität der Fluorophore wurden die Zellen im Auswahlbereich „mCherryGFP+“ markiert. Abschließend wurde der Auswahlbereich „sort“ nach der Messung der Vorwärtsstreuung-Fläche (FSC-A) und -Höhe (FSC-H) zur Entfernung von Zellaggregaten gesetzt.

Die sortierten Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen mit 500 µl Tetracyclin-freiem FBS gegeben. Der Ansatz wurde mit 10 ml warmen Tetracyclin-freiem Vollmedium suspendiert und in eine 10 cm Schale überführt. Die Zellen wurden für sieben Tage bei 37 °C kultiviert und mittels der Fluoreszenzmikroskopie analysiert (3.6.2) sowie zur Langzeitlagerung weggefroren (3.2.1).

3.2.9. Quantifizierung von Autophagie und ER-Phagie im BD LSRFortessa

Die Quantifizierung der Aktivierung von Autophagie und ER-Phagie wurde durch die Fluoreszenzmessung von stabil transduzierten Reporterzelllinien im Durchflusszytometer BD LSRFortessa Cell Analyzer der AG Herold durchgeführt. Die Reportersysteme bestehen aus einem stabilen, roten fluoreszierenden Protein (mCherry oder ssRFP) und einem pH-sensitiven, grünen fluoreszierenden Protein ((e)GFP), welches nach der Aktivierung von Autophagie oder ER-Phagie in Autolysosomen durch den niedrigen pH-Wert *gequencht* wird. Zur Auswertung wurde eine Zellauswahlstrategie etabliert, welche Zellen in solche mit hoher bzw. niedriger autophagischer/ER-phagischer Aktivität klassifiziert abhängig des Intensitätsverhältnisses der Fluorophore.

Hierzu wurden 300.000 Reporter-transduzierte Zellen in 60 mm Schalen mit 4 ml Vollmedium ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Tetracyclin-

abhängigen ER-Phagie-Reporter wurde zusätzlich 4 µg/ml Doxycyclin hinzugegeben. Es erfolgten die jeweilige Behandlung für 4 h bis 24 h bei 33 °C oder 37 °C. Die adhärennten Zellen wurden durch Trypsin/EDTA in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 500 ×g, 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurde mit 500 µl eiskaltem PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch den Zellsieb des Falcon Teströhrchen gegeben und auf Eis gelagert. Vor der Messung wurde 0,5 µl des SYTOX™ Blue Nukleinsäurefärbemittels, welches durch die Zellmembran von toten Zellen diffundiert und diese anfärbt, zu den Zellen hinzugegeben und für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurden pro Kondition 10.000 bis 100.000 Zellen im Durchflusszytometer BD LSRFortessa der AG Herold analysiert. Die Zellauswahlstrategie zur Auswertung ist in Abb. 12 dargestellt und erläutert.

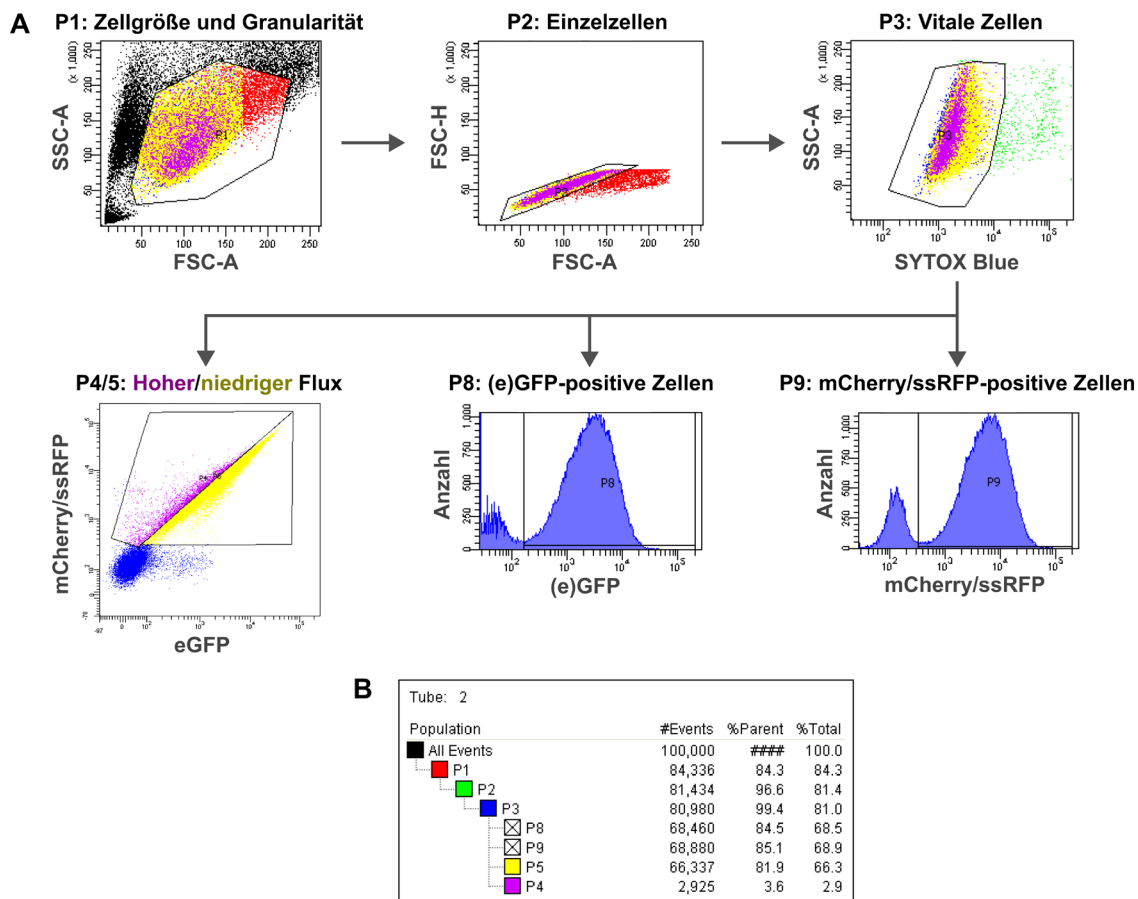


Abb. 12 Quantifizierungsstrategie der Tandem-Reporterzellen am BD LSRFortessa

(A) Die Zellen wurden anhand ihrer SSC-A und FSC-A vermessen und durch den Zellauswahlbereich P1, Zellen mit regulärer Zellgröße und Granularität ausgewählt. Im zweiten Schritt wurden durch die Messung der FSC-A und FSC-H mittels des Auswahlbereiches P2 Zellaggregate entfernt. Vitale Zellen wurden durch eine fehlende SYTOX™ Blue-Färbung im Auswahlbereich P3 identifiziert. Die Einstufung von Zellen mit einem hohen autophagischen/ER-phagischen Flux, d.h. mit einer quenching-bedingten verhältnismäßig gegenüber mCherry/ssRFP niedrigeren (e)GFP-Intensität, erfolgte durch den Auswahlbereich P4 (lila). Demgegenüber wurden im Auswahlbereich P5 (gelb) Zellen mit einem niedrigen Flux markiert. Die Histogramme mit den Auswahlbereichen P8 und P9 identifizieren Zellen, welche

eine über der Autofluoreszenz liegenden Intensität für (e)GFP bzw. mCherry/RFP demonstrierten. (B) Dargestellt ist eine beispielhafte Auszählung von 100.000 vermessenen Zellen (#Events) und dem Anteil der in den Auswahlbereichen gemessenen Zellen prozentual bezogen auf alle Zellen (%Total) oder die des vorherigen Bereiches (%Parent).

3.3. Mikrobiologische Methoden

3.3.1. Transformation von Bakterien (XL1-Blue E.coli oder TOP10 E.coli)

Für die Expression von Plasmiden wurden diese in Bakterien (XL1-Blue E.coli oder TOP10 E.coli) transformiert. Hierzu wurden die bei -80 °C gelagerten Bakterien für 30 min auf Eis aufgetaut. Der vollständige Ansatz aus der Klonierung von sgRNAs in LentiCRISPR-v2 (3.4.8) oder aus der Rekonstruktion des ER-Phagie-Vektors (3.4.6) wurde zu den Bakterien gegeben und durch Schnipsen des Gefäßes vermischt. Die Bakterien wurden 20 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C und die Lagerung auf Eis für 2 min. Anschließend wurden 600 µl vorgewärmtes LB-Mediums hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden für 5 min, bei 20 °C mit 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Ansatz wurde mit 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine vorgewärmte Agarplatte, welche das entsprechende Selektionsantibiotikum (Ampicillin, Kanamycin) enthielt, ausgestrichen. Die Platten wurden für 16 h bis 24 h bei 37 °C inkubiert und es wurden zwei bis drei Klone zur Kultivierung und DNA-Isolation mit dem NucleoSpin Plasmid Kit gewählt.

3.3.2. Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die E.coli Bakterien wurden mit 5 ml LB-Medium für die Minikulturen oder mit 200 ml LB-Medium für die Maxi-Kulturen kultiviert. Dem LB-Medium wurde 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin hinzugefügt. Die Plasmid-Isolation für die Miniprep (NucleoSpin Plasmid Kit) oder Maxiprep (NucleoBond Xtra Midi Kit für Plasmid DNA) erfolgte nach Herstellerangaben nachfolgend der Inkubation für 16 h bis 20 h bei 37 °C. Zur Langzeitlagerung wurden 500 µl der Bakteriensuspension (in LB-Medium) mit 500 µl Glycerol in einem Kryoröhrchen vermischt und bei -80 °C gelagert.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die RNA von Zellpellets wurde mit dem NucleoSpin RNA Kit von Macherey-Nagel anhand der Herstellerangaben isoliert. Die Elution der RNA wurde in 40 µl bis 60 µl RNase-freiem Wasser durchgeführt und für die reverse Transkription (3.4.3) mit qPCR (3.4.4) weiterverwendet oder zur Langzeitlagerung bei -80 °C transferiert.

3.4.2. Messung der Nukleinsäurekonzentration

Der Nukleinsäuregehalt einer Probe wurde durch den Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer oder den Nanodrop One bestimmt. Hierbei wurde die Lichtabsorption von Nukleinsäuren bei 260 nm verwendet. Zusätzlich wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 260/280 nm gemessen und gab Aufschluss über etwaige Verunreinigungen mit beispielsweise Proteinen. Dieses Reinheitsverhältnis lag zur weiteren Nutzung der Probe zwischen 1,9 und 2,2.

3.4.3. Reverse Transkription (RT)

Aus Zellen isolierte RNA wurde durch eine reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) für die weitere Nutzung in der qPCR (3.4.4) umgeschrieben. Für 1 µg RNA wurde ein Ansatzvolumen von 20 µl wie folgt hergestellt und im Thermocycler T Professional inkubiert:

Reagenz	Menge/Volumen
5x RT-Puffer	4 µl
Random Hexamer Primer	0,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
RevertAid Reverse Transcriptase	0,5 µl
RNA	1 µg
H ₂ O (RNase-frei)	ad 20 µl

Temperatur [°C]	Dauer [min]
25	10
42	60
70	10

Die cDNA wurde direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

3.4.4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zur Bestimmung der relativen Menge an mRNA in einem Zellextrakt wurde nach der reversen Transkription (3.4.3) eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion mittels eines TaqMan- oder SYBR-Green-Assays durchgeführt.

TaqMan-Assay

Bei der TaqMan-Methode wurde eine genspezifische TaqMan-Sonde mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem *quencher* am 3'-Ende genutzt, welche an die jeweilige DNA-Sequenz zwischen den Primerpaaren band. Während der Polymerase-Kettenreaktion assoziierte das Primerpaar an die cDNA und die TaqMan-Polymerase synthetisierte die cDNA. Sobald die Polymerase die TaqMan-Sonde erreichte wurde diese abgebaut und der Farbstoff freigesetzt. Durch das fehlende *quenchen* war eine Fluoreszenz detektierbar, welche Rückschluss auf die gebundene Menge an cDNA gab.

SYBR-Green-Assay

Der SYBR-Green-Assay verwendete ein genspezifisches Primerpaar, welches an die DNA im Zielgen zur Amplifikation assoziierte, sowie einen SYBR-Green-Farbstoff, der sich unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagerte und infolgedessen ein Fluoreszenzsignal emittierte. Die Fluoreszenzstärke nahm proportional mit der Amplifikation des Zielgens zu und gab daher Aufschluss über die cDNA-Menge.

Durchführung der qPCR

Beide Methoden erzeugten eine Amplifikationskurve durch die erhaltenen Fluoreszenzsignale. Die Messung lieferte für jede Probe einen C_T -Wert (*cycle threshold*), sobald das Signal über dem Hintergrundrauschen lag. Die Höhe des C_T -Wertes gab indirekt Aufschluss über die ursprüngliche Menge an mRNA im Zellextrakt. Je höherer dieser war, desto niedriger war die eingesetzte cDNA-Menge und folglich auch die mRNA-Menge in der Probe. Es wurde mit jeweils zwei technischen Replikaten gearbeitet. Der 10 µl Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

TaqMan-Assay:	
Reagenz	Volumen [µl]
TaqMan-Fast Advanced PCR Master Mix	5
TaqMan-Sonde	0,25
H ₂ O (RNase-frei)	3,75

SYBR-Green-Assay:	
Reagenz	Volumen [µl]
FAST SYBR Green PCR Master Mix	5
Vorwärtsprimer	0,25
Rückwärtsprimer	0,25
H ₂ O (RNase-frei)	3,5

Der Ansatz wurde in eine 96-Well Platte pipettiert und 1 µl cDNA hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer qPCR-Folie bedeckt und im 7500 Fast Real Time PCR System mit folgendem Temperaturprofil behandelt:

Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
95	20	1
95	3	} 40
60	30	

Bei der Messung des SYBR-Green-Assays wurde zusätzlich eine Schmelzkurve erstellt, um falsche (zusätzliche) PCR-Produkte sowie unspezifische Bindungen des Farbstoffes an Primerdimere auszuschließen. Die erhaltenen Rohdaten wurden visuell auf vergleichbare Amplifikationskurven inspiziert, um Artefakte bei der Quantifizierung auszuschließen.

Quantifizierung und Normalisierung der C_T -Werte

Die erhaltenen C_T -Werte wurden zur relativen Quantifizierung zweifach normalisiert. Zuerst wurde auf ein Referenzgen (*ACTB* oder *GUSB*) skaliert, welches parallel zum Zielgen gemessen wurde:

$$C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen}) = \Delta C_T$$

Im Anschluss wurde dieser Wert auf eine Kontrolle bezogen, welche in dieser Arbeit unbehandelte oder für die Messung von *nsp8* infizierte Zellen waren:

$$\Delta C_T(\text{Probe}) - \Delta C_T(\text{Kontrolle}) = \Delta \Delta C_T$$

Der erhaltene Messwert wurde dann als x-fache mRNA-Expression angegeben:

$$2^{-\Delta \Delta C_T} = x\text{-fache mRNA-Expression}$$

3.4.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA anhand der Basenpaarlänge erfolgte auf einem Agarosegel durch die Gelelektrophorese unter Anlegen eines elektrischen Feldes, wodurch die negativ geladene DNA in Richtung der Anode wanderte. Kleine DNA-Moleküle bewegten sich schneller durch das Gel als größere und infolgedessen kam es zur Größenauftrennung. Durch das Auftragen einer Referenzleiter wurde die Basenpaarlänge der DNA ermittelt. Die Visualisierung erfolgte durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid in das Gel, welcher DNA interkalierte und durch UV-Licht detektiert wurde, oder die spätere Färbung mit Methylengrün, welches elektrostatisch an die DNA-Moleküle band und diese färbte. Die Methode wurde wie folgt durchgeführt:

Es wurden 1,3 g Agarose mit 130 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht und in eine Gelvorrichtung mit einem Taschenkamm gegossen. Für Ethidiumbromidgele wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Das Gel wurde für 20 min ausgekühlt, und die Laufkammer wurde mit 1x TAE-Puffer befüllt. Die Proben wurden mit 1x *loading dye* versetzt und in die Taschen gegeben. Das Gel wurde für 40 min bis 90 min bei 100 V laufen gelassen. Abschließend erfolgte die Dokumentation für Ethidiumbromidgele im Gel iX Imager UV-Transilluminator. Gele ohne den Farbstoff wurden mit 0,02 % Methylengrün für 15 min bis 30 min gefärbt. Die Hintergrundfärbung wurde durch zweimaliges Waschen in ddH₂O für jeweils 15 min entfernt. Im Anschluss wurde die DNA mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit nach den Herstellerangaben aufgereinigt.

3.4.6. Rekonstruktion des ER-Phagie-Reporters pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL

Die Tetracyclin-abhängigen ER-Phagie-Reporter konnten nicht in Huh7 Zellen transduziert werden und unter der Annahme, dass das Vektorgerüst ursächlich dafür war, wurde der Reporter ssRFP-GFP-KDEL in das Vektorgerüst des Autophagie-Reporters pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B kloniert.

Primer-Design

Die Sequenz der Vektoren pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B und pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL wurde von Addgene bezogen und im DNASTAR SeqBuilder geöffnet. Im Vektor pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B wurden Restriktionsschnittstellen angezeigt, welche bis zu 30 Basenpaare von mCherry-eGFP-LC3B entfernt lagen. Es wurden die Restriktionsenzyme NheI, SmaI (SmaI) und SalI gewählt, da diese einmalig im Vektor vorkamen und hierdurch spezifisch mCherry-eGFP-LC3B aus dem Vektor heraus schnitten. Zur Amplifikation des Inserts ssRFP-GFP-KDEL wurden Primer über die Website Primer3 Plus (<https://www.primer3plus.com>) designt. Die Voraussetzungen waren eine Länge von 18 bis 24 Basenpaaren, ein GC-Gehalt von 40 % bis 60 %, eine geringe Selbstanlagerung und eine Schmelztemperatur von etwa 60 °C. Der Vorwärtsprimer wurde mit der Restriktionsschnittstelle von SmaI (SmaI) oder NheI und der Rückwärtsprimer mit der Restriktionsschnittstelle für SalI versehen. Zusätzlich wurden vier Basenpaare (TAAT) angehängt, welche eine verbesserte Bindung der Restriktionsenzyme beim späteren Verdau des PCR-Inserts zur Generierung der *sticky-/blunt-ends* bewirkten:

Primer	Rohsequenz	Restriktions-schnittstelle	Finale Sequenz 5' → 3'
Swal_KDEL_fwd	ATCCACGCTGTTTTG ACCTC	ATTAAAT	TAAT ATTAAAT ATCCA CGCTGTTTTGACCTC
KDEL_SALI_rev	CGGATCCTTAGAGCT CATCTTTC	GTCGAC	TAAT GTCGAC CGGATC CTTAGAGCTCATCTTTC
NheI_KDEL_fwd	ATCCACGCTGTTTTG ACCTC	GCTAGC	TAAT GCTAGC ATCCACG CTGTTTTGACCTC

Insert-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion

Zur Klonierung wurde das Insert ssRFP-GFP-KDEL aus dem Vektor pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL durch die gezeigten Primer amplifiziert. Es wurde die Phusion high-fidelity DNA-Polymerase verwendet, welche eine geringe Fehlerquote besaß. Zur Austestung der Primer wurde wie folgt ein 20 µl Ansatz hergestellt, während für die spätere Isolierung des Inserts ein 50 µl Ansatz verwendet wurde:

Reagenz	Volumen für 20 µl Ansatz		Volumen für 50 µl Ansatz	
	GC-Puffer	HF-Puffer	GC-Puffer	HF-Puffer
5x Phusion reaction buffer	4 µl	4 µl	10 µl	10 µl
10 µM forward primer	0,8 µl	0,8 µl	2 µl	2 µl
10 µM reverse Primer	0,8 µl	0,8 µl	2 µl	2 µl
10 mM dNTP	0,4 µl	0,4 µl	1 µl	1 µl
1 ng DNA donor	0,4 µl	0,4 µl	1 µl	1 µl
2 U/µl Phusion polymerase	0,2 µl	0,2 µl	0,5 µl	0,5 µl
DMSO (3 %)	0,6 µl	-	1,5 µl	-
Nuclease-free water	12,8 µl	13,4 µl	32 µl	33,5 µl

Es wurde mit folgendem Temperaturprofil im Thermocycler T Professional verfahren:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30 s	1
Denaturierung	98	10 s	} 35
Hybridisierung	60	30 s	
Elongation	72	40 s	
Finale Elongation	72	10 min	1

Die Proben wurden mit 4 µl bis 10 µl des 6x DNA-Gel-Ladefarbstoff versetzt und eine Gelelektrophorese (3.4.5) mit Ethidiumbromid zur Überprüfung der Effizienz der Primer durchgeführt. Anschließend wurde ein 1 % Agarosegel mit Methylenblaufärbung für die Isolierung des Inserts angefertigt. Hierbei wurde das Insert ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit nach Herstellerangaben isoliert.

Verdau des Inserts und pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B

Das Grundgerüst des neuen Vektors wurde aus pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B entnommen. Hierzu wurde mCherry-eGFP-LC3B durch die Restriktionsenzyme SmaI (Swal) und Sall aus dem Vektor herausgeschnitten. Das neue PCR-amplifizierte Insert wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen geschnitten, um die überhängenden Basenpaare zu entfernen und die notwendigen *sticky-/blunt-ends* zur Ligation zu generieren. Für den Vektor und das Insert wurde der folgende Ansatz hergestellt:

Reagenz	Insert	Vektor
DNA	0,2 µg	2 µg
10x FastDigest Buffer	2 µl	2 µl
FastDigest SmaI (Swal)	1 µl	1 µl
FastDigest Sall	1 µl	1 µl
ddH ₂ O	ad 30 µl	ad 20 µl

Beide Mischungen wurde jeweils für 15 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend die Restriktionsenzyme für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Das verdaute

Insert wurde direkt mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Der verdaute Leervektor wurde durch eine Gelelektrophorese (3.4.5) mit Methylenblaufärbung von mCherry-eGFP-LC3B getrennt und bei 6430 bp ausgeschnitten zur Aufreinigung mittels des NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kits.

Ligation

Zur Ligation des Leervektors und des neuen Inserts wurde die T4 Ligase mit einem Basenpaarverhältnis von 5:1 von Insert zu Vektor genutzt. Es wurde der folgende Ansatz hergestellt:

Reagenz	Menge/Volumen
Verdautes Insert	63,68 ng
Leervektor	50 ng
NEB T4 Ligase Puffer	2 µl
NEB T4 Ligase	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Die Mischung wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die T4 Ligase bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Der klonierte Vektor wurde in Bakterien transformiert (3.3.1) und auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Zur Miniprep (3.3.2) und anschließenden Sanger-Sequenzierung (3.4.9) wurden zwei Klone isoliert. Nach dem Nachweis über die korrekte Insertion, wurde der Vektor mit einer Maxiprep vervielfältigt und zur Generierung von lentiviralen Partikeln (3.1.1) verwendet.

3.4.7. Design von sgRNAs

Die sgRNAs zur Klonierung in den Leervektor LentiCRISPR-v2 (3.4.8) wurden über das Online-Tool CHOPCHOP designt. Das Tool lieferte eine Auswahl an sgRNAs mit einer Länge von 20 Nukleotiden, welche anhand ihrer *knockout*-Effizienz und Selektivität in einer Rangliste sortiert wurden. Für jedes Gen wurden drei sgRNAs anhand der Rangliste und der Bindungsposition im Gen, welche sich im ersten Exon befinden sollte und deren Sequenzen sich nicht mit anderen sgRNAs überschneidet, ausgewählt.

3.4.8. Klonierung von sgRNAs in LentiCRISPR-v2

Zur Generierung von CRISPR-Cas9-vermittelten *knockout*-Zelllinien wurden sgRNAs erstellt (3.4.7) und die PAM-Sequenz (5'-NGG-3'), welche in der DNA von der Cas9 erkannt wird, entfernt sowie die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Esp3I (BsmBI) zur Klonierung in den lentiviralen Leervektor LentiCRISPR-v2 angefügt. Nachfolgend ist die Modifikation für beispielhaft PIP4K2B-sgRNA1 gezeigt:

sgRNA-Sequenz	Oligomer (Sense-Strang)	Oligomer (Antisense-Strang)
GACAAAGCGCCGGT CGTAGGTGG	CACCGG GACAAAGCGCC GGTCGTAGG	AAACCCTACGACCGGCGC TTTGTCC

Die Klonierung wurde mit folgenden Ansätzen und Temperaturprofilen durchgeführt:

Hybridisierung der einzelsträngigen Oligomere (ssOligo) zu doppelsträngigen Oligomeren (dsOligo)

Reagenz	V für 50 µl Ansatz [µl]	Temperatur [°C]	Dauer [min]
ssOligos (se/as)	Jeweils 1	95	4
T4 PNK Puffer A	5	70	10
ddH ₂ O	43	37	15

Phosphorylierung der dsOligos

Reagenz	V für 10 µl Ansatz [µl]	Temperatur [°C]	Dauer [min]
dsOligo	2	37	30
T4 PNK Puffer A	1	70	10
ATP (1 mM)	1		
T4 PNK	1		
ddH ₂ O	5		

Restriktion des Leervektors LentiCRISPR-v2 und Ligation mit phosphorylierten dsOligos (p-dsOligo)

Reagenz	Volumen für 20 µl Ansatz [µl]
LentiCRISPR-v2 Leervektor (100 µg/ml)	1
1:8 verdünnte p-dsOligo	2
FastDigest Puffer	2
ATP (10 mM)	1
FastDigest Esp3I (BsmBI) (10 U/µl)	1
T4 Ligase	1
ddH ₂ O	10

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
37	5	} 6
21	5	

Der Ansatz wurde in XL1-Blue E.coli oder TOP10 E.coli Bakterien transformiert (3.3.1). Es wurden zwei bis drei Klone ausgewählt, die nach einer Miniprep (3.3.2) mittels Sanger-Sequenzierung (3.4.9) durch Verwendung des hU6-fwd-Primers auf den korrekten Einbau geprüft wurden. Anschließend erfolgte eine Maxiprep zur Amplifikation des Plasmids und Bakterienstocks zur Langzeitlagerung bei -80 °C wurden weggefroren.

3.4.9. Sanger-Sequenzierung

Die Bestätigung über die erfolgreiche Klonierung und korrekte Expression von Plasmiden wurde mittels einer Sanger-Sequenzierung durch die Firma Microsynth durchgeführt. Die Plasmide wurden auf eine Konzentration von 80 ng/µl in einem Volumen von 12 µl eingestellt. Es wurden Standard-Primer oder von Addgene für die jeweiligen Plasmide vorgeschlagene Primer genutzt. Die Auswertung der erhaltenen FASTQ-Dateien erfolgte über DNASTAR SeqMan Pro.

3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.5.1. Zelllyse

Zellpellets wurden mit 30 µl bis 100 µl Ganzzell-Lyse-Puffer für 15 min auf Eis inkubiert, um die enthaltenen Proteine freizusetzen. Das Lysat wurde durch eine Zentrifugation für 15 min bei 10.000 ×g, 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und direkt zur Proteinkonzentrationsmessung (3.5.2) weiterverwendet oder für bis zu zwei Wochen bei -20 °C gelagert.

3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration einer Probe wurde mittels der Bradford-Methode ermittelt (Bradford, 1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue (enthalten in Roti-Quant) bindet Proteine nicht kovalent über elektrostatische Anziehung (Arginin, Histidin, Lysin) oder hydrophobe Interaktionen, wodurch die anionische Form des Moleküls stabilisiert wird. Hierdurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Die Änderung ist proportional zur Menge an durch den Farbstoff gebundenen Protein.

Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe erstellt. Hierzu wurde BSA in PBS mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, ..., 35 µg/ml. Die zumessende Probe wurde 1:300 bis 1:600 in PBS verdünnt. Jeweils 100 µl der Eichreihe oder der Probe wurde dreimal auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Zu jedem well wurden 100 µl einer 40 % Roti-Quant-Lösung gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Emission wurde bei 595 nm mit dem SpectraMax Plus 384 Microplate-Reader gemessen. Mittels der Eichreihe wurde über die lineare Beziehung der Absorption und BSA-Konzentration die Proteinmenge der Probe berechnet.

3.5.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli

Die SDS-PAGE nach Laemmli ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und basiert auf der Bindung von SDS an hydrophobe Bereiche der Proteine,

welche hierdurch denaturieren und negativ geladen werden (Laemmli, 1970). Zunächst werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem großporigen Polyacrylamidgel, dem sogenannten Sammelgel, konzentriert, um eine gleichmäßige Lauffront zu schaffen. Im Anschluss wandern diese Proteine im kleinporigen Trenngel. Kleinere Proteine durchqueren dieses schneller als größere und es kommt zur Auftrennung. Mit Hilfe eines Standards kann die Proteingröße ermittelt werden.

Die Auftrennungskapazität des Polyacrylamidgels ist abhängig von seiner Porengröße, welche durch die Acrylamid-Konzentration bestimmt wird. In dieser Arbeit wurden 5 % Acrylamidgele als Sammelgel und 12,5 % Acrylamidgele als Trenngel verwendet. Die Zusammensetzung war wie folgt:

Lösung	Sammelgel (5 %) [ml]	Trenngel (12,5 %) [ml]
ddH ₂ O	5,6	1,6
50 % Glycerol	0,9	2,4
Trenngelpuffer	-	10,3
Sammelgelpuffer	1,26	-
30 % Acrylamid	1,68	11,3
2 % SDS	0,5	1,35
40 % APS	0,030	0,041
TEMED	0,020	0,027

Nach der Lyse und Proteinbestimmung wurden 25 µg bis 50 µg Protein pro Probe eingesetzt und mit Wasser auf 18,75 µl verdünnt. Es wurden 6,25 µl Roti-Load hinzugeben für ein Endvolumen von 25 µl. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C gekocht. Die Gele zur Auftrennung wurden frisch hergestellt und in einer Gelelektrophoresekommer mit 1x Lämmli-Puffer bedeckt. Das Probenvolumen wurde in die Taschen gegeben und angrenzend eine Proteinleiter (PageRuler Thermo Scientific, #26616; 1:3 verdünnt in 2x Roti-Load) hinzugegeben. Die leeren Taschen wurden mit 2x Roti-Load befüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 50 mA pro Gel für 2,5 h. Die Gele wurden zur Western-Blot-Methode (3.5.4) weiterverwendet.

3.5.4. Western-Blot (*semi-dry*)

Nach dem Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)- oder Nitrocellulose-Membran mit der *semi-dry* Western-Blot-Methode übertragen und durch spezifische Antikörper detektiert. Die PVDF-Membran wurde vor der Verwendung für 5 min in Methanol aktiviert. Für die Nitrocellulose-Membran entfiel dieser Schritt. Zur Übertragung der Proteine wurde das Gel im Sandwich-Verfahren zwischen jeweils zwei in Western-Blot-Puffer eingeweichten *whatman-papern* mit der Membran gelegt. Die Proteine wurden durch ein elektrisches

Feld (101 mA pro Gel, 2 h) in Richtung der Anode auf die Membran transferiert. Im Anschluss wurde diese mit Wasser gewaschen und der gleichmäßige Transfer der Proteine durch eine Färbung für 5 min mit einer 0,1 % PonceauS-Lösung (in 5 % Essigsäure) sichtbar gemacht. Es wurde zweimal mit Wasser gewaschen und nach der Dokumentation des Transfers wurde die Membran für 5 min in TBS-T entfärbt. Unspezifische Bindungen wurden durch das Blocken in 5 % Milch oder BSA (in TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur entfernt. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit einem spezifischen Primärantikörper (verdünnt in 3/5 % Milch/BSA in TBS-T ggf. mit 0,1 % Tween) inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal mit TBS-T für jeweils 5 min gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur mit einem Sekundärantikörper (verdünnt in 5 % Milch in TBS-T) inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurden die Reagenzien Amersham ECL™ Western-Blotting-Reagenzien oder Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate entsprechend der Herstellerangaben frisch angesetzt und die Membran für 1 min bis 5 min in der Detektionslösung inkubiert. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper reagierte mit dem Detektionsreagenz und es entstand eine Chemilumineszenz, welche mittels des ChemiDoc™ Touch Imaging System aufgenommen wurde. Die relative Quantifizierung der erhaltenen Signale wurde durch die Bio-Rad Image Lab Software durchgeführt.

3.5.5. Metabolische Markierung mittels OPP

Markierung der Zellen

Die metabolische Markierung von naszierenden Proteinen erfolgte durch die Substanz OPP (O-propargyl-puromycin), welche während der Translation von Proteinen in diese eingebaut wurde und zu einem Kettenabbruch führte. Die Alkin-Gruppe von OPP wurde durch eine Click-Reaktion an Biotin gebunden und mittels Streptavidin-Beads isoliert (Parker & Pratt, 2020). Die metabolische Markierung wurde wie folgt durchgeführt:

4 x 10⁷ Huh7 Zellen wurden in 20 ml Vollmedium auf eine 145 mm Schale ausgesät und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit HCoV-229E für 24 h infiziert. 3 h vor Ende der Infektionszeit wurde eine Kontrollschale mit Cycloheximid (10 µg/ml) behandelt. OPP (30 µM) oder DMSO (0,3%) wurden 2 h vor Infektionsende zu den Zellen hinzugegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte in 2 ml kaltem PBS.

Zelllyse und Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Zellpellets wurden in 750 µl des CLICK Chemie Lyse-Puffer mit dem Zusatz von PMSF (1:100) und cOmplete Proteasehemmer-Cocktail (1:50) für 15 min auf Eis inkubiert und mehrfach gevortext. Das Lysat wurde bei 16.000 ×g, 4 °C für 20 min

zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Methode (3.5.2). Es wurden dreimal 25 µg Protein als Ganzzell-Lysat-Probe für die SDS-PAGE/Western-Blot-Analyse (3.5.3, 3.5.4) separiert und mit 1x Roti-Load für 10 min bei 95 °C aufgeköcht.

Pre-Clearing

Es wurden 30 µl der *high capacity streptavidin agarose resin beads* in ein Eppendorfgefäß pipettiert und 500 µl des CLICK Chemie Lyse-Puffers hinzugefügt. Die Beads wurden bei 1000 ×g, 4 °C für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Waschung wurde wiederholt. Es wurden 1,8 mg bis 9 mg Protein auf die Beads gegeben und das Volumen auf 1 ml mit dem CLICK Chemie Lyse-Puffer (mit PMSF 1:100 und cOmplete Proteasehemmer-Cocktail 1:50) ergänzt. Der Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht rotiert. Das geklärte Lysat wurde durch eine Zentrifugation mit 1000 ×g bei 4 °C für 2 min von den Beads getrennt und in ein neues Gefäß überführt.

Click-Reaktion

Für die Click-Reaktion zur Biotinbindung wurde das Lysat mit dem folgenden Ansatz versetzt und für 1,5 h bei Raumtemperatur rotiert:

Reagenz	Stockkonzentration	Endkonzentration	Volumen für 1 ml Lysat
Biotin-Azid	15,3 mm in DMSO	0,625 mM	6,53 µl
TCEP	174,3 mm in H ₂ O	6,25 mM	5,73 µl
TBTA	56,5 mm in DMSO	0,625 mM	1,77 µl
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	1 M in H ₂ O	6,25 mM	1,00 µl
SDS	20 %	6,25 %	50,00 µl
ddH ₂ O		ad 160 µl	94,96 µl

Proteinpräzipitation

Das *in vitro* markierte (Click-)Lysat wurde in ein 5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es wurde 4 ml bei -20 °C gelagertes Aceton hinzugefügt und bei -20 °C für 1 h oder über Nacht inkubiert. Das Präzipitat wurde für 5 min bei 3000 ×g, 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml gekühltem Methanol suspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 3500 ×g, 4 °C, und der Überstand wurde verworfen. Die Waschung wurde wiederholt. Die Restflüssigkeit im Gefäß wurde für 5 min bei Raumtemperatur abgedampft. Das Pellet wurde in 120 µl 1 % SDS-Lösung (in PBS) mit Hilfe einer abgeschnittenen Spitze gelöst.

Reinigung und Umpufferung

Zur Reinigung und Umpufferung der Lösung wurden ein Zebra Spin Säulchen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und die Lagerlösung durch eine Zentrifugation bei

1500 ×g für 1 min entfernt. 300 µl des CLICK Waschpuffers I wurden hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Waschung zweimal wiederholt. Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Gefäß gestellt und 120 µl der Probe hinzugefügt. Es wurde für 2 min bei 1500 ×g zentrifugiert und der Durchfluss zur Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet (3.5.2). Für die Durchführung der SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse (3.5.3, 3.5.4) wurden dreimal 25 µg Protein als gereinigtes Click-Lysat separiert und mit 1x Roti-Load für 10 min bei 95 °C aufgeköcht.

Pulldown

Die naszierenden Proteine wurden über Streptavidin-Agarose-Beads separiert. 60 µl der Beads wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl CLICK Waschpuffer I versetzt. Der Überstand wurde durch eine Zentrifugation für 1 min bei 2000 ×g, 4 °C entfernt. Es wurden 450 µg bis 900 µg des gereinigten Click-Lysats mit 500 µl CLICK Waschpuffer I auf die Beads gegeben und über Nacht bei 4 °C rotiert. Die Beads wurden entsprechend der nachfolgenden Tabelle gewaschen und der Überstand jeweils durch eine Zentrifugation für 2 min mit 1000 ×g, 4 °C entfernt:

Waschungen	Puffer, Menge	Dauer, Temperatur
2	CLICK Waschpuffer I, 500 µl	10 min, 4 °C
3	CLICK Waschpuffer II, 500 µl	10 min, 4 °C
3	Eiskaltes PBS, 500 µl	10 min, 4 °C

Die Beads wurden 20 min mit 60 µl 2x Roti-Load bei 95 °C aufgeköcht und der Überstand als *pulldown*-Lysat zur Durchführung der SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse (3.5.3, 3.5.4) verwendet.

3.6. Mikroskopische Methoden

3.6.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Die mikroskopische Methode der indirekten Immunfluoreszenz wurde verwendet, um Proteine, Lipide und Nukleinsäuren in Zellen zu visualisieren. Hierzu wurden Zellen in Ibidi *µ-slides* ausgesät und behandelt, infiziert oder transfiziert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 150 µl warmen HBSS gewaschen und für 5 min mit 100 µl 4 % Paraformaldehyd (in PBS) fixiert. Die Zellmembran wurde für 10 min mit 100 µl einer 0,1 % Saponin-Lösung (in HBSS) permeabilisiert und unspezifische Bindungen durch das Blocken für 20 min mit 100 µl einer 2 % Serum-Lösung (in 0,005% Saponin/HBSS) maskiert. Es erfolgte die Inkubation für 2 h mit 50 µl des Primärantikörpers (verdünnt in 0,005 % Saponin/HBSS), welcher spezifische Proteine, PI(4,5)P₂ oder doppelsträngige RNA band. Für jede indirekte

Immunfluoreszenz wurde ein Kontrollkanal ohne die Zugabe von Primärantikörpern mitgeführt, um das Hintergrundsignal des Sekundärantikörpers zu bestimmen. Die Zellen wurden dreimal für 10 min mit 0,005 % Saponin (in HBSS) gewaschen und der Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper (verdünnt in 0,005% Saponin/HBSS), welcher an den Primärantikörper assoziierte, für 2 h unter Lichtausschluss hinzugegeben. Es wurde dreimal für 10 min mit HBSS gewaschen und die Zellkerne für 5 min mit 100 µl einer Hoechst-Lösung (1 µM in HBSS) gefärbt. Die Zellen wurde zweimal mit HBSS gewaschen und in 30 % Glycerol-Lösung eingebettet. Die Dokumentation erfolgte mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop DMI8.

3.6.2. Mikroskopische Erfassung von Tandem-Reportern

Zur Erfassung von autophagischen Prozessen wurden stabil lentiviral mit einem Autophagie- oder ER-Phagie-Reporter transduzierte Zelllinien verwendet. Der Reporter bestand aus einem rot (mCherry oder ssRFP) oder grün ((e)GFP) fluoreszierenden Protein und LC3B (für Autophagie) bzw. KDEL, RAMP4, CLIMP63 oder REEP5 (für ER-Phagie). Durch das pH-abhängige *quenchen* der grünen Fluoreszenz in lysosomalen Kompartimenten konnte der resultierende Rotumschlag Rückschluss auf den autophagischen/ER-phagischen Flux ermöglichen. Für die mikroskopische Erfassung wurden die Reporterzellen ausgesät. Es erfolgte die Aktivierung der Reporterexpression mit Doxycyclin, Behandlung mit Inhibitoren, Hungerbedingungen und/oder die Transfektion von Plasmiden. Nach zweimaligem Waschen mit vorgewärmten HBSS wurde umgehend die Fluoreszenzmikroskopie am DMI8 Mikroskop durchgeführt. Für die Kombination des Autophagie-Reporters und der Erfassung von doppelsträngiger RNA wurden die Ibidi µ-slides nach der Mikroskopie für 5 min mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS) fixiert und es wurde mit der indirekten Immunfluoreszenz fortgefahren (3.6.1). Die erfassten Bilder wurden mittels ImageJ/Fiji oder Cellprofiler quantifiziert (3.7).

3.6.3. Proximity ligation assay mit Puromycin-Markierung (Puro-PLA)

Der *proximity ligation assay* detektiert die räumliche Nähe von zwei oder mehr Zielstrukturen, durch die Bindung von spezifischen Primärantikörpern verschiedener Spezies. Sekundärantikörper, welche kurze DNA-Sequenzen besitzen, binden an die Primärantikörper. Wenn diese weniger als 40 nm voneinander entfernt liegen, erfolgt die Ligation der DNA-Stränge zu einer zirkulären Struktur. Die DNA wird in einer *rolling circle amplification* zu einer langen einzelsträngigen DNA amplifiziert. Komplementäre DNA-Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff können diese binden und mittels der Fluoreszenzmikroskopie erfasst werden. Der Assay kann zur Detektion von neosynthetisierten Proteinen mit einer Puromycin-Markierung kombiniert werden.

Hierbei wird Puromycin den Zellen zugegeben und während der Translation in die Polypeptidkette eingebaut. Durch die Kombination von Antikörpern gerichtet gegen Puromycin und ein Zielprotein, werden die im Markierungszeitraum translatierten Proteine visualisiert (Chin & Lecuyer, 2021). Der Puro-PLA wurde wie folgt durchgeführt:

Es wurden 9.000 Zellen in einen Kanal des Ibidi μ -slides ausgesät und behandelt bzw. infiziert. Cycloheximid wurde als Translationsinhibitor 1,5 h vor Behandlungsende hinzugegeben und 30 min vor der Fixierung erfolgte die Applikation von 3 μ M Puromycin. Die Zellen wurden viermal innerhalb von 10 min mit vorgewärmten HBSS gewaschen. Die Durchführung des PLA erfolgte entsprechend der folgenden Tabelle mit 50 μ l bis 100 μ l der jeweiligen Lösung des Duolink In Situ PLA Sonde Anti-Kaninchen/Maus PLUS/MINUS Kits oder des Duolink In Situ Detektionsreagenzien Orange Kits, wobei die Inkubation bei 37 °C im Hybridisier HB-1D stattfand:

Lösung/Reagenz	Inkubation	Waschschritt (RT)
Fixierung: 4 % PFA (in PBS)	5 min, RT	HBSS 3x 5 min
Permeabilisierung: 0,1 % Saponin (in HBSS)	10 min, RT	-
Blocking-Lösung	30 min, 37 °C	-
Primärantikörper (in Antibody-Diluent)	1 h, 37 °C	PLA-Puffer A 3x 5 min
1x PLA Sonde (in Antibody-Diluent)	1 h, 37 °C	PLA-Puffer A 3x 5 min
Ligase 1:60 (in 1x Ligationspuffer)	30 min, 37 °C	PLA-Puffer A 3x 2 min
Polymerase 1:80 (in 1x Amplifikationspuffer)	100 min, 37 °C	PLA-Puffer B 3x 5 min
Hoechst (1 μ M in HBSS)	5 min, RT	HBSS 2x in 5 min

Die Zellen wurden in 100 μ l einer 30 % Glycerol-Lösung (in HBSS) einbettet. Die Erfassung des Puro-PLA erfolgte durch die Fluoreszenzmikroskopie am Leica DMI8.

3.7. Grafische Auswertung und statistische Analysen

3.7.1. Segmentierung von Zellen durch Cellpose

Die Segmentierung von Zellen erfolgte durch das Programm Cellpose 2.0, welches durch spezifisch trainierte Modelle mithilfe einer Deep Learning basierten Bildanalyse Zellen umranden konnte (Pachitariu & Stringer, 2022). Das manuelle Training der Modelle ermöglichte es dem Programm ein neuronales Netzwerk, angepasst auf die verwendeten Zellarten, zu erstellen. Dieses konnte anhand von Helligkeitsunterschieden in den Mikroskopiebildern über die Generierung eines Vektorfeldes eine Maske erzeugen, welche die Zellen differenzierte und welche nachfolgend in ImageJ/Fiji oder Cellprofiler zur weiteren Auswertung genutzt wurde. Für jede Zelllinie, unabhängig von eventueller Transfektion oder Transduktion, wurde ein Modell entsprechend der Herausgeberangaben mit drei bis zehn repräsentativen Bildern und einer Gesamtmenge

von mehr als 150 Zellen anhand der Phasenkontrastbilder (A549, HeLa, Huh7) oder Fluoreszenzbilder (mittels FLAG-Antikörper für A549⁺) trainiert. Die Segmentierung der Bilder wurde direkt über die Anaconda-Eingabeaufforderung wie folgt durchgeführt:

```
python -m cellpose --dir X --pretrained_model Y --diameter 0 --save_png  
--verbose --use gpu
```

Code 1 Eingabeaufforderung zur Segmentierung von Ordnern mit Cellpose

Gezeigt ist ein Code-Snippet zur automatischen Verarbeitung von Bildern. Der Pfad der Bilder wurde für X eingegeben und das trainierte Modell passend zum Zelltyp wurde für Y eingetragen.

3.7.2. Erfassung von mittleren zellulären Fluoreszenzsignalen

Für die Messung des mittleren Fluoreszenzsignales von Zellen nach der indirekten Immunfluoreszenz (3.6.1) oder der Erfassung des Autophagie-/ER-Phagie-Reporters (3.6.2) wurden die Bilder in ImageJ/Fiji geladen. Zur Quantifizierung wurde ein Makro geschrieben, welches automatisiert eine Vielzahl an Bildern mittels der Segmentierungsmasken von Cellpose (3.7.1) vermessen konnte (Code 2). Das Erweiterungsmodul PTBIOP konnte diese Masken in Zellumrandungen (*region of interest*, ROI) umwandeln (Biolmaging and Optics Core Facility, 2021). Anschließend erfolgte die Messung der Intensität jeder Zelle im Fluoreszenzkanal. Nach dem Durchlaufen des Makros wurde die Tabelle mit den Ergebnissen in Excel exportiert.

```
1.  run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid  
   center perimeter bounding fit shape feret's integrated median  
   skewness kurtosis area_fraction stack display redirect=None  
   decimal=3");  
2.  for (i = 0; i < 300; i++) {  
3.      image=getTitle();  
4.      image_empty=replace(image, "ch01.tif", "");  
5.      image_empty=replace(image_empty, "ch02.tif", "");  
6.      open("PFAD");  
7.      run("Label image to ROIs", "rm=[RoiManager[size=1000,  
   visible=true]]");  
8.      close();  
9.      selectWindow(image_empty+"ch02.tif");  
10.     Count=roiManager("count");  
11.     for (j = 0; j < Count; j++) {  
12.         roiManager("Select", j);  
13.         run("Measure");  
14.     }  
15.     roiManager("deselect");  
16.     roiManager("Delete");  
17.     close();  
18. }
```

Code 2 ImageJ/Fiji-Makro zur Intensitätsmessung eines Kanals

Das Makro maß fortlaufend die Intensität eines Fluoreszenzkanals durch die in Cellpose generierten Masken für bis zu 300 Bilder. Der Pfad der Cellposebilder musste in Zeile 6 eingefügt

werden. Gegebenenfalls musste das Suffix des Bildernamens für andere Fluoreszenzkanäle in Zeile 9 angepasst werden.

3.7.3. Kolokalisation von dsRNA und mCherry-eGFP-LC3B

Die Beurteilung der Kolokalisation des dsRNA-Antikörpers mit den Autophagosom-ähnlichen Strukturen in Autophagie-Reporter transduzierten Zellen erfolgte durch eine unabhängige, automatische Auswertung zur Erfassung der Überlappung der Objekte sowie der Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten r (Abb. 13). Zu diesem Zweck wurde für die Tandem-Reporterzellen nach der Infektion eine indirekte Immunfluoreszenz (3.6.1) mit einem dsRNA-Primärantikörper (SCICONS/Nordic-Mubio, #10010200) gefolgt von einem Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt. Es wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie repräsentative Bilder erfasst. Die Zellen wurden durch Cellpose (3.7.1) segmentiert. Im Anschluss erfolgte die Detektion der dsRNA-Spots und Autophagosom-ähnlichen Strukturen über Cellprofiler und die generierten Masken wurden exportiert. Zur weiteren Auswertung wurde ein Makro in ImageJ/Fiji erstellt, welches die Schnittmenge der Flächen beider Strukturen pro Zelle vermessen konnte. Zudem erfolgte durch das JACoP Tool des PTBIOP Plugins die Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten r (Bolte & Cordelières, 2006). Hierzu wurde nach einer *rolling-ball* Hintergrundkorrektur (50 px), ein manueller Intensitätsschwellenwert von 7475 für dsRNA-Spots und 5482 für Autophagosom-ähnliche Strukturen gesetzt. Zusätzlich wurde eine Costes-Randomisierung (100 Iterationen) durchgeführt (Costes et al., 2004). Für 99,6 % der Zellen wurde ein p-Wert von mehr als 0,95 erfasst, welcher gegen eine zufällige Kolokalisation sprach. Die finale Analyse erfolgte in Excel anhand der Reporterexpression, des dsRNA-Vorkommens und der prozentualen Überlappung der Autophagosom-ähnlichen Strukturen mit dsRNA.

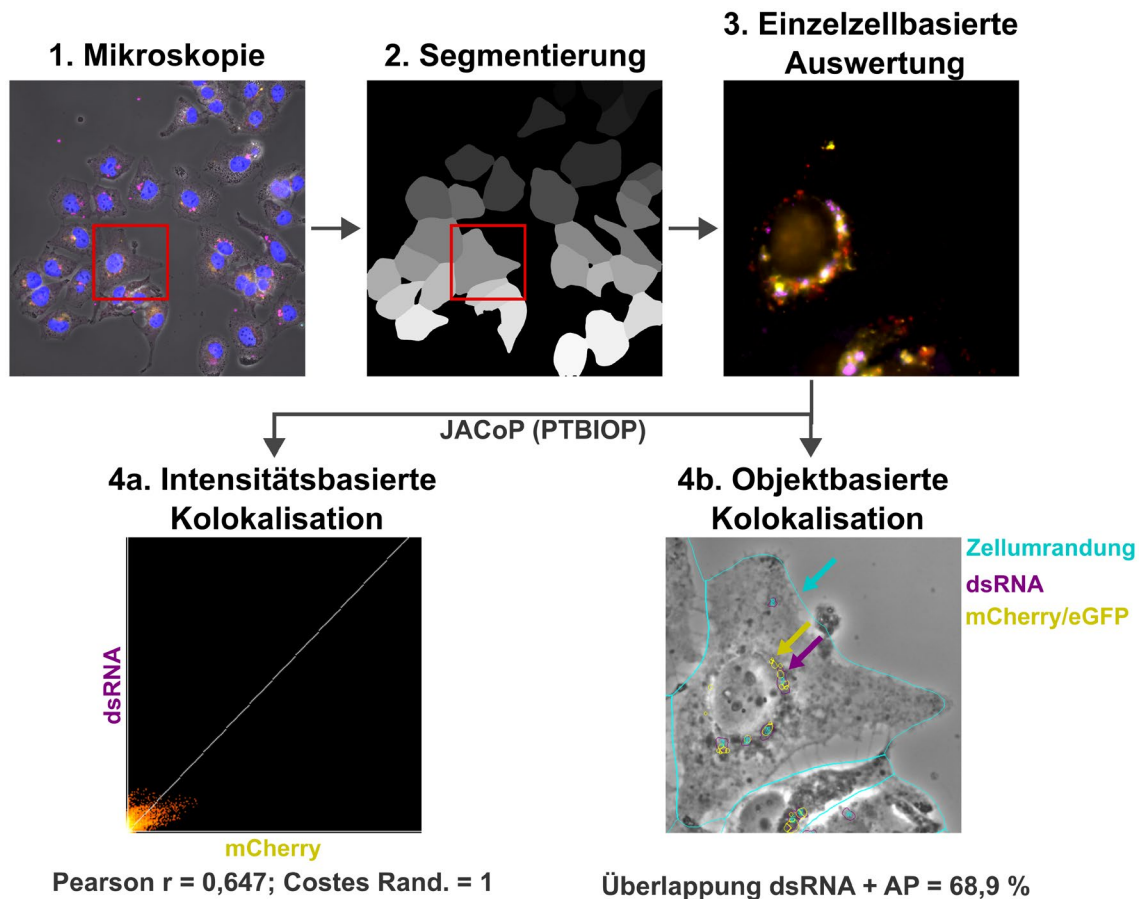


Abb. 13 Schematische Darstellung der Kolokalisation-Analyse

Nach der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Segmentierung der Zellen durch Cellpose. Für jede Zelle wurden die dsRNA-Spots und mCherry/eGFP-positiven Autophagosom-ähnlichen Strukturen (AP) in Cellprofiler bestimmt und mittels des ImageJ/Fiji Plugins JACoP vermessen. Es erfolgte eine pixelintensitätsbasierte Analyse mit der Erfassung des Pearson-Korrelationskoeffizienten r pro Zelle sowie die objektbasierte Analyse der prozentualen Überlappung von dsRNA mit den Autophagosom-ähnlichen Strukturen.

3.7.4. Bildüberlagerung nach einem Live-Cell-Imaging in Kombination mit einer indirekter Immunfluoreszenz

Mikroskopiebilder, welche durch die Kombination des Live-Cell-Imagings (3.6.2) und der indirekten Immunfluoreszenz (3.6.1) dokumentiert wurden, zeigten aufgrund des Entfernens des Ibidi μ -slides aus der Mikroskophalterung Verschiebungen der Aufnahmen Prä- und Postfixierung, weshalb diese nicht überlagerbar waren. Daher wurde der LAX-Navigator der Leica LAS X Software genutzt, um gleiche Bildausschnitte wieder zu finden und ein ImageJ/Fiji-Makro erstellt, welches mittels der BigDataViewer-Erweiterung die Aufnahmen anpasste (Bogovic et al., 2016). Zunächst wurden für jedes Ibidi μ -slide mit dem BigWarp-Tool zehn Orientierungspunkte festgelegt. Die nach der Fixierung aufgenommenen Bilder und die korrespondierenden Phasenkontrastbilder vor der Fixierung wurden für ein Ibidi μ -slide im Programm geöffnet. Durch die Ausführung von Code 3 erfolgte anhand der Orientierungspunkte die

automatisierte Transformation und Speicherung aller Bilder. Mittels der Cellpose-generierten Segmentierungsmasken wurde die korrekte Anpassung der Bilder überprüft und zur Auswertung durch Cellprofiler im nachfolgenden Kapitel weiterverwendet.

```

1.  for (i = 0; i < 100; i++) {
2.    for (j = 0; j < 5; j++) {
3.      image=getTitle();
4.      image_e=replace(image, "postfix_", "");
5.      image_e=replace(image_e, "ch00.tif", "");
6.      image_e=replace(image_e, "ch01.tif", "");
7.      image_e=replace(image_e, "ch02.tif", "");
8.      image_e=replace(image_e, "ch03.tif", "");
9.      image_e=replace(image_e, "ch04.tif", "");
10.     Ibidi="Ibidi-2";
11.     image_e=replace(image_e, "Ibidi-2", "");
12.     run("Big Warp Apply", "browse=[Y:/PFAD]
        landmarks_image_file=[Y:/PFAD]
        moving_image=["+Ibidi+"_postfix"+image_e+"ch0"+j+".tif]
        target_image=["+Ibidi+image_e+"ch00.tif] moving=[]
        moving_dataset=[] target=[] target_dataset=[]
        transform=[Thin Plate Spline] resolution=Target field=Target
        bounding=FACES samples=5 point=[] x=1.0000 y=1.0000 z=1.0000
        x_0=0.0000 y_0=0.0000 z_0=0.0000 x_1=-1 y_1=-1 z_1=-1
        interpolation=Linear threads=4 file_or_n5_root=[]
        n5_dataset=[] n5_block_size=32 n5_compression=gzip");
13.     wait(1000);
14.     rename(Ibidi+image_e+"ch0"+j+"_warp.tif");
15.     imagenew=getTitle();
16.     saveAs("Tiff", "E:/PFAD/"+imagenew+".tif");
17.     close();
18.     selectWindow(Ibidi+"_postfix"+image_e + "ch0"+j+".tif");
19.     close();
20.   }
21.   selectWindow(Ibidi+image_e + "ch00.tif");
22.   close();
23. }

```

Code 3 ImageJ/Fiji-Makro für die Überlagerung von Bildern vor/nach Fixierung

Das Makro passte die nach der Fixierung aufgenommenen Bilder des kombinierten Live-Cell-Imagings mit einer indirekten Immunfluoreszenz an die vor der Fixierung erfassten Bilder an. Die Ausführung des Makros erfolgte Ibidi μ -slide-spezifisch. Es wurden bis zu 100 Bilder mit jeweils fünf Kanälen bearbeitet. Zu Beginn wurde in Zeile 10, 11 die Ibidi μ -slide-Nummer angepasst und in Zeile 12 der Pfad für die Transformationspunkte eingefügt.

3.7.5. Analyse subzellulärer Strukturen mittels Cellprofiler und Excel

Cellprofiler ist eine Open-Source-Software zur Auswertung von Mikroskopiebildern (Stirling et al., 2021). Hiermit wurden automatisierte und standardisierte *pipelines* für die Identifizierung und Vermessung von Objekten wie Autolysosomen, PLA-Spots oder dsRNA-Spots erstellt. Durch die Cellpose-Segmentierung (3.7.1) konnten diese Objekte einzelnen Zellen zugeordnet werden. Die finale Auswertung erfolgte in Excel.

Aufbau der Cellprofiler *pipelines*

Im Tool **EnhanceOrSupressFeatures** wurden unter Verwendung eines *white top hat* Filters Autolysosomen, PLA-Spots oder dsRNA-Spots als *speckles* vom Hintergrund im jeweiligen Fluoreszenzbild differenziert. Es wurde eine Featuregröße von 30 px oder 50 px für dsRNA-Spots/Autolysosomen in Abhängigkeit des Tandem-Reporters oder des Zelltyps und 8 px für PLA-Spots gewählt.

Im zweiten Schritt wurden die Objekte durch **IdentifyPrimaryObjects** in den Fluoreszenzbildern mit einer Objektgröße von 2 px bis 25 px für Autolysosomen, 2 px bis 50 px für dsRNA-Spots und 2 px bis 10 px für PLA-Spots detektiert. In den erweiterten Einstellungen wurden die folgenden Parameter für die Erkennung durch den *robust background* Algorithmus gesetzt:

Parameter	dsRNA-Spots	Autolysosomen	PLA-Spots
Lower outlier fraction	0.05	0.05	0.05
Upper outlier Fraction	0.1	0.1	0.1
Averaging Method	Mean	Mean	Mean
Variance method	Standard dev.	Standard dev.	Standard dev.
# of deviations	3	2	3
Threshold smoothing scale	2 – 3	1.3488	2
Threshold correction factor	5 – 10	3 – 7	8
Lower/upper bound on threshold	0.0 – 1.0	0.0 – 1.0	0.0 – 1.0
Method to distinguish/draw dividing lines between clumped Objects	Intensity	Intensity	Intensity
Smoothing filter for declumping	8	Calculate auto	Calculate auto
Display accepted local maxima	No	No	No
Fill holes in identified objects	After both	After both	After both

Objekte, die fälschlicherweise außerhalb der Zellen identifiziert wurden, konnten durch die in Cellpose generierten Masken mit dem Feature **MaskImage** entfernt werden. Für die spezielle Erfassung des PI(4,5)P₂-Signals in den äußeren Bereichen der Zelle wurde das Modul **ExpandOrShrinkObjects** verwendet. Ausgehend von den Zellumrandungen wurde diese um 30 px geschrumpft. Hierdurch konnten die Objekte *Shrunkencells* durch die nachfolgenden Module vermessen werden und in der Excel-Auswertung das PI(4,5)P₂-Signal des äußeren und inneren Bereiches der Zellen analysiert werden.

Die Intensität der Objekte wurden durch **MeasureObjectIntensity** erfasst. Es wurde für alle vorhandenen Fluoreszenzen die Gesamtzellintensität durch die Cellpose-Segmentierung gemessen. Zusätzlich wurden die Intensitäten von dsRNA und PI(4,5)P₂ in identifizierten dsRNA-Spots analysiert. In den detektierten Autolysosomen erfolgte die Messung der (e)GFP-Fluoreszenz, zur späteren Differenzierung von Autophagosomen

und Autolysosomen. Für die PLA-Spots wurde ebenfalls die Messung der Intensität in den identifizierten Regionen durchgeführt.

Durch **RelateObjects** konnten die dsRNA-Spots, Autolysosomen und PLA-Spots den jeweiligen Zellen zugeordnet werden. Mit **MeasureObjectSizeShape** wurde die Größe der Zellen und Objekte in der Einheit Quadratpixel (px^2) vermessen (Umrechnungsfaktor für 400-fache Vergrößerung von px^2 zu $\mu\text{m}^2 = 0,02640625$). Die Darstellung der ausgewerteten Bilder mit den identifizierten Objekten wurde über **OverlayOutlines**, **DisplayDataOnImage** und **SaveImages** erzeugt. Die Daten wurden über das Modul **ExportToSpreadsheet** als CSV-Datei ausgegeben und in Excel weiter ausgewertet.

Auswertung von dsRNA-Spots in Kombination mit FLAG/MURC-Antikörpern

Die Auswertung der Daten der indirekten Immunfluoreszenz mit dem dsRNA-Antikörper (SCICONS/Nordic-Mubio, #10010200) und dem FLAG- oder MURC-Antikörper ist schematisch in Abb. 14 dargestellt. Die Datenverarbeitung in Excel erfolgte basierend auf dem im Anhang gelisteten VBA-Makro (Code Anhang 1). Das Makro importierte die Dateien der Cellprofiler-Auswertung und ggf. nach einer Anpassung des Codes wurden die Messwerte der Zellen und Spots zusammengeführt. Folgende Parameter wurden aus den Rohdateien entnommen: Zellfläche in px^2 , integrierte (aufsummierte) Intensität für MURC/FLAG pro Zelle, Fläche identifizierter Objekte (dsRNA) in px^2 und integrierte Intensität pro Objekt. Hieraus erfolgte die Ableitung folgender weiterer Messwerte:

Messwert	Berechnung
Mittlere zelluläre FLAG-/MURC-Intensität	$= \frac{\text{Integrierte FLAG-/MURC-Intensität}}{\text{Zellfläche } [\text{px}^2]}$
Fläche/Intensität von dsRNA pro Zelle	$= \frac{\text{Summe der Fläche}}{\text{integrierten Intensität von Objekte pro Zelle}}$
Mittlere zelluläre dsRNA-Intensität	$= \frac{\text{Integrierte dsRNA-Intensität pro Zelle}}{\text{Zellfläche } [\text{px}^2]}$
Infizierte Zellen	$= \text{Summe an Zellen mit integrierte dsRNA-Intensität} > 0$

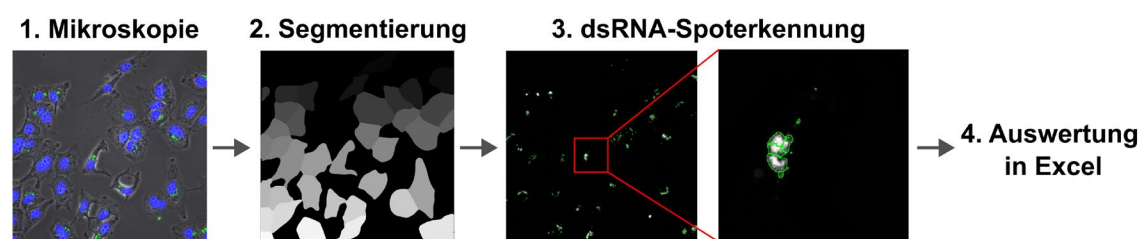


Abb. 14 Übersicht des Ablaufs der Vermessung von dsRNA-Spots

Nach der indirekten Immunfluoreszenz wurden repräsentative Bilder erfasst. Die Segmentierung durch Cellpose erzeugte eine Maske mit einem Graugradienten. Die dsRNA-Spoterkennung erfolgt mit Hilfe der Cellpose-Maske in Cellprofiler. Die identifizierten Objekte wurden umrandet und die Intensität sowie Größe analysiert. Die finale Auswertung erfolgte in Excel.

Kombination des dsRNA- und PI(4,5)P₂-Antikörpers

Die indirekte Immunfluoreszenz mit dem dsRNA-Antikörper (Absolute Antibody, #Ab01299-23.0) und dem PI(4,5)P₂-Antikörper wurde basierend auf dem VBA-Makro Code Anhang 1 durchgeführt. Das Makro wurde durch den Code Anhang 2 zur Lokalisation von PI(4,5)P₂ innerhalb der Zellen ergänzt. Es wurden folgende Messwerte den Dateien entnommen: integrierte Intensität von PI(4,5)P₂ der Gesamtzelle oder des inneren Bereiches sowie dessen Fläche in px², Fläche identifizierter Objekte (dsRNA) in px² und integrierte Intensität pro Objekt. Die Berechnung weiterer Parameter erfolgte für dsRNA wie bereits beschrieben und für PI(4,5)P₂ (PIP2) wie folgt:

Messwert	Berechnung
Integrierte Intensität PI(4,5)P ₂ äußerer Bereich	$= \text{Integrierte Intensität PIP2 pro Zelle} - \text{innerer Bereich}$
Fläche äußerer Bereich [px ²]	$= \text{Zellfläche} - \text{Fläche innerer Bereich}$
Mittlere Intensität PI(4,5)P ₂ in Bereich X (innen/außen)	$= \frac{\text{Integrierte Intensität PIP2 in Bereich X}}{\text{Fläche von Bereich X}}$
Mittlere Intensität PI(4,5)P ₂ in dsRNA-Spots	$= \frac{\text{Integrierte Intensität PIP2 in dsRNA-Spots}}{\text{Fläche dsRNA-Spots}}$

Für Versuche, welche eine Transfektion mit einem mTagBFP2(*monomeric tag blue fluorescent protein*)-gekoppelten Protein beinhalteten, wurde zusätzlich die mittlere zelluläre Intensität für mTagBFP(2) ermittelt und anhand dieser eine Klassifizierung der Zellen in erfolgreich transfizierte und nicht transfizierte Zellen vorgenommen.

Autophagie-Reporter und ER-Phagie-Reporter

Die Mikroskopiebilder des Autophagie-Reporters wurden basierend auf dem VBA-Makro Code Anhang 1 in Excel ausgewertet (Abb. 15). Zur Klassifizierung von Autolysosomen und Autophagosomen wurde ein Mikroskop- und Belichtungszeitspezifischer Grenzwert für das Verhältnis von mCherry/eGFP in den Vesikeln festgelegt. Bei einem Wert von über 0,6 wurden die Objekte als Autolysosomen deklariert, während ein niedrigeres Verhältnis Autophagosomen anzeigte. Das Makro lieferte eine Aussage über die Anzahl und Fläche der Vesikel pro Zelle. Die Auswertung des ER-Phagie-Reporters erfolgte analog, jedoch war keine Erfassung von Autophagosomen möglich.

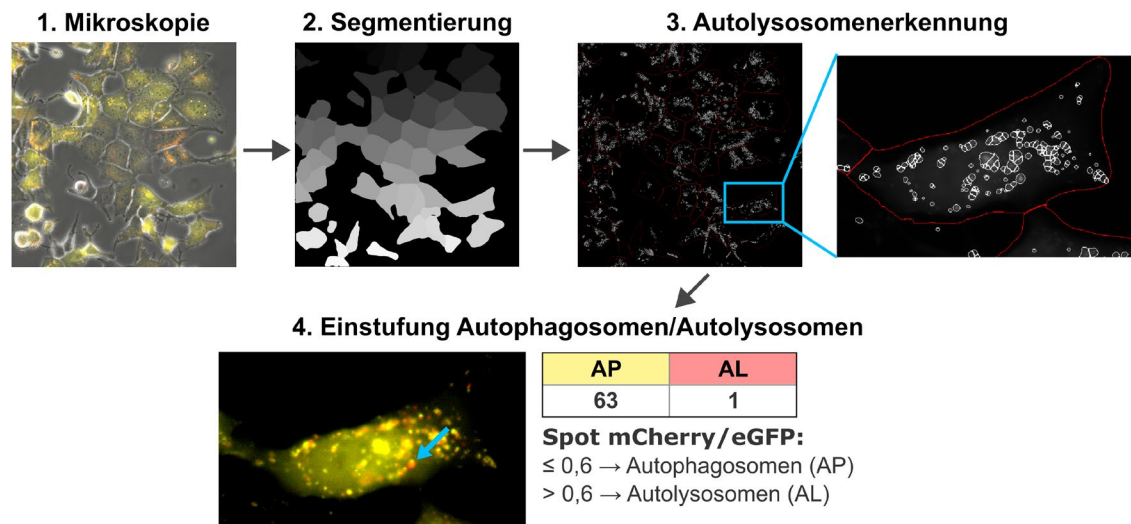


Abb. 15 Automatische Auszählung von Autophagosomen und Autolysosomen

Die Reporterzellen wurden durch ein Live-Cell-Imaging erfasst und die Zellen mittels Cellpose segmentiert. Anhand des mCherry-Signals wurden Autophagosomen (AP) bzw. Autolysosomen (AL) detektiert. Es wurde die Intensität, Anzahl und Größe pro Zelle erfasst und es erfolgte die Einstufung in AP und AL durch das Intensitätsverhältnis von mCherry/eGFP. Dargestellt ist eine repräsentative Zelle mit 63 Autophagosomen und 1 Autolysosomen (blauer Pfeil).

PLA-Spots

Für die Auswertung der PLA-Spots mit dem PIP4K2B-Antikörper wurden die Spalten *ImageNumber*, *Objektnummer*, *Filename_PH*, *AreaShape_Area* und *Children_Objects_Spots_Count* der zellulären Vermessung entnommen. Die Anzahl der Objekte pro Zelle wurde durch Letztgenanntes wiedergegeben und als PLA-Spots pro Zelle geplottet. Zur Auswertung der PLA-Spots des MURC-Antikörpers wurden folgende Messwerte der Objekte verwendet: *ImageNumber*, *FileName_PH*, *Intensity_MeanIntensity_Spots*, *Parent_Cell*. Es wurde für jede Zelle durch das Verketteten von *ImageNumber* und *Parent_Cell* ein Primärschlüssel generiert. Zusätzlich wurde anhand der Kontrollen ein PLA-Spot-Intensitätsgrenzwert von > 35 festgelegt. Zur Zuordnung und Summierung der PLA-Spots pro Zelle wurde die Funktion `=SUMMEWENN` von Excel unter Verwendung des generierten Primärschlüssels genutzt.

3.7.6. Statistische Auswertung mit Graphpad Prism

Die statistische Auswertung erfolgte durch Graphpad Prism. Es wurden ungepaarte, parametrische/nicht-parametrische, zweiseitige T-Tests zur Beurteilung von signifikanten Unterschieden für Western-Blot-, RT-qPCR-, FACS-Analysen und Vergleiche von Mittelwerten biologischer Replikate nach der mikroskopischen Erfassung durchgeführt. Aufgrund der hohen Zellzahlen von einzelzellbasierten mikroskopischen Auswertungen wurde hierbei eine One-Way ANOVA angewendet. Zusammenhänge wurden mittels des Pearson-Korrelationskoeffizienten r bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung eines Reportersystems zur Messung der Autophagie und ER-Phagie

Coronaviren interagieren bereits in den frühen Phasen des Replikationszyklus mit dem ER und es wird vermutet, dass diesen Wechselwirkungen eine zentrale Rolle bei der Bildung von DMVs zukommt (Mihelc et al., 2021). Zudem führt die Translation viraler Proteine zur Ansammlung von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen im ER, welches durch den dadurch hervorgerufenen ER-Stress eine ausgeprägte Aktivierung der UPR zur Folge hat (Fung & Liu, 2019). ER-Veränderungen sind mit Modulationen der (Makro)Autophagie, inklusive der ER-Phagie, welche regulatorische und adaptive Expansions- oder Schrumpfungsvorgänge des ER unterstützt, verknüpft, wobei (un)veröffentlichte Transkriptom- und Proteom-Daten der AG Kracht Hinweise für eine Deregulation von multiplen Komponenten dieser Prozesse in infizierten Zellen liefern. Für eine Vielzahl weiterer Viren ist eine Verbindung zu Autophagie bekannt, entweder durch Inhibition, wodurch die Degradation viraler Komponenten verhindert wird oder durch gezielte Ausnutzung sowie Umfunktionierung Autophagie-relevanter Proteine für virale Prozesse. Um die Frage zu beantworten, inwieweit Coronaviren sowohl Autophagie als auch ER-Phagie modulieren, erfolgte im folgenden Kapitel die Etablierung eines für quantitative und subzelluläre Analysen geeignetes Tandem-Reporter-Systems gefolgt von einer Validierung der erzielten Ergebnisse durch komplementäre Methoden.

4.1.1. Transiente Transfektion der Autophagie- und ER-Phagie-Reporter

Als Reportersysteme bzw. Biosensoren wurden kommerziell erhältliche, bereits publizierte lentivirale Plasmide eingesetzt, deren Funktionalität und korrekte Expression der fluoreszierenden Markerproteine zunächst überprüft wurde (Liang et al., 2018; Wulansari et al., 2021). Zu diesem Zweck wurden die Plasmide pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B für die Messung der Autophagie und TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 für die Messung der ER-Phagie verwendet und mittels Calcium-Phosphat-Transfektion in Huh7 Zellen eingebracht. Der ER-Phagie-Reporter war Tetracyclin-induzierbar, weshalb die Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) erfolgte. Zur Überprüfung der Fähigkeit der Biosensoren, die Dynamik der Autophagie zu erfassen, wurden die Zellen Hungerbedingungen (Abwesenheit von Serum und Aminosäuren) ausgesetzt, um Autophagie zu induzieren, bzw. mit dem Lysosomeninhibitor Bafilomycin A1 (1 µM, 24 h) behandelt, um Autophagie zu blockieren.

Für beide Plasmide zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie in allen Proben anhand der Fluoreszenzen von mCherry und eGFP die erwartete Expression der Reporter (Abb. 16). In der unbehandelten Kondition erschienen die Zellen in der Überlagerung der beiden Kanäle überwiegend gelb/orange. Für beide Transfektionsbedingungen konnten basal vereinzelt stärker gelb fluoreszierende Spots in der Zellkernnähe beobachtet werden, welche Autophagosomen entsprachen, während Hungern zu einer induzierten Akkumulation von roten Autolysosomen sowie einer korrespondierenden Abnahme der zytosolischen Intensität von eGFP und mCherry infolge des Reporterabbaus führte. Die Zugabe von Bafilomycin A1 war sowohl unter Basalbedingungen als auch nach Hungern mit einer Zunahme der Anzahl an Autophagosomen in den Autophagie-Reporterzellen und einer Steigerung der Gesamtfluoreszenz der ER-Phagie-Reporterzellen assoziiert.

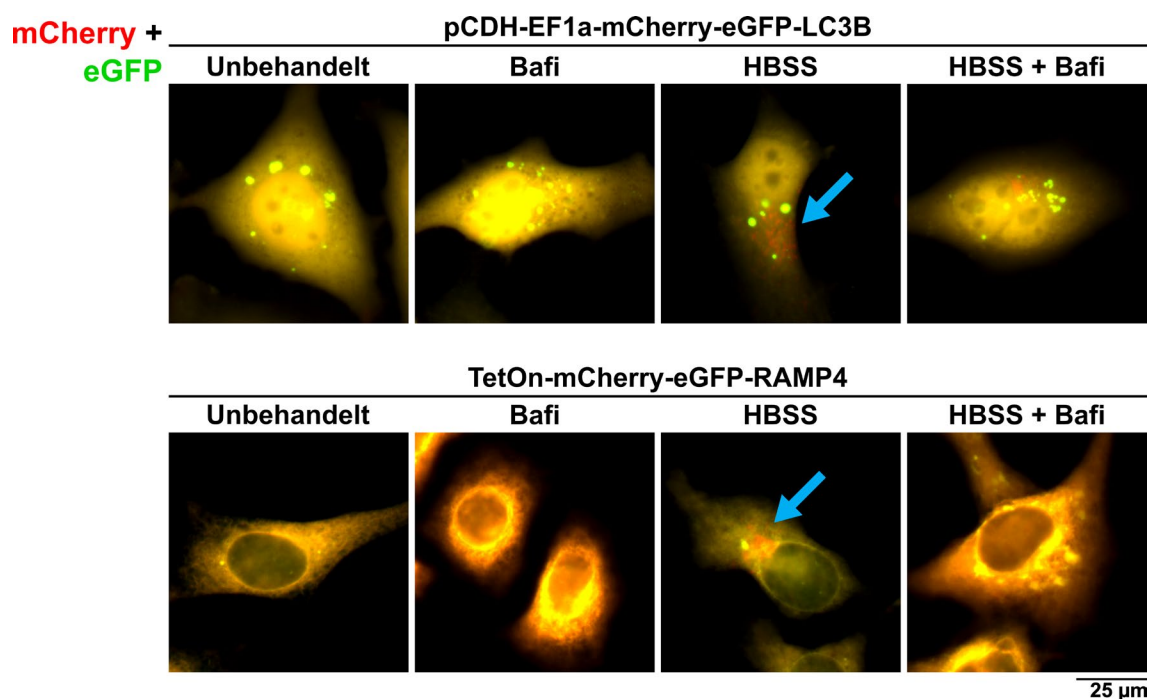


Abb. 16 Expressionsnachweis des Autophagie- und ER-Phagie-Reporters nach transienter Transfektion

Huh7 Zellen wurden mittels Calcium-Phosphat mit den Plasmiden pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B und TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 transient transfiziert. Für das letztgenannte Plasmid erfolgte die Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) bei der Aussaat. Es erfolgte die Behandlung mit Bafilomycin A1 (Bafi, 1 µM) und das Ersetzen des Mediums durch HBSS. Nach 24 h wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und in diesem durch die Fluoreszenzmikroskopie erfasst. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Die blauen Pfeile zeigen die Akkumulation von Autolysosomen als rote Strukturen an. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach.

Die Veränderungen der autophagischen Foci bestätigen in den Huh7 Zellen die vielfach in anderen Modellsystemen beschriebene Bafilomycin A1-supprimierbare Aktivierung der Autophagie und ER-Phagie. Konventionell wird Bafilomycin A1 als indirekter Fusionsinhibitor von Autolysosomen mit Konzentrationen von mehr als 0,1 µM

eingesetzt, jedoch ist die Nutzung von höheren Dosen durch zytotoxische Effekte limitiert (Yan et al., 2016). Daher war es wichtig, niedrigere Bafilomycin A1-Konzentrationen mit noch ausreichender Inhibition von Autophagie zu ermitteln. Hierzu wurden Huh7 Zellen mit dem Autophagie-Reporter transient transfiziert und mit steigenden Konzentrationen von Bafilomycin A1 (100, 500 oder 1000 nM; 24 h) behandelt, gefolgt von einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse.

Bereits bei 100 nM des Inhibitors war die vollständige Hemmung der Autophagie durch eine intensive gelbe Färbung in der Mischfluoreszenz sichtbar (Abb. 17). Zudem war primär um den Zellkern herum eine Ansammlung an stärker fluoreszierenden Spots erkennbar, welche die Akkumulation von Autophagosomen nach Fusionsinhibition der autophagischen Vesikel durch Bafilomycin A1 zeigte. Konzentrationen von 500 nM oder 1000 nM änderten diesen Effekt nicht, allerdings zeigten sich vermehrt zytopathische Effekte, als Veränderungen der Zellmorphologie sowie Bildung von Vesikeln. Daher wurde für weitere Experimente die Konzentration des Inhibitors auf 100 nM festgelegt.

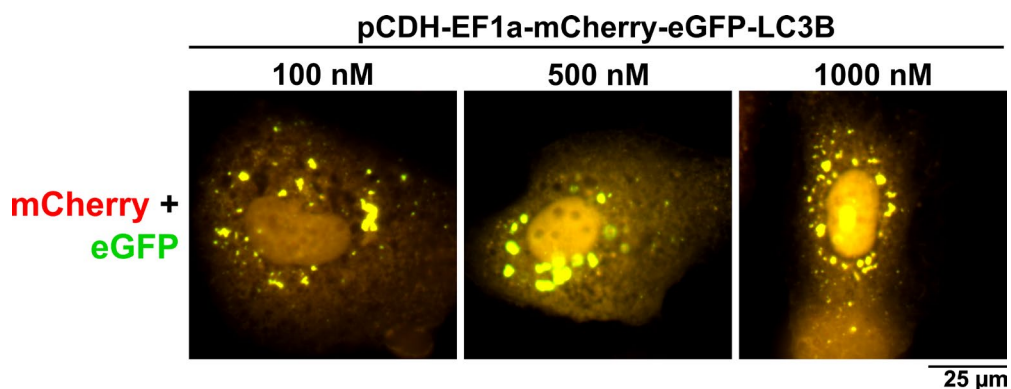


Abb. 17 Konzentrationsabhängige Inhibition der Autophagie durch Bafilomycin A1
Huh7 Zellen wurden durch Calcium-Phosphat mit dem Plasmid pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Bafilomycin A1 (100, 500 oder 1000 nM) für weitere 24 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und durch die Fluoreszenzmikroskopie erfasst. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach.

