

Die Rolle von Ceramiden und assoziierten Faktoren in der Bildung von Coronavirus- induzierten replikativen Organellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs 08 - Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Florian Salisch
Master of Science

Gießen, 2025

Angefertigt am Institut für Medizinische Virologie des Fachbereichs 11 (Medizin) der
Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. John Ziebuhr

- 1. Gutachter** Prof. Dr. Kai Thormann
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Fachbereich 08,
Justus-Liebig-Universität Gießen
- 2. Gutachter** Prof. Dr. John Ziebuhr
Institut für Medizinische Virologie, Fachbereich 11, Justus-Liebig-
Universität Gießen

Abstract

RNA viruses have evolved diverse strategies to re-program and exploit host cellular functions and molecules, including cellular lipids, to ensure efficient virus replication and production of infectious virus progeny. A conserved feature of plus-strand RNA virus replication is the formation of membranous microenvironments (replicative organelles, ROs) in virus-infected cells. RO formation is known to be initiated by virus-encoded membrane-associated nonstructural proteins and involves extensive remodeling of host cell membranes. This process is thought to involve cellular enzymes responsible for synthesizing and modifying specific lipids.

In this study, I investigated the potential roles of specific cellular sphingolipids and enzymes acting on sphingolipids in the replication of different coronaviruses. The data revealed that, following infection, cellular ceramide species increase significantly, whereas sphingomyelin levels decreased, indicating an involvement of sphingomyelinases that convert sphingomyelin to ceramide. To verify this, I targeted the cellular sphingomyelinases using pharmacological and genetic approaches. I could provide evidence that neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) plays an essential role in an early phase (but not entry) of coronavirus replication in Huh-7-ACE2 cells. Furthermore, I was able to demonstrate a colocalization of neutral sphingomyelinase 2 and ceramide, but not sphingomyelin, with both infection-induced and genetically induced ROs. Ceramides and coronaviral ROs were found to colocalize in different cell systems used in this study. However, in another set of experiments, I also obtained data to suggest that the extent of specific sphingolipid deregulations and the role of nSMase2 in coronavirus infections may vary among different infection systems, depending on the cell type used.

Taken together, this study strongly suggests that ceramides serve as crucial lipid building blocks in the formation of coronaviral ROs in different cell types, suggesting that inhibition of cellular ceramide production may represent a potential antiviral strategy against coronavirus infections. However, the mechanisms of ceramide generation or recruitment to specific intracellular sites seem to vary depending on the cell type used and, possibly, the baseline ceramide levels in these cell types. Further investigation is required to clarify these variations and their biological implications.

Zusammenfassung

Zusammenfassung

RNA-Viren haben verschiedene Strategien entwickelt, um wirtszelluläre Funktionen und Moleküle, einschließlich zellulärer Lipide, umzuprogrammieren und für ihre effiziente Replikation zu nutzen. Ein konserviertes Merkmal positivsträngiger RNA-Viren ist die Bildung von membranösen Mikroumgebungen (replikative Organelle, ROs) in infizierten Zellen. Es wurde gezeigt, dass die Bildung von ROs durch virale membranassoziierte Nichtstrukturproteine initiiert wird und eine massive Umstrukturierung von Wirtszellmembranen zur Folge hat. Vermutlich sind an diesem Prozess zahlreiche zelluläre Enzyme beteiligt, die spezifische zelluläre Lipide synthetisieren und modifizieren.

In dieser Arbeit habe ich die mögliche Rolle spezifischer zellulärer Sphingolipide und einiger an ihrem Metabolismus beteiligter Enzyme im Rahmen der Replikation verschiedener Coronaviren untersucht. Nach der Infektion erfolgte ein Anstieg der zellulären Ceramid-Spiegel, während die Sphingomyelin-Konzentrationen abnahmen. Dies deutete auf eine Beteiligung von Sphingomyelinasen hin, die die Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid katalysieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, habe ich die Rolle von zellulären Sphingomyelinasen in der coronaviralen Replikation mittels pharmakologischer und genetischer Ansätze untersucht. Ich konnte nachweisen, dass die neutrale Sphingomyelinase 2 (nSMase2) eine wesentliche Rolle in einer frühen Phase der Coronavirus-Replikation (aber nicht beim Viruseintritt) in Huh-7-ACE2-Zellen spielt. Darüber hinaus konnte ich eine Kollokalisierung der neutralen Sphingomyelinase 2 und von Ceramiden, jedoch nicht von Sphingomyelin, mit infektionsinduzierten und gentechnisch induzierten ROs nachweisen. Ich konnte außerdem bestätigen, dass eine Kollokalisierung von Ceramiden mit coronaviralen ROs in verschiedenen Zellsystemen erfolgt. Allerdings konnte ich auch eine Zelltypabhängigkeit hinsichtlich der in anderen Zelltypen beobachteten Sphingolipid-Deregulationen und der funktionellen Rolle von nSMase2 bei Coronavirus-Infektionen feststellen.