Zusätzlich wurde die korrekte Expression der fluoreszierenden Proteine durch eine Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper validiert. Hierbei wurde neben den bereits mikroskopisch untersuchten Plasmiden die Transfektion des Autophagie-Reporter FUW-mCherry-GFP-LC3 als Alternative getestet, während zur Detektion von ER-Phagie ergänzend pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4 evaluiert wurde, welcher nicht als Tandem-Reporter funktioniert, sondern über seine Degradation infolge von ER-Phagie auf Proteinebene anhand der trunkierten Proteinbanden nachgewiesen wird (Leeman et al., 2018; Liang et al., 2018). Als Kontrolle dienten die Leervektoren pcDNA 3.1 und peGFP-C1 sowie für jede Kondition eine zusätzliche Bafilomycin A1-

Behandlung (100 nM, 6 h), um die Effekte der negativen Modulation der Autophagie zu erfassen.

Gegen GFP und mCherry gerichtete Antikörper konnten die vollständig exprimierten Tandem-Reporter bei etwa 70 kDa und den ER-Phagie-Reporter mCherry-RAMP4 bei 38 kDa nachweisen (Abb. 18). Die Behandlung mit Bafilomycin A1 führte zu keinen ausgeprägten Änderungen der Proteinmengen oder -muster der Reporter. Zudem war für alle Reporter eine zweite schwächere Bande etwa 5 kDa bis 10 kDa unterhalb des vollständig exprimierten Proteins sichtbar. Die Verwendung eines LC3B- und RAMP4-Antikörpers bestätigte ebenfalls die Reporterexpression und zeigte erneut die schneller laufende Doppelbande, welche wahrscheinlich eine unvollständig translatierte Variante der überexprimierten Reporterproteine unter Erhalt der antigenen Epitope war.

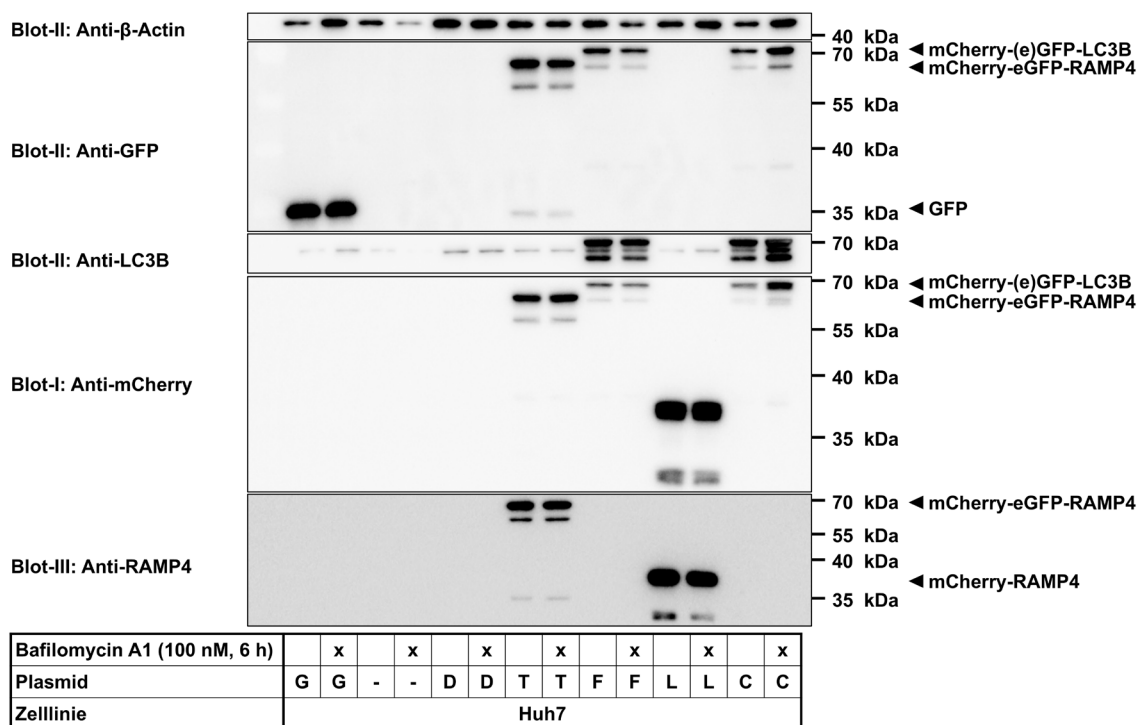


Abb. 18 Nachweis der Proteinexpression der Autophagie-/ER-Phagie-Reportersysteme
Huh7 Zellen wurden mittels Calcium-Phosphat mit den Plasmiden peGFP-C1 (G), pcDNA 3.1 (D), TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 (T), FUW-mCherry-GFP-LC3 (F), pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4 (L) oder pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B (C) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Bafilomycin A1 (100 nM, 6 h) behandelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse. Dargestellt ist ein biologisches Replikat.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle Reportersystem transient in Huh7 Zellen exprimiert werden können, und die mikroskopische Betrachtung bestätigte die Funktionalität der Tandem-Reporter durch die Bildung von sichtbaren, mit 100 nM Bafilomycin A1 hemmbaren, Autophagosomen und Autolysosomen.

4.1.2. Generierung und Optimierung von stabil transduzierten ER-Phagie-Reporterzelllinien

Die vorhergehenden Experimente der transienten Transfektion der Reporter zeigten starke Unterschiede in der Fluoreszenzintensität pro Zelle und eine erfolgreiche Expression war nur in ungefähr 30 % der Zellen nachweisbar. Daher sollte zur weiteren Verwendung des ER-Phagie-Reporters eine stabile homogene Zellpopulation generiert werden. Diese würde zukünftige Untersuchungen vereinfachen, transfectionsbedingte Stresseffekte reduzieren sowie eine höhere Vergleichbarkeit erzielter Ergebnisse und die Etablierung einer automatisierten Auswertung der Mikroskopiebilder ermöglichen. Zur Generierung stabiler Zelllinien wurden Lentiviren erzeugt und HeLa Zellen transduziert. Die erfolgreiche Doxycyclin-abhängige Expression des mCherry-eGFP-RAMP4 Reporters wurde mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen und verschiedene Konzentrationen sowie Behandlungszeiträume von Doxycyclin (0,5; 1; 2; 4 µg/ml für 24 h oder 0,5; 4 µg/ml für 48 h) überprüft.

Die Proteinvisualisierung mit gegen mCherry, GFP und RAMP4 gerichteten Antikörpern zeigte, dass in untransduzierten Zellen oder bei Ausbleiben der Doxycyclin-Behandlung keine Bildung des Reporters stattfand, welches die spezifische Aktivierung durch ein Tetracyclin-Derivat bestätigte (Abb. 19 A, B). Der Einsatz steigender Doxycyclin-Konzentrationen erhöhte die Expression des Reporters, welcher die maximale Proteinmenge bei 4 µg/ml erreichte. Des Weiteren zeigten sich nach 48 h vergleichbare Proteinmengen wie die korrespondierenden Behandlungen für 24 h. Die endogene Bildung von RAMP4 war durch die Reporterexpression und die Doxycyclin-Behandlung unbeeinflusst (Abb. 19 A). Weitergehend wurde der Autophagie-Marker LC3B betrachtet, welcher keine Veränderungen in den verschiedenen Konditionen zeigte. Hiermit konnten Nebeneffekte auf Autophagie durch die Transduktion des ER-Phagie-Reporters und den Einsatz von Doxycyclin ausgeschlossen werden.

Aufgrund der höchsten gemessenen Proteinmenge bei einer Behandlung mit 4 µg/ml Doxycyclin, wurde diese als Standard für alle folgenden Experimente festgelegt. Zudem konnte eine Behandlungsdauer von 48 h definiert werden, welche die zeitversetzte Zugabe von beispielsweise Bafilomycin A1 oder eine 24-stündige Infektion mit HCoV-229E ermöglichte.

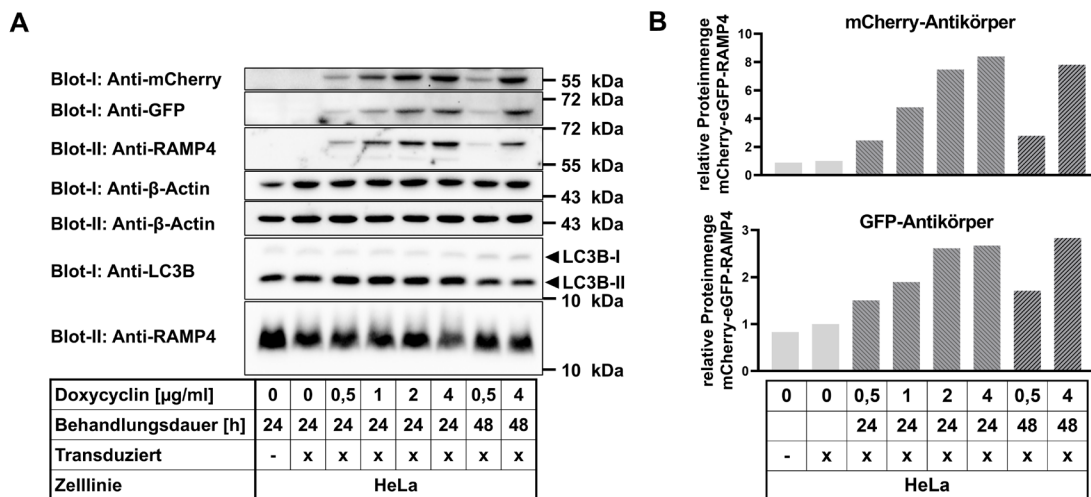


Abb. 19 Optimierung der Dosis- und Behandlungsdauer für die Doxycyclin-abhängige Aktivierung des ER-Phagie-Reporters

(A) HeLa Zellen wurden lentiviral mit dem ER-Phagie-Reporter TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 transduziert. Es erfolgte die Zugabe von Doxycyclin (0,5; 1; 2; 4 µg/ml für 24 h oder 0,5; 4 µg/ml für 48 h). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse. (B) Die relative Quantifizierung des Reporterkonstrukts nach der Detektion mit einem mCherry- oder GFP-Antikörper erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die transduzierte, unbehandelte Probe. Dargestellt ist ein biologisches Replikat.

Im nächsten Schritt erfolgte der Nachweis der stabilen Expression und der Funktionalität der lentiviral transduzierten HeLa Zellen nach Doxycyclin-Aktivierung (4 µg/ml) und nachfolgender Behandlung mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) oder Hungerbedingungen (16 h) mittels eines Live-Cell-Imagings am Fluoreszenzmikroskop. Die Betrachtung der Zellen ohne Doxycyclin-Behandlung oder ohne Transduktion des Reporters zeigte kein Fluoreszenzsignal (Abb. 20). Dies bestätigte die spezifische Induktion der Expression und ein geringes Hintergrundsignal. Infolge der Tetracyclin-abhängigen Aktivierung des Reporters waren starke Unterschiede für die Signale von mCherry und eGFP innerhalb der Zellpopulation zu sehen und die relative Fluoreszenzstärke von mCherry gegenüber eGFP zeigte Schwankungen. Darüber hinaus betrug die Transduktionseffizienz ungefähr 10 %, welche für eine lentivirale Transduktion von HeLa Zellen unerwartet niedrig war. Die Behandlung mit Bafilomycin A1 zeigte optisch ein stärkeres eGFP- und mCherry-Signal, jedoch waren keine Autophagosomen differenzierbar. Die Applikation von Hungerbedingungen erzeugte in einigen Zellen Autolysosomen-Anreicherungen. Ein wichtiger Aspekt war die Durchführung der Quantifizierung zur Interpretation der ER-Phagie, welche aufgrund der Heterogenität der Fluoreszenzsignale nicht möglich war. Ergänzend erfolgte analog die Transduktion und Analyse von Huh7 Zellen, welche allerdings keine Reporterexpression zeigten (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt).

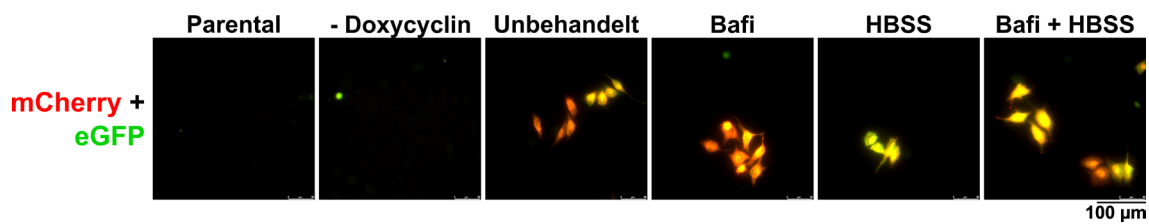


Abb. 20 Nachweis der stabilen Expression des ER-Phagie-Reporters in HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden lentiviral mit dem ER-Phagie-Reporter TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 transduziert. Mit Ausnahme von parental Zellen und der Doxycyclin-negativ Kontrolle erfolgte die Zugabe von Doxycyclin bei der Aussaat der Zellen mit 4 µg/ml. Nach 24 h wurden die Zellen mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) behandelt und/oder gehungert (HBSS 16 h). Die Zellen wurden in HBSS gewaschen und durch eine Fluoreszenzmikroskopie erfasst. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 100 µm. Vergrößerung: 400-fach

In Anbetracht dessen, dass die auf Tandem-Reporter-Systemen beruhenden Aussagen eine genaue Quantifizierung von zum Teil marginalen Unterschieden in der subzellulären Fluoreszenzintensität erfordern, war es notwendig, die Zellpopulation zu vereinheitlichen. Das Ziel war es in unbehandelten Zellen eine vergleichbare Intensität von mCherry und eGFP zu erhalten und eine Transduktionseffizienz von mehr als 90 % zu erreichen. Eine Limitation des Reporters war die fehlende Antibiotikaresistenz des lentiviralen Vektors, welche eine fluoreszenzbasierte Selektion erforderlich machte. In diesem Kontext erfolgte die Anwendung einer Durchflusszytometrie mit der Charakterisierung und Auswahl der Zellen anhand des mCherry- und eGFP-Signals.

Der Ablauf des Experimentes ist in Abb. 21 schematisch dargestellt. Zunächst wurden Lentiviren erzeugt, geerntet und in verschiedene Zelllinien (Huh7, HeLa und A549) transduziert. Die Zellen wurden kultiviert und die Reporterexpression in einer Kontrollschale mit Doxycyclin-Zugabe fünf Tage nach der Transduktion mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Überstände der Zellen auf das Vorhandensein von lentiviralen RNA-Komponenten getestet, um die theoretische Möglichkeit der Rekombination und Entstehung replikationskompetenter Viren auszuschließen. Bei negativem Befund wurde die biologische Sicherheitsstufe 2 der Zelllinien auf die Sicherheitsstufe 1 reduziert. Die Zellsortierung wurde nach Aktivierung der Reporterexpression mit Doxycyclin (4 µg/ml, 24 h) durch die FACS-Facility der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Susanne Herold an einem BD FACSAria Gerät durchgeführt. Mittels einer Zellauswahlstrategie wurden vitale Zellen mit einem vergleichbaren mCherry- und eGFP-Fluoreszenzsignal isoliert. Die Durchführung war für HeLa und A549 Zellen erfolgreich, jedoch war aufgrund eines fehlenden Fluoreszenzsignals die Zellsortierung von Huh7 Zellen nicht möglich.

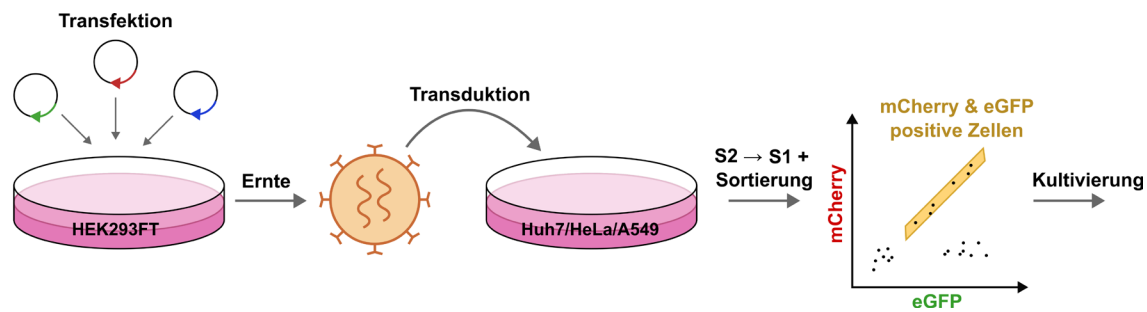


Abb. 21 Generierung von stabilen Zelllinien mit homogener Expression des ER-Phagie-Reporters mittels Zellsortierung

HEK293FT Zellen wurden mit dem ER-Phagie-Reporter TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 und den Helferplasmiden psPAX2 sowie pMD2.G transfiziert. Die Lentiviren wurden geerntet und in Huh7, HeLa oder A549 Zellen transduziert. Sieben Tage nach Transduktion wurden die Zellen mittels eines BD FACSAria Gerätes sortiert. Zellen mit einer ähnlichen Fluoreszenzintensität von mCherry und eGFP wurden isoliert und anschließend weiter kultiviert.

Nachfolgend wurden die sortierten HeLa Zellen funktionell überprüft sowie eine Quantifizierungsstrategie der Fluoreszenzsignale etabliert. Hierzu wurde die Expression der Reporter mit Doxycyclin (4 µg/ml) aktiviert. Sodann erfolgte die Behandlung mit Bafilomycin A1 (100 nM) oder die Induktion von klassischen Autophagiebedingungen durch Hungern für 16 h. Als Kontrollen wurden parentale Zellen verwendet oder Konditionen ohne Doxycyclin analysiert. Die Erfassung der Reportersignale erfolgte durch ein Live-Cell-Imaging am Fluoreszenzmikroskop.

Nach der Doxycyclin-Zugabe war eine Reporterexpression in über 90 % der Zellen nachweisbar und die Fluoreszenzsignale von mCherry und eGFP erschienen visuell deutlich homogener als vor der Sortierung (Abb. 22 A). In unbehandelten Zellen war eine gleichmäßige Intensität von eGFP und mCherry sowie keine Bildung von autophagischen Vesikeln sichtbar. Die Zugabe von Bafilomycin A1 erhöhte die Signalstärke von eGFP, welche in den überlagerten Bildern in einer grüneren Erscheinung der Zellen resultierte. Durch Hungern kam es zur Bildung von Autolysosomen in der Nähe des Zellkerns. Eine zusätzliche Behandlung der gehungerten Zellen mit Bafilomycin A1 zeigte optisch ein stärkeres Signal der Fluoreszenzen.

Zum Zweck der unabhängigen Analyse der Zellen wurde eine Auswertestrategie implementiert, welche mittels der Programme Cellpose, ImageJ/Fiji, Cellprofiler und Excel die mittlere zelluläre Intensität der Fluoreszenzsignale sowie die Anzahl an Autolysosomen pro Zelle vermessen konnte. Die Quantifizierung des mCherry/eGFP-Verhältnisses sollte Aufschluss über die Aktivierung von ER-Phagie bringen, wobei bei aktivierter ER-Phagie das Grünfluoreszenzsignal in den sauren Lysosomen unterdrückt wird und es zu einer Rotverschiebung in den Zellen kommt. Der

Vergleich von unbehandelten Zellen und der Bafilomycin A1-Zugabe zeigte keinen Unterschied, welches als niedriger basaler Level an ER-Phagie interpretiert wurde (Abb. 22 B, C). Unter Hungerbedingungen wurde durch die erwartete Bildung von Autolysosomen das Verhältnis der Fluoreszenzen in Richtung von mCherry verschoben. Eine zusätzliche Behandlung der gehungerten Zellen mit Bafilomycin A1 zeigte allerdings keine weiteren Effekte. Folglich war die Blockade der ER-Phagie mit Bafilomycin A1 beeinträchtigt.

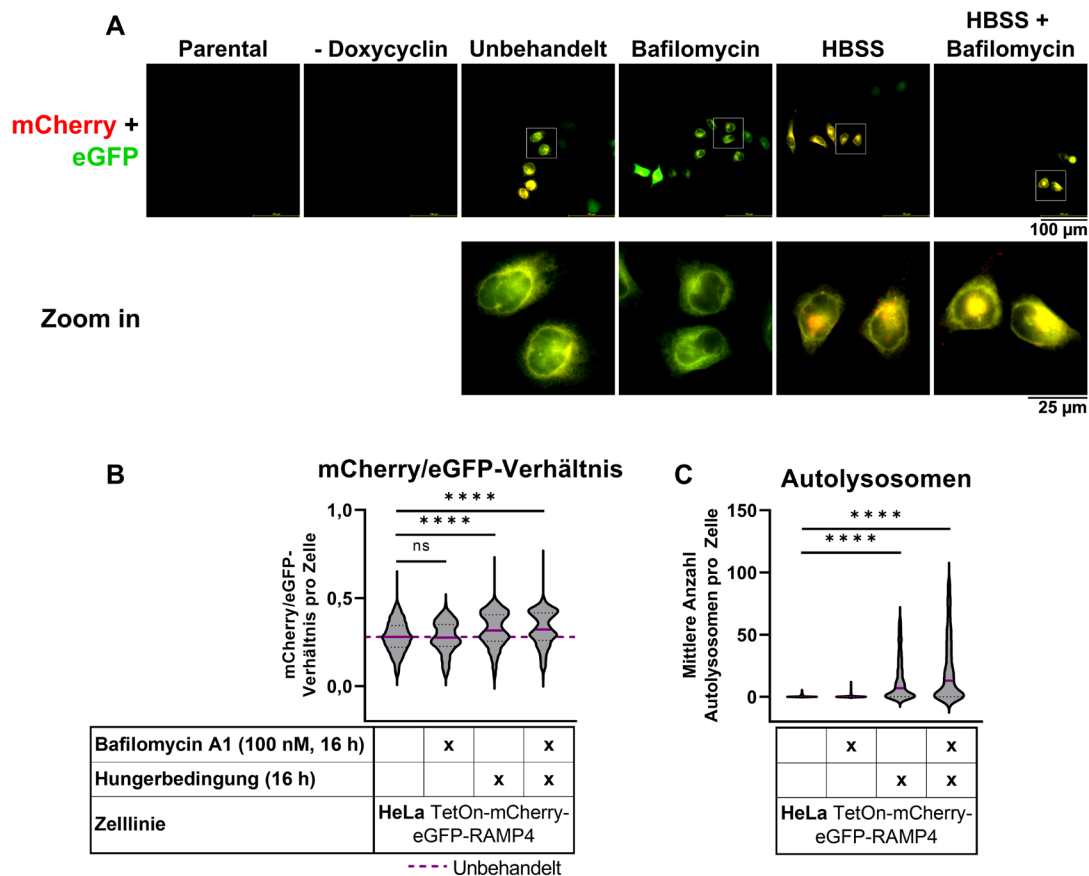


Abb. 22 Funktionelle Charakterisierung des ER-Phagie-Reportersystems auf subzellulärer Ebene nach der Sortierung stabiler Zelllinien

(A) Mit TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 transduzierte HeLa Zellen wurden nach der Zellsortierung mit Doxycyclin (4 μ g/ml) behandelt, um die Reporterexpression zu induzieren. Nach 24 h wurden die Zelllinien mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) behandelt und/oder Hungerkonditionen (HBSS, 16 h) ausgesetzt. Die Erfassung der Fluoreszenzsignale erfolgte durch Live-Cell-Imaging am Fluoreszenzmikroskop. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 100/25 μ m. Vergrößerung: 400-fach. (B) Die Quantifizierung des zellulären mittleren mCherry/eGFP-Verhältnisses erfolgte durch Cellpose und ImageJ/Fiji für drei zusammengeführte unabhängige biologische Replikate (248 bis 1213 Zellen pro Behandlung). (C) Die Zählung der Autolysosomen pro Zelle wurde mit Cellpose, Cellprofiler und Excel durchgeführt. Zur Darstellung der Violindiagramme wurden Ausreißer durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA (ns (nicht-signifikant) $p > 0,05$; **** $p \leq 0,0001$).

Zusammenfassend erzeugte die Zellsortierung eine deutlich homogenere Zellpopulation, welche mikroskopisch genauer ausgewertet werden konnte. Die Etablierung einer

Analysestrategie ermöglichte die Quantifizierung der Rotverschiebung auf der Ebene ganzer Zellen sowie der Bildung einzelner Autolysosomen auf subzellulärer Ebene. Anhand von Hungerkonditionen als Positivkontrolle konnte der Assay validiert werden, jedoch fand eine unzureichende Hemmung der ER-Phagie durch Bafilomycin A1 statt.

Zusätzlich zur mikroskopischen Erfassung sollte eine orthogonale Methode genutzt werden, um die Funktion des Reporters, insbesondere im Hinblick auf die Inhibition durch Bafilomycin A1, zu validieren. Vor diesem Hintergrund erfolgte die Messung der Gesamtzellfluoreszenz mittels Durchflusszytometrie. Der Vorteil dieser Methode liegt in der schnellen unabhängigen Erfassung einer Vielzahl an Zellen und der gleichzeitigen Vermessung von Änderungen des mCherry/eGFP-Verhältnisses, zur Beurteilung der ER-phagischen Aktivität. Mit der Unterstützung der FACS-Facility der AG Herold wurde eine Zellauswahlstrategie entwickelt, welche tote und amorphe Zellen sowie Aggregate und Fremdpartikel vor der eigentlichen Analyse entfernte. Die Durchführung der Messung ist schematisch in Abb. 23 dargestellt. Hierzu wurden lentiviral transduzierte und sortierte HeLa Zellen mit Doxycyclin (4 µg/ml) behandelt. Es erfolgte die Behandlung mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) oder mit Hungerbedingungen (16 h). Die Zellen wurden trypsinisiert und im BD LSRFortessa erfasst. In diesem Zusammenhang wurden basierend auf der Intensität von eGFP und mCherry Zellauswahlbereiche gesetzt, welche ER-phagisch aktive Zellen anhand einer Rotverschiebung separat von durch einen zweiten Bereich markierten inaktiven Zellen quantifiziert.

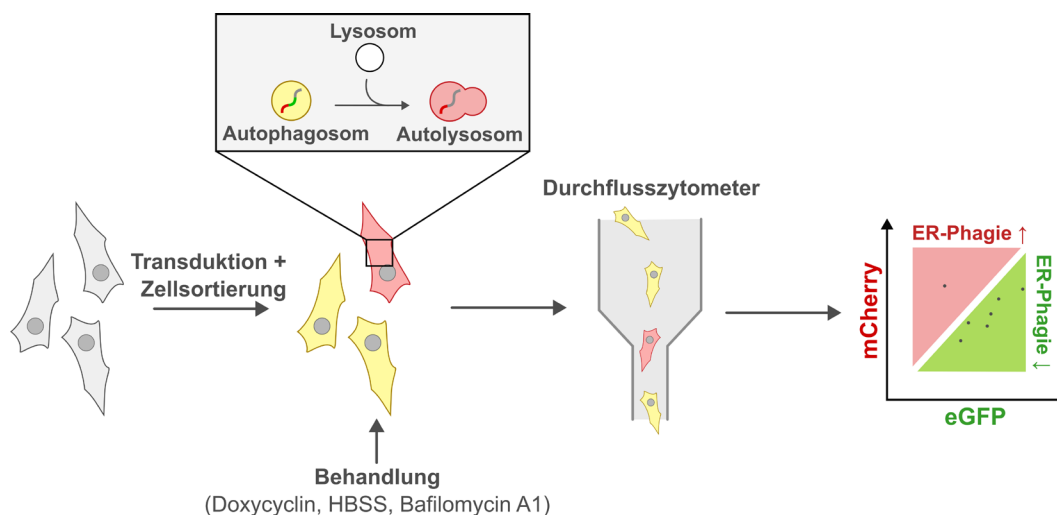


Abb. 23 Quantifizierung von Reporterzelllinien am Durchflusszytometer

Schematische Darstellung der Vermessung von Reporterzelllinien am Durchflusszytometer. Zellen wurden mit einem Tandem-Reporter transduziert und sortiert. Die Mischfluoreszenz der Fluorophore erzeugte eine gelbe Färbung der Zellen. Es erfolgte die Behandlung mit Doxycyclin, Bafilomycin A1 oder Hungerbedingungen (HBSS). Infolge der Aktivierung von ER-Phagie kam es zur Formation von Autolysosomen und dem quenchenden des GFP-Signals, welches zu einer Rotfärbung der Zellen führte. Die Vermessung der Fluoreszenzänderungen erfolgte am

Durchflusszytometer BD LSRFortessa und Zellen wurden anhand ihres mCherry/eGFP-Signals als ER-phagisch aktiv bzw. inaktiv eingestuft.

Die Betrachtung der Konturplots zeigte die geringe Autofluoreszenz von parentalen Zellen sowie das Fehlen von Signalen in der Abwesenheit von Doxycyclin, welches die transkriptionelle Steuerbarkeit des konditionell exprimierten Reporters validiert (Abb. 24 A). Nach Tetracyclin-Behandlung exprimierte der Großteil der Zellen den Reporter und wurde durch einen der beiden gesetzten Zellauswahlbereiche erfasst. Auffällig war, dass ein Teil der Zellen ausschließlich eGFP bildete. Die Ursache hierfür war unbekannt, jedoch wurden diese Zellen aus der weiteren Quantifizierung ausgeschlossen. Unter Hungerbedingungen war optisch eine leichte Zunahme an ER-phagisch aktiven Zellen zu beobachten. Die Quantifizierung des Anteils an Zellen mit Rotverschiebung zeigte für unbehandelte und Bafilomycin A1 behandelte Zellen ein niedriges Level an ER-Phagie (Abb. 24 B). Infolge des Nährstoffmangel nach Hungern kam es zur Aktivierung von ER-Phagie in 3,19 % der Zellen, welches einem 3-fachen Anstieg gegenüber unbehandelten Zellen entsprach. Die Bafilomycin A1-Zugabe zu den gehungerten Zellen senkte die Aktivierung partiell auf 2,09 %.

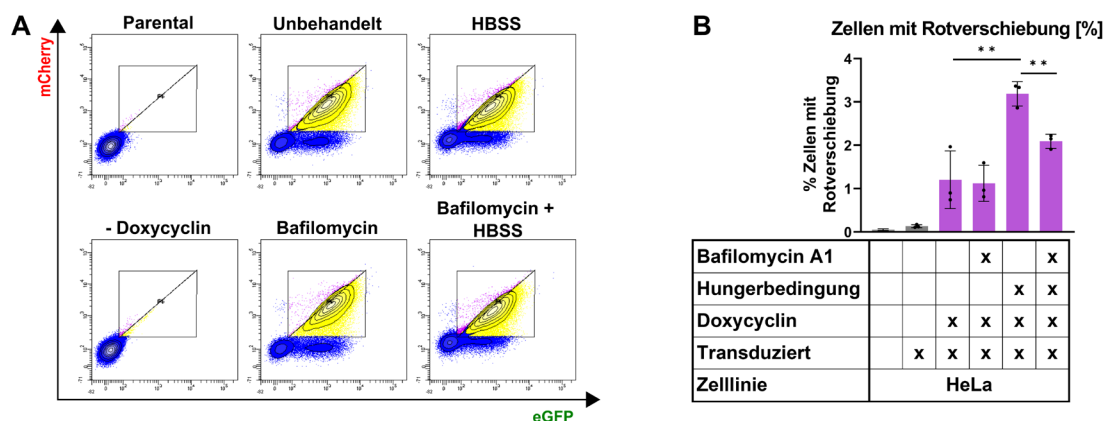


Abb. 24 Implementierung der durchflusszytometrischen Analyse des ER-Phagie-Reporters (A) Die Expression von TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 in stabil transduzierten und sortierten HeLa Zellen wurden mit 4 µg/ml Doxycyclin induziert. Sodann erfolgte die Behandlung mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) und/oder Hungerbedingungen (16 h). Die Zellen wurden trypsinisiert und am BD LSRFortessa der AG Herold durch eine individuell etablierte Zellauswahlstrategie vermessen. Dargestellt sind repräsentative Konturplots für ein biologisches Replikat mit 10.000 gemessenen Zellen pro Behandlung. ER-phagisch aktive Zellen sind im Auswahlbereich als lila, inaktive Zellen als gelb gekennzeichnet. (B) Gezeigt sind die gemittelten relativen Änderungen des Anteils an Zellen mit Rotverschiebung ± SD (Standardabweichung), d.h Zellen mit aktiver ER-Phagie, aus drei biologischen Replikaten. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (** $p \leq 0,01$).

Zusammenfassend konnte für den ER-Phagie-Reporter TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 eine homogene Zellpopulation in HeLa Zellen erzeugt werden, welche durch zwei orthogonale Methoden zur Erfassung des Reporters validiert wurde. Hierbei zeigte sich

unter klassischen Hungerbedingungen eine Aktivierung von ER-Phagie in einem kleinen Teil der Zellen. Dieser Effekt war allerdings je nach verwendeter Methode nicht oder nur sehr gering durch Bafilomycin A1 revertierbar.

4.1.3. Indirekte Erfassung von ER-Phagie über die Reporterdegradation

Eine Studie von Liang et al. (2018) demonstriert neben der Messung von ER-Phagie über Fluoreszenzveränderungen von geeigneten Reportermolekülen eine ergänzende Analyse durch die Nutzung des Expressionsvektors pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4. In diesem Zusammenhang wird das Konstrukt mCherry-RAMP4 durch die Aktivierung von ER-Phagie in Autolysosomen zu RAMP4 und mCherry gespalten. Anschließend kann das mCherry-Fragment mittels einer Proteindetektion vermessen werden und bietet damit die Möglichkeit einer indirekten Quantifizierung des ER-Phagieprozesses durch eine weitere komplementäre Methode.

Hierzu wurden HeLa und Huh7 Zellen lentiviral mit pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4 transduziert. Die Zellen wurden fünf Tage kultiviert, wie vorhergegangen behandelt und die extrahierten Proteine aus Ganzzellextrakten mittels Western-Blot analysiert (Abb. 25 A). Der Antikörper-basierte Nachweis von mCherry und RAMP4 spezifischen Proteinbanden bei 38 kDa zeigte die erfolgreiche Transduktion des Reporters in beiden Zelllinien. Die gegenüber Huh7 Zellen stärkere Expression in HeLa Zellen deutete auf eine unterschiedliche Transduktionseffizienz hin. Bei etwa 25 kDa konnte mit beiden Antikörpern eine weitere Bande detektiert werden die Epitope für beide Antikörper besaß und daher als ein Spaltprodukt des Reporters interpretiert wurde, welches nicht dem für die Auswertung notwendigen mCherry-Einzelfragment entsprach. Ferner änderten sich sowohl die Gesamtproteinmengen des Reporters als auch des Spaltproduktes durch Hungerbedingungen oder die Behandlung mit Bafilomycin A1 nicht und die Quantifizierung zeigte keine weiteren behandlungsabhängigen Unterschiede, wodurch eine Vermessung der ER-Phagie nicht möglich war (Abb. 25 B). Die Proteinmenge des endogenen RAMP4 war durch die Reporterexpression unverändert, jedoch zeigte sich ein Abbau des Proteins nach Hungern, welcher Autophagie-unabhängig war, da keine Blockade dieses Effekts mit Bafilomycin A1 möglich war (Abb. 25 A). Zur weiteren Validierung wurde der mCherry-RAMP4-Reporter in HCT116 Zellen untersucht, welche in der Originalpublikation verwendet wurden, jedoch zeigte sich ein weitestgehend identisches Bild im Vergleich zu Huh7 und HeLa Zellen (Abb. Anhang 1).

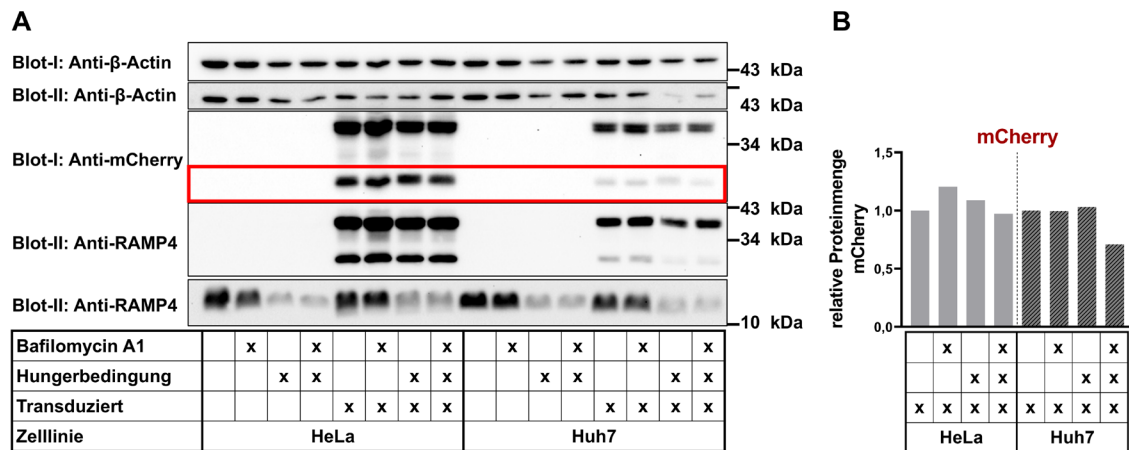


Abb. 25 Evaluierung des ER-Phagie-Reporters pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4 in HeLa und Huh7 Zellen

(A) HeLa und Huh7 Zellen wurden lentiviral mit pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4 transduziert und mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) und/oder HBSS (16 h) behandelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse. (B) Die relative Quantifizierung des mCherry-Einzelfragmentes (in Rot hervorgehoben) erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die transduzierte, unbehandelte Probe der jeweiligen Zelllinie. Dargestellt ist ein Einzelexperiment.

Aufgrund der aufgezeigten Problematik wurde als Alternative zur Etablierung eines Degradationsassays mit dem Tandem-Reporter TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 weiterverfahren, welcher in zuvor durchgeführten, hier nicht gezeigten, Western-Blot-Analysen ein ähnliches Abbauverhalten zeigte, wie es in der Originalpublikation für das Konstrukt mCherry-RAMP4 beschrieben wurde. Die Expression in lentiviral transduzierten, sortierten HeLa Zellen wurde durch Doxycyclin (4 µg/ml) induziert und mit den Kontrollbehandlungen des vorhergehenden Experimentes weiterverfahren. Zur Proteindetektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

Mittels gegen mCherry, GFP und RAMP4 gerichteten Antikörpern wurde die Doxycyclin-abhängige Expression des Reporters mit einem Molekulargewicht von 70 kDa validiert (Abb. 26 A). Die Behandlung mit Bafilomycin A1 erhöhte leicht die Proteinmenge des Tandem-Reporters, während Hungerbedingungen zu einer Reduktion führten. Zudem wurde bei 30 kDa ein Fragment des Reporters erfasst, welches exklusiv durch den mCherry-Antikörper detektiert wurde, dessen Intensität infolge von Hungern zunahm, wohingegen Bafilomycin A1 die Bildung inhibierte (Abb. 26 A, B). Die Behandlung mit DMSO hatte keinen Einfluss auf die Fragmentierung des Reporters. Demnach konnte bestätigt werden, dass die Degradation des von RAMP4 abgeleiteten Reporters ER-Phagie-abhängig stattfand und damit eine weitere Methode zur Messung der ER-Phagie darstellt.

Die endogenen Level für RAMP4 waren durch die Transduktion des Reporters unverändert und wurden durch Hungerbedingungen erniedrigt, jedoch konnte der lysosomale Inhibitor Bafilomycin A1 diesen Abbau erneut nicht verhindern (Abb. 26 B). Weitere Untersuchung durch Hinzunahme des Proteasom-Inhibitors MG-132 zeigten, dass die hungerstressbedingte Abnahme der Proteinmenge weder durch Autophagie noch das ERAD-assoziierte Proteasom, sondern über unbekannte Abbauprozesse erfolgte (Abb. Anhang 2). Die Proteinmengen der Autophagie-Marker LC3B-I und LC3B-II wurden durch Bafilomycin A1 erhöht (Abb. 26 B). Durch Hungern kam es dagegen zu einem Abbau, welcher durch eine Bafilomycin A1-Behandlung blockiert wurde. Dies zeigte, dass die Transduktion des Reporters zu keiner Veränderung der physiologischen Synthese von RAMP4 und der unspezifischen Autophagie führte.

Zusammenfassend konnte damit eine weitere Methode zur Erfassung der ER-Phagie etabliert werden, welche auf der Degradation des Reporters basierte. Nachteilig gegenüber den bereits dargestellten Methoden war, dass keine einzelzellbasierte Messung möglich war. Somit bietet die Western-Blot-basierte Analyse eine komplementäre Erfassung der ER-Phagie.

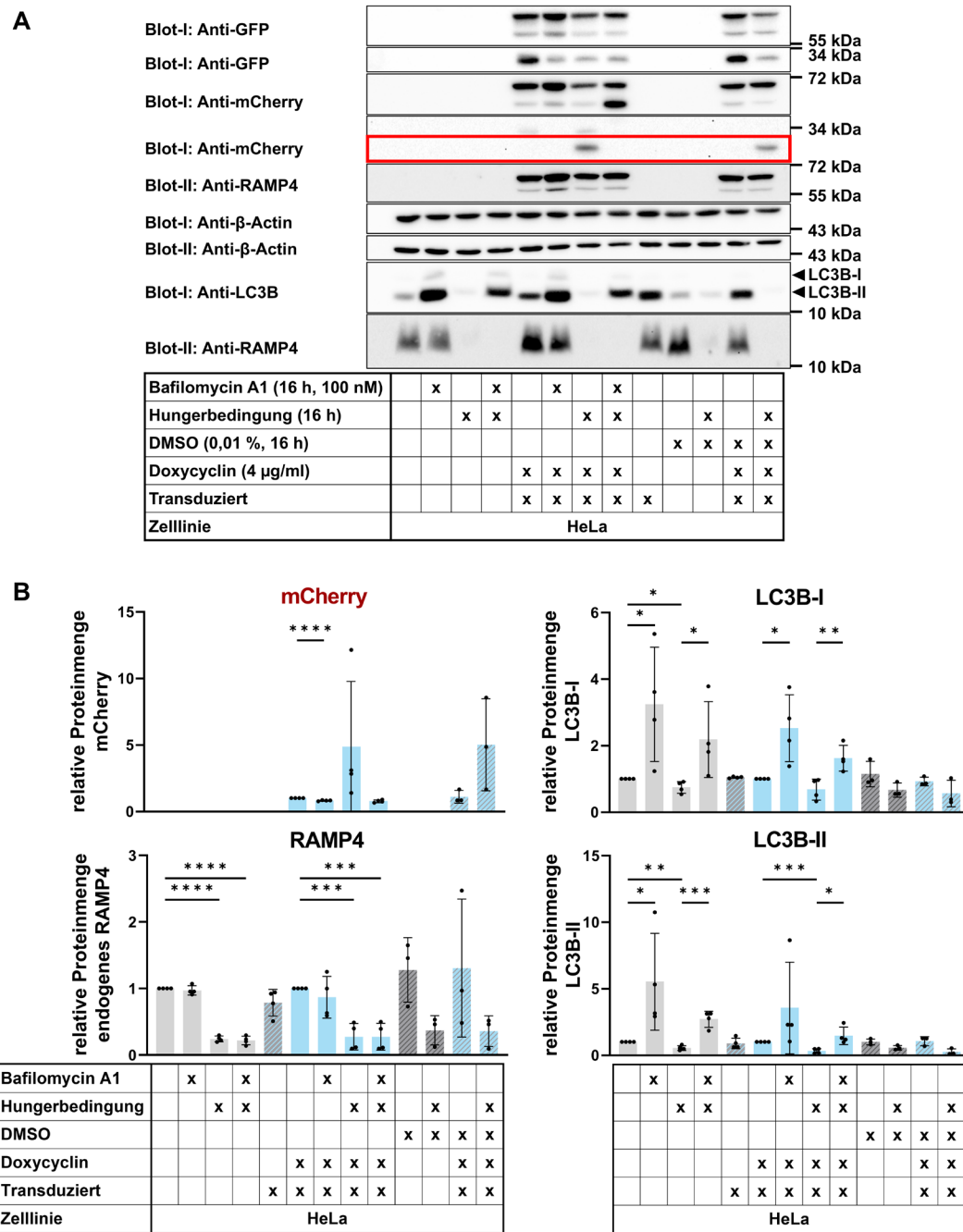


Abb. 26 Etablierung eines Degradationsassays für den ER-Phagie-Reporter TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4

(A) Parentale und mit TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4 transduzierte, sortierte HeLa Zellen wurden mit 4 µg/ml Doxycyclin behandelt, um die Expression des Reporters zu induzieren. Nach 24 h wurde Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h), HBSS (16 h) und/oder DMSO (0,01 %, 16 h) hinzugegeben. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. (B) Die relative Quantifizierung von drei bis vier biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die transduzierte, unbehandelte Probe. In Rot ist das mCherry-Einzelfragment hervorgehoben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

4.1.4. Charakterisierung von stabil transduzierten Autophagie-Reporterzelllinien

Die transiente Transfektion des Autophagie-Reporters zeigte eine starke zelluläre Heterogenität, welche die Quantifizierung mittels Fluoreszenzmikroskopie erschwerte. Folglich war es von Bedeutung, analog zu dem ER-Phagie-Reportersystem, stabile Zelllinien zu generieren und diese sorgfältig funktionell zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde die lentivirale Transduktion des Autophagie-Reporter pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B in HeLa und Huh7 Zellen mit dem Ziel der Erzeugung homogener Zellpopulationen durchgeführt. Nach sieben Tagen war die stabile Expression der Fluorophore mikroskopisch zu beobachten, und die vollständige Bildung des Reporters wurde zunächst auf Western-Blot-Ebene nachgewiesen. Zusätzlich war zu untersuchen, ob der Degradationsassay, welche für den ER-Phagie-Reporter etabliert wurde, hier ebenso angewendet werden kann. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in vorherigen Experimenten beschrieben mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) und/oder Hungerbedingungen (HBSS, 16 h). Die Zellen wurden geerntet und die Proteindetektion via Western-Blot durchgeführt.

Analysen mit GFP-, mCherry- und LC3B-Antikörpern bestätigten die vollständige Expression des Reporters in beiden Zelllinien mit einem Molekulargewicht von 70 kDa (Abb. 27 A). Infolge der Bafilomycin A1-Zugabe kam es zu einer Zunahme der Proteinmenge des Reporters, während Hungerbedingungen in HeLa Zellen, jedoch nicht in Huh7 Zellen, zu einer Abnahme führten (Abb. 27 C). Des Weiteren visualisierte der mCherry-Antikörper bei 30 kDa eine Bande, welche nicht mit anderen Antikörpern detektierbar war (Abb. 27 A). Demnach handelte es sich um ein mCherry-Fragment, welches in Autolysosomen vom Reporter-Konstrukt abgespalten wurde und eine Induktion von Autophagieprozessen repräsentiert (Abb. 27 B). Dies wurde durch die Intensitätsänderungen nach Bafilomycin A1-Behandlung oder Hungern bestätigt (Abb. 27 C). Somit konnte die Western-Blot-Analyse die vollständige und stabile Expression des Reporters in zwei Zelllinien nachweisen und die Erfassung von Autophagie über die Degradation des Tandem-Reporters bestätigt werden.

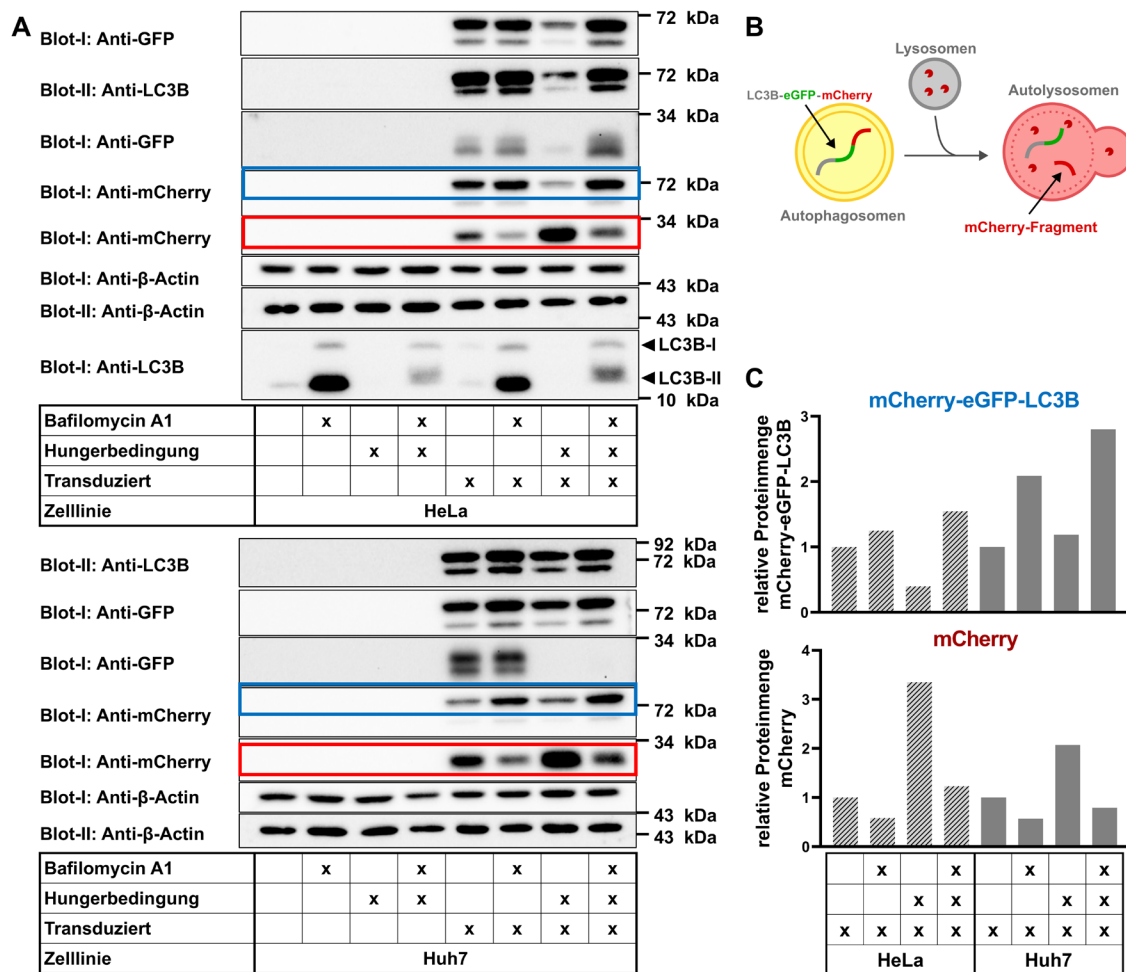


Abb. 27 Nachweis der stabilen Expression des Autophagie-Reporters

(A) HeLa und Huh7 Zellen wurden lentiviral mit pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduziert und mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) und/oder HBSS (16 h) behandelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. (B) Schematische Darstellung der mCherry-Fragmentbildung: Der Autophagie-Reporter wird infolge der Aktivierung von Autophagie in Autophagosomen eingelagert, in denen er nach Fusion mit Lysosomen zu Autolysosomen enzymatisch gespalten wird. Das entstandene mCherry-Fragment kann durch die Western-Blot-Methode detektiert werden. (C) Die relative Quantifizierung über den mCherry-Antikörper des Reporters (Blau) oder des mCherry-Einzelfragments (Rot) erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die transduzierte, unbehandelte Probe der jeweiligen Zelllinie. Dargestellt ist ein biologisches Replikat.

Weiterführend sollte die Erfassung mittels Durchflusszytometrie erfolgen, um eine einzelzellbasierte Analyse zu ermöglichen. Die HeLa und Huh7 Reporterzellen wurden entsprechend der vorhergegangenen Western-Blot-Analyse behandelt und im BD LSRFortessa vermessen. Analog zu der zuvor für den ER-Phagie-Reporter etablierten Zellauswahlstrategie konnten tote und amorphe Zellen sowie Aggregate und Artefakte aus der Messung entfernt und die Auswahlbereiche zur Bestimmung der Aktivierung oder Repression von Autophagie über die Rotverschiebung der Zellen für den Reporter angepasst werden.

Die Kontourplots zeigten für parentale Zellen eine geringe Autofluoreszenz, welche außerhalb der gesetzten Auswahlbereiche lag (Abb. 28 A). Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für mCherry und eGFP war in unbehandelten Zellen vergleichbar. Im Gegensatz zu der Erfassung von ER-Phagie-Reporterzellen besaß nur eine geringe Anzahl an Zellen eine ausschließliche Bildung von eGFP, welches eine stabile Expression des Reporters nachweist. Die Quantifizierung zeigte eine geringe basale Autophagieaktivität, da nur 6,78 % (Huh7) und 3,57 % (HeLa) der unbehandelten Zellen eine Rotverschiebung aufwiesen (Abb. 28 B). Die Stressinduktion durch Hungern führt zu einem erhöhten autophagischen Flux in 64,55 % (Huh7) bzw. 52,97 % (HeLa) der Zellen, welcher durch die Zugabe von Bafilomycin A1 vollständig blockiert wurde. Weitergehend wurden die mittleren Intensitäten für mCherry und eGFP in transduzierten Zellen gemessen, wobei eine leichte Zunahme nach Bafilomycin A1-Behandlung und eine Reduktion durch Hungern stattfand (Abb. 28 C). Somit wurde für das pH-stabile mCherry ein Abbau des Reporters infolge der Autophagie-Aktivierung erfasst, während die stärker ausfallenden Intensitätsschwankungen von eGFP neben dem Abbau des Reporters, auch das *quenchen* des Fluoreszenzsignales in Autolysosomen zeigten.

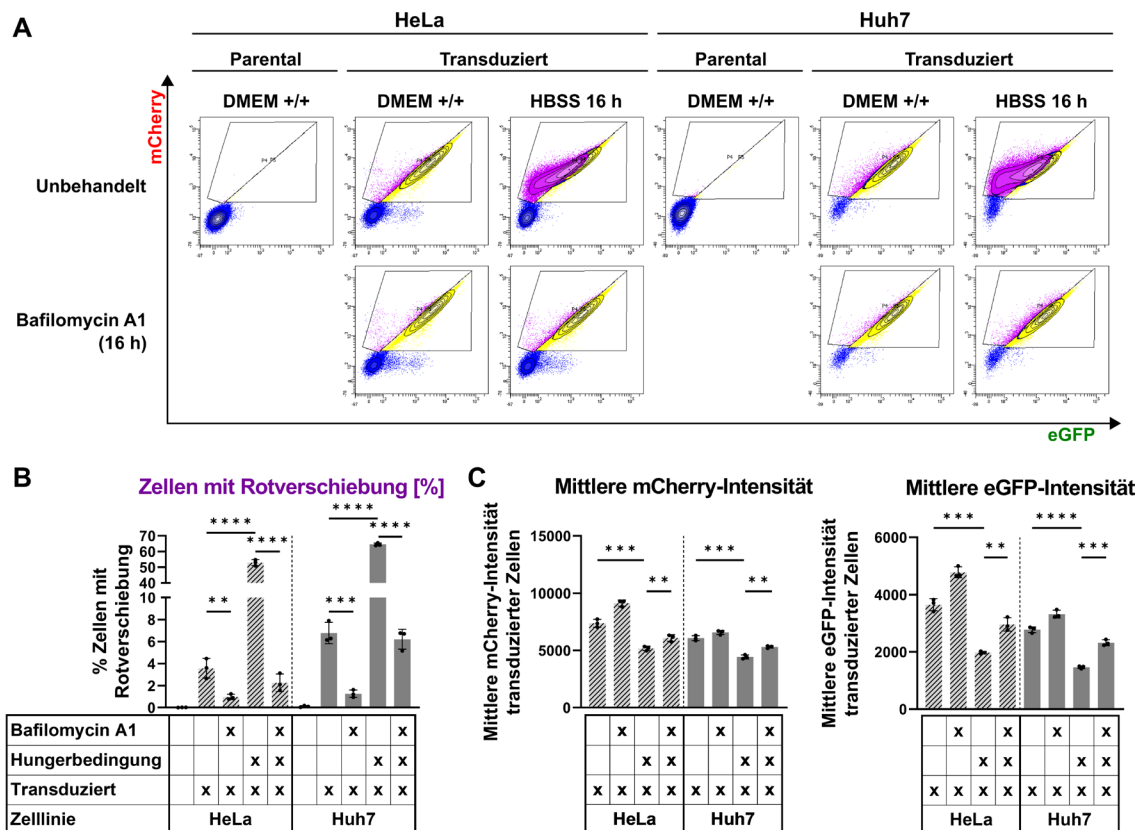


Abb. 28 Etablierung der Durchflusszytometrie-basierten Messung des Autophagie-Reporters

(A) HeLa und Huh7 Zellen wurden lentiviral mit pCDH-EF1a-mCherry-eGFP-LC3B transduziert und mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) und/oder HBSS (16 h) behandelt. Pro Behandlung wurden

*10.000 Zellen im BD LSRFortessa vermessen. Die Zellauswahlstrategie wurde von der ER-Phagie-Reporteranalyse übernommen und angepasst. Zellen, die im Kontourplot lila angezeigt sind, wurden als autophagisch aktiv klassifiziert. (B) Gezeigt ist der prozentuale Anteil an Zellen mit Rotverschiebung, d.h. mit aktiviertem autophagischen Flux. (C) Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD der Gesamtzellfluoreszenz für mCherry bzw. eGFP der transduzierten Zellen von drei biologischen Replikaten. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).*

Als weitere Methode zur Erfassung des Autophagie-Reporters wurde ein mikroskopischer Ansatz etabliert. Dieser hatte gegenüber der Western-Blot-Auswertung und Durchflusszytometrie-basierten Messung den Vorteil, dass neben der Gesamtzellfluoreszenz eine verfeinerte subzelluläre Auswertung von Autophagosomen und Autolysosomen möglich war. Huh7 Zellen wurden wie zuvor behandelt, mit HBSS gewaschen und anschließend mittels Live-Cell-Imaging am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Zur Auswertung wurde eine bioinformatische Auswertestrategie konzipiert, welche mittels der Segmentierung durch Cellpose und der Vesikelerfassung durch Cellprofiler/Excel die Quantifizierung der Bilder ausführte. Hierbei wurden die detektierten Vesikel anhand ihrer Fluoreszenzintensität in Autolysosomen oder Autophagosomen unterteilt und weiter vermessen.

Die Zellen zeigten eine homogene Reporterexpression anhand der Erfassung der Fluoreszenzen von eGFP und mCherry (Abb. 29 A). Die Quantifizierung der mittleren Anzahl an Autophagosomen und Autolysosomen pro Zelle zeigte basal einen ähnlichen Anteil an beiden Vesikelarten, welcher sich durch die Bafilomycin A1-Zugabe in Richtung der Autophagosomen verschob (Abb. 29 B). Das Hungern der Zellen führte zu einer insgesamt erhöhten Bildung von Vesikeln, wobei es sich vornehmend um Autolysosomen handelte. Bafilomycin A1 hemmte die Aktivierung von Autophagie auf ein basales Level und DMSO hatte in der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss auf die Aktivität dieser Prozesse. Die Darstellung der Anzahl der autophagischen Vesikel der Zellpopulation in Violinplots zeigte eine ausgeprägte zelluläre Heterogenität (Abb. 29 C). Auffällig war, dass Bafilomycin A1 behandelte Zellen eine größere Variabilität in der Anzahl an Autophagosomen aufwiesen als unbehandelte Zellen. Dies visualisierte das unterschiedliche Ansprechen der Zellen auf den Inhibitor. Ein vergleichbarer Effekt war bei Betrachtung der Autolysosomen nach Hungerbedingungen zu erkennen.

Zusammenfassend wurden stabile Autophagie-Reporterzelllinien erfolgreich etabliert. Diese ermöglichten eine Erfassung des Autophagieprozesses auf drei komplementären Ebenen: (1) der Degradation des Reporters mittels Western-Blot-Analyse, (2) der durchflusszytometrischen Messung der Grün-Rot-Verschiebung in lebenden Zellen und (3) der subzellulären Auszählung von Vesikeln in einzelnen Zellen nach

Fluoreszenzmikroskopie. Der Einsatz von Kontrollbedingungen validierte die Methoden und ermöglichte nachfolgend eine detailliertere und komplexere Evaluierung des autophagischen Fluxes.

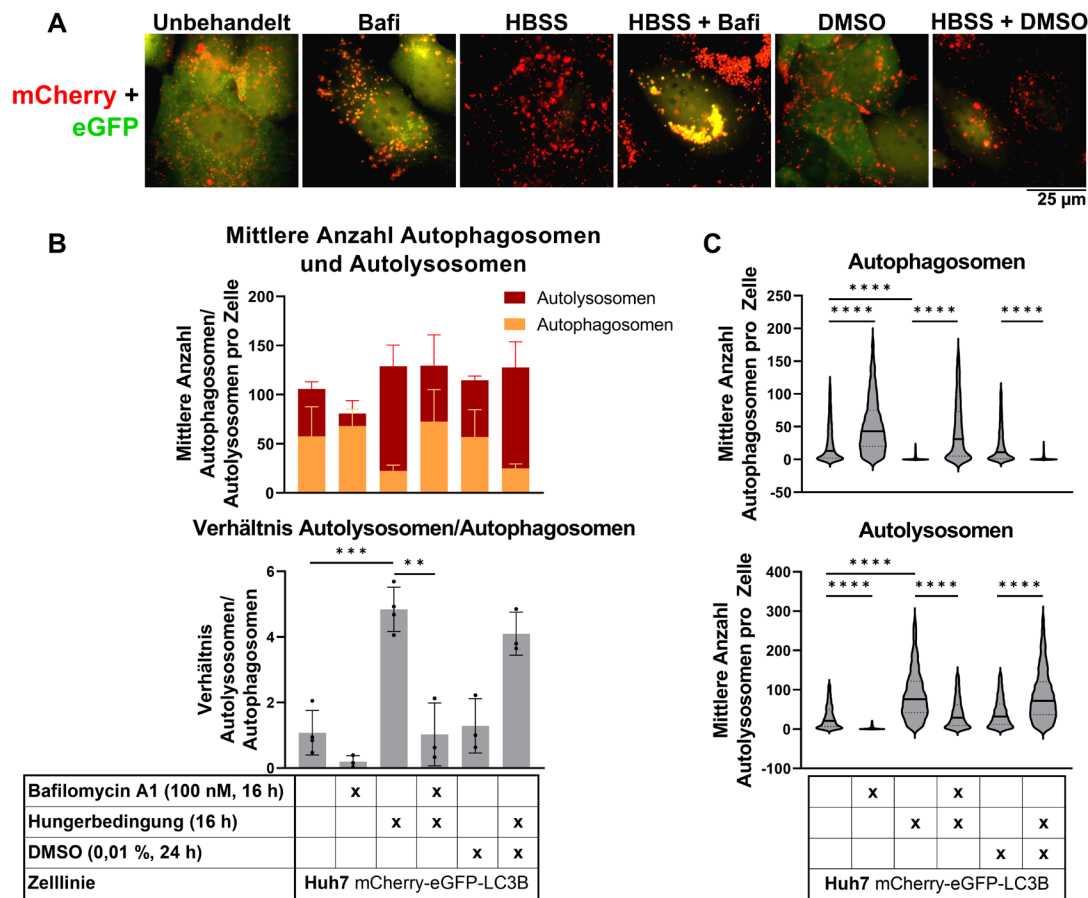


Abb. 29 Etablierung der mikroskopischen Erfassung von Autophagieprozessen und subzellulären Foci

(A) Huh7 Zellen wurden lentiviral mit pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduziert und mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h), DMSO (0,01 %, 24 h) und/oder HBSS (16 h) behandelt. Die Zellen wurden durch eine Fluoreszenzmikroskopie erfasst. Es wurden repräsentative Bilder eines biologischen Replikates ausgewählt. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach. (B) Die Quantifizierung der Autophagosomen und Autolysosomen erfolgte für drei bis vier biologische Replikate mit Cellpose, Cellprofiler und Excel. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der Vesikel und das Verhältnis der mittleren Anzahl an Autolysosomen zu Autophagosomen pro Zelle $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test. (C) Darstellung der Anzahl an Autophagosomen und Autolysosomen pro Zelle für die zusammengeführten Zellen der biologischen Replikate (1769 bis 2546 Zellen pro Behandlung) als Violindiagramm. In der Darstellung wurden Ausreißer durch die ROUT-Methode ($Q = 1$ %) von Graphpad Prism entfernt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

4.1.5. Rekonstruktion des ER-Phagie-Reporters in ein neues Vektorgerüst zur verbesserten Transduktion

Vorherige Experimente zeigten, dass der ER-Phagie-Reporter mittels lentiviraler Transduktion ausschließlich in HeLa oder A549 Zellen exprimiert wurde. Im Hinblick auf

zukünftige Versuche zur Erfassung von ER-Phagie nach einer Infektion mit HCoV-229E war es notwendig den Reporter auch in Huh7 Zellen zu etablieren. Zusätzlich zu dem Tandem-Reporter TetOn-mCherry-eGFP-RAMP wurden daher drei weitere publizierte und kommerziell erhältliche Plasmide zur lentiviralen Transduktion von Huh7 Zellen getestet: TetOn-REEP5-mCherry-eGFP, TetOn-CLIMP63-mCherry-eGFP und pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL (Chino et al., 2019; Liang et al., 2020). Die zwei erstgenannten Vektoren zeichneten sich durch das gleiche Vektorgrundgerüst wie der bereits genutzte Reporter aus. Der letztgenannte Vektor basierte ebenso auf einer Tetracyclin-abhängigen Expression, hingegen waren die fluoreszierenden Proteine an eine kurze Aminosäuresequenz (KDEL) als ER-Membrananker anstelle eines vollständigen Proteins geknüpft. Es erfolgte die Herstellung von Lentiviren und die Transduktion in Huh7 Zellen. Die mikroskopische Betrachtung der Zellen zeigte eine Transduktionseffizienz von weniger als 5 % für alle Plasmide, so dass eine Quantifizierung nicht realisierbar war (Abb. Anhang 3). Eine Gemeinsamkeit der Reportersysteme war die Tetracyclin-abhängige Bildung der Fusionsproteine. In Bezug auf den konstitutiv exprimierten Autophagie-Reporter wurde gezeigt, dass in Huh7 Zellen eine Transduktion ohne Selektion von mehr als 90 % der Zellen möglich war und eine stabile Expression über einen langen Zeitraum stattfand. Daher wurde die Entscheidung getroffen, den ER-Phagie-Reporter in das Vektorgerüst des Autophagie-Reporters einzufügen (Abb. 30). Es wurde sich für den ER-Phagie-Reporter pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL entschieden, da dieser im Vergleich der getesteten Plasmide die höchste Transduktionseffizienz in Huh7 Zellen hatte und ein homogenes Signal aufwies.

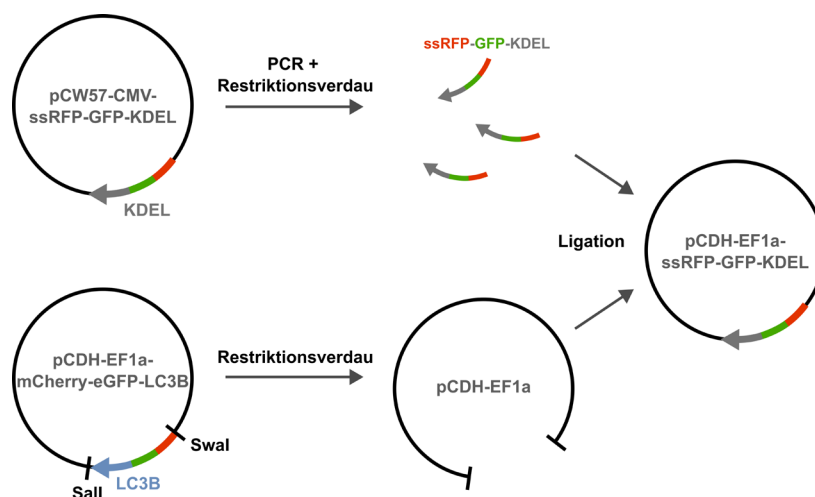


Abb. 30 Schematische Darstellung der Vektorrekonfiguration des ER-Phagie-Reporters
Das Insert ssRFP-GFP-KDEL wurde aus dem ER-Phagie-Vektor pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL durch eine PCR mit anschließenden Restriktionsverdau amplifiziert. Der Autophagie-Vektor pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B wurde mit den Restriktionsenzymen Sall und SwaI geschnitten und der Leervektor pCDH-EF1a aufgereinigt. Es erfolgte die Ligation von pCDH-EF1a und dem Insert zum neuen ER-Phagie-Vektor pCDH-EF1a-ssRFP-GFP-KDEL.

Zunächst wurden zwei verschiedene Primer für die Amplifikation des Reporters ssRFP-GFP-KDEL aus dem ER-Phagie-Vektor entworfen und in einer PCR getestet sowie die Effektivität der Phusion-Reaktionspuffer HF und GC verglichen (Abb. 31 A). Dazu wurde eine Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid durchgeführt und die amplifizierten Inserts unter UV-Licht bei einer Länge von 1506 bp visualisiert. Es zeigte sich die beste Amplifikation ohne Fragmentierung bei der Verwendung des Phusion Reaktionspuffers GC in Kombination mit dem Vorwärtsprimer „Swal“ und es wurde daher mit diesen Reaktionsbedingungen fortgefahren. Das Insert wurde durch eine Gelelektrophorese mit Methylenblaufärbung isoliert und aufgereinigt. Der Autophagie-Reporter pCDH-EF1a-mCherry-eGFP-LCB sollte als Grundgerüst dienen und wurde durch die Restriktionsenzyme Sall und Swal geschnitten, deren korrespondierenden Schnittstellen nur einmalig im Plasmid vorkamen und folglich das gezielte Herausschneiden des Reporters garantierten. Mittels einer Gelelektrophorese wurde das Vektorgerüst (6430 bp) isoliert und anschließend aufgereinigt (Abb. 31 B). Das Insert und der Leervektor wurden ligiert, in Bakterien amplifiziert und die erfolgreiche Klonierung über eine Sanger-Sequenzierung nachgewiesen (Abb. 31 C). Das Plasmid wurde amplifiziert und zur weiteren Testung verwendet.

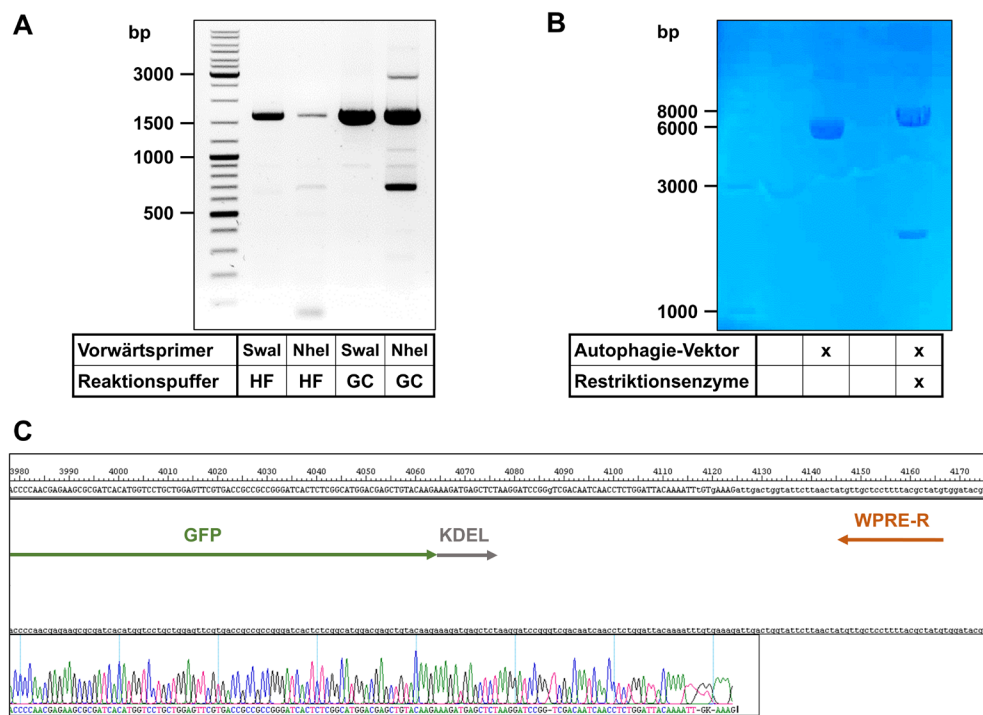


Abb. 31 Austausch des Vektorgerüst des ER-Phagie-Reporters pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL

(A) Die PCR für das Insert wurde mit den Phusion-Reaktionspuffern HF und GC durchgeführt sowie zwei verschiedenen Vorwärtsprimern (Swal, NheI). Die Visualisierung erfolgte durch ein Ethidiumbromidgel unter UV-Licht. (B) Die Restriktion des Autophagie-Vektors mit Sall und Swal wurde durch ein Methylenblau-gefärbtes Gel dargestellt. Der Leervektor pCDH-EF1a (6430 bp) konnte vom Autophagie-Reporter (1938 bp) abgetrennt werden. (C) Ausschnitt der Sanger-

Sequenzierung mit dem WPRE-R-Primer zur Detektion des korrekten Einbaus des Inserts anhand der KDEL- und GFP-Sequenz.

Abschließend wurde eine Funktionstestung des neuen ER-Phagie-Reporters pCDH-EF1a-ssRFP-GFP-KDEL nach der lentiviralen Transduktion von Huh7 Zellen und anschließender Behandlung mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h) und/oder Hungerbedingungen (24 h) durch ein Live-Cell-Imaging am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Das Verhältnis der Intensitäten von GFP und ssRFP war in allen Zellen vergleichbar und mehr als 90 % der Zellen zeigten eine erfolgreiche Transduktion (Abb. 32). Die Überlagerung der Fluoreszenzen ergab für unbehandelte Zellen eine gelbe Färbung, welche für eine geringe Aktivität von ER-Phagie sprach. Die Behandlung mit Bafilomycin A1 erhöhte die perinukleäre Intensität von ssRFP und GFP und zeigte hiermit die Hemmung der Degradation des Reporters sowie aufgrund der Lokalisation die Spezifität für das ER. Infolge von Hungern kam es zu einer vermehrten Ansammlung an Autolysosomen und Reduktion der zytosolischen GFP-Fluoreszenz, die durch Bafilomycin-Zugabe reversibel war. Folglich war der Austausch des Vektorrückrates des ER-Phagie-Vektors erfolgreich und die Funktionalität des Reporters konnte durch Kontrollbedingungen mit Bafilomycin A1 und Hungern belegt werden.

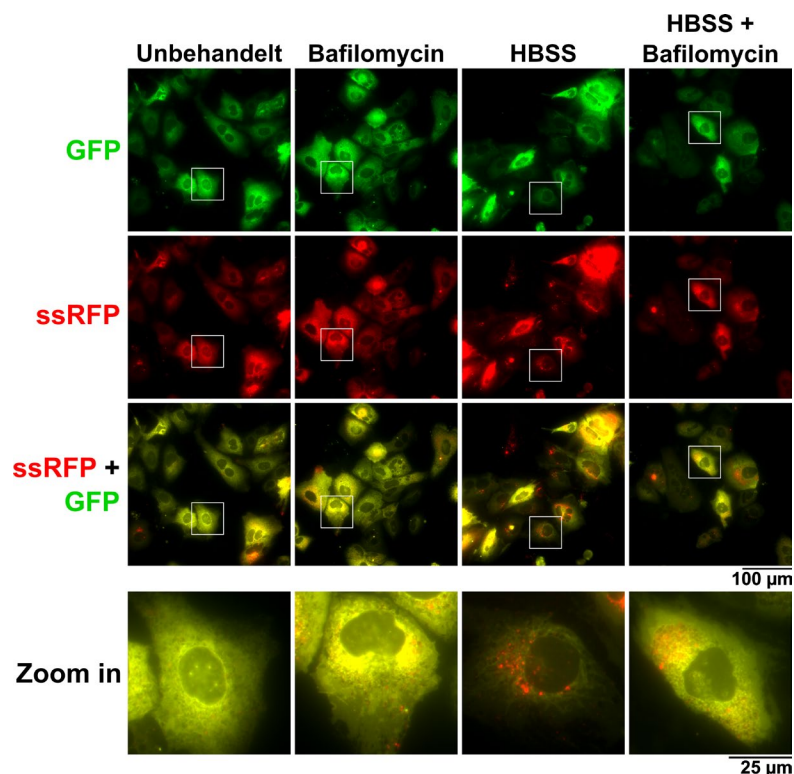


Abb. 32 Mikroskopischer Funktionsnachweis des rekonstituierten ER-Phagie-Reporters
Huh7 Zellen wurde lentiviral mit pCDH-EF1a-ssRFP-GFP-KDEL transduziert und mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h) und/oder HBSS (24 h) behandelt. Die Dokumentation erfolgte durch eine Fluoreszenzmikroskopie. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 100/25 µm. Vergrößerung: 400-fach.

4.2. Der Einfluss von HCoV-229E auf Autophagie/ER-Phagie

4.2.1. Modulation von ER-Phagie durch eine HCoV-229E-Infektion

Eine Publikation von Shaban et al. (2022) demonstrierte die HCoV-229E-induzierte Aktivierung von PERK mit einer nachfolgenden Induktion der UPR. Zusammen mit ER-Phagie sind beide Prozesse an der Homöostase des ER beteiligt. Zudem besteht eine enge Verbindung zwischen UPR und ER-Phagie mit der Option zur gegenseitigen Induktion und Regulation unter verschiedenen Stressbedingungen (Cherubini & Zito, 2022; Wilkinson, 2019). Folglich war es von Interesse, ER-Phagie, als Subform der Autophagie, in Bezug auf die Infektion mit HCoV-229E genauer zu untersuchen. Zur Durchführung der Experimente dieses Kapitels wurden die Zellen für die Dauer der Virusinfektion bei 33 °C, dem Temperaturoptimum der Replikation von HCoV-229E, inkubiert. Auf eventuelle Effekte der Temperaturreduktion gegenüber den üblichen 37 °C in Bezug auf Autophagie wird in Kapitel 4.2.2 näher eingegangen. Zunächst wurde der Degradationsassay des Tetracyclin-abhängigen ER-Phagie-Reporter in HeLa und A549 Zellen mittels Western-Blot-Analyse durchgeführt, um einen globalen Überblick über eine mögliche Regulation der ER-Phagie zu erhalten. Die Zellen wurden hierzu mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 24 h) und mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), Thapsigargin (1 µM, 24 h) oder Hungerbedingungen (16 h) behandelt.

Der GFP- und mCherry-Antikörper zeigte eine Expression des Reporters nach Transduktion und Zugabe von Doxycyclin (Abb. 33 A. B). Mittels N Protein-Antikörper wurde die Infektion mit HCoV-229E nachgewiesen, welche erwartet infolge der Behandlung mit Bafilomycin A1 oder Thapsigargin vollständig blockiert wurde. Die Bildung des ssRFP-Fragments, vergleichbar mit dem zuvor beschriebenen mCherry-Fragment als ER-Phagie-Indikator, erfolgte in unbehandelten A549 und HeLa Zellen zu einem geringen Maß (Abb. 34). Die Zugabe von Bafilomycin A1 hemmte die Fragmentierung des Reporters, während eine Induktion von ER-Phagie durch Hungern die Zunahme der Proteinmenge zeigte. A549 Zellen wurden zusätzlich mit dem indirekten Fusionsinhibitor Thapsigargin behandelt, wodurch eine Reduktion der Bildung des Fragmentes verursacht wurde. Des Weiteren zeigten infizierte A549 Zellen eine vergleichbare Proteinmenge des Reporterfragmentes wie unbehandelte Zellen, während für HeLa Zellen eine Abnahme quantifizierbar war, welche einer Suppression von ER-Phagie entsprach.

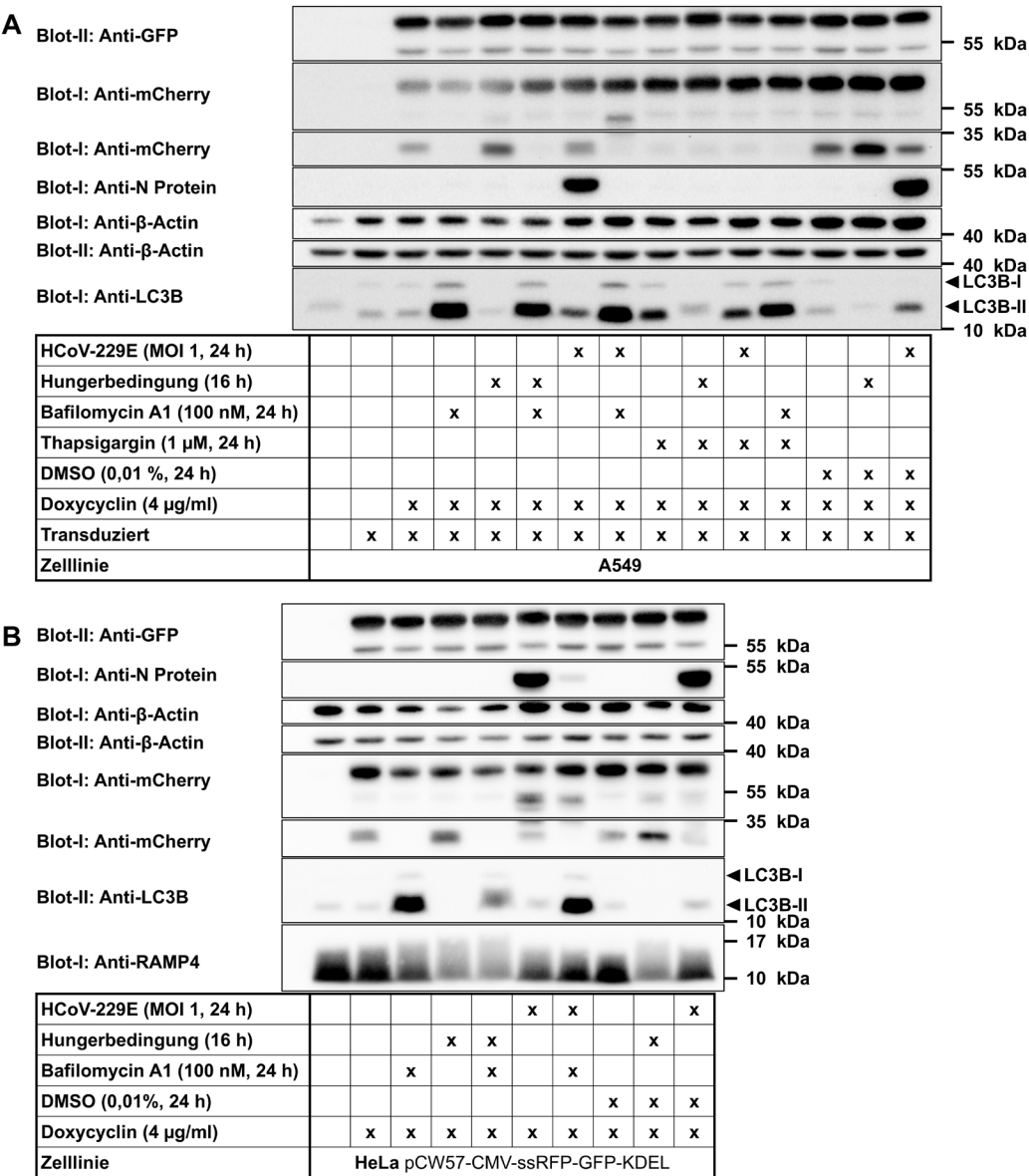


Abb. 33 Erfassung globaler Veränderungen der ER-Phagie in HCoV-229E-infizierten A549 und HeLa Zellen

(A) Parentale und mit pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL transduzierte A549 Zellen wurden mit 4 μg/ml Doxycyclin behandelt, um die Expression des Reporters zu induzieren. Es erfolgte die Zugabe von Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), HBSS (16 h), Thapsigargin (1 μM, 24 h) und Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse. (B) HeLa Zellen mit dem ER-Phagie-Reporter pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL wurden analog behandelt und mittels Western-Blot-Analyse erfasst.

LC3B-I und LC3B-II wurden als Marker für die unspezifische Autophagie genutzt und zeigten aufgrund des Autophagiearrestes durch eine Bafilomycin A1- und Thapsigargin-Behandlung eine Zunahme, wobei der Anstieg für Letztgenannten nicht signifikant ausfiel (Abb. 34). Eine Ursache für die unterschiedliche Effektivität der Inhibitoren kann auf die duale Wirkung von Bafilomycin A1 vermutet werden, welches zur Blockade der V-ATPase mit Senkung der Ansäuerung von Lysosomen sowie zur Modulation des Calciumhaushaltes der Zelle mittels der Hemmung von SERCA führt, welche der primäre

(4 µg/ml) aktiviert. Es erfolgte die Behandlung/Infektion mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), HBSS (24 h) und HCoV-229E (MOI 1; 4, 8, 12, 16, 20, 24 h). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse (Abb. Anhang 4). Die relative Quantifizierung der Proteinmengen von N Protein, LC3B-I, LC3B-II und ssRFP von drei bis sechs biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die transduzierte, unbehandelte Probe der jeweiligen Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Die Western-Blot-Analyse liefert keine Informationen zu lokal begrenzten ER-Phagieprozessen und deren Heterogenität in einzelnen Zellen. Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass zu einem gegebenen Zeitpunkt jeweils nur kleine Anteile des gesamten ER über einen ER-Phagieprozess moduliert werden, wurden zunächst weitere einzelzellbasierte durchflusszytometrische Analysen mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infizierten Zellen und unter Kontrollbedingungen (Bafilomycin A1 100 nM, 24 h; Hungern 16 h) durchgeführt (Abb. Anhang 5).

Nach der Aktivierung der Reporterexpression mit Doxycyclin wurde eine geringe basale ER-Phagieaktivität anhand des Anteils von 4,52 % (A549) bzw. 6,85 % (HeLa) der Zellen mit Rotverschiebung erfasst, welche eine 1,5-fach höhere Aktivität von HeLa Zellen gegenüber A549 Zellen zeigte (Abb. 36). Die Behandlung mit Bafilomycin A1 senkte den Anteil aktiver Zellen auf 2,97 % (A549) und 5,14 % (HeLa), während das Hungern der Zellen, als starker Induktor von ER-Phagie, diesen Anteil auf 7,95 % (A549) bzw. 13,37 % (HeLa) der Zellen steigerte. Die Infektion mit HCoV-229E reduzierte die Aktivität von ER-Phagie gegenüber unbehandelten Zellen auf 3,03 % (A549) und 3,85 % (HeLa).

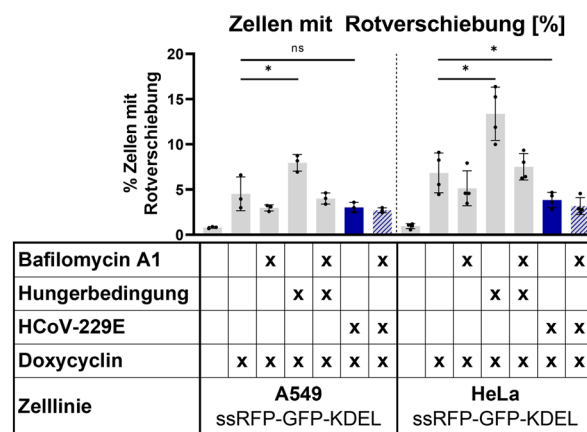


Abb. 36 Senkung von ER-Phagie durch HCoV-229E-Infektion ermittelt durch eine durchflusszytometrische Auswertung

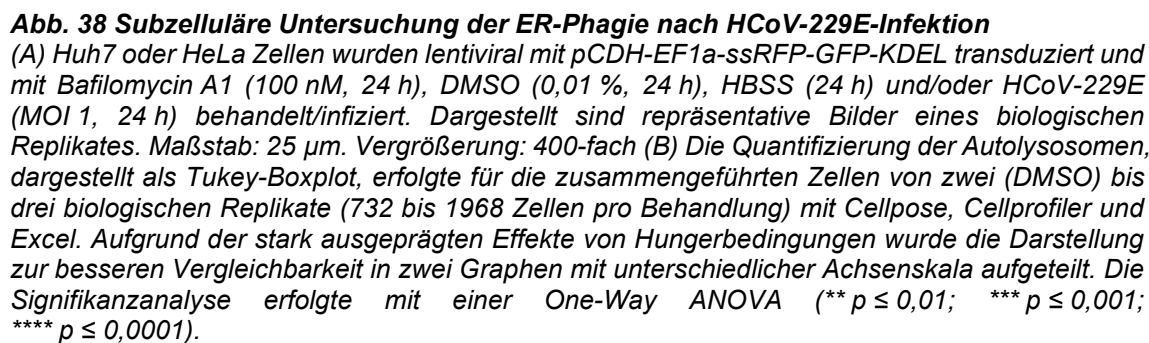
(A) Mit pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL transduzierte A549 und HeLa Zellen wurden mit 4 µg/ml Doxycyclin behandelt. Es erfolgte die Zugabe von Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), HBSS (16 h) und Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h). Pro Behandlung wurden 10.000 Zellen am BD LSR-Fortessa Durchflusszytometer vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von drei bis vier biologischen Replikaten der Anteile der im Dotplot aus Abb. Anhang 5 gezählten Zellen, welche durch ihre ER-phagische Aktivität eine Rotverschiebung demonstrierten. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$).

*Replikaten. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).*

Der inhibitorische Effekt der viralen Infektion entsprach damit den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen, jedoch erwies sich die Sensitivität der Methode als problematisch, daher wurden nachfolgend subzelluläre Veränderungen untersucht, um die Hypothese zu testen, dass es lokale HCoV-229E-bedingte Änderungen der ER-Phagie geben könnte. Hierzu wurde die mikroskopische Erfassung von Veränderungen der Fluoreszenzsignale und die Quantifizierung von Autolysosomen mittels automatisierter Auswertung unter denselben Bedingungen wie zuvor (Bafilomycin A1 100 nM, Hungern, HCoV-229E MOI 1; 24 h) durchgeführt.

Die mikroskopische Betrachtung zeigte in beiden Zelllinien (Huh7, HeLa) eine homogene Reporterexpression, welche perinukleär am intensivsten war (Abb. 38 A). Entsprechend den vorherigen Befunden führte Hungern der Zellen zu einer Abnahme der Intensität sowie Ansammlung von Autolysosomen, in Form von roten Foci, während diese nach Bafilomycin A1-Zugabe verschwanden (Abb. 38 A, B). Infizierte Zellen zeigten im Mittel eine mit unbehandelten Zellen vergleichbare Anzahl an Autolysosomen, welche jedoch eine starke Variabilität innerhalb der Zellpopulation aufwies.

Zusammenfassend konnte die in einem kleinen Anteil der Zellpopulation stattfindende ER-Phagie und ihre Regulation durch klassische Hungerbedingungen korrekt erfasst und damit auch im Hinblick auf die Infektion mit HCoV-229E untersucht werden. Die gehemmte Degradation des Reporters in der Western-Blot-Analyse und die reduzierte Rotverschiebung von Zellen im Durchflusszytometer zeigten eine Abnahme von ER-Phagie durch HCoV-229E, während die mikroskopische Erfassung keine Effekte auf die Formation von Autolysosomen offenbarte.



Transkriptom- und Proteom-Analysen der AG Kracht lieferten Hinweise für die Involvement von Autophagieprozessen in der Replikation von HCoV-229E. Diverse Viren hemmen oder aktivieren verschiedene Formen der Autophagie und auch diesbezügliche Untersuchungen von Coronaviren liefern ein komplexes und insgesamt

heterogenes Bild. In den vorhergegangenen Experimenten wurden eine geringe Reduktion des ER-Phagieprozess durch HCoV-229E beobachtet. Im Folgenden sollte daher zunächst über die durchflusszytometrische Analyse erfasst werden, ob vergleichbare Effekte auf den Prozess der unselektiven Autophagie erfolgen. In diesem Kontext war zu beachten, dass Autophagie ein hochdynamischer Prozess ist, welcher auch von physikalischen Faktoren wie der Umgebungstemperatur beeinflusst werden kann. Die Replikation von HCoV-229E erfolgt primär in den oberen Atemwegen, welche eine geringere Temperatur aufweisen als tiefersitzende Kompartimente. In einer Studie von Lamarre and Talbot (1989) wurde ein Replikationsoptimum des Virus bei 33 °C ermittelt. Folglich war zu überprüfen, ob eine Temperaturerniedrigung Auswirkungen auf den Prozess der Autophagie in den hier verwendeten Zellkultursystemen verursacht. Hierzu wurde der Anteil an autophagisch aktiven Autophagie-Reporterzelllinien unter Kontrollbedingungen (Bafilomycin A1 100 nM, 16/24 h; Hungern 16 h) und der Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) erfasst (Abb. 39 A).

In allen Konditionen war die Autophagieaktivität in Huh7 Zellen höher als in HeLa Zellen (Abb. 39 B). Unter Standardbedingungen (37 °C) betrug der Anteil autophagisch aktiver Zellen 3,11 % (HeLa) bzw. 5,35 % (Huh7), welche durch die Zugabe von Bafilomycin A1 infolge der Hemmung der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion auf weniger als 1 % gesenkt wurde. Durch Hungern kam es bei den bei 37 °C kultivierten Zelllinien zur starken Aktivierung von Autophagie in 50,9 % (HeLa) bzw. 68,5 % (Huh7) der Zellen, welche durch die Zugabe von Bafilomycin A1 blockiert wurde.

Die Inkubation der Zellen bei 33 °C für 24 h senkte die basale Aktivität auf 1,18 % in HeLa Zellen, wohingegen in Huh7 Zellen eine Steigerung auf 6,77 % beobachtet wurde (Abb. 39 B). Weiterhin zeigte die Positivkontrolle unter Hungerbedingungen im Vergleich zu der 37 °C Bedingung eine schwächere Aktivierung des autophagischen Fluxes in HeLa (21,64 %) bzw. Huh7 (55,04 %) Zellen. Die inhibitorische Wirkung von einer 16-stündigen Bafilomycin A1-Behandlung war dagegen temperaturunabhängig, und eine längere Zugabe des Inhibitors für 24 h führte zu einer stärkeren Blockade. Die Infektion mit HCoV-229E stimulierte in beiden Zelllinien den autophagischen Flux, wobei HeLa Zellen (5,71 %) schwächer aktiviert waren als Huh7 Zellen (17,83 %). Die plausibelste Erklärung hierfür war die geringere Infektions- oder Replikationsrate von HCoV-229E in HeLa Zellen. In beiden Zelllinien wurde die Aktivierung der Coronavirus-vermittelte Autophagie durch Bafilomycin A1 gehemmt.

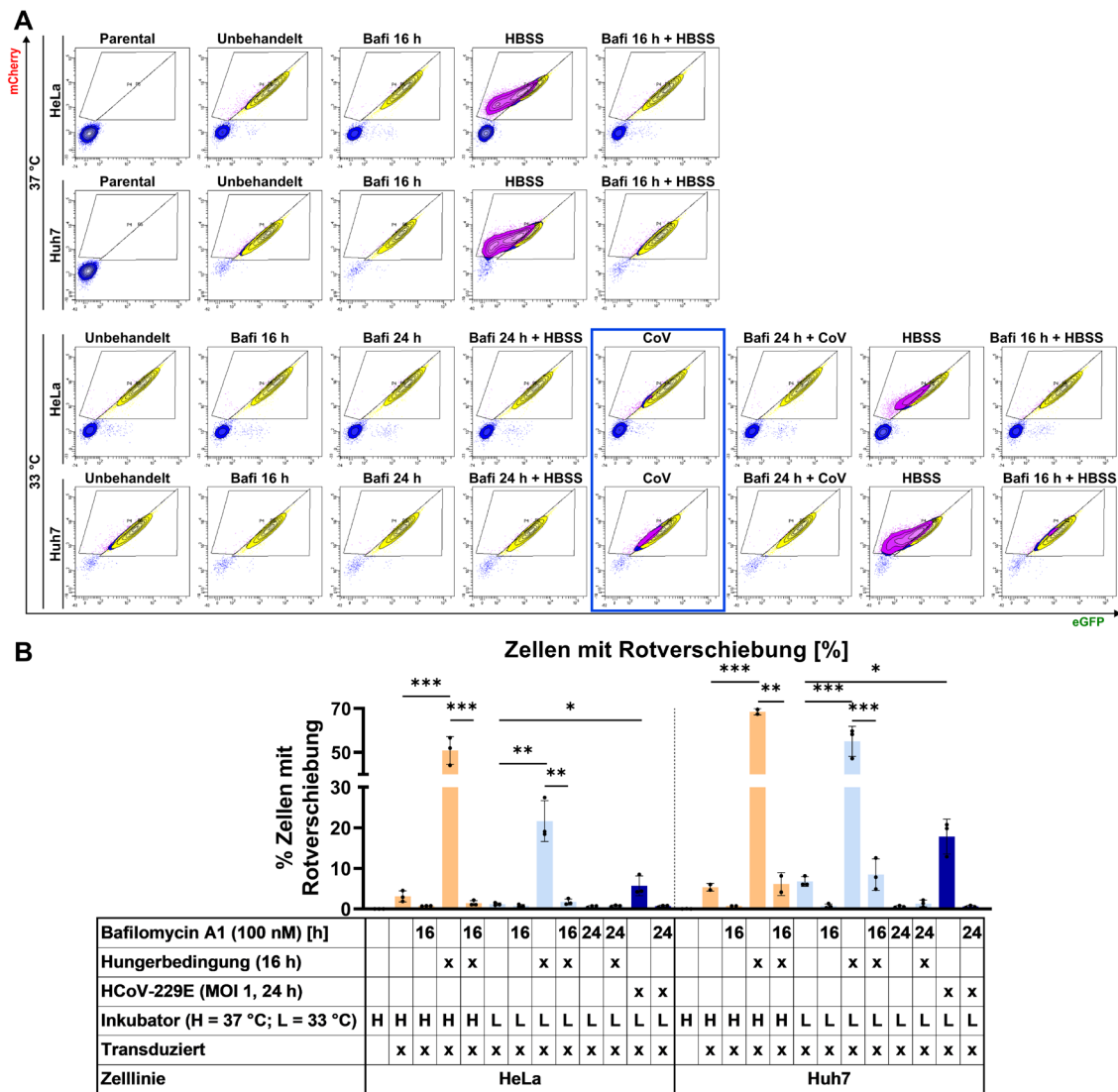


Abb. 39 HCoV-229E-vermittelte Induktion der Autophagie erfasst durch eine Durchflusszytometrie-basierte Analyse

(A) Lentiviral mit pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduzierte Huh7 und HeLa Zellen wurden mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 oder 24 h), DMSO (0,01 %, 24 h), Hungerbedingungen (16 h) und/oder mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) behandelt/infiziert. Dargestellt sind repräsentative Kontourplots eines biologischen Replikates. (B) Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD von drei biologischen Replikaten der Anteile an Zellen mit Rotverschiebung, d.h. mit aktiviertem autophagischen Flux (in (A) lila markiert). Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Weiterführend wurde der zeitliche Zusammenhang der Infektion mit HCoV-229E und der Aktivierung des Autophagieprozesses durch einen Infektionszeitverlauf analog zu den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen ER-Phagie-Ansätzen untersucht. Im vorherigen Experiment waren bei einer Inkubation bei 33 °C anstelle der üblichen 37 °C für 24 h nur geringfügige Veränderungen des Vorgangs beobachtet worden. Zudem war die Funktionalität des Reporters nicht beeinträchtigt. Daher wurde dieses experimentelle Design beibehalten.

Der Autophagie-Reporter demonstrierte für beide Zelllinien niedrige basale Level (1,99 % für HeLa; 6,78 % für Huh7), welche durch die Bafilomycin A1-Behandlung auf weniger als 1% autophagisch aktive Zellen gesenkt wurden und infolge von Hungern auf 38,76 % (HeLa) bzw. 64,23 % (Huh7) anstieg (Abb. 40). Die Betrachtung des Zeitverlaufs zeigte in HeLa Zellen eine Aktivierung des autophagischen Fluxes bereits 12 h nach Infektion (2,73 %), welcher bis 20 h nach Infektion weiter anstieg. Hingegen war für Huh7 Zellen erst 20 h bis 24 h nach Infektion eine signifikante Veränderung messbar. Hiermit konnte die maximale Aktivierung des Autophagieprozesses für beide Zelllinien mit einem Anteil von 6,44 % (HeLa) bzw. 13,2 % (Huh7) autophagisch aktiver Zellen 20 h nach Infektion erfasst werden.

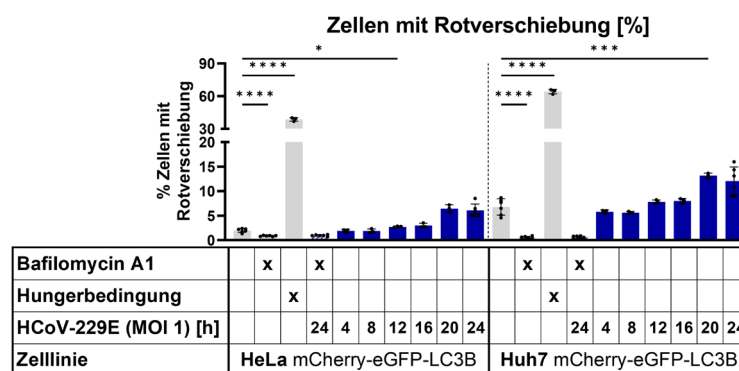


Abb. 40 Zeitabhängige Induktion der Autophagie durch HCoV-229E

Lentiviral mit dem Autophagie-Reporter pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduzierte Huh7 und HeLa Zellen wurden mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), HBSS (24 h) und/oder HCoV-229E (MOI 1; 4, 8, 12, 16, 20, 24 h) behandelt/infiziert. Pro Behandlung wurden 10.000 Zellen im BD LSRFortessa vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD des Anteils an Zellen mit Rotverschiebung, d.h. mit aktivierter Autophagie von drei bis sechs biologischen Replikaten. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

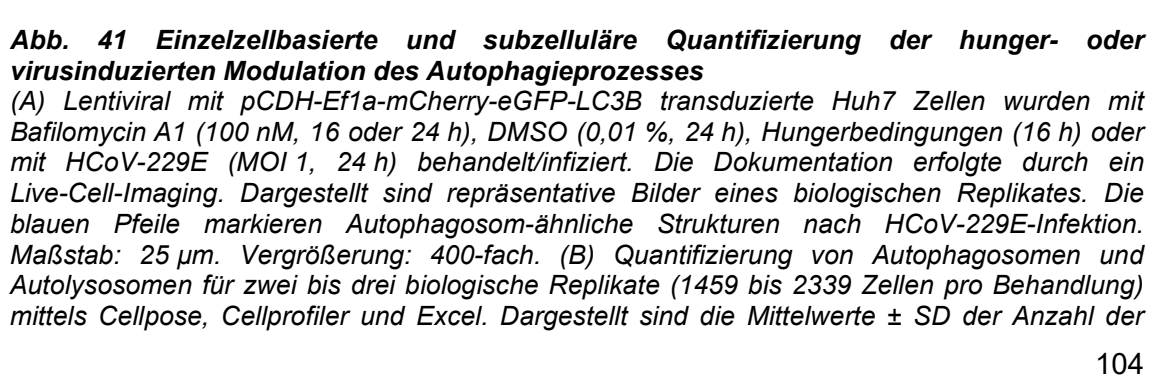
Um ein komplementäres Bild über die beobachtete Aktivierung von Autophagie nach HCoV-229E-Infektion zur erhalten und diese *in situ*, d.h. ohne die für die durchflusszytometrische Analyse benötigte vorherige Trypsin-abhängige Ablösung der adhären Zellen, zu validieren, wurden die Fluoreszenzsignale des Reporters mikroskopisch erfasst und die Anzahl an subzellulären Foci (Autophagosomen oder Autolysosomen) vermessen. Die Behandlung der Zellen wurde mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16/24 h), Hungerbedingungen (16 h) und DMSO (0,01 %, 24 h) durchgeführt oder die Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infiziert.

Die mikroskopische Analyse unbehandelter Zellen zeigte basal eine geringe Menge an autophagischen Vesikeln, wobei Autophagosomen tendenziell häufiger als Autolysosomen auftraten (Abb. 41 A, B). Die Zugabe von Bafilomycin A1 führte zur Anreicherung von Autophagosomen, welche durch die längere Behandlungsdauer von

24 h stärker ausfiel als nach 16 h. Unter Hungerbedingungen kam es zum vollständigen *quenchen* des GFP-Signals im Zytosol und einer starken Akkumulation von rot erscheinenden Autolysosomen (Abb. 41 A, C). Die Blockierung dieser Aktivierung wurde durch Bafilomycin A1 nach einer Behandlungsdauer von 16 h auf ein basales Level gesenkt, während 24 h eine stärkere Unterdrückung verursachten.

Durch die Infektion mit HCoV-229E kam es zu einer leichten Verschiebung des Verhältnisses der Vesikel in Richtung von Autolysosomen und die mittlere Anzahl an autophagischen Vesikeln stieg an (Abb. 41 B). Auffällig waren zudem perinukleäre zirkuläre oder längliche Strukturen mit starker Gelbfärbung (Abb. 41 A). Diese wurden in der folgenden Auswertung aufgrund ihres Fluoreszenzverhaltens als Autophagosomen klassifiziert, jedoch unterschieden sich diese optisch von den nach Bafilomycin A1-Behandlung auftretenden kleineren und rundlicheren Vesikeln. Die Strukturen bedürften daher weiterer Untersuchungen. Darüber hinaus war die Inhibition der Autophagie durch Bafilomycin A1 nach Infektion weiterhin möglich und DMSO hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung bzw. Hemmung von Autophagie in den jeweiligen Konditionen (Abb. 41 B).

Ergänzend zu der Auswertung wurde eine Messung der mittleren Fläche der Autophagosomen durchgeführt, welche eine Größenzunahme nach Bafilomycin A1-Behandlung zeigte, die durch die indirekt fusionshemmenden Eigenschaften mit nachfolgender Expansion der Vesikel begründet war (Abb. 41 D). Beim Hungern der Zellen veränderte sich die Größe gegenüber unbehandelten Zellen nicht. Mit HCoV-229E kam es zu einer leichten Zunahme der Fläche der Vesikel, welche dem Auftreten der stark fluoreszierenden sphärischen oder länglichen Strukturen in der Zellkernnähe zugeordnet wurde. In Kapitel 4.2.3 wurden diese näher untersucht.



Vesikel pro Zelle und pro Replikat (oberer Graph) sowie das Verhältnis von Autolysosomen zu Autophagosomen (unterer Graph). Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test. (C) Das Violindiagramm zeigt die Anzahl an Autolysosomen für die zusammengeführten Zellen der Replikate. Ausreißer wurden zur Darstellung durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt. (D) Die mittlere Fläche von Autophagosomen pro Zelle für die zusammengeführten Replikate. Die Signifikanzanalyse der Violindiagramme erfolgte mit einer One-Way ANOVA ($p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$).*

Komplementär zu den Befunden wurde erneut ein Zeitverlaufsexperiment in HeLa und Huh7 Zellen durchgeführt, um die frühen Replikationsschritte von HCoV-229E zu untersuchen (Abb. 42 A). Die Kontrollproben mit gehungerten Zellen oder der Bafilomycin A1-Behandlung führten jeweils zur Induktion von Autophagie, mit der Bildung von Autolysosomen, oder einer distalen Blockade des Autophagieprozesses, mit einer Akkumulation von Autophagosomen (Abb. 42 B). Die Virusinfektion bewirkte die Bildung der Autophagosom-ähnlichen Strukturen in beiden Zelllinien, welche erstmals 12 h nach Infektion optisch differenzierbar von anderen Vesikeln waren (Abb. 42 A). Die Größe und Anzahl dieser nahm bis 20 h nach Infektion zu. Zudem zeigte die Zählung der mittleren Anzahl an Autolysosomen und Autophagosomen, dass es parallel mit der Bildung der Strukturen zur vermehrten Formation von Autolysosomen kam sowie der Steigerung des mCherry/eGFP-Verhältnisses in den Vesikeln. (Abb. 42 B, C). Dieser Anstieg blieb über den weiteren Infektionsverlauf konsistent.

Zusammenfassend konnte die zelltyp- und temperaturabhängige quantitative Modulation der basalen Autophagie erfasst werden. Die Messungen des Anteils an Autophagosomen und Autolysosomen sowie der Rotverschiebung von Zellen offenbarte eine zeitabhängige, langsame und, im Vergleich zu Hungerbedingungen, relative schwache Autophagie-Aktivierung durch HCoV-229E, welche 12 h nach Infektion begann.

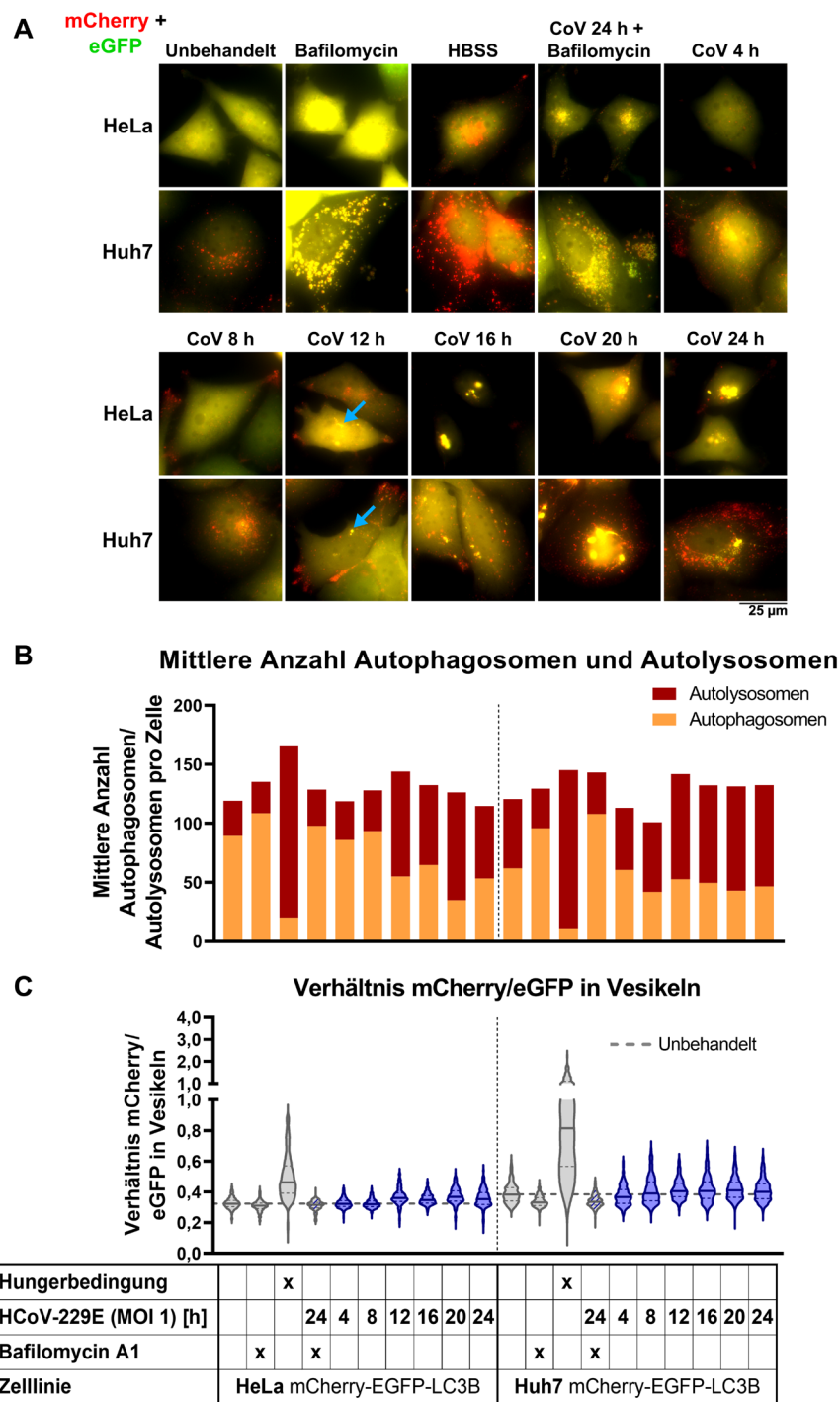


Abb. 42 HCoV-229E-induzierte Veränderungen subzellulärer autophagischer Vesikel im Infektionszeitverlauf

(A) Huh7 und HeLa Zellen wurden lentiviral mit pCDH-EF1a-mCherry-eGFP transduziert und mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), HBSS (24 h) und/oder HCoV-229E (MOI 1; 4, 8, 12, 16, 20, 24 h) behandelt/infiziert. Es wurden repräsentative Bilder eines biologischen Replikates ausgewählt. Die blauen Pfeile indizieren Autophagosom-ähnliche Strukturen nach Infektion mit HCoV-229E. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach. (B) Die Quantifizierung der Autolysosomen und Autophagosomen erfolgte für 357 bis 662 Zellen pro Behandlung mit Cellpose, Cellprofiler und Excel. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der Vesikel pro Zelle. (C) Gezeigt ist ein Violindiagramm eines biologischen Replikates des Verhältnisses der Intensitäten von mCherry und eGFP in den Vesikeln. Die gestrichelten Linien zeigen den Medianwert des basalen Autophagieflux in der jeweiligen Zelllinie. Ausreißer wurden zur Darstellung durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt.

4.2.3. Rekrutierung des Autophagie-Reporters von HCoV-229E in DMVs

In der mikroskopischen Analyse des Autophagie-Reporters wurde festgestellt, dass es während der HCoV-229E-Infektion zu einer Anreicherung von prominenten, unregelmäßigen und großflächigen Strukturen in der Nähe des Zellkerns kommt. Diese zeigten durch ihr Fluoreszenzmuster Ähnlichkeiten mit Autophagosomen, jedoch waren morphologische Auffälligkeiten sichtbar. Zudem kam es zur vermehrten Autolysosomenproduktion, welche eine Aktivierung von Autophagie sowie des autophagischen Fluxes implizierte und folglich eine Anreicherung von Autophagosomen wenig wahrscheinlich machte. Daher wurde mittels eines dsRNA-Antikörpers in Autophagie-Reporterzellen überprüft, ob es sich bei diesen Strukturen um klassische Autophagosomen oder virusinduzierte Strukturen, wie z.B. DMVs handelte. Hierbei ist dsRNA typischerweise in den replikativen Organellen lokalisiert und markiert daher DMVs. Ein bedeutsamer technischer Aspekt war, dass eine Fixierung von Tandem-Reporterzellen, aufgrund von Veränderungen des pH-Werts in Lysosomen das *quenching* von eGFP aufhebt, sodass Autophagosomen und Autolysosomen fluoreszenzbasiert nicht mehr differenzierbar waren, welches eine Quantifizierung des autophagischen Fluxes nicht möglich machte. Da die zu untersuchenden Strukturen sich visuell stark von den autophagischen Vesikeln durch ihre Größe und Form unterschieden, konnte nichtsdestotrotz eine Auswertung der Kolo-kalisation mit dsRNA mittels einer subzellulären Segmentierung durch Cellprofiler und Analyse der Überlappung der Flächen erfolgen. Die Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten sowie eine Kontrolle anhand einer zufallsbasierten Kolo-kalisation mittels Costes-Randomisierung wurde in ImageJ/Fiji durchgeführt.

Die Fixierung der Zellen reduzierte die Fluoreszenzintensität im Zytosol in allen Behandlungen (Abb. 43 A). Mit der Zugabe von Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h) zeigte sich eine starke Vesikelanreicherung, während die Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) zur Bildung von kleinen Spots führte, bei welchen es sich um autophagische Vesikel handelte. Des Weiteren waren die Autophagosom-ähnlichen Strukturen sowie das dsRNA-Signal in der Umgebung des Zellkerns erkennbar. Die Behandlung mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle zeigte keine Effekte und die IF-Kontrolle (IF ctr.) mit Ausbleiben der Primärantikörper-Inkubation wies keine unspezifischen Bindungen auf.

Die Quantifizierung der indirekten Immunfluoreszenz zeigte, dass in 84,60 % der Reporter-positiven Zellen dsRNA-Spots nachweisbar waren (Abb. 43 B). Hierbei zeigten 49,63 % der Reporterzellen eine ausgeprägte Überschneidung der Autophagosom-ähnlichen Strukturen mit den dsRNA-Spots. Die Berechnung des Pearson-

Korrelationskoeffizienten (r) zur Beurteilung der pixelbasierten Intensitätsüberlappung der Fluoreszenzen ergab einen Mittelwert von 0,5201, welcher einer moderaten Kolokalisation entsprach (Abb. 43 C). Diese Beobachtungen legten nahe, dass es sich bei den erfassten Strukturen nicht um klassischen Autophagosomen handelte, sondern eine Verbindung zu den virusinduzierten DMVs bestand.

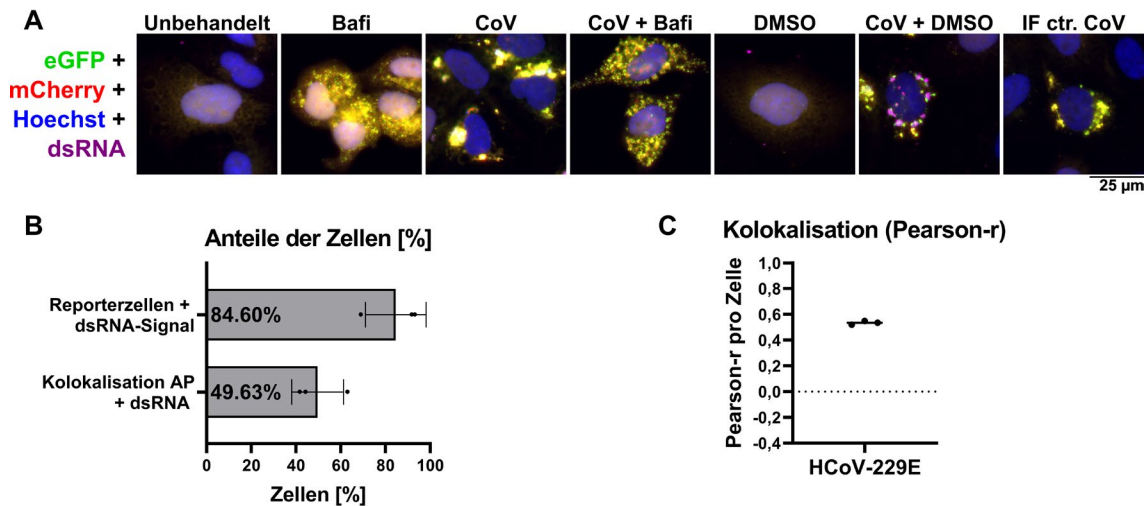


Abb. 43 Rekrutierung des Autophagie-Reporters in die DMVs von HCoV-229E

(A) Lentiviral mit pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduzierte Huh7 Zellen wurden mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), DMSO (0,01 %, 24 h) oder mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) behandelt/infiziert. Es wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt mit einem dsRNA-Antikörper (SCICONS/Nordic-Mubio, #10010200) als Primärantikörper und einem Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 μ m. Vergrößerung: 400-fach. (B) Es erfolgte die Quantifizierung von drei biologischen Replikaten mit 820 unbehandelten, infizierten Zellen, welche anhand ihrer Überlappung der dsRNA-Spots und Autophagosom-ähnlichen Strukturen (AP) sowie Expression des Reporters durch Cellpose, Cellprofiler, ImageJ und Excel analysiert wurden. (C) Darstellung der Mittelwerte der pixelbasierten Korrelation von dsRNA-Spots und den Autophagosom-ähnlichen Strukturen in Reporter-positiven Zellen durch den Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) für drei biologische Replikate ermittelt mittels ImageJ/Fiji (JACoP Plugin).

4.2.4. Abhängigkeit der HCoV-229E-Replikation vom Autophagieprozess

Im Kontext der HCoV-229E-Infektion wurde eine Aktivierung von Autophagie mit gesteigerter Autolysosomenproduktion sowie eine Rekrutierung des Reporters in Autophagosom-ähnlichen Strukturen erfasst. Im nächsten Schritt sollte mittels einer indirekten Immunfluoreszenz mit einem dsRNA-Antikörper in Kombination mit dem Autophagie-Reporter geprüft werden, ob die autophagische Aktivität einer Zelle direkt mit der Replikationsstärke des Virus zusammenhängt. Im vorherigen Kapitel wurde beobachtet, dass die Funktion des Reporters durch die Fixierung der Zellen mit PFA aufgrund von Veränderungen des pH-Wertes beeinträchtigt war (Klionsky et al., 2021). Weitere Fixierungskonditionen wurden getestet, gestatteten jedoch keine Quantifizierung (Abb. Anhang 6). Da eine Neutralisation der Kompartimente durch die

Fixiermethoden mit PFA oder Methanol als unvermeidbar erschien, erforderte die Erfassung des Reporters und die Identifizierung von dsRNA eine zweischrittige Analyse im unfixierten gefolgt von dem fixierten Zustand. Zur Durchführung des kombinierten Live-Cell-Imagings mit einer indirekten Immunfluoreszenz wurden Autophagie-Reporterzellen mit HCoV-229E (MOI 1) infiziert oder den Kontrollbedingungen (Bafilomycin A1 100 nM, Hungern, DMSO 0,01 %) ausgesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen und unfixiert mikroskopiert. Mittels der Navigator-Funktion der Leica LAS X Software wurden die Koordination der erfassten Bilder gespeichert. Im Anschluss erfolgte die indirekte Immunfluoreszenz mit einem dsRNA-Antikörper, und die Zellen wurden an den gespeicherten Koordinaten erneut mikroskopiert. Durch das Ein- und Auslegen der Ibidi μ -slides aus der Mikroskophalterung kam es zu leichten Bildverschiebungen Prä- und Postfixierung. Zur Korrektur wurden Zellen mittels Cellpose segmentiert, die Bilder per ImageJ/Fiji transformiert und eine Auswertestrategie in Cellprofiler/Excel entwickelt, welche zusätzlich dsRNA-Spots quantifizierte.

Die Betrachtung der Mikroskopiebilder zeigte erneut, dass Autophagosom-abgeleitete Strukturen in der Zellkernnähe eine Kolokalisation mit dem dsRNA-Signal von HCoV-229E aufwiesen (Abb. 44). Jedoch war die Beurteilung hiervon eingeschränkt, da aufgrund der Verschiebungen der Bilder Prä- und Postfixierung die Fluoreszenzmikroskopie mit einer geringeren Vergrößerung (200-fach anstelle der standardmäßigen 400-fach) durchgeführt wurde.

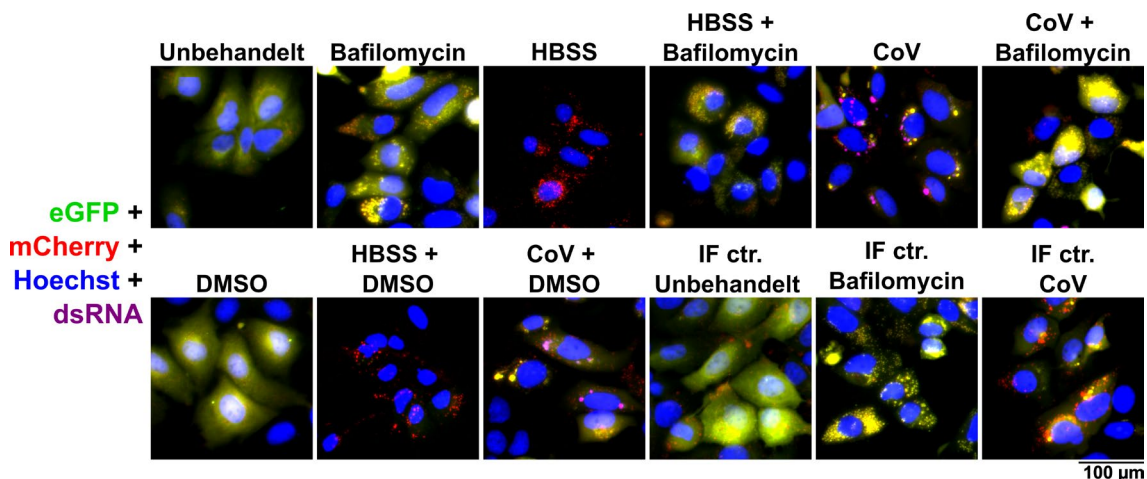


Abb. 44 Kombinierte Erfassung der Autophagie und dsRNA-Bildung infolge der Infektion mit HCoV-229E

Lentiviral mit pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduzierte Huh7 Zellen wurden mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), DMSO (0,01 %, 24 h), HBSS (24 h) oder HCoV-229E (MOI 1, 24 h) behandelt/infiziert. Die Zellen wurden in HBSS gewaschen und durch eine Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Die Positionen der Bilder wurden im LAS X Navigator markiert. Anschließend wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem gegen dsRNA gerichteten Primärantikörper (SCICONS/Nordic-Mubio, #10010200) und einem Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt. Die gespeicherten Positionen wurden erneut mikroskopiert.

Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 100 µm. Vergrößerung: 200-fach

Durch die Quantifizierung der Vesikel wurde für unbehandelte Zellen ein vergleichbares Verhältnis von Autolysosomen und Autophagosomen festgestellt, welches sich nach Bafilomycin A1-Zugabe in Richtung der Autophagosomen verschob, während Hungern einen gegenteiligen Effekt zeigte (Abb. 45 A). Für HCoV-229E konnte erneut ein Anstieg der Autolysosomenformation beobachtet werden, welches die Funktionalität des Reporters in der zweischrittigen Auswertung bestätigte. Das zelluläre Verhältnis der Intensität von mCherry/eGFP wurde in Abhängigkeit des mittleren dsRNA-Signal betrachtet und zeigte für HCoV-229E-infizierte Zellen keine Korrelation (Abb. 45 B). Infolge der Behandlung mit Bafilomycin A1 war dsRNA in nur wenigen Zellen erfassbar, welche ein niedriges mCherry/eGFP-Verhältnis aufzeigten. DMSO hatte keinen Effekt in der verwendeten Konzentration.

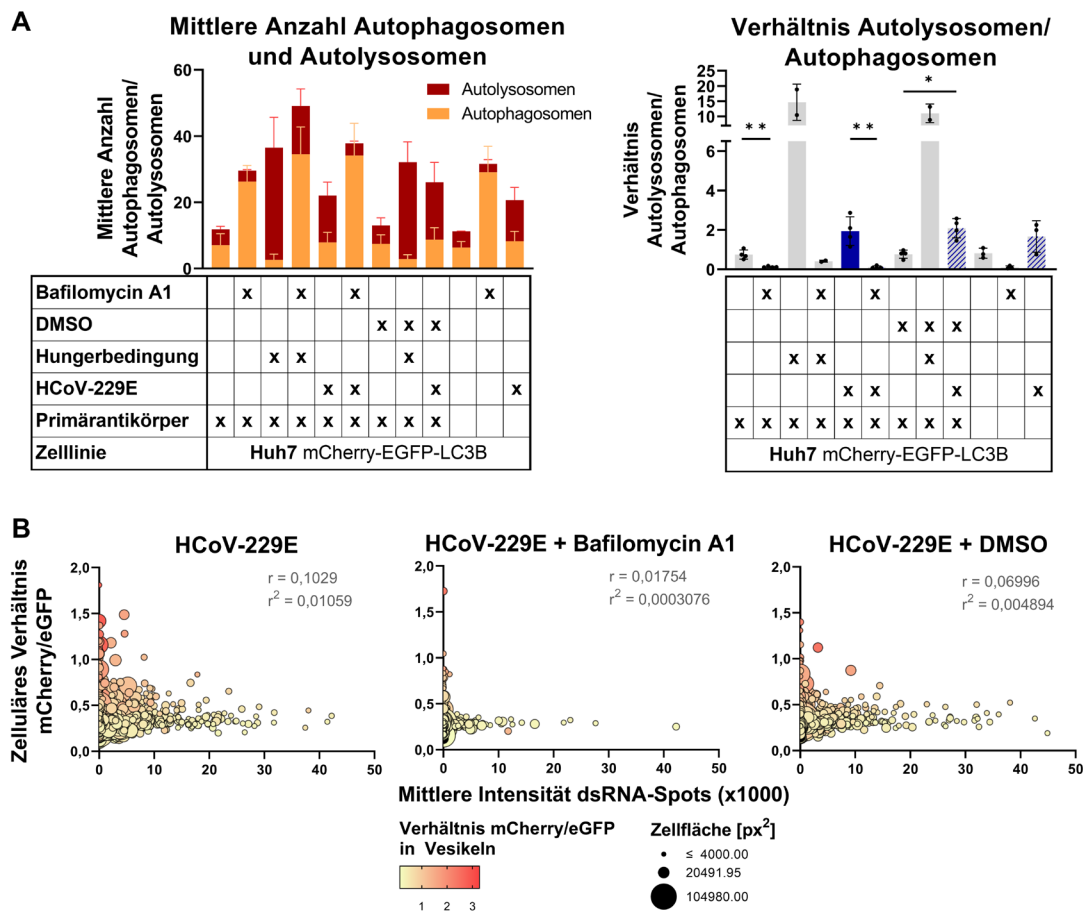


Abb. 45 Einzelzellbasierte Korrelation von dsRNA-Synthese und Autophagie-Induktion in HCoV-229E-infizierten Zellen

(A) Quantifizierung der autophagischen Vesikel der vorhergegangenen indirekten Immunfluoreszenz-Analyse mittels Cellpose, Cellprofiler und Excel. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Es wurden zwei (Hungerbedingungen) bis vier biologische Replikate durchgeführt mit insgesamt 13.455 bis 18.414 Zellen pro Behandlung. Die Signifikanzanalyse

erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (B) Gezeigt sind Bubbleplots für die zusammengeführten Einzelzelldaten aus allen biologischen Replikaten, um das zelluläre Intensitätsverhältnis von mCherry/eGFP mit der mittleren dsRNA-Intensität pro Zelle darzustellen und zu korrelieren. Die Bubblegröße gibt die gemessene Zellgröße in μm^2 an und die Farben der Bubbles gibt Aufschluss über das mCherry/eGFP-Verhältnis, welches in den Vesikeln gemessen wurde. Der Korrelationsfaktor r und das Bestimmungsmaß r^2 wurden mittels Pearson-Korrelation in Graphpad Prism berechnet.

Die vorangegangenen Arbeiten zeigten eine enge Verknüpfung der viralen Replikation von HCoV-229E und der Induktion des Autophagieprozesses. Zwar konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der globalen autophagischen Aktivität einer Zelle und der Bildung von dsRNA festgestellt werden, jedoch wurde eine Rekrutierung des Autophagie-Reporters zu den DMVs beobachtet, welches auf eine Relevanz früher Schritte der Autophagie hindeutete.

4.3. Wechselwirkung von SEC24A und Thapsigargin auf Autophagie

In der Dissertation von Albert (2023) wurde durch einen CRISPR-Cas9-vermittelten *knockout screen* SEC24A als Protein, welches mit der antiviralen Wirkung von Thapsigargin gegen Coronaviren assoziiert ist, identifiziert. SEC24A besitzt essentielle Funktionen in der Formation von COPII-Vesikeln und in der Regulation des Calciumhaushaltes einer Zelle. Zudem vermittelt es in nicht virusinfizierten Zellen die Thapsigargin-induzierte Toxizität (Chidawanyika et al., 2021). Des Weiteren sind COPII-Vesikel als eine Membranquelle für die Formation von Autophagosomen nachgewiesen worden (Shima et al., 2019). Aufgrund der Erkenntnis, dass HCoV-229E Autophagie aktiviert und Thapsigargin als starker Inhibitor des Virus mit SEC24A interferiert, sollten diese beiden Zusammenhänge näher untersucht werden.

4.3.1. Validierung von SEC24A-defizienten Zellen und Transduktion mit dem Autophagie-Reporter

Zur Messung von Autophagie und dem Einfluss von SEC24A war es erforderlich Zelllinien zweifach mit einem CRISPR-Cas9-sgRNA-Konstrukt und dem Autophagie-Tandem-Reporter zu transduzieren. Die veränderte Expression von SEC24A und die erfolgreiche Transduktion des Reporters wurden zunächst durch eine Western-Blot-Analyse bestätigt. Zudem wurde die Zugabe von Thapsigargin (1 μM , 24 h) und die Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) untersucht. Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h),

oder der Bafilomycin A1-Behandlung kam es zur Zu- bzw. Abnahme des mCherry-Fragmentes durch die entsprechende Induktion bzw. Blockade von Autophagie. Die Infektion mit HCoV-229E führte in *knockout*-Zellen zu einem Anstieg der Proteinmenge, welcher stärker ausgeprägt war als in Leervektorzellen. Zudem konnte Thapsigargin durch seine inhibitorischen Eigenschaften auf den Autophagieprozess die Menge des mCherry-Fragmentes senken. Auffällig war, dass diese Reduktion in *SEC24A knockout*-Zellen weniger effektiv verlief.

LC3B-I, LC3B-II und p62 als Autophagie-Marker zeigten in beiden Zelllinien die charakteristische Akkumulation durch eine Behandlung mit Bafilomycin A1 oder Thapsigargin sowie die Abnahme der Proteinmengen nach Hungern. HCoV-229E veränderte die Level unabhängig vom *knockout* mit einer Reduktion von LC3B-I und p62 sowie einer Zunahme von LC3B-II. Die N Proteinmenge war in beiden Zelllinien vergleichbar und die Expression konnte durch Bafilomycin A1 und Thapsigargin gleichermaßen gehemmt werden. Zur weitergehenden Analyse von Autophagie war eine Betrachtung auf Einzelzelebene erforderlich.

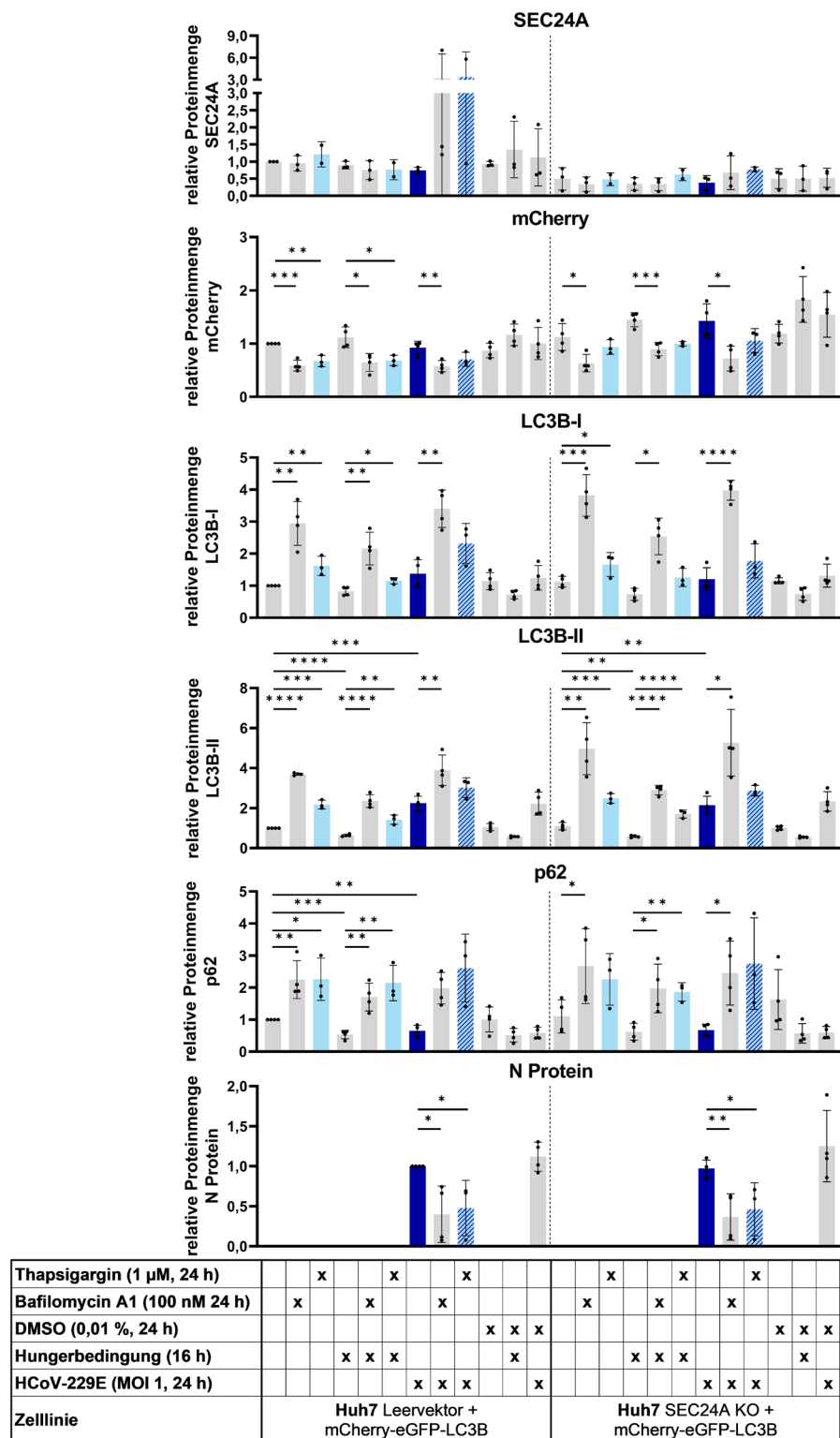


Abb. 47 Beeinflussung der Proteinmengen von Autophagie-Markern nach dem knockout von SEC24A unter Thapsigargin-Behandlung und HCoV-229E-Infektion

Die relative Quantifizierung der Proteinmengen von Huh7 Zellen transduziert mit pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B und LentiCRISPR-v2 (Leervektor) oder LentiCRISPR-v2-SEC24A-sg1 (SEC24A KO) der vorherig gezeigten Western-Blot-Analyse von drei biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die Leervektor-transduzierte, unbehandelte Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

4.3.2. Bestimmung von Autophagie in *SEC24A* knockout-Zellen nach Thapsigargin-Behandlung

Im weiteren Verlauf wurde die Bestimmung der Autophagie durch den komplementären Ansatz der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Erfassung des Reporters durchgeführt. Hierbei konnten gegenüber der Western-Blot-basierten Auswertung zellindividuelle und subzelluläre Veränderungen quantifiziert werden, um eine genauere Aussage über die Effekte von Thapsigargin in Verbindung mit dem *SEC24A* knockout zu treffen. Die Behandlung erfolgte analog zu dem vorhergegangenen Experiment.

Der Vergleich der basalen Autophagielevel beider Zelllinien in der durchflusszytometrischen Messung zeigte eine 3-fach höhere Aktivität in *SEC24A* knockout-Zellen gegenüber Leervektorzellen (3,16 % vs. 9,14 %) (Abb. 48). Die inhibitorische Funktion von Bafilomycin A1 war von der Transduktion unbeeinträchtigt und senkte den Anteil auf weniger als 1 % (Leervektor) bzw. 1,26 % (*SEC24A* knockout). Hungerbedingungen und die Infektion mit HCoV-229E aktivierten Autophagie in beiden Zelllinien, jedoch waren die Level in den *knockout*-Zellen erneut erhöht. Die Zugabe von Thapsigargin senkte in Leervektorzellen die basale autophagische Aktivität auf 2,02 % der Zellen. Dieser Effekt wurde in *SEC24A*-defizienten Zellen aufgehoben, und es wurde ein mit unbehandelten Zellen vergleichbarer Anteil (9,73 %) von autophagisch aktiven Zellen detektiert, welcher auch bei der Behandlung von infizierten Zellen erhalten blieb (9,29 %). Demzufolge vermittelte *SEC24A* einen wesentlichen Teil der Autophagie-hemmenden Effekte von Thapsigargin, ohne den antiviralen Effekt, d.h. die Inhibition der N Protein-Produktion zu beeinträchtigen.

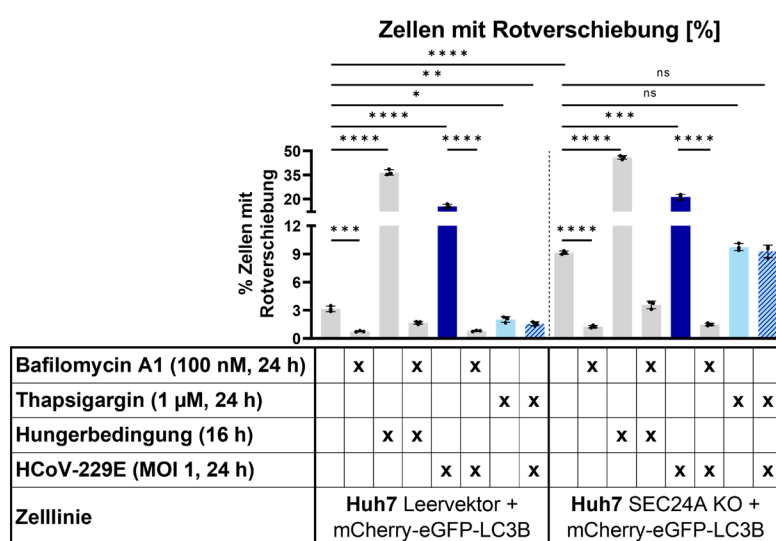


Abb. 48 Gesteigerter autophagischer Flux in *SEC24A* knockout-Zellen

Lentiviral mit pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B und LentiCRISPR-v2-Leervektor oder LentiCRISPR-v2-*SEC24A*-sg1 (*SEC24A* KO) transduzierte Huh7 Zellen wurden mit

*Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), Thapsigargin (1 μ M, 24 h) Hungerbedingungen (16 h) und/oder mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) behandelt/infiziert. Pro Kondition wurden 10.000 Zellen im BD LSRFortessa vermessen. Dargestellt ist der Anteil an Zellen mit Rotverschiebung, d.h. erhöhter autophagischer Aktivität als Mittelwerte $\pm$ SD von drei biologischen Replikaten. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).*

Als orthogonaler Assay zur Bestätigung der Befunde über die aufgehobene Autophagie-Blockade durch Thapsigargin, erfolgte die Auszählung der Autophagosomen und Autolysosomen mittels Live-Cell-Imaging am Fluoreszenzmikroskop (Abb. Anhang 7). Die kumulierte Anzahl an Vesikeln in den verschiedenen Behandlungen war in beiden Zelllinien vergleichbar (Abb. 49 A). Für unbehandelte Zellen war der Anteil an Autolysosomen gegenüber Autophagosomen in *knockout*-Zellen höher als in Leervektorzellen und bestätigte damit den stärkeren autophagischen Flux infolge der SEC24A-Depletion (Abb. 49 B). Bafilomycin A1 zeigte in beiden Zelllinien einen vergleichbaren Hemmeffekt auf die Bildung von Autolysosomen, welcher auch nach Infektion oder Hungern unbeeinträchtigt war. Demgegenüber war die Blockade von Autophagie durch Thapsigargin in *knockout*-Zellen partiell aufgehoben und damit vereinbar, dass SEC24A die Thapsigargin-vermittelte Autophagosomen-Autolysosomen-Fusion negativ reguliert (Abb. 49 A). Eine gleichartige Wirkung wurde durch die Behandlung mit Thapsigargin von gehungerten oder infizierten Zellen dahingehend erzielt, dass eine Reduktion des autophagischen Fluxes in *knockout*-Zellen nur auf basale Level möglich war (Abb. 49 B). Die Kombination aus Bafilomycin A1 und Thapsigargin zeigte in Leervektorzellen eine gesteigerte Autophagosomen-Akkumulation, welche auf einen kombinierten Block der Autolysosomenbildung und zusätzliche zytotoxische Effekte der Inhibitoren zurückzuführen sein könnte (Abb. 49 A). Diese Anreicherung an Autophagosomen war in SEC24A-defizienten Zellen reduziert.

Ferner zeigte der Vergleich der Größe von Autophagosomen zwischen unbehandelten Leervektor- und *knockout*-Zellen keine Unterschiede (Abb. 49 C). Zudem war in beiden Zelllinien ein Anstieg der Fläche durch die Behandlung mit Bafilomycin A1 oder Thapsigargin sowie der Infektion mit HCoV-229E messbar. Der SEC24A-Depletion zeigte somit keinen Einfluss auf die verstärkte Bildung und Größenzunahme der Autophagosom-ähnlichen Strukturen nach Infektion.

Zusammenfassend wurde SEC24A in diesen Experimenten als ein Faktor identifiziert, der substantiell den durch Thapsigargin induzierten Block der Autophagie vermittelt. Da HCoV-229E eine moderate Aktivierung der Autophagie in späteren Stadien des Lebenszyklus benötigt, lassen diese Ergebnisse die Interpretation zu, dass ein Teil des

starken antiviralen Effekts von Thapsigargin in einer SEC24A-abhängige Blockade der Autophagie resultiert.

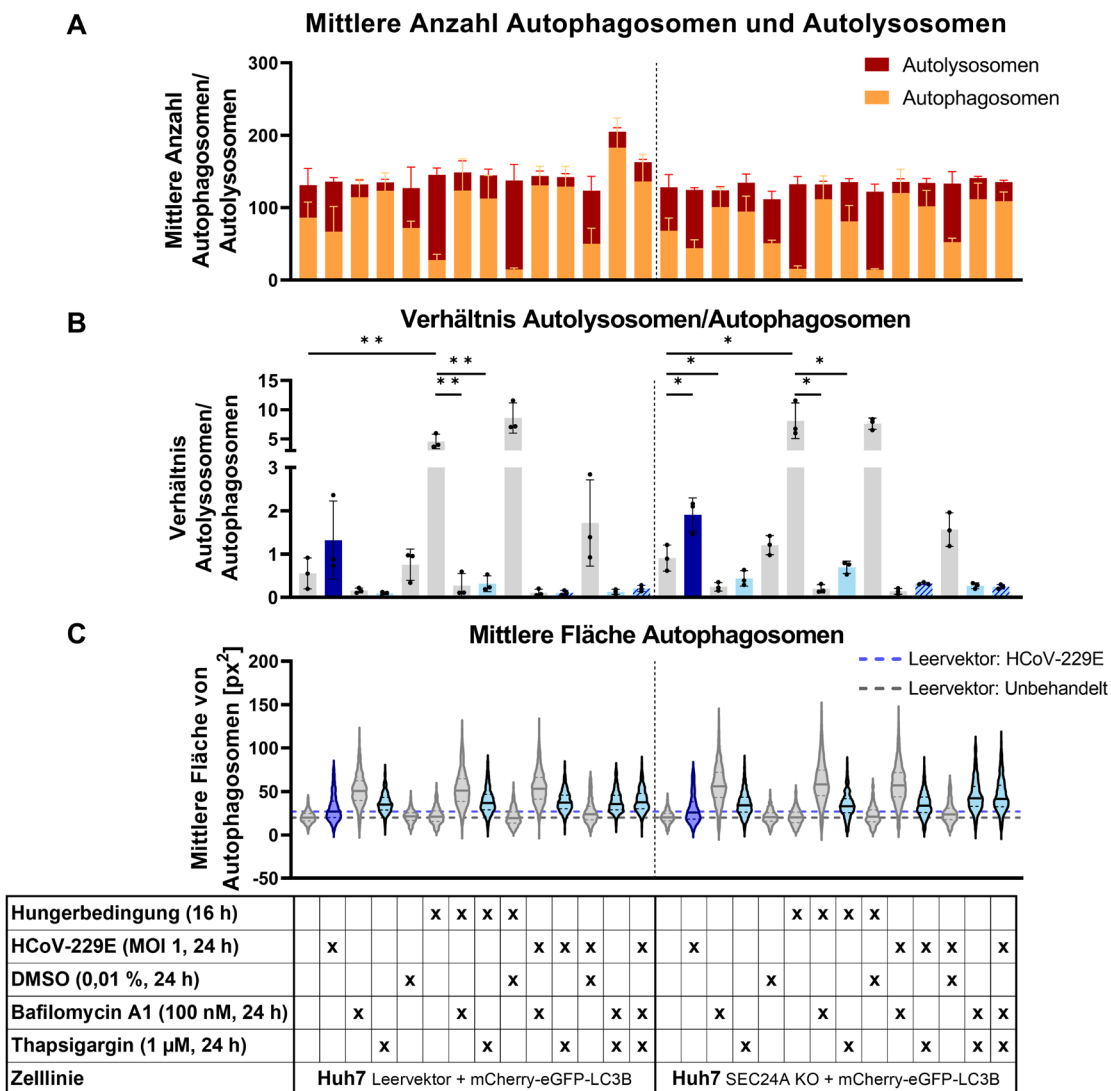


Abb. 49 SEC24A-abhängige Modulation der Thapsigargin-regulierten Dynamik von autophagischen Vesikeln

(A) Lentiviral mit pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B und LentiCRISPR-v2-Leervektor oder LentiCRISPR-v2-SEC24A-sg1 (SEC24A KO) transduzierte Huh7 Zellen wurden mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), DMSO (0,01 %, 24 h), Thapsigargin (1 µM, 24 h) Hungerbedingungen (16 h) und/oder mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) behandelt/infiziert (Abb. Anhang 7). Die Quantifizierung der Autolysosomen und Autophagosomen erfolgte für drei biologische Replikate (890 bis 1643 Zellen pro Behandlung) mit Cellpose, Cellprofiler und Excel. (B) Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD des Verhältnisses der Anzahl an Autolysosomen und Autophagosomen von Zellen. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). (C) Gezeigt ist die mittlere Fläche von Autophagosomen in px^2 für die zusammengeführten biologischen Replikate. Ausreißer wurden durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism in der Darstellung entfernt. Die gestrichelten Linien zeigen den Medianwert des basalen autophagischen Fluxes in Leervektorzellen und die Zunahme nach Infektion.

4.4. PIP4K2 und MURC/CAVIN-4 als neue Zielstrukturen von HCoV-229E

Viele RNA-Viren supprimieren effektiv und global die Translationsrate von zellulären Proteinen zur Blockierung zell-intrinsischer antiviraler Abwehrmechanismen sowie zur Nutzung von limitierten metabolischen Ressourcen. Coronaviren blockieren den Zugang von zellulären mRNAs, aber nicht viralen RNAs, zu den translatierenden Ribosomen durch die viralen Proteine nsp1 und nsp14 (Hsu et al., 2021; Nakagawa & Makino, 2021). Allerdings wird neben den virusspezifischen Proteinen auch weiterhin eine kleine Gruppe von unzureichend definierten Wirtszellfaktoren translatiert, z.B. der Transkriptionsfaktor ATF3 (Shaban et al., 2021). Die genaue Anzahl an zellulären Proteinen, die dem Translationsstopp „entkommen“, sowie die zugrundeliegenden Mechanismen sind nur unvollständig verstanden. Eine systematische hochauflösende Charakterisierung dieser zellulären Faktoren bietet daher interessante Optionen für die Entwicklung von innovativen antiviralen Strategien. In diesem Kontext erfolgten umfangreiche Vorarbeiten innerhalb der AG Kracht mittels der Markierung naszierender Proteinen in lebenden Zellen durch das Puromycin-Analogon O-Propargyl-Puromycin (OPP). Puromycin ist eine Tyrosyl-tRNA-Analogon, dessen Aminogruppe eine Peptidbindung mit dem Carboxy-Terminus der neu gebildeten Polypeptidkette eingehen kann und hiermit die Translation terminiert (Aviner, 2020; Enam et al., 2020).

Der schematische Ablauf dieser Methodik ist in Abb. 50 gezeigt. Untersucht wurde das Proteom und naszierenden Proteom von HCoV-229E-infizierten Huh7 Zellen (MOI 1; 12, 16, 20, 24 h). In einer weiteren Serie an Experimenten wurden Zellen für 24 h unter den gleichen Bedingungen in der An- oder Abwesenheit von Thapsigargin (1 μ M, 24 h) erfasst. Diese Experimente erfolgten im Vorfeld der Dissertation durch Dr. Johanna Meier-Sölch. Die von Prof. Michael Kracht ausgewerteten Datensätze führten zur Identifikation neuer Autophagie-regulierender Faktoren und dienten als Grundlage für umfangreiche funktionelle Experimente im weiteren Verlauf dieser Arbeit.

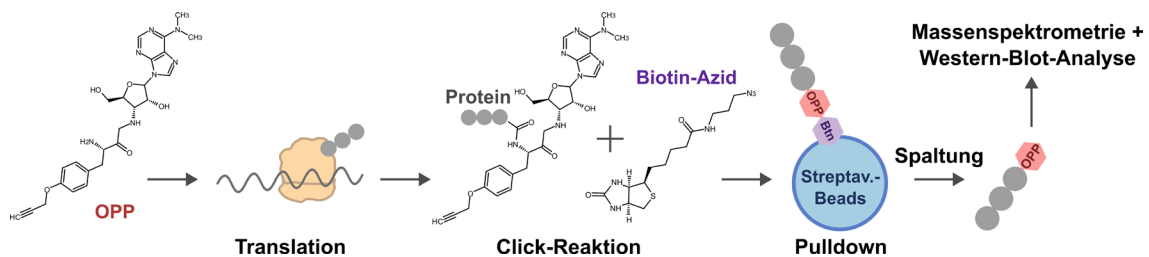


Abb. 50 Markierung naszierender Proteine mittels OPP

Schematische Darstellung der OPP-Markierung. OPP wird nach der Zugabe zu den Zellen während der Elongation am Ribosom in die neu translatierten Polypeptide eingebaut und führt

zum Abbruch der Translation. Durch eine Click-Reaktion mit Biotin-Azid werden die aus Zellextrakten isolierten OPP-markierten Proteine *in vitro* biotinyliert (Btn). Anschließend wird diese Proteinfraction mittels Streptavidin(Streptav.)-Beads aufgereinigt und die an den Beads befindlichen Proteine mittels Massenspektrometrie oder SDS-Page/Western-Blot-Analyse identifiziert und quantifiziert.

Die bioinformatische Auswertung der Proteomdaten bestätigte eine globale Abnahme der Translation zellulärer Faktoren infolge der HCoV-229E-Infektion bei gleichzeitiger Restsynthese eines definierten Proteinpanels (Abb. 51 A). Die höchste Expression entgegen dieser translationalen Abnahme zeigte sich erwartungsgemäß für die viralen Faktoren M Protein, N Protein, S Protein und nsp4a (Abb. 51 B). Zu den wirtszellspezifischen Proteinen, die am stärksten durch HCoV-229E translational induziert und Thapsigargin supprimiert wurden, gehörten MURC und PIP4K2B, welche mit Membranereignissen assoziiert sind und daher auch in die Endomembranregulation und in Autophagieprozessen infizierter Zellen impliziert sein könnten (Chidlow & Sessa, 2010; De Craene et al., 2017). Infolgedessen wurde der weitere Fokus dieser Arbeit auf die Untersuchung beider Proteine gelegt.

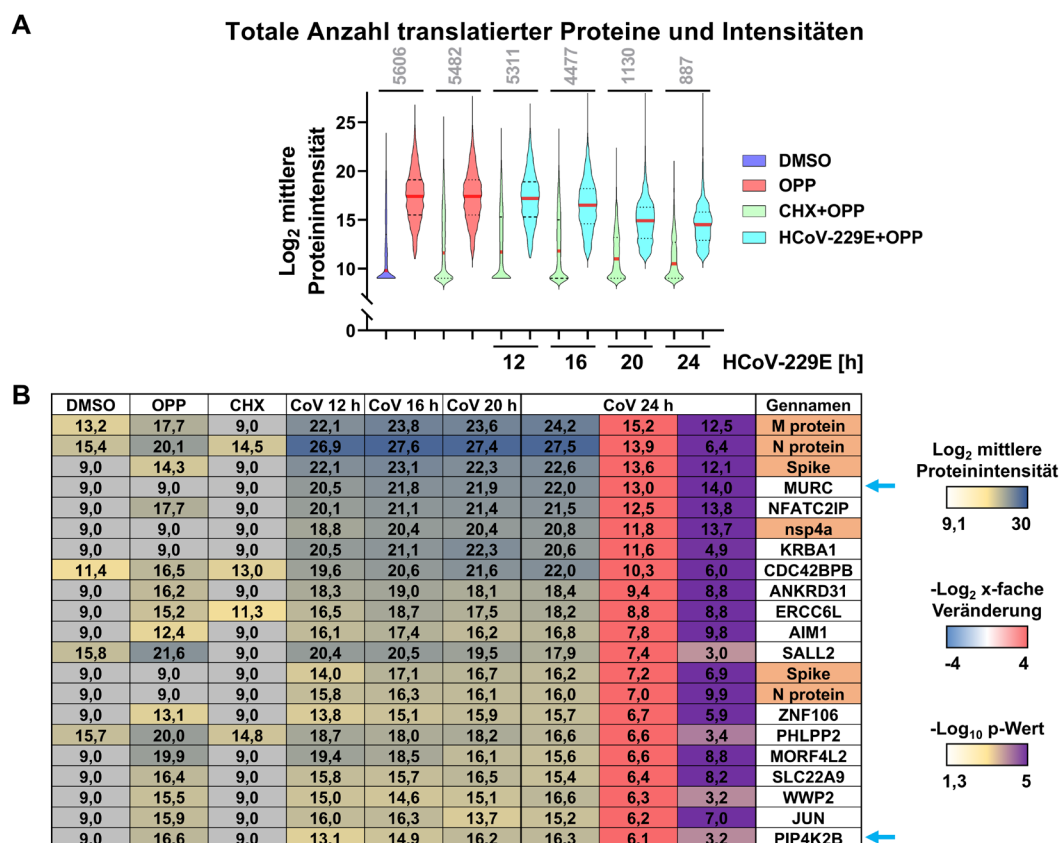


Abb. 51 Top 21 HCoV-229E-induzierte naszierende Proteine

(A) Violinplots der Gesamtanzahl (in grau) der nach OPP-Markierung gemessenen naszierenden Proteine sowie deren mittlere Intensitäten nach Zugabe von Cycloheximid (CHX, 10 µg/ml, 3 h), HCoV-229E (MOI 1; 12, 16, 20, 24 h) aus zwei biologisch unabhängigen Replikaten. (B) Tabellarische Darstellung der 21 am stärksten während einer HCoV-229E-Infektion von Huh7 Zellen neu synthetisierten Proteine, welche nach OPP-Markierung mittels Massenspektrometrie

identifiziert und quantifiziert wurden. Die Daten stammen aus einer nicht publizierten Studie der AG Kracht. Dargestellt sind die mittleren Log_2 Proteinintensitäten der aufgereinigten naszierenden Proteinfraktion. Zudem ist für 24 h HCoV-229E-Infektion die $-\text{Log}_2$ x-fache Veränderung und die Signifikanz ($-\text{Log}_{10}$ p-Wert) angegeben. Das Violindiagramm und die Tabelle wurden von Prof. Michael Kracht erstellt und zur Verfügung gestellt.

4.4.1. Beeinflussung der naszierenden Proteine durch HCoV-229E

Die Massenspektrometrie-basierte Auswertung der OPP-Markierung identifizierte PIP4K2B als HCoV-229E-reguliertes Protein, welches durch eine Western-Blot-Analyse der naszierenden Proteine zusätzlich bestätigt werden sollte. Hierzu wurden Huh7 Zellen mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 24 h). Als Referenz für eine maximale Hemmung der Translation wurde Cycloheximid (10 $\mu\text{g/ml}$, 3 h) verwendet. Die Zugabe von OPP (30 μM) oder DMSO (0,3 %), als Lösungsmittelkontrolle, erfolgte für 2 h. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Im Anschluss wurde eine Click-Reaktion, Proteinpräzipitation und der *pulldown* der naszierenden Proteine durchgeführt. Die Proteindetektion erfolgte für die Gesamtzelllysate, die *in vitro* markierten Lysate (Click-Lysate) und die aufgereinigte naszierende Proteinfraktion (*pulldown*) mittels der Western-Blot-Analyse.

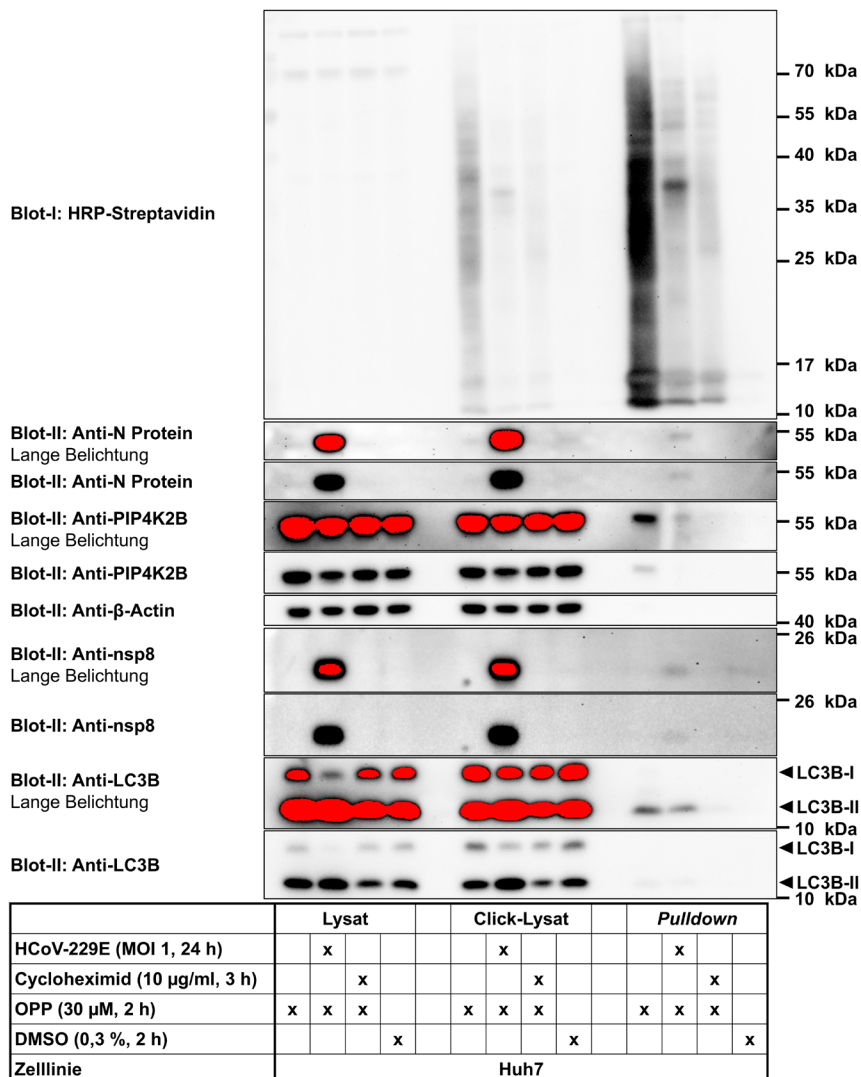
Die Inkubation mit HRP-Streptavidin ermöglichte die Visualisierung von biotinylierten Proteinen, welches in den Ausgangslysaten vor der Durchführung der Click-Reaktion keine unspezifischen Signale detektierte (Abb. 52 A). Nach der Click-Reaktion und in der aufgereinigten Proteinfraktion wurde ein Bandenmuster der naszierenden Proteine nach HCoV-229E-Infektion beobachtet, welches der Cycloheximid-Behandlung als Negativkontrolle entsprach und somit die ausgeprägte translationale Hemmung zeigte (Abb. 52 A, B). Die Lösungsmittelkontrolle DMSO wies kein Signal auf, welches die Spezifität der OPP-Markierung bestätigte.