Insgesamt unterstützen diese Daten die Schlussfolgerung, dass Ceramide in verschiedenen Zelltypen als wichtige Lipidbausteine bei der Bildung von coronaviralen ROs dienen. Eine Hemmung der zellulären Ceramid-Produktion könnte daher als mögliche antivirale Strategie bei der Behandlung von Coronavirus-Infektionen dienen. Die Mechanismen der Ceramid-Erzeugung oder -Rekrutierung scheinen jedoch in Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp und möglicherweise auch der Ceramid-

Abstract

Ausgangskonzentration in diesen Zelltypen zu variieren. Weitere Studien sind daher erforderlich, um diese Unterschiede umfassend aufzuklären und ihre möglichen biologischen Implikationen zu verstehen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Coronaviren.....	1
1.1.1. Allgemeines	1
1.1.2. Aufbau des Virions und des Genoms	2
1.1.3. Der Replikationszyklus von Coronaviren	4
1.2. Virus-induzierte replikative Organelle.....	6
1.2.1. Coronavirus-induzierte replikative Organelle	8
1.2.2. Rolle von zellulären Proteinen in der Bildung von replikativen Organellen.....	11
1.2.3. Rolle von zellulären Lipiden in der Bildung von replikativen Organellen.....	12
1.3. Sphingolipide.....	14
1.3.1. Allgemeines	14
1.3.2. Sphingolipid-Metabolismus.....	15
1.3.3. Sphingomyelinasen	16
1.3.3.1. Saure Sphingomyelinase	17
1.3.3.2. Neutrale Sphingomyelinasen	17
1.3.4. Sphingolipide in viralen Infektionen	19
1.4. Zielsetzung.....	21
2. Materialien und Methoden	22
2.1 Zellkultur.....	22
2.1.1 Zelllinien	22
2.1.2 Verwendete Medien und Zusätze	23
2.1.3 Auftauen von Zelllinien	23
2.1.4 Lagerung von Zellen im Stickstoff.....	23
2.1.5 Enzyminhibitoren	24
2.1.6 Bestimmung der zytotoxischen Konzentration 50 (CC ₅₀).....	24
2.2 Virusinfektionen.....	25
2.2.1 Auflistung der verwendeten Viren	25
2.2.2 Virusinfektionen	25
2.2.3 Präparation von hochtitrigen Virusstocks.....	25
2.2.4 Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay.....	26
2.2.5 Testung von Substanzen auf antivirale Effekte.....	26
2.3 DNA-Analyse.....	27
2.3.1 DNA-Konstrukte	27

Inhaltsverzeichnis

2.3.2 Mutagenese von DNA-Konstrukten	28
2.3.3 Restriktionsverdau von DNA	29
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.3.5 Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	30
2.3.6 Isolation von DNA aus Bakterien.....	31
2.3.7 Sequenzierung von Plasmiden.....	31
2.3.8 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen.....	32
2.4 RNA-Analyse	33
2.4.1 Auflistung der verwendeten small interfering RNAs (siRNAs)	33
2.4.2 Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen	34
2.4.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	34
2.5 Protein-Analyse.....	36
2.5.1 Isolation von Proteinen aus Zellen.....	36
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten.....	37
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.5.4 Western Blot.....	38
2.6 Bildgebende Verfahren	38
2.6.1 Immunfluoreszenz	38
2.7.2 Quantifizierung von fluoreszenzmarkierten Zellen.....	40
2.7.3 Konfokale <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie	40
2.7.4 Bildverarbeitung und Kolokalisationsrate.....	41
2.7.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	41
2.7 Sphingolipid-Analyse.....	42
2.7.1 Infektionen für Sphingolipid-Analyse	42
2.7.2 Transfektionen für Sphingolipid-Analyse	43
2.7.3 Sphingolipidisolation und –analyse	43
2.8 Statistik	44
3. Ergebnisse.....	45
3.1 Die Rolle von zellulären Sphingomyelinasen in der Replikation von Coronaviren.....	45
3.1.1 Sphingolipidanalyse von Coronavirus-infizierten Huh-7-ACE2-Zellen.....	45
3.1.1.1 Huh-7-ACE2-Zellen sind ein geeignetes Zellkulturmodell für die Infektion mit verschiedenen Coronaviren	45
3.1.1.2 Sphingolipidanalyse der infizierten Huh-7-ACE2 zeigt eine zeitabhängige Deregulation der Sphingolipidhomöostase	48
3.1.2 Untersuchung der Effekte von pharmakologischer und genetischer Inhibition von SMasen auf die Replikation von Coronaviren.....	51

Inhaltsverzeichnis

3.1.2.1 Pharmakologische Inhibition von SMasen zeigt unterschiedliche Abhängigkeit der coronaviralen Replikation von SMasen	51
3.1.2.2 Knockdown der zellulären SMasen vermindert die Vermehrung von MERS-CoV und SARS-CoV-2	56
3.1.2.3 Inhibition der nSMase2 beeinflusst einen Schritt in der Virusreplikation nach dem Viruseintritt, jedoch vor der Freisetzung neugebildeter Viruspartikel.	59
3.1.2.4 Der nSMase2-Inhibitor PDDC reduziert die Bildung coronaviraler ROs.	61
3.1.3 Nachweis der nSMase2 und Cer in coronaviralen ROs	64
3.1.3.1 Cer kolokalisieren mit coronaviralen ROs	64
3.1.3.2 SM kolokalisiert nicht mit coronaviralen ROs	66
3.1.3.3 Die nSMase2 kolokalisiert mit coronaviralen ROs, unabhängig von ihrer Aktivität	68
3.1.4 Sphingolipidanalyse von weiteren, biologisch relevanteren Zellkulturmodellen	72
3.1.4.1 Sphingolipidanalyse der infizierten A549- und MRC-5-Zellen deutet auf eine zelltypabhängige Deregulation der Sphingolipide hin	72
3.1.4.2. Effekte von nSMase-Inhibitoren auf die Replikation der CoV in MRC-5 und A549-Zellen	78
3.2 Ceramide – essentielle Bestandteile von coronaviralen ROs?	83
3.2.1 Etablierung eines experimentellen Systems zur Erzeugung von artifiziellen coronaviralen ROs	83
3.2.2. Sphingolipidanalyse von Huh-7-ACE2-Zellen nach Transfektion von HCoV-229E-nsp3-4-Expressionsplasmiden	88
3.2.3. Ceramide kolokalisieren mit den artifiziell gebildeten ROs	91
4. Diskussion	93
4.1 Verschiedene Coronaviren induzieren abhängig vom infizierten Zelltyp ähnliche Veränderungen des Sphingolipidhaushaltes	93
4.2. Die Rolle von zellulären Sphingomyelinasen in der Replikation von Coronaviren	95
4.2.1 Coronaviren zeigen eine unterschiedliche Abhängigkeit von verschiedenen zellulären Sphingomyelinasen	95
4.2.2 Die neutrale Sphingomyelinase 2 ist ein wichtiger Wirtszellfaktor für die Bildung von coronaviralen replikativen Organellen in Huh-7-ACE2-Zellen	97
4.2.3 Die neutrale Sphingomyelinase 2 ist kein zelltypübergreifender Wirtsfaktor der coronaviralen Replikation	99
4.4 Überexpression von HCoV-229E-nsp3-4 induziert die Bildung von RO-ähnlichen Membranveränderungen	101
4.5 Ceramide sind wesentliche Bestandteile coronaviraler ROs	103
4.5.1 Ceramide sind Bestandteile artifiziell-induzierter ROs	103