Der Nachweis von N Protein und nsp8 in den Gesamtzelllysaten, *in vitro* markierten Lysaten und schwach im *pulldown* demonstrierte die erfolgreiche Infektion (Abb. 52 A). PIP4K2B wurde trotz niedriger Abundanz ebenso in allen Lysatarten detektiert. Die Quantifizierung zeigte in den Gesamtzelllysaten und *in vitro* markierten Lysaten eine leichte Abnahme der Proteinmenge infolge der Infektion oder der Cycloheximid-Behandlung (Abb. 52 B). Im Gegensatz hierzu wurden im *pulldown* eine Zunahme der Synthese nach Infektion gegenüber Cycloheximid registriert, welche verglichen zu unbehandelten Zellen allerdings schwächer ausfiel.

Die Detektion von LC3B-I/II veranschaulichte die charakteristische Zunahme von LC3B-II nach Infektion, während die Proteinmenge von LC3B-I in den Gesamtzelllysaten und *in vitro* markierten Lysaten abnahm (Abb. 52 A). Die Behandlung mit Cycloheximid

resultierte in einer Reduktion beider Proteine. LC3B-I war im *pulldown* nicht sichtbar, während die lipidierte Form LC3B-II auch in infizierten Zellen erfasst wurde (Abb. 52 B).

A



B

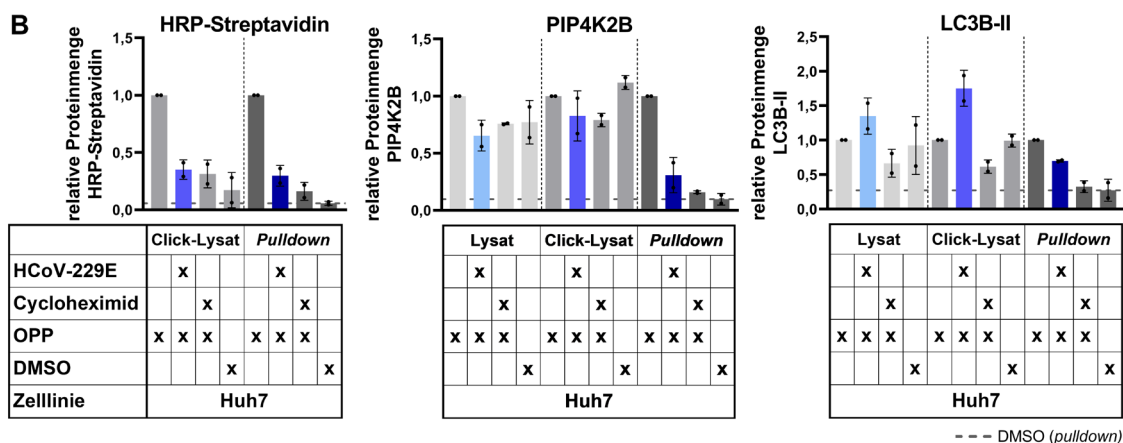


Abb. 52 Nachweis der erhaltenen Translation von PIP4K2B und LC3B-II in HCoV-229E-infizierten Zellen

(A) Huh7 Zellen wurden für 24 h mit HCoV-229E (MOI 1) infiziert oder 3 h mit Cycloheximid (10 µg/ml) behandelt. 2 h vor Ende der Inkubation erfolgte die Zugabe von OPP (30 µM) oder

DMSO (0,3 %). Die Zellen wurden geerntet, lysiert, mittels einer Click-Reaktion biotinyliert und die markierten Proteine wurden im pulldown durch Streptavidin-Beads von dem restlichen Proteom separiert. Die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse. Dargestellt ist ein repräsentatives biologisches Replikat. (B) Die relative Quantifizierung von HRP-Streptavidin, PIP4K2B und LC3B-II von zwei biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf das jeweils unbehandelte Gesamtzelllysate, in vitro markierte (Click-)Lysat und den pulldown. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die gestrichelte Linie zeigt das Hintergrundsignal als den Mittelwert des Signals nach DMSO-Behandlung im pulldown.

Zusammengenommen wurde der Befund der Massenspektrometrie-basierten Analyse der naszierenden Proteine zu PIP4K2B bestätigt und eine vorhandene Restsynthese entgegen der globalen translationalen Hemmung der meisten Proteine nach HCoV-229E-Infektion auf einem allerdings schwachen Niveau nachgewiesen. In diesen Versuchen war eine Analyse von MURC nicht möglich, da trotz umfassender Testung kein spezifischer kommerzieller Antikörper für Western-Blot-Analysen gefunden wurde.

4.4.2. Erfassung der Synthese von PIP4K2B und MURC durch eine Puromycin-Markierung

Die OPP-basierte massenspektrometrische Analyse der naszierenden Proteine zeigte eine erhöhte Synthese für MURC trotz der HCoV-229E-bedingten Translationshemmung, jedoch war die Bestätigung der Befunde durch eine Western-Blot-Analyse technisch nicht möglich. Daher sollte als orthogonaler Assay ein *proximity ligation assay* in Kombination mit einer Puromycin-Markierung angewandt werden. Als Kontrollbedingungen der spezifischen Bindung der Antikörper dienten PIP4K2- und MURC-defizienten Zelllinien deren Generierung und Charakterisierung in Kapitel 4.4.3 detailliert erläutert wird. Zur Quantifizierung der PLA-Spots wurde eine Auswertung durch Cellpose und Cellprofiler/Excel eingeführt.

Der Puro-PLA mittels PIP4K2B-Antikörper zeigte in unbehandelten Zellen zahlreiche Spots, welche infolge der HCoV-229E-Infektion (MOI 1, 12 h oder 24 h) eine starke Zellvariabilität aufzeigten, während Cycloheximid (10 μ g/ml, 1 h) die Translation blockierte (Abb. 53 A, Abb. Anhang 8). Die Quantifizierung der PIP4K2B-Synthese für unbehandelte Leervektorzelle zeigte einen niedrigen Syntheseelevel mit einem Median von 28 Spots/Zelle (Abb. 53 B). Der Median war 12 h nach Infektion leicht reduziert, während er nach 24 h auf 33 Spots/Zelle anstieg, welches die zeitabhängige Proteinsynthese der OPP-Markierungsdaten rekapituliert. Die unbehandelten PIP4K2B-defizienten Zellen zeigten nur wenige PLA-Spots, wodurch die PIP4K2B-Antikörperspezifität bestätigt wurde. Eine methodische Limitation war, dass die alleinige Verwendung des Puromycin-Antikörpers ein starkes unspezifisches Signal aufwies, wodurch sich das schwache PIP4K2B-spezifische Signal nur wenig vom

Hintergrundrauschen abhob. Die Inkubation ohne beide Primärantikörper oder nur mit PIP4K2B-Antikörper zeigte kein Auftreten von Spots, welches die erwähnte Problematik auf den Puromycin-Antikörper eingrenzte. Zudem wurde eine erhöhte Anzahl an PLA-Spots in infizierten *PIP4K2B knockout*-Zellen erfasst, dessen Ursache auf die unspezifische Bindung des Antikörpers an virale Faktoren vermutet werden kann.

Die erheblich stärkere Syntheserate von MURC gegenüber PIP4K2B, welche bereits in der massenspektrometrischen Analyse der naszierenden Proteine erfasst wurde, konnte durch den Puro-PLA bestätigt werden (Abb. 53 A). Zudem zeigte sich in unbehandelten sowie HCoV-229E-infizierten Zellen eine starke Heterogenität der Bildung von MURC innerhalb der Zellpopulation. In MURC-defizienten Zellen war die Anzahl der Spots nur geringfügig reduziert, jedoch die Intensität deutlich niedriger. Mögliche Gründe hierfür sind eine Restsynthese oder unspezifische Bindung des Antikörpers an die CAVIN-Isoformen. Aufgrund dessen wurde ein Intensitätsgrenzwert festgelegt, welcher schwach fluoreszierende Spots und eventuelle Hintergrundsignale aus der Auswertung entfernte und folglich nur relevante PLA-Spots quantifizierte (Abb. 53 C). Der Median für unbehandelte Leervektorzellen betrug 110 Spots pro Zelle, während die Infektion mit HCoV-229E diesen auf 131 Spots pro Zelle steigerte und Cycloheximid erfolgreich die Translation blockierte. Durch die starke Syntheserate von MURC war das gemessene unspezifische Signal der PLA-Kontrollen im Hintergrund zu vernachlässigen. Hervorzuheben ist, dass infizierte *MURC knockout*-Zellen einen Hintergrund aufzeigten, welcher analog zu den infizierten *PIP4K2B knockout*-Zellen war. Hierbei kann als Ursache erneut eine unspezifische Bindung des Antikörpers an virale Komponenten vermutet werden.

Schlussfolgernd konnte trotz der technischen Limitationen eine entgegen der translationalen Hemmung von HCoV-229E gesteigerte Synthese von PIP4K2B und MURC mittels zweier orthogonaler Methoden nachgewiesen werden.

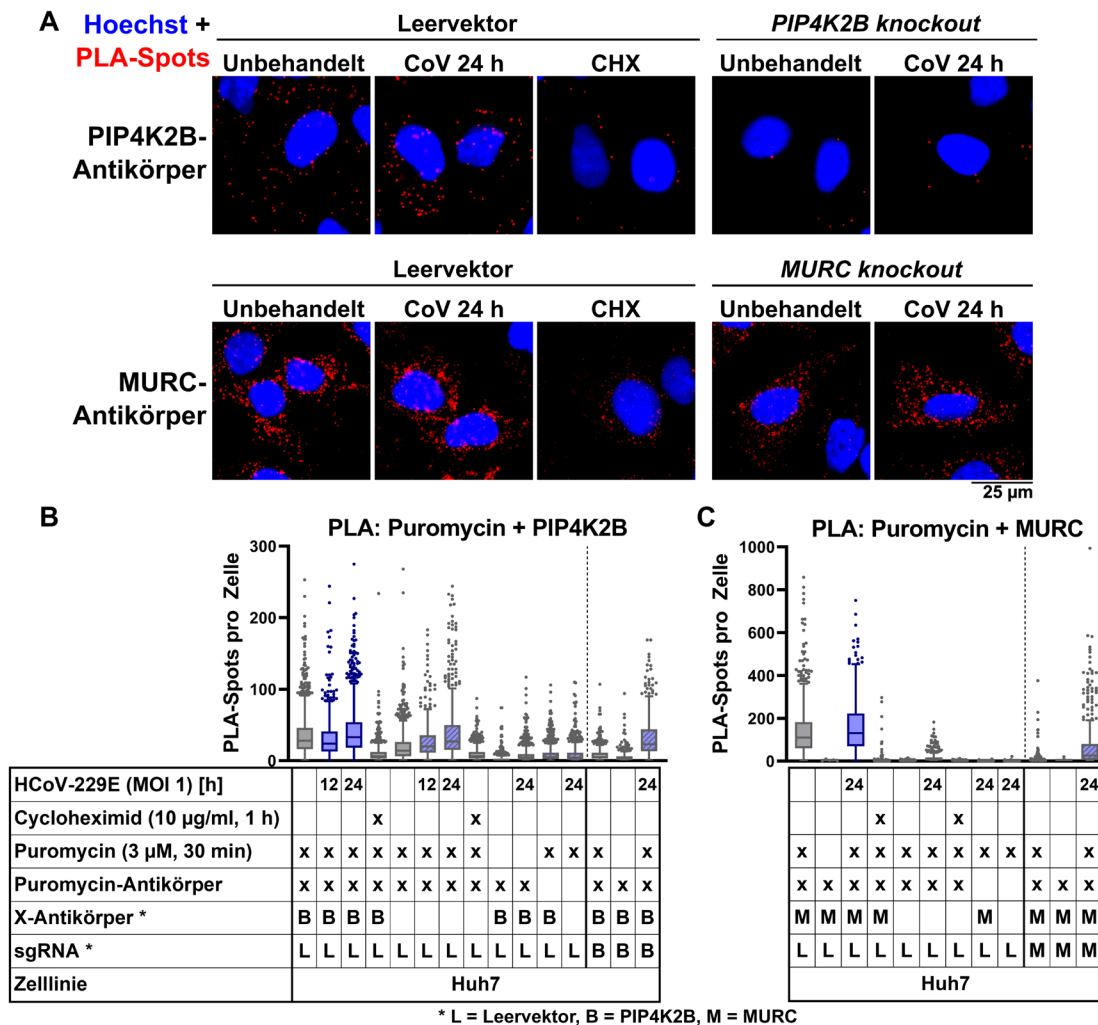


Abb. 53 Erfassung der Synthese von PIP4K2B und MURC nach HCoV-229E-Infektion mittels Puro-PLA

(A) Huh7 Leervektor- oder MURC bzw. PIP4K2B knockout-Zellen wurden mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 12/24 h). Es erfolgte die Behandlung mit Cycloheximid (10 µg/ml, 1 h) und die Puromycin-Markierung (3 µM) für 30 min. Der PLA wurde mit Primärantikörpern gerichtet gegen Puromycin und gegen PIP4K2B oder MURC durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach. (B) Gezeigt ist die Quantifizierung der PLA-Spots pro Zelle mit PIP4K2B-Antikörper durch Cellpose und Cellprofiler für ein bis drei biologische Replikate (347 bis 1533 Zellen pro Behandlung). (C) Dargestellt ist die Quantifizierung der PLA-Spots pro Zelle mit MURC-Antikörper durch Cellpose, Cellprofiler und Excel inklusive Definierung eines Grenzwertes für die Intensität der Spots. Es wurde ein biologisches Replikate angefertigt mit 319 bis 697 Zellen pro Behandlung.

4.4.3. CRISPR-Cas9-basierte Generierung von PIP4K2- und MURC-defizienten Zelllinien und Einfluss auf die virale Replikation

Im Folgenden wurden genomeditierte stabile Zelllinien hergestellt, um die Funktion der PIP4K2-Isoformen und MURC in HCoV-229E-infizierten Zellen aufzuklären. Abb. 54 zeigt eine schematische Darstellung des Vorgehens. Hierbei wurden jeweils drei verschiedene gegen die drei Isoformen von PIP4K2 (PIP4K2A, PIP4K2B und PIP4K2C) bzw. gegen MURC gerichtete sgRNAs erstellt, welche in das lentivirale Transferplasmid

LentiCRISPR-v2 eingebracht wurden. Die Transfektion von HEK293FT Zellen mit dem klonierten Vektor sowie den Helferplasmiden psPAX2 und pMD2.G führte zur Produktion infektiöser lentiviraler Partikel, mit welchen Huh7, HeLa und/oder A549⁺⁺ Zellen transduzierten wurden. Um die *knockout*-Effizienz zu maximieren, wurden die Zielzellen jeweils mit Gemischen aus den drei Lentiviruspräparationen infiziert, d.h. die drei sgRNAs wurden in Kombination eingesetzt.

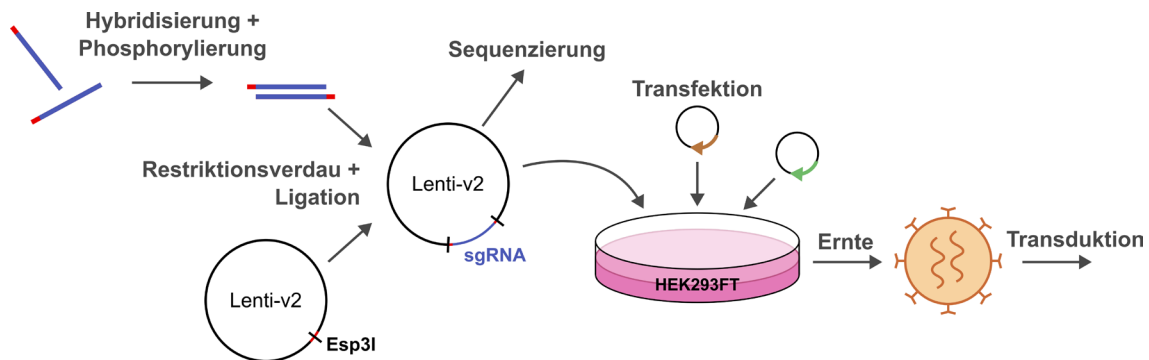


Abb. 54 Generierung von knockout-Zelllinien mit dem Leervektor LentiCRISPR-v2

Der Leervektor LentiCRISPR-v2 (Lenti-v2) wurde durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym Esp3I geschnitten. Hybridisierte und phosphorylierte sgRNAs wurden mit dem Vektor ligiert. Der klonierte Vektor wurde durch eine Sanger-Sequenzierung auf den korrekten Einbau der sgRNAs geprüft. Zusammen mit zwei Helferplasmiden wurde der Vektor in HEK293FT Zellen transfiziert. Die Lentiviren enthaltenden Überstände wurden geerntet und zur Transduktion von Huh7, HeLa und/oder A549⁺⁺ Zellen genutzt.

Die transduzierten Zellen wurden für sieben Tage durch Puromycin (1 µg/ml) selektiert. Zur Herstellung von doppelten oder dreifachen *knockout*-Zelllinien der verschiedenen Isoformen von PIP4K2 erfolgte nach Selektionsende erneut eine Transduktion mit einem optimierten Lentivirusüberstand. Der Nachweis des Depletion von PIP4K2 in A549⁺⁺ und Huh7 Zellen sowie der Einfluss einer HCoV-229E-Infektion (MOI 1, 24 h) wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 55).

Es konnte eine ausgeprägte Depletion infolge der jeweiligen *knockouts* von *PIP4K2A*, *PIP4K2B* und *PIP4K2C* bestätigt werden, wobei die dreifachen *knockout*-Zellen, insbesondere A549⁺⁺ Zellen, eine geringe Restsynthese von PIP4K2A, allerdings unterhalb der basalen Level der Leervektorzellen, zeigten (Abb. 56 A, B). Die Infektion mit HCoV-229E reduzierte jeweils die Proteinmengen der Kinasen, sofern kein *knockout* vorhanden war. Zudem führte die Depletion aller Isoformen zu einem verlangsamten Wachstum, welches möglicherweise essentielle Funktionen der Proteine aufzeigte.

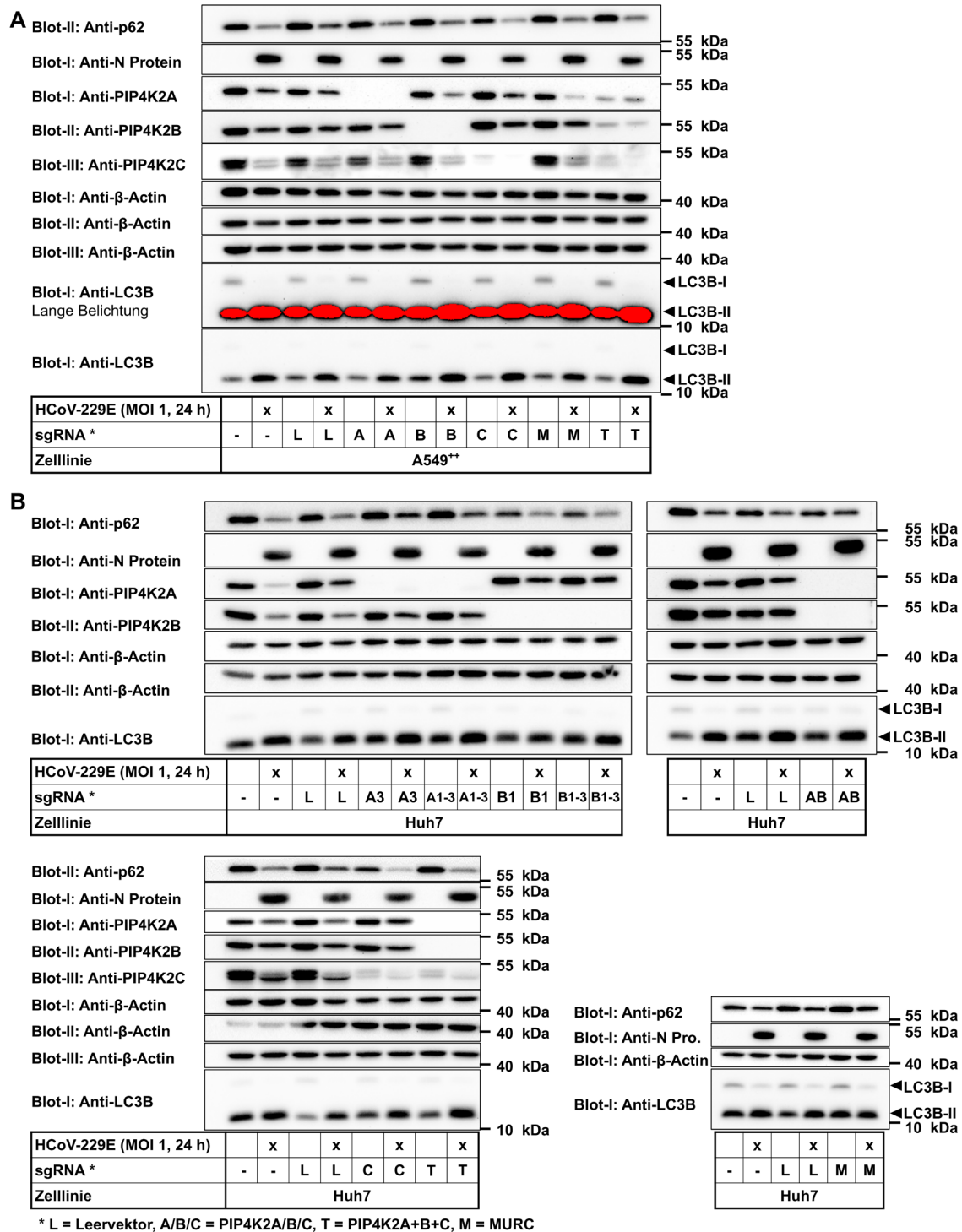


Abb. 55 Erfolgreiche stabile Depletion von PIP4K2-Isoformen

A549⁺⁺ (A) und Huh7 (B) Zellen wurden lentiviral mit dem Leervektor LentiCRISPR-v2 oder mit den klonierten PIP4K2- oder MURC-Vektoren für die Generierung von knockout-Zellen transduziert. Sofern angegeben indizieren die Zahlen 1 – 3 die verwendeten sgRNAs. Bei fehlender Angabe wurde die Transduktion durch Kombination der jeweiligen drei sgRNAs durchgeführt. Es erfolgte die Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei bis zwölf biologischen Replikaten.

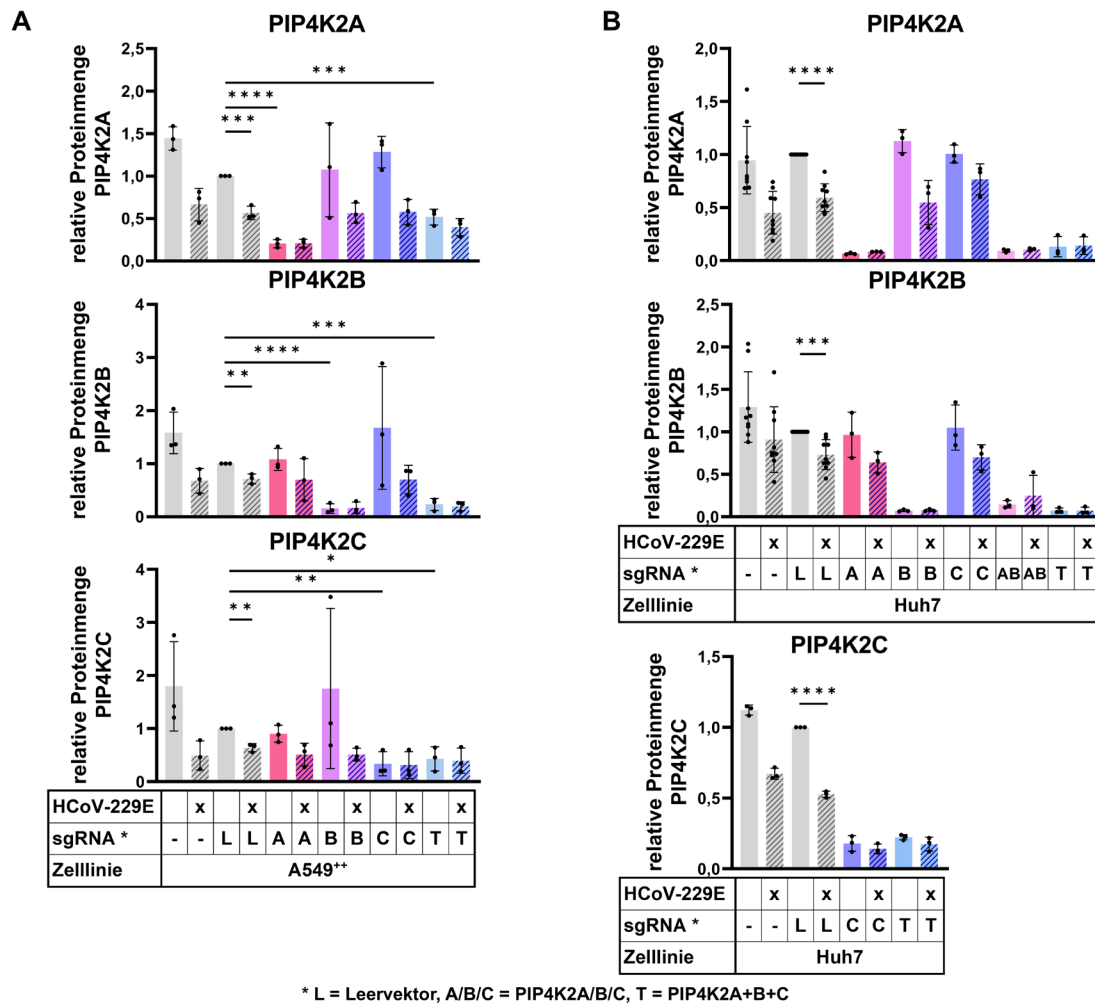


Abb. 56 Quantitative Analyse der PIP4K2-Depletion

(A) Die relative Quantifizierung der Isoformen von PIP4K2 für die in Abb. 55 A gezeigte Western-Blot-Analyse von drei biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die unbehandelten Leervektorzellen. (B) Gleiche Quantifizierung für die Abb. 55 B gezeigte Western-Blot-Analyse mit drei bis zwölf biologischen Replikaten. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Die Quantifizierung der Synthese von N Protein, zur Erfassung eventueller Effekte auf die Virusreplikation, zeigten für A549⁺⁺ Zellen mit einer Depletion von PIP4K2A und PIP4K2C eine nicht signifikante Reduktion des viralen Proteins (Abb. 57 A). Demgegenüber wurde eine leicht gesteigerte Proteinmenge in Huh7 Zellen mit einem *knockout* für PIP4K2B und der Kombination aller PIP4K2-Isoformen beobachtet. Zusätzlich wurden der virale Titer in den Überständen der Zellen mittels Plaque-Assay bestimmt (Abb. 57 B). In A549⁺⁺ Zellen wurde eine Abnahme des Titers für den dreifachen *knockout* gegenüber Leervektorzellen im Mittel um 65 % quantifiziert (Abb. 57 C). Im Gegensatz dazu zeigten Huh7 Zellen eine Reduktion für die Einzel-*knockouts* von PIP4K2B (65 %) und PIP4K2C (41 %) sowie den dreifachen *knockout* (45 %).

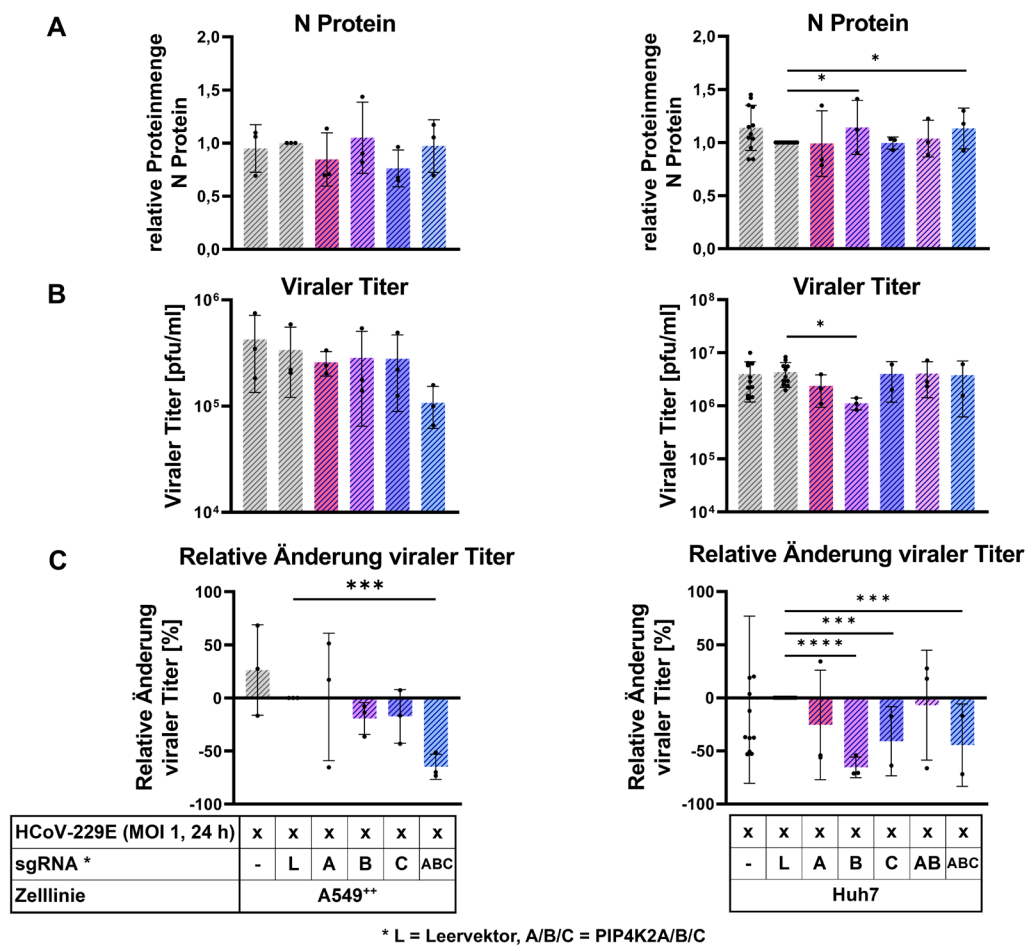


Abb. 57 Differenzielle Effekte der PIP4K2-Depletion auf die Replikation von HCoV-229E

(A) Die relative Quantifizierung der N Proteinlevel der in Abb. 55 gezeigten Western-Blot-Analyse von drei bis zwölf biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die unbehandelten Leervektorzellen der jeweiligen Zelllinie. (B) Die Überstände der Zellen wurden für die Bestimmung der viralen Titer durch einen Plaque-Assay verwendet. (C) Dargestellt ist die relative Änderung der viralen Titer in Prozent bezogen auf die Leervektorkontrolle der jeweiligen Zelllinie. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Die Western-Blot-Analyse bestätigte die erfolgreiche Depletion der drei PIP4K2-Isoformen, wobei ein Restsignal der Kinasen zwischen 6 % und 50 % detektiert wurde, entweder, weil nicht alle Zellen erfolgreich mit sgRNAs und Cas9 transduziert wurden, oder wahrscheinlicher in den transduzierten Zellen nicht alle vorhandenen Allele komplett editiert wurden. Zudem konnten zelllinienspezifische, moderate Unterschiede auf den viralen Titer festgestellt werden. Daher wurden einzelzellbasierte Analysen der dsRNA-Bildung nach einer indirekten Immunfluoreszenz mit einem gegen FLAG-gerichteten Antikörper in *knockout*-Zellen durchgeführt, um feinere Unterschiede in der Wirtszellreaktion und Virusreplikation besser zu quantifizieren. Das FLAG-Peptid war an Cas9 gekoppelt, welches Aufschluss über die erfolgreiche Transduktion gab und zudem anstelle der Phasenkontrastbilder zur späteren Zellsegmentierung diente, da die

Synzytienbildung durch HCoV-229E und die *knockout*-bedingten morphologischen Veränderungen der Zellen die digitale Zellerkennung erschwerten, während die homogene Verteilung des FLAG-Antikörpers eine genauere Erfassung ermöglichte.

Die mikroskopische Betrachtung des FLAG-Signals zeigte die erfolgreiche Transduktion in der Mehrheit der A549⁺⁺ Zellen und das dsRNA-Signal wurde in Zellkernnähe nach HCoV-229E-Infektion beobachtet, während die IF-Kontrolle ohne Primärantikörper ein geringes Hintergrundsignal bestätigte (Abb. 58 A, Abb. Anhang 9). Die automatisierte Auswertung zeigte eine Absenkung des Anteils an infizierten Zellen infolge des *PIP4K2A* *knockouts* sowie für alle doppelten/dreifachen *knockouts*, welche *PIP4K2A* beinhalteten (*PIP4KA+B*, *PIP4K2A+C*, *PIP4K2A+B+C*), von 88 % auf 84 % bis zu 79 % der Zellen (Abb. 58 B). Die kombinierte Depletion von PIP4K2B und PIP4K2C bewirkte eine leichte, nicht signifikante Reduktion der infizierten Zellen. Die Quantifizierung des mittleren zellulären dsRNA-Signals illustrierte eine starke Abnahme in den doppelten *knockouts* von *PIP4K2*, welche bei kombinierter Depletion aller Isoformen abgeschwächt war und auf die in der vorherigen Western-Blot-Analyse gezeigte geringe Restexpression von PIP4K2A zurückgeführt werden kann (Abb. 58 C, Abb. 55 B). Die Einzel-*knockouts* der PIP4K2-Isoformen wiesen keine Veränderungen des mittleren Signals auf (Abb. 58 C).

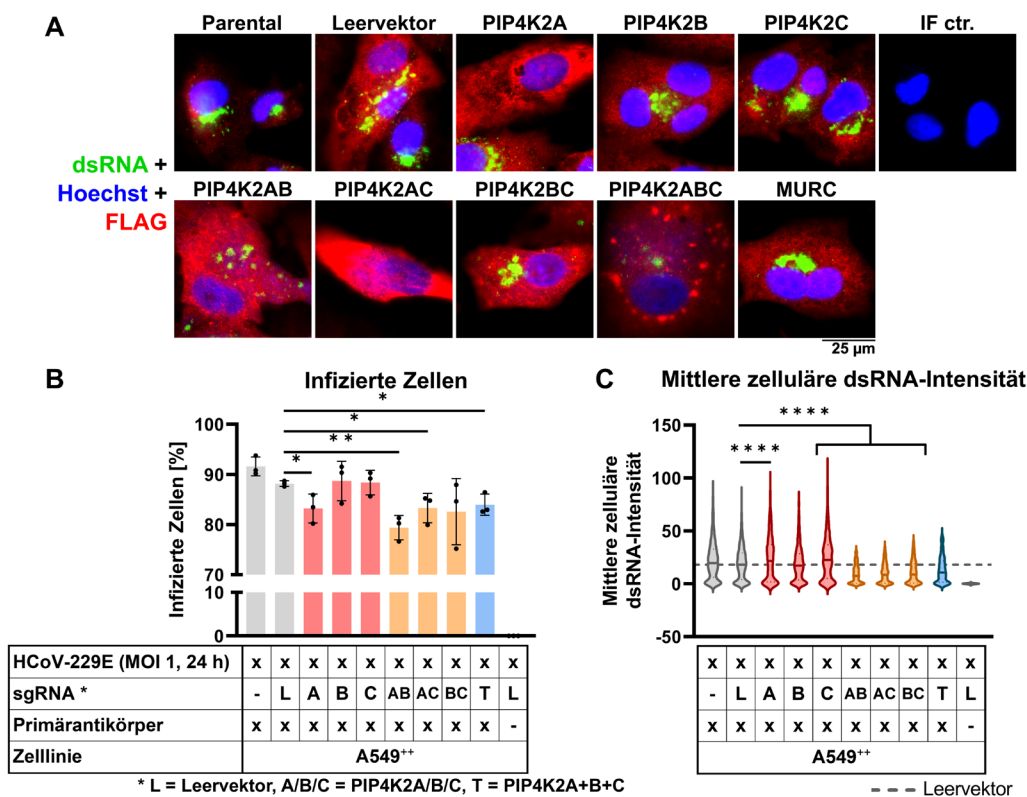


Abb. 58 Isoformenspezifische Inhibition der HCoV-229E dsRNA-Synthese in PIP4K2-defizienten A549⁺⁺ Zellen

(A) A549⁺⁺ Zellen wurden lentiviral mit dem Leervektor LentiCRISPR-v2 oder mit dem klonierten Vektor, welcher sgRNAs gegen die PIP4K2s oder MURC enthielt, transduziert. Die Zellen wurden

mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infiziert. Es erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz mit Primärantikörpern gerichtet gegen dsRNA (SCICONS/Nordic-Mubio, #10010200) und FLAG sowie den Sekundärantikörpern Cy3-gekoppelte anti rabbit IgG und Dylight488-gekoppelte anti mouse IgG. Dargestellt sind repräsentative Bilder infizierter Zellen eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach. (B) Die Quantifizierung der infizierten Zellen erfolgte durch Cellpose, Cellprofiler und Excel für drei biologische Replikate (588 bis 1602 Zellen pro Behandlung). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test. (C) Darstellung der mittleren zellulären dsRNA-Intensität für die zusammengeführten Zellen der drei biologischen Replikate. Für das Violindiagramm wurden Ausreißer durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$).

Im Zuge der mikroskopischen Analyse fiel auf, dass die Depletion von PIP4K2 zu Unterschieden in der Zellgröße führte (Abb. 59). Nach Infektion mit HCoV-229E zeigte sich eine leichte nicht signifikante Zunahme der Zellfläche in parentalen, Leervektor- und den PIP4K2B-defizienten Zellen, während der *PIP4K2A knockout* keine Veränderungen und *PIP4K2C knockout* nur eine geringe Zunahme zeigten, welches auf eine Reduktion der Replikation des Virus hindeutete. Zudem kam es zur Verdopplung bis Verdreifachung der Zellfläche durch die kombinierte Depletion der PIP4K2-Isoformen, jedoch wurde hier im Gegensatz zu dem *PIP4K2A Einzel-knockout* weiterhin eine Zunahme der Fläche nach Infektion festgestellt.

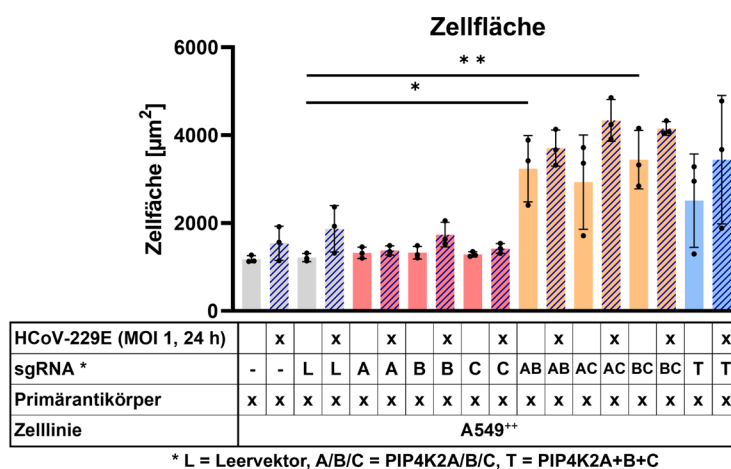


Abb. 59 Modulation der Zellfläche durch Verlust von PIP4K2-Isoformen und Infektion mit HCoV-229E

Quantifizierung der Zellfläche von A549⁺⁺ Zellen nach einer indirekten Immunfluoreszenz gezeigt in Abb. 58. Die Auswertung erfolgte durch Cellpose, Cellprofiler und Excel für drei biologische Replikate (588 bis 1602 Zellen pro Behandlung). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Weiterführend wurde aus den gemessenen Parametern eine Korrelationsmatrix für infizierte Leervektorzellen erstellt, um eventuelle Zusammenhänge der Bildung von dsRNA und der Zellfläche zu identifizieren (Abb. 60). Es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen der Zellfläche und dem integrierten (aufsummierten) dsRNA-Signal.

Zudem herrschte ein starker Zusammenhang zwischen dem mittleren zellulären Signal und dem mit dsRNA-bedeckten Anteil der Zellfläche. Dies veranschaulichte, dass große Zellen eine starke Produktion von dsRNA aufwiesen, vereinbar mit einer Zellflächenzunahme nach der Infektion mit HCoV-229E. Im Hinblick auf die *knockout*-Zellen, welche starke Veränderungen der Zellfläche verursachten, war es folglich wichtig, diesen Zusammenhang ebenfalls zu quantifizieren.

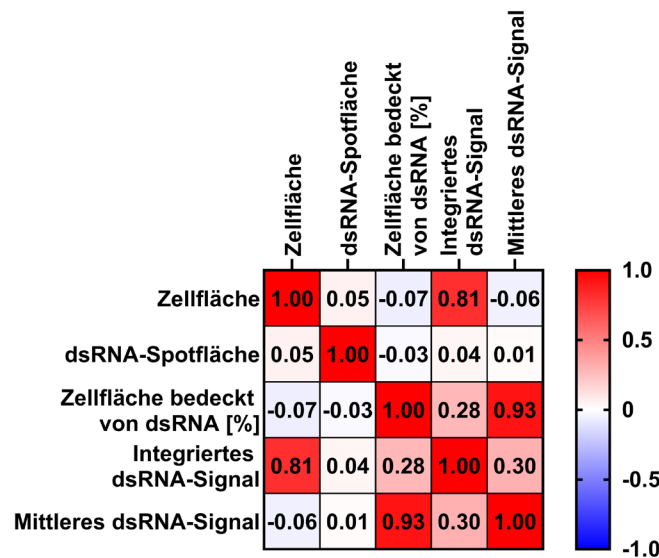


Abb. 60 Zusammenhänge von dsRNA-Spots und der Zellfläche in infizierten Zellen

Die Pearson-Korrelationsmatrix wurde für die zusammengeführten infizierten Leervektorzellen von drei biologischen Replikaten (1254 Zellen) des in Abb. 58 beschriebenen Experimentes in Graphpad Prism erstellt. Die Farbskala visualisiert den Pearson-Korrelationskoeffizienten r .

Auf Grundlage der vorherigen Erkenntnisse wurden Bubbleplots erstellt, welche zellindividuelle Unterschiede der mit dsRNA-bedeckten Zellfläche in Abhängigkeit vom mittleren zellulären dsRNA-Signal abbildeten, wobei die Zellfläche durch die Bubblegröße und das integrierte dsRNA-Signal farblich dargestellt wurde (Abb. 61). Für Leervektorzellen zeigte sich eine fast perfekte lineare Beziehung der dsRNA-bedeckten Fläche zum mittleren dsRNA-Signal. Die Depletion von PIP4K2A bewirkte einen leicht reduzierten Korrelationskoeffizienten aufgrund stärkerer zellulärer Heterogenität. Zudem stieg für *PIP4K2A* und *PIP4K2C* *knockout*-Zellen das mittlere dsRNA-Signal sowie der Anteil der dsRNA-Fläche in den Zellen an, während die *PIP4K2B*-Depletion keinen Unterschied zu Leervektorzellen zeigte. In den Doppel-*knockout*-Zellen wurde die starke Reduktion des mittleren zellulären Signals und des dsRNA-Flächenanteils detektiert mit steigender Zellfläche, welche für die dreifachen *knockout*-Zellen schwächer ausfiel.

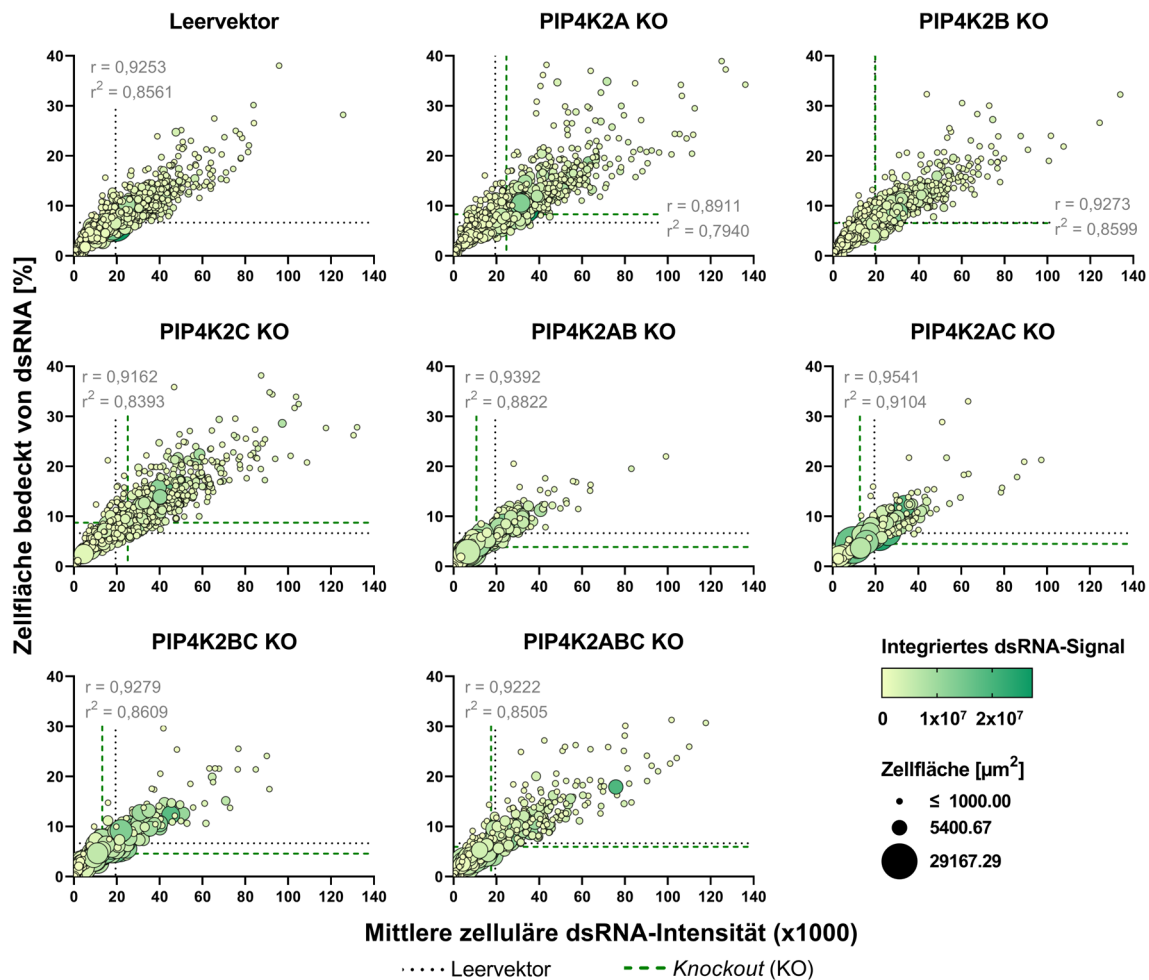


Abb. 61 Einfluss der Depletion der PIP4K2-Isoformen auf die dsRNA-bedeckte Zellfläche in Abhängigkeit der dsRNA-Intensität

Dargestellt ist die Auswertung von HCoV-229E-infizierten A549⁺⁺ knockout-Zellen (KO) für drei zusammengeführte biologische Replikate des in Abb. 58 beschriebenen Experimentes. Die Graphen zeigen die prozentual von dsRNA-bedeckte Zellfläche im Verhältnis zu ihrem mittleren zellulären dsRNA-Signal. Die Farbe der Bubbles gibt das integrierte dsRNA-Signal wieder und ihre Größe die gemessene Zellfläche. Der Pearson-Korrelationskoeffizient r und das Bestimmtheitsmaß r^2 wurden für die Zellfläche bedeckt von dsRNA bezogen auf die mittlere zelluläre dsRNA-Intensität durch Graphpad Prism berechnet.

Zusammengenommen implizieren diese Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen der redundanten Expression von PIP4K2-Isoformen und frühen Phasen der Virusreplikation. Der Verlust von PIP4K2A resultierte in dem stärksten Phänotyp in A549⁺⁺ Zellen und der doppelte/dreifache *knockout* der PIP4K2s zeigte stärkere Effekte als ein Einzel-*knockout*, vereinbar damit, dass die drei PIP4K2-Isoformen sich gegenseitig funktionell kompensieren könnten. Die genetische Perturbation der PIP4K2 verursachte Veränderungen der Zellfläche, woraus abgeleitet werden kann, dass dieses Enzymsystem globale und fundamentale Parameter der Zellmorphologie beeinflusst.

Ergänzend erfolgte die Durchführung der Experimente in MURC-defizienten Zellen, dessen Depletion aufgrund des fehlenden funktionalen Antikörpers nicht bestätigt

werden konnte. In Huh7 Zellen führte der *MURC knockout* zu einer leichten Reduktion der N Proteinmenge sowie einer Abnahme des viralen Titors um 50 %, während in A549⁺⁺ Zellen kein Effekt auf die Virusreplikation beobachtet wurde (Abb. 62).

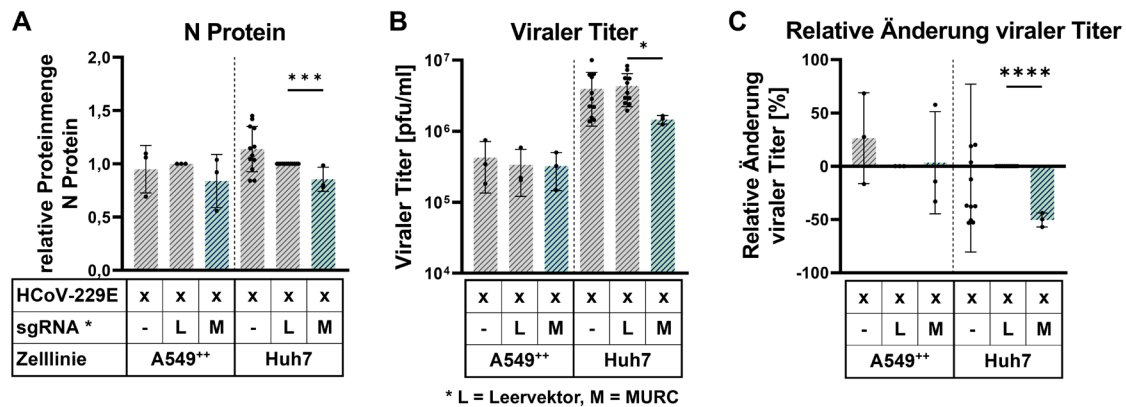


Abb. 62 Zelllinienspezifische Hemmung der viralen Replikation nach einer MURC-Depletion

(A) Die relative Quantifizierung des N Proteins der in Abb. 55 gezeigten Western-Blot-Analyse von drei bis zwölf biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die Leervektor transduzierte, unbehandelte Probe der jeweiligen Zelllinie. (B) Die Überstände der Zellen wurden für die Bestimmung der viralen Titer durch einen Plaque-Assay verwendet. (C) Dargestellt ist die relative Änderung der viralen Titer in Prozent bezogen auf die Leervektorkontrolle der jeweiligen Zelllinie. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Des Weiteren zeigte die einzelzellbasierte Analyse der dsRNA-Bildung keine Veränderungen des Anteils an infizierten Zellen oder des mittleren zellulären dsRNA-Signals infolge der Depletion von MURC in A549⁺⁺ Zellen (Abb. 63 A, B). Der Vergleich des Korrelationskoeffizienten zwischen dem prozentual mit dsRNA-bedeckten Flächenanteil und dem mittleren zellulären dsRNA-Signals war in MURC-defizienten Zellen niedriger als in Leervektorzellen aufgrund einer höheren Streuung der Messwerte (Abb. 63 C). Zudem wurden vermehrt Zellen mit einer größeren Zellfläche erfasst, welche ein gesteigertes integriertes dsRNA-Signal zeigten. Die Mittelwerte der dsRNA-bedeckten Fläche sowie der zellulären dsRNA-Intensität waren unverändert. Dieser Effekt kontrastiert mit den Doppel-*knockout*-Zellen für *PIP4K2*, welche eine Reduktion des mittleren Signals zeigten.

Die mikroskopische Analyse wurde für *PIP4K2* und *MURC knockouts* ebenso in Huh7 Zellen durchgeführt ohne signifikanten Effekt auf den Anteil der infizierten Zellen oder die Bildung von dsRNA (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Aufgrund der technischen Einschränkungen eines fehlenden spezifischen Antikörpers für MURC wurde zur weiteren Analyse des Proteins eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt, welche eine schwach positive Korrelation der dsRNA- und MURC-Intensität einer Zelle aufzeigte

(Abb. Anhang 10). Zudem wurde ein siRNA *knockdown* von MURC durchgeführt, wobei keine Effekte auf die N Proteinmenge oder die Menga an *nsp8*-mRNA von HCoV-229E beobachtet wurden (Abb. Anhang 11). Jedoch zeigte sich in einem weiteren Experiment eine gesteigerte, infektionszeitabhängige Bildung von *MURC*-mRNA infolge einer HCoV-229E-Infektion (Abb. Anhang 12). Aufgrund der technischen Limitationen wurde von einer weiterführenden Analyse des Proteins abgesehen.

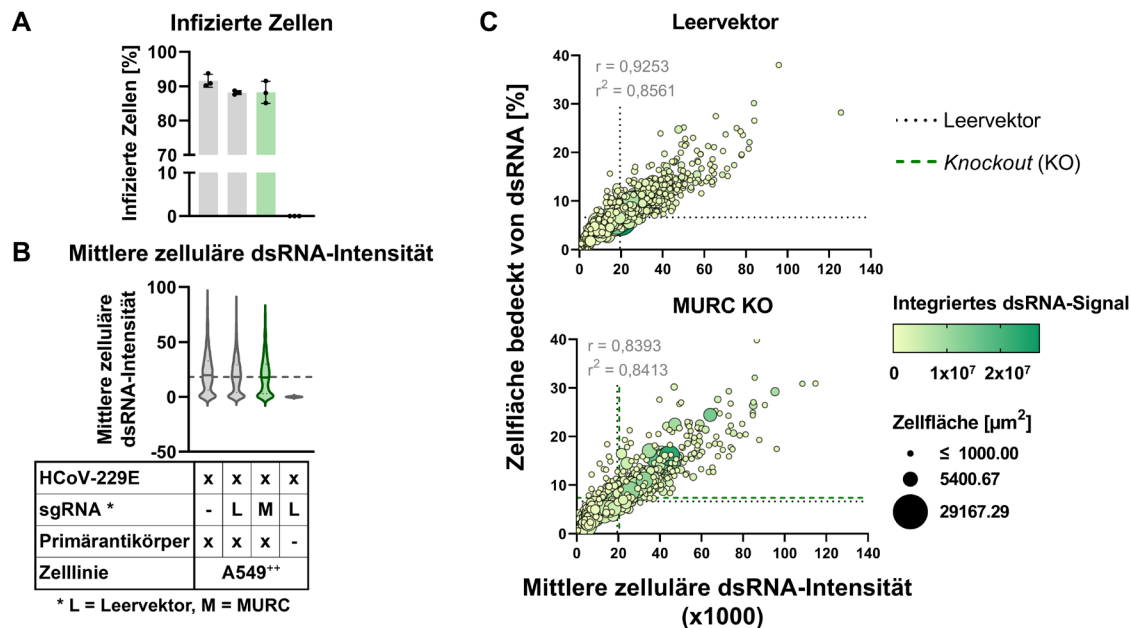


Abb. 63 Beeinflussung der Formation von dsRNA durch eine MURC-Depletion

(A) Quantifizierung der infizierten Zellen des in Abb. 58 A gezeigten Experimentes mittels Cellpose, Cellprofiler und Excel für drei biologische Replikate (588 bis 1602 Zellen pro Behandlung). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test. (B) Darstellung der mittleren zellulären dsRNA-Intensität für die zusammengeführten Zellen der drei biologischen Replikate. Für das Violindiagramm wurden Ausreißer durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt. (C) Die Graphen zeigen die prozentual von dsRNA-bedeckte Zellfläche im Verhältnis zu ihrem mittleren zellulären dsRNA-Signal. Die Darstellung der Leervektorkontrolle aus Abb. 61 erfolgte hier zur verbesserten Vergleichbarkeit erneut. Die Farbe der Bubbles gibt das integrierte dsRNA-Signal wieder und ihre Größe die gemessene Zellfläche. Der Pearson-Korrelationskoeffizient r und das Bestimmtheitsmaß r^2 wurden für die Zellfläche bedeckt von dsRNA bezogen auf die mittlere zelluläre dsRNA-Intensität durch Graphpad Prism berechnet.

4.4.4. Überexpression von katalytisch aktiven und inaktiven PIP4K2

Die PIP4K2-Isoformen beeinflussten die Replikation von HCoV-229E differenziell, einhergehend mit einer Hemmung der dsRNA-Bildung. Hierbei stellte sich die Frage, ob die katalytische Funktion der Kinasen entscheidend ist, oder ob auch anderen Proteindomänen eine Rolle für die beobachteten Phänotypen spielen könnten, so wie bspw. für die PI(4,5)P₂-abhängige Plasmamembranrekrutierung von PIP4K2 mit Aktivitätssenkung von PIP5K (Wills et al., 2023). Hierzu wurden kommerzielle erhältliche Plasmide mit katalytisch aktiven und inaktiven PIP4K2 transient transfiziert und die

Mengenveränderungen des Substrates PI(4,5)P₂ sowie die Replikation von HCoV-229E untersucht (Wills et al., 2023). Zunächst wurde durch eine Western-Blot-Analyse die Transfektion bestätigt.

Es konnte eine starke Überexpression der Konstrukte bei etwa 75 kDa anhand der jeweiligen isoformspezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 64). Der PIP4K2C-Antikörper kreuzreagierte dabei mit den ektopisch exprimierten PIP4K2A- und PIP4K2B-Proteinen, welches nicht in der vorherigen Analyse der *knockout*-Zelllinien beobachtet wurde und daher für eine geringe, erst nach Überexpression sichtbare Affinität spricht. Ferner führte das PIP4K2B-Konstrukt zu einer Zunahme des endogenen PIP4K2B, vermutlich durch Abspaltung des fluoreszierenden Proteinanteils, sowie einer Reduktion des endogenen PIP4K2A. Eine solche Degradation und Gegenregulation konnte nicht für die beiden anderen Kinasen beobachtet werden. Die Proteinmengen der Autophagie-Marker p62 und LC3B-I/II zeigten keine Veränderungen durch die Transfektionen. Dementsprechend kam es gleichermaßen zu einer Abnahme von p62 und LC3B-I sowie einer Zunahme von LC3B-II infolge der Infektion mit HCoV-229E. Die N Proteinmenge war für alle infizierten Konditionen vergleichbar. Des Weiteren war die endogene Proteinmenge der Isoformen von PIP4K2 nach Infektion gegenüber unbehandelten Zellen unabhängig von den transfizierten Plasmiden reduziert.

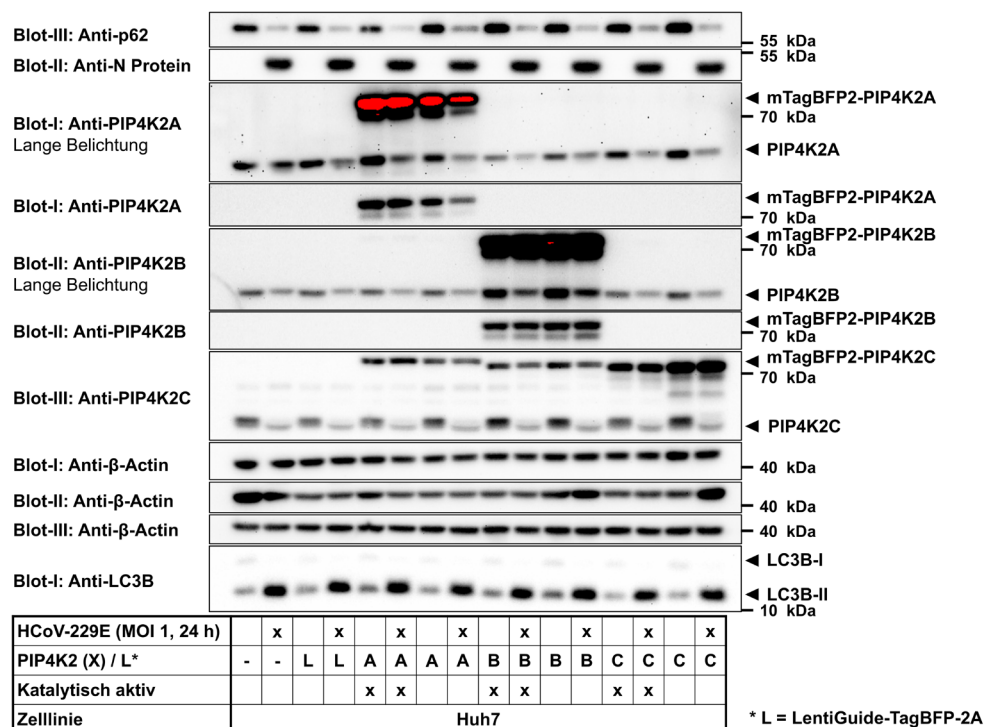


Abb. 64 Nachweis der Überexpression von PIP4K2-Varianten

Huh7 Zellen wurde mittels Calcium-Phosphat mit den Überexpressionvektoren für die katalytisch aktiven/inaktiven PIP4K2 transfiziert und mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 24 h). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion fand durch die Western-Blot-Analyse statt.

Zur verfeinerten Analyse der Auswirkungen der Überexpression auf die Replikation von HCoV-229E wurde eine einzelzellbasierte Auswertung der Bildung und Lokalisation von PI(4,5)P₂ in Bezug auf dsRNA durch eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt (Abb. Anhang 13). Als zusätzlicher Parameter wurden die Zellen auf das Vorhandensein des Fluorophores mTagBFP2 getestet, um die Auswertung auf transfizierte Zellen zu fokussieren.

Der Anteil an infizierten Zellen war in den verschiedenen Transfektionsansätzen unverändert (Abb. 65 A). Die Betrachtung des mittleren zellulären dsRNA-Signals zeigte nach Transfektion des katalytisch aktiven PIP4K2A und des katalytisch inaktiven PIP4K2C eine leichte, nicht signifikante Reduktion, wohingegen für die Transfektion der PIP4K2B-Mutante eine signifikante Abnahme des mittleren Signals detektiert wurde (Abb. 65 B). Der Vergleich des zellulären PI(4,5)P₂-Levels zwischen unbehandelten und HCoV-229E-infizierten Zellen ergab für die Vektorkontrolle keine Veränderung der mittleren Intensität (Abb. 65 C). Infolge der Überexpression von katalytisch aktiven PIP4K2A und PIP4K2C, aber nicht PIP4K2B stieg der Median des zellulären PI(4,5)P₂-Signals, während diese Zunahme nicht für die Mutanten beobachtet wurde. Dies veranschaulichte die primäre Produktion von PI(4,5)P₂ durch PIP4K2A, wobei der Anstieg durch PIP4K2C unerwartet war. Zudem wurde eine Abnahme des zellulären PI(4,5)P₂-Signals bei Transfektion von aktiven/inaktivem PIP4K2A und inaktivem PIP4K2C nach Infektion mit HCoV-229E beobachtet. Eine Erklärung für diesen Effekt ist die Kombination der translationalen Abnahme nach Infektion zusammen mit einer Senkung der Aktivität von beispielsweise PIP5K.

Die Erfassung des PI(4,5)P₂-Signals, welches in dsRNA-Spots lokalisiert war, zeigte eine leichte Anreicherung in Leervektorzellen und bei Überexpression von aktiven oder inaktiven PIP4K2B (Abb. 65 C). Hingegen wurde nach einer Überexpression von PIP4K2A, unabhängig von der enzymatischen Aktivität, eine Reduktion der Subpopulation an PI(4,5)P₂ beobachtet. Der stärkste Effekt war durch die Transfektion von katalytisch aktiven, nicht aber inaktiven, PIP4K2C zu erkennen, welches in einer Akkumulation von PI(4,5)P₂ innerhalb der dsRNA-Spots resultierte.

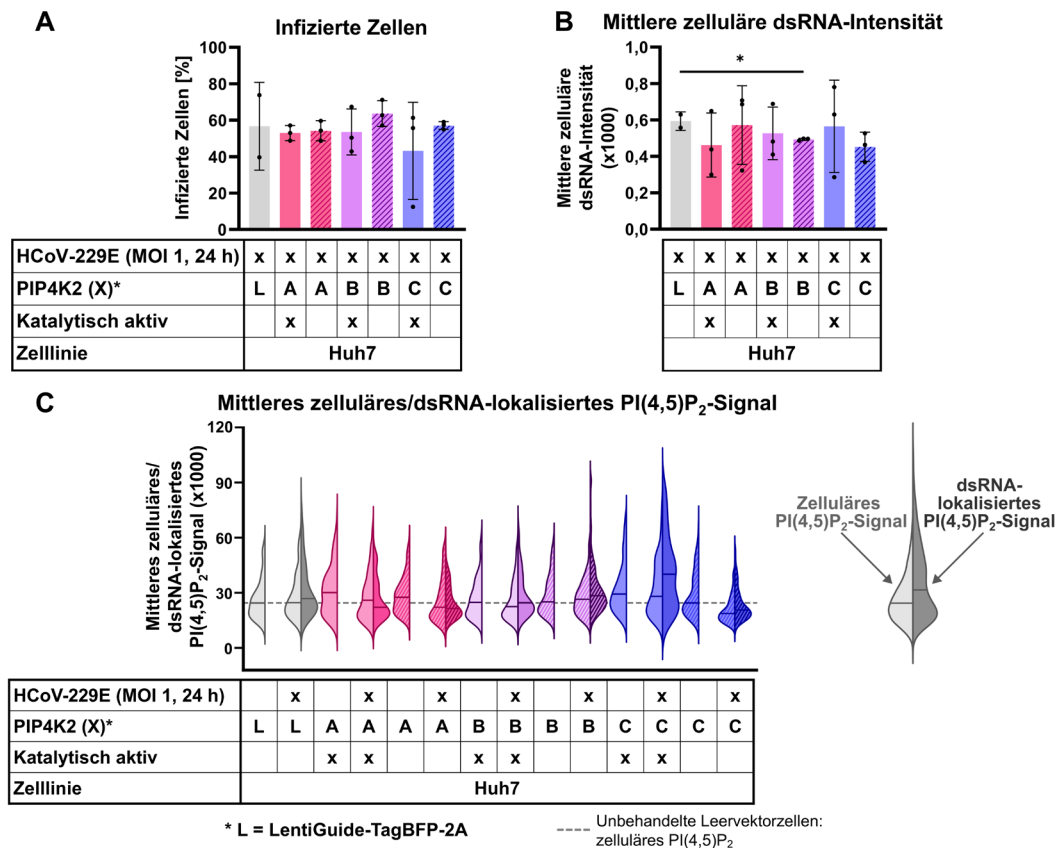


Abb. 65 Einfluss der Überexpression katalytisch aktiver/inaktiver PIP4K2-Isoformen auf die Replikation von HCoV-229E und die Bildung von PI(4,5)P₂

(A) Huh7 Zellen wurde mittels Calcium-Phosphat mit den Überexpressionvektoren für die katalytisch aktiven/inaktiven Isoformen der PIP4K2 transfiziert und mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 24 h). Es erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen dsRNA (Absolute Antibody #Ab01299-23.0) und PI(4,5)P₂. Als Sekundärantikörper wurden Cy3-gekoppelte anti rabbit IgG und Dylight488-gekoppelte anti mouse IgG verwendet (Abb. Anhang 13). Der Anteil der infizierten Zellen und das dsRNA/PI(4,5)P₂-Signals pro Zelle wurde durch Cellpose, Cellprofiler und Excel bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte nur für transfizierte Zellen, welche ein mTagBFP(2)-Signal hatten. Dargestellt sind die Mittelwerte des Anteils an infizierten Zellen $\pm$ SD für zwei bis drei biologische Replikate (90 bis 395 Zellen pro Behandlung). (B) Der Graph zeigt die mittlere zelluläre dsRNA-Intensität pro Versuch $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$). (C) Gezeigt ist ein Splitviolindiagramm des mittleren zellulären (links) und dsRNA-lokalisierten PI(4,5)P₂-Signals (rechts) für die zusammengeführten biologischen Replikate. Ausreißer wurden durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt.

Zusammenfassend zeigten die Überexpression der verschiedenen Isoformen von PIP4K2 differenzielle Effekte in Abhängigkeit von der enzymatischen Aktivität. Hierbei reduzierte aktives PIP4K2A sowie inaktives PIP4K2B und PIP4K2C die Formation von dsRNA. Zudem bildete sich ein Subpopulation von PI(4,5)P₂ innerhalb der dsRNA-Spots, welcher durch die Überexpression von aktiven PIP4K2C stark erhöht war. Es zeigte sich, dass PIP4K2A einen negativen Effekt auf das Infektionsgeschehen in Huh7 Zellen hatte, während eine enzymatische Aktivität von PIP4K2B und PIP4K2C förderlich für die Formation von dsRNA und hierin lokalisiertem PI(4,5)P₂ war.

Eine Überexpression von katalytisch aktivem PIP4K2A resultierte in einer leichten Abnahme von dsRNA, während dies auch für die inaktiven Formen der PIP4K2B und PIP4K2C beobachtet werden konnte. Die Massenspektrometrie-Auswertung der OPP-Markierung zeigte die Hochregulation von PIP4K2B, nicht jedoch PIP4K2A, in Huh7 Zellen, welches in dem vorhergegangenen Experiment womöglich durch PIP4K2A herunterreguliert wurde und eine verminderte Virusreplikation bewirkte. Die *knockout*-Experimente in A549⁺⁺ Zellen zeigten in dieser Zelllinie hingegen eine stärkere Relevanz der PIP4K2A-Isoform anhand der Abnahme infizierter Zellen. Zur weiteren Untersuchung dieses Befundes wurde analysiert, ob eine Überexpression von PIP4K2A in *knockout*-Zellen ein reguläres Infektionsgeschehen wiederherstellen kann und ob die enzymatische Funktion der Kinase hierfür notwendig ist (Abb. Anhang 14).

Nach der Transfektion von aktivem oder inaktivem PIP4K2A in Leervektorzellen stieg sowohl der Median als auch der Mittelwert des zellulären dsRNA-Signals, wobei die Zunahme bei der inaktiven Variante geringer ausfiel (Abb. 66 A, B). In *knockout*-Zellen wurde dieser Effekt nur für die katalytisch aktive Form beobachtet. Die Quantifizierung der zellulären PI(4,5)P₂-Intensität zeigte für alle unbehandelten Zelllinien unabhängig von der Transfektion ein vergleichbares Signal, welches nach Infektion anstieg (Abb. 66 C). In infizierten *PIP4K2A knockout*-Zellen war der Median des zellulären PI(4,5)P₂-Signals mit den Leervektorzellen vergleichbar, jedoch zeigte sich eine größere Streuung der Messwerte. Im Kontrast zu den zuvor untersuchten Huh7 Zellen war PI(4,5)P₂ in dsRNA-Spots deutlich stärker akkumuliert, wobei die Intensität infolge der Transfektion von aktiven/inaktiven PIP4K2A höher war als in den untransfizierten Zellen.

Zusammenfassend konnte eine differenzielle Rolle der verschiedenen Isoformen der PIP4K2s gezeigt werden. In Huh7 war die katalytische Aktivität von PIP4K2B und PIP4K2C vorteilhaft für die Replikation von HCoV-229E, während eine Überexpression von PIP4K2A die Replikation hemmte und die PI(4,5)P₂-Level in der Zelle senkte. Demgegenüber konnte in A549⁺⁺ *knockout*-Zellen die Überexpression von PIP4K2A die Bildung von dsRNA wieder erhöhen. Die katalytische Aktivität war hierbei förderlich, aber nicht essentiell. Zudem wurde eine Ansammlung von PI(4,5)P₂ in den dsRNA-Spots identifiziert.

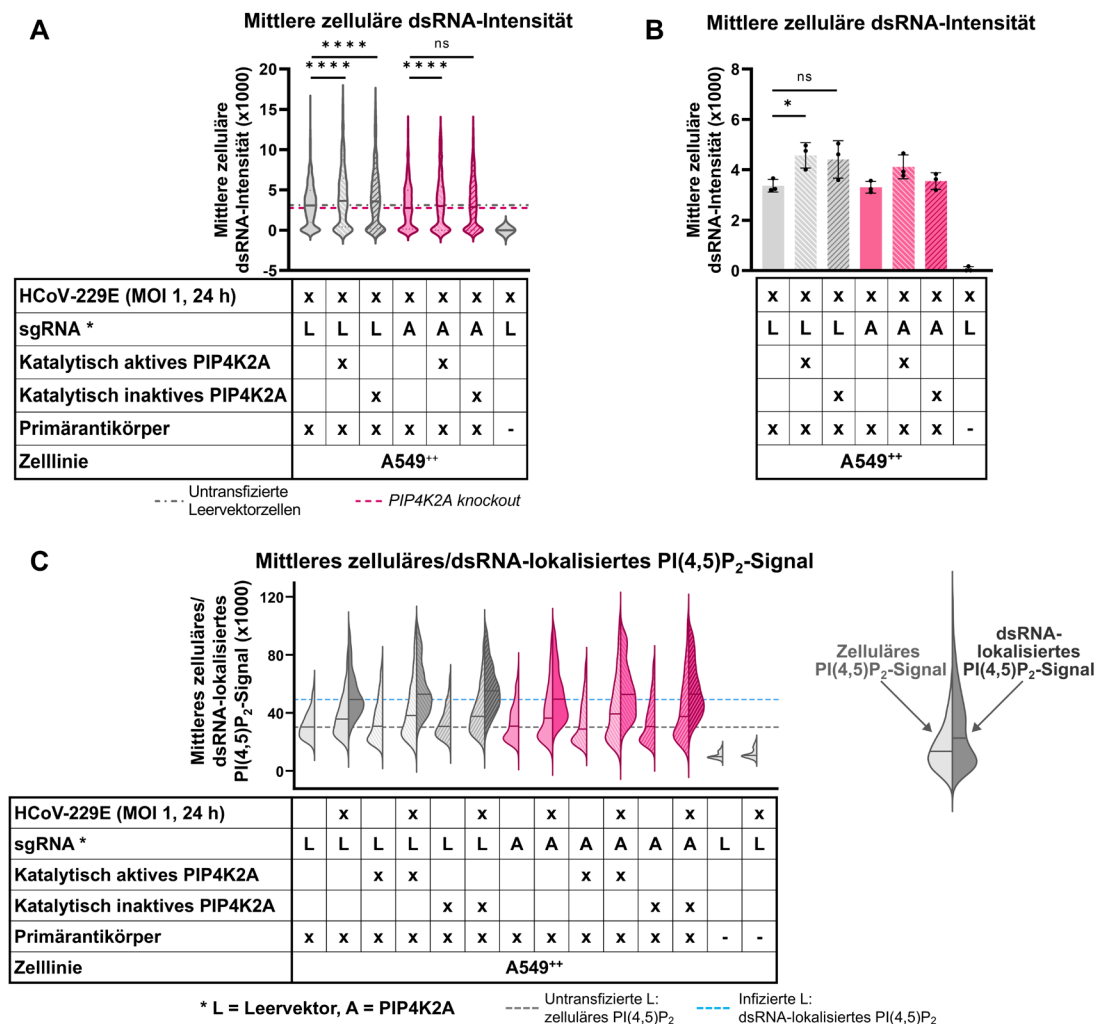


Abb. 66 Effekte der Rekonstitution von PIP4K2A-Varianten in knockout-Zellen

(A) Lentiviral mit dem Leervektor oder einem PIP4K2A knockout transduzierte A549⁺⁺ Zellen wurde mittels Calcium-Phosphat mit den Überexpressionvektoren für katalytisch aktives/inaktives PIP4K2A transfiziert und mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 24 h). Es erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz mit dsRNA- (Absolute Antibody #Ab01299-23.0) und PI(4,5)P₂-Antikörpern. Als Sekundärantikörper wurden Cy3-gekoppelte anti rabbit IgG und Dylight488-gekoppelte anti mouse IgG verwendet (Abb. Anhang 14). Das dsRNA/PI(4,5)P₂-Signal pro Zelle wurde durch Cellpose, Cellprofiler und Excel bestimmt. Das Violindiagramm zeigt das mittlere zelluläre dsRNA-Signal für die zusammengeführten Zellen von drei biologischen Replikaten (481 bis 1420 Zellen pro Behandlung). Eine Selektion anhand des mTagBFP(2)-Signales war technisch infolge der Fixierung mit PFA nicht möglich. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA. (B) Dargestellt sind die Mittelwerte des zellulären dsRNA-Signals $\pm$ SD für drei biologische Replikate. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$). (C) Gezeigt ist ein Splitviolindiagramm des mittleren zellulären (links) und dsRNA-lokalisierten PI(4,5)P₂-Signals (rechts) für die zusammengeführten biologischen Replikate. In beiden gezeigten Violindiagrammen wurden zur Darstellung Ausreißer durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt.

4.4.5. Veränderungen des autophagischen Fluxes in PIP4K2- und MURC-defizienten Zellen

In einer Studie mit maus-embryonalen Fibroblasten, welche einen *knockout* für *Pip4k2a* und *Pip4k2b* aufzeigten, ist ein Defekt im Autophagieprozess beobachtet worden

(Lundquist et al., 2018). Für MURC sind keine Informationen über eventuelle Interaktionen mit dem Prozess bekannt, jedoch wurde für das verwandte Caveolin-1 eine Hemmung der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion durch die Untersuchung von defizienten Zelllinien nachgewiesen (Shi et al., 2015). Aufgrund dieser Evidenz sowie der zuvor gezeigten Aktivierung der Autophagie während der Replikation von HCoV-229E und der parallelen erfolgenden translationalen Induktion von PIP4K2 und MURC, war es daher wichtig zu überprüfen, ob diese Proteine eine funktionelle Rolle in der infektionsbedingten Autophagie spielen.

Zunächst erfolgten Untersuchungen der Proteinmengen von Autophagie-assoziierten Proteinen in *PIP4K2 knockout*-Zellen infolge einer HCoV-229E-Infektion. In A549⁺⁺ Zellen konnte eine nicht signifikante Zunahme des selektiven Autophagie-Markers p62 bei einem dreifachen *knockout* aller Isoformen beobachtet werden (Abb. 67 A). In ähnlicher Weise führte eine Depletion von PIP4K2A, PIP4K2B und die Kombination aller Isoformen zu einem gesteigerten Proteinlevel in Huh7 Zellen (Abb. 67 B). Die Betrachtung von LC3B-II zeigte die charakteristische Zunahme nach Infektion mit HCoV-229E (Abb. 67 A, B). Die *knockouts* der verschiedenen Isoformen von *PIP4K2* führten zu differenziellen Effekten in beiden Zelllinien, welche jedoch sehr gering ausfielen. Auffällig war, dass im Falle einer Depletion von PIP4K2C in A549⁺⁺ und PIP4K2B in Huh7 Zellen die Akkumulation von LC3B-II nach der Infektion verringert war.