Inhaltsverzeichnis

4.5.2 Cer kolokalisiert zelltypunabhängig mit ROs.....	104
4.5.3 Mögliche Rollen von Cer in der Bildung von coronaviralen ROs	105
4.6 Zusammenfassung.....	108
4.7 Ausblick.....	108
5. Referenzen	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Coronavirus.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Genoms von HCoV-229E.	4
Abbildung 3: Übersicht über den Replikationszyklus von Coronaviren am Beispiel von SARS-CoV-2.	6
Abbildung 4: Übersicht über Membranstrukturen, welche in Zellen nach Infektion mit +ssRNA-Viren gebildet werden.....	8
Abbildung 5: Überblick über die von Coronaviren gebildeten Strukturen, die Teil der ROs sind.....	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung der durch nsp3-4-Interaktionen vermittelten Membranveränderungen, die zur Bildung von RO führen.....	11
Abbildung 7: Aufbau eines komplexen Sphingolipids.	15
Abbildung 8: Schematische Übersicht über den Sphingolipid-Metabolismus.....	16
Abbildung 9: Rolle von Sphingolipiden in der Replikation verschiedener RNA-Viren. ...	20
Abbildung 10: Wachstumskinetiken und Bildung von ROs von verschiedenen Coronaviren in ACE2-überexprimierenden Huh-7-Zellen (Huh-7-ACE2).....	47
Abbildung 11: Analyse des Sphingolipidoms coronavirus-infizierter Huh-7-ACE2-Zellen.	51
Abbildung 12: Bestimmung der Zellviabilität von Huh-7-ACE2-Zellen nach Behandlung mit den verwendeten SMase-Inhibitoren.	53
Abbildung 13: Effekt der Inhibitoren der aSMase auf die virale Replikation von verschiedenen Coronaviren in Huh-7-ACE2-Zellen.....	54
Abbildung 14: Effekt der Inhibitoren der nSMasen auf die virale Replikation von verschiedenen Coronaviren in Huh-7-ACE2-Zellen.....	55
Abbildung 15: Validierung des siRNA-induzierten Knockdowns von Transkripten, die für Sphingomyelinasen oder coronavirale Rezeptorproteine kodieren.....	57
Abbildung 16: Effekt des siRNA-Knockdowns von SMasen auf die Reproduktion von Coronaviren.	58
Abbildung 17: Virusreplikation von HCoV-229E bei zeitabhängiger Gabe von PDDC..	60
Abbildung 18: Effekt von PDDC sowie bekannten Inhibitoren der coronaviralen RO-Bildung auf die Anzahl RO-positiver Zellen nach Infektion.	63
Abbildung 19: Quantifizierung der Effekte von PDDC auf die die Bildung von ROs nach Infektion.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Lokalisation von Coronavirus-induzierten ROs im Vergleich mit Ceramiden.....	65
Abbildung 21: Lokalisation von Coronavirus-induzierten ROs im Vergleich mit Sphingomyelin.....	67
Abbildung 22: Kolokalisation von Coronavirus-induzierten ROs mit der humanen nSMase2.	69
Abbildung 23: Lokalisation von Coronavirus-induzierten ROs im Vergleich mit der inaktiven nSMase2.	70
Abbildung 24: Lokalisation von Coronavirus-induzierten ROs im Vergleich mit GFP. ...	71
Abbildung 25: Veränderungen der einzelnen Sphingolipidspezies in Coronavirus-infizierten A549-CD13-, A549-ACE2- oder MRC-5-Zellen.....	75
Abbildung 26: Vergleich der relativen Änderungen von Cer und SM nach Infektionen mit den verschiedenen Coronaviren (MOI=3; 12 h p. i.) in den verschiedenen Zelltypen.	77
Abbildung 27: Kreisdiagramme zur Darstellung der relativen Anteile der verschiedenen Sphingolipidklassen in den verschiedenen uninfizierten Zelltypen.	78
Abbildung 28: Effekt von PDDC auf die virale Replikation von verschiedenen Coronaviren in A549-CD13-, A549-ACE2- und MRC-5-Zellen.....	80
Abbildung 29: Kolokalisation von Coronavirus-induzierten ROs mit Ceramiden in primären und permanenten pulmonalen Zellsystemen.....	82
Abbildung 30: Etablierung eines experimentellen Systems zur Produktion von ROs in Zellen mittels Transfektion von HCoV-229E nsp3-4.....	85
Abbildung 31: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Bildung von ROs nach Transfektion von pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5.....	87
Abbildung 32: Veränderungen der einzelnen Sphingolipidspezies in mit pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5 transfizierten Huh-7-ACE2-Zellen.	91
Abbildung 33: Kolokalisation von artifiziell induzierten ROs mit Ceramiden.	92
Abbildung 34: Übersicht über den Sphingolipid-Metabolismus mit Hervorhebung von Enzymen, die in Coronavirus-infizierten A549-Zellen Cer generieren könnten. ...	101
Abbildung 35: Schematisches Modell der Entstehung von coronaviralen ROs durch nsp3 und nsp4 mittels Generierung von Cer-angereicherten Mikrodomänen.....	107

1. Einleitung

1.1 Coronaviren

1.1.1. Allgemeines

Coronaviren sind behüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom positiver Polarität (+ssRNA), welche eine Vielzahl von Säugetieren und Vögeln infizieren können. Die erstmalige Entdeckung von Coronaviren geht aufs Jahr 1931 zurück, in dem sie als Verursacher einer neuartigen respiratorischen Erkrankung bei Vögeln identifiziert wurden (1). Die allgemein als Coronaviren bezeichneten Viren gehören der Unterfamilie *Orthocoronavirinae* innerhalb der Ordnung *Nidovirales* an (2). Die Vertreter der *Orthocoronavirinae* gliedern sich in vier verschiedenen Genera: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* und *Deltacoronavirus*. Gemeinsame Merkmale dieser Viren ist die Produktion von geschachtelten (eng. *nested*, lat. *nido*) subgenomischen RNAs, eine einheitliche Genomorganisation, die Produktion von zwei verschiedenen Polyproteinen (pp) mittels Leserasterverschiebung sowie einzigartige Proteinfunktionen, unter anderem eine korrekturlesende (eng. *proofreading*) Exoribonuklease (3).

Coronaviren können infolge der Infektion verschiedenste respiratorische, intestinale, oder systemische Erkrankungen verursachen (4). Es sind bislang sieben humanpathogene Coronaviren (HCoV) bekannt, dazu zählen unter anderem HCoV-229E (5), HCoV-NL63 (6), HCoV-OC43 (7) und HCoV-HKU1 (8), die vornehmlich die oberen Atemwege infizieren. Diese vier Coronaviren gelten als endemische Erkältungsviren und rufen nur selten schwerwiegende Symptome hervor.

Zudem sind drei weitere HCoVs erst im Laufe dieses Jahrtausends auf den Menschen übergesprungen und können teilweise schwere Atemwegserkrankungen mit tödlichem Verlauf hervorrufen:

(i) SARS-CoV (vom eng. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*) führte 2002/2003 zu einer Epidemie in 29 Ländern (9, 10).

(ii) Ein Jahrzehnt später wurde der erste Fall einer Infektion mit MERS-CoV (vom eng. *Middle east respiratory syndrome virus*) in Saudi-Arabien verzeichnet (11). Die Übertragung von MERS-CoV erfolgt für gewöhnlich von einem Reservoirwirt (Kamele oder Dromedare) auf den Menschen. Mensch-zu-Mensch-Übertragungen wurden zwar beobachtet, treten jedoch deutlich seltener auf (12). Dennoch gilt MERS-CoV als ein zu

Einleitung

beobachtendes Virus, welches durch mögliche Anpassungsmutationen bessere Übertragbarkeit und somit pandemisches Potential entwickeln könnte (13).

(iii) Im Jahr 2019 wurde durch ein neu entdecktes Coronavirus, das SARS-CoV-2, eine weltweite Pandemie ausgelöst (14). SARS-CoV-2 verursacht eine als *coronavirus disease 2019* (COVID-19) bezeichnete Erkrankung mit multiplen Symptomen (15). Seit Beginn der Pandemie sind über 775 Millionen Menschen an COVID-19 erkrankt und über 7 Million an der Krankheit verstorben (16).

In den vergangenen Jahren wurden große Erfolge in der Therapie von Coronavirus-Infektionen und den daraus resultierenden Erkrankungen erreicht. So existieren mittlerweile diverse zugelassene Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 (17). Des Weiteren existieren mit Paxlovid und Veklury zugelassene Medikamente für die Behandlung von COVID-19 Patienten (18, 19). Beide Medikamente inhibieren direkt virale Proteine, welche für die Replikation essentiell sind. Aufgrund der hohen Fehlerrate der viralen Polymerase während des Kopiervorganges kann es jedoch zu Anpassungsmutationen kommen, welche mit einer Medikamentenresistenz einhergehen. Solche Anpassungsmutationen wurden sowohl für Paxlovid als auch für Veklury beschrieben (20, 21). Eine Alternative bieten daher antivirale Strategien, die statt viraler Proteine Wirtszellfaktoren, die für die Replikation des Virus benötigt werden, als Ziel haben. Solche Wirtszellfaktoren bleiben von Mutationen im viralen Genom weitgehend unbeeinflusst und sind häufig für verschiedene Vertreter einer Virusfamilie konserviert. Die Erforschung von Viren und ihrer Wechselwirkungen mit dem Wirt ist und bleibt daher von großer Wichtigkeit für potenzielle neue Therapiemöglichkeiten.

1.1.2. Aufbau des Virions und des Genoms

Das Virion der Coronaviren hat eine annähernd kugelförmige Gestalt und hat einen Durchmesser zwischen 50 und 200 nm (22). Außen besteht das Virion aus einer Lipidschicht, in welche drei virale Strukturproteine integriert sind: das Spike-Protein (S-Protein), das Hüll-Protein (engl. *envelope protein*, E-Protein) und das Membran-Protein (M-Protein) (Abbildung 1).

Das S-Protein vermittelt den Eintritt des Virions durch Bindung an den Eintrittsrezeptor, gefolgt von Rezeptor-vermittelter Endozytose oder direkter Fusion des Virions mit der Zellmembran des Wirtes (23).

Das M-Protein und E-Protein sind essentiell für die Assemblierung neuer Viruspartikel, Koexpression beider Proteine induziert die Bildung von virusähnlichen Partikeln (24).

Einleitung

Innerhalb des Virions befindet sich ein weiteres Strukturprotein, das Nucleokapsid-Protein (N-Protein). Hauptaufgabe dieses Protein ist die Verpackung der RNA als Ribonukleoprotein.

Vertreter des Subgenus *Embecovirus* der Betacoronaviren enthält Viren, welche zusätzlich zu den bereits erwähnten vier Strukturproteinen noch ein weiteres Strukturprotein, eine Hämagglutinin-Esterase (HE), produzieren. Die HE dient der Spaltung von 9-O-acetylierter Sialinsäure, die als Rezeptor für die Viren dient, und erleichtert so die Freisetzung von neugebildeten Virionen (25).