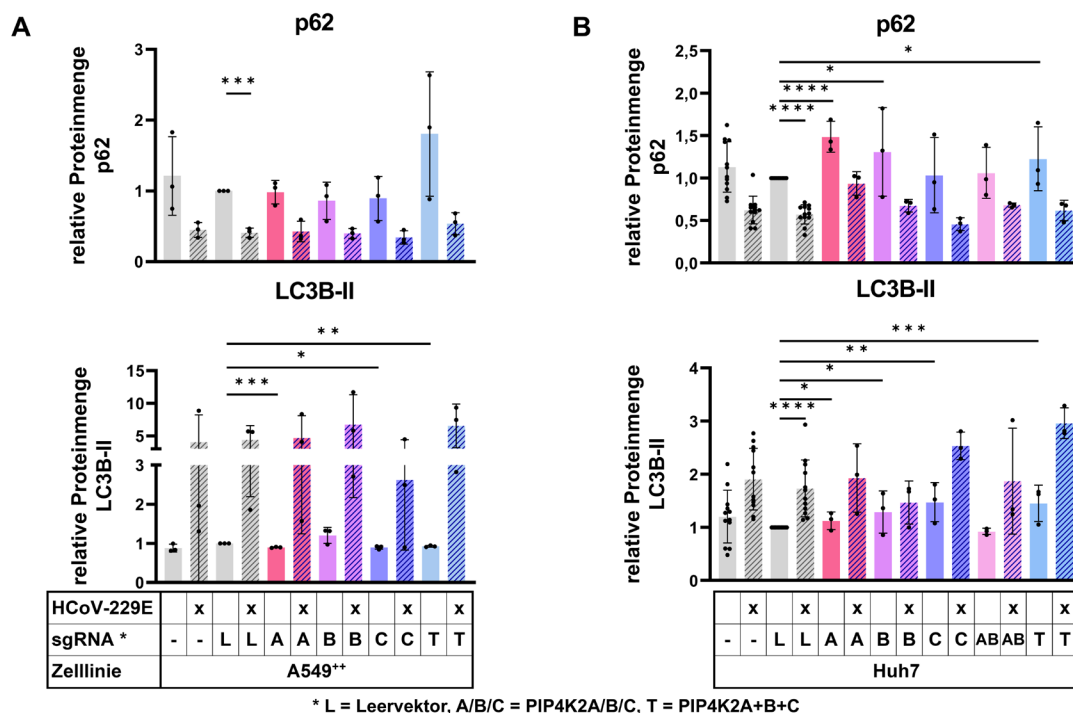


Abb. 67 Effekte der Depletion von PIP4K2 und MURC auf Autophagie-assoziierte Proteine
A549⁺⁺ (A) und Huh7 (B) Zellen wurden lentiviral mit dem Leervektor LentiCRISPR-v2 oder mit dem klonierten Vektor, welcher sgRNAs für die Isoformen von PIP4K2 enthielt, transduziert. Es

erfolgte die Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse gezeigt in Abb. 55. Die relative Quantifizierung der Proteine LC3B-II und p62 von drei bis zwölf biologischen Replikaten wurde durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die Leervektor transduzierte, unbehandelte Probe durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Die Kombination des *SEC24A* knockouts mit dem Autophagie-Reporter hatte in vorhergegangenen Experimenten gezeigt, dass eine zweifache, sequentielle Transduktion die Funktion des Reporters und die *knockout*-Effizienz nicht beeinträchtigte. Folglich wurden die zuvor erzeugten stabilen Huh7 und A549⁺⁺ *knockout*-Zellen mit dem Tandem-Reporter pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B lentiviral transduziert und kultiviert. Mittels eines Live-Cell-Imagings wurden die HCoV-229E-infizierten Zellen unter Hinzunahme der üblichen Kontrollbedingungen (Bafilomycin A1 100 nM, 24 h; Hungerbedingungen 24 h) untersucht und im Anschluss quantifiziert (Abb. Anhang 15).

Die Auszählung der autophagischen Vesikel zeigte die charakteristische Zunahme an Autolysosomen nach Hungern oder einer HCoV-229E-Infektion sowie die erfolgreiche Blockade der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion durch eine Bafilomycin A1-Behandlung (Abb. 68 A, B). Die Depletion von PIP4K2B führte zu einer gesteigerten Anzahl an Vesikeln, wobei sich in infizierten Zellen das Verhältnis in Richtung von Autophagosomen verschob, während die Behandlung mit Bafilomycin A1 weiterhin eine Akkumulation von Autophagosomen bedingte. In den dreifachen *knockouts* aller Isoformen war der Anteil an Autophagosomen ebenso höher (59 %) als in der Kontrollzelllinie (45 %). Dies zeigte, dass es durch den *knockout* zu einer Induktion von Autophagie mit vermehrter Bildung von autophagischen Vesikeln sowie einer leichten Blockade ihres Abbaus kommt. Eine Depletion der restlichen Isoformen zeigte ebenfalls eine gering erhöhte Anzahl an Vesikeln, jedoch schwächer ausgeprägt als für PIP4K2B. Die Betrachtung von A549⁺⁺ Zellen mit einem dreifachen *PIP4K2* *knockout* demonstrierte eine vergleichbare Blockade des Autophagieprozesses, jedoch im Gegensatz zu Huh7 Zellen auch unter basalen Bedingungen (Abb. Anhang 16). Ferner war die Bildung von Autophagosom-ähnlichen Strukturen nach HCoV-229E-Infektion infolge einer Depletion aller Isoformen oder von PIP4K2B reduziert, welches anhand der mittleren Fläche von Autophagosomen erkenntlich war (Abb. 68 C).

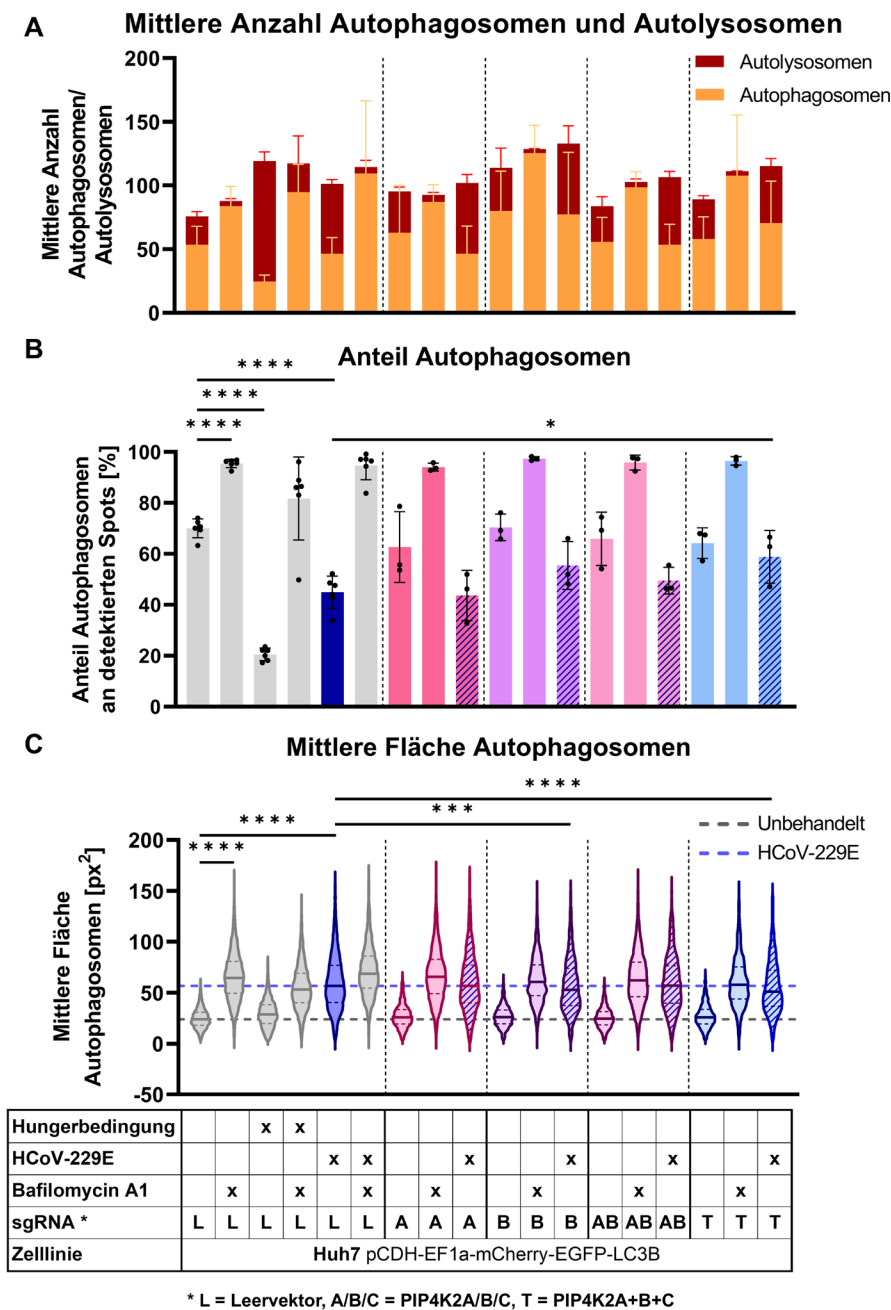


Abb. 68 Differenzielle stressinduzierte Autophagosomenformation in PIP4K2-defizienten Zellen

(A) Huh7 Zellen mit einem knockout für ein bis drei Isoformen von PIP4K2 oder dem Leervektor LentiCRISPR-v2 wurden lentiviral mit dem Autophagie-Reporter pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduziert. Die Zellen wurde mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h) behandelt, gehungert (24 h) oder mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 24 h). Es erfolgte ein Live-Cell-Imaging für drei bis sechs biologische Replikate (1622 bis 4524 Zellen pro Behandlung) gezeigt in Abb. Anhang 15. Die Anzahl an Autophagosomen und Autolysosomen pro Zelle wurde durch Cellpose, Cellprofiler und Excel ermittelt. (B) Für den Anteil an Autophagosomen an den identifizierten Vesikeln sind die Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (C) Die mittlere Fläche der Autophagosomen ist für die zusammengeführten Zellen der drei bis sechs Experimente gezeigt. Für das Violindigramm wurden Ausreißer durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA (** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Weitergehend erfolgte die Untersuchung von MURC-defizienten Zellen im Hinblick auf Autophagie. P62 war in unbehandelten A549⁺⁺ *knockout*-Zellen leicht reduziert, während in Huh7 Zellen keine Veränderung erfasst wurde (Abb. 69). Des Weiteren war die Zunahme von LC3B-II infolge der Infektion mit HCoV-229E in beiden Zelllinien stark reduziert, welches eine Beteiligung von MURC am Autophagieprozess wahrscheinlich machte.

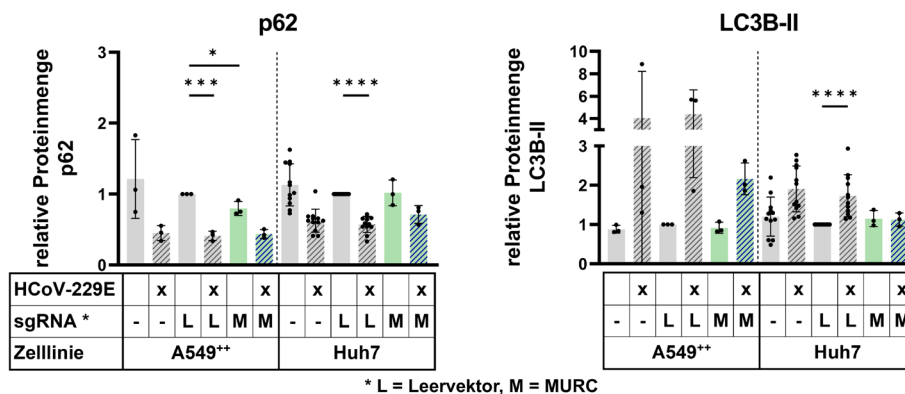


Abb. 69 Modulation der Proteinmengen von p62 und LC3B-II infolge einer MURC-Depletion A549⁺⁺ und Huh7 Zellen mit dem Leervektor LentiCRISPR-v2 oder einem knockout für MURC wurde mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infiziert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse gezeigt in Abb. 55. Die relative Quantifizierung der Proteine LC3B-II und p62 von drei bis zwölf biologischen Replikaten wurde durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die Leervektor transduzierte, unbehandelte Probe der jeweiligen Zelllinie durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Die detaillierte Analyse von Huh7 Autophagie-Reporterzellen mit einem *MURC knockout* zeigte ähnliche Effekte wie bereits für *PIP4K2B*-defiziente Zellen demonstriert. Es wurde eine Zunahme der Gesamtanzahl an autophagischen Vesikeln beobachtet, wobei das Verhältnis von Autophagosomen zu Autolysosomen unbeeinflusst war und sich folglich eine verstärkte Autophagieinduktion zeigte (Abb. 70 A, B). Zudem wurde infolge einer HCoV-229E-Infektion eine reduzierte Formation von Autolysosomen erfasst, bei einem Autophagosomenanteil von 60 % gegenüber 45 % in Leervektorzellen, welches analog zu den Befunden in *PIP4K2B knockout*-Zellen eine Beteiligung in der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion nach Stressinduktion implizierte. Die mittlere Fläche von Autophagosomen nach Infektion war in den MURC-defizienten Zellen reduziert, jedoch fiel dieser Effekt sehr gering aus (Abb. 70 C).

Abschließend konnte damit gezeigt werden, dass *PIP4K2*, vor allem *PIP4K2B* in Huh7 Zellen, und *MURC* eine wichtige Rolle im Autophagieprozess spielen. Sie sind sowohl an der Induktion von Autophagie als auch an der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen unter Stressbedingungen beteiligt, wobei ein Verlust der Proteine nicht in

einem vollständigen Arrest des Vorgangs resultiert, welches eine Kompensation durch verwandte Isoformen oder Proteine vermuten lässt.

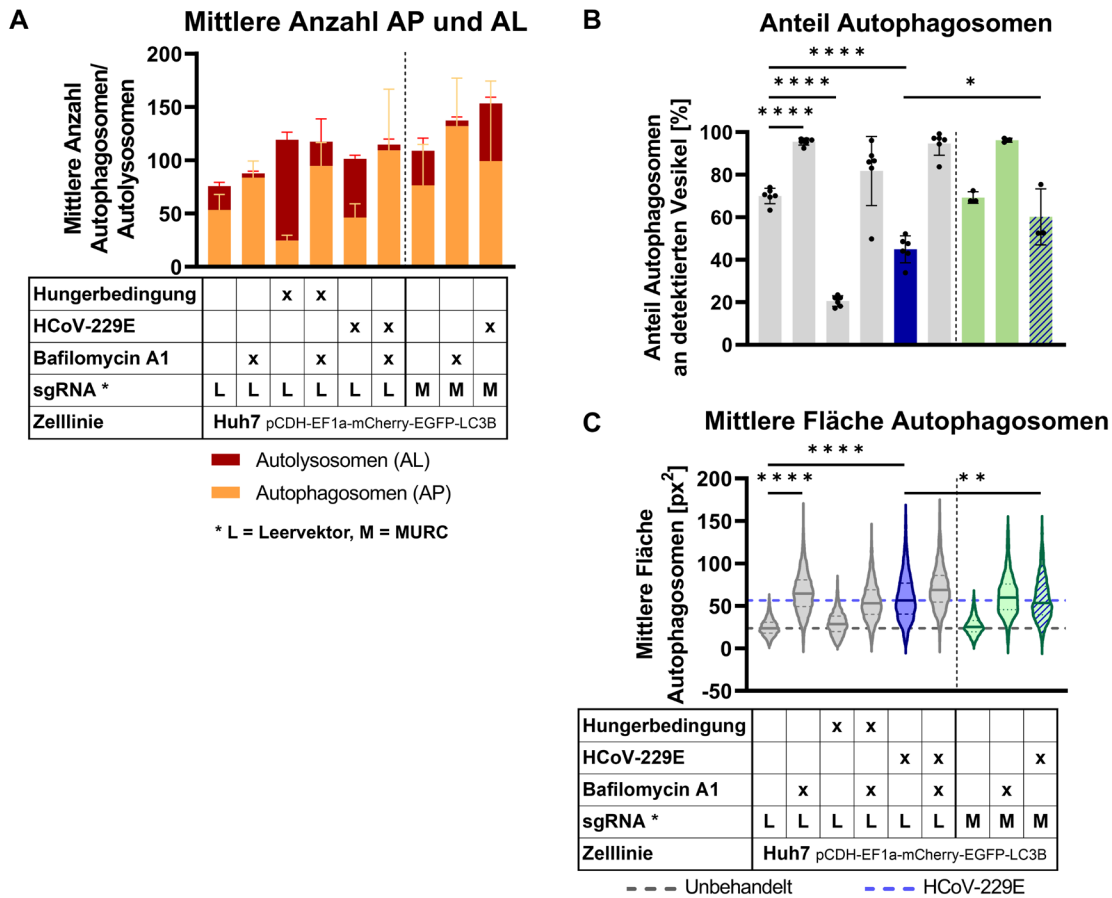


Abb. 70 Induzierte Bildung autophagischer Vesikel in MURC-defizienten Zellen

(A) Quantifizierung des in Abb. Anhang 15 gezeigten Experimentes für Leervektor- und MURC-defiziente Huh7 Autophagie-Reporterzellen nach Behandlung mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), Hungerbedingungen (24 h) oder Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h). Es erfolgte ein Live-Cell-Imaging für drei bis sechs biologische Replikate (1622 bis 4524 Zellen pro Behandlung). Die Anzahl von Autophagosomen (AP) und Autolysosomen (AL) pro Zelle wurde durch Cellpose, CellProfiler und Excel ermittelt. (B) Für den Anteil an Autophagosomen an den identifizierten Vesikeln sind die Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem unpaired, parametrischen, zweiseitigen T-Test (C) Die mittlere Fläche der Autophagosomen ist für die zusammengeführten Zellen der drei bis sechs Experimente gezeigt. Für das Violindiagramm wurden Ausreißer durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$).

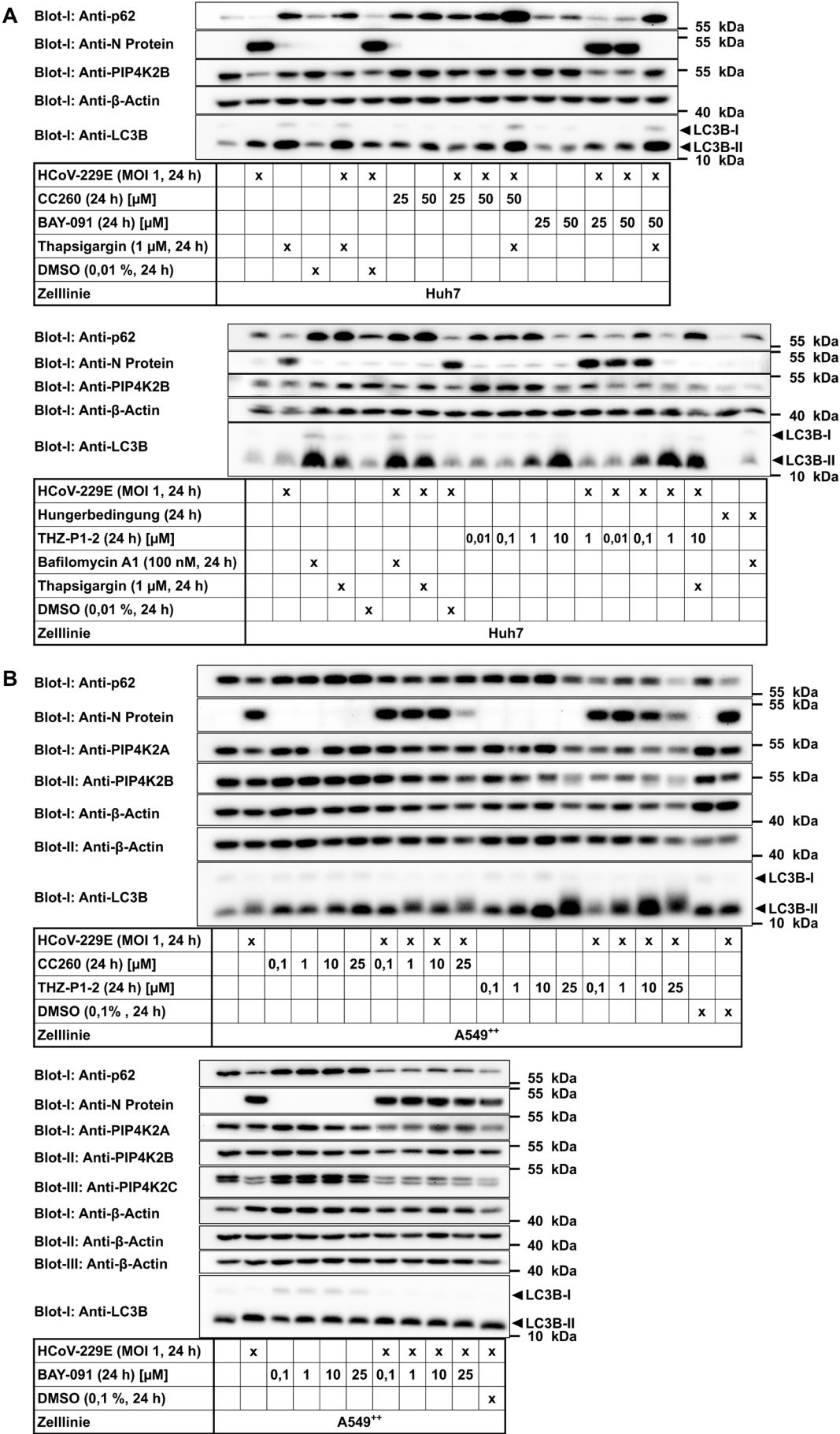
4.5. Einfluss von PIP4K2-Inhibitoren auf die Virusreplikation

Die Untersuchungen von PIP4K2 zeigten, dass ein *knockout* die Replikation von HCoV-229E zelltypspezifisch modulierte. Zudem konnten Veränderungen in der unspezifischen Autophagie beobachtet werden. Die Effekte zeigten eine starke isoform-abhängige Variabilität des Phänotyp durch eine Depletion der jeweiligen Kinasen. Im Rahmen der Forschung zu Krebserkrankungen wurden verschiedene ATP-kompetitive Inhibitoren für PIP4K2 entwickelt: THZ-P1-2 ist ein selektiver, irreversibler Inhibitor aller Isoformen, während der Inhibitor CC260 eine Selektivität für PIP4K2A und PIP4K2B aufweist (Chen et al., 2021; Sivakumaren et al., 2020). BAY-091 zeigt eine starke Bindung von PIP4K2A, wohingegen seine Affinität für PIP4K2B und PIP4K2C unbekannt ist (Wortmann et al., 2021). Vor dem Hintergrund der bereits gezeigten Verbindung zwischen PIP4K2 und HCoV-229E sollten im Folgenden mit Hilfe dieser Inhibitoren die Effekte einer pharmakologischen Perturbation dieser Kinasen evaluiert werden.

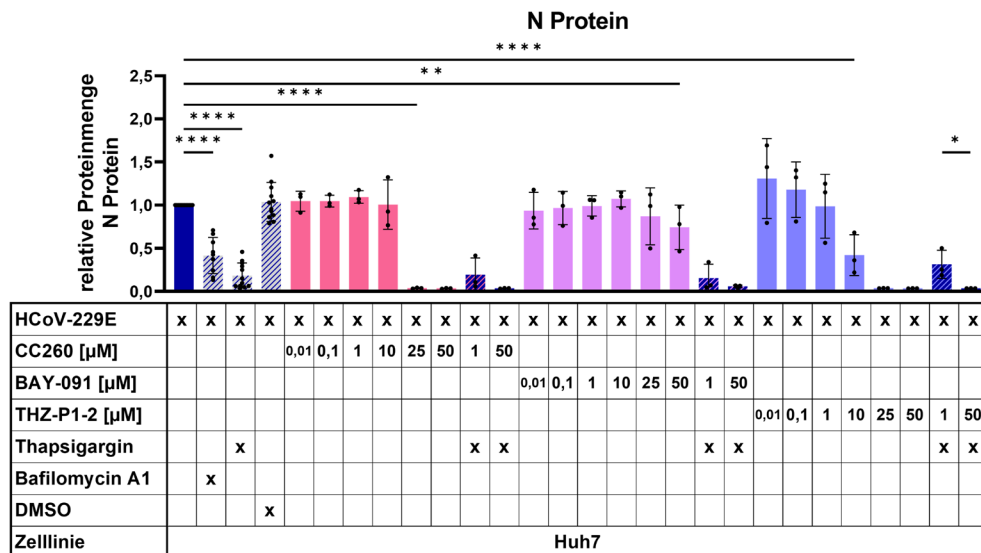
4.5.1. Erfassung der antiviralen Wirkung von PIP4K2-Inhibitoren

Initial wurde eine Reihe an Dosis-Wirkungs-Experimenten mit den drei Inhibitoren für die Parameter Virusreplikation, Zelltod und Autophagieregulation in Huh7 und A549++ Zelllinien durchgeführt, um die sich aus den vorherigen genetischen Experimenten andeutete Funktion und Isoformselektivität zu evaluieren. Als Kontrollbehandlungen diente neben Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h) sowie DMSO (0,01 % oder 0,1 %, 24 h) auch der Wirkstoff Thapsigargin (1 µM, 24 h), aufgrund seines starken antiviralen Effektes, der Blockade des späten Autophagieflusses sowie der Suppression der PIP4K2B *de novo* Synthese (Abb. 71 A, B).

Die Quantifizierung des N Proteins in Huh7 Zellen demonstrierte die erfolgreiche Hemmung der Replikation durch Bafilomycin A1- und Thapsigargin-Behandlung, während die Lösungsmittelkontrolle DMSO keinen Einfluss auf die N Proteinexpression ausübte (Abb. 71 C). Der duale Inhibitor CC260 blockierte bei Konzentrationen ab 25 µM in beiden Zelllinien die Bildung von N Protein komplett (Abb. 71 C, D). Der Einsatz von BAY-091 zeigte bei einer Konzentration von 50 µM in Huh7 bzw. 25 µM in A549++ Zellen eine Abnahme der N Proteinmenge, jedoch einhergehend mit mikroskopisch erfassbaren zytopathischen Effekten. Für den irreversiblen Inhibitor THZ-P1-2 wurde eine Reduktion des N Proteins ab 10 µM (Huh7) bzw. 25 µM (A549++) detektiert.



C



D

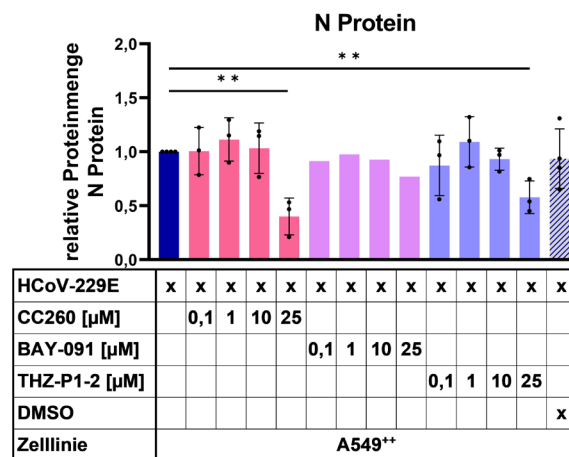


Abb. 71 Beeinflussung der N Proteinmenge durch die Behandlung mit PIP4K2-Inhibitoren
Huh7 (A) und A549⁺⁺ (B) Zellen wurden mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), Thapsigargin (1 μ M, 24 h), DMSO (0,01 % oder 0,1 %, 24 h), der angegebenen Konzentration von CC260, THZ-P1-2, BAY-091 (24 h) behandelt oder gehungert (24 h). Es erfolgte die Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse. (C, D) Die relative Quantifizierung des N Proteins von Huh7 (C) und A549⁺⁺ (D) Zellen von ein bis zwölf biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf unbehandelte, infizierte Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0001$).

Vor der Ernte der Huh7 Zellen wurden die Überstände abgenommen und zur Bestimmung des viralen Titers mittels Plaque-Assay genutzt (Abb. 72 A). Es konnten die bekannten starken antiviralen Effekte durch Bafilomycin A1 und Thapsigargin erfasst werden. CC260 zeigte bei einer Konzentration von 10 μ M einen vergleichbaren Titer zu unbehandelten Zellen, während 25 μ M in einer vollständigen Hemmung der Replikation resultierten. Zur Untersuchung dieser sprunghaften Abnahme wurden Überstände mit weiteren Inhibitor-Konzentrationen (13, 16, 19, 22 μ M) erzeugt und die viralen Titer bestimmt. In diesem Zusammenhang wurde eine halb-maximale effektive Konzentration (EC_{50}) von 11,49 μ M für den Inhibitor berechnet (Abb. 72 B). Die Zugabe von BAY-091

wirksamen Bereich zu definieren. Hierzu wurde ein MTS-Assay durchgeführt mit einer Konzentrationsreihe in Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer HCoV-229E-Infektion.

Die Zugabe von CC260 bis 50 μM (A549⁺⁺) bzw. 100 μM (Huh7) führte zu keiner Beeinträchtigung der Zellviabilität (Abb. 73). Die zusätzliche Infektion mit HCoV-229E hatten keinen weiteren Einfluss auf das Überleben der Zellen. Demnach war die Berechnung einer halb-maximalen zytotoxischen Konzentration (CC_{50}) für diese beiden HCoV-229E-infizierte Zelllinien nicht möglich, da Konzentrationen deutlich oberhalb von 50 μM noch toleriert wurden. Demgegenüber zeigte der Inhibitor THZ-P1-2 eine stärkere Toxizität in beiden Zelllinien mit einem geringen Selektivitätsindex, also des Verhältnisses von CC_{50} zu EC_{50} . Es ergab sich für Huh7 Zellen ein CC_{50} -Wert von 20,04 μM mit HCoV-229E und 16,96 μM ohne Infektion. A549⁺⁺ reagierten weniger sensitiv auf den Inhibitor, und der CC_{50} -Wert betrug 45,69 μM mit bzw. 30,09 μM ohne HCoV-229E-Infektion.

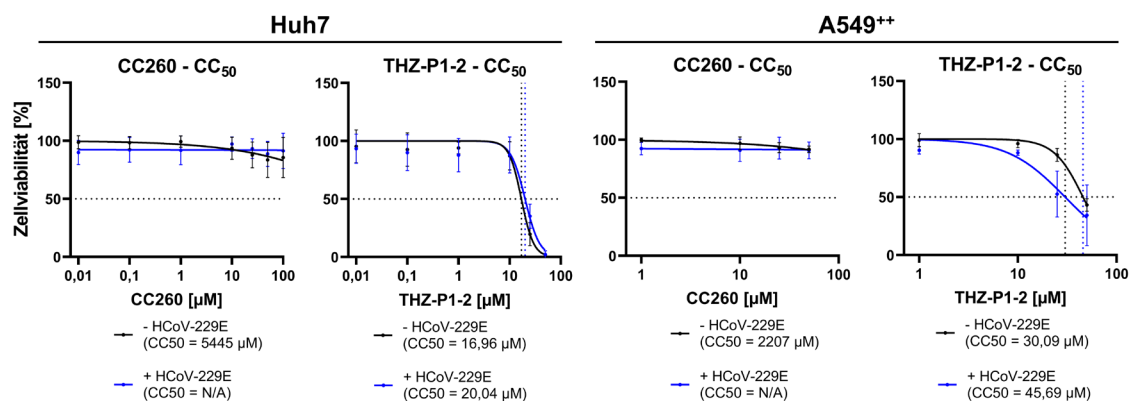


Abb. 73 Differenzielle Effekte der PIP4K2-Inhibitoren CC260 und THZ-P1-2 auf die Zellviabilität

MTS-Assay zur Bestimmung der Zellviabilität für Huh7 und A549⁺⁺ Zellen mit/ohne HCoV-229E-Infektion und Behandlung mit CC260 oder THZ-P1-2 (24 h) für drei biologische und jeweils drei technische Replikate. Dargestellt ist die Dosis-Wirkungskurve und Berechnung der CC_{50} -Werte durch Graphpad Prism.

Zusammenfassend zeigte sich für THZ-P1-2 eine dosisabhängige kontinuierlichere Hemmung der Replikation mit einem engen Selektivitätsindex. Im Gegensatz hierzu trat für CC260 ein Schwellenphänomen mit einem abrupten Abfall des viralen Titers auf, während die Zellviabilität unbeeinträchtigt war. Der Inhibitor BAY-091 zeigte keine antiviralen Effekte und wurde daher nicht weiter untersucht.

4.5.2. Postinfektiöse Behandlung mit CC260 und THZ-P1-2

Die Anwendung der Inhibitoren CC260 und THZ-P1-2 zeigte eine antivirale Wirkung bei paralleler Zugabe zur Infektion. PI(4,5) P_2 spielt eine entscheidende Rolle in verschiedenen Schritten der Clarithrin-vermittelten Endozytose unter Beteiligung von

PIP4K2 (Kamalesh et al., 2017; Sun et al., 2007). Basierend auf diesen Grundlagen war es von Bedeutung eine postinfektiöse Behandlung der Inhibitoren zu testen zur Eingrenzung des Wirkmechanismus auf den Eintritt des Virus in die Zelle oder auf spätere Schritte der Replikation. Hierzu wurden Huh7 Zellen für 24 h mit HCoV-229E (MOI 1) infiziert gefolgt von einer parallelen oder zeitversetzten Behandlung mit Thapsigargin (1 μ M), DMSO (0,1 %), CC260 (25 μ M) oder THZ-P1-2 (10 μ M) für 24 h, 23 h (1 h p.i.) oder 16 h (8 h p.i.). Die Überstände der Zellen dienten zur Messung der viralen Titer mittels Plaque-Assays, während die Zellen selbst für die Proteindetektion durch Western-Blot-Analyse geerntet wurden (Abb. 74 A, C).

Die Quantifizierung des N Proteins und des viralen Titters zeigte für Thapsigargin eine starke Hemmung der Replikation von HCoV-229E bei paralleler Zugabe sowie bei einer verkürzten Behandlung von 23 h und 16 h (Abb. 74 B, C). Der Inhibitor CC260 demonstrierte den stärksten Hemmeffekt bei einer Behandlungsdauer von 24 h oder 23 h, während die Zugabe für 16 h eine leichte Reduktion in der antiviralen Wirkung zeigte. THZ-P1-2 senkte die N Proteinmenge und den viralen Titer weniger effektiv als die beiden anderen Inhibitoren mit dem stärksten Effekt bei paralleler Applikation zur Infektion mit einer Reduktion des viralen Titters um 86,14 %. Demgegenüber verringerte eine Behandlungsdauer von 23 h oder 16 h die Virusmenge im Überstand nur um 54,13 % (23 h) bzw. 52,52 % (16 h). DMSO hatte keinen Einfluss auf den viralen Titer.

Die Behandlung mit den PIP4K2-Inhibitoren hemmte die Virusreplikation auch bei verspäteter Zugabe effektiv, während die Generierung von *knockout*-Zelllinien nur eine leichte Absenkung der viralen Titer zeigte. Daher wurde geprüft, ob die Wirkung von CC260 ausschließlich über PIP4K2 erfolgte oder *off-target* Effekte eine Rolle für die beobachtete antivirale Wirkung spielen könnten. Hierfür wurden *PIP4K2 knockout*-Zellen mit dem Inhibitor behandelt. Es zeigte sich das Fortbestehen der antiviralen Wirkung, welches vermuten lässt, dass PIP4K2 nicht als alleinige Zielstruktur für den antiviralen Effekt des Inhibitors in Frage kam oder die PIP4K2-Funktionen in den stabilen *knockout*-Zelllinien durch alternative Signalwege kompensiert wurden (Abb. Anhang 17).

Zusammengenommen zeigten die Ergebnisse, dass die antivirale Wirkung von CC260 auch nach Aufnahme der Viren in die Zelle bestand, während die Wirksamkeit von THZ-P1-2 reduziert war. Folglich war es interessant, den Wirkmechanismus beider Inhibitoren weiter zu charakterisieren.

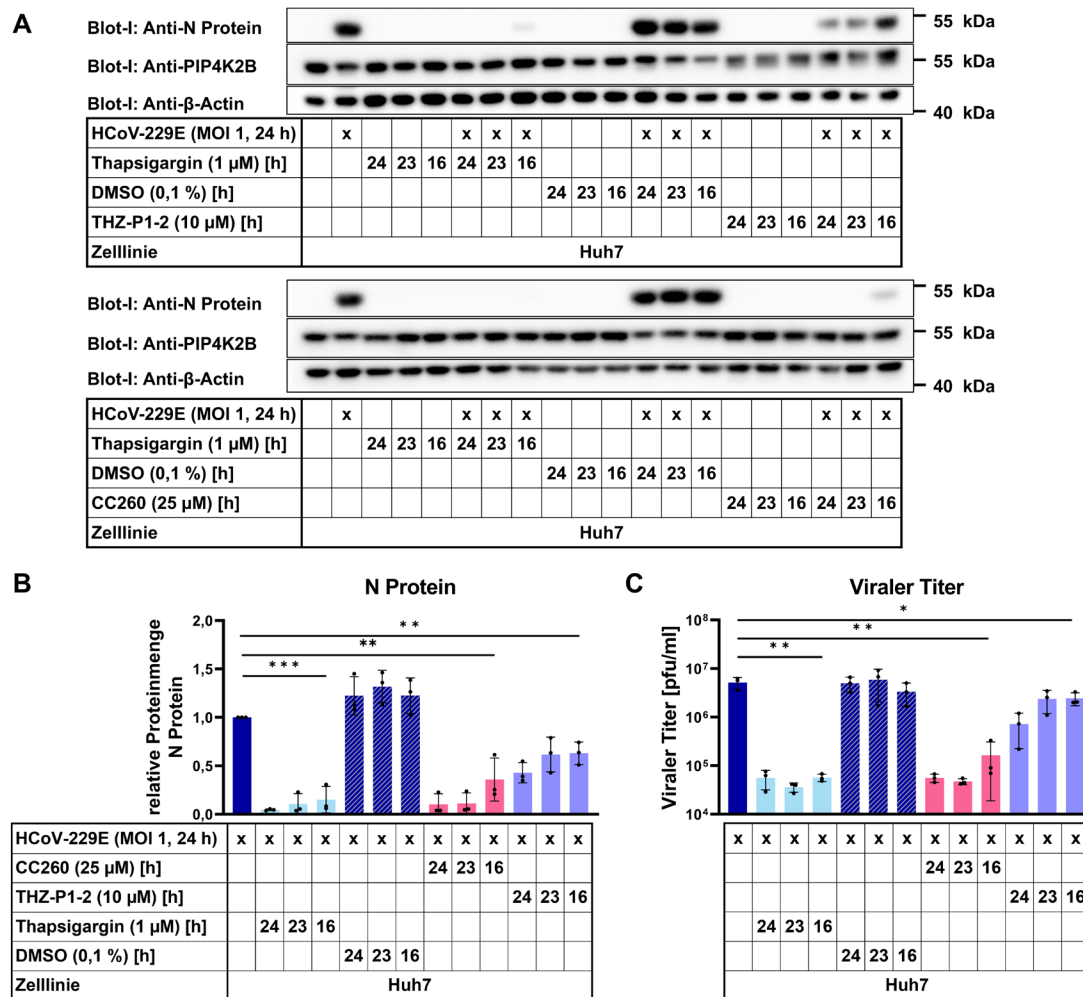


Abb. 74 Antivirale Wirkung von PIP4K2-Inhibitoren bei verzögerter Zugabe

(A) Huh7 Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infiziert und mit Thapsigargin (1 μM), DMSO (0,1 %), CC260 (25 μM) oder THZ-P1-2 (10 μM) für 24 h, 23 h oder 16 h behandelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse. (B) Die Quantifizierung der N Proteinmenge für drei biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die unbehandelte, infizierte Probe. (C) Die Bestimmung des viralen Titers der Überstände durch einen Plaque-Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

4.5.3. Einfluss der PIP4K2-Inhibitoren auf den Autophagieprozess

In den PIP4K2B-defizienten Zellen wurde eine vermehrte Bildung von Autophagosomen und eine reduzierte Formation von Autolysosomen beobachtet. Basierend auf der Erkenntnis, dass HCoV-229E eine Zunahme des autophagischen Fluxes verursachte, sollte die Beeinflussung von Autophagie durch die PIP4K2-Inhibitoren untersucht werden, um den Wirkmechanismus weiter aufzuschlüsseln.

Zunächst erfolgte die Quantifizierung von Autophagie-relevanten Proteinen sowie PIP4K2B im Zusammenhang mit der Inhibitorbehandlung anhand des in Kapitel 4.5.1 gezeigten Dosis-Wirkungs-Experimentes. Die Proteinmenge von PIP4K2B war nach der

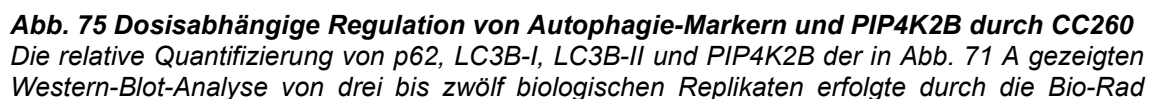


Image Lab Software mit Normalisierung auf unbehandelte Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test ($p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).*

Des Weiteren zeigten die Untersuchung des Inhibitors BAY-091 bei höheren Konzentrationen eine geringe Akkumulation von p62 und LC3B-I/II, während PIP4K2B gesenkt wurde. Diese Effekte sind vermutlich zytotoxischen Eigenschaften des Inhibitors zuzuschreiben (Abb. Anhang 18).

Zur detaillierteren Analyse von Autophagie wurden die Inhibitoren mikroskopisch mittels des Autophagie-Reporters untersucht (Abb. Anhang 19). Die Erfassung der mittleren Anzahl der Vesikel zeigte für unbehandelte Zellen eine geringe Produktion von Autolysosomen, welche nach HCoV-229E-Infektion wie zuvor zunahm (Abb. 77 A). Konzentrationen von 1 μ M oder 10 μ M des Inhibitors CC260 bewirkten keine Veränderung der autophagischen Vesikel, während die antiviral wirksamen Konzentrationen von 25 μ M oder 50 μ M eine gesteigerte Formation von Autolysosomen bedingten. Zudem nahm die Gesamtmenge an Vesikeln geringfügig zu. Als weiterer Autophagie-Indikator diente das Verhältnis von mCherry zu eGFP in den gemessenen Vesikeln, welches sich bei gesteigerter autophagischer Aktivität nach CC260-Behandlung konzentrationsabhängig in Richtung von mCherry verlagerte (Abb. 77 B). Die mittlere Fläche der Autophagosomen war nach der Infektion aufgrund der Bildung von Autophagosom-ähnlichen Strukturen erhöht, welche durch die Zugabe von 25 μ M oder 50 μ M CC260 in ihrer Bildung gehemmt wurden (Abb. 77 C).

Die Durchführung der Konzentrationsreihe für BAY-091 offenbarte keine Beeinflussung des Autophagieprozesses (Abb. 77 A). Durch die Zugabe von 1 μ M BAY-091 wurde eine leichte Steigerung des mCherry/eGFP-Verhältnisses detektiert, welche sich mit höheren Inhibitorkonzentrationen nicht veränderte (Abb. 77 B). Der Inhibitor BAY-091 zeigte keinen Einfluss auf die Größe der Vesikel (Abb. 77 C). Der Einsatz von 50 μ M zusammen mit einer HCoV-229E-Infektion verursachte eine leichte Reduktion der Größe, jedoch konnten zelltoxische Effekte beobachtet werden.

THZ-P1-2 bewirkte eine Zunahme an Autophagosomen ab einer Dosis von 10 μ M, welches konzentrationsabhängig in einer starken Akkumulation der Vesikel resultierte und auf eine Hemmung der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion im späten Autophagieprozess hindeutete (Abb. 77 A). Die zusätzliche Infektion der Zellen mit HCoV-229E zeigte ab 10 μ M eine Reduktion der virusinduzierten Autolysosomenformation (Abb. 77 A). Eine Zugabe von 25 μ M oder 50 μ M THZ-P1-2

4.5.4. Lokalisation von PI(4,5)P₂ nach einer HCoV-229E-Infektion und Behandlung mit PIP4K2-Inhibitoren

PI(4,5)P₂ kommt abundant und ubiquitär in Zellen vor und befindet sich vorrangig in Membranen, wie z.B. der Zellmembran. Die mikroskopische Betrachtung der Signale des gegen PI(4,5)P₂-gerichteten Antikörpers nach einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse von Proben aus infizierten Zellen zeigte eine Akkumulation im Bereich der dsRNA-Spots (siehe Kapitel 4.4.4). Für die verschiedenen Kinasen, welche die Synthese des Moleküls katalysieren, sind charakteristische Lokalisationen in der Zelle beschrieben. In diesem Zusammenhang ist PIP4K2A primär in der Plasmamembran zu finden, während PIP4K2B zelltypabhängig in den Nukleus lokalisiert und PIP4K2C in inneren Kompartimenten vorhanden ist (Raghu, 2021). Zur Erforschung von weiteren Effekten der PIP4K2-Inhibitoren wurde untersucht, ob eine Hemmung von PIP4K2 mit CC260 und THZ-P1-2 die Lokalisation von PI(4,5)P₂ verändert und ob die Anreicherungen des Phosphoinositids in den Replikationsvesikeln, sofern vorhanden, Änderungen erfahren.

Hierzu wurden Huh7 Zellen mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infiziert und mit CC260 (25 µM, 24 h), THZ-P1-2 (10 µM, 24 h) oder DMSO (0,05 %, 24 h) behandelt, gefolgt von einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse mit Antikörpern gegen PI(4,5)P₂ und dsRNA und der bereits validierten standardisierten Auswertung durch Cellpose, Cellprofiler und Excel. Die Betrachtung der Mikroskopiebilder zeigte einige Zellen mit einem starken PI(4,5)P₂-Signal an der äußeren Membran, jedoch war für die Mehrheit der Zellen ein homogenes Signal innerhalb des Zytoplasmas erkennbar (Abb. 78 A). Zur Erfassung dieser Verteilungsunterschiede wurde eine zusätzliche Auswertung eingeführt, welche die äußeren und inneren Bereiche der Zelle separat quantifiziert, allerdings zeigten sich in keiner Kondition ausgeprägte Unterschiede (Abb. Anhang 20).

Es wurde die Anzahl der infizierten Zellen anhand der Formation von dsRNA-Spots quantifiziert (Abb. 78 B). Durch CC260 kam es zu einer starken Hemmung der Virusreplikation mit Senkung der infizierten Zellen auf weniger als 1 %, während die Behandlung mit THZ-P1-2 keinen Effekt zeigte. Hiermit konnte der Wirkmechanismus von THZ-P1-2, basierend auf der Erkenntnis über die antivirale Wirkung des Inhibitors durch die Western-Blot-Analyse und Plaque-Assays auf Replikationsschritte, welche früh stattfinden und daher eine Wirkabschwächung nach zeitversetzter Zugabe des Inhibitors erklären, gleichzeitig aber nach der Formation von dsRNA erfolgen oder diese nicht beeinträchtigen, eingegrenzt werden.

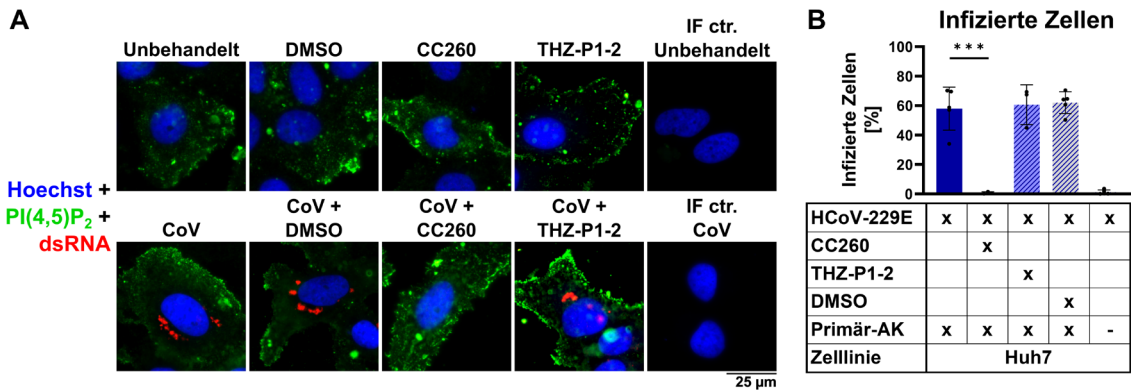


Abb. 78 Behandlung mit PIP4K2-Inhibitoren und Erfassung von PI(4,5)P₂ sowie dsRNA nach einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse

(A) Huh7 Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infiziert und mit CC260 (25 µM, 24 h), THZ-P1-2 (10 µM, 24 h) oder DMSO (0,05 %, 24 h) behandelt. Es erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz mit Primärantikörpern (Primär-AK) gegen dsRNA (Absolute Antibody, #Ab01299-23.0) und PI(4,5)P₂. Als Sekundärantikörper wurden Cy3-gekoppelte anti rabbit IgG und Dylight488-gekoppelte anti mouse IgG verwendet. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach. (B) Die Bestimmung des Anteils an infizierten Zellen von drei bis fünf biologischen Replikaten wurde durch Cellpose, Cellprofiler und Excel durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (***) $p \leq 0,001$.

Darüber hinaus wurde das PI(4,5)P₂ (sub)zellulär quantifiziert (Abb. 79). Die Behandlung mit CC260 und THZ-P1-2 zeigte eine Zunahme des zellulären PI(4,5)P₂-Signals, während die Infektion mit HCoV-229E keine Veränderungen verursachte. Der Vergleich des zellulären gegenüber dem dsRNA-Spot-lokalisierten PI(4,5)P₂-Signal demonstrierte die Akkumulation des Phosphoinositids in den DMVs. Die Behandlung infizierter Zellen mit THZ-P1-2 bewirkte einen starken Anstieg der PI(4,5)P₂-Intensität in den dsRNA-Regionen. Die DMSO-Zugabe zeigte keine Unterschiede, und das Hintergrundsignal, durch Auslassen der Primärantikörper-Zugabe, war vernachlässigbar gering.

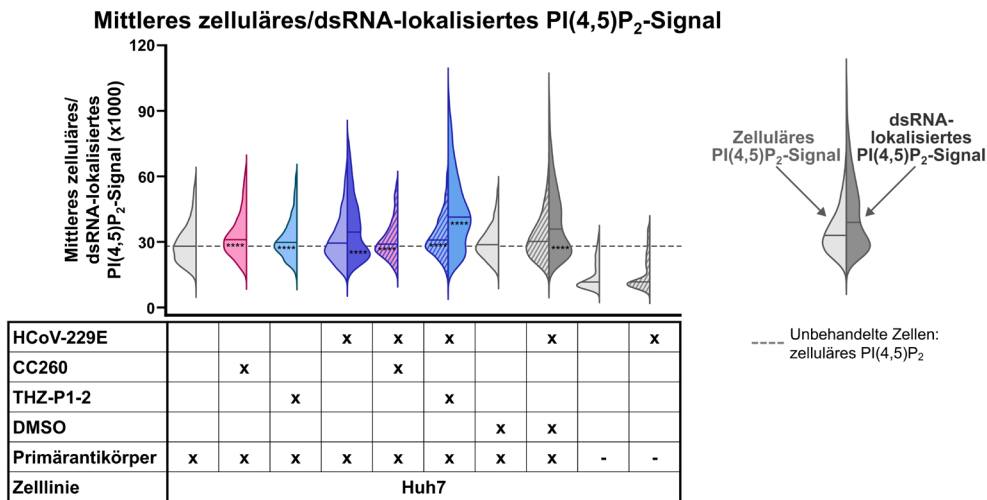


Abb. 79 Lokalisation von PI(4,5)P₂ in dsRNA-Spots nach PIP4K2-Inhibitorbehandlung

Gezeigt ist ein Splitviolinplot für das mittlere zelluläre PI(4,5)P₂-Signal (links) und das dsRNA-lokalisierte PI(4,5)P₂-Signal (rechts) des in Abb. 78 gezeigten Versuches für die

zusammengeführten Replikate. Zur Darstellung wurden Ausreißer durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA bezogen auf die unbehandelte, nichtinfizierte Probe für das zelluläre Signal oder auf das zelluläre Gesamtsignal der jeweiligen Behandlung für das dsRNA-lokalisierte Signal (**** $p \leq 0,0001$).

Nachfolgend wurden mögliche Zusammenhänge der dsRNA- und PI(4,5)P₂-Level durch die Erstellung einer Korrelationsmatrix der erhobenen Parameter für HCoV-229E-infizierte Zellen untersucht (Abb. 80). Die Zunahme der Fläche von dsRNA-Spots korrelierte stark mit einem Anstieg des mittleren und integrierten dsRNA-Signals, welches zeigte, dass die dsRNA-Intensität proportional zur Spotgröße steht. Zudem wurde ein schwacher Zusammenhang der Zellfläche und dsRNA-Spotfläche beobachtet. In Bezug auf PI(4,5)P₂ wurde eine moderate bis starke Korrelation zwischen der Fläche sowie Intensität von dsRNA und der mittleren oder integrierten PI(4,5)P₂-Signalstärke innerhalb der dsRNA-Spots detektiert. Im Kontrast hierzu bestand keine Abhängigkeit der mittleren und integrierten Intensität oder Fläche von dsRNA zu der mittleren PI(4,5)P₂-Intensität in der Gesamtzelle oder den inneren bzw. äußeren Bereichen der Zelle. Demnach konnte das dsRNA-lokalisierte PI(4,5)P₂ als eine Subpopulation des Phosphoinositids klassifiziert werden, welche unabhängig von der Gesamtproduktion der Zelle in dsRNA-positive Strukturen lokalisierte.

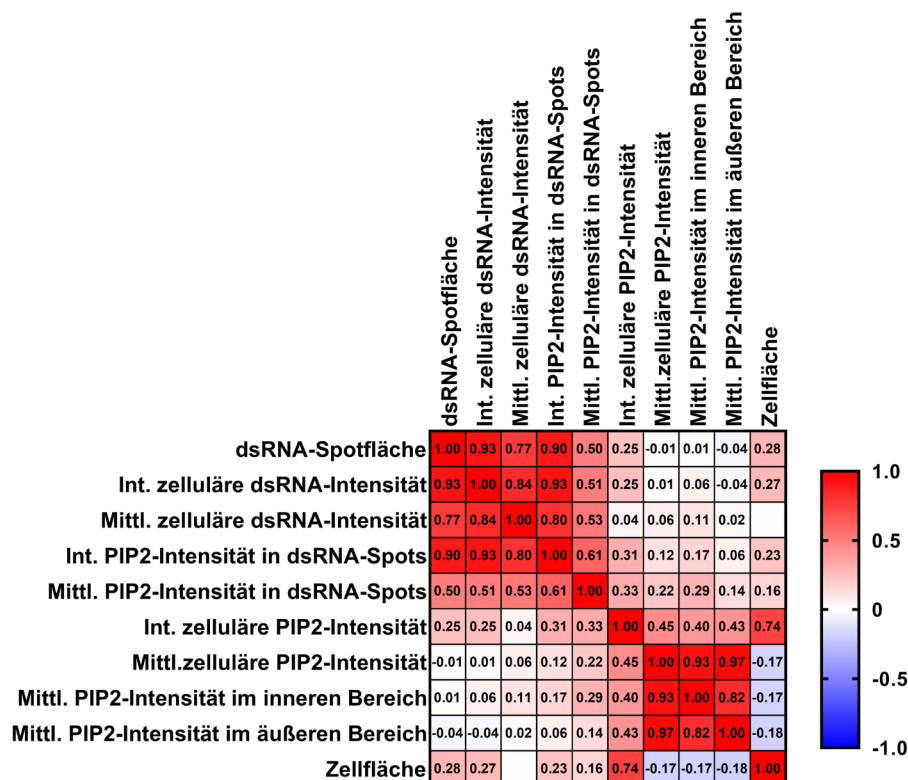


Abb. 80 Untersuchung der Zusammenhänge von PI(4,5)P₂ und dsRNA in HCoV-229E-infizierten Zellen

Die Korrelationsmatrix wurde durch Graphpad Prism für die in Abb. 78 gezeigten Daten aus der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse mit Erfassung der mittleren (mittl.)/integrierten (int.)

Intensitäten sowie Flächen von dsRNA und PI(4,5)P₂ (PIP2) für die zusammengeführten drei bis fünf biologischen Replikate erstellt. Die Farbskala visualisiert den Pearson-Korrelationskoeffizienten r.

Die Formation von dsRNA-Spots und die Zellfläche verhielten sich proportional. Es zeigte sich die Bildung einer Subpopulation von PI(4,5)P₂ in dsRNA-Spots, welche von der Fläche und Intensität dieser abhängig waren, während das restliche zelluläre PI(4,5)P₂ keine Korrelation aufwies. Im Weiteren sollte veranschaulicht werden, welchen Einfluss die Inhibitorbehandlung auf diesen Effekt hatte. Für die Abhängigkeit des mittleren dsRNA-Signales vom dsRNA-lokalisierten PI(4,5)P₂ zeigte sich eine moderate Korrelation für unbehandelten Zellen und solche, welche mit THZ-P1-2 oder DMSO behandelt wurden (Abb. 81 A). Die Zugabe von CC260 hemmte erfolgreich die Bildung der replikativen Organellen, aufgrund dessen nur wenige Zellen mit dsRNA-Spots detektiert wurden. Der Vergleich der Abhängigkeit des dsRNA-bedeckten Flächenanteils der Zelle von der mittleren dsRNA-Intensität zeigte eine sehr starke Korrelation in unbehandelten Zellen sowie nach der Zugabe von THZ-P1-2 oder DMSO (Abb. 81 B). Interessanterweise führte die Behandlung mit THZ-P1-2 zu einer verbesserten Korrelation. Für CC260 war durch die Hemmung der Replikation erneut keine Messung von dsRNA möglich.

Zusammenfassend konnte die starke antivirale Wirkung von CC260 bestätigt werden, während THZ-P1-2 die Bildung von dsRNA nicht beeinflusste. Die Analyse der Verteilung von PI(4,5)P₂ zeigte die Bildung einer Subpopulation, welche sich in dsRNA-Spots anreicherte und einen engen Zusammenhang zu der Intensität und Fläche der dsRNA-Spots aufwies.

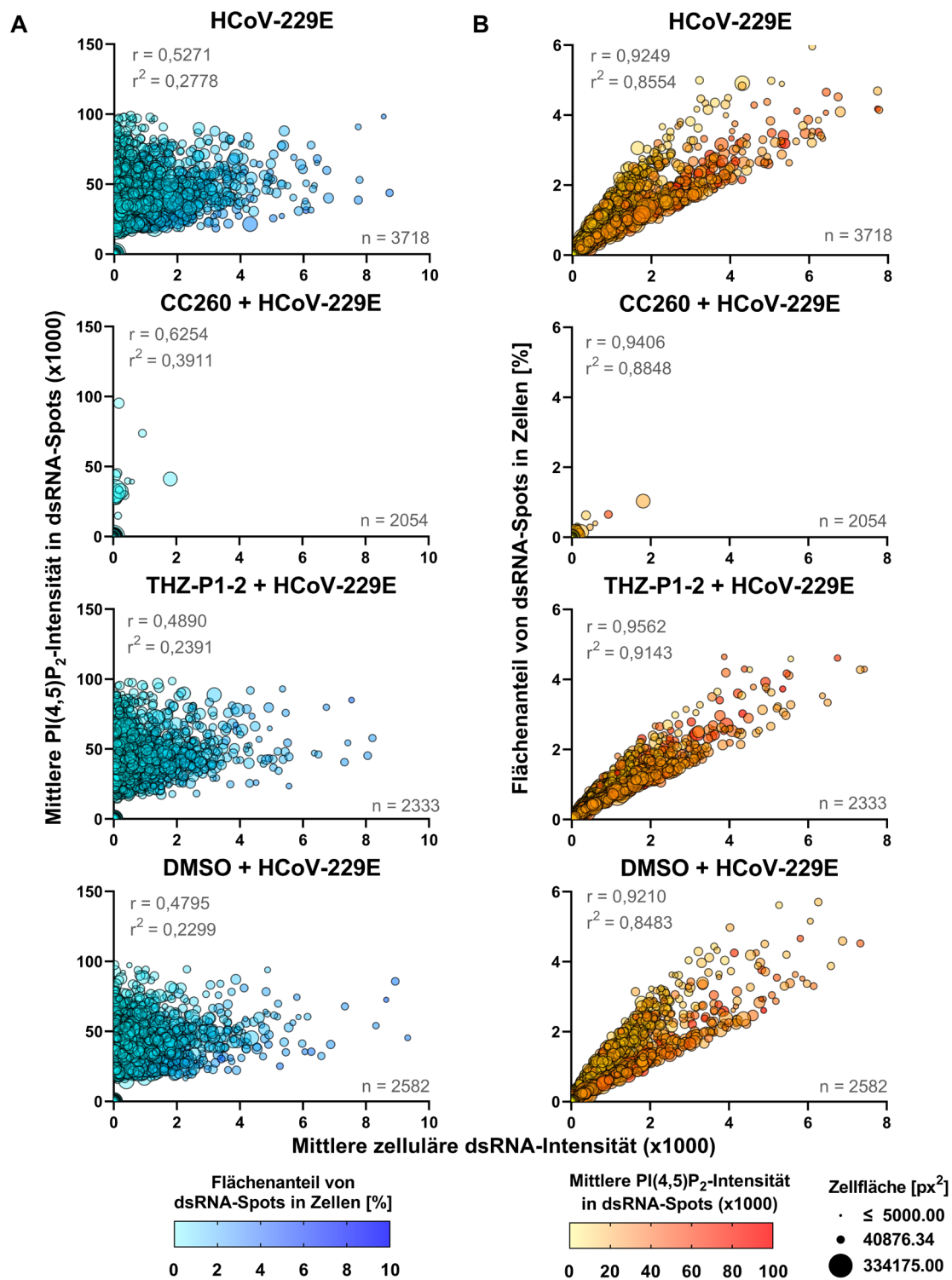


Abb. 81 Einzelzellbasierte Darstellung der Abhängigkeiten von PI(4,5)P₂ und dsRNA nach der Behandlung mit THZ-P1-2 und CC260

(A) Gezeigt sind Bubbleplots der infizierten Huh7 Zellen mit bzw. ohne CC260-, THZ-P1-2- oder DMSO-Zugabe nach der in Abb. 78 beschriebenen indirekten Immunfluoreszenz-Analyse für die Abhängigkeit der mittleren PI(4,5)P₂-Intensität in dsRNA-Spots verglichen mit der mittleren zellulären dsRNA-Intensität für die zusammengeführten Zellen von drei bis fünf biologischen Replikaten. Der Wert n gibt die Anzahl der erfassten Zellen pro Behandlung an. (B) Dargestellt sind Bubbleplots für die Relation des Flächenanteils von dsRNA-Spots in der Zelle zur mittleren zellulären dsRNA-Intensität. Die Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten r und des Bestimmungsmaßes r^2 erfolgte durch Graphpad Prism.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich die Messung der Vorgänge der Autophagie und ER-Phagie durch verschiedene, voneinander unabhängige Methoden etabliert und für die Untersuchung der Autophagie-abhängigen Regulation von Endomembranstrukturen in CoV-infizierten Zellen angewandt. In diesem Kontext wurden sodann neue Zielstrukturen als Angriffspunkte für eine antivirale Therapie mit pharmakogenetischen Methoden funktionell charakterisiert. Diese Befunde sowie ihre Einordnung in den aktuellen Stand der Forschung werden im Folgenden diskutiert.

5.1. Die Rolle von Autophagie in der Replikation von HCoV-229E

Zur Erfassung des Autophagie- und ER-Phagieprozesses wurde ein Tandem-Reportersystem etabliert. Die durchflusszytometrische Analyse wurde mittels einer standardisierten Zellauswahlstrategie durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte über die KI-basierte Zählung und Vermessung von Autophagosomen und Autolysosomen in über 1.000 Zellen pro Kondition und erlaubte eine verfeinerte Quantifizierung der Anzahl und Größe von Autophagosomen und der durch Fusion entstandenen Autolysosomen, wodurch frühe und späte Schritte im Autophagieprozess getrennt voneinander analysiert werden konnten. Zusätzlich wurde für den ER-Phagie-Reporter ein Degradationsassay eingeführt. Im Verlauf dieser Studie wurden diese etablierten Methoden zur systematischen und vergleichenden Untersuchung von Autophagieprozessen in HCoV-229E-infizierten Zellen verwendet.

5.1.1. Induktion der unspezifischen Autophagie durch HCoV-229E

Autophagie ist ein Prozess, welcher sowohl konstitutive bzw. homöostatische als auch stressinduzierbare Funktionen ausübt (He & Klionsky, 2009). Während Autophagie primär zum Recycling von Makromolekülen oder zur Elimination von potentiell schädlichen Strukturen, wie fehlerhaften Organellen oder aggregierten Proteinkomplexen, dient, nutzen diverse Viren den Prozess offenbar auch für ihre Replikation aus. Coronaviren, insbesondere SARS-CoV-2, wurden in einigen Studien hinsichtlich ihrer Interaktion mit Autophagieprozessen untersucht, jedoch zeigen die Ergebnisse kein einheitliches Bild (Chen et al., 2023; Seiler & Tschan, 2021). Mit Hilfe der verbesserten einzelzellbasierten Quantifizierung des Tandem-Reporter-Systems konnten in dieser Arbeit drei wesentliche Befunde für ein mit HCoV-229E-infiziertes zelluläres Modellsystem erhoben werden: (1) HCoV-229E aktiviert Autophagie mit zunehmender Infektionszeit auf einem moderaten Niveau, (2) LC3B ist ein Bestandteil

der DMVs, und (3) das Ausmaß des virusinduzierten autophagischen Fluxes korreliert nicht mit der Replikationsstärke.

Zunächst wurde mittels des Autophagie-Tandem-Reporters die zeitabhängige Aktivierung nach HCoV-229E-Infektion gezeigt, welche 20 h nach Infektion am stärksten war. Die ersten Autolysosomenformationen waren 8 h nach Infektion festzustellen, während 12 h nach Infektion eine nachweisbare Abnahme von Autophagosomen stattfand. Im selben Zeitraum begann die Synthese des N Proteins, welches durch die Western-Blot-Analyse detektiert wurde und bis 20 h nach Infektion weiter zunahm. Die Untersuchung von SARS-CoV offenbart ein ähnliches Bild mit der Dauer eines Replikationszykluses von etwa 7 h (Keyaerts et al., 2005). Im Kontext der Autophagieregulation durch SARS-CoV-2 konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Beclin-1 oder VPS15 zu einer Blockade der Replikation des Virus durch den Arrest von Autophagie führt (Wang et al., 2021). Zudem induziert SARS-CoV-2 die Formation von Autophagosomen durch die Aktivierung von ULK-1-ATG13- und VPS24-VPS15-Beclin-1 Komplexen (Shang et al., 2021). Im Falle von MERS-CoV wird der Abbau von Autophagosomen durch die Blockade der Autophagosom-Lysosom-Fusion verhindert (Chen et al., 2014). Konträr hierzu wurde in dieser Arbeit eine substantielle Zunahme an Autolysosomen nach HCoV-229E-Infektion detektiert. Demnach ist Autophagie ein wichtiger aktivierbarer Prozess während einer Coronavirus-Infektion, jedoch zeigen sich virusspezifische Unterschiede in den späteren Regulationsschritten dieses Vorgangs.

Die Infektion mit SARS-CoV führt durch nsp6 zu einer starken Induktion der Formation von Autophagosomen, jedoch ist deren Expansion gehemmt (Cottam et al., 2011; Cottam et al., 2014). Die Messung der Autophagosomenfläche nach HCoV-229E-Infektion zeigte in dieser Arbeit mit einer reproduzierbaren Vergrößerung in zwei Zelllinien einen gegenteiligen Effekt. Während der Infektion entstanden regelmäßig perinukleäre auffällige Strukturen mit hoher Reporterdichte und starker Fluoreszenz, welche als Autophagosom-ähnlich eingestuft wurden. Eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse zeigte die Lokalisation von dsRNA in diesen Vesikeln. Für Viren wie HCV oder MHV ist ebenfalls eine Assoziation von LC3 mit den replikativen Organellen bekannt (Paul & Bartenschlager, 2013). Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass Coronaviren wie HCoV-229E, MERS-CoV, SARS-CoV und SARS-CoV-2 die Formation der Autophagosomen für ihre Replikation und als Ursprung der DMVs nutzen (Cortese et al., 2020; Knoops et al., 2008; Snijder et al., 2020). Des Weiteren werden die DMVs von MHV durch einen mit ERAD in Verbindung stehenden Mechanismus geformt und LC3-I wird über einen Autophagie-unabhängigen Weg rekrutiert (Monastyrska et al.,

2013; Reggiori et al., 2010; Wang et al., 2017). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit eine Suppression der Proteinmenge von LC3B-I nach der Infektion mit HCoV-229E erfasst, welches mit einer vermehrten Konvertierung von LC3B-I in die lipidierte aktive Form LC3B-II vereinbar ist und somit eine zusätzliche, unabhängige Evidenz für eine Aktivierung von Autophagie darstellt.

Die Behandlung mit Bafilomycin A1, als indirekter Fusionsinhibitor von Autophagosomen mit Lysosomen, resultierte in einer starken antiviralen Wirkung gegen HCoV-229E. Einen vergleichbaren Effekt erzielt die Behandlung nach SARS-CoV-2-Infektion, jedoch ist hierbei ein Teil des Wirkmechanismus auf die Hemmung des Eintritts des Virus in die Zelle zurückzuführen, durch die Blockade der Ansäuerung von endosomalen Kompartimenten (Icho et al., 2022). Im Fall von HCoV-229E wurde eine Abnahme der antiviralen Wirkung von Bafilomycin A1 bei der Zugabe zu späteren Zeitpunkten nach erfolgter Infektion festgestellt, während für MERS-CoV keine Hemmung stattfindet, welches ebenfalls auf eine Rolle in der Aufnahme des Virus hindeutet (Shaban et al., 2021). Demnach variiert die Bafilomycin A1-Sensitivität für verschiedene Coronaviren und die Substanz ist kein universeller Hemmstoff der CoV-Replikation.

Als weiteres RNA-Virus zeigen Polioviren eine starke Korrelation des Autophagielevels und der Virusreplikation (Jackson et al., 2005). Zudem fusionieren die DMVs des Poliovirus in späten Replikationsschritten mit Endosomen, welches zu ihrer Ansäuerung führt und obligat für die Bildung von reifen Virionen ist (Richards & Jackson, 2012). Demgegenüber zeigten die Untersuchungen dieser Arbeit keine Korrelation zwischen der Stärke der HCoV-229E-induzierten Autophagie und der Intensität der Bildung von dsRNA. Dies lässt vermuten, dass für die Replikation von HCoV-229E einzelne Schritte der Autophagie von zentraler Bedeutung sind, während der vollständige Ablauf mit Bildung der Autolysosomen eine geringere Relevanz hat.

Die Proteinmenge von LC3B-I zeigte eine starke Abnahme nach Infektion, welche durch die Umwandlung zu LC3B-II begründet werden kann. Untersuchungen für SARS-CoV-2 zeigen eine zeitabhängige Zunahme von LC3-I und LC3-II, wobei Letztgenanntes überproportional gebildet wird, und funktionelle Analysen nach Überexpression der viralen Komponenten identifizierte *ORF3a* als entscheidendes Gen für die Lipidierung (Qu et al., 2021). Demnach verlief die Zunahme von LC3-II für SARS-CoV-2 und HCoV-229E vergleichbar ab, welches eine Induktion von Autophagie demonstrierte, während sich differenzielle Effekte auf LC3-I und die späten Phasen des autophagischen Fluxes zeigten (Miller et al., 2020).

Die Messung des Autophagie-Markers p62 zeigte eine Bafilomycin A1-sensitive Abnahme durch die Infektion mit HCoV-229E, welche für eine Induktion der spezifischen Autophagie spricht und damit die bereits von unserer Gruppe publizierten Befunde in unabhängigen Untersuchungen validierte (Shaban et al., 2021). P62 ist als Cargo-Rezeptor mit einem LIR-Motif an diversen spezifischen Autophagieprozessen beteiligt, unter anderem Aggrephagie, Mitophagie und Xenophagie (Kumar et al., 2022). Vor diesem Hintergrund ist für SARS-CoV-2 die Induktion der Mitophagie beschrieben, welche mit einer Kolo-kalisation des viralen M Proteins mit den Mitochondrien sowie einer vermehrten Lipidierung von LC3-I zu LC3-II einhergeht (Hui et al., 2021). Für HCoV-229E kann daher eine ähnliche Induktion vermutet werden, jedoch erfordert das breite Substratspektrum von p62 eine weitere genaue Eingrenzung der Subform der spezifischen Autophagie durch zukünftige Untersuchungen.

Zusammenfassend zeigen die Experimente dieser Arbeit und publizierte verfügbare Ergebnisse von weiteren Coronaviren wie SARS-CoV, SARS-CoV-2 und MERS-CoV eine einheitliche Induktion von Autophagie, während spätere Schritte wie die Autolysosomenbildung heterogener und virusspezifisch abzulaufen scheinen (Miller et al., 2020). Eine Hemmung der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen durch Inhibitoren der V-ATPase zeigt keine speziesübergreifende antivirale Wirkung und eignet sich daher nicht als Angriffspunkt eines pan-antiviralen Wirkstoffes. In diesem Kontext wurde im Laufe der COVID-19-Pandemie die zugelassenen Wirkstoffe Chloroquin und Hydroxychloroquin *in vitro* als stark antivirale Substanzen identifiziert, welche V-ATPase-unabhängig die Fusion der Autophagosomen und Lysosomen verhindern (Liu et al., 2020). In klinischen Studien fiel dieser Effekt gering aus und die Überlebensrate sank vermutlich aufgrund dosisbedingter kardialer Nebenwirkungen (Manivannan et al., 2021). Die Datenlage deutet daraufhin, dass *in vitro* die Blockade des Viruseintritts in die Zelle für die Chloroquinwirkung entscheidend ist und nicht die späte Hemmung der Fusion der autophagischen Vesikel mit Lysosomen. Somit wäre eine Fokussierung der zukünftigen Wirkstoffentwicklung auf Faktoren, die zur Aktivierung von Autophagie führen, wie beispielsweise AMPK und mTORC1, oder welche für die Bildung von Autophagosomen relevant sind angebracht (Fattahi et al., 2022). Die pharmakologische Aktivierung von AMPK durch MK-8722 zeigt *in vitro* antivirale Effekte gegen SARS-CoV-2 (Cottignies-Calamarte et al., 2025). Ein weiterer Wirkstoff ist das Antimalariamittel Artemisinin, welches mit einer Reihe an Proteinen interagiert und unter anderem zur Hemmung von mTOR und PI3K führt (Li et al., 2022). Artemisinin zeigt *in vitro* und in ersten *in vivo* Studien gegen SARS-CoV-2 starke antivirale Effekte. Weitere klinische Studien sind ausstehend (Li et al., 2021; Zhou et al.,

2021). Eine Limitation dieser Angriffspunkte besteht darin, dass Autophagie nach Stresseinwirkung und Infektion eine Schutzfunktion für die Zelle erfüllt, weshalb eine Hemmung zur Akkumulation toxischer Strukturen führen kann, welche unter anderem in Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen stehen (Bolt & Klimecki, 2012). Die Umgehung dieser möglichen systemischen Nebenwirkungen wäre allerdings durch eine gezielte inhalative Verabreichung oder eine zeitlich begrenzte Gabe in Form einer ausreichend hoch dosierten einmaligen Applikation denkbar.

5.1.2. Virale Modulation der ER-Phagie

Die Erfassung von ER-Phagie wurde in dieser Arbeit über drei orthogonale Methoden durchgeführt: die durchflusszytometrische und mikroskopische Auswertung anhand der Unterdrückung der (e)GFP-Signale in Autolysosomen, sowie auf Western-Blot-Ebene mittels der Degradation des ER-Phagie-Reporters. Zusammengenommen zeigten die Daten eine zelllinienabhängige HCoV-229E-induzierte Hemmung von ER-Phagie ab 12 h nach Infektion und keinen Effekt auf die Bildung von Autolysosomen. Die Quantifizierung von Autophagosomen war technisch nicht möglich, da diese nicht ausreichend sichtbar waren und begrenzte folglich die Interpretation der mikroskopischen Ergebnisse. Zudem war keine Rekrutierung des Reporters in DMVs erkennbar. In Bezug auf SARS-CoV-2 zeigt sich in Überexpressionsexperimenten von *ORF8* die Bildung von Kondensaten mit p62, welche mit den ER-Phagie-Cargo-Rezeptoren FAM134B und ATL3 aggregieren. Diese führen zur Formation der DMVs sowie der Hemmung von ER-Phagie (Tan et al., 2023). Während der Replikation von anderen einzelsträngigen RNA-Viren wie Ebola- und Zika-Virus kommt es ebenfalls zu einer Hemmung der ER-Phagie, wobei infolge des *knockouts* von *FAM134B* 10- bis 100-fach höhere virale Titer für das Ebola-Virus messbar sind (Chiramel et al., 2016; Lennemann & Coyne, 2017). Des Weiteren zeigte eine Überexpression des ER-Phagie-Rezeptors SEC62 antivirale Effekte für das Maul-und-Klauenseuche-Virus (Wu et al., 2021). SEC62 wird infolge von ER-Stress aktiv und steht in Verbindung zur UPR, einem alternativen Mechanismus zum Abbau von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen (Wilson & McCormick, 2025). Für verschiedene Vertreter der Coronaviren wie SARS-CoV und HCoV-OC43 wurde gezeigt, dass eine Infektion mit verstärkter Belastung des ERs zur Aktivierung der UPR führt (Fung & Liu, 2019). Eine gesteigerte Expression von SEC62 kann somit die Induktion der UPR senken und sich negativ auf das Infektionsgeschehen auswirken (Wilson & McCormick, 2025).

Zusammengefasst ist ER-Phagie ein noch unvollständig charakterisierter Prozess, der zu einem gegebenen Zeitpunkt vermutlich nur lokal einen kleinen Teil des ERs betrifft

und damit schwierig zu messen ist (Di Monaco et al., 2024). ER-Phagie wird von zahlreichen Viren herunterreguliert, welches ebenfalls in dieser Arbeit für HCoV-229E beobachtet werden konnte (Wilson & McCormick, 2025). Zur weiteren Untersuchung von ER-Phagie wäre es zielführend, die Relevanz der einzelnen Cargo-Rezeptoren wie FAM134B oder SEC62 für HCoV-229E zu klären. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte vermutet werden, dass die gezielte Aktivierung oder Restaurierung der ER-Phagie einen interessanten Angriffspunkt für neue antivirale Wirkstoffe darstellt und möglicherweise geringere Nebeneffekte sowie Toxizität gegenüber einer globalen Beeinflussung der unspezifischen Autophagie verursacht.

5.2. SEC24A als Faktor in der Wirkung von Thapsigargin

5.2.1. Modulation von Autophagie durch SEC24A

Die Syntheserate von SEC24A wird infolge der HCoV-229E-Infektion gesenkt, während die Zugabe von Thapsigargin diese steigert. Die Behandlung von infizierten SEC24A-defizienten Zelllinien mit Thapsigargin resultiert in einer höheren Zellviabilität nach 96 h im Vergleich zu Leervektorzellen sowie einer auf einem sehr schwachen Niveau erfolgenden Aufhebung der antiviralen Wirkung von Thapsigargin auf die HCoV-229E-Replikation (Albert, 2023). In den Experimenten dieser Arbeit erfolgte die weitere Analyse der Funktion von SEC24A während einer HCoV-229E-Infektion durch die Etablierung von *knockout*-Zelllinien mit dem Autophagie-Reporter. Die Western-Blot-Analyse der SEC24A-defizienten Zellen zeigte gegenüber Leervektorzellen eine stärkere Anreicherung von LC3B-I/II sowie p62 nach der Bafilomycin A1-Behandlung. Zudem wurde durch die Reporterbasierten Methoden eine erhöhte autophagische Aktivität sowie die Formation von Autolysosomen unabhängig von den verschiedenen Behandlungen beobachtet.

SEC24A ist neben SEC23 ein Bestandteil der inneren Hülle von COPII-Vesikeln, welche dem ER entstammen, und bindet dort verschiedene Proteine für den Transport zu Organellen (Zanetti et al., 2013). COPII-Vesikel werden seit geraumer Zeit als eine der Ausgangsstrukturen für die Bildung von Phagophoren in frühen Schritten der Autophagie diskutiert (Shima et al., 2019). SEC12 ist an der Formation von COPII-Vesikeln beteiligt und unter Nährstoffmangel wird es durch ULK1 zum ERGIC rekrutiert (Ge et al., 2017). Im Anschluss können sich die Vesikel an der Bildung der Phagophore beteiligen (Ge et al., 2015). Zudem phosphoryliert ULK1 das Protein SEC23B, welches SEC24A und SEC24B komplexiert und das Wachstum von Phagophoren bedingt (Jeong et al., 2018). Vor diesem Hintergrund lässt sich vermuten, dass der *knockout* von *SEC24A* eine Hemmung der Formation von Phagophoren und damit der Aktivierung von Autophagie

bewirkt, jedoch zeigten entsprechende Experimente in dieser Arbeit einen gegenteiligen Befund. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch das Fehlen von SEC24A die Synthese von SEC24B angetrieben wird und eine Überkompensation mit anschließender gesteigerter Formation der Vesikel stattfindet. Hinzukommt, dass die Messung der Fläche der Autophagosomen in *knockout*-Zellen keine Veränderungen zeigte, welche eine Modulation der Expansion und des Abbaus von Autophagosomen ausschloss. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass SEC24A eher an den frühen Schritten der Autophagie beteiligt ist.

Die Infektion der *SEC24A knockout*-Zellen mit HCoV-229E zeigte keine Veränderungen der N Proteinmenge oder Formation der virusinduzierten Autophagosom-ähnlichen Strukturen, als indirekter Nachweis der replikativen Organellen, im Vergleich zu den Wildtypzellen. Für Polioviren konnte eine Beteiligung von COPII-Vesikeln an der Bildung von DMVs gezeigt werden (Trahey et al., 2012). Zudem ist SEC24C als proviraler Faktor für die Replikation des Ebola-Virus und HIV-1 erforscht (Bhattarai et al., 2022; Rebensburg et al., 2021). Des Weiteren zeigt ein siRNA *knockdown* von *SEC24C* eine Relevanz für die durch Torin2, einem mTOR-Inhibitor, induzierte ER-Phagie, während der Prozess von den anderen Isoformen des Proteins unbeeinträchtigt ist (Cui et al., 2019). Für Coronaviren gibt es keine ausreichend genauen Hinweise über die Nutzung von COPII-Vesikeln. Die Senkung der Neosynthese von SEC24A und die unveränderte Bildung von Autophagosom-ähnlichen Strukturen deuten darauf hin, dass die Formation von funktionalen COPII-Vesikeln während der Replikation von HCoV-229E in Huh7 Zellen von geringer Bedeutung sind und der generellen translationalen Abnahme nach Infektion unterliegen.