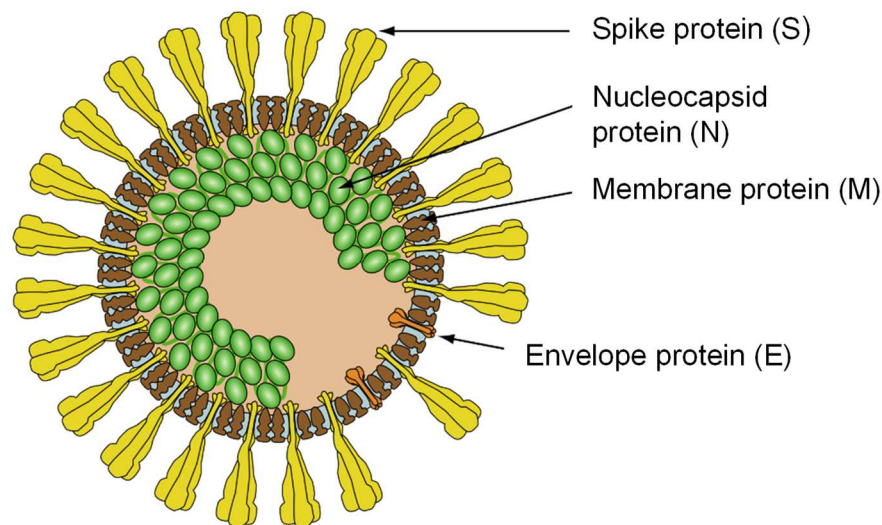


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Coronavirus. Entnommen und modifiziert von https://viralzone.expasy.org/766?outline=all_by_species (SwissBioPics), lizenziert durch Creative Commons-Lizenz (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Das Genom von Coronaviren ist einzelsträngig und von positiver Polarität und zwischen 26 und 32 kb groß (26). Das Genom ist am 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur ausgestattet (27, 28). Dies hat zur Folge, dass die genomische RNA direkt nach Einbringen in die Zelle translatiert werden kann. Das Genom von Coronaviren enthält am 5'- und 3'-Ende untranslatierte Regionen (UTR), welche in-*cis*-wirkende RNA-Sekundärstrukturen bilden (29). Ein Großteil des Genoms bildet von der 5'-UTR startend zwei große, sich überlappende offene Leserahmen (eng. *open reading frame*, ORF). Diese als ORF1a und ORF1b bezeichneten ORFs codieren für zwei pp, pp1a und pp1ab. Der näher am 5'-Ende (*upstream*) liegende ORF1b codiert dabei für das pp1a, während das pp1ab durch das Ablesen von sowohl ORF1a als auch ORF1b gebildet wird. Grundlage hierfür ist eine ribosomale Leserasterverschiebung (*ribosomal frame shift*) (30).

Einleitung

Nach ORF1a und ORF1b folgen Richtung 3'-Ende (*downstream*) weitere Gene, die für die Strukturproteine sowie verschiedene akzessorische Proteine, deren Anzahl bei unterschiedlichen Coronavirus-Spezies variiert (31). Die Biosynthese dieser Proteine erfolgt durch die Produktion von subgenomischen mRNAs (sgmRNAs) vermittelt. Eine detaillierte Beschreibung des Ablaufs der Synthese von sgmRNAs findet sich beispielsweise in einem Artikel von Sawicki et al. (32).

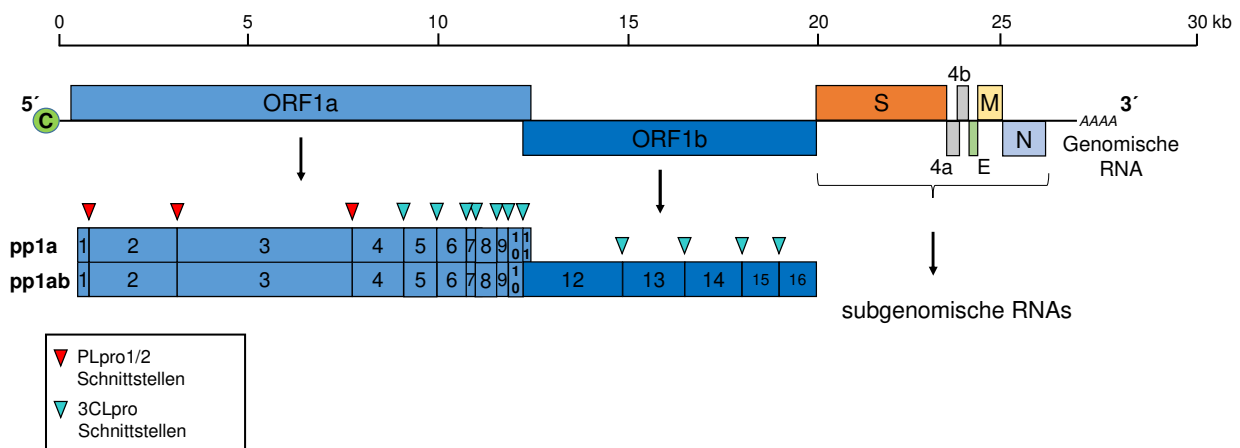


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Genoms von HCoV-229E.