5.2.2. Einfluss von SEC24A auf die Inhibition der Autophagie durch Thapsigargin

Die Behandlung von SEC24A-defizienten Zellen mit Thapsigargin und nachfolgender durchflusszytometrischer sowie mikroskopischer Analyse der Autophagie zeigte nach Hungern und Infektion mit HCoV-229E eine Reduktion der Thapsigargin-vermittelten Hemmung der Autophagieaktivität auf basale Level, während die antivirale Wirkung unbeeinflusst war. In Pflanzenzellen ist eine Interaktion von SAR1 (Sekretionsassoziierte Ras-verwandte GTPase), eine GTPase beteiligt an der COPII-Hüllbildung, und SEC24A mit dem PI3P-Effektorprotein FYVE2 belegt, welches auch in späten Schritten der Autophagie involviert ist (Chung et al., 2024; Kim et al., 2022). Vor diesem Hintergrund ist eine komplexe Interaktion von COPII-Vesikeln mit der Autophagie-Maschinerie zu vermuten und weitere Untersuchungen sind notwendig.

Die Kombination von Thapsigargin mit Bafilomycin A1, führte in Leervektorzellen zu einer Akkumulation von Autophagosomen und es zeigten sich morphologisch zytopathische Effekte. In *SEC24A knockout*-Zellen war dagegen die Anzahl an autophagischen Vesikeln vergleichbar zu der alleinigen Behandlung der beiden Inhibitoren. Eine Reaktion der Zelle auf Stresszustände wie beispielsweise ER-Stress ist die Aktivierung von Autophagie. In einer Studie von Chidawanyika et al. (2018) wurde SEC24A durch einen genomweiten CRISPR-Cas9-basierten *loss-of-function screen* als ein Faktor für die Thapsigargin-vermittelte Zelltoxizität und Aktivierung der UPR identifiziert. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass der *knockout* von SEC24A die Toxizität sowie UPR-Aktivierung nach Thapsigargin-Behandlung reduziert, welches eine verminderte Induktion von Autophagie und Formation von Autophagosomen zufolge hat, welche bei einer Koadministration mit Bafilomycin A1 in ihrem Abbau gehemmt werden können.

Insgesamt zeigt die Datenlage, dass SEC24A an der Thapsigargin-bedingten UPR-Aktivierung und Autophagie-Hemmung beteiligt ist, während die antivirale Wirkung primär auf einem alternativen Mechanismus, wie beispielsweise der Veränderung des Calciumhaushaltes basiert. Eine Limitation der Anwendung von Thapsigargin bei nicht malignen Erkrankungen können Dosisbeschränkungen aufgrund toxischer Effekte durch seine multiplen, komplexen Einflüsse auf den Zellmetabolismus sein (Jaskulska et al., 2021). Aus diesen Ergebnissen und Schlussfolgerungen ergäbe sich somit ein neuer, spekulativer Ansatz, anhand dessen die Kombination eines SEC24A-Inhibitors mit Thapsigargin dessen Toxizität inklusive Auswirkungen auf Autophagie senken kann bei gleichzeitig fortbestehender antiviraler Wirkung.

5.3. Charakterisierung von Proteinen mit erhaltener Resttranslation in HCoV-229E-infizierten Zellen

Die translationale Abnahme infolge der Coronavirus-Infektion ist weitreichend beschrieben und folglich war es von Interesse, die weiterhin translatierten Proteine mit der Hypothese zu untersuchen, dass diese eine potentielle Rolle in der Replikation spielen könnten (Karousis et al., 2024). Die Analyse der naszierenden Proteine zeigte für MURC und PIP4K2B eine zeitabhängige Expression nach Infektion, welche durch einen Puro-PLA bestätigt wurde. Im Folgenden sollen die Einflüsse dieser beiden Proteine im Kontext der Arbeit diskutiert werden.

5.3.1. CoV-induzierte Regulation von Caveolae-assoziierten Proteinen am Beispiel von MURC/CAVIN-4

Die Bildung von Caveolae in der Plasmamembran wird durch Caveolin-1 – 3 initiiert und durch die assoziierten Faktoren CAVIN-1 – 3 sowie CAVIN-4 (MURC) stabilisiert (Chidlow & Sessa, 2010). Diese Einstülpungen sind eine spezielle Form von *lipid rafts*, welche als dynamische Mikrodomänen in der Zellmembran für Membranorganisationen und Signalübertragungen essentiell sind (Patel et al., 2008). HCoV-229E und HCoV-OC43 nutzen Caveolae durch eine Interaktion mit APN für den Eintritt in die Zelle (Nomura et al., 2004). Im Falle von SARS-CoV-2 sind weitere Cholesterin-reiche *lipid rafts* zur Aufnahme in Zellen beschrieben worden (Palacios-Rapalo et al., 2021). Bereits zugelassene Therapien einer Infektion mit SARS-CoV-2, wie Glukokortikoide oder Heparin, basieren neben der antiinflammatorischen und immunsupprimierenden bzw. gerinnungshemmenden Wirkung möglicherweise auf der Modulation solcher Strukturen (Roncato et al., 2022). Der konkrete Einfluss der Stützproteine CAVIN-1 – 4 auf die Replikation von Viren ist größtenteils unerforscht. Für das Humane Parainfluenza-Virus Typ 2 ist die Hemmung des Abbaus von CAVIN-3 festgestellt worden, welches essentiell für die Replikation des Virus ist (Ohta et al., 2020). In den Experimenten dieser Arbeit wurde eine infektionszeitabhängige Zunahme der mRNA-Expression von *MURC* (*CAVIN4*) gezeigt. Zudem konnte in dem durchgeführten Puro-PLA eine gesteigerte Bildung von MURC in HCoV-229E-infizierten Zellen gemessen werden, wobei eine ausgeprägte zelluläre Heterogenität beobachtet wurde. Zudem erfolgte in MURC-defizienten Zellen die ungehinderte der Bildung von dsRNA-Spots, jedoch eine leichte Abnahme des viralen Titers für Huh7 Zellen. Aufgrund der zeitabhängigen Zunahme des Proteins und der späten Beeinflussung des Replikationszyklus lässt sich eine Rolle für die Assemblierung des Virus oder die Freisetzung aus der Zelle vermuten. Ein solcher Mechanismus wurde bereits für HIV-1 oder HCV beschrieben, welche *lipid rafts* als molekulares Stützgerüst (*scaffold*) für die Assemblierung neuer Virionen verwenden (Hommelgaard et al., 2005; Xing et al., 2020). Weitergehend wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse gezeigt, dass MURC ubiquitär in Zellen verteilt ist, jedoch nach Infektion mit HCoV-229E vermehrt in die Umgebung des Zellkerns lokalisiert, wobei eine Korrelationsanalyse der mittleren zellulären Intensität von dsRNA und MURC einen schwachen Zusammenhang ergab. Eine Erklärung für diese Verteilung wäre eine Rekrutierung von MURC an Endomembranen, wo es als Stützprotein für die DMVs fungieren könnte.

5.3.2. Einfluss einer MURC/CAVIN-4-Depletion auf Autophagie und HCoV-229E

Zur weiteren Untersuchung von MURC wurden Zellen mittels eines siRNA-basierten *knockdown*, welcher über die Depletion der *MURC*-mRNA-Level nachgewiesen wurde, oder CRISPR-Cas9-vermittelten *knockouts* verwendet, wobei die mangelnde Verfügbarkeit eines spezifischen MURC-Antikörpers keine Aussage zu dem Ausmaß einer möglichen Proteinsuppression erlaubte. Die basalen Proteinlevel der Autophagie-Markers p62 und LC3B-II waren nach einer MURC-Depletion vermindert, vereinbar mit einer Steigerung des basalen Autophagieflusses. In Übereinstimmung damit zeigten die Autophagie-Reporterzelllinien eine parallele Zunahme von Autophagosomen und Autolysosomen, welche allerdings ein unverändertes Verhältnis gegenüber den Kontrollzellen aufwiesen. Diese Daten zeigten, dass der komplette Autophagieprozess intakt war und die gleichzeitige Zunahme von Autophagosomen und Autolysosomen wahrscheinlich durch eine gesteigerte Induktion von Autophagie bedingt war. Die HCoV-229E-induzierte Formation von Autolysosomen und die Flächenzunahme von Autophagosomen war durch die Depletion von MURC leicht beeinträchtigt, jedoch war die Gesamtanzahl der autophagischen Vesikel erhöht, welches erneut die gesteigerte Induktion nach dem *knockout* offenbart und eine geringfügige Bedeutung für die Replikation des Virus impliziert. Über eine Rolle von Caveolae im Autophagieprozess ist bislang wenig bekannt, jedoch besteht eine inverse Korrelation zwischen den mRNA-Leveln von *CAV1* (kodiert Caveolin-1) verglichen mit der *ATG5*- bzw. *BECN1* (kodiert Beclin-1)-mRNA-Menge (Liu et al., 2016). Zudem führt ein *knockout* des *CAV1*-Gens zu einer Akkumulation von LC3B-II, welches auf eine Autophagie-hemmende Funktion des Proteins hindeutet (Liu et al., 2016). In Untersuchungen der Atherosklerose wurde eine Interaktion von Caveolin-1 mit dem für die Lipidierung von LC3B-I zuständigen ATG5-ATG12-Komplex nachgewiesen, welche zu einer reduzierten Formation von Autophagosomen führt (X. B. Zhang et al., 2020). Für CAVIN-Proteine fehlen bislang analoge wissenschaftliche Untersuchungen. Die gesteigerte Bildung von Vesikeln in *MURC knockouts* ist ein Indiz für die Derepression von Autophagieprozessen und stimmt daher mit den zitierten Beobachtungen zu Caveolin-1 überein.

Die MURC-defizienten Zellen zeigten eine sehr geringe zelllinienabhängige Abnahme des viralen Titers bei nahezu unveränderter N Proteinmenge und der siRNA-vermittelte *knockdown* beeinflusste die *nsp8*-mRNA-Menge nicht. Zudem war in einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse die mittlere dsRNA-Intensität sowie der Anteil an infizierten Zellen mit den Kontrollzellen vergleichbar. Des Weiteren wurde eine starke Korrelation

zwischen der mittleren dsRNA-Intensität und der dsRNA-bedeckten Zellfläche beobachtet. Auffällig war, dass im Gegensatz zu den Kontrollzellen vermehrt Zellen mit großer Zellfläche und verstärkten integrierten dsRNA-Signal auftraten. Für Caveolin-Proteine ist die Beteiligung am viralen Egress des humanen respiratorischen Synzytial-Virus oder des Dengue-Virus beschrieben (Alcalá et al., 2017; Kipper et al., 2015). Vor diesem Hintergrund ist eine Erklärung der Befunde, dass in MURC-defizienten Zellen eine normale Produktion von Coronaviruspartikeln innerhalb der Zelle stattfindet, jedoch das Ausschleusen der Viren partiell eingeschränkt ist. Infolgedessen akkumuliert dsRNA in Zellen und diese expandieren. Eine alternative Hypothese ist, dass durch den *MURC knockout* die negative Regulation auf Autophagie entfällt, welches eine gesteigerte Synthese von autophagischen Vesikeln und daraus resultierend zunehmender Produktion von DMVs bedingt, die zu der beobachteten Expansion der Zellflächen führen. Aufgrund ungenügender mikroskopischer Auflösung war es nicht möglich, die genaue Anzahl der DMVs pro Zelle zu ermitteln, sondern nur deren absolute Fläche, welches durch den Einsatz eines Transmissionselektronenmikroskopes umgangen werden könnte. Hierdurch könnte die Anzahl und Größe von DMVs in Kontrollzellen und MURC-defizienten Zellen sowie die subzelluläre Lokalisation von assemblierenden viralen Partikeln systematisch verglichen und eine Aussage zur Rolle von MURC getroffen werden.

5.3.3. PIP4K2 als neue Zielstruktur der Virusreplikation

PIP4K2 trägt nur in geringem Ausmaß zu der Gesamtsynthese von PI(4,5)P₂ bei, ist aber offenbar wichtig für dessen Produktion an bestimmten Endomembranen und subzellulären Kompartimenten sowie für die Regulation der Aktivität von PIP5K (Wills et al., 2023). Im Falle einer HIV-1-Infektion erfolgt das *budding* an die Plasmamembran sowie das Verlassen der Wirtszelle unter Einfluss von PI(4,5)P₂ (Saad et al., 2006). Zudem ist PI(4,5)P₂ durch die Interaktion mit und Rekrutierung von Proteinen sowie die Erzeugung von Membrankrümmungen an Signalprozessen und der Formgebung von Membranen beteiligt (Shukla et al., 2019). Des Weiteren spielt PI(4,5)P₂ eine wichtige Rolle für Membran-Kontaktstellen, z.B. zwischen dem ER und der Plasmamembran zur Übertragung von Lipiden oder der Regulation von Ca²⁺ (Giordano et al., 2013). Es lässt sich daher vermuten, dass PI(4,5)P₂ die Signalübermittlung zur Formation von DMVs fördert, diese Strukturen stabilisiert und eine lokale Bildung der synthesebeteiligten Enzyme entweder weitestgehend von der globalen, HCoV-229E-induzierten translationalen Abnahme ausschließt oder durch eine virusinduzierte *de novo* Synthese kompensiert. Diese Hypothese wurde mittels umfangreicher systematischer

Experimente in dieser Arbeit überprüft. Hierbei zeigte sich die Abnahme der Gesamtproteinlevel der verschiedenen Isoformen von PIP4K2 infolge einer HCoV-229E-Infektion, jedoch wurde PIP4K2B in Huh7 Zellen zu späteren Replikationszeitpunkten neu translatiert, welches eine selektive infektionszeitabhängige Expression demonstrierte.

Zur Untersuchung der Effekte von PIP4K2 wurden CRISPR-Cas9-basierte *knockouts* in Huh7 und A549⁺⁺ Zellen für einzelne oder Kombinationen der drei *PIP4K2*-Isoformen generiert. Unter basalen Bedingungen wurde keine kompensatorische Gegenregulation der Proteinmengen der beiden verbleibenden Isoformen durch einen *knockout* beobachtet, welches auf eine hohe funktionelle Redundanz schließen lässt. In infizierten Zellen konnten im Hinblick auf die CoV-Replikation folgende zelltypspezifische funktionelle Unterschiede zwischen den Isoformen festgestellt werden: (1) die N Proteinlevel nahmen in A549⁺⁺ Zellen nach einer PIP4K2A- und PIP4K2C-Depletion ab, (2) doppelte/dreifache *knockouts* reduzierten in A549⁺⁺ Zellen die dsRNA-Synthese und (3) der virale Titer sank nach einem dreifachen *knockout* (A549⁺⁺) bzw. einem *PIP4K2B* (Huh7) *knockout* um 65 %.

Insgesamt zeigten die Daten der PIP4K2-defizienten Zellen, dass in A549⁺⁺ Zellen vor allem PIP4K2A und in Huh7 Zellen vor allem PIP4K2B für die Replikation des Virus wichtig waren, welches durch die typische gewebespezifische Expression der Kinasen begründet sein könnte. Für PIP4K2A konnte beispielsweise ein abundantes Vorkommen in peripheren Blutzellen gezeigt werden, während PIP4K2B in Muskelgewebe und PIP4K2C in Nierenzellen stark exprimiert wird (Castellino et al., 1997; Clarke et al., 2008; Divecha et al., 1995). Für PIP4K2B wurden zudem nur ein niedriges Expressionsniveau in Lungenzellen detektiert (Castellino et al., 1997).

Bemerkenswerterweise zeigten die dreifachen *knockouts* eine geringere Reduktion des Anteils an infizierten Zellen und der mittleren dsRNA-Intensität als die doppelten *knockouts*. Infolge der Depletion aller drei Isoformen wurde eine verlangsamte Zellproliferation beobachtet, welche sich innerhalb von zwei Wochen wieder erholte, und mit einer Restexpression von PIP4K2A, der enzymatisch aktivsten Lipidkinase, assoziiert war (Clarke & Irvine, 2013). Eine Proteomanalyse der kombinierten Depletion von PIP4K2A und PIP4K2B in Osterosarkomzellen zeigt eine Deregulation von Proteinen, welche an Vesikeltransport, Zellproliferation, Zellmotilität und RNA-Splicing beteiligt sind, jedoch keine apoptotischen Effekte, welches eine überlebenswichtige Kompensation der Synthese von PI(4,5)P₂ durch PIP4K2C oder PIP5K vermuten lässt (Awasthi et al., 2022; Wang et al., 2019). Demgegenüber sind Mäuse nach einer Ko-

Depletion von Pip4k2a und Pip4k2b nicht überlebensfähig, während ein einzelner *knockout* nicht letal verläuft (Emerling et al., 2013). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass vermutlich die Depletion oder pharmakologische Inhibition von mindestens zwei der drei PIP4K2-Isoformen in einem ausreichenden Maß stattfinden muss für einen substantiellen antiviralen Effekt. Dieses Vorgehen birgt jedoch das Risiko von zytotoxischen Effekten, sobald die Gesamtaktivität von PI(4,5)P₂-erzeugenden Kinasen unter ein bestimmtes, minimal erforderliches Niveau fällt.

5.3.4. Relevanz der PI(4,5)P₂-Synthese für die Replikation von HCoV-229E

Im Kontext der Untersuchung von PIP4K2 stellte sich die Frage, inwiefern die katalytische Aktivität eine Rolle für HCoV-229E spielt. Phosphoinositide zeigen eine komplexe Dynamik ihrer Verteilung innerhalb von Zellen (Falkenburger et al., 2010). Während PI(4,5)P₂ abundant in der Plasmamembran vorkommt, ist PI3P hauptsächlich in Membranen von Endosomen oder Autophagosomen zu finden (De Craene et al., 2017). Das subzelluläre Modifikationsmuster der Phosphoinositide wird unter anderem über die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beteiligten Kinasen und Phosphatasen gesteuert. PIP4K2 reguliert die Synthese einer Subpopulation von PI(4,5)P₂ in intrazellulären Membranen, z.B. von Autophagosomen, während PIP5K die PI(4,5)P₂-Level an der Plasmamembran erzeugt (Posor et al., 2022). Die Experimente dieser Arbeit zeigten eine Lokalisation und Akkumulation von PI(4,5)P₂ in dsRNA-Spots, welche über der mittleren zellulären Intensität lag. Zudem bestand eine moderate Korrelation zwischen dieser Subpopulation an PI(4,5)P₂ und der Fläche von dsRNA-Spots, wohingegen das zelluläre PI(4,5)P₂-Signal diese Abhängigkeit nicht aufwies. Die PI(4,5)P₂-Intensität der Gesamtzelle war nach Infektion gegenüber unbehandelten Zellen unverändert (Huh7) oder leicht erhöht (A549⁺⁺). Unterschiedliche Phosphoinositide wurden bereits vielfach im Kontext der Virusreplikation untersucht, so etwa die ausgeprägte Anreicherung von PI(4,5)P₂ an der viralen Membran von HIV-1, welche ausgehend von der Plasmamembran entsteht, oder die Akkumulation von PI4P an der ER-Membran nach einer HCV-Infektion, welche essentiell für dessen Replikation ist (Hsu et al., 2010; Wen et al., 2020). Des Weiteren ist für Birnaviren die Bildung von frühen PI3P-reichen Endosomen als Plattform der Synthese neuer Virionen gezeigt (Zanetti et al., 2025).

Weitergehende funktionelle Untersuchungen zur Rolle von PIP4K2 wurden mit Hilfe von Mutanten der Isoformen in parental Huh7 Zellen durchgeführt. Die Überexpression der katalytisch aktiven PIP4K2A führte zu einer Reduktion der mittleren dsRNA-Intensität und des darin lokalisierten PI(4,5)P₂-Signals, während dies im Falle von PIP4K2B und

PIP4K2C nur für die inaktiven Mutanten beobachtet wurde. Dieses ist zusätzliche Evidenz für die Relevanz der enzymatischen Aktivität von PIP4K2B bzw. PIP4K2C, jedoch nicht PIP4K2A in Huh7 Zellen. Phosphoinositidkinasen assoziieren als Homo- bzw. Heterodimeren, welches die exakte subzelluläre Lokalisation determiniert und einen weiteren Regulationsmechanismus der aktiven Kinasen darstellt (Lacalle et al., 2015). PIP5K lokalisiert als Homodimer an die Plasmamembran, während ein Heterodimer aus PIP4K2A mit PIP4K2B für eine Translokation zum Nukleus sorgt (Bultsma et al., 2010; Hansen et al., 2022). In diesem Zusammenhang lässt sich vermuten, dass durch die Unterdrückung oder Verdrängung von endogenem PIP4K2B oder PIP4K2C durch ektopische Überexpression von PIP4K2A die korrekte Assemblierung und Translokation von endogenen PIP4K2-Dimeren gestört ist und in einer gesenkten $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Produktion in DMVs resultiert. Die Transfektion der aktiven PIP4K2B- und PIP4K2C-Varianten zeigten dagegen keine Veränderungen des mittleren zellulären dsRNA-Signal, während die inaktiven Formen dieses senkten. Hierbei ist eine analoge Gegenregulation wie für PIP4K2A wahrscheinlich und würde in einer Abnahme der Expression oder Aktivität der endogenen PIP4K2B/C-Komplexe resultieren. Diese Ergebnisse stellen zusätzliche Evidenz für eine Rolle von PIP4K2B bzw. PIP4K2C bei der Bildung von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ in subzellulären Kompartimenten wie dsRNA-Spots dar.

Da die PIP4K2A-Depletion in A549⁺⁺ Zellen den auffälligsten Phänotyp in Bezug auf die virale Replikation ergab, wurden diese mit verschiedenen PIP4K2A-Varianten rekonstituiert. Nach der Transfektion wurde ein erhöhtes mittleres dsRNA-Signal für das katalytisch aktive und inaktive PIP4K2A beobachtet, jedoch war der Anstieg durch die Mutante geringer. Ebenso war eine Zunahme des $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Signals in den dsRNA-Spots infolge der Transfektion messbar. Somit konnte wahrscheinlich eine erfolgreiche Kompensation der PIP4K2A-Funktion in den Zellen durchgeführt werden. Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass die enzymatische Funktion von PIP4K2A während der Replikation von HCoV-229E zur Synthese von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ in dsRNA-Spots beiträgt. Zudem deuten noch erhaltenen Effekte mit der katalytisch inaktiven Mutante auf einen sekundären katalytisch unabhängigen Mechanismus hin, z.B. durch die Beeinflussung der Zusammensetzung von PIP4K2-Komplexen.

Zusammenfassend zeigt sich eine zelltypspezifische Rolle der Isoformen von PIP4K2 für die Replikation von HCoV-229E. Kinaseunabhängige Funktionen können das Infektionsgeschehen fördern, jedoch ist die primäre Aufgabe offenbar die Feinregulation von Subpopulationen des Phosphoinositids $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ in den replikativen Organellen. Zukünftig wäre es daher sehr interessant, die subzelluläre räumliche Verteilung der

einzelnen, endogenen mono- und di-phosphorylierten Phosphoinositide in den genetischen PIP4K2-defizienten Modellen am Ort ihrer Entstehung mit Hilfe von verbesserten Nachweismethoden zu bestimmen. Phosphoinositide interagieren mit spezifischen lipidbindenden Domänen in Proteinen, die für die Entwicklung von rekombinanten, an Fluorophoren-gekoppelten Biosensoren verwendet wurden (Halet, 2005; Maib et al., 2024). Diese Moleküle sind bis auf PI5P für alle sechs Phosphoinositide verfügbar und hochspezifisch (Maib et al., 2024). Zudem wäre es möglich, die intrazellulären PI5P-Level artefiziell zu erhöhen, um die Relevanz dieses Phosphoinositids auf die virale Replikation direkter zu untersuchen. Hierzu kann entweder die aus *shigella flexneri* isolierte Phosphatase IpgD (*inositol phosphate phosphatase*) exprimiert werden, welche das abundante PI(4,5)P₂ quantitativ zu PI5P dephosphoryliert, oder zellpermeable kurzkettige synthetische PI5P-Varianten (C4- oder C16-PI5P) zu den Zellen gegeben werden (Pendaries et al., 2006). Alternativ ist die Erfassung der Virusreplikation nach externer Zugabe von PI5P oder PI(4,5)P₂ durch Mikroinjektion oder in Polyamin-Komplexen, welche an Fluorophore gekoppelt sind, eine weitere wichtige Methode, um die subzelluläre Lokalisationen nach HCoV-229E-Infektion zu untersuchen und zu perturbieren (Golebiewska et al., 2008; Ozaki et al., 2000).

5.3.5. Zellflächenregulation durch PIP4K2

Im Zusammenhang der mikroskopischen Analyse der PIP4K2-defizienten Zellen erfolgte auch eine Erfassung der Zellfläche. Diese nahm nach Infektion zu und dieser Effekt war in *PIP4K2A* und *PIP4K2C* *knockouts* reduziert, in Korrelation mit der Reduktion der HCoV-229E dsRNA-Synthese. Darüber hinaus zeigte sich anhand einer systematischen Korrelationsmatrix von infizierten Kontrollzellen, dass das integrierte dsRNA-Signal mit der Zellfläche sowie der dsRNA-bedeckte Flächenanteil mit dem mittleren zellulären dsRNA-Signal nahezu perfekt korrelierte. Die doppelten und dreifachen *knockouts* besaßen bereits im nicht infizierten Zustand eine zwei- bis dreifach erhöhte Zellfläche verglichen mit Kontrollzellen oder Einzel-*knockouts*. Eine erhöhte Aktivität der Phosphatase PTEN, einem Tumorsuppressor, resultiert u.a. in der Umwandlung von PI(3,4,5)P₃ zu PI(4,5)P₂ und bedingt in Kardiomyozyten eine Vergrößerung der Zellen (Li et al., 2014). Es ist daher zu vermuten, dass infolge des mehrfachen *knockouts* der *PIP4K2*-Isoformen die negative Regulation der Aktivität von PIP5K durch PIP4K2 entfällt und nachfolgend die Produktion von PI(4,5)P₂ an der Plasmamembran gesteigert wird, gefolgt von einer Aktin-Polymerisation und Zunahme der Zellfläche (Hou et al., 2025; Wills et al., 2023). Die Synzytienbildung in HCoV-229E-infizierten A549⁺⁺ Zellen, welche

durch eine Bindung des S Proteins an das Oberflächenprotein APN entsteht, war durch den doppelten und dreifachen *knockout* nicht beeinflusst, jedoch nahm die Fläche des integrierten dsRNA-Signals nur wenig zu, wodurch es zu einer relativen Reduktion der auf die Zellgröße gemittelten dsRNA-Intensität kam (Kawase et al., 2009; Parry & Macnaughton, 1983). Zusammenfassend sind Zellgrößenveränderungen ein interessanter Nebeneffekt der genetischen Perturbation von PIP4K2 und bieten eine zusätzliche Erklärung für die verringerte Proliferation der mehrfachen *knockouts* sowie die Zellvergrößerung durch Coronavirus-Infektion.

5.3.6. Die Rolle von PI(4,5)P₂ im Autophagieprozess

Phosphoinositide sind wesentliche Regulatoren des Autophagieprozesses, so etwa PI3P, welches durch VPS34, eine Phosphatidylinositol-3-Kinase, synthetisiert wird und die Initiierung und Formation von Autophagosomen bewirkt (Yin et al., 2016). Die Bedeutung weiterer Kinasen und Phosphoinositide für die Autophagie ist Gegenstand aktueller Forschung. Daher wurden in dieser Arbeit mögliche Veränderungen von Autophagieprozessen infolge der PIP4K2-Depletion mittels des Autophagie-Reporters untersucht. In Huh7 Zellen fand nach dem *knockout* von *PIP4K2B* ein Anstieg der Gesamtmenge an autophagischen Vesikeln statt. Infolge der Infektion mit HCoV-229E wurde eine unveränderte Aktivierung der Autophagie beobachtet, welche in *PIP4K2B* und den dreifachen *knockouts* allerdings mit einer geringeren Produktion von Autolysosomen einherging, vereinbar mit einer Rolle von PIP4K2 in späteren Phasen des Autophagieprozesses. Die durch HCoV-229E-bedingte Flächenzunahme der Autophagosomen mit Bildung der DMVs war in beiden Zelllinien infolge eines *knockouts* ebenfalls verringert, korrelierend mit einer moderaten Hemmung der Replikation. In A549⁺⁺ Zellen mit einem dreifachen *knockout* war eine Akkumulation von Autophagosomen in allen Behandlungen sichtbar. In ähnlicher Weise zeigen Mausmodelle mit einer Depletion von Pip4k2a und Pip4k2b in der Leber nach Fasten eine Anreicherung von autophagischen Vesikeln (Lundquist et al., 2018). In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Blockade der Kinasen nicht zu einem vollständigen Arrest des Prozesses führt, jedoch zu einem verringerten Abbau der Vesikel, sichtbar durch die gesteigerte Gesamtmenge der Autophagosomen und Autolysosomen.

Für PI(4,5)P₂ ist eine Lokalisation in Phagophoren beschrieben und bietet daher eine Erklärung für die topische Zunahme des Phosphoinositids auf den Autophagosom-ähnlichen, dsRNA-positiven Strukturen von HCoV-229E (Moreau et al., 2012). Hierbei wird eine kleine Menge an PI(4,5)P₂ subzellulär und lokal durch PIP4K2 gebildet und in die sich ausbildenden Phagophore eingelagert. Die Generierung von DMVs aus diesen

Vesikeln resultiert anschließend in Kompartimenten (DMVs) mit der beobachteten erhöhten Dichte an PI(4,5)P₂. Zudem reguliert PI(4,5)P₂ ATG14, welches eine Aktivierung des Autophagieprozesses bewirkt, und ist beteiligt an der Clathrin-vermittelten Endozytose, welche Membranbestandteile für die Synthese von Phagophoren zur Verfügung stellt (Puri et al., 2013; Tan et al., 2016). Ferner ist eine Spaltung durch die Phospholipase C β in Diacylglycerol und IP3 (Inositoltrisphosphat) möglich. Nachfolgend interagiert der aktivierte IP3-Rezeptor mit Beclin-1, welches wiederum den autophagischen Flux unterdrückt (Vicencio et al., 2009). Des Weiteren führt die Bindung von IP3 an den IP3-Rezeptor zum Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER mit der subsequenten Aktivierung von mTORC1, welches ebenso Autophagie hemmt (Hou et al., 2022).

Zusammenfassend besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Regulation der Autophagie und PI(4,5)P₂. Es ist zu vermuten, dass eine Aktivierung oder Hemmung einzelner Schritte des Autophagieprozesses an die korrekte subzelluläre Lokalisation und Konzentration dieses Phosphoinositids gekoppelt ist. Eine Dysregulation der beteiligten Kinasen oder Phosphatasen kann daher eine, möglicherweise subtile, Veränderung der subzellulären PI(4,5)P₂ bedingen, jedoch ist das System durch die hohe Redundanz der beteiligten Enzyme und Phosphoinositide in der Lage, Änderungen in einem weiten Bereich zu kompensieren, welche den nur moderaten Effekt der PIP4K2-Depletion auf den Autophagieprozess erklären würden.

5.4. Pharmakologische Inhibition von PIP4K2

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PIP4K2-Inhibitoren umfangreich auf ihre antivirale Wirkung untersucht. Die Western-Blot-Analyse des N Proteins, die Erfassung der dsRNA-Synthese und die Messung des viralen Titers zeigten für den Inhibitor CC260 bei Konzentrationen von 25 μ M und für THZ-P1-2 ab 10 μ M eine starke, fast komplette Reduktion der Virusreplikation, welche vergleichbar mit denen von Thapsigargin, einer hochpotenten antiviralen Substanz, waren. BAY-091 zeigte in den zwei getesteten Zelllinien keinen Auswirkungen. Im Folgenden werden die differenziellen Effekte der Inhibitoren detaillierter diskutiert.

5.4.1. Der multifaktorielle antivirale Wirkmechanismus von CC260

Die Austestung des Inhibitors CC260 ergab in Huh7 Zellen einen EC₅₀-Wert von 11,49 μ M und zeigte eine *switch-like* Dosis-Wirkungs-Beziehung. Dieses Verhalten könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Inhibitor in Membranen integriert wird und erst bei Überschreiten eines Schwellenwertes freigesetzt wird, welches die für die

Wirkung benötigten hohen Dosen erklärt. Eine Anreicherung in Membranen ist beispielsweise für das Beta-2-Sympathomimetikum Salmeterol bekannt, welches durch seine langsame Freigabe aus dem Membranreservoir zu einer Wirkverlängerung führt (Vauquelin, 2016). Aufgrund fehlender Toxizität bis zu den getesteten Konzentrationen von 100 μM für Huh7 und 50 μM für A549⁺⁺ Zellen war die genaue Bestimmung eines CC_{50} -Wertes nicht möglich. In den *knockout*-Experimenten von *PIP4K2* wurde für den dreifachen *knockout* festgestellt, dass dieser bei vollständiger Abwesenheit der Kinasen nicht überlebensfähig war, sondern nur stabile Zelllinien mit einem residualen Level an *PIP4K2A* erhalten werden konnten. In diesem Zusammenhang wurde in einer Studie die Toxizität von *PIP4K2*-Inhibitoren in akuten lymphatischen Leukämiezellen getestet. Hierbei zeigt THZ-P1-2 mit seiner Affinität für alle Isoformen auch die stärkste Reduktion der Zellviabilität gefolgt von CC260, der basierend auf Kinom-Analysen vermutlich selektiv *PIP4K2A* und *PIP4K2B* inhibiert, während der Inhibitor *PIP4K-IN-a131*, welcher eine Hemmung von *PIP4K2A* und *PIP4K2C* verursacht, den schwächsten toxischen Effekt zeigt (Chen et al., 2021; Kitagawa et al., 2017; Lima et al., 2024). Diese Isoformenselektivität bietet eine Erklärung für die fehlende Toxizität von CC260 im Gegensatz zu THZ-P1-2 und den dreifachen *knockouts* in den Experimenten dieser Arbeit.

Die *in vitro* Spezifität von CC260 wurde an einem Panel von über 70 % des menschlichen Kinoms (396 Proteinkinasen und 14 Lipidkinasen) untersucht. Es zeigt sich eine hohe Affinität für die ATP-Bindungsstellen von *PIP4K2A* und *PIP4K2B*, während *PIP4K2C* nur gering inhibiert wurde (Chen et al., 2021). Die Infektion von *PIP4K2*-defizienten Zellen resultierte in verringerten viralen Titern, welches eine spezifische Rolle der Kinasen bei der Replikation belegt. Andererseits war durch Zugabe von CC260 noch eine nahezu unveränderte, starke Hemmung der Replikation möglich. Diese fehlende Aufhebung der Inhibitorwirkung in Abwesenheit seines spezifischen Zielmoleküls impliziert, dass die Inhibition von *PIP4K2* keine vollständige Erklärung für den potenten Wirkmechanismus von CC260 bietet. Die Kinom-Analysen offenbarten unspezifische Bindungen von CC260 an *PI3K- γ/δ* und *PIKfyve* mit einer drei- bis fünffach höheren Inhibitionskonstante als für *PIP4K2A* (Chen et al., 2021). *PI3K- γ/δ* phosphoryliert bevorzugt *PI(4,5)P₂* zu *PI(3,4,5)P₃* und zu einem geringeren Maß *PI* oder *PI4P* am C₃-Atom (Bilanges et al., 2019; Chantry et al., 1997). Mit einer primären Lokalisation an der Plasmamembran sind *PI3Ks* wichtig für die *PI3K/AKT*-Signalkaskade (Gao et al., 2011). Hierdurch fördern sie das Überleben und die Proliferation von Zellen, sowie die Senkung der Aktivität von Autophagie, welches sich für die Replikation von SARS-CoV-2 als förderlich erwiesen hat (Basile et al., 2022). Inhibitoren des

Signalweges wie der AKT-Inhibitor MK-2206 oder PI3K-Inhibitor Pictilisib zeigen *in vitro* starke antivirale Effekte (Appelberg et al., 2020; Klann et al., 2020). Demzufolge ist die unspezifische Hemmung weiterer Lipidkinasen durch den Einsatz hoher CC260-Konzentrationen ein zusätzlicher plausibler Aspekt des antiviralen Wirkmechanismus.

In diesem Kontext sei zu erwähnen, dass PI3K eine Relevanz für den Eintritt verschiedener Viren wie Influenza A oder HCV in die Zelle aufzeigt (Diehl & Schaal, 2013). PI(4,5)P₂ ist ebenso an endozytotischen Prozessen beteiligt, weswegen in dieser Arbeit eine zeitversetzte Zugabe von CC260 zu infizierten Zellen getestet wurde. Die antivirale Wirkung war auch bei einer Behandlung 8 h nach Infektion vorhanden und demonstrierte, dass die Hauptwirkung des Inhibitors nicht über eine Hemmung des Eintritts des Virus in die Zelle stattfindet. Weitergehend bestätigte eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse eine signifikante Blockade der Produktion von dsRNA. Dementsprechend kann der Wirkmechanismus von CC260 auf frühe Replikationsschritte nach dem Eintritt in die Wirtszelle eingegrenzt werden.

PIKfyve katalysiert einen der zwei möglichen Synthesewege zur Produktion von PI5P, welches als Substrat von PIP4K2 genutzt wird (De Craene et al., 2017). Die Kinase ist eine Zielstruktur des Inhibitors Apilimod, welcher *in vitro* effektiv die Replikation von SARS-CoV-2, HCoV-229E und HCoV-OC43 hemmt (Baker et al., 2023). In einer klinischen Studie zur Therapie einer SARS-CoV-2-Infektion erfolgte eine Senkung der Viruslast, jedoch war kein Vorteil in sekundären Parametern wie Krankenhausaufenthalt erkennbar (Yale University, 2020). Der Wirkmechanismus wird in der Rolle der Kinase während der Endozytose der Viren vermutet. Die postinfektiöse Zugabe von Apilimod zeigt für SARS-CoV-2 abgeschwächte, zelltypabhängige Effekte, jedoch ist kein vollständiger Wirkverlust zu beobachten, welches auf sekundäre antivirale Einflüsse hindeutet (Logue et al., 2022). Hingegen wurde für CC260 keine Reduktion der Wirkung bei postinfektiöser Zugabe detektiert. Daraus folgt, dass die unspezifische Bindung von PIKfyve nicht der primäre Wirkmechanismus von CC260 ist, jedoch zu dessen Effektivität beitragen könnte.

Zusammenfassend wurde der PIP4K2-Inhibitor CC260 als eine neue effektive antivirale Substanz mit geringer Zelltoxizität gegen HCoV-229E identifiziert. Weitere Untersuchungen von MERS-CoV, SARS-CoV und SARS-CoV-2 in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Verena Krähling (Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg) zeigen einen pan-coronavirus-antiviralen Effekt in Calu-3 Zellen, einer Lungenadenokarzinom-Zelllinie (Baumgart et al., 2025). Der Wirkmechanismus lässt sich auf die kombinierte Hemmung von PIP4K2A/B sowie vermutlich sekundäre

unspezifische Bindungen an PIKfyve oder PI3K eingrenzen. In einer neuen Studie konnte für den niedermolekularen PIP4K2C- und PIKfyve-Inhibitor RMC-113 eine komplexe antivirale Wirkung gegen SARS-CoV-2 durch Hemmung des Eintritts in die Zelle, RNA-Replikation, Assemblierung und Verlassens der Zelle gezeigt werden (Karim et al., 2025). Diese unabhängige Evidenz bestätigt die hier gezeigten Daten für PIP4K2 im Kontext der CoV-Replikation und des vielversprechenden antiviralen Inhibitors CC260, welcher als gering toxische Leitsubstanz für die Entwicklung von dualen Hemmstoffen der PI(4,5)P₂-produzierenden Kinasen zur Blockierung der CoV-Replikation dienen könnte.

5.4.2. THZ-P1-2 als Inhibitor der HCoV-229E-Replikation mit begrenztem Selektivitätsindex

THZ-P1-2 bewirkte in Huh7 Zellen eine Senkung der viralen Titer mit einem EC₅₀-Wert von 2,75 µM. Die Bestimmung des CC₅₀-Werts von 20,04 µM in Huh7 Zellen mit HCoV-229E-Infektion resultierte in einem Selektivitätsindex (CC₅₀ / EC₅₀) von 7,3, welches eine niedrige therapeutische Breite in Patienten vermuten lässt. In einer Studie von Lima et al. (2022) ist die Toxizität des Inhibitors extensiv in verschiedenen lymphatischen und myeloischen Leukämiezellen erprobt worden und zeigt vergleichbare CC₅₀-Werte in einem Bereich von 2,3 µM bis 63,3 µM. PI(4,5)P₂, welches durch PIP4K2 synthetisiert wird, ist durch den Transport von Lipidtropfen zu Peroxisomen ein wichtiger Regulator des mitochondrialen Metabolismus. Eine Störung der Funktion der Kinase kann unter Stresseinwirkung zum Zelltod führen (Ravi et al., 2021). Der Inhibitor bindet alle PIP4K2-Isoformen kovalent, welches mit einer Abnahme der Proteinmenge von PIP4K2B mit zunehmender Konzentration einherging. In Anbetracht der beobachteten notwendigen Restsynthese von PIP4K2 in den dreifachen *knockouts* bietet dies eine Erklärung für die im Vergleich zu CC260 erhöhte Toxizität des Inhibitors. Es lässt sich vermuten, dass die Konzentrationen im Wirksamkeitsbereich eine ausreichende antivirale Effektivität besitzen, jedoch zu einer unvollständigen Blockade von PIP4K2 führt, welche das Überleben der Zellen ermöglicht. Zur Einstufung des Selektivitätsindex von 7,3 ist zu erwähnen, dass einige zugelassene Medikamente enge Dosierungsbereiche besitzen, wie bspw. das Antiarrhythmikum Digoxin mit einer *in vivo* therapeutischen Breite von etwa 2 bis 3 (Goldberger & Goldberger, 2012). Ein Wirkstoff mit einem vergleichbaren Wert wie THZ-P1-2 von ungefähr 6 bis 12 ist das Analgetikum Paracetamol mit einer üblichen Einzeldosis von 500 mg bis 1000 mg und Toxizität beginnend bei einer Einnahme von mehr als 6 g für Erwachsene (Horlemann, 2024).

Die Quantifizierung der zellulären PI(4,5)P₂-Level nach THZ-P1-2-Zugabe zeigte analog zur CC260-Behandlung eine Zunahme, deren Ursache sich möglicherweise auf eine indirekt gesteigerte PIP5K-Aktivität zurückführen lässt (Wang et al., 2019; Wills et al., 2023). Zudem war ein starker heterogener Anstieg der PI(4,5)P₂-Intensität in dsRNA-Spots zu beobachten. Eine Begründung hierfür ist die vermehrte Produktion von PI(4,5)P₂ durch PIP5K mit anschließender subzellulärer Umverteilung aus der Zellmembran, als Reaktion auf die starke Abnahme des intrazellulären PI(4,5)P₂ nach fehlender Synthese durch PIP4K2 oder auf den Überschuss des Phosphoinositids an der Zellmembran.

Des Weiteren zeigte eine Behandlung 1 h oder 8 h nach Infektion eine reduzierte Effektivität des Inhibitors mit einer partiellen Absenkung des viralen Titters um 54,13 % bzw. 52,52 %, während bei gleichzeitiger Zugabe mit der Infektion eine Hemmung von 86,14 % beobachtet wurde. Dies lässt vermuten, dass ein Bestandteil der Wirkung des Inhibitors auf der Verhinderung des Eindringens von HCoV-229E in die Zelle basiert. Zellbasierte (HEK293FT Zellen) und *in vitro* Kinom-Analysen für THZ-P1-2 zeigen eine geringe Anzahl an *off-target* Effekten, jedoch wurde in Vero Zellen ab 10 µM eine Beeinflussung von PIKfyve festgestellt, welches eine Erklärung für den inhibitorischen Effekt auf den Eintritt von HCoV-229E in die Zelle bietet (Sivakumaren et al., 2020). Bemerkenswerterweise war die Produktion von dsRNA in den Zellen trotz Inhibitorbehandlung weiterhin möglich, jedoch war die N Proteinmenge reduziert. Dies ermöglicht die Eingrenzung des Wirkmechanismus von THZ-P1-2 auf zwei Ebenen. Zum einen findet eine Hemmung der Endozytose oder vollständigen Freisetzung des viralen Genoms statt, zum anderen wird die Transkription der viralen RNA oder die Translation von viralen Proteinen beeinflusst. Im Laufe der Replikation von Coronaviren muss die virale mRNA aus den DMVs zu den Ribosomen gelangen, welche über die Bildung von Poren in der Vesikelmembran erfolgt (Chen et al., 2024). Diese werden durch die viralen Proteine nsp3 und nsp4 geformt, welche eine positive Ladung aufweisen. Zusammen mit negativ geladenen Phospholipiden wird die Stabilisierung der Poren erreicht (Huang et al., 2024). In Folge der Inhibitorbehandlung wurden starke Schwankungen der Intensität von dsRNA-lokalisierten PI(4,5)P₂ erfasst. Dementsprechend könnte eine Deregulation durch den Inhibitor mit einer Akkumulation oder einer Depletion von PI(4,5)P₂ die Porenbildung stören oder verhindern.

Zusammenfassend handelt es sich bei THZ-P1-2 um einen weiteren Wirkstoff mit einer primären Hemmung von PIP4K2s und sekundären Effekten auf PIKfyve. Hierbei kommt es zu einer Hemmung der Endozytose von Viren und der Beeinflussung der

Transkription oder Translation der viralen RNA. Es ist perspektivisch denkbar, THZ-P1-2 als Ausgangstruktur zur Entwicklung weiterer Derivate zu nutzen, welche eine höhere Affinität für PIP4K2 besitzen oder durch einen dualen Angriffsmechanismus mit Hemmung von PIKfyve die Potenz des Wirkstoffes steigern.

5.4.3. Fehlende Hemmung der HCoV-229E-Replikation durch den PIP4K2-Inhibitor BAY-091

Der Einsatz von BAY-091-Konzentrationen bis 50 μ M in Huh7 oder 25 μ M in A549⁺⁺ Zellen verursachte eine leichte Abnahme der N Proteinmenge, jedoch nicht der viralen Titer, und morphologische Veränderungen sowie das vermehrte Absterben der Zellen waren sichtbar. Der Inhibitor ist spezifisch für die Bindung von PIP4K2A entwickelt worden, während seine Affinität in der Bindungstasche von PIP4K2B und PIP4K2C durch Strukturanalysen als gering prognostiziert wurde, bislang aber nicht experimentell überprüft wurde (Wortmann et al., 2021). Die Messung der viralen Replikation anhand von dsRNA bestätigte, dass die genetische Depletion von mindestens zwei Isoformen einen stärkeren Hemmeffekt bewirkte als ein Einzel-*knockout*, welches die fehlende antivirale Wirkung von BAY-091 aufgrund der erwarteten Isoformenselektivität des Inhibitors vermuten lässt. Um ein besseres Verständnis der in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede von BAY-091 gegenüber den antiviral wirksamen Substanzen CC260 und THZ-P1-2 zu erlangen, ist die Durchführung von systematischen Kinom-Studien, vor allem im Hinblick auf die vermutete Affinität zu PIKfyve und die Bestimmung der subzelluläre Phosphoinositidspezies und -level erforderlich.

5.4.4. Differenzielle Modulation von Autophagie durch PIP4K2-Inhibitoren

Die Inhibitoren wurden neben ihren antiviralen Effekten auch auf die Auswirkungen auf Autophagie untersucht. Im Folgenden werden diese Ergebnisse für jeden Inhibitor getrennt diskutiert.

THZ-P1-2 senkte die Proteinmenge von p62 und steigerte LC3B-II in einer konzentrationsabhängigen Weise. Der Autophagie-Reporter zeigte eine starke Akkumulation von Autophagosomen vor allem ab Konzentrationen von 25 μ M mit einem damit einhergehenden Abfall des mCherry/eGFP-Verhältnisses. Zudem nahm die Autophagosomenfläche leicht zu, jedoch war dieser Anstieg schwächer als für die Infektion mit HCoV-229E. Eine Ursache für die massive Ansammlung an Autophagosomen könnte in der Toxizität des Inhibitors liegen, welche zur stressbedingten Aktivierung von Autophagie führt, während gleichzeitig die Fusion von

Autophagosomen mit Autolysosomen blockiert wird. Letzterer Effekt ist vermutlich auf die reduzierte Bildung von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ in Autophagosomen oder Lysosomen zurückzuführen. Für das Phosphoinositid PI4P ist eine Beteiligung an der Fusion der Vesikel bekannt und lässt die Mitwirkung von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ plausibel erscheinen (Wang et al., 2015). Des Weiteren führt ein Verlust von Pip4k2a und Pip4k2b in Mausembryonalen Fibroblasten zu einer Aktivierung des Autophagie-Masterregulators TFEB (*transcription factor EB*). Dieser Transkriptionsfaktor kann die Expression von lysosomalen Genen und damit die Biogenese von Lysosomen, Autophagosomen und Autolysosomen beeinflussen, welches die gesteigerte Bildung der autophagischen Vesikel nach Inhibitorbehandlung begründen kann (Lundquist et al., 2018; Sivakumaren et al., 2020).

HCoV-229E ist auf frühe Schritte der Autophagie zur Bildung der DMVs angewiesen. Die Formation von Autophagosom-ähnlichen Strukturen war durch THZ-P1-2 nicht beeinträchtigt. Zudem zeigte sich bei einer antiviral wirksamen Konzentration des Inhibitors von 10 μM weiterhin die Bildung von Autolysosomen und nur eine geringe Fusionshemmung. Auf der Basis dieser Befunde liegt der antivirale Wirkmechanismus von THZ-P1-2 höchstwahrscheinlich außerhalb einer Beeinflussung der Autophagie.

CC260 steigerte die Proteinmenge von LC3B-II sowie dem selektiven Autophagie Marker p62. Die mikroskopische Betrachtung des Autophagie-Reporters zeigte eine gesteigerte Gesamtmenge an autophagischen Vesikeln mit primärer Zunahme von Autolysosomen, also einem erhaltenen Autophagieflux. Ein wichtiger Aspekt in diesem Kontext ist eine mögliche CC260-bedingte unspezifische Hemmung von $\text{PI3K-}\gamma/\delta$, welches für die Produktion von $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ zuständig ist. Das Phosphoinositid rekrutiert AKT, welches im Anschluss mTORC1 aktiviert und eine Hemmung von Autophagie bedingt (Soto-Avellaneda & Morrison, 2020). Hierbei könnte der Einsatz von hohen Konzentrationen des Inhibitors durch eine Hemmung von $\text{PI3K-}\gamma/\delta$ diese Signalkaskade blockieren und so die Induktion des Autophagieprozess mit Bildung von autophagischen Vesikeln fördern.

Ferner katalysiert PIKfyve die Umwandlung von PI3P in $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$. PI3P besitzt eine essentielle Funktion in der Formation von Phagophoren und deren Expansion. Zusätzlich unterstützt es den Zusammenbau von SNARE-Komplexen, welche die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen fördern (Ebner et al., 2019). Die konträr agierende Phosphatase INPP5E, welche die Synthese von $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ in PI3P katalysiert, wurde als obligates Enzym auf Lysosomen für die Bildung von Autolysosomen identifiziert (Hasegawa et al., 2016). Eine unspezifische Hemmung von PIKfyve durch CC260 könnte die verfügbare Menge an PI3P steigern und die Fusion der Vesikel

fördern. Hierdurch wäre ein Überwiegen der Effekte auf PI3K und PIKfyve möglich mit der vermehrten Produktion von Autolysosomen. Dies bietet eine Erklärung für den gegenteiligen Effekt und die höhere Toxizität des Inhibitors THZ-P1-2, welcher durch eine kovalente Hemmung von PIP4K2 bei fehlender Hemmung von PI3K, den autophagischen Flux blockiert und so die Akkumulation von Autophagosomen verursacht, welches die Homöostase der Zelle stört.

Interessanterweise zeigte die kombinierte Behandlung von 50 μ M CC260 mit dem Inhibitor Thapsigargin eine Steigerung der Proteinmengen von p62 und LC3B-II, welche ausgeprägt über denen der jeweils einzelnen Behandlungen lagen. Dies könnte auf einen voneinander unabhängigen Angriffspunkt der Wirkstoffe im Autophagieprozess hindeuten, welcher eine additive Hemmung des autophagischen Fluxes bedingte. Unter Einbezug der Ergebnisse ist zu vermuten, dass CC260 durch seine unspezifischen Effekte auf PIKfyve und PI3K- γ/δ die Formation von Autophagosomen induziere, während Thapsigargin als indirekter Fusionshemmer später im Prozess agiere. Hierdurch kumulierte p62 und aktiviertes LC3B-II, da deren Abbau verhindert wäre.

BAY-091 verursachte keine Veränderungen der Proteinmenge für LC3B-I/II und p62. Die mikroskopische Analyse visualisierte eine leichte Steigerung des mCherry/eGFP-Verhältnisses, welche eine Aktivierung von Autophagie indiziert. Die Induktion fiel jedoch schwächer aus als bei den anderen beiden Inhibitoren und zeigte keine Konzentrationsabhängigkeit. Dies ist auf mögliche Spezifität für PIP4K2A zurückzuführen, die eine Kompensation der Kinase durch PIP4K2B oder PIP4K2C zulässt.

Zusammenfassend zeigen die Inhibitoren CC260 und THZ-P1-2 sehr interessante differenzielle Effekte auf den basalen Autophagieprozess und eine deutlich unterschiedliche Zytotoxizität, bei vergleichbarer antiviraler Wirkung. Es kann daher vermutet werden, dass die zytotoxischen Effekte von THZ-P1-2 durch die Blockade des Autophagiefluxes bedingt sind, während die antiviralen Effekte beider Substanzen eher im Zusammenhang mit einer subzellulären lokalen Regulation der PI5P-Phosphorylierung zu PI(4,5)P₂ stehen, die für die Ausbildung von DMVs und die Synthese von dsRNA erforderlich ist.

5.5. Schlussfolgerung, Limitationen und Aussichten

Zu der Rolle von Autophagieprozessen bei der Coronavirus-Replikation existieren bislang unvollständige und teils widersprüchliche Evidenzen. In dieser Arbeit konnte durch die Etablierung eines fluoreszierenden Biosensorsystems gefolgt von einer mikroskopischen und bioinformatischen Analyse subzellulärer autophagischer Vesikel eine moderate Aktivierung von Autophagievorgängen innerhalb der ersten 24 Stunden einer HCoV-229E-Infektion gezeigt werden und in der Gesamtheit kompletter Zellkulturen mittels unabhängiger Western-Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 82 A). Die separate Analyse von frühen gegenüber späten Schritten des Autophagieprozesses zeigte, dass eine HCoV-229E-Infektion die Formation von großflächigen Autophagosom-ähnlichen Strukturen induziert, die aufgrund ihres dsRNA-Gehalts als replikative Organellen klassifiziert werden können.

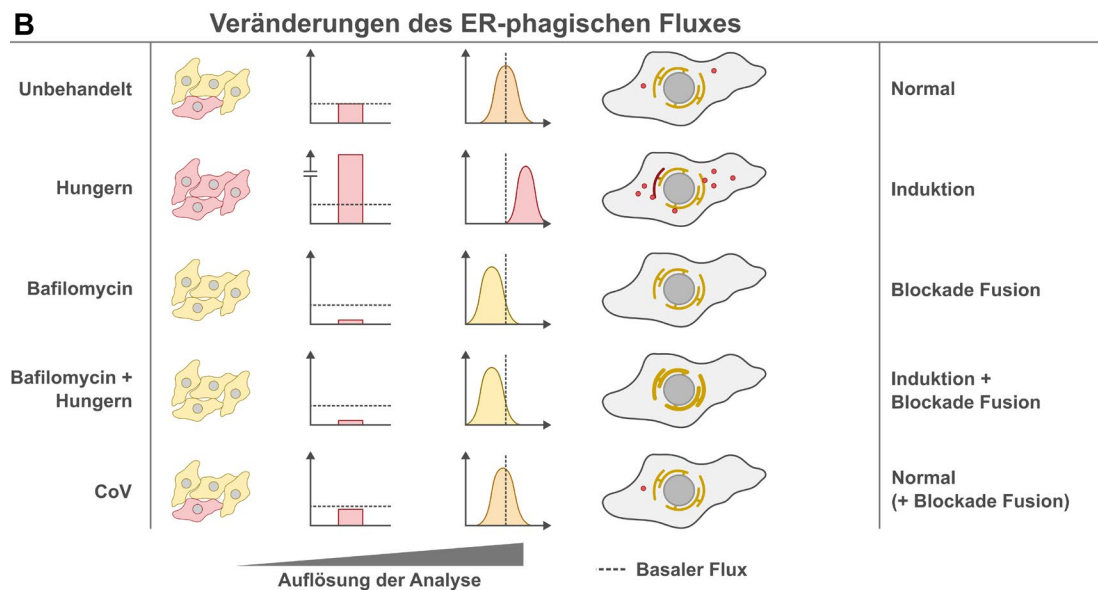
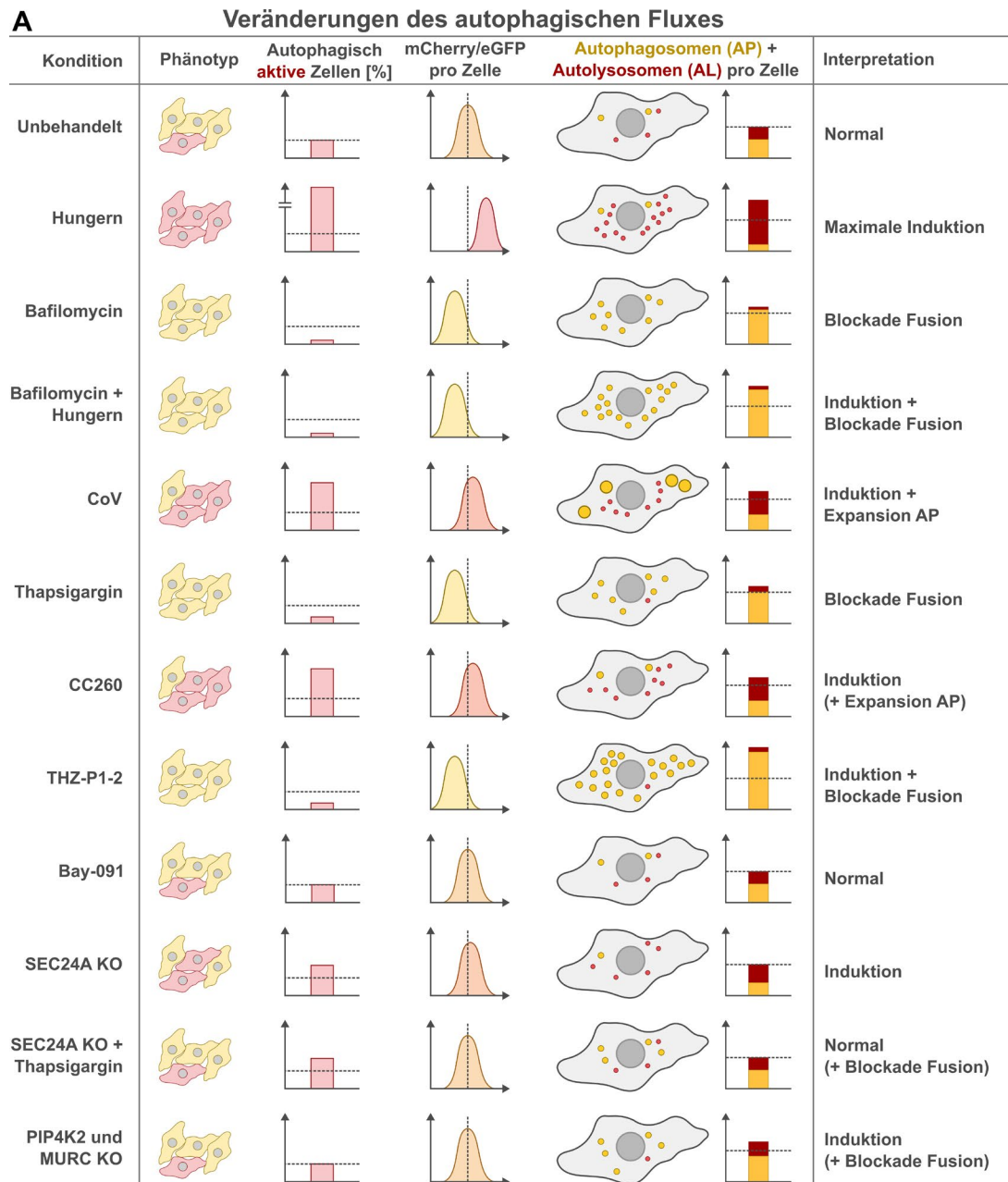
Eine analog durchgeführte systematische Analyse der ER-Phagie zeigte dagegen eine schwache, variable und zelllinienabhängige Hemmung während einer HCoV-229E-Infektion (Abb. 82 B). Aufgrund technischer Limitationen war die subzelluläre Erfassung von lediglich Autolysosomen möglich, weshalb eine weiterführende Untersuchung mittels höher auflösender Methoden wie der Transmissionselektronenmikroskopie oder die Verwendung zusätzlicher Reportersysteme, beispielsweise auf Basis des Cargo-Rezeptors FAM134B, daher erforderlich ist, um die Rolle der ER-Phagie für die Virusreplikation weiter aufzuklären.

Mit Hilfe des Autophagie-Reporters und weiterer pharmakogenetischer Ansätze wurden nachfolgend eine Reihe an Wirtszellfaktoren untersucht, die mittels proteomischer *screening* Methoden als Kandidaten antiviraler Mechanismen im Vorfeld dieser Arbeit in der AG Kracht identifiziert wurden. So konnte die Rolle des Proteins SEC24A im Wirkmechanismus der hochpotenten antiviralen, aber auch zytotoxischen Substanz Thapsigargin evaluiert werden, wobei eine Depletion von SEC24A den Thapsigargin-vermittelten Autophagiearrest ohne Beeinträchtigung der antiviralen Wirkung reduzierte (Abb. 82 A). Aufgrund dieser Ergebnisse wäre eine neue Strategie zur Senkung der Toxizität von Thapsigargin durch den kombinierten Therapieansatz eines SEC24A-Inhibitors mit dem Inhibitor, in Erwägung zu ziehen.

Das Caveolae-assoziierte Protein MURC wurde in mehreren Proteomanalysen als HCoV-229E-induziertes Protein entdeckt. Die Induktion von MURC auf mRNA-Ebene bestätigt diese Regulation und deutet auf einen (post)transkriptionellen Mechanismus hin (Abb. 82 C). MURC-defiziente Zellen zeigten eine zelllinienabhängige geringfügige

Reduktion der Virusreplikation. Die Bewertung der Effektivität der Depletion des Proteins konnte aufgrund eines fehlenden spezifischen Antikörpers nicht erfolgen. Zukünftig könnten zu diesem Zweck Massenspektrometrie-basierte Methoden oder neu generierte Antikörper angewandt werden. Zudem könnten kompensatorische Effekte der drei weiteren Isoformen des Proteins die Effekte einer MURC-Depletion maskieren, weshalb umfangreiche Untersuchungen aller beteiligten Caveolae-Proteine mittels einer genetischen oder, falls verfügbar, pharmakologischen Perturbation erforderlich sind.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der drei Isoformen der Lipidkinase PIP4K2, von denen sowohl in den erwähnten Proteomuntersuchungen als auch durch zusätzlich Experimente in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Ihre Proteinbiosynthese trotz CoV-bedingter translationaler Hemmung aufrechterhalten wird. Eine Subpopulation des durch PIP4K2 modifizierten Phospholipids PI(4,5)P₂ reichte sich in den dsRNA-positiven replikativen Organellen des Virus an (Abb. 82 C). Der Verlust von mindestens zwei Isoformen der Kinase führte zu einer deutlichen Reduktion der Bildung dieser dsRNA-Spots. In diesem Zusammenhang wurden die antiviralen und toxischen Wirkungen drei isoformspezifischer pharmakologischer Inhibitoren systematisch evaluiert. THZ-P1-2 und CC260 bewirkten eine effektive Replikationshemmung von mehreren Coronavirusspezies und differenzielle Effekte auf den autophagischen Flux (Abb. 82 A, C). Diese Ergebnisse lassen in dem Zusammenhang mit den mildereren Phänotypen der genetischen Modelle auf eine spezifische und möglicherweise auch zelltypspezifisch ausgeprägte Rolle der drei PIP4K2-Isoformen schließen. Zukünftig wäre es daher wichtig, die ausgeprägten antiviralen Effekte der PIP4K2-Wirkstoffe in komplexeren Modellen, z.B. Organoiden oder in präklinischen Modellen zu überprüfen. Zusätzlich sollte zur Aufklärung des Wirkmechanismus der Einfluss von CC260 auf weitere Phosphoinositidkinasen und den (sub)zellulären Phosphoinositidstoffwechsel sorgfältig charakterisiert werden.



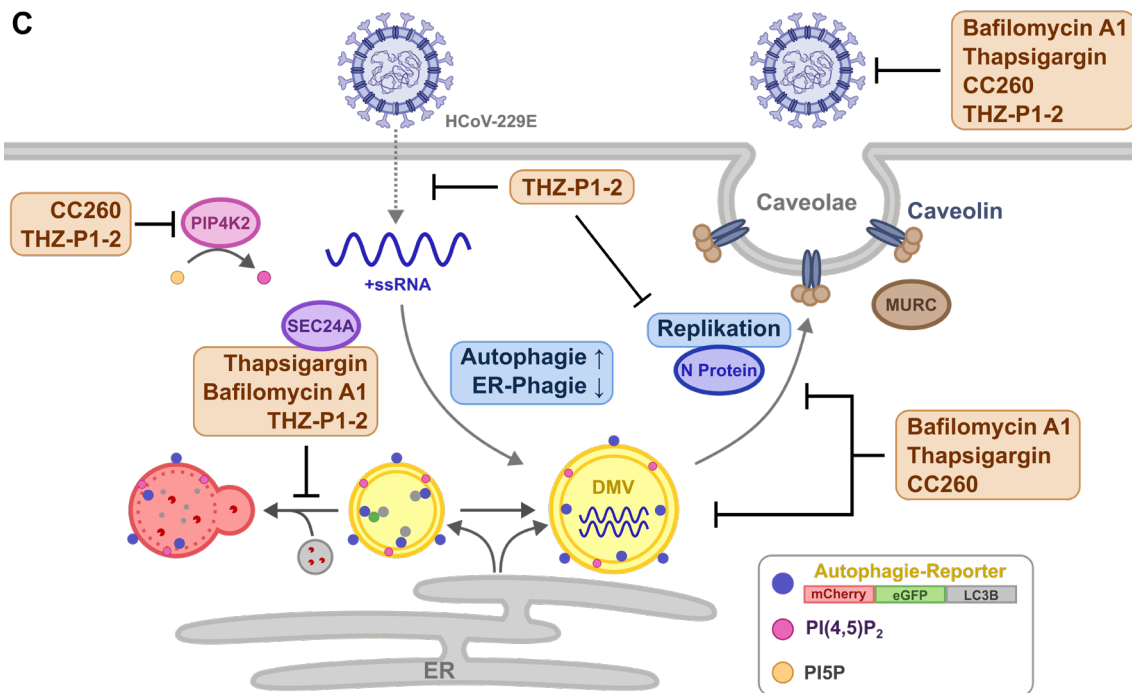


Abb. 82 Zusammenfassung Ergebnisse dieser Arbeit

(A) Schematische Darstellung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Regulation der Autophagie durch HCoV-229E, verglichen mit Hungerbedingungen und der Modulation durch unterschiedliche pharmakogenetische Ansätze. Die Dynamik des Prozesses wurde dabei auf zellulärer Ebene anhand der Rot/Gelb-Verschiebung des Tandem-Reporters und auf subzellulärer Ebene anhand der Anzahl von Autolysosomen (AL) und Autophagosomen (AP) quantifiziert. Unter Hungerbedingungen ist Autophagie auf allen Ebenen maximal induziert, während Bafilomycin A1 bzw. Thapsigargin einen späten Block des autophagischen Fluxes durch Hemmung der AL-Bildung bewirken. Die CoV-Infektion induziert Autophagie einhergehend mit einer Rotverschiebung, Zunahme der AL und Expansion von AP-ähnlichen Strukturen. CC260 führt zur Steigerung des mCherry/eGFP-Verhältnisses und einer vermehrten Bildung von AL, vereinbar mit einem stimulierten Autophagieflux. THZ-P1-2 induziert Autophagie, während der Abbau von AP gehemmt wird. BAY-091 zeigt einen basalen autophagischen Flux. Ein SEC24A knockout (KO) erhöht die Aktivität von Autophagie und Thapsigargin kann diesen Effekt nur auf basale Level senken. Die Depletion von PIP4K2 oder MURC führt zur leichten Hemmung des Abbaus von AP/AL mit Zunahme der Gesamtmenge an autophagischen Vesikel entsprechend einer frühen Induktion des Prozesses.

(B) Analoge schematische Darstellung der Ergebnisse für die Modulation von ER-Phagie ohne Erfassung von AP. Hungerbedingungen erhöhen die AL-Formation, welche nach einer Bafilomycin A1-Behandlung inhibiert wird. CoV reduziert leicht das mCherry/eGFP-Verhältnis, während die AL-Produktion nahezu unbeeinflusst ist, welches einen normalen oder leicht reduzierten ER-phagischen Flux demonstriert.

(C) HCoV-229E induziert den Autophagieprozess während der Formation von replikativen Organellen, insbesondere den DMVs. Die Einlagerung von LC3B in diesen Strukturen zeigt, dass sie ausgehend von AP gebildet werden. Zeitgleich werden ER-Phagie-Prozesse in der Zelle supprimiert. Bafilomycin A1 und Thapsigargin hemmen den späten Autophagieflux durch Blockade der Fusion von AP mit Lysosomen. Dieses geht einher mit einer Hemmung des CoV-Replikationszyklus gezeigt durch eine Abnahme von DMVs, viralen Proteinen und des viralen Titer. Die Wirkung der Fusionshemmung von Thapsigargin ist abhängig von SEC24A. PIP4K2-Lipidkinasen tragen zur intrazellulären Bildung des Phosphoinositids PI(4,5)P₂ bei, welches in DMVs akkumuliert. Die Inhibition von PIP4K2 durch THZ-P1-2 resultiert in einer Abnahme der Bildung von AL, Hemmung des Eintritts von CoV in die Zelle sowie der Senkung der Bildung viraler Proteine und des viralen Titer. CC260, ein weiterer Inhibitor von PIP4K2, hemmt die Formation von DMVs, die Synthese viraler Proteine und senkt den viralen Titer. Die CoV-vermittelte Induktion und die Perturbation des Caveolae Faktors MURC impliziert eine Rolle in späten Schritten der Virusreplikation.

I. Zusammenfassung

Humane Coronaviren (CoV) sind weit verbreitete, umhüllte RNA-Viren, welche vor allem Erkrankungen der Atemwege verursachen, die von leichten Erkältungssymptomen bis hin zu lebensbedrohlichen Komplikationen reichen können. Die weltweite Ausbreitung von SARS-CoV, MERS-CoV und SARS-CoV-2 verdeutlicht das pandemische Potential von CoV und den dringenden Bedarf an neuen innovativen antiviralen Strategien. In dieser Arbeit wurden, unter der Verwendung des HCoV-229E als Modell, Endomembran-assoziierte Prozesse und dabei beteiligte Faktoren im Kontext der Virusreplikation charakterisiert. Schwerpunktmäßig wurde der Vorgang der Autophagie untersucht, welcher die zelluläre Homöostase aufrechterhält und für die Replikation einiger Viren als essentiell gilt, während die Evidenz von Autophagie bei der Replikation von CoV zu Beginn der Arbeit unvollständig und uneinheitlich war. Dieses galt auch für die ER-Phagie, eine Unterform der Autophagie, welche zur Regulation und Adaptation des endoplasmatischen Retikulums in Stresskonditionen beiträgt.

Die experimentelle Analyse des Autophagieprozesses erfolgte anhand eines fluoreszierenden Reportersystems und über mikroskopische, durchflusszytometrische und proteinbiochemische Methoden, wodurch eine umfassende Analyse der Regulation des autophagischen Fluxes unter basalen und Stress- bzw. Infektionsbedingungen ermöglicht wurde. Zusätzlich wurde eine quantitative KI-basierte Einzelzell-Auswertung etabliert, welche unabhängig, automatisiert und hochpräzise subzelluläre Strukturen in einer Vielzahl an Zellen identifizierte und auch für die Erfassung der virale dsRNA-enthaltenden replikativen Organellen sowie der (sub)zellulären Verteilung des Phosphoinositids PI(4,5)P₂ genutzt wurde. In einem weiteren Ansatz wurden defiziente Zelllinien für Faktoren, welche aufgrund vorheriger Proteomuntersuchungen als an virusregulierten Endomembranvorgängen beteiligt identifiziert wurden, mittels des CRISPR-Cas9-Systems erzeugt.

In zwei unterschiedlichen Zellmodellen wurde eine moderate zeitverzögerte Aktivierung des autophagischen Fluxes durch HCoV-229E und die Lokalisation des essentiellen Autophagiefaktors LC3B in dsRNA-positiven replikativen Organellen, jedoch keine Korrelation der autophagischen Aktivität mit der Bildung von dsRNA, beobachtet, während ER-Phagie zelltypabhängig gering negativ reguliert wurde. Detaillierte Quantifizierungen zeigten eine Größenzunahme von LC3B-positiven Autophagosom-ähnlichen Strukturen in infizierten Zellen und deuten auf eine Abhängigkeit der Virusreplikation von vornehmlich frühen Autophagieschritten hin.

SEC24A vermittelt die Rekrutierung von Proteinen in COPII-Vesikel, die frühe Schritte der Autophagie unterstützen, und beeinflusst gleichzeitig die Toxizität des antiviralen Wirkstoffs Thapsigargin. In experimentelle Analysen von SEC24A-defizienten Zelllinien unter Thapsigargin-Behandlung zeigte sich eine Reduktion der Autophagie-hemmenden, aber nicht der antiviralen Eigenschaften des Inhibitors. Diese Befunde lieferten neue Informationen zu dem nicht vollständig beschriebenen Wirkmechanismus von Thapsigargin.

Zudem wurde das Protein MURC/CAVIN-4 untersucht, welches an der Bildung von speziellen, als Caveolae bezeichneten, *lipid rafts* beteiligt ist. Aufgrund der transkriptionellen Induktion von MURC/CAVIN-4 während der Infektion mit HCoV-229E und unveränderter Bildung von dsRNA, bei gleichzeitiger leichter Senkung der viralen Titer nach einer Depletion des Proteins, ist eine Beteiligung von MURC/CAVIN-4 an späten Schritten der Infektion wie der Exozytose wahrscheinlich.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der Lipidkinasen PIP4K2 untersucht, welche die nicht-kanonische Modifikation des Phosphoinositids PI5P zu PI(4,5)P₂ katalysieren und deren Proteinbiosynthese in HCoV-229E-infizierten Zellen, entgegen des globalen virusinduzierten translationalen Arrests, aufrechterhalten wird. Es konnte eine Anreicherung von PI(4,5)P₂ in den replikativen Organellen identifiziert werden und die Depletion von mindestens zwei der drei Isoformen der Kinase (PIP4K2A/B/C) resultierte in einer Abnahme der viralen dsRNA-Bildung.

Die pharmakologische Blockade von PIP4K2 durch zwei ATP-kompetitive Inhibitoren, THZ-P1-2 und CC260, zeigte starke dosisabhängige antivirale Effekte. Zusätzlich wurde eine differenzielle Modulation des autophagischen Fluxes durch beide Substanzen festgestellt, so zeigte CC260 eine leichte Induktion des Prozesses, während THZ-P1-2 zu einem ausgeprägten Arrest von späten Autophagieschritten führte einhergehend mit einer erhöhten Zytotoxizität.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein vertieftes Verständnis der Regulation von Autophagie-abhängigen Endomembranvorgängen bei der CoV-Replikation erreicht werden. Die funktionellen Daten und pharmakogenetische Perturbationsexperimente charakterisieren subzellulär angereichertes PI(4,5)P₂ und die dabei beteiligten Lipidkinasen als neue, interessante Kandidaten für antivirale Interventionsstrategien auf der Ebene der infizierten Wirtszelle.

II. Abstract

Human coronaviruses (CoV) are widespread, enveloped RNA-viruses that cause respiratory infections ranging from a mild common cold to life-threatening complications. The world-wide transmission of SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 highlighted the pandemic potential of CoV and the demand for innovative antiviral strategies. In this study HCoV-229E was used as a model to investigate endomembrane processes and associated factors in the context of viral replication. In particular, the process of autophagy was studied, which is responsible for maintaining cellular homeostasis and essential in the replication of several viruses while evidence regarding autophagy in the CoV viral life cycle remained incomplete and inconclusive at the beginning of this study. This also applied to ER-phagy, a subcategory of autophagy, which is responsible for regulating and adapting the endoplasmic reticulum under stress conditions.

The experimental analysis of autophagy was conducted by means of a fluorescent reporter system and microscopy, flow cytometry and protein biochemistry methods, providing a comprehensive understanding of the autophagic flux under basal, stress and infection conditions. Additionally, an unbiased quantitative AI-based single cell analysis was established to automatically identify subcellular structures with high precision in several cells and also measure replicative organelles containing dsRNA as well as the (sub)cellular distribution of the phosphoinositide PI(4,5)P₂. As a further approach, cell lines deficient for factors identified by previous proteome-analyses as involved in viral-regulated endomembrane processes were generated using the CRISPR-Cas9-system

In two different cell lines a moderate delayed induction of the autophagic flux by HCoV-229E and the localisation of LC3B into the dsRNA-positive replicative organelles was observed, however there was no correlation of the autophagic activity and the formation of dsRNA, while ER-phagy was slightly repressed depending on the cell line. Detailed quantifications revealed an enlargement of LC3B-positive autophagosome-like structures in infected cells and indicate a strong link between viral replication and predominantly early autophagic stages.

SEC24A facilitates the recruitment of proteins to COPII vesicles, which support early autophagic events, and simultaneously promotes the toxicity of the antiviral substance thapsigargin. The experimental analysis of SEC24A deficient cell lines treated with thapsigargin revealed a reduction of the inhibitor-mediated impairment on autophagy but not the antiviral activity of the inhibitor. These findings provide further information on the not fully elucidated mechanism of action of thapsigargin.

Furthermore, the protein MURC/CAVIN-4 was studied, which is involved in the assembly of caveolae, a specialised lipid raft. As a result of the transcriptional induction of MURC/CAVIN-4 in the replication cycle of HCoV-229E and the stable dsRNA formation cooccurring with a reduction of viral titer after protein depletion a role in late stages of viral infection, e.g. exocytosis, is probable.

The second part of this study investigated the role of the lipid kinases PIP4K2, which catalyse the non-canonical synthesis of the phosphoinositide PI(4,5)P₂ from PI5P and of which protein biosynthesis is upregulated after HCoV-229E infection despite the global virus-induced translational shutdown. An accumulation of PI(4,5)P₂ was identified to localize in the replicative organelles and the depletion of at least two out of the three isoforms of the kinase (PIP4K2A/B/C) resulted in a reduction of dsRNA formation.

The pharmacological Inhibition of PIP4K2 via two tested ATP-competitive compounds, THZ-P1-2 and CC260, revealed strong dose-responsive antiviral activities. Additionally, the autophagic flux was regulated differently by both inhibitors, while CC260 showed a weak induction of the process, THZ-P1-2 lead to a substantial arrest of late autophagic stages accompanied by an increased cytotoxicity.

In conclusion, this study provides a deeper understanding of the regulation of autophagy-dependent endomembrane processes during CoV replication. The functional data and pharmaco-genetic perturbation experiments characterize subcellular enriched PI(4,5)P₂ and the associated lipid kinases as new, interesting candidates for antiviral intervention strategies at the level of the infected host cell.

III. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent	dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
(e)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>	Dox	Doxycyclin
°C	Grad Celsius	DPBS	<i>(Dulbecco's) phosphate buffered saline</i>
μ	mikro	ds	doppelsträngig
A	Ampere	E.Coli	Escherichia coli
Abb.	Abbildung	EC	effektive Konzentration
AKT	Proteinkinase B, PKB	ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
AL	Autolysosomen	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AMP	Adenosinmonophosphat	ER	Endoplasmatisches Retikulum
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>	ERAD	<i>endoplasmic reticulum associated degradation</i>
APN	Aminopeptidase N	ERGIC	<i>ER-to-golgi intermediate compartment</i>
AP	Autophagosomen	EtOH	Ethanol
APS	Ammoniumpersulfat	FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>	FAM134B	<i>family with sequence similarity 134 member b</i>
as	<i>antisense</i>	FBS	<i>filtrated bovine serum</i>
ATP	Adenosintriphosphat	FSC-a/h	<i>forward scatter area/height</i>
BFP	<i>monomeric tag blue fluorescent protein</i>	fwd	<i>forward</i>
bp/kb	Basenpaar/Kilobasenpaare	g	gramm
BSA	Bovines Serumalbumin	ggf.	gegebenenfalls
bspw.	beispielsweise	h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
bzw.	beziehungsweise	HBSS	<i>hanks' balanced salt solution</i>
Ca ²⁺	Calcium-Ion	HCV	Hepatitis C-Virus
Cas9	<i>CRISPR-associated</i>	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
cDNA	<i>complementary DNA</i>	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
CLIMP63	<i>cytoskeleton-linking membrane protein 63</i>	IC	Inhibitorische Konzentration
CoV	Coronavirus	IF	Indirekte Immunfluoreszenz
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	IP3	Inositoltrisphosphat
Ct	<i>threshold cycle</i>	kDa	kilo Dalton
ctr.	<i>control</i>	KO	<i>knockout</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	l	Liter
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	LB	Luria-Bertani
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	(MAP1)	<i>microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	LC3(A)	<i>short sequence motif LC3-interacting region</i>
DMV	<i>double membrane vesicles</i>	LIR	

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
log	Logarithmus	PVDF	Polyvinylidenfluorid
m	mili	px	Pixel
M	Molar	qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
MERS	<i>middle east respiratory syndrome</i>	RAMP4	<i>ribosome associated membrane protein 4</i>
MHV	Murines Hepatitisvirus	rb	<i>rabbit</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>	REEP5	<i>receptor expression-enhancing protein 5</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>	RFP	<i>red fluorescent protein</i>
ms	<i>mouse</i>	RNA	Ribonukleinsäure
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>	rpm	<i>revolutions per minute</i>
MURC/ CAVIN-4	<i>muscle-related coiled-coil protein</i>	RT	Raumtemperatur
n	nano	RTC	<i>replication-transcription complex</i>
NEAA	<i>non essential amino acids</i>	S1/2	biologische Sicherheitsstufe 1/2
NP-40	Nonidet P-40	SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
nsp	Nichtstrukturprotein	SD	Standardabweichung
nt	Nukleotide	SDS	Natriumdodecylsulfat
OPP	O-Propargyl-Puromycin	se	<i>sense</i>
ORF	<i>open reading frame</i>	SERCA	<i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
p	p-Wert	sgRNA	<i>single guide RNA</i>
p62/ SQSTM1	Sequestosome-1	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-elektrophorese	SSC-a/h	<i>sideward scatter area/height</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TAE	Tris-Acetat-EDTA
PE	Phosphatidylethanolamin	TBS-(T)	<i>tris-buffered saline</i> (mit Tween 20)
PERK	<i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>	TCID50	<i>tissue culture infective dose 50%</i>
PFA	Paraformaldehyd	TEMED	Tetramethylethylendiamin
pH	potentia hydrogenii	TMPRSS2	Transmembran Serinprotease 2
p.i.	<i>post infectionem</i>	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomet han
PI(x)P	Phosphatidylinositol-x-phosphat	U	Units
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	ULK1	<i>unc-51-like autophagy activating kinase 1</i>
PIKfyve	<i>phosphoinositide kinase, FYVE-type zinc finger containing</i>	UPR	<i>unfolded protein response</i>
PIP4K2	<i>phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type 2</i>	V	Volt
PIP5K	<i>phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1</i>	V-ATPase	V-Typ ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
Puro-PLA	<i>proximity ligation assay</i> mit Puromycin-Markierung	x g	Erdbeschleunigung
		z.B.	zum Beispiel

IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Taxonomie und Aufbau von HCoV-229E.....	4
Abb. 2 Der Replikationszyklus von Coronaviren	6
Abb. 3 Aktivierung von Autophagie mit Bildung von Autophagosomen und Autolysosomen	12
Abb. 4 Selektive Autophagie durch den Cargo-Rezeptor p62	13
Abb. 5 Bestimmung des autophagischen Fluxes mittels Western-Blot-Analyse unter Hinzunahme eines Lysosomen- bzw. Fusionsinhibitors	14
Abb. 6 Bestimmung des autophagischen Fluxes mittels Tandem-Reporter	16
Abb. 7 Strukturformel von Phosphatidylinositol.....	19
Abb. 8 Syntheschemata von Phosphoinositiden (PI) und Klassifizierung der PI-Kinasen	21
Abb. 9 Beispielaufnahme eines Kristallviolett gefärbten Plaque-Assays	39
Abb. 10 Schematische Darstellung eines Kristallviolett gefärbten TCID ₅₀ -Assays	40
Abb. 11 Darstellung der Zellsortierungsstrategie am BD FACSAria Cell Sorter.....	44
Abb. 12 Quantifizierungsstrategie der Tandem-Reporterzellen am BD LSRFortessa.....	45
Abb. 13 Schematische Darstellung der Kolokalisation-Analyse.....	63
Abb. 14 Übersicht des Ablaufs der Vermessung von dsRNA-Spots	66
Abb. 15 Automatische Auszählung von Autophagosomen und Autolysosomen	68
Abb. 16 Expressionsnachweis des Autophagie- und ER-Phagie-Reporters nach transienter Transfektion	70
Abb. 17 Konzentrationsabhängige Inhibition der Autophagie durch Bafilomycin A1	71
Abb. 18 Nachweis der Proteinexpression der Autophagie-/ER-Phagie-Reportersysteme	72
Abb. 19 Optimierung der Dosis- und Behandlungsdauer für die Doxycyclin-abhängige Aktivierung des ER-Phagie-Reporters	74
Abb. 20 Nachweis der stabilen Expression des ER-Phagie-Reporters in HeLa Zellen	75
Abb. 21 Generierung von stabilen Zelllinien mit homogener Expression des ER-Phagie- Reporters mittels Zellsortierung	76
Abb. 22 Funktionelle Charakterisierung des ER-Phagie-Reportersystems auf subzellulärer Ebene nach der Sortierung stabiler Zelllinien.....	77
Abb. 23 Quantifizierung von Reporterzelllinien am Durchflussszytometer	78
Abb. 24 Implementierung der durchflussszytometrischen Analyse des ER-Phagie-Reporters....	79
Abb. 25 Evaluierung des ER-Phagie-Reporters pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4 in HeLa und Huh7 Zellen	81
Abb. 26 Etablierung eines Degradationsassays für den ER-Phagie-Reporter TetOn-mCherry-eGFP-RAMP4	83
Abb. 27 Nachweis der stabilen Expression des Autophagie-Reporters.....	85
Abb. 28 Etablierung der Durchflussszytometrie-basierten Messung des Autophagie-Reporters	86
Abb. 29 Etablierung der mikroskopischen Erfassung von Autophagieprozessen und subzellulären Foci.....	88
Abb. 30 Schematische Darstellung der Vektorrekonfiguration des ER-Phagie-Reporters	89
Abb. 31 Austausch des Vektorgerüsts des ER-Phagie-Reporters pCW57-CMV-ssRFP-GFP- KDEL	90
Abb. 32 Mikroskopischer Funktionsnachweis des rekonstituierten ER-Phagie-Reporters	91
Abb. 33 Erfassung globaler Veränderungen der ER-Phagie in HCoV-229E-infizierten A549 und HeLa Zellen	93
Abb. 34 Quantifizierung der ER-Phagie anhand der Degradation eines ssRFP-GFP-KDEL Reporterproteins.....	94
Abb. 35 Infektionszeitabhängige Veränderungen von Autophagie-Markerproteinen.....	95
Abb. 36 Senkung von ER-Phagie durch HCoV-229E-Infektion ermittelt durch eine durchflussszytometrische Auswertung	96
Abb. 37 Zeitabhängige Beeinflussung der ER-Phagie durch HCoV-229E	97
Abb. 38 Subzelluläre Untersuchung der ER-Phagie nach HCoV-229E-Infektion	99
Abb. 39 HCoV-229E-vermittelte Induktion der Autophagie erfasst durch eine Durchflussszytometrie-basierte Analyse	101
Abb. 40 Zeitabhängige Induktion der Autophagie durch HCoV-229E.....	102
Abb. 41 Einzelzellbasierte und subzelluläre Quantifizierung der hunger- oder virusinduzierten Modulation des Autophagieprozesses	104
Abb. 42 HCoV-229E-induzierte Veränderungen subzellulärer autophagischer Vesikel im Infektionszeitverlauf	106

Abb. 43 Rekrutierung des Autophagie-Reporters in die DMVs von HCoV-229E.....	108
Abb. 44 Kombinierte Erfassung der Autophagie und dsRNA-Bildung infolge der Infektion mit HCoV-229E	109
Abb. 45 Einzelzellbasierte Korrelation von dsRNA-Synthese und Autophagie-Induktion in HCoV-229E-infizierten Zellen	110
Abb. 46 Nachweis der Depletion von SEC24A sowie der Expression des Autophagie-Reporters in stabil transduzierten Zelllinien	112
Abb. 47 Beeinflussung der Proteinmengen von Autophagie-Markern nach dem knockout von SEC24A unter Thapsigargin-Behandlung und HCoV-229E-Infektion	114
Abb. 48 Gesteigerter autophagischer Flux in SEC24A knockout-Zellen	115
Abb. 49 SEC24A-abhängige Modulation der Thapsigargin-regulierten Dynamik von autophagischen Vesikeln.....	117
Abb. 50 Markierung naszierender Proteine mittels OPP.....	118
Abb. 51 Top 21 HCoV-229E-induzierte naszierende Proteine.....	119
Abb. 52 Nachweis der erhaltenen Translation von PIP4K2B und LC3B-II in HCoV-229E-infizierten Zellen	121
Abb. 53 Erfassung der Synthese von PIP4K2B und MURC nach HCoV-229E-Infektion mittels Puro-PLA	124
Abb. 54 Generierung von knockout-Zelllinien mit dem Leervektor LentiCRISPR-v2.....	125
Abb. 55 Erfolgreiche stabile Depletion von PIP4K2-Isoformen.....	126
Abb. 56 Quantitative Analyse der PIP4K2-Depletion	127
Abb. 57 Differenzielle Effekte der PIP4K2-Depletion auf die Replikation von HCoV-229E	128
Abb. 58 Isoformenspezifische Inhibition der HCoV-229E dsRNA-Synthese in PIP4K2-defizienten A549 ⁺⁺ Zellen	129
Abb. 59 Modulation der Zellfläche durch Verlust von PIP4K2-Isoformen und Infektion mit HCoV-229E	130
Abb. 60 Zusammenhänge von dsRNA-Spots und der Zellfläche in infizierten Zellen	131
Abb. 61 Einfluss der Depletion der PIP4K2-Isoformen auf die dsRNA-bedeckte Zellfläche in Abhängigkeit der dsRNA-Intensität	132
Abb. 62 Zelllinienspezifische Hemmung der viralen Replikation nach einer MURC-Depletion	133
Abb. 63 Beeinflussung der Formation von dsRNA durch eine MURC-Depletion	134
Abb. 64 Nachweis der Überexpression von PIP4K2-Varianten	135
Abb. 65 Einfluss der Überexpression katalytisch aktiver/inaktiver PIP4K2-Isoformen auf die Replikation von HCoV-229E und die Bildung von PI(4,5)P ₂	137
Abb. 66 Effekte der Rekonstitution von PIP4K2A-Varianten in knockout-Zellen	139
Abb. 67 Effekte der Depletion von PIP4K2 und MURC auf Autophagie-assoziierte Proteine ..	140
Abb. 68 Differenzielle stressinduzierte Autophagosomenformation in PIP4K2-defizienten Zellen	142
Abb. 69 Modulation der Proteinmengen von p62 und LC3B-II infolge einer MURC-Depletion	143
Abb. 70 Induzierte Bildung autophagischer Vesikel in MURC-defizienten Zellen.....	144
Abb. 71 Beeinflussung der N Proteinmenge durch die Behandlung mit PIP4K2-Inhibitoren....	147
Abb. 72 Beeinflussung der viralen Replikation durch PIP4K2-Inhibitoren	148
Abb. 73 Differenzielle Effekte der PIP4K2-Inhibitoren CC260 und THZ-P1-2 auf die Zellviabilität	149
Abb. 74 Antivirale Wirkung von PIP4K2-Inhibitoren bei verzögerter Zugabe	151
Abb. 75 Dosisabhängige Regulation von Autophagie-Markern und PIP4K2B durch CC260 ...	152
Abb. 76 Dosisabhängige Regulation von Autophagie-Markern und PIP4K2B durch THZ-P1-2	153
Abb. 77 Differenzielle Regulation von Autophagie durch THZ-P1-2 und CC260.....	155
Abb. 78 Behandlung mit PIP4K2-Inhibitoren und Erfassung von PI(4,5)P ₂ sowie dsRNA nach einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse	157
Abb. 79 Lokalisation von PI(4,5)P ₂ in dsRNA-Spots nach PIP4K2-Inhibitorbehandlung.....	157
Abb. 80 Untersuchung der Zusammenhänge von PI(4,5)P ₂ und dsRNA in HCoV-229E-infizierten Zellen	158
Abb. 81 Einzelzellbasierte Darstellung der Abhängigkeiten von PI(4,5)P ₂ und dsRNA nach der Behandlung mit THZ-P1-2 und CC260	160
Abb. 82 Zusammenfassung Ergebnisse dieser Arbeit	188

Abb. Anhang 1 Western-Blot-Analyse des Degradationsbasierten ER-Phagie-Reporters in HCT116 Zellen	222
Abb. Anhang 2 Autophagie- und Proteasom-unabhängiger Abbau von RAMP4 nach Hungern	222
Abb. Anhang 3 Transduktion Tetracyclin-abhängiger ER-Phagie-Reporter in Huh7 Zellen	223
Abb. Anhang 4 Western-Blot-Analyse eines Zeitverlaufs der Infektion mit HCoV-229E von ER-Phagie-Reporterzellen.....	223
Abb. Anhang 5 Dotplots der ER-Phagie-Reporterzellen nach Infektion mit HCoV-229E	224
Abb. Anhang 6 Fixierungstest des Autophagie-Reporters mit PFA und Methanol	224
Abb. Anhang 7 Fluoreszenzmikroskopie von SEC24A knockout-Zellen mit dem Autophagie-Reporter.....	224
Abb. Anhang 8 Kontrollbedingungen für die Durchführung des Puro-PLA	225
Abb. Anhang 9 Visualisierung der Infektion von PIP4K2 und MURC knockout-Zellen.....	225
Abb. Anhang 10 HCoV-229E-induzierte Expression von MURC in Huh7 Zellen.....	226
Abb. Anhang 11 HCoV-229E-induzierte und siRNA-supprimierte MURC-mRNA-Expression	226
Abb. Anhang 12 Progressive HCoV-229E-induzierte mRNA-Expression von MURC	227
Abb. Anhang 13 Indirekte Immunfluoreszenz der Überexpression der PIP4K2-Varianten	227
Abb. Anhang 14 Überexpression von katalytisch aktiven/inaktiven PIP4K2A in PIP4K2A-defizienten Zellen	228
Abb. Anhang 15 Mikroskopische Erfassung der autophagischen Aktivität von MURC und PIP4K2 knockout-Zellen	228
Abb. Anhang 16 Erfassung des Autophagieprozesses in PIP4K2-defizienten A549 ⁺⁺ Zellen	229
Abb. Anhang 17 Fortbestehende antivirale Wirkung von CC260 nach PIP4K2-Depletion	230
Abb. Anhang 18 Dosisabhängige Regulation von Autophagie-Markern und PIP4K2B durch BAY-091	230
Abb. Anhang 19 Mikroskopische Erfassung des Autophagie-Reporters nach PIP4K2-Inhibitorbehandlung	231
Abb. Anhang 20 Erfassung der zellulären Verteilung von PI(4,5)P ₂ nach Behandlung mit CC260 und THZ-P1-2.....	231

V. Codeverzeichnis

Code 1 Eingabeaufforderung zur Segmentierung von Ordnern mit Cellpose.....	61
Code 2 ImageJ/Fiji-Makro zur Intensitätsmessung eines Kanals	61
Code 3 ImageJ/Fiji-Makro für die Überlagerung von Bildern vor/nach Fixierung	64
Code Anhang 1 VBA-Makro zur Auswertung der Kombination der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse der dsRNA und dem Autophagie-Reporter	220
Code Anhang 2 Ergänzung des Code Anhang 1 zur Messung der Lokalisation von PI(4,5)P ₂	221

VI. Literaturverzeichnis

- Al-Beltagi, S., Goulding, L. V., Chang, D. K. E., Mellits, K. H., Hayes, C. J., Gershkovich, P., Coleman, C. M., & Chang, K. C. (2021). Emergent SARS-CoV-2 variants: comparative replication dynamics and high sensitivity to thapsigargin. *Virulence*, 12(1), 2946-2956. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2006960>
- Al-Beltagi, S., Preda, C. A., Goulding, L., James, J., Pu, J., Skinner, P., Jiang, Z. M., Wang, B. L., Yang, J. Y., Banyard, A. C., Mellits, K. H., Gershkovich, P., Hayes, C. J., Nguyen-Van-Tam, J., Brown, I. H., Liu, J. H., & Chang, K. C. (2021). Thapsigargin Is a Broad-Spectrum Inhibitor of Major Human Respiratory Viruses: Coronavirus, Respiratory Syncytial Virus and Influenza A Virus. *Viruses-Basel*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/v13020234>
- Al-Omari, A., Rabaan, A. A., Salih, S., Al-Tawfiq, J. A., & Memish, Z. A. (2019). MERS coronavirus outbreak: Implications for emerging viral infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(3), 265-285. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.011>
- Albert, B. V. (2023). *Identification and validation of the human genes that support human coronavirus infection using functional genomics approaches* (Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen) <https://jlupub.ub.uni-giessen.de/items/d0455d0b-a784-4913-8707-4337feb63861>
- Alcalá, A. C., Hernández-Bravo, R., Medina, F., Coll, D. S., Zambrano, J. L., del Angel, R. M., & Ludert, J. E. (2017). The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted from infected mosquito cells via a non-classical caveolin-1-dependent pathway. *Journal of General Virology*, 98(8), 2088-2099. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000881>
- Almeida, J. D., Berry, D. M., Cunningham, C. H., Hamre, D., Hofstad, M. S., Mallucci, L., McIntosh, K., & Tyrrell, D. A. J. (1968). Coronaviruses. *Nature*, 220(5168), 650-+. <Go to ISI>://WOS:A1968C094700023
- Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W., & Buchmeier, M. J. (2013). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles. *mBio*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00524-13>
- Appelberg, S., Gupta, S., Akusjärvi, S. S., Ambikan, A. T., Mikaeloff, F., Saccon, E., Végvári, A., Benfeitas, R., Sperk, M., Ståhlberg, M., Krishnan, S., Singh, K., Penninger, J. M., Mirazimi, A., & Neogi, U. (2020). Dysregulation in Akt/mTOR/HIF-1 signaling identified by proteo-transcriptomics of SARS-CoV-2 infected cells. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 1748-1760. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1799723>
- Arabi, Y. M., Asiri, A. Y., Assiri, A. M., Balkhy, H. H., Al Bshabshe, A., Al Jeraisy, M., Mandourah, Y., Azzam, M. H. A., Bin Eshaq, A. M., Al Johani, S., Al Harbi, S., Jokhdar, H. A. A., Deeb, A. M., Memish, Z. A., Jose, J., Ghazal, S., Al Faraj, S., Al Mekhlafi, G. A., Sherbeeni, N. M., . . . Grp, S. C. C. T. (2020). Interferon Beta-1b and Lopinavir-Ritonavir for Middle East Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 383(17), 1645-1656. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015294>
- Arevalo, S. J., Castillo-Chávez, A., Calampa, C. S. U., Sifuentes, D. Z., Huallpa, C. J., Bianchi, G. L., Casas, R. G. S., Aguilar, M. Q., & Chavarría, R. P. (2023). What do we know about the function of SARS-CoV-2 proteins? *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1249607>
- Audesse, A. J., Dhakal, S., Hassell, L. A., Gardell, Z., Nemtsova, Y., & Webb, A. E. (2019). FOXO3 directly regulates an autophagy network to functionally regulate proteostasis in adult neural stem cells. *Plos Genetics*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008097>
- Aviner, R. (2020). The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1074-1083. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.04.014>
- Awasthi, P., Srivastava, A. K., Yadav, V. K., Singh, R., Yadav, S. S., Kidiyoor, G. R., & Kumar, A. (2022). Proteome profiling of phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type 2A and 2B knockdown cells identify modifications in key regulators involved in cell homeostasis and genome integrity. *Genome Instability & Disease*, 3(2), 88-107. <https://doi.org/10.1007/s42764-022-00060-7>
- Baer, A., & Kehn-Hall, K. (2014). Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *Jove-Journal of Visualized Experiments*(93). <https://doi.org/10.3791/52065>

- Baker, J., Ombredane, H., Daly, L., Knowles, I., Rapeport, G., Ito, K., & Martinez, M. A. (2023). Pan-antiviral effects of a PIKfyve inhibitor on respiratory virus infection in human nasal epithelium and mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.01050-23>
- Baptista, A., Vieira, A. M., Capela, E., Juliao, P., & Macedo, A. (2023). COVID-19 fatality rates in hospitalized patients: A new systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection and Public Health*, 16(10), 1606-1612. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.07.006>
- Basile, M. S., Cavalli, E., McCubrey, J., Hernández-Bello, J., Muñoz-Valle, J. F., Fagone, P., & Nicoletti, F. (2022). The PI3K/Akt/mTOR pathway: A potential pharmacological target in COVID-19. *Drug Discovery Today*, 27(3), 848-856. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.11.002>
- Baumgart, S., Dort, F., Mezzacapo, J., Peppler, H., Pfeiffer, S., Shaban, M. S., Krähling, V., & Kracht, M. (2025). *Suppression of coronavirus replication by phosphoinositide kinase inhibitors targeting PI5P4K* [Konferenz-Posterabstract]. 34th Annual Meeting of the Society for Virology, Hamburg.
- Beale, R., Wise, H., Stuart, A., Ravenhill, B. J., Digard, P., & Randow, F. (2014). A LC3-Interacting Motif in the Influenza A Virus M2 Protein Is Required to Subvert Autophagy and Maintain Virion Stability. *Cell Host & Microbe*, 15(2), 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.006>
- Berger, K. L., Kelly, S. M., Jordan, T. X., Tartell, M. A., & Randall, G. (2011). Hepatitis C Virus Stimulates the Phosphatidylinositol 4-Kinase III Alpha-Dependent Phosphatidylinositol 4-Phosphate Production That Is Essential for Its Replication. *Journal of Virology*, 85(17), 8870-8883. <https://doi.org/10.1128/Jvi.00059-11>
- Berryman, S., Brooks, E., Burman, A., Hawes, P., Roberts, R., Netherton, C., Monaghan, P., Whelband, M., Cottam, E., Elazar, Z., Jackson, T., & Wileman, T. (2012). Foot-and-Mouth Disease Virus Induces Autophagosomes during Cell Entry via a Class III Phosphatidylinositol 3-Kinase-Independent Pathway. *Journal of Virology*, 86(23), 12940-12953. <https://doi.org/10.1128/Jvi.00846-12>
- Berthet, J., & De Duve, C. (1951). Tissue fractionation studies. I. The existence of a mitochondria-linked, enzymically inactive form of acid phosphatase in rat-liver tissue. *Biochemical journal*, 50(2), 174-181. <https://doi.org/10.1042/bj0500174>
- Bertram, S., Dijkman, R., Habjan, M., Heurich, A., Gierer, S., Glowacka, I., Welsch, K., Winkler, M., Schneider, H., Hofmann-Winkler, H., Thiel, V., & Pohlmann, S. (2013). TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *Journal of Virology*, 87(11), 6150-6160. <https://doi.org/10.1128/JVI.03372-12>
- Bettini, E., & Locci, M. (2021). SARS-CoV-2 mRNA Vaccines: Immunological Mechanism and Beyond. *Vaccines*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/vaccines9020147>
- Bhatt, P. R. (2022). Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science*, 378(6625), 1181-1181.
- Bhattacharai, N., Pavadai, E., Pokhrel, R., Baral, P., Hossen, M. L., Stahelin, R. V., Chapagain, P. P., & Gerstman, B. S. (2022). Ebola virus protein VP40 binding to Sec24c for transport to the plasma membrane. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 90(2), 340-350. <https://doi.org/10.1002/prot.26221>
- Bilanges, B., Posor, Y., & Vanhaesebroeck, B. (2019). PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(9), 515-534. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0129-z>
- Biolmaging and Optics Core Facility. (2021). LaRoMe: Label and ROI Measurement Plugin. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. Abgerufen am 08.2025 von <https://github.com/BIOP/ijp-LaRoMe>
- Bogovic, J. A., Hanslovsky, P., Wong, A., & Saalfeld, S. (2016, 13-16 April 2016). Robust registration of calcium images by learned contrast synthesis. 2016 IEEE 13th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI),
- Bolt, A. M., & Klimecki, W. T. (2012). Autophagy in toxicology: self-consumption in times of stress and plenty. *Journal of Applied Toxicology*, 32(7), 465-479. <https://doi.org/10.1002/jat.1787>
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224, 213-232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>

- Bradford, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Broekman, M. J., Ward, J. W., & Marcus, A. J. (1981). Fatty-Acid Composition of Phosphatidylinositol and Phosphatidic-Acid in Stimulated Platelets - Persistence of Arachidonyl-Stearyl Structure. *Journal of Biological Chemistry*, 256(16), 8271-8274. <Go to ISI>://WOS:A1981MC83000007
- Bultsma, Y., Keune, W. J., & Divecha, N. (2010). PIP4Kbeta interacts with and modulates nuclear localization of the high-activity PtdIns5P-4-kinase isoform PIP4Kalpha. *Biochemical journal*, 430, 223-235. <https://doi.org/10.1042/Bj20100341>
- Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. (2022). Informationen zu Paxlovid® und Lagevrio®. Abgerufen am 08.2025 von <https://www.bfarm.de/DE/Arzneimittel/Arzneimittelinformationen/covid-19-arzneimittel.html>
- Burke, J. E., Triscott, J., Emerling, B. M., & Hammond, G. R. V. (2023). Beyond PI3Ks: targeting phosphoinositide kinases in disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 22(5), 357-386. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00582-5>
- Cai, X., Xu, Y., Cheung, A. K., Tomlinson, R. C., Alcazar-Roman, A., Murphy, L., Billich, A., Zhang, B., Feng, Y., Klumpp, M., Rondeau, J. M., Fazal, A. N., Wilson, C. J., Myer, V., Joberty, G., Bouwmeester, T., Labow, M. A., Finan, P. M., Porter, J. A., . . . Huang, Q. (2013). PIKfyve, a class III PI kinase, is the target of the small molecular IL-12/IL-23 inhibitor apilimod and a player in Toll-like receptor signaling. *Chem Biol*, 20(7), 912-921. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.05.010>
- Calabrese, M. F., Rajamohan, F., Harris, M. S., Caspers, N. L., Magyar, R., Withka, J. M., Wang, H., Borzilleri, K. A., Sahasrabudhe, P. V., Hoth, L. R., Geoghegan, K. F., Han, S., Brown, J., Subashi, T. A., Reyes, A. R., Frisbie, R. K., Ward, J., Miller, R. A., Landro, J. A., . . . Kurumbail, R. G. (2014). Structural Basis for AMPK Activation: Natural and Synthetic Ligands Regulate Kinase Activity from Opposite Poles by Different Molecular Mechanisms. *Structure*, 22(8), 1161-1172. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.06.009>
- Castellino, A. M., Parker, G. J., Boronenkov, I. V., Anderson, R. A., & Chao, M. V. (1997). A novel interaction between the juxtamembrane region of the p55 tumor necrosis factor receptor and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), 5861-5870. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5861>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2003). Update: outbreak of severe acute respiratory syndrome--worldwide, 2003. *JAMA*, 289(15), 1918-1920. <https://doi.org/10.1001/jama.289.15.1918>
- Chan, J. F. W., Yuan, S. F., Chu, H., Sridhar, S., & Yuen, K. Y. (2024). COVID-19 drug discovery and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 22(7), 391-407. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01036-y>
- Chantry, D., Vojtek, A., Kashishian, A., Holtzman, D. A., Wood, C., Gray, P. W., Cooper, J. A., & Hoekstra, M. F. (1997). p110 delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19236-19241. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19236>
- Chatterjee, S., Choi, A. J., & Frankel, G. (2021). A systematic review of Sec24 cargo interactome. *Traffic*, 22(12), 412-424. <https://doi.org/10.1111/tra.12817>
- Chaudhuri, S., Symons, J. A., & Deval, J. (2018). Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987-2017 and beyond. *Antiviral Research*, 155, 76-88. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.05.005>
- Chen, A. A., Lupan, A. M., Quek, R. T., Stanciu, S. G., Asaftei, M., Stanciu, G. A., Hardy, K. S., Magalhaes, T. D., Silver, P. A., Mitchison, T. J., & Salic, A. (2024). A coronaviral pore-replicase complex links RNA synthesis and export from double-membrane vesicles. *Science Advances*, 10(45). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adq9580>
- Chen, S., Chandra Tjin, C., Gao, X., Xue, Y., Jiao, H., Zhang, R., Wu, M., He, Z., Ellman, J., & Ha, Y. (2021). Pharmacological inhibition of PI5P4Kalpha/beta disrupts cell energy metabolism and selectively kills p53-null tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.2002486118>

- Chen, T., Tu, S. Y., Ding, L., Jin, M. L., Chen, H. C., & Zhou, H. B. (2023). The role of autophagy in viral infections. *Journal of Biomedical Science*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00899-2>
- Chen, X. J., Wang, K., Xing, Y. L., Tu, J., Yang, X. X., Zhao, Q., Li, K., & Chen, Z. B. (2014). Coronavirus membrane-associated papain-like proteases induce autophagy through interacting with Beclin1 to negatively regulate antiviral innate immunity. *Protein & Cell*, 5(12), 912-927. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0104-6>
- Cherry, J. D., & Krogstad, P. (2004). SARS: the first pandemic of the 21st century. *Pediatric Research*, 56(1), 1-5. <https://doi.org/10.1203/01.Pdr.0000129184.87042.Fc>
- Cherubini, A., & Zito, E. (2022). ER stress as a trigger of UPR and ER-phagy in cancer growth and spread. *Frontiers in Oncology*, 12, 997235. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.997235>
- Chidawanyika, T., Chakrabarti, R., Beauchemin, K. S., Higgs, H. N., & Supattapone, S. (2021). SEC24A facilitates colocalization and Ca(2)(+) flux between the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Journal of Cell Science*, 134(6). <https://doi.org/10.1242/jcs.249276>
- Chidawanyika, T., Sergison, E., Cole, M., Mark, K., & Supattapone, S. (2018). SEC24A identified as an essential mediator of thapsigargin-induced cell death in a genome-wide CRISPR/Cas9 screen. *Cell Death Discovery*, 4. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0135-5>
- Chidlow, J. H., Jr., & Sessa, W. C. (2010). Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovascular research*, 86(2), 219-225. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq075>
- Chin, A., & Lecuyer, E. (2021). Puromycin Labeling Coupled with Proximity Ligation Assays to Define Sites of mRNA Translation in Drosophila Embryos and Human Cells. *Methods Mol Biol*, 2381, 267-284. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1740-3_15
- Chino, H., Hatta, T., Natsume, T., & Mizushima, N. (2019). Intrinsically Disordered Protein TEX264 Mediates ER-phagy. *Molecular cell*, 74(5), 909-+. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.033>
- Chipurupalli, S., Samavedam, U., & Robinson, N. (2021). Crosstalk Between ER Stress, Autophagy and Inflammation. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.758311>
- Chiramel, A. I., & Best, S. M. (2018). Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. *Virus Research*, 254, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.006>
- Chiramel, A. I., Dougherty, J. D., Nair, V., Robertson, S. J., & Best, S. M. (2016). FAM134B, the Selective Autophagy Receptor for Endoplasmic Reticulum Turnover, Inhibits Replication of Ebola Virus Strains Makona and Mayinga. *Journal of Infectious Diseases*, 214, S319-S325. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw270>
- Choi, Y., Bowman, J. W., & Jung, J. U. (2018). Autophagy during viral infection - a double-edged sword. *Nature Reviews Microbiology*, 16(6), 340-353. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0003-6>
- Chung, T., Choi, Y. E., Song, K., & Jung, H. (2024). How coat proteins shape autophagy in plant cells. *Plant Physiology*, 197(1). <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae426>
- Clarke, J. H., Emson, P. C., & Irvine, R. F. (2008). Localization of phosphatidylinositol phosphate kinase Ily in kidney to a membrane trafficking compartment within specialized cells of the nephron. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 295(5), F1422-F1430. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90310.2008>
- Clarke, J. H., & Irvine, R. F. (2013). Evolutionarily conserved structural changes in phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PI5P4K) isoforms are responsible for differences in enzyme activity and localization. *Biochemical journal*, 454(1), 49-57. <https://doi.org/10.1042/BJ20130488>
- Cortese, M., Lee, J. Y., Cerikan, B., Neufeldt, C. J., Oorschot, V. M., Köhrer, S., Hennies, J., Schieber, N. L., Ronchi, P., Mizzon, G., Romero-Brey, I., Santarella-Mellwig, R., Schorb, M., Boermel, M., Mocaer, K., Beckwith, M. S., Templin, R. M., Gross, V., Pape, C., . . . Bartenschlager, R. (2020). Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host & Microbe*, 28(6), 853-+. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.11.003>
- Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., & Lockett, S. (2004). Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical Journal*, 86(6), 3993-4003. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.038422>

- Cottam, E. M., Maier, H. J., Manifava, M., Vaux, L. C., Chandra-Schoenfelder, P., Gerner, W., Britton, P., Ktistakis, N. T., & Wileman, T. (2011). Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy*, 7(11), 1335-1347. <https://doi.org/10.4161/auto.7.11.16642>
- Cottam, E. M., Wheelband, M. C., & Wileman, T. (2014). Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy*, 10(8), 1426-1441. <https://doi.org/10.4161/auto.29309>
- Cottignies-Calamarte, A., Marteau, F., He, F. F., Belouzard, S., Dubuisson, J., Tudor, D., Viollet, B., & Bomsel, M. (2025). Direct pharmacological AMPK activation inhibits mucosal SARS-CoV-2 infection by reducing lipid metabolism, restoring autophagy flux and the type I IFN response. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00394-25>
- Cui, Y. X., Parashar, S., Zahoor, M., Needham, P. G., Mari, M., Zhu, M., Chen, S. L., Ho, H. C., Reggiori, F., Farhan, H., Brodsky, J. L., & Ferro-Novick, S. (2019). A COPII subunit acts with an autophagy receptor to target endoplasmic reticulum for degradation. *Science*, 365(6448), 53-60. <https://doi.org/10.1126/science.aau9263>
- Davis, H. E., McCorkell, L., Vogel, J. M., & Topol, E. J. (2023). Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations (vol 21, pg 133, 2023). *Nature Reviews Microbiology*, 21(6), 408-408. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00896-0>
- De Craene, J. O., Bertazzi, D. L., Bar, S., & Friant, S. (2017). Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. *International journal of molecular sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030634>
- Debuysschere, C., Nekoua, M. P., Alidjinou, E. K., & Hober, D. (2024). The relationship between SARS-CoV-2 infection and type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 20(10), 588-599. <https://doi.org/10.1038/s41574-024-01004-9>
- Desforges, M., Desjardins, J., Zhang, C. S., & Talbot, P. J. (2013). The Acetyl-Esterase Activity of the Hemagglutinin-Esterase Protein of Human Coronavirus OC43 Strongly Enhances the Production of Infectious Virus. *Journal of Virology*, 87(6), 3097-3107. <https://doi.org/10.1128/Jvi.02699-12>
- DeWolf, S., Laracy, J. C., Perales, M. A., Kamboj, M., van den Brink, M. R. M., & Vardhana, S. (2022). SARS-CoV-2 in immunocompromised individuals. *Immunity*, 55(10), 1779-1798. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.09.006>
- Di Monaco, M., Peteri, M., & Liang, J. R. (2024). Methods for Monitoring ER-Phagy. *Methods Mol Biol*, 2845, 109-126. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4067-8_9
- Diehl, N., & Schaal, H. (2013). Make Yourself at Home: Viral Hijacking of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Viruses-Basel*, 5(12), 3192-3212. <https://doi.org/10.3390/v5123192>
- Divecha, N., Truong, O., Hsuan, J. J., Hinchliffe, K. A., & Irvine, R. F. (1995). The Cloning and Sequence of the C-Isoform of Ptdins4p 5-Kinase. *Biochemical journal*, 309, 715-719. <https://doi.org/10.1042/bj3090715>
- Doggrell, S. A. (2021). Do we need bamlanivimab? Is etesevimab a key to treating Covid-19? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 21(11), 1359-1362. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1985458>
- Dorobantu, C. M., Albuлесcu, L., Harak, C., Feng, Q., van Kampen, M., Strating, J. R. P. M., Gorbalenya, A. E., Lohmann, V., van der Schaar, H. M., & van Kuppeveld, F. J. M. (2015). Modulation of the Host Lipid Landscape to Promote RNA Virus Replication: The Picornavirus Encephalomyocarditis Virus Converges on the Pathway Used by Hepatitis C Virus. *Plos Pathogens*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005185>
- Dossou, A. S., & Basu, A. (2019). The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy. *Cancers*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101422>
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A. M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Muller, S., . . . Doerr, H. W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348(20), 1967-1976. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>
- Ebner, M., Koch, P. A., & Haucke, V. (2019). Phosphoinositides in the control of lysosome function and homeostasis. *Biochemical Society Transactions*, 47(4), 1173-1185. <https://doi.org/10.1042/BST20190158>
- Emerling, B. M., Hurov, J. B., Poulogiannis, G., Tsukazawa, K. S., Choo-Wing, R., Wulf, G. M., Bell, E. L., Shim, H. S., Lamia, K. A., Rameh, L. E., Bellinger, G., Sasaki, A. T., Asara, J.

- M., Yuan, X., Bullock, A., DeNicola, G. M., Song, J. X., Brown, V., Signoretti, S., & Cantley, L. C. (2013). Depletion of a Putatively Druggable Class of Phosphatidylinositol Kinases Inhibits Growth of p53-Null Tumors. *Cell*, 155(4), 844-857. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.057>
- Enam, S. U., Zinshteyn, B., Goldman, D. H., Cassani, M., Livingston, N. M., Seydoux, G., & Green, R. (2020). Puromycin reactivity does not accurately localize translation at the subcellular level. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.60303>
- English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippé, R., & Desjardins, M. (2009). Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nature Immunology*, 10(5), 480-487. <https://doi.org/10.1038/ni.1720>
- Erdwiens, A., Hackmann, C., Preuß, U., Reiche, J., Biere, B., Duwe, S., Köndgen, S., Oh, D., Wedde, M., Krieger, D., Bauer, T., Virologic SARI Surveillance Study Group, Dürrwald, R., & Tolksdorf, K. (2025). *Virologische ARE- und SARI Surveillance* (Zirkulation von Atemwegsviren in der Saison 2024/25). https://www.rki.de/DE/Aktuelles/Publikationen/Epidemiologisches-Bulletin/2025/35_25.pdf
- European Medicines Agency. (2023, 09.08.2023). Lagevrio (Molnupiravir). Abgerufen am 08.02.2025 von <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lagevrio>
- Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., Dickson, E. J., Suh, B. C., & Hille, B. (2010). Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *Journal of Physiology-London*, 588(17), 3179-3185. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.192153>
- Fattahi, S., Khalifehzadeh-Esfahani, Z., Mohammad-Rezaei, M., Mafi, S., & Jafarinia, M. (2022). PI3K/Akt/mTOR pathway: a potential target for anti-SARS-CoV-2 therapy. *Immunologic Research*, 70(3), 269-275. <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09268-x>
- Fiume, R., Stijf-Bultsma, Y., Shah, Z. H., Keune, W. J., Jones, D. R., Jude, J. G., & Divecha, N. (2015). PIP4K and the role of nuclear phosphoinositides in tumour suppression. *Biochim Biophys Acta*, 1851(6), 898-910. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.02.014>
- Friedman, R. M., & Contente, S. (2010). Treatment of hepatitis C infections with interferon: a historical perspective. *Hepat Res Treat*, 2010, 323926. <https://doi.org/10.1155/2010/323926>
- Fung, T. S., & Liu, D. X. (2019). Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annual Review of Microbiology*, Vol 73, 73, 529-557. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>
- Gagneur, A., Sizun, J., Vallet, S., Leger, M. C., Picard, B., & Talbot, P. J. (2002). Coronavirus-related nosocomial viral respiratory infections in a neonatal and paediatric intensive care unit: a prospective study. *Journal of hospital infection*, 51(1), 59-64. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1179>
- Ganley, I. G., Wong, P. M., Gammoh, N., & Jiang, X. J. (2011). Distinct Autophagosomal-Lysosomal Fusion Mechanism Revealed by Thapsigargin-Induced Autophagy Arrest. *Molecular cell*, 42(6), 731-743. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.024>
- Gao, X. X., Lowry, P. R., Zhou, X., Depry, C., Wei, Z. K., Wong, G. W., & Zhang, J. (2011). PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(35), 14509-14514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019386108>
- Gayle, S., Landrette, S., Beeharry, N., Conrad, C., Hernandez, M., Beckett, P., Ferguson, S. M., Mandelkern, T., Zheng, M., Xu, T., Rothberg, J., & Lichtenstein, H. (2017). Identification of apilimod as a first-in-class PIKfyve kinase inhibitor for treatment of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 129(13), 1768-1778. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-736892>
- Ge, L., Wilz, L., & Schekman, R. (2015). Biogenesis of autophagosomal precursors for LC3 lipidation from the ER-Golgi intermediate compartment. *Autophagy*, 11(12), 2372-2374. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1105422>
- Ge, L., Zhang, M., Kenny, S. J., Liu, D. W., Maeda, M., Saito, K., Mathur, A., Xu, K., & Schekman, R. (2017). Remodeling of ER-exit sites initiates a membrane supply pathway for autophagosome biogenesis. *Embo Reports*, 18(9), 1586-1603. <https://doi.org/10.15252/embr.201744559>
- Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S. F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E. O., Bagriantsev, S. N., Borgese, N., & De Camilli, P. (2013). PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell*, 153(7), 1494-1509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.026>

- Goldberger, Z. D., & Goldberger, A. L. (2012). Therapeutic Ranges of Serum Digoxin Concentrations in Patients With Heart Failure. *American Journal of Cardiology*, 109(12), 1818-1821. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.02.028>
- Golebiewska, U., Nyako, M., Woturski, W., Zaitseva, I., & McLaughlin, S. (2008). Diffusion coefficient of fluorescent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of cells. *Molecular Biology of the Cell*, 19(4), 1663-1669. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1208>
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., Ziebuhr, J., & Grp, C. S. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536-544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Grainger, D. L., Tavelis, C., Ryan, A. J., & Hinchliffe, K. A. (2012). The emerging role of PtdIns5P: another signalling phosphoinositide takes its place. *Biochemical Society Transactions*, 40, 257-261. <https://doi.org/10.1042/Bst20110617>
- Guan, Y., Zheng, B. J., He, Y. Q., Liu, X. L., Zhuang, Z. X., Cheung, C. L., Luo, S. W., Li, P. H., Zhang, L. J., Guan, Y. J., Butt, K. M., Wong, K. L., Chan, K. W., Lim, W., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Peiris, J. S., & Poon, L. L. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 302(5643), 276-278. <https://doi.org/10.1126/science.1087139>
- Guevin, C., Manna, D., Belanger, C., Konan, K. V., Mak, P., & Labonte, P. (2010). Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology*, 405(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.032>
- Halet, G. (2005). Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains. *Biology of the Cell*, 97(7), 501-518. <Go to ISI>://WOS:000230780300003
- Hammond, G. R. V., & Burke, J. E. (2020). Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport, and disease. *Current opinion in cell biology*, 63, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.007>
- Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med*, 121(1), 190-193. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30734>
- Hansen, S. D., Lee, A. A., Duewell, B. R., & Groves, J. T. (2022). Membrane-mediated dimerization potentiates PIP5K lipid kinase activity. *Elife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.73747>
- Harb, J. G., Noureldine, H. A., Chedid, G., Eldine, M. N., Abou Abdallah, D., Chedid, N. F., & Nour-Eldine, W. (2020). SARS, MERS and COVID-19: clinical manifestations and organ-system complications: a mini review. *Pathogens and Disease*, 78(4). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa033>
- Hasegawa, J., Iwamoto, R., Otomo, T., Nezu, A., Hamasaki, M., & Yoshimori, T. (2016). Autophagosome-lysosome fusion in neurons requires INPP5E, a protein associated with Joubertsyndrome. *Embo Journal*, 35(17), 1853-1867. <https://doi.org/10.15252/embj.201593148>
- Hasegawa, J., Strunk, B. S., & Weisman, L. S. (2017). PI5P and PI(3,5)P2: Minor, but Essential Phosphoinositides. *Cell Structure and Function*, 42(1), 49-60. <https://doi.org/10.1247/csf.17003>
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43, 67-93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- Heath, E. I., Chen, W., Heilbrun, L., Choi, J. E., Dobson, K., Smith, M., Maj, T., Vaishampayan, U., Kryczek, I., Zou, W. P., Chinnaiyan, A. M., & Qiao, Y. Y. (2024). Phase II trial of multi-kinase inhibitor ESK981 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Investigational New Drugs*, 42(5), 566-574. <https://doi.org/10.1007/s10637-024-01463-x>
- Hers, I., Vincent, E. E., & Tavaré, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*, 23(10), 1515-1527. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>
- Hoang, H. D., Naeli, P., Alain, T., & Jafarnejad, S. M. (2023). Mechanisms of impairment of interferon production by SARS-CoV-2. *Biochemical Society Transactions*, 51(3), 1047-1056. <https://doi.org/10.1042/BST20221037>
- Hoffmann, M., Hofmann-Winkler, H., Smith, J. C., Kruger, N., Arora, P., Sorensen, L. K., Sogaard, O. S., Hasselstrom, J. B., Winkler, M., Hempel, T., Raich, L., Olsson, S., Danov, O., Jonigk,

- D., Yamazoe, T., Yamatsuta, K., Mizuno, H., Ludwig, S., Noe, F., . . . Pohlmann, S. (2021). Camostat mesylate inhibits SARS-CoV-2 activation by TMPRSS2-related proteases and its metabolite GBPA exerts antiviral activity. *EBioMedicine*, 65, 103255. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103255>
- Holmes, E. C., Goldstein, S. A., Rasmussen, A. L., Robertson, D. L., Crits-Christoph, A., Wertheim, J. O., Anthony, S. J., Barclay, W. S., Boni, M. F., Doherty, P. C., Farrar, J., Geoghegan, J. L., Jiang, X., Leibowitz, J. L., Neil, S. J. D., Skern, T., Weiss, S. R., Worobey, M., Andersen, K. G., . . . Rambaut, A. (2021). The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*, 184(19), 4848-4856. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>
- Hommelgaard, A. M., Roepstorff, K., Vilhardt, F., Torgersen, M. L., Sandvig, K., & van Deurs, B. (2005). Caveolae: Stable membrane domains with a potential for internalization. *Traffic*, 6(9), 720-724. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00314.x>
- Horby, P., Lim, W. S., Emberson, J. R., Mafham, M., Bell, J. L., Linsell, L., Staplin, N., Brightling, C., Ustianowski, A., Elmahi, E., Prudon, B., Green, C., Felton, T., Chadwick, D., Rege, K., Fegan, C., Chappell, L. C., Faust, S. N., Jaki, T., . . . Grp, R. C. (2021). Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 384(8), 693-704. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436>
- Horby, P., Mafham, M., Linsell, L., Bell, J. L., Staplin, N., Emberson, J. R., Wiselka, M., Ustianowski, A., Elmahi, E., Prudon, B., Whitehouse, T., Felton, T., Williams, J., Faccenda, J., Underwood, J., Baillie, J. K., Chappell, L. C., Faust, S. N., Jaki, T., . . . Landray, M. J. (2020). Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 383(21), 2030-2040. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022926>
- Horlemann, C. (2024). Paracetamol: Moderner Klassiker mit Langzeitrissen. *Schmerzmedizin*, 40(1), 32-33. <https://doi.org/10.1007/s00940-023-4655-6>
- Hou, W. C., Hao, Y. L., Sun, L., Zhao, Y., Zheng, X. Y., & Song, L. (2022). The dual roles of autophagy and the GPCRs-mediating autophagy signaling pathway after cerebral ischemic stroke. *Molecular Brain*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-022-00899-7>
- Hou, X. T., Ren, C., Jin, J., Chen, Y., Lyu, X., Bi, K. L., Carrillo, N. D., Cryns, V. L., Anderson, R. A., Sun, J. C., & Chen, M. (2025). Phosphoinositide signalling in cell motility and adhesion. *Nature Cell Biology*, 27(5), 736-748. <https://doi.org/10.1038/s41556-025-01647-4>
- Hsu, J. C. C., Laurent-Rolle, M., Pawlak, J. B., Wilen, C. B., & Cresswell, P. (2021). Translational shutdown and evasion of the innate immune response by SARS-CoV-2 NSP14 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.2101161118>
- Hsu, N. Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y. H., Takvorian, P. M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., Cameron, C. E., Ehrenfeld, E., van Kuppeveld, F. J. M., & Altan-Bonnet, N. (2010). Viral Reorganization of the Secretory Pathway Generates Distinct Organelles for RNA Replication. *Cell*, 141(5), 799-811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.050>
- Huang, X. C., Dong, W. J., Milewska, A., Golda, A., Qi, Y. H., Zhu, Q. K., Marasco, W. A., Baric, R. S., Sims, A. C., Pyrc, K., Li, W. H., & Sui, J. H. (2015). Human Coronavirus HKU1 Spike Protein Uses O-Acetylated Sialic Acid as an Attachment Receptor Determinant and Employs Hemagglutinin-Esterase Protein as a Receptor-Destroying Enzyme. *Journal of Virology*, 89(14), 7202-7213. <https://doi.org/10.1128/Jvi.00854-15>
- Huang, Y. X., Wang, T. Y., Zhong, L. J., Zhang, W. X., Zhang, Y., Yu, X. L., Yuan, S. F., & Ni, T. (2024). Molecular architecture of coronavirus double-membrane vesicle pore complex. *Nature*, 633(8028), 224-+. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07817-y>
- Hui, X. F., Zhang, L. L., Cao, L., Huang, K., Zhao, Y., Zhang, Y. F., Chen, X., Lin, X., Chen, M. Z., & Jin, M. L. (2021). SARS-CoV-2 promote autophagy to suppress type I interferon response. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00574-8>
- Icho, S., Rujas, E., Muthuraman, K., Tam, J., Liang, H. Z., Landreth, S., Liao, M. M., Falzarano, D., Julien, J. P., & Melnyk, R. A. (2022). Dual Inhibition of Vacuolar-ATPase and TMPRSS2 Is Required for Complete Blockade of SARS-CoV-2 Entry into Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(7). <https://doi.org/10.1128/aac.00439-22>
- Ikonomov, O. C., Sbrissa, D., Delvecchio, K., Xie, Y. F., Jin, J. P., Rappolee, D., & Shisheva, A. (2011). The Phosphoinositide Kinase PIKfyve Is Vital in Early Embryonic Development. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13404-13413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.222364>

- Ingólfsson, H. I., Melo, M. N., van Eerden, F. J., Arnarez, C., Lopez, C. A., Wassenaar, T. A., Periole, X., de Vries, A. H., Tieleman, D. P., & Marrink, S. J. (2014). Lipid Organization of the Plasma Membrane. *Journal of the American Chemical Society*, 136(41), 14554-14559. <https://doi.org/10.1021/ja507832e>
- Islam, M. J., Islam, N. N., Alom, M. S., Kabir, M., & Halim, M. A. (2023). A review on structural, non-structural, and accessory proteins of SARS-CoV-2: Highlighting drug target sites. *Immunobiology*, 228(1). <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152302>
- Jackson, W. T., Giddings, T. J. r., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R., & Kirkegaard, K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *Plos Biology*, 3(5), 861-871. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030156>
- Jaskulska, A., Janecka, A. E., & Gach-Janczak, K. (2021). Thapsigargin-From Traditional Medicine to Anticancer Drug. *International journal of molecular sciences*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/ijms22010004>
- Jeong, Y. T., Simoneschi, D., Keegan, S., Melville, D., Adler, N. S., Saraf, A., Florens, L., Washburn, M. P., Cavasotto, C. N., Fenyö, D., Cuervo, A. M., Rossi, M., & Pagano, M. (2018). The ULK1-FBXW5-SEC23B nexus controls autophagy. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.42253>
- Jin, Y., & Xue, J. (2023). Lipid kinases PIP5Ks and PIP4Ks: potential drug targets for breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1323897>
- Jude, J. G., Spencer, G. J., Huang, X., Somerville, T. D. D., Jones, D. R., Divecha, N., & Somerville, T. C. P. (2015). A targeted knockdown screen of genes coding for phosphoinositide modulators identifies PIP4K2A as required for acute myeloid leukemia cell proliferation and survival. *Oncogene*, 34(10), 1253-1262. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.77>
- Kahn, J. S., & McIntosh, K. (2005). History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatric infectious disease journal*, 24(11 Suppl), S223-227, discussion S226. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000188166.17324.60>
- Kamalesh, K., Trivedi, D., Toscano, S., Sharma, S., Kolay, S., & Raghu, P. (2017). Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase regulates early endosomal dynamics during clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Science*, 130(13), 2119-2133. <https://doi.org/10.1242/jcs.202259>
- Karim, M., Mishra, M., Lo, C. W., Saul, S., Cagirici, H. B., Gourdelier, M., Ghita, L., Ojha, A., Tran, D. N., Agrawal, A., McGraw, C., East, M. P., Gammeltoft, K. A., Sahoo, M. K., Mooney, N. A., Johnson, G. L., Das, S., Leyssen, P., Neyts, J., . . . Einav, S. (2025). PIP4K2C inhibition reverses autophagic flux impairment induced by SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-61759-1>
- Karousis, E. D., Schubert, K., & Ban, N. A. (2024). Coronavirus takeover of host cell translation and intracellular antiviral response: a molecular perspective. *Embo Journal*, 43(2), 151-167. <https://doi.org/10.1038/s44318-023-00019-8>
- Kawase, M., Shirato, K., Matsuyama, S., & Taguchi, F. (2009). Protease-Mediated Entry via the Endosome of Human Coronavirus 229E. *Journal of Virology*, 83(2), 712-721. <https://doi.org/10.1128/Jvi.01933-08>
- Keyaerts, E., Vijgen, L., Maes, P., Neyts, J., & Van Ranst, M. (2005). Growth kinetics of SARS-coronavirus in Vero E6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(3), 1147-1151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.085>
- Khan, U., Mubariz, M., Khlidj, Y., Nasir, M. M., Ramadan, S., Saeed, F., Muhammad, A., & Abuelazm, M. (2024). Safety and Efficacy of Camostat Mesylate for Covid-19: a systematic review and Meta-analysis of Randomized controlled trials. *BMC infectious diseases*, 24(1), 709. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09468-w>
- Kim, J. H., Lee, H. N., Huang, X., Jung, H., Otegui, M. S., Li, F. Q., & Chung, T. (2022). FYVE2, a phosphatidylinositol 3-phosphate effector, interacts with the COPII machinery to control autophagosome formation in Arabidopsis. *Plant Cell*, 34(1), 351-373. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab263>
- Kipper, S., Hamad, S., Caly, L., Avrahami, D., Bacharach, E., Jans, D. A., Gerber, D., & Bajorek, M. (2015). New Host Factors Important for Respiratory Syncytial Virus (RSV) Replication Revealed by a Novel Microfluidics Screen for Interactors of Matrix (M) Protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(3), 532-543. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.044107>
- Kitagawa, M., Liao, P. J., Lee, K. H., Wong, J., Shang, S. C., Minami, N., Sampetean, O., Saya, H., Lingyun, D., Prabhu, N., Diam, G. K., Sobota, R., Larsson, A., Nordlund, P., McCormick,

- F., Ghosh, S., Epstein, D. M., Dymock, B. W., & Lee, S. H. (2017). Dual blockade of the lipid kinase PIP4Ks and mitotic pathways leads to cancer-selective lethality. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02287-5>
- Klann, K., Bojkova, D., Tascher, G., Ciesek, S., Münch, C., & Cinatl, J. (2020). Growth Factor Receptor Signaling Inhibition Prevents SARS-CoV-2 Replication. *Molecular cell*, 80(1), 164-+. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.006>
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., . . . Tong, C. K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy*, 17(1), 1-382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Kluge, S., Janssens, U., Schälte, G., Spinner, C. D., Malin, J. J., Langer, F., Westhoff, M., Pfeifer, M., Rabe, K. F., Bracht, H., Hoffmann, F., Böttiger, B. W., Weinmann-Menke, J., Kersten, A., Berlit, P., Krawczyk, M., Nehls, W., Haase, R., Müller, O. J., . . . Karagiannis, C. (2024). S3-Leitlinie - Empfehlungen zur Therapie von Patienten mit COVID-19. Abgerufen am 02.2026 von <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/113-001>
- Knoops, K., Kikkert, M., van den Worm, S. H. E., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Koster, A. J., Mommaas, A. M., & Snijder, E. J. (2008). SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *Plos Biology*, 6(9), 1957-1974. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060226>
- Koczulla, A., Ankermann, T., Behrends, U., Berlit, P., Brinkmann, F., Frank, U., Gloeckl, R., Gogoll, C., Häuser, W. H., B. Huber, G. H., T., Köllner, V., Krause, S., Kronsbein, J., Maibaum, T., Mooren, F., Pecks, U., Peters, E., Peters, S., Pfeifer, M., . . . Zwick, R. (2024). S1-Leitlinie Long/Post-COVID. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP). Abgerufen am 08.2025 von https://register.awmf.org/assets/guidelines/020-027I_S1_Long-Post-Covid_2025-08-verlaengert.pdf
- Kokic, G., Hillen, H. S., Tegunov, D., Dienemann, C., Seitz, F., Schmitzova, J., Farnung, L., Siewert, A., Höbartner, C., & Cramer, P. (2021). Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20542-0>
- Kroemer, G., Marino, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, 40(2), 280-293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>
- Kumar, A. V., Mills, J., & Lapierre, L. R. (2022). Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Frontiers in Cell and Developmental biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.793328>
- Lacalle, R. A., de Karam, J. C., Martínez-Muñoz, L., Artetxe, I., Peregil, R. M., Sot, J., Rojas, A. M., Goñi, F. M., Mellado, M., & Mañes, S. (2015). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase homo- and heterodimerization determines its membrane localization and activity. *Faseb Journal*, 29(6), 2371-2385. <https://doi.org/10.1096/fj.14-264606>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227(5259), 680-+. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lamark, T., & Johansen, T. (2021). Mechanisms of Selective Autophagy. *Annual review of cell and developmental biology*, 37, 143-169. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-035530>
- Lamarre, A., & Talbot, P. J. (1989). Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E. *Canadian journal of microbiology*, 35(10), 972-974. <https://doi.org/10.1139/m89-160>
- Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 270-284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- Leeman, D. S., Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, A. E., McKay, A., Pollina, E. A., Dulken, B., Zhao, X. A., Yeo, R. W., Ho, T. T., Mahmoudi, S., Devarajan, K., Passequé, E., Rando, T. A., Frydman, J., & Brunet, A. (2018). Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science*, 359(6381), 1277-1282. <https://doi.org/10.1126/science.aag3048>
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D708-D717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>

- Lennemann, N. J., & Coyne, C. B. (2017). Dengue and Zika viruses subvert reticulophagy by NS2B3-mediated cleavage of FAM134B. *Autophagy*, 13(2), 322-332. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1265192>
- Lew, T. W. K., Kwek, T. K., Tai, D., Earnest, A., Loo, S., Singh, K., Kwan, K. M., Chan, Y., Yim, C. F., Bek, S. L., Kor, A. C., Yap, W. S., Chelliah, Y. R., Lai, Y. C., & Goh, S. K. (2003). Acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 290(3), 374-380. <https://doi.org/10.1001/jama.290.3.374>
- Li, G. M., Yuan, M., Li, H. H., Deng, C. S., Wang, Q., Tang, Y. X., Zhang, H. Y., Yu, W. S., Xu, Q., Zou, Y. Y., Yuan, Y. M., Guo, J. W., Jin, C. M., Guan, X. D., Xie, F. J., & Song, J. P. (2021). Safety and efficacy of artemisinin-piperazine for treatment of COVID-19: an open-label, non-randomised and controlled trial. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(1). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106216>
- Li, J., Jiang, M. Q., Yu, Z. T., Xiong, C. W., Pan, J. E., Cai, Z. H., Xu, N. W., Zhou, X. D., Huang, Y., & Yang, Z. C. (2022). Artemisinin relieves osteoarthritis by activating mitochondrial autophagy through reducing TNFSF11 expression and inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling in cartilage. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00365-1>
- Li, J. L., Tanhehco, E. J., & Russell, B. (2014). Actin dynamics is rapidly regulated by the PTEN and PIP2 signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 307(11), H1618-H1625. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00393.2014>
- Li, W., Laishram, R. S., & Anderson, R. A. (2013). The novel poly(A) polymerase Star-PAP is a signal-regulated switch at the 3'-end of mRNAs. *Advances in Biological Regulation*, 53(1), 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2012.10.004>
- Li, Y., Liu, Y. Y., Zhang, Y. H., Tan, C., Cai, Y. F., Zhang, Y., Chen, J. N., Fu, Y. G., & Liu, G. L. (2024). In vitro and in vivo evaluation of thapsigargin as an antiviral agent against transmissible gastroenteritis virus. *Veterinary Research*, 55(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-04-01359-x>
- Liang, J. R., Lingeman, E., Ahmed, S., & Corn, J. E. (2018). Atlastins remodel the endoplasmic reticulum for selective autophagy. *Journal of Cell Biology*, 217(10), 3354-3367. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804185>
- Liang, J. R., Lingeman, E., Luong, T., Ahmed, S., Muhar, M., Nguyen, T., Olzmann, J. A., & Corn, J. E. (2020). A Genome-wide ER-phagy Screen Highlights Key Roles of Mitochondrial Metabolism and ER-Resident UFMylation. *Cell*, 180(6), 1160-+. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.017>
- Liang, Q. M., Chang, B., Brulois, K. F., Castro, K., Min, C. K., Rodgers, M. A., Shi, M. D., Ge, J. N., Feng, P. H., Oh, B. H., & Jung, J. U. (2013). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K7 Modulates Rubicon-Mediated Inhibition of Autophagosome Maturation. *Journal of Virology*, 87(22), 12499-12503. <https://doi.org/10.1128/Jvi.01898-13>
- Liang, S., Wu, Y. S., Li, D. Y., Tang, J. X., & Liu, H. F. (2021). Autophagy in Viral Infection and Pathogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.766142>
- Lie, L. K., Synowiec, A., Mazur, J., Rabalski, L., & Pyrc, K. (2023). An engineered A549 cell line expressing CD13 and TMPRSS2 is permissive to clinical isolate of human coronavirus 229E. *Virology*, 588. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109889>
- Lima, K., Nogueira, F. L., Cipelli, M., Carvalho, M. F. L., Pereira-Martins, D. A., da Silva, W. F., Cavaglieri, R. C., Nardinelli, L., Leal, A. M., Velloso, E., Bendit, I., Camara, N. O. S., Schuringa, J. J., Machado-Neto, J. A., & Rego, E. M. (2024). Potency and efficacy of pharmacological PIP4K2 inhibitors in acute lymphoblastic leukemia. *European journal of pharmacology*, 977, 176723. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176723>
- Lima, K., Pereira-Martins, D. A., de Miranda, L. B. L., Coelho-Silva, J. L., Leandro, G. D., Weinhäuser, I., Cavaglieri, R. D., Leal, A. D., da Silva, W. F., Lange, A. P. A. D., Velloso, E. D. R. P., Griessinger, E., Hilberink, J. R., Ammatuna, E., Huls, G., Schuringa, J. J., Rego, E. M., & Machado-Neto, J. A. (2022). The PIP4K2 inhibitor THZ-P1-2 exhibits antileukemia activity by disruption of mitochondrial homeostasis and autophagy. *Blood Cancer Journal*, 12(11). <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00747-w>
- Liu, J., Cao, R. Y., Xu, M. Y., Wang, X., Zhang, H. Y., Hu, H. R., Li, Y. F., Hu, Z. H., Zhong, W., & Wang, M. L. (2020). Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is

- effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discovery*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0156-0>
- Liu, W. R., Jin, L., Tian, M. X., Jiang, X. F., Yang, L. X., Ding, Z. B., Shen, Y. H., Peng, Y. F., Gao, D. M., Zhou, J., Qiu, S. J., Dai, Z., Fan, J., & Shi, Y. H. (2016). Caveolin-1 promotes tumor growth and metastasis via autophagy inhibition in hepatocellular carcinoma. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 40(2), 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.06.017>
- Logue, J., Chakraborty, A. R., Johnson, R., Goyal, G., Rodas, M., Taylor, L. J., Baracco, L., McGrath, M. E., Haupt, R., Furlong, B. A., Soong, M., Prabhala, P., Horvath, V., Carlson, K. E., Weston, S., Ingber, D. E., DePamphilis, M. L., & Frieman, M. B. (2022). PIKfyve-specific inhibitors restrict replication of multiple coronaviruses in vitro but not in a murine model of COVID-19. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03766-2>
- Lu, L., Zhong, W., Bian, Z., Li, Z., Zhang, K., Liang, B., Zhong, Y., Hu, M., Lin, L., Liu, J., Lin, X., Huang, Y., Jiang, J., Yang, X., Zhang, X., & Huang, Z. (2020). A comparison of mortality-related risk factors of COVID-19, SARS, and MERS: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 81(4), e18-e25. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.07.002>
- Lundquist, M. R., Goncalves, M. D., Loughran, R. M., Possik, E., Vijayaraghavan, T., Yang, A., Pauli, C., Ravi, A., Verma, A., Yang, Z., Johnson, J. L., Wong, J. C. Y., Ma, Y., Hwang, K. S., Weinkove, D., Divecha, N., Asara, J. M., Elemento, O., Rubin, M. A., . . . Emerling, B. M. (2018). Phosphatidylinositol-5-Phosphate 4-Kinases Regulate Cellular Lipid Metabolism By Facilitating Autophagy. *Molecular cell*, 70(3), 531-544 e539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.037>
- Lytton, J., Westlin, M., & Hanley, M. R. (1991). Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic-Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17067-17071. <Go to ISI>://WOS:A1991GF44500018
- Maib, H., Adarska, P., Hunton, R., Vines, J. H., Strutt, D., Bottanelli, F., & Murray, D. H. (2024). Recombinant biosensors for multiplex and super-resolution imaging of phosphoinositides. *Journal of Cell Biology*, 223(6). <https://doi.org/10.1083/jcb.202310095>
- Mandic, M., Marjanovic, M. M., Janjetovic, K., Bosnjak, M., Harhaji-Trajkovic, L., Trajkovic, V., & Vucicevic, L. (2025). Multifaceted role of AMPK in autophagy: more than a simple trigger? *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 329(5), C1380-C1397. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.01058.2024>
- Manivannan, E., Karthikeyan, C., Moorthy, N. S. H. N., & Chaturvedi, S. C. (2021). The Rise and Fall of Chloroquine/Hydroxychloroquine as Compassionate Therapy of COVID-19. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.584940>
- Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193-+. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
- Mauvezin, C., & Neufeld, T. P. (2015). Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11(8), 1437-1438. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1066957>
- McCaughy, J., & Stephens, D. J. (2018). COPII-dependent ER export in animal cells: adaptation and control for diverse cargo. *Histochemistry and cell biology*, 150(2), 119-131. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1689-2>
- McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z., & Chanock, R. M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(4), 933-940. <https://doi.org/10.1073/pnas.57.4.933>
- Meyer, D., Sielaff, F., Hammami, M., Böttcher-Friebertshäuser, E., Garten, W., & Steinmetzer, T. (2013). Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease IMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation. *Biochemical journal*, 452, 331-343. <https://doi.org/10.1042/Bj20130101>
- Mihelc, E. M., Baker, S. C., & Lanman, J. K. (2021). Coronavirus infection induces progressive restructuring of the endoplasmic reticulum involving the formation and degradation of double membrane vesicles. *Virology*, 556, 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.12.007>
- Miller, K., McGrath, M. E., Hu, Z., Ariannejad, S., Weston, S., Frieman, M., & Jackson, W. T. (2020). Coronavirus interactions with the cellular autophagy machinery. *Autophagy*, 16(12), 2131-2139. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1817280>

- Milne, S. B., Ivanova, P. T., DeCamp, D., Hsueh, R. C., & Brown, H. A. (2005). A targeted mass spectrometric analysis of phosphatidylinositol phosphate species. *Journal of Lipid Research*, 46(8), 1796-1802. <https://doi.org/10.1194/jlr.D500010-JLR200>
- Mizushima, N. (2025). Autophagic flux measurement: Cargo degradation versus generation of degradation products. *Current opinion in cell biology*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2025.102463>
- Mizushima, N., & Murphy, L. O. (2020). Autophagy Assays for Biological Discovery and Therapeutic Development. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(12), 1080-1093. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.07.006>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 107-132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Monastyrska, I., Ulasli, M., Rottier, P. J. M., Guan, J. L., Reggiori, F., & de Haan, C. A. M. (2013). An autophagy-independent role for LC3 in equine arteritis virus replication. *Autophagy*, 9(2), 164-174. <https://doi.org/10.4161/auto.22743>
- Moreau, K., Ravikumar, B., Puri, C., & Rubinsztein, D. C. (2012). Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *Journal of Cell Biology*, 196(4), 483-496. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110114>
- Mossel, E. C., Huang, C., Narayanan, K., Makino, S., Tesh, R. B., & Peters, C. J. (2005). Exogenous ACE2 expression allows refractory cell lines to support severe acute respiratory syndrome coronavirus replication. *Journal of Virology*, 79(6), 3846-3850. <https://doi.org/10.1128/Jvi.79.6.3846-3850.2005>
- Münz, C. (2011). Beclin-1 Targeting for Viral Immune Escape. *Viruses-Basel*, 3(7), 1166-1178. <https://doi.org/10.3390/v3071166>
- Nagaraj, N., Wisniewski, J. R., Geiger, T., Cox, J., Kircher, M., Kelso, J., Pääbo, S., & Mann, M. (2011). Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Molecular Systems Biology*, 7. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.81>
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., & Sato, J. (1982). Growth of Human Hepatoma-Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Research*, 42(9), 3858-3863. <Go to ISI>://WOS:A1982PK77000064
- Nakagawa, K., & Makino, S. (2021). Mechanisms of Coronavirus Nsp1-Mediated Control of Host and Viral Gene Expression. *Cells*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/cells10020300>
- National Academies of Sciences Engineering and Medicine. (2024). Selected Long-Term Health Effects Stemming from COVID-19 and Functional Implications. In *Long-Term Health Effects of COVID-19: Disability and Function Following SARS-CoV-2 Infection*. National Academies Press (US). <https://doi.org/10.17226/27756>
- Nelson, E. A., Dyall, J., Hoenen, T., Barnes, A. B., Zhou, H. Y., Liang, J. Y., Michelotti, J., Dewey, W. H., DeWald, L. E., Bennett, R. S., Morris, P. J., Guha, R., Klumpp-Thomas, C., McKnight, C., Chen, Y. C., Xu, X., Wang, A., Hughes, E., Martin, S., . . . White, J. M. (2017). The phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase inhibitor apilimod blocks filoviral entry and infection. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005540>
- Nomura, R., Kiyota, A., Suzaki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T., & Fujimoto, T. (2004). Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *Journal of Virology*, 78(16), 8701-8708. <https://doi.org/10.1128/Jvi.78.16.8701-8708.2004>
- Ogata, T., Ueyama, T., Isodono, K., Tagawa, M., Takehara, N., Kawashima, T., Harada, K., Takahashi, T., Shioi, T., Matsubara, H., & Oh, H. (2008). MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Molecular and Cellular Biology*, 28(10), 3424-3436. <https://doi.org/10.1128/MCB.02186-07>
- Ohta, K., Matsumoto, Y., & Nishio, M. (2020). Inhibition of Cavin3 Degradation by the Human Parainfluenza Virus Type 2 V Protein Is Important for Efficient Viral Growth. *Frontiers in Microbiology*, 11, 803. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00803>
- Omari, S., Makareeva, E., Roberts-Pilgrim, A., Mirigian, L., Jarnik, M., Ott, C., Lippincott-Schwartz, J., & Leikin, S. (2018). Noncanonical autophagy at ER exit sites regulates procollagen turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(43), E10099-E10108. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814552115>

- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q. H., Wei, Y. J., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A., & Levine, B. (2007). HSV-1ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host & Microbe*, 1(1), 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2006.12.001>
- Osborne, S. L., Thomas, C. L., Gschmeissner, S., & Schiavo, G. (2001). Nuclear PtdIns(4,5)P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *Journal of Cell Science*, 114(13), 2501-2511. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.13.2501>
- Ozaki, S., DeWald, D. B., Shope, J. C., Chen, J., & Prestwich, G. D. (2000). Intracellular delivery of phosphoinositides and inositol phosphates using polyamine carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11286-11291. <https://doi.org/10.1073/pnas.210197897>
- Pachitariu, M., & Stringer, C. (2022). Cellpose 2.0: how to train your own model. *Nature methods*, 19(12), 1634-1641. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01663-4>
- Palacios-Rapalo, S. N., De Jesús-González, L. A., Cordero-Rivera, C. D., Farfan-Morales, C. N., Osuna-Ramos, J. F., Martínez-Mier, G., Quistián-Galván, J., Muñoz-Pérez, A., Bernal-Dolores, V., del Angel, R. M., & Reyes-Ruiz, J. M. (2021). Cholesterol-Rich Lipid Rafts as Platforms for SARS-CoV-2 Entry. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.796855>
- Parker, C. G., & Pratt, M. R. (2020). Click Chemistry in Proteomic Investigations. *Cell*, 180(4), 605-632. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.025>
- Parry, R. P., & Macnaughton, M. R. (1983). Syncytium Production by Human Coronavirus-229e Group Viruses. *Fems Microbiology Letters*, 20(1), 23-26. <Go to ISI>://WOS:A1983RM74700005
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460-473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Patel, H. H., Murray, F., & Insel, P. A. (2008). Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 359-391. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.121506.124841>
- Paul, D., & Bartenschlager, R. (2013). Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol*, 2(2), 32-48. <https://doi.org/10.5501/wjv.v2.i2.32>
- Pendaries, C., Tronchère, H., Arbibe, L., Mounier, J., Gozani, O., Cantley, L., Fry, M. J., Gaits-lacovoni, F., Sansonetti, P. J., & Payrastra, B. (2006). PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during Shigella flexneri infection. *Embo Journal*, 25(5), 1024-1034. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601001>
- Phillipotts, R. J., Wallace, J., Tyrrell, D. A. J., & Tagart, V. B. (1983). Therapeutic Activity of Enviroxime against Rhinovirus Infection in Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(5), 671-675. <https://doi.org/10.1128/Aac.23.5.671>
- Posor, Y., Jang, W., & Haucke, V. (2022). Phosphoinositides as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(12), 797-816. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00490-x>
- Puri, C., Renna, M., Bento, C. F., Moreau, K., & Rubinsztein, D. C. (2013). Diverse Autophagosome Membrane Sources Coalesce in Recycling Endosomes. *Cell*, 154(6), 1285-1299. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.044>
- Qu, Y. F., Wang, X., Zhu, Y. K., Wang, W. L., Wang, Y. Y., Hu, G. W., Liu, C. R., Li, J. J., Ren, S. H., Xiao, M. Z. X., Liu, Z. S., Wang, C. X., Fu, J., Zhang, Y. C., Li, P., Zhang, R., & Liang, Q. M. (2021). ORF3a-Mediated Incomplete Autophagy Facilitates Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Replication. *Frontiers in Cell and Developmental biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716208>
- Raghu, P. (2021). Emerging cell biological functions of phosphatidylinositol 5 phosphate 4 kinase. *Current opinion in cell biology*, 71, 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.01.012>
- Rahman, A., & Sarkar, A. (2022). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection: Analyses of risk factors and literature review of knowledge, attitude and practices. *Zoonoses Public Health*, 69(6), 635-642. <https://doi.org/10.1111/zph.12952>
- Rameh, L. E., Talias, K. F., Duckworth, B. C., & Cantley, L. C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*, 390(6656), 192-196. <https://doi.org/10.1038/36621>

- Rashid, H. O., Yadav, R. K., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2015). ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, 11(11), 1956-1977. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091141>
- Ravi, A., Palamiuc, L., Loughran, R. M., Triscott, J., Arora, G. K., Kumar, A., Tieu, V., Pauli, C., Reist, M., Lew, R. J., Houlihan, S. L., Fellmann, C., Metallo, C., Rubin, M. A., & Emerling, B. M. (2021). PI5P4Ks drive metabolic homeostasis through peroxisome-mitochondria interplay. *Developmental Cell*, 56(11), 1661-+. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.04.019>
- Rebensburg, S. V., Wei, G. C., Larue, R. C., Lindenberger, J., Francis, A. C., Annamalai, A. S., Morrison, J., Shkriabai, N., Huang, S. W., KewalRamani, V., Poeschla, E. M., Melikyan, G. B., & Kvaratskhelia, M. (2021). Sec24C is an HIV-1 host dependency factor crucial for virus replication. *Nature Microbiology*, 6(4), 435-+. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00868-1>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Reggiori, F., & Molinari, M. (2022). Er-Phagy: Mechanisms, Regulation, and Diseases Connected to the Lysosomal Clearance of the Endoplasmic Reticulum. *Physiological Reviews*, 102(3), 1393-1448. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2021>
- Reggiori, F., Monastyrska, I., Verheije, M. H., Cali, T., Ulasli, M., Bianchi, S., Bernasconi, R., de Haan, C. A., & Molinari, M. (2010). Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host & Microbe*, 7(6), 500-508. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.013>
- Reis, G., Moreira Silva, E. A. S., Medeiros Silva, D. C., Thabane, L., Campos, V. H. S., Ferreira, T. S., Santos, C. V. Q., Nogueira, A. M. R., Almeida, A., Savassi, L. C. M., Figueiredo-Neto, A. D., Dias, A. C. F., Freire Junior, A. M., Bitaraes, C., Milagres, A. C., Callegari, E. D., Simplicio, M. I. C., Ribeiro, L. B., Oliveira, R., . . . Investigators, T. (2023). Early Treatment with Pegylated Interferon Lambda for Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 388(6), 518-528. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2209760>
- Richards, A. L., & Jackson, W. T. (2012). Intracellular Vesicle Acidification Promotes Maturation of Infectious Poliovirus Particles. *Plos Pathogens*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003046>
- Riva, L., Yuan, S. F., Yin, X., Martin-Sancho, L., Matsunaga, N., Pache, L., Burgstaller-Muehlbacher, S., De Jesus, P. D., Teriete, P., Hull, M. V., Chang, M. W., Chan, J. F. W., Cao, J. L., Poon, V. K. M., Herbert, K. M., Cheng, K. Y., Nguyen, T. T. H., Rubanov, A., Pu, Y., . . . Chanda, S. K. (2020). Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature*, 586(7827), 113-+. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2577-1>
- Rohaim, M. A., El Naggar, R. F., Clayton, E., & Munir, M. (2021). Structural and functional insights into non-structural proteins of coronaviruses. *Microbial Pathogenesis*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104641>
- Roncato, R., Angelini, J., Pani, A., & Talotta, R. (2022). Lipid rafts as viral entry routes and immune platforms: A double-edged sword in SARS-CoV-2 infection? *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1867(6). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2022.159140>
- Saad, J. S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R. H., & Summers, M. F. (2006). Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11364-11369. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602818103>
- Sarkes, D., & Rameh, L. E. (2010). A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides. *Biochemical journal*, 428(3), 375-384. <https://doi.org/10.1042/BJ20100129>
- Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J., Kofuji, S., Eguchi, S., Yamazaki, M., & Suzuki, A. (2009). Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Progress in Lipid Research*, 48(6), 307-343. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.06.001>
- Satarker, S., Ahuja, T., Banerjee, M., E, V. B., Dogra, S., Agarwal, T., & Nampoothiri, M. (2020). Hydroxychloroquine in COVID-19: Potential Mechanism of Action Against SARS-CoV-2. *Current pharmacology reports*, 6(5), 203-211. <https://doi.org/10.1007/s40495-020-00231-8>

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/Nmeth.2019>
- Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology Journal*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
- Schreiber, A., & Ludwig, S. (2025). Host-targeted antivirals against SARS-CoV-2 in clinical development- Prospect or disappointment? *Antiviral Research*, 235. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2025.106101>
- Seiler, K., & Tschan, M. P. (2021). Autophagy and coronavirus infection - a Trojan horse or Achilles heel? *Swiss Medical Weekly*, 151. <https://doi.org/10.4414/smw.2021.20468>
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M., & Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *Embo Journal*, 31(5), 1095-1108. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.32>
- Shaban, M. S., Mayr-Buro, C., Meier-Soelch, J., Albert, B. V., Schmitz, M. L., Ziebuhr, J., & Kracht, M. (2022). Thapsigargin: key to new host-directed coronavirus antivirals? *Trends in Pharmacological Sciences*, 43(7), 557-568. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.04.004>
- Shaban, M. S., Müller, C., Mayr-Buro, C., Weiser, H., Meier-Soelch, J., Albert, B. V., Weber, A., Linne, U., Hain, T., Babayev, I., Karl, N., Hofmann, N., Becker, S., Herold, S., Schmitz, M. L., Ziebuhr, J., & Kracht, M. (2021). Multi-level inhibition of coronavirus replication by chemical ER stress. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25551-1>
- Shang, C., Zhuang, X. Y., Zhang, H., Li, Y. Q., Zhu, Y. L., Lu, J., Ge, C. C., Cong, J. N., Li, T. Y., Li, N., Tian, M. Y., Jin, N. Y., & Li, X. (2021). Inhibition of Autophagy Suppresses SARS-CoV-2 Replication and Ameliorates Pneumonia in hACE2 Transgenic Mice and Xenografted Human Lung Tissues. *Journal of Virology*, 95(24). <https://doi.org/10.1128/JVI.01537-21>
- Shen, L. W., Mao, H. J., Wu, Y. L., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2017). TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections. *Biochimie*, 142, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.016>
- Shi, Y., Tan, S. H., Ng, S., Zhou, J., Yang, N. D., Koo, G. B., McMahon, K. A., Parton, R. G., Hill, M. M., Del Pozo, M. A., Kim, Y. S., & Shen, H. M. (2015). Critical role of CAV1/caveolin-1 in cell stress responses in human breast cancer cells via modulation of lysosomal function and autophagy. *Autophagy*, 11(5), 769-784. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034411>
- Shima, T., Kirisako, H., & Nakatogawa, H. (2019). COPII vesicles contribute to autophagosomal membranes. *Journal of Cell Biology*, 218(5), 1503-1510. <https://doi.org/10.1083/jcb.201809032>
- Shukla, S., Jin, R., Robustelli, J., Zimmerman, Z. E., & Baumgart, T. (2019). PIP2 Reshapes Membranes through Asymmetric Desorption. *Biophysical Journal*, 117(5), 962-974. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.047>
- Sivakumaren, S. C., Shim, H., Zhang, T., Ferguson, F. M., Lundquist, M. R., Browne, C. M., Seo, H. S., Paddock, M. N., Manz, T. D., Jiang, B., Hao, M. F., Krishnan, P., Wang, D. G., Yang, T. J., Kwiatkowski, N. P., Ficarro, S. B., Cunningham, J. M., Marto, J. A., Dhe-Paganon, S., . . . Gray, N. S. (2020). Targeting the PI5P4K Lipid Kinase Family in Cancer Using Covalent Inhibitors. *Cell chemical biology*, 27(5), 525-537 e526. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.02.003>
- Snijder, E. J., Limpens, R. W. A. L., de Wilde, A. H., de Jong, A. W. M., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Maier, H. J., Faas, F. F. G. A., Koster, A. J., & Bárcena, M. (2020). A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *Plos Biology*, 18(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000715>
- Soto-Avellaneda, A., & Morrison, B. E. (2020). Signaling and other functions of lipids in autophagy: a review. *Lipids in Health and Disease*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01389-2>
- Steiner, S., Kratzel, A., Barut, G. T., Lang, R. M., Aguiar Moreira, E., Thomann, L., Kelly, J. N., & Thiel, V. (2024). SARS-CoV-2 biology and host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 22(4), 206-225. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-01003-z>

- Stephens, L. R., Jackson, T. R., & Hawkins, P. T. (1993). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim Biophys Acta*, 1179(1), 27-75. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(93\)90072-w](https://doi.org/10.1016/0167-4889(93)90072-w)
- Stirling, D. R., Swain-Bowden, M. J., Lucas, A. M., Carpenter, A. E., Cimini, B. A., & Goodman, A. (2021). CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *Bmc Bioinformatics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04344-9>
- Sun, Y. D., Carroll, S., Kaksonen, M., Toshima, J. Y., & Drubin, D. G. (2007). PtdIns(4,5)P₂ turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-dependent endocytic internalization. *Journal of Cell Biology*, 177(2), 355-367. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611011>
- Tan, X., Cai, K., Li, J. J., Yuan, Z., Chen, R. F., Xiao, H. R., Xu, C. R., Hu, B., Qin, Y. L., & Ding, B. B. (2023). Coronavirus subverts ER-phagy by hijacking FAM134B and ATL3 into p62 condensates to facilitate viral replication. *Cell Reports*, 42(4). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112286>
- Tan, X. J., Thapa, N., Liao, Y. H., Choi, S. Y., & Anderson, R. A. (2016). PtdIns(4,5)P₂ signaling regulates ATG14 and autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(39), 10896-10901. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523145113>
- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., & Kominami, E. (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1(2), 84-91. <https://doi.org/10.4161/auto.1.2.1697>
- Taylor, M. P., & Kirkegaard, K. (2007). Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *Journal of Virology*, 81(22), 12543-12553. <https://doi.org/10.1128/Jvi.00755-07>
- Trahey, M., Oh, H. S., Cameron, C. E., & Hay, J. C. (2012). Poliovirus Infection Transiently Increases COPII Vesicle Budding. *Journal of Virology*, 86(18), 9675-9682. <https://doi.org/10.1128/Jvi.01159-12>
- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 333(1-2), 169-174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-e)
- V'Kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature reviews. Microbiology*, 19(3), 155-170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Vabret, A., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean, J., Corbet, S., & Freymuth, F. (2006). Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clinical infectious diseases*, 42(5), 634-639. <https://doi.org/10.1086/500136>
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., & Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature medicine*, 10(4), 368-373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>
- van der Schaar, H. M., Leyssen, P., Thibaut, H. J., de Palma, A., van der Linden, L., Lanke, K. H. W., Lacroix, C., Verbeken, E., Conrath, K., MacLeod, A. M., Mitchell, D. R., Palmer, N. J., de Poël, H. V., Andrews, M., Neyts, J., & van Kuppeveld, F. J. M. (2013). A Novel, Broad-Spectrum Inhibitor of Enterovirus Replication That Targets Host Cell Factor Phosphatidylinositol 4-Kinase IIIβ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 4971-4981. <https://doi.org/10.1128/Aac.01175-13>
- Vauquelin, G. (2016). Cell membranes... and how long drugs may exert beneficial pharmacological activity. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 82(3), 673-682. <https://doi.org/10.1111/bcp.12996>
- Vicencio, J. M., Ortiz, C., Criollo, A., Jones, A. W. E., Kepp, O., Galluzzi, L., Joza, N., Vitale, I., Morselli, E., Tailer, M., Castedo, M., Maiuri, M. C., Molgó, J., Szabadkai, G., Lavandro, S., & Kroemer, G. (2009). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death and Differentiation*, 16(7), 1006-1017. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.34>
- Vicinanza, M., Korolchuk, V. I., Ashkenazi, A., Puri, C., Menzies, F. M., Clarke, J. H., & Rubinsztein, D. C. (2015). PI(5)P Regulates Autophagosome Biogenesis. *Molecular cell*, 57(2), 219-234. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.007>
- Vigh, L., Nakamoto, H., Landry, J., Gomez-Munoz, A., Harwood, J. L., & Horvath, I. (2007). Membrane regulation of the stress response from prokaryotic models to mammalian cells.