1.1.3. Der Replikationszyklus von Coronaviren

Der erste Schritt im Replikationszyklus eines Coronavirus ist die Bindung des S-Proteins an einen zellulären Rezeptor an der Zelloberfläche. Verschiedene Coronavirus-Spezies verwenden dabei unterschiedliche Rezeptoren (33). HCoV-229E verwendet beispielsweise die Aminopeptidase N (APN, auch: CD13) (34), MERS-CoV die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) (35) und SARS-CoV sowie SARS-CoV-2 das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) (36, 37). Der Eintritt in die Wirtszelle erfolgt nach Bindung des Rezeptors entweder über Rezeptor-vermittelte Endozytose oder über direkte Fusion der Virushülle mit der Zellmembran (38). Nach Fusion der Virushülle mit der zellulären Membran wird dann das Genom ins Zytosol freigesetzt.

Nach Freisetzung des Genoms erfolgt die Translation von pp1a und zu geringerem Anteil von pp1ab. Diese pp enthalten bis zu 16 Nicht-Strukturproteine (nsps), die für die Replikation des viralen Genoms essentiell sind. Die Freisetzung der nsps erfolgt durch die in den pp enthaltenen Proteasen. Die Hauptprotease von Coronaviren ist die 3CL^{pro} in nsp5, welche an 11 hoch konservierten Stellen im pp schneidet und zur Freisetzung von nsp5-16 führt (39, 40). Die sich am N-Terminus des pp befindenden nsps werden

von ein oder zwei (abhängig von der jeweiligen Coronavirus-Spezies) Papain-ähnlichen Proteasen (PL^{pro}) in nsp3 prozessiert (41).

Die freigesetzten nsps haben verschiedene Funktionen im Replikationszyklus von Coronaviren. Dazu gehören unter anderem: (i) die Bildung des Replikations-/Transkriptionskomplexes (RTC) (42), (ii) die Bildung einer Cap-Struktur am 5'-Ende des Genoms und der sgRNAs zum Schutz vor zellulären Exoribonukleasen (43), (iii) die Unterdrückung der Immunantwort (44-46). Ein essentieller nsp-vermittelter Schritt ist die Bildung von sogenannten membranösen replikativen Organellen (ROs), welche von allen bekannten +ssRNA-Viren gebildet werden (47). Die Bildung coronaviraler ROs wird durch nsp3 und nsp4 vermittelt (48-50), wobei eine unterstützende Rolle von nsp6 diskutiert wird (49, 51).

Nach Synthese der coronaviralen Strukturproteine und neuer genomischer RNAs findet der Zusammenbau neuer infektiöser Viren im sogenannten ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) statt (52). Die Membranen des ERGIC dienen dabei als Quelle der Virushülle und die neu gebildeten Virionen knospen in das Lumen des ERGICs (53). Anschließend erfolgt der Austritt (eng. *egress*) des Virus durch Exozytose, wobei verschiedene Mechanismen diskutiert werden (54). Sämtliche hier aufgeführten Schritte und der Ablauf des coronaviralen Replikationszyklus können in schematischer Form der Abbildung 3 entnommen werden.