- Stress Responses in Biology and Medicine*, 1113, 40-51. <https://doi.org/10.1196/annals.1391.027>
- Volpatti, J. R., Al-Maawali, A., Smith, L., Al-Hashim, A., Brill, J. A., & Dowling, J. J. (2019). The expanding spectrum of neurological disorders of phosphoinositide metabolism. *Disease Models & Mechanisms*, 12(8). <https://doi.org/10.1242/dmm.038174>
- von Delft, A., Hall, M. D., Kwong, A. D., Purcell, L. A., Saikatendu, K. S., Schmitz, U., Tallarico, J. A., & Lee, A. A. (2023). Accelerating antiviral drug discovery: lessons from COVID-19. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(7), 585-603. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00692-8>
- Wada, Y., Cardinale, I., Khatcherian, A., Chu, J., Kantor, A. B., Gottlieb, A. B., Tatsuta, N., Jacobson, E., Barsoum, J., & Krueger, J. G. (2012). Apilimod Inhibits the Production of IL-12 and IL-23 and Reduces Dendritic Cell Infiltration in Psoriasis. *Plos One*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035069>
- Wang, D. G., Paddock, M. N., Lundquist, M. R., Sun, J. Y., Mashadova, O., Amadiume, S., Bumpus, T. W., Hodakoski, C., Hopkins, B. D., Fine, M., Hill, A., Yang, T. J., Baskin, J. M., Dow, L. E., & Cantley, L. C. (2019). PIP4Ks Suppress Insulin Signaling through a Catalytic-Independent Mechanism. *Cell Reports*, 27(7), 1991-+. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.070>
- Wang, H. Z., Sun, H. Q., Zhu, X. H., Zhang, L., Albanesi, J., Levine, B., & Yin, H. (2015). GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome: lysosome fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(22), 7015-7020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507263112>
- Wang, L. Y., Kim, J. Y., Liu, H. M., Lai, M. M. C., & Ou, J. H. J. (2017). HCV-induced autophagosomes are generated via homotypic fusion of phagophores that mediate HCV RNA replication. *Plos Pathogens*, 13(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006609>
- Wang, L. Y., & Ou, J. H. J. (2015). Hepatitis C virus and autophagy. *Biological Chemistry*, 396(11), 1215-1222. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0172>
- Wang, R., Simoneau, C. R., Kulsuptrakul, J., Bouhaddou, M., Travisano, K. A., Hayashi, J. M., Carlson-Stevermer, J., Zengel, J. R., Richards, C. M., Fozouni, P., Oki, J., Rodriguez, L., Joehnk, B., Walcott, K., Holden, K., Sil, A., Carette, J. E., Krogan, N. J., Ott, M., & Puschnik, A. S. (2021). Genetic Screens Identify Host Factors for SARS-CoV-2 and Common Cold Coronaviruses. *Cell*, 184(1), 106-+. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.004>
- Wang, Y. N., Rajpoot, S., Li, P. F., Lavrijsen, M., Ma, Z. R., Hirani, N., Saqib, U., Pan, Q. W., & Baig, M. S. (2022). Repurposing dyphylline as a pan-coronavirus antiviral therapy. *Future Medicinal Chemistry*, 14(10), 685-699. <https://doi.org/10.4155/fmc-2021-0311>
- Wen, Y., Feigenson, G. W., Vogt, V. M., & Dick, R. A. (2020). Mechanisms of PI(4,5)P₂ Enrichment in HIV-1 Viral Membranes. *Journal of Molecular Biology*, 432(19), 5343-5364. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.018>
- Whitworth, K. M., Rowland, R. R. R., Petrovan, V., Sheahan, M., Cino-Ozuna, A. G., Fang, Y., Hesse, R., Mileham, A., Samuel, M. S., Wells, K. D., & Prather, R. S. (2019). Resistance to coronavirus infection in amino peptidase N-deficient pigs. *Transgenic Research*, 28(1), 21-32. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0100-3>
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wickham, H., & Bryan, J. (2025). readxl: Read Excel Files. <https://readxl.tidyverse.org>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2026). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. <https://dplyr.tidyverse.org>
- Wickham, H., Vaughan, D., & Girlich, M. (2026). tidyr: Tidy Messy Data. <https://tidyr.tidyverse.org>
- Wilkinson, S. (2019). ER-phagy: shaping up and destressing the endoplasmic reticulum. *Febs Journal*, 286(14), 2645-2663. <https://doi.org/10.1111/febs.14932>
- Wills, R. C., Doyle, C. P., Zewe, J. P., Pacheco, J., Hansen, S. D., & Hammond, G. R. V. (2023). A novel homeostatic mechanism tunes PI(4,5)P₂-dependent signaling at the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 136(16). <https://doi.org/10.1242/jcs.261494>
- Wilson, A., & McCormick, C. (2025). Reticulophagy and viral infection. *Autophagy*, 21(1), 3-20. <https://doi.org/10.1080/15548627.2024.2414424>
- Wilson, R., Kovacs, D., Crosby, M., & Ho, A. (2024). Global Epidemiology and Seasonality of Human Seasonal Coronaviruses: A Systematic Review. *Open Forum Infectious Diseases*, 11(8). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofae418>

- Wolff, G., Melia, C. E., Snijder, E. J., & Bárcena, M. (2020). Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends in Microbiology*, 28(12), 1022-1033. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.009>
- Wong, A. C. P., Li, X., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2019). Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. *Viruses*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/v11020174>
- Woo, P. C. Y., Huang, Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K. Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, 2(8), 1804-1820. <https://doi.org/10.3390/v2081803>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B. J., Chan, K. H., & Yuen, K. Y. (2012). Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86(7), 3995-4008. <https://doi.org/10.1128/Jvi.06540-11>
- World Health Organization. (2018). *Surveillance for human infection with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Interim guidance* (WHO/MERS/SUR/15.1 Revision 1). <https://www.who.int/publications/i/item/10665-177869>
- World Health Organization. (2021). *WHO-Convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part* (2096-9511, 2693-8839). (COVID-19: Animal-human interface and food safety). <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>
- World Health Organization. (2023). WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. Abgerufen am 01.2026 von <https://data.who.int/dashboards/covid19/more-resources>
- Wortmann, L., Brauer, N., Holton, S. J., Irlbacher, H., Weiske, J., Lechner, C., Meier, R., Karen, J., Sioberg, C. B., Putter, V., Christ, C. D., Ter Laak, A., Lienau, P., Lesche, R., Nicke, B., Cheung, S. H., Bauser, M., Haegebarth, A., von Nussbaum, F., . . . Lemos, C. (2021). Discovery and Characterization of the Potent and Highly Selective 1,7-Naphthyridine-Based Inhibitors BAY-091 and BAY-297 of the Kinase PIP4K2A. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(21), 15883-15911. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01245>
- Wu, J. E., Zhang, Z. H., Teng, Z. D., Abdullah, S. W., Sun, S. Q., & Guo, H. C. (2021). Sec62 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy Balance to Affect Foot-and-Mouth Disease Virus Replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.707107>
- Wulansari, N., Darsono, W. H. W., Woo, H. J., Chang, M. Y., Kim, J., Bae, E. J., Sun, W., Lee, J. H., Cho, I. J., Shin, H., Lee, S. J., & Lee, S. H. (2021). Neurodevelopmental defects and neurodegenerative phenotypes in human brain organoids carrying Parkinson's disease-linked DNAJC6 mutations. *Science Advances*, 7(8). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb1540>
- Xing, Y. F., Wen, Z. Y., Gao, W., Lin, Z. K., Zhong, J., & Jiu, Y. M. (2020). Multifaceted Functions of Host Cell Caveolae/Caveolin-1 in Virus Infections. *Viruses-Basel*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/v12050487>
- Yale University. (2020). A Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Study of LAM-002A for the Prevention of Progression of COVID-19. ClinicalTrials.gov. Abgerufen am 07.2025 von <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04446377>
- Yan, W. Z., Zheng, Y. H., Zeng, X. T., He, B., & Cheng, W. (2022). Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00884-5>
- Yan, Y., Jiang, K., Liu, P., Zhang, X., Dong, X., Gao, J., Liu, Q., Barr, M. P., Zhang, Q., Hou, X., Meng, S., & Gong, P. (2016). Bafilomycin A1 induces caspase-independent cell death in hepatocellular carcinoma cells via targeting of autophagy and MAPK pathways. *Scientific Reports*, 6, 37052. <https://doi.org/10.1038/srep37052>
- Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microbial cell*, 3(12), 588-596. <https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546>
- Yoshii, S. R., & Mizushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *International journal of molecular sciences*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>
- Yu, M., Chen, J., Xu, Z., Yang, B., He, Q., Luo, P., Yan, H., & Yang, X. (2023). Development and safety of PI3K inhibitors in cancer. *Archives of toxicology*, 97(3), 635-650. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03440-4>

- Zanetti, F. A., Fernandez, I., Baquero, E., Guardado-Calvo, P., Ferrino-Iriarte, A., Dubois, S., Morel, E., Alfonso, V., Aguilera, M. O., Celayes, M. E., Polo, L. M., Suhaiman, L., Galassi, V. V., Chiarpotti, M., Allende-Ballester, C., Rodriguez, J. M., Castón, J. R., Lijavetzky, D., Taboga, O., . . . Delgui, L. R. (2025). On the role of VP3-PI3P interaction in birnavirus endosomal membrane targeting. *Elife*, 13. <https://doi.org/10.7554/eLife.97261>
- Zanetti, G., Prinz, S., Daum, S., Meister, A., Schekman, R., Bacia, K., & Briggs, J. A. G. (2013). The structure of the COPII transport-vesicle coat assembled on membranes. *Elife*, 2. <https://doi.org/10.7554/eLife.00951>
- Zhang, X. B., Ramírez, C. M., Aryal, B., Madrigal-Matute, J., Liu, X. R., Diaz, A., Torrecilla-Parra, M., Suárez, Y., Cuervo, A. M., Sessa, W. C., & Fernández-Hernando, C. (2020). Cav-1 (Caveolin-1) Deficiency Increases Autophagy in the Endothelium and Attenuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 40(6), 1510-1522. <https://doi.org/10.1161/Atvbaha.120.314291>
- Zhang, Y. X., Inoue, M., Tsutsumi, A., Watanabe, S., Nishizawa, T., Nagata, K., Kikkawa, M., & Inaba, K. (2020). Cryo-EM structures of SERCA2b reveal the mechanism of regulation by the luminal extension tail. *Science Advances*, 6(33). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb0147>
- Zhou, Y. Y., Gilmore, K., Ramirez, S., Settels, E., Gammeltoft, K. A., Pham, L. V., Fahnoe, U., Feng, S., Offersgaard, A., Trimpert, J., Bukh, J., Osterrieder, K., Gottwein, J. M., & Seeberger, P. H. (2021). In vitro efficacy of artemisinin-based treatments against SARS-CoV-2. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93361-y>

VII. Anhang

```

1. Sub Export_Daten_newworksheet()
2.     WorkbookdsRNA = ThisWorkbook.Name
3.     WorkbookCell = WorkbookdsRNA
4.     WorkbookRot = WorkbookdsRNA
5.     WorkbookCell = Replace(WorkbookCell, "Objects_dsRNA", "Cell", 1, 1)
6.     WorkbookRot = Replace(WorkbookRot, "Objects_dsRNA", "Objects_Rot", 1, 1)
7.     Workbooks(WorkbookdsRNA).Activate
8.     With Columns("A:A")
9.     .TextToColumns Destination:=Range("A1"), DataType:=xlDelimited, _
10.         TextQualifier:=xlDoubleQuote, Comma:=True, FieldInfo:=Array(1, 1)
11.     End With
12.     Workbooks(WorkbookCell).Activate
13.     With Columns("A:A")
14.     .TextToColumns Destination:=Range("A1"), DataType:=xlDelimited, _
15.         TextQualifier:=xlDoubleQuote, Comma:=True, FieldInfo:=Array(1, 1)
16.     End With
17.     Workbooks(WorkbookRot).Activate
18.     With Columns("A:A")
19.     .TextToColumns Destination:=Range("A1"), DataType:=xlDelimited, _
20.         TextQualifier:=xlDoubleQuote, Comma:=True, FieldInfo:=Array(1, 1)
21.     End With
22.     Workbooks(WorkbookdsRNA).Activate
23.     Range("A:C,K:K, AS:AS,BJ:BJ").Select
24.     Range("BJ1").Activate
25.     Selection.Copy
26.     Sheets.Add After:=ActiveSheet
27.     Sheets("Tabelle1").Name = "dsRNA"
28.     ActiveSheet.Paste 'einkopieren von ImageNr, ObjectNr, Bildname, Area, dsRNA
intensity, parental cell in Tabelle1
29.     Sheets.Add After:=ActiveSheet
30.     Sheets("Tabelle2").Name = "Rot"
31.     Sheets.Add After:=ActiveSheet
32.     Sheets("Tabelle3").Name = "Auswertung_VBA"
33.     Sheets("dsRNA").Select
34.     TiteldsRNA = ActiveWorkbook.Name
35.     Workbooks(WorkbookRot).Activate
36.     Range("A:C,K:K,BA:BB,CE:CE").Select
37.     Range("CE1").Activate
38.     Selection.Copy
39.     Workbooks(TiteldsRNA).Activate
40.     Sheets("Rot").Select
41.     ActiveSheet.Paste 'einkopieren von ImageNR, ObjectNr, Bildname, Area, intentsity
dsrna, rot, gün,parental cell in Tabelle1
42.     Workbooks(WorkbookCell).Activate
43.     Range("A:C,K:K, AJ:AK, BJ:BL").Select
44.     Range("BL1").Activate
45.     Selection.Copy
46.     Workbooks(TiteldsRNA).Activate
47.     Sheets("Auswertung_VBA").Select
48.     ActiveSheet.Paste 'einkopieren von ImageNR, ObjectNr, Bildname, Area, Children in
Auswertung-VBA, intentsity dsrna, rot, gün
49.     Range("J1").Select
50.     ActiveCell.FormulaR1C1 = "Key"
51.     reihen = Cells(Rows.Count, 1).End(xlUp).Row
52.     Range("J2").Select
53.     ActiveCell.FormulaR1C1 = "=CONCATENATE(RC[-9], ""A"", RC[-8])"
54.     Selection.AutoFill Destination:=Range("J2", Cells(reihen, 10)),
Type:=xlFillDefault
55.     Sheets("dsRNA").Select
56.     reihentabds = Cells(Rows.Count, 1).End(xlUp).Row
57.     Range("G1").Select
58.     ActiveCell.FormulaR1C1 = "Key"
59.     Range("G2").Select
60.     ActiveCell.FormulaR1C1 = "=CONCATENATE(RC[-6], ""A"", RC[-1])"
61.     Selection.AutoFill Destination:=Range("G2", Cells(reihentabds, 7)),
Type:=xlFillDefault
62.     Range("H1").Select
63.     ActiveCell.FormulaR1C1 = "Intensity_MeanIntensity_dsRNA_adj"
64.     Range("H2").Select
65.     ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUBSTITUTE(RC[-3], "".""", """"")*1000"
66.     Selection.AutoFill Destination:=Range("H2", Cells(reihentabds, 8)),
Type:=xlFillDefault

```

```

67. Range("I1").Select
68. ActiveCell.FormulaR1C1 = "absolute_intensity-dsRNA"
69. Range("I2").Select
70. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[-1]*RC[-5]"
71. Selection.AutoFill Destination:=Range("I2", Cells(reihentabds, 9)),
Type:=xlFillDefault
72. Sheets("Rot").Select
73. reihentabrot = Cells(Rows.Count, 1).End(xlUp).Row
74. Range("H1").Select
75. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Key"
76. Range("H2").Select
77. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=CONCATENATE(RC[-7], ""A"", RC[-1])"
78. Selection.AutoFill Destination:=Range("H2", Cells(reihentabrot, 8)),
Type:=xlFillDefault
79. Range("I1").Select
80. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Intensity_MeanIntensity_Grun_adj"
81. Range("I2").Select
82. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUBSTITUTE(RC[-4], "".""", "", "")"
83. Selection.AutoFill Destination:=Range("I2", Cells(reihentabrot, 9)),
Type:=xlFillDefault
84. Columns("I").Copy
85. Columns("I").PasteSpecial Paste:=xlPasteValues
86. Application.CutCopyMode = False
87. Range("J1").Select
88. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Intensity_MeanIntensity_Rot_adj"
89. Range("J2").Select
90. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUBSTITUTE(RC[-4], "".""", "", "")"
91. Selection.AutoFill Destination:=Range("J2", Cells(reihentabrot, 10)),
Type:=xlFillDefault
92. Columns("J").Copy
93. Columns("J").PasteSpecial Paste:=xlPasteValues
94. Application.CutCopyMode = False
95. Range("K1").Select
96. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Ratio mCherry/GFP"
97. Range("K2").Select
98. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[-1]/RC[-2]"
99. Selection.AutoFill Destination:=Range("K2", Cells(reihentabrot, 11)),
Type:=xlFillDefault
100. Columns("K").Copy
101. Columns("K").PasteSpecial Paste:=xlPasteValues
102. Application.CutCopyMode = False
103. Range("L1").Select
104. ActiveCell.FormulaR1C1 = ">0,37?"
105. Range("L2").Select
106. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=IF(RC[-1]>0.37,1,0)"
107. Selection.AutoFill Destination:=Range("L2", Cells(reihentabrot, 12)),
Type:=xlFillDefault
108. Columns("L").Copy
109. Columns("L").PasteSpecial Paste:=xlPasteValues
110. Application.CutCopyMode = False
111. Sheets("Auswertung_VBA").Select
112. reihencell = Cells(Rows.Count, 1).End(xlUp).Row
113. Range("K1").Select
114. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Sum dsRNA area"
115. Range("K2").Select
116. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUMIF(dsRNA!R2C7:R" & reihentabds & "C7,RC[-1],dsRNA!R2C4:R" & reihentabds & "C4)"
117. Selection.AutoFill Destination:=Range("K2", Cells(reihencell, 11)),
Type:=xlFillDefault
118. Range("L1").Select
119. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Intensity_MeanIntensity_GRUN_adj"
120. Range("L2").Select
121. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUBSTITUTE(RC[-5], "".""", "", "")"
122. Selection.AutoFill Destination:=Range("L2", Cells(reihencell, 12)),
Type:=xlFillDefault
123. Range("M1").Select
124. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Intensity_MeanIntensity_Rot_adj"
125. Range("M2").Select
126. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUBSTITUTE(RC[-5], "".""", "", "")"
127. Selection.AutoFill Destination:=Range("M2", Cells(reihencell, 13)),
Type:=xlFillDefault
128. Range("N1").Select
129. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Sum absolute dsRNA intensity"
130. Range("N2").Select

```

```

131. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUMIF(dsRNA!R2C7:R" & reihentabds & "C7,RC[-
132. Selection.AutoFill Destination:=Range("N2", Cells(reihencell, 14)),
Type:=xlFillDefault
133. Range("O1").Select
134. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mean dsRNA intensity in spots per cell"
135. Range("O2").Select
136. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[-1]/RC[-11]"
137. Selection.AutoFill Destination:=Range("O2", Cells(reihencell, 15)),
Type:=xlFillDefault
138. Range("P1").Select
139. ActiveCell.FormulaR1C1 = "cell mCherry/GFP ratio"
140. Range("P2").Select
141. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[-3]/RC[-4]"
142. Selection.AutoFill Destination:=Range("P2", Cells(reihencell, 16)),
Type:=xlFillDefault
143. Range("Q1").Select
144. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Autolysosomen spots"
145. Range("Q2").Select
146. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUMIF(Rot!R2C8:R" & reihentabrot & "C8,RC[-
147. Selection.AutoFill Destination:=Range("Q2", Cells(reihencell, 17)),
Type:=xlFillDefault
148. Range("R1").Select
149. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Autophagosomen spots"
150. Range("R2").Select
151. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[1]-RC[-1]"
152. Selection.AutoFill Destination:=Range("R2", Cells(reihencell, 18)),
Type:=xlFillDefault
153. Range("S1").Select
154. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Anzahl aller Spots"
155. Range("S2").Select
156. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=COUNTIF(Rot!R2C8:R" & reihentabrot & "C8,RC[-9])"
157. Selection.AutoFill Destination:=Range("S2", Cells(reihencell, 19)),
Type:=xlFillDefault
158. Range("T1").Select
159. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Autolysosomen % Anteil"
160. Range("T2").Select
161. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[-3]/RC[-1]*100"
162. Selection.AutoFill Destination:=Range("T2", Cells(reihencell, 20)),
Type:=xlFillDefault
163. 'Mittelwert berechnung für Behandlungen
164. Sheets.Add After:=ActiveSheet
165. Sheets("Tabelle4").Name = "Mittelwerte_Rot_Spots"
166. Range("A1").Select
167. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Versuch"
168. Range("B1").Select
169. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mittelwert Autolysosomen"
170. Range("C1").Select
171. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mittelwert Autophagosomen"
172. Range("D1").Select
173. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mittelwert aller Spots"
174. Range("B2").Select
175. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=AVERAGEIF(Auswertung_VBA!R2C3:R" & reihencell &
"C3,RC[-1]&"",Auswertung_VBA!R2C17:R" & reihencell & "C17)"
176. Range("C2").Select
177. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=AVERAGEIF(Auswertung_VBA!R2C3:R" & reihencell &
"C3,RC[-2]&"",Auswertung_VBA!R2C18:R" & reihencell & "C18)"
178. Range("D2").Select
179. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=AVERAGEIF(Auswertung_VBA!R2C3:R" & reihencell &
"C3,RC[-3]&"",Auswertung_VBA!R2C19:R" & reihencell & "C19)"
180. Range("E1").Select
181. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Verhältnis Autolysosomen/Autoph."
182. Range("E2").Select
183. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[-3]/RC[-2]"
184. End Sub

```

Code Anhang 1 VBA-Makro zur Auswertung der Kombination der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse der dsRNA und dem Autophagie-Reporter

Die nach der Cellprofiler-Auswertung generierten CSV-Dateien für die Zellen, dsRNA-Spots und Vesikel wurden in Excel zusammengeführt. Es erfolgte die Bestimmung von Autophagosomen und Autolysosomen anhand eines Schwellenwertes für die Intensität von mCherry/eGFP. Die Fläche, Intensität und Anzahl der Zellen, dsRNA und Vesikel wurde vermessen.


```

1. Range("K1").Select
2. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Intensity_MeanIntensity_PIP_adj_allcell"
3. Range("K2").Select
4. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUBSTITUTE(RC[-5],\"\".\"\", \"\", \"\")*1000"
5. Selection.AutoFill Destination:=Range("K2", Cells(reihencell, 11)),
   Type:=xlFillDefault
6. Range("L1").Select
7. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Sum absolute PIP2 intensity_spots"
8. Range("L2").Select
9. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=SUMIF(Werte_dsRNA!R2C8:R" & reihentab & "C8,RC[-
4],Werte_dsRNA!R2C11:R" & reihentab & "C11)"
10. Selection.AutoFill Destination:=Range("L2", Cells(reihencell, 12)),
    Type:=xlFillDefault
11. Range("M1").Select
12. ActiveCell.FormulaR1C1 = "Mean PIP2 intensity in spotsarea per cell"
13. Range("M2").Select
14. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=IF(RC[-4]=0,0,RC[-1]/RC[-4])"
15. Selection.AutoFill Destination:=Range("M2", Cells(reihencell, 13)),
    Type:=xlFillDefault
16. Range("P1").Select
17. ActiveCell.FormulaR1C1 = "PIP2 absolute intensity outer area"
18. Range("Q1").Select
19. ActiveCell.FormulaR1C1 = "PIP2 mean intensity outer area"
20. Sheets("Werte_Shrunkencells").Select
21. Columns("H").Copy
22. Sheets("Auswertung_VBA").Select
23. Columns("N").PasteSpecial Paste:=xlPasteValues
24. Application.CutCopyMode = False
25. Range("N1").Select
26. ActiveCell.FormulaR1C1 = "PIP2 absolute intensity inner area"
27. Sheets("Werte_Shrunkencells").Select
28. Columns("G").Copy
29. Sheets("Auswertung_VBA").Select
30. Columns("O").PasteSpecial Paste:=xlPasteValues
31. Application.CutCopyMode = False
32. Range("O1").Select
33. ActiveCell.FormulaR1C1 = "PIP2 mean intensity inner area"
34. Range("P2").Select
35. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=(RC[-5]*RC[-12])-RC[-2]"
36. Selection.AutoFill Destination:=Range("P2", Cells(reihencell, 16)),
    Type:=xlFillDefault
37. Range("Q2").Select
38. ActiveCell.FormulaR1C1 = "=RC[-1]/(RC[-13]-Werte_Shrunkencells!RC4)"
39. Selection.AutoFill Destination:=Range("Q2", Cells(reihencell, 17)),
    Type:=xlFillDefault
40. Columns("Q").Copy
41. Columns("Q").PasteSpecial Paste:=xlPasteValues
42. Application.CutCopyMode = False

```

Code Anhang 2 Ergänzung des Code Anhang 1 zur Messung der Lokalisation von $PI(4,5)P_2$
 Code-snippet, welcher in das VBA-Makro Code Anhang 1 eingefügt wurde zur zusätzlichen
 Messung von $PI(4,5)P_2$ in den dsRNA-Spots, dem äußeren und inneren Bereich der Zelle nach
 dem Import der CSV-Datei „Shrunkencells“.

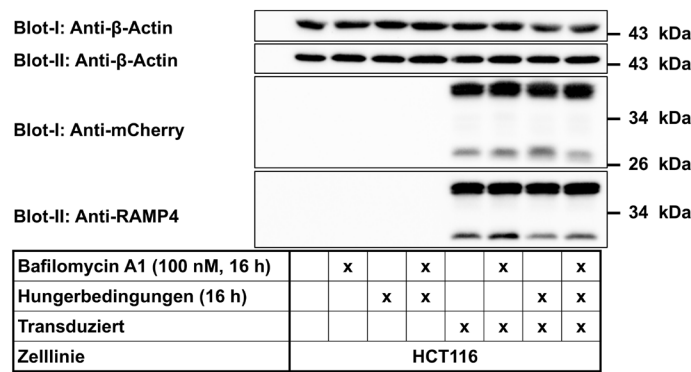


Abb. Anhang 1 Western-Blot-Analyse des Degradationsbasierten ER-Phagie-Reporters in HCT116 Zellen

HCT116 Zellen wurden mit pLenti-X1-hygro-mCherry-RAMP4 transduziert und mit Bafilomycin A1 (100 nM, 16 h) und/oder Hungerbedingungen (16 h) behandelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte mittels Western-Blot.

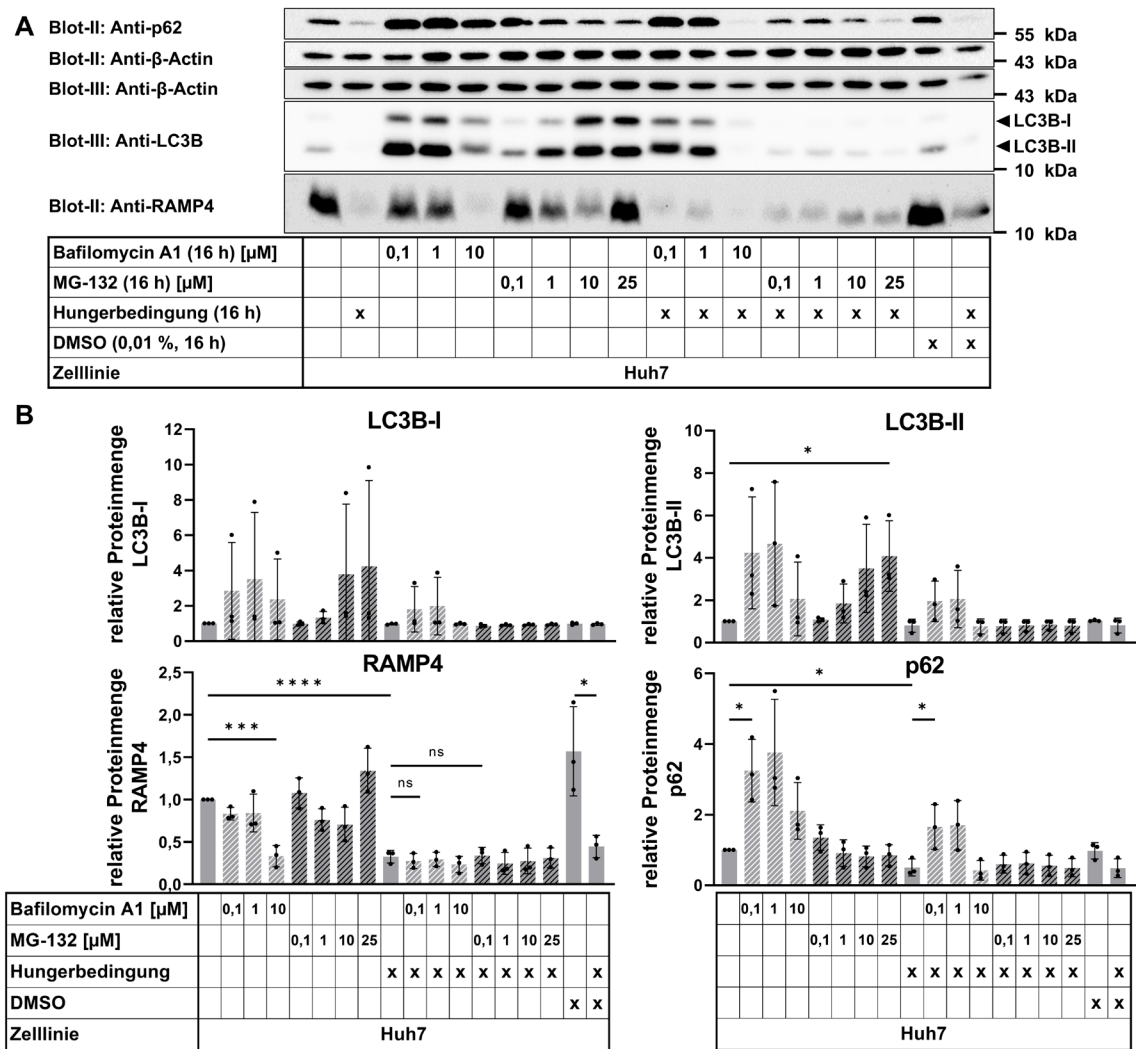


Abb. Anhang 2 Autophagie- und Proteasom-unabhängiger Abbau von RAMP4 nach Hungern

(A) Parentale Huh7 Zellen wurde mit Bafilomycin A1 (0,1; 1; 10 μM, 16 h), MG-132 (0,1; 1; 10, 25 μM, 16 h), DMSO (0,01 %, 16 h) und/oder HBSS (16 h) behandelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteindetektion erfolgte durch die Western-Blot-Analyse. (B) Die relative

Quantifizierung von drei biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf die unbehandelte Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test ($ns\ p > 0,05$; $*\ p \leq 0,05$; $***\ p \leq 0,001$; $****\ p \leq 0,0001$).

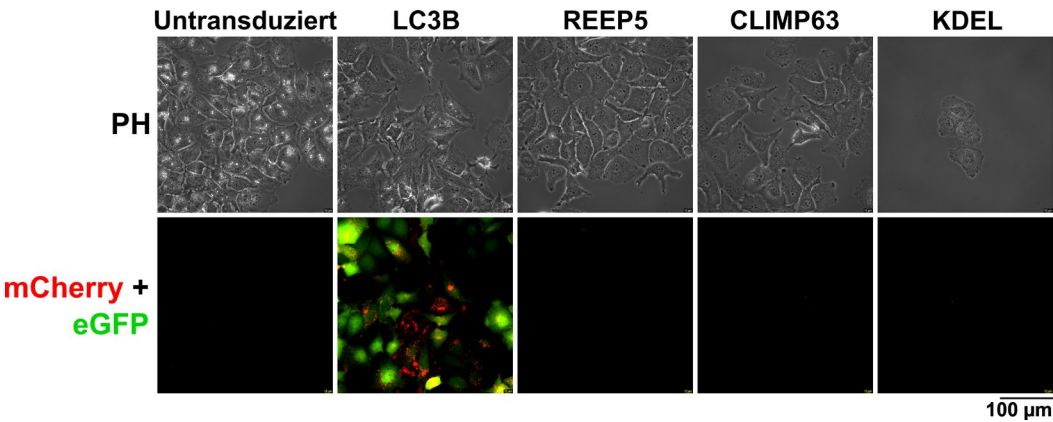


Abb. Anhang 3 Transduktion Tetracyclin-abhängiger ER-Phagie-Reporter in Huh7 Zellen
Huh7 Zellen wurden mit den ER-Phagie-Reportern TetOn-REEP5-mCherry-eGFP (REEP5), TetOn-CLIMP63-mCherry-eGFP (CLIMP63), pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL (KDEL) und mit dem Autophagie-Reporter pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B (LC3B) transduziert. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit HBSS gewaschen und es erfolgte ein Live-Cell-Imaging am Fluoreszenzmikroskop. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 100 μ m. Vergrößerung: 400-fach.

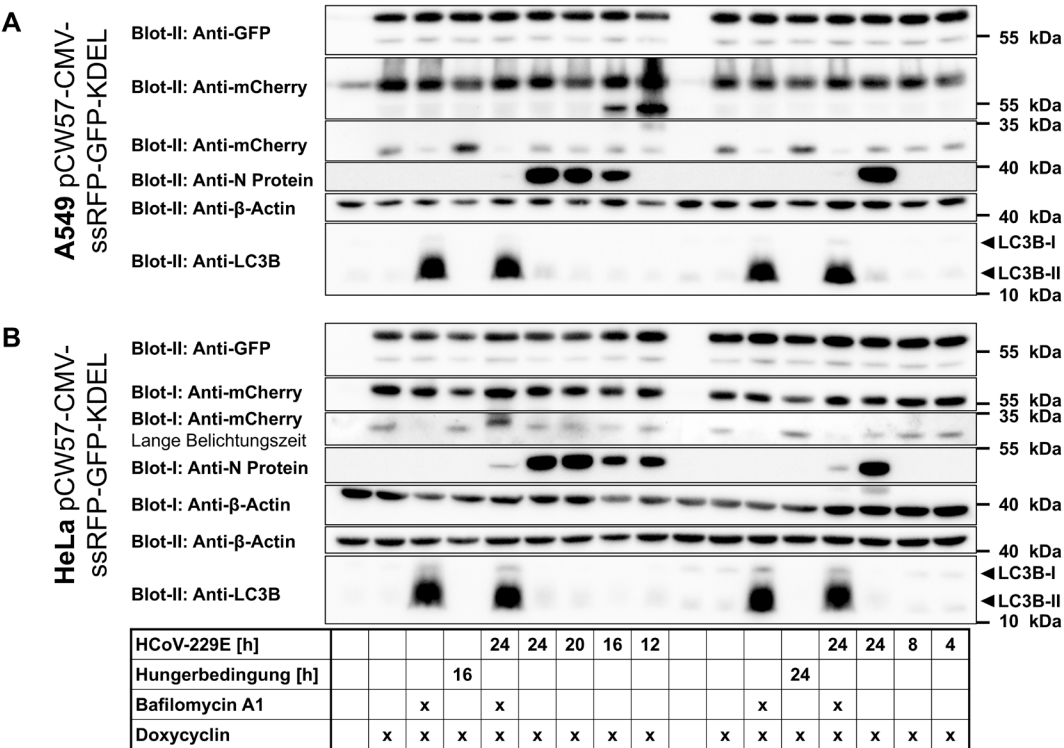


Abb. Anhang 4 Western-Blot-Analyse eines Zeitverlaufs der Infektion mit HCoV-229E von ER-Phagie-Reporterzellen

Repräsentative Western-Blots zur Proteindetektion für die Infektion mit HCoV-229E (MOI 1; 4, 8, 12, 16, 20, 24 h), Behandlung mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h) oder Hungern (24 h) nach Aktivierung durch Doxycyclin (4 μ g/ml) von lentiviral mit pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL transduzierten HeLa oder A549 Zellen.

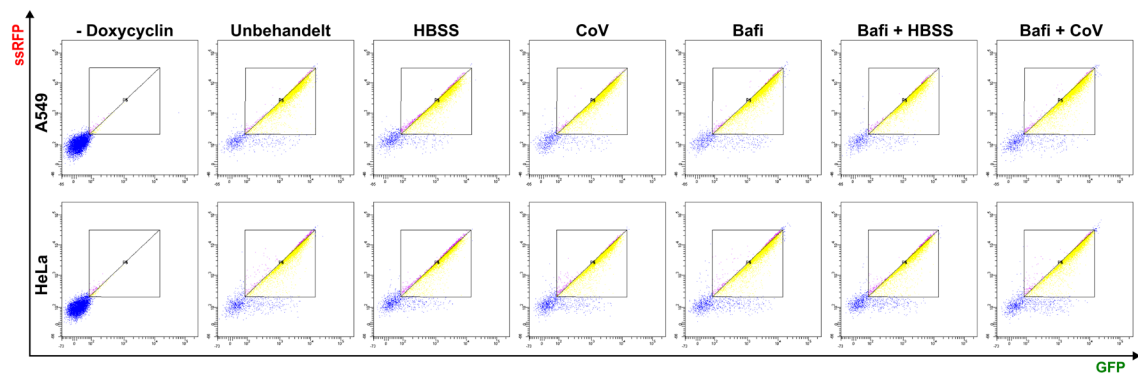


Abb. Anhang 5 Dotplots der ER-Phagie-Reporterzellen nach Infektion mit HCoV-229E
Mit pCW57-CMV-ssRFP-GFP-KDEL transduzierte A549 und HeLa Zellen wurden mit 4 µg/ml Doxycyclin behandelt. Es erfolgte die Zugabe von Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), HBSS (16 h) und Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h). Pro Behandlung wurden 10.000 Zellen am Durchflusszytometer BD LSRFortessa vermessen. Im Dotplot wurden die lila dargestellten Zellen gezählt, welche durch ihre ER-phagische Aktivität eine Rotverschiebung demonstrierten.

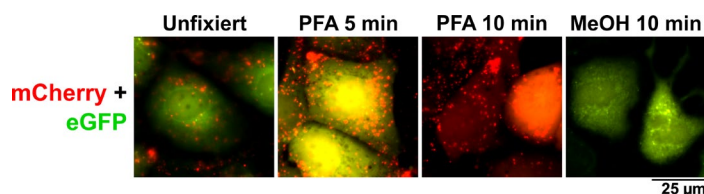


Abb. Anhang 6 Fixierungstest des Autophagie-Reporters mit PFA und Methanol
Huh7 Zellen wurden 24 h nach Aussaat in HBSS gewaschen und in diesem belassen oder fixiert. Die PFA-Fixierung erfolgte für 5 min oder 10 min bei Raumtemperatur mit einer 4 % Lösung (in PBS). Zur Methanol-Fixierung wurde bei -20 °C gelagertes Methanol auf die Zellen gegeben und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen und in diesem durch eine Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Es sind repräsentative Bilder aus einem biologischen Replikat dargestellt. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach.

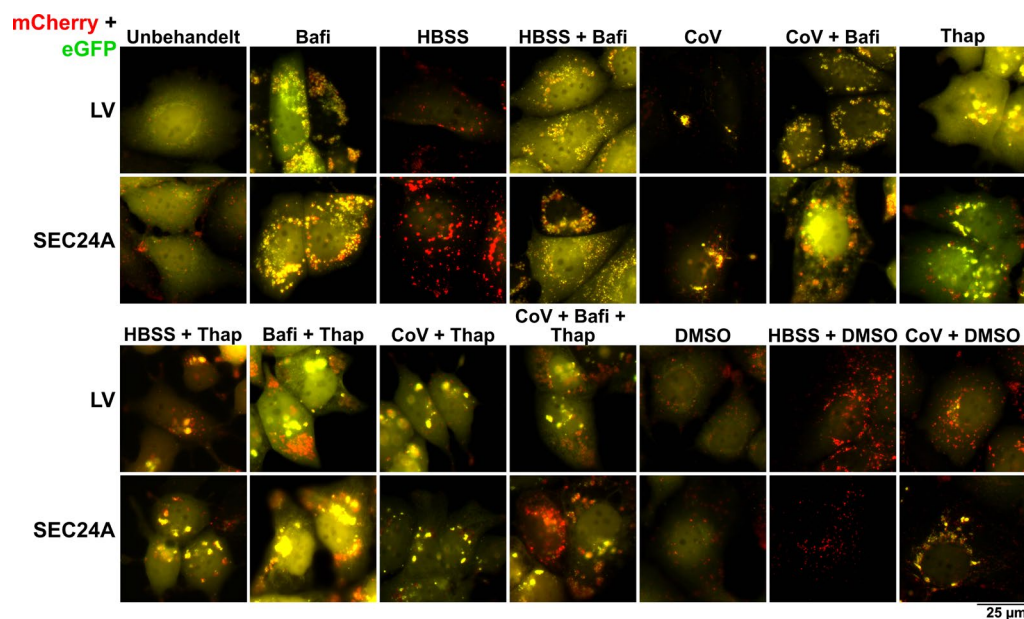


Abb. Anhang 7 Fluoreszenzmikroskopie von SEC24A knockout-Zellen mit dem Autophagie-Reporter

Huh7 Leervektor(LV)- oder SEC24A knockout-Zellen wurden lentiviral mit dem Autophagie-Reporter pCDH-EF1a-mCherry-eGFP-LC3B transduziert. Es erfolgte die Behandlung/Infektion

mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h), DMSO (0,01 %, 24 h), Thapsigargin (1 μ M, 24 h) Hungerbedingungen (16 h) und/oder HCoV-229E (MOI 1, 24 h). Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 μ m. Vergrößerung: 400-fach.

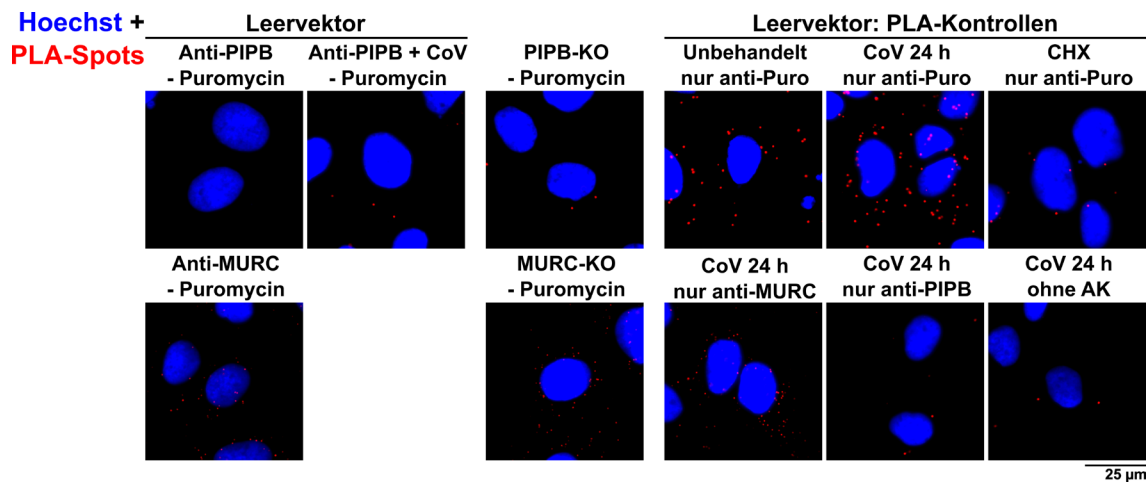


Abb. Anhang 8 Kontrollbedingungen für die Durchführung des Puro-PLA

Huh7 Zellen, welche mit dem Leervektor LentiCRISPR-v2 oder einem knockout von PIP4K2B (PIPB-KO) oder MURC (MURC-KO) transduziert wurden, wurden mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 12/24 h) oder Cycloheximid (10 μ g/ml, 1 h) behandelt. Es erfolgte die Puromycin-Markierung (3 μ M) für 30 min. Der PLA wurde mit Primärantikörpern gerichtet gegen Puromycin (anti-Puro) und gegen PIP4K2B (anti-PIPB) oder MURC (anti-MURC) durchgeführt. Dargestellt sind die Kontrollbedingungen eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 μ m. Vergrößerung: 400-fach.

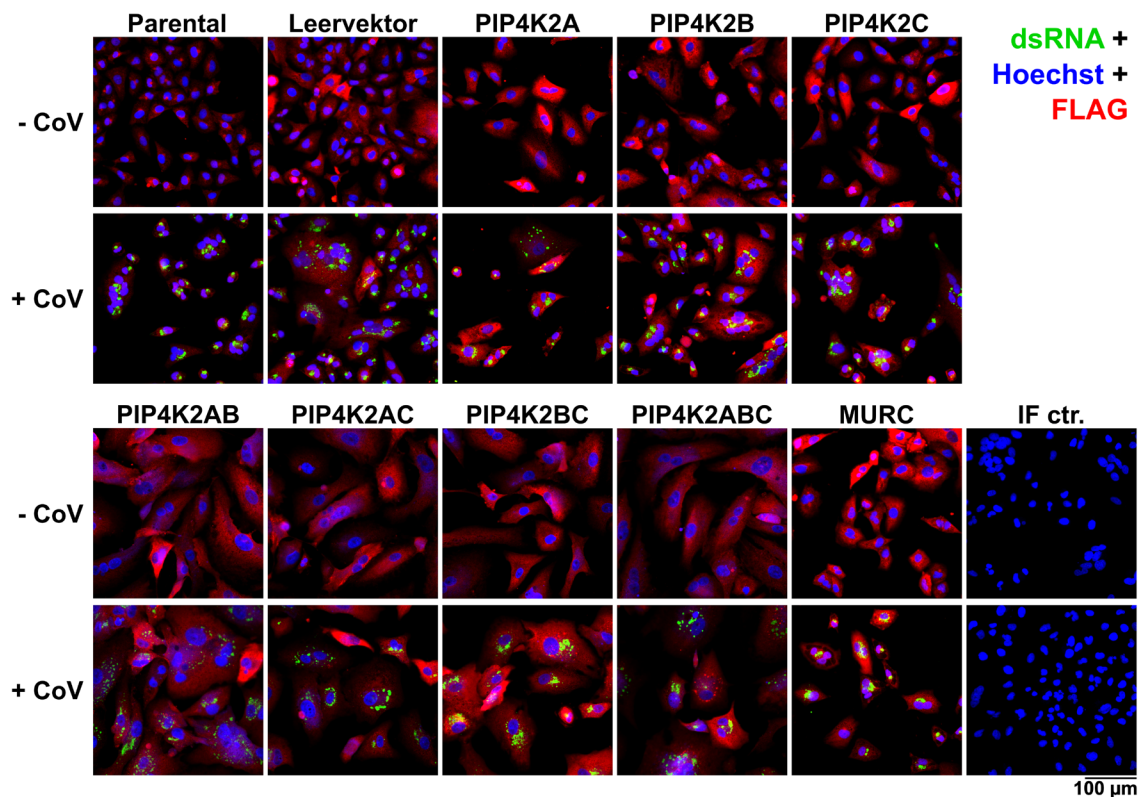


Abb. Anhang 9 Visualisierung der Infektion von PIP4K2 und MURC knockout-Zellen

Lentiviral mit dem Leervektor LentiCRISPR-v2 oder dem klonierten Vektor, mit sgRNAs gegen die Isoformen von PIP4K2 oder MURC, transduzierte A549⁺⁺ Zellen wurden mit HCoV-229E

infiziert (MOI 1, 24 h). Es erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz mit Primärantikörpern gerichtet gegen dsRNA (SCICONS/Nordic-Mubio, #10010200) und FLAG sowie den Sekundärantikörpern Cy3-gekoppelte anti rabbit IgG und Dylight488-gekoppelte anti mouse IgG. Dargestellt sind repräsentative Bilder infizierter Zellen eines biologischen Replikates. Maßstab: 100 µm. Vergrößerung: 400-fach

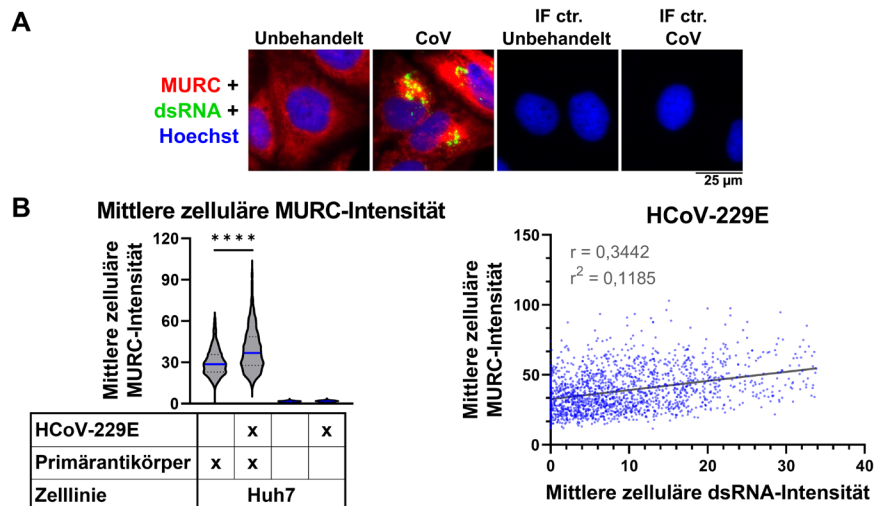


Abb. Anhang 10 HCoV-229E-induzierte Expression von MURC in Huh7 Zellen

(A) Huh7 Zellen wurden mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 24 h) und es erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz mit Primärantikörpern gegen MURC und dsRNA (SCICONS/Nordic-Mubio, #10010200). Als Sekundärantikörper diente Cy3-gekoppelte anti rabbit IgG und Dylight488-gekoppelte anti mouse IgG. Für die IF-Kontrollen entfiel die Inkubation mit den Primärantikörpern. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach. (B) Gezeigt ist die Quantifizierung des mittleren zellulären MURC- und dsRNA-Signals durch Cellpose, Cellprofiler und Excel der zusammengeführten Zellen von drei biologischen Replikaten (1054 bis 1806 Zellen pro Behandlung). Für das Violindiagramm wurden Ausreißer durch die ROUT-Methode ($Q = 1\%$) von Graphpad Prism entfernt. Die Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten r und des Bestimmungsmaßes r^2 erfolgte durch Graphpad Prism. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA (**** $p \leq 0,0001$).

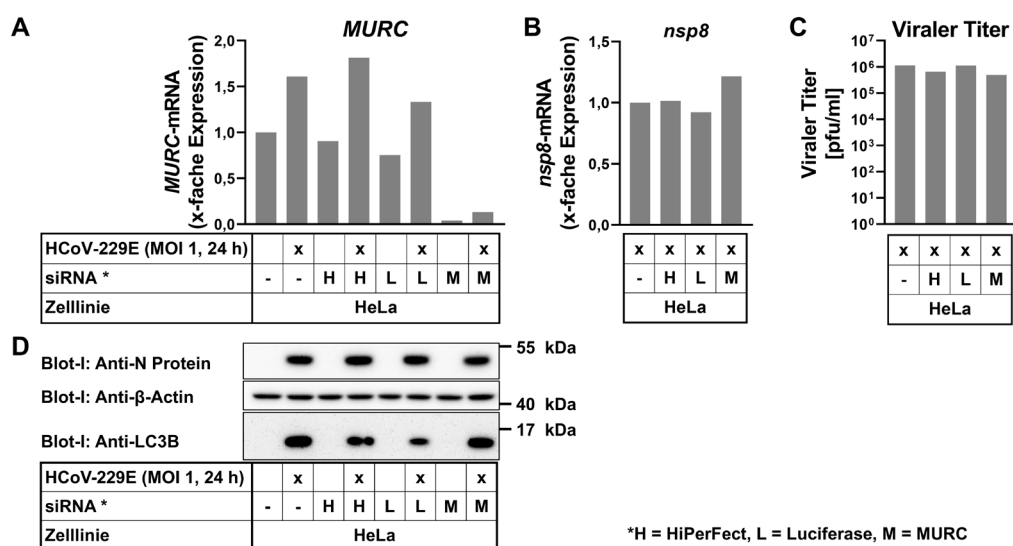


Abb. Anhang 11 HCoV-229E-induzierte und siRNA-supprimierte MURC-mRNA-Expression

(A) HeLa Zellen wurden mit HiPerFect-Transfektionsreagenz mit einer Kombination aus vier siRNAs (10 µM) gegen MURC (Qiagen #GS347273), einer siRNA gegen Luciferase (Eurofins,

Sequenz: CGUACGCGGAUACUUCGA) oder ohne siRNA nach Herstellerangaben transfiziert. Es erfolgte die Infektion mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h). Die Zellen wurden geerntet und für eine RT-qPCR und Western-Blot-Analyse aufgeteilt. Die Analyse der mRNA-Expression von MURC erfolgte mittels TaqMan-Assay. (B) Messung von nsp8 mittels eines SYBR-Green-Assay. (C) Die Überstände der infizierten Zellen wurden für die Bestimmung des viralen Titers mittels Plaque-Assay verwendet. (D) Die Zellen wurden lysiert, und es erfolgte die Proteindetektion durch eine Western-Blot-Analyse. Es wurde ein biologisches Replikate durchgeführt.

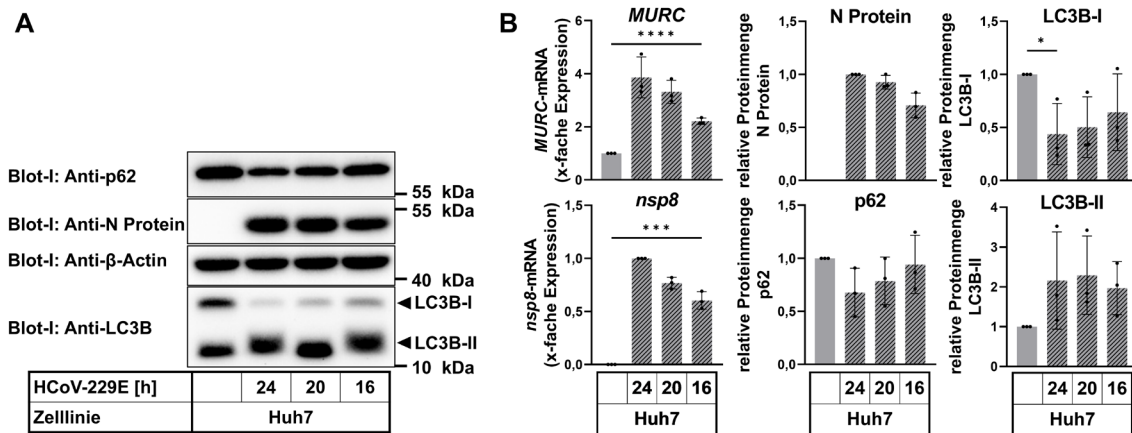


Abb. Anhang 12 Progressive HCoV-229E-induzierte mRNA-Expression von MURC

(A) Huh7 Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI 1) für 16, 20 oder 24 h infiziert. Die Zellen wurden geerntet und aufgeteilt für eine Western-Blot-Analyse sowie eine RT-qPCR. Dargestellt ist die Western-Blot-Analyse eines biologischen Replikates. (B) Die relative Quantifizierung der Proteine N Protein, LC3B-I, LC3B-II und p62 von drei biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software. Die mRNA-Expression wurde mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode quantifiziert. Die Normalisierungen erfolgten auf die unbehandelte Probe bzw. auf die 24 h infizierte Probe für die N Proteinmenge und die nsp8-mRNA-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

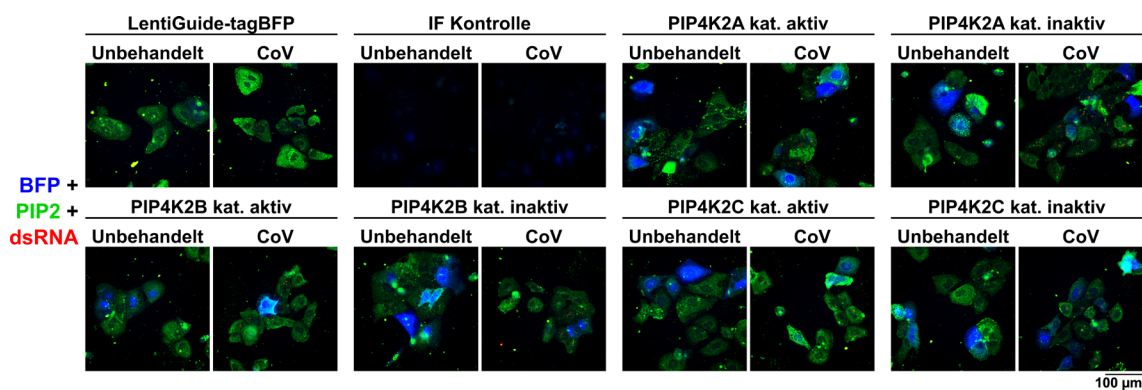


Abb. Anhang 13 Indirekte Immunfluoreszenz der Überexpression der PIP4K2-Varianten

Huh7 Zellen wurden mit den katalytisch (kat.) aktiven/inaktiven Isoformen von PIP4K2 transfiziert und mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infiziert. Die Zellen wurden fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz mit dsRNA- (Absolute Antibody, #Ab01299-23.0) und PI(4,5) P_2 -Antikörpern (PIP2) durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurden Cy3-gekoppelte anti rabbit IgG und Dylight488-gekoppelte anti mouse IgG verwendet. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 100 μ m. Vergrößerung: 400-fach.

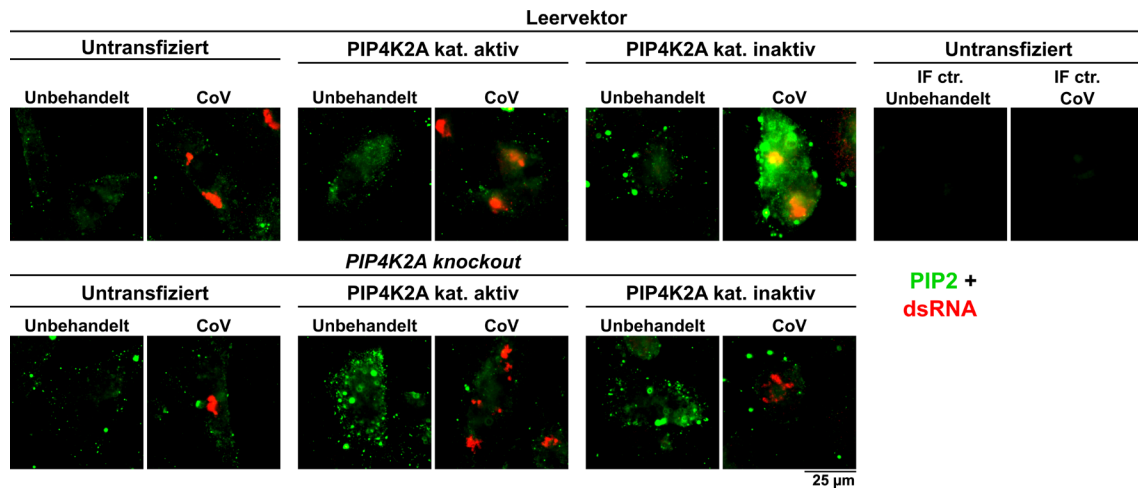


Abb. Anhang 14 Überexpression von katalytisch aktiven/inaktiven PIP4K2A in PIP4K2A-defizienten Zellen

Lentiviral mit einem PIP4K2A knockout oder dem Leervektor transduzierte A549⁺⁺ Zellen wurden mit katalytisch aktiven/inaktiven PIP4K2A transfiziert und mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infiziert. Die Zellen wurden fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz mit Primärantikörpern gegen dsRNA (Absolute Antibody #Ab01299-23.0) und PI(4,5)P₂ (PIP2) durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurden Cy3-gekoppelte anti rabbit IgG und Dylight488-gekoppelte anti mouse IgG verwendet. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach.

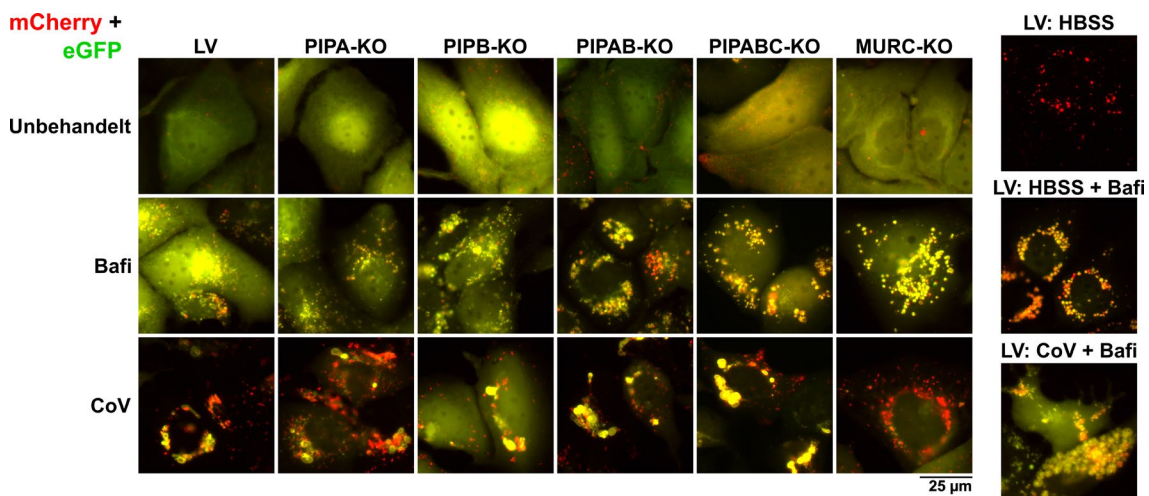


Abb. Anhang 15 Mikroskopische Erfassung der autophagischen Aktivität von MURC und PIP4K2 knockout-Zellen

Huh7 knockout-Zellen (KO) der PIP4K2-Isoformen (PIPA/B/C) oder MURC und Leervektorzellen (LV) wurden lentiviral mit dem Autophagie-Reporter pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduziert. Die Zellen wurde mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h) behandelt, gehungert (24 h) oder mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 24 h). Dargestellt ist das Live-Cell-Imaging eines repräsentativen Replikates. Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach.

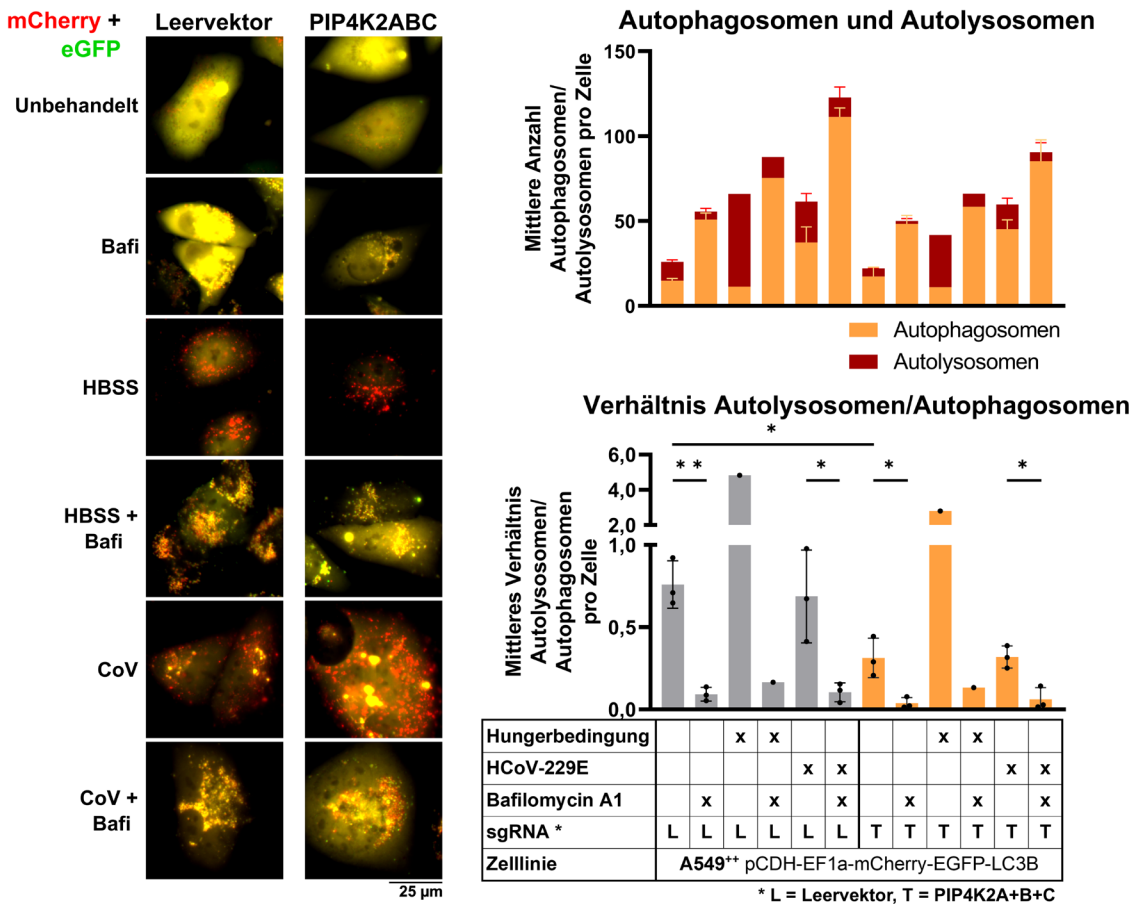
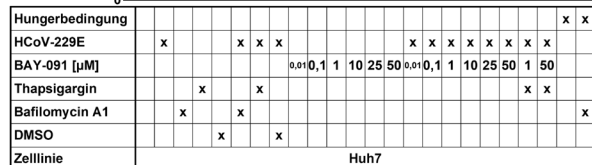


Abb. Anhang 16 Erfassung des Autophagieprozesses in PIP4K2-defizienten A549⁺⁺ Zellen
A549⁺⁺ Zellen transduziert mit einem knockout für alle PIP4K2-Isoformen oder dem Leervektor wurden erneut mit dem Autophagie-Reporter pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduziert. Die Zellen wurde mit Bafilomycin A1 (100 nM, 24 h) behandelt, gehungert (24 h) oder mit HCoV-229E infiziert (MOI 1, 24 h). Es erfolgte ein Live-Cell-Imaging für ein bis drei biologische Replikate (434 bis 2388 Zellen pro Behandlung). Maßstab: 25 µm. Vergrößerung: 400-fach. Die Anzahl von Autophagosomen und Autolysosomen pro Zelle wurde durch Cellpose, Cellprofiler und Excel ermittelt und das Verhältnis der Vesikel berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Replikate ± SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).



Die relative Quantifizierung von p62, LC3B-I, LC3B-II und PIP4K2B der in Abb. 71 A gezeigten Western-Blot-Analyse von drei bis zwölf biologischen Replikaten erfolgte durch die Bio-Rad Image Lab Software mit Normalisierung auf unbehandelte Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte

± SD. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem ungepaarten, parametrischen, zweiseitigen T-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

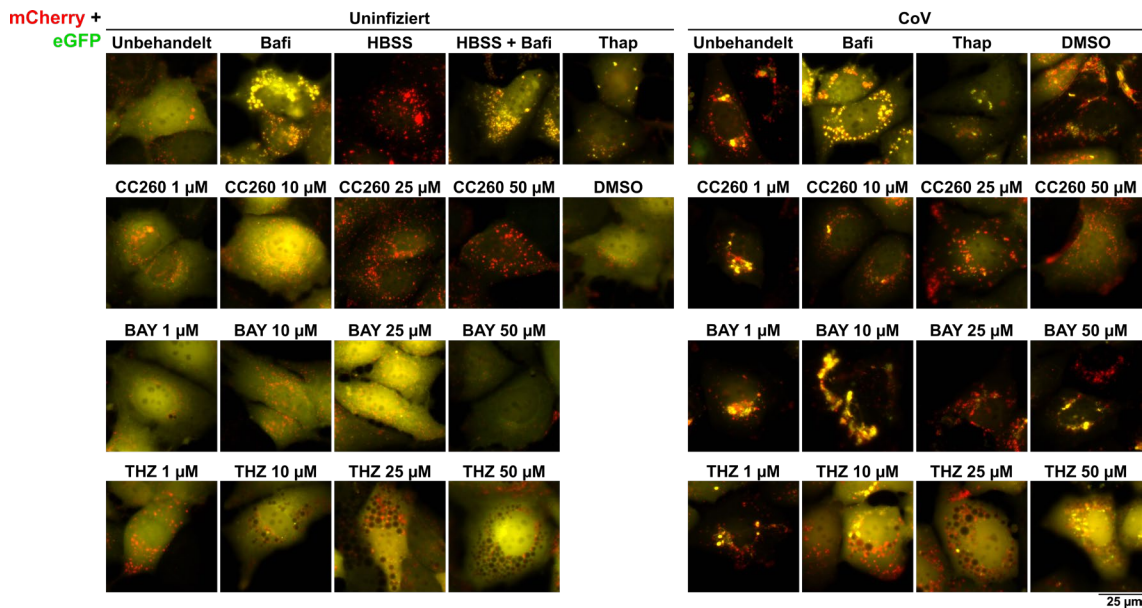


Abb. Anhang 19 Mikroskopische Erfassung des Autophagie-Reporters nach PIP4K2-Inhibitorbehandlung

Lentiviral mit dem Autophagie-Reporter pCDH-Ef1a-mCherry-eGFP-LC3B transduzierte Huh7 Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI 1, 24 h) infiziert und mit 1, 10, 25 oder 50 μM der Inhibitoren CC260, BAY-091 oder THZ-P1-2 behandelt. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines biologischen Replikates. Maßstab: 25 μm. Vergrößerung: 400-fach.

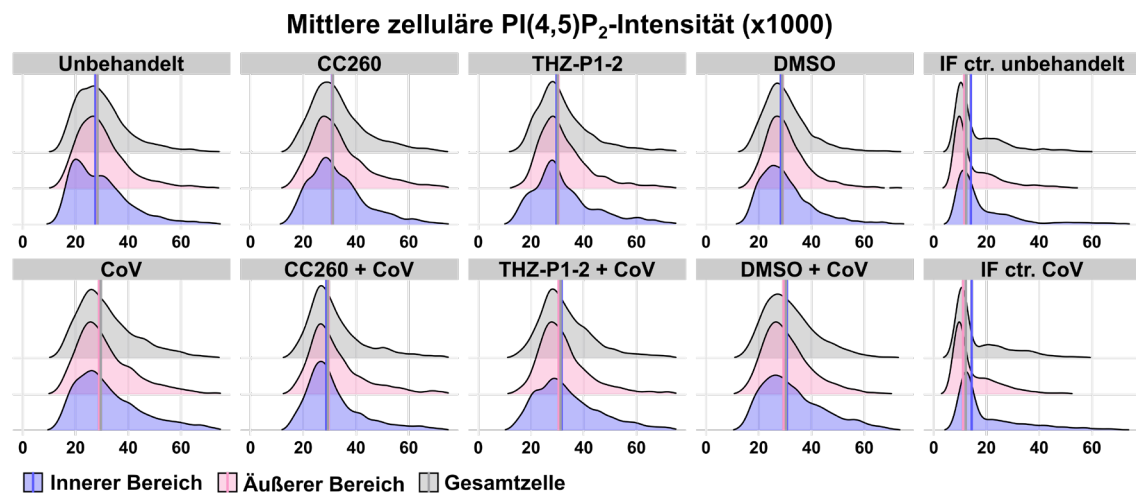


Abb. Anhang 20 Erfassung der zellulären Verteilung von PI(4,5)P₂ nach Behandlung mit CC260 und THZ-P1-2

Die Quantifizierung von PI(4,5)P₂ des in Abb. 78 gezeigten Experimentes erfolgte durch Cellpose, Cellprofiler und Excel. Dargestellt ist das PI(4,5)P₂-Signal der Gesamtzelle, dem inneren Bereich und äußeren Bereich (30 px von der Zellmembran entfernt) von drei bis fünf zusammengeführten biologischen Replikaten in einem Ridgelineplot (1406 bis 3720 Zellen pro Behandlung).

VIII. Publikationsverzeichnis

Peer-Reviewed Journals

Keine bisher veröffentlichten Artikel.

Preprint:

Shaban, M. S., Schuele Weiser, H., Weber, A., Meier-Soelch, J., **Dort, F.**, Mayr-Buro, C., Poppe, M., Karl, N., Wilhelm, J., Ziebuhr, J., Linne, U., & Kracht, M. (2025). PERK inhibition rewires translational and CMGC protein kinase networks into an antiviral state. *bioRxiv*, 2025.2010.2008.681090. <https://doi.org/10.1101/2025.10.08.681090>

Kongressbeiträge:

Dort, F. M., Heylmann, D., & Kracht, M. (2023) The role of autophagy and the related ER-phagy in coronavirus infected cells (8th German Pharm-Tox Summit 2023) [Konferenz-Posterabstract]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 396 (Suppl 1), 68 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02397-6>

Dort, F. M., Heylmann, D., & Kracht, M. (2024) The role of autophagy and the related ER-phagy in coronavirus infected cells (9th German Pharm-Tox Summit 2024) [Konferenz-Posterabstract]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 397 (Suppl 1), 69 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00210-024-02974-3>

Baumgart, S., **Dort, F.**, Mezzacapo, J., Peppler, H., Pfeiffer, S., Shaban, M. S., Krähling, V., & Kracht, M. (2025). Suppression of coronavirus replication by phosphoinositide kinase inhibitors targeting PI5P4K [Konferenz-Posterabstract]. *34th Annual Meeting of the Society for Virology, Hamburg*.

IX. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

X. Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Michael Kracht danken für die Möglichkeit zur Promotion am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie. Seine wissenschaftliche Expertise sowie seine wertvollen, konstruktiven Ratschläge leisteten einen maßgeblichen Beitrag zur Versuchsplanung, Analyse der Daten und Interpretation der Ergebnisse sowie zur Verfassung dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich der FACS-Facility der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Susanne Herold danken für die Unterstützung und den Zugang zu den Durchflusszytometern, welche einen wichtigen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Zudem gilt mein Dank allen Mitarbeitern des RBIs für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie die außerordentliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung meiner Experimente.

Insbesondere danke ich Dr. Daniel Heylmann der mit mir lange Stunden am Durchflusszytometer verbracht hat.

Dr. Christin Mayr-Buro und Hendrik Schüle Weiser möchte ich danken für die ausführliche Einarbeitung in alle virologischen Methoden.

Außerdem danke ich Dr. Johanna Meier-Sölch für die Hilfe bei der Optimierung einer Vielzahl an Versuche.

Ganz besonders danke ich Helke Seim die ihre Promotion mit mir am RBI begann und thematisch sowie methodisch eng mit mir zusammengearbeitet hat. Ihre offene, freundliche und stets positive Art haben mir viel Freude bereitet.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Verlobten danken. Eure stetige Liebe und emotionale Unterstützung, auch in schweren Zeiten, haben mir Kraft gegeben diese Arbeit anzufertigen.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.