Einleitung

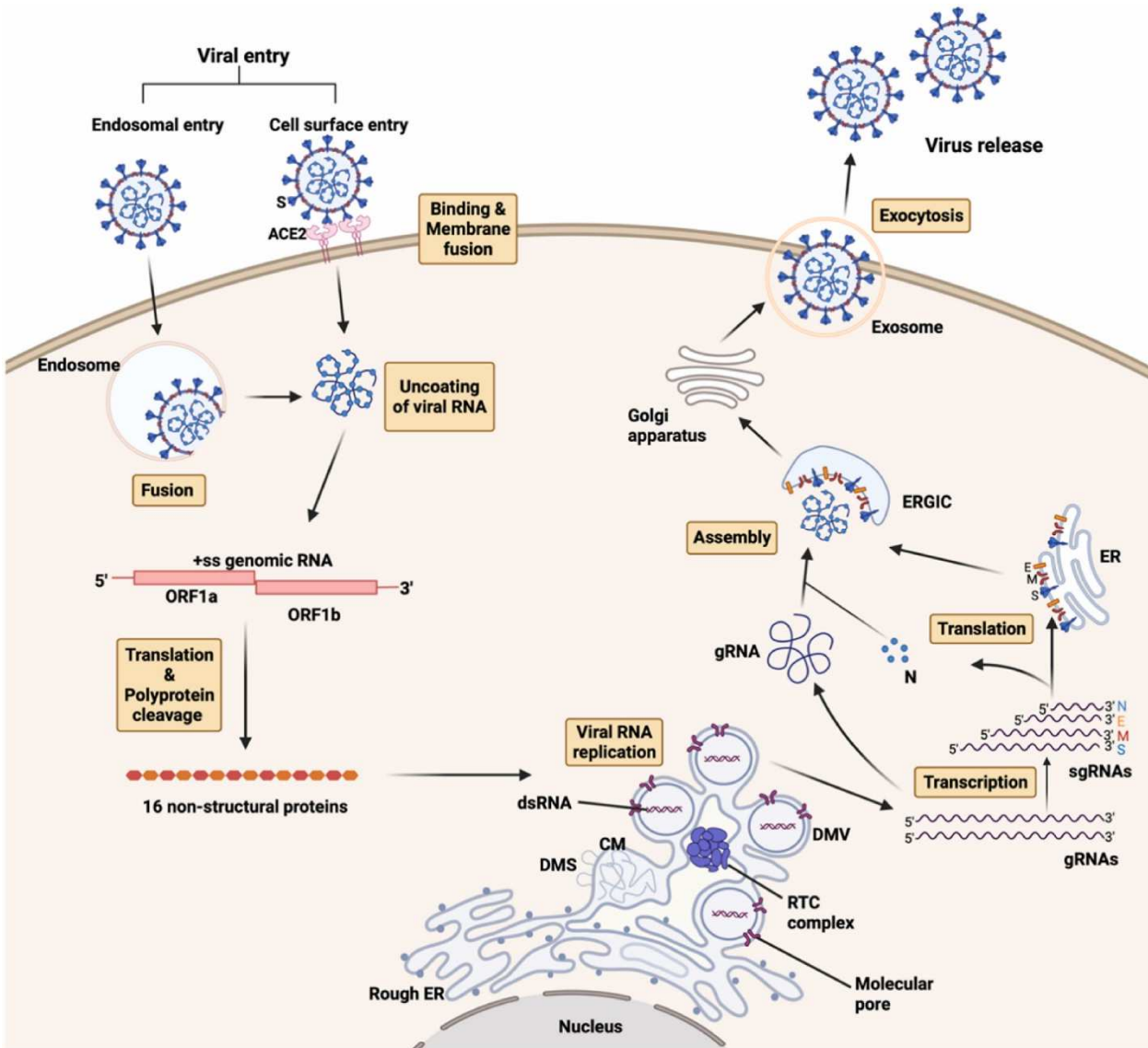


Abbildung 3: Übersicht über den Replikationszyklus von Coronaviren am Beispiel von SARS-CoV-2. Entnommen aus (55). lizenziert durch Creative Commons-Lizenz (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

1.2. Virus-induzierte replikative Organelle

Ein wesentlicher Schritt im Replikationszyklus von +ssRNA-Viren ist die massive Umstrukturierung von Wirtszellmembranen zur Bildung von viralen ROs (56, 57). Diese sind Standort der Replikations- und Transkriptionsmaschinerie und werden typischerweise nach der Translation der viralen nsps gebildet. Die Bildung dieser Organelle ist aus zwei Gründen vorteilhaft für das Virus: (i) es findet eine Kompartimentierung der Replikations- und Transkriptionsmaschinerie innerhalb der Zelle statt, wodurch die benötigten viralen und zellulären Faktoren konzentriert vorliegen,

(ii) sie sorgt für eine räumliche Abtrennung der viralen Replikation und Transkription und bietet hierdurch einen Schutz vor der Immunerkennung durch die Wirtszelle. Das virale RNA-Genom liegt während Replikation und Transkription als Doppelstrang-RNA (dsRNA) vor und würde somit ohne die angesprochene räumliche Abtrennung durch sogenannte „pattern recognition receptors“ wie MDA5 und RIG-I erkannt werden, was den Abbau viraler dsRNA-Intermediate und eine allgemeine Aktivierung der angeborenen Immunantwort der Zelle zur Folge hätte (58).

Die Bildung von viralen ROs ist nachgewiesenermaßen essentiell für +ssRNA Viren (59, 60). Moleküle, die die Bildung von ROs hemmen können, sind daher vielversprechende Kandidaten für eine antivirale Therapie.

Die Morphologie und die Lokalisation der ROs unterscheiden sich dabei zwischen den verschiedenen Virusfamilien (56). Einen Überblick der induzierten RO-Strukturen bietet Abbildung 4. Das Flock-House-Virus (Familie *Nodaviridae*) bildet beispielsweise Vesikel innerhalb von Mitochondrien (61). Das Rötelnvirus (Familie *Matonaviridae*) bildet sogenannte zytopathische Vakuolen, die mit dem Golgi-Komplex und Mitochondrien verbunden sind (62). Viren der Familie *Togaviridae* bilden invaginierte Vesikel, die entweder mit zytopathischen Vakuolen assoziiert sind (im Falle von Semliki-Forest-Virus oder Sindbis-Virus) (63) oder sich an der Plasmamembran befinden (Chikungunya-Virus) (64). Weitere typische Strukturen, die von mehreren Virusfamilien gebildet werden, sind die sogenannten Doppelmembranvesikel (DMV). Auch die Vertreter der Ordnung *Nidovirales*, inklusive der in dieser Arbeit untersuchten Coronaviren, bilden DMVs im Verlaufe der Infektion (47). Auf diese Eigenschaft wird im nachfolgenden Kapitel genauer eingegangen.

Einleitung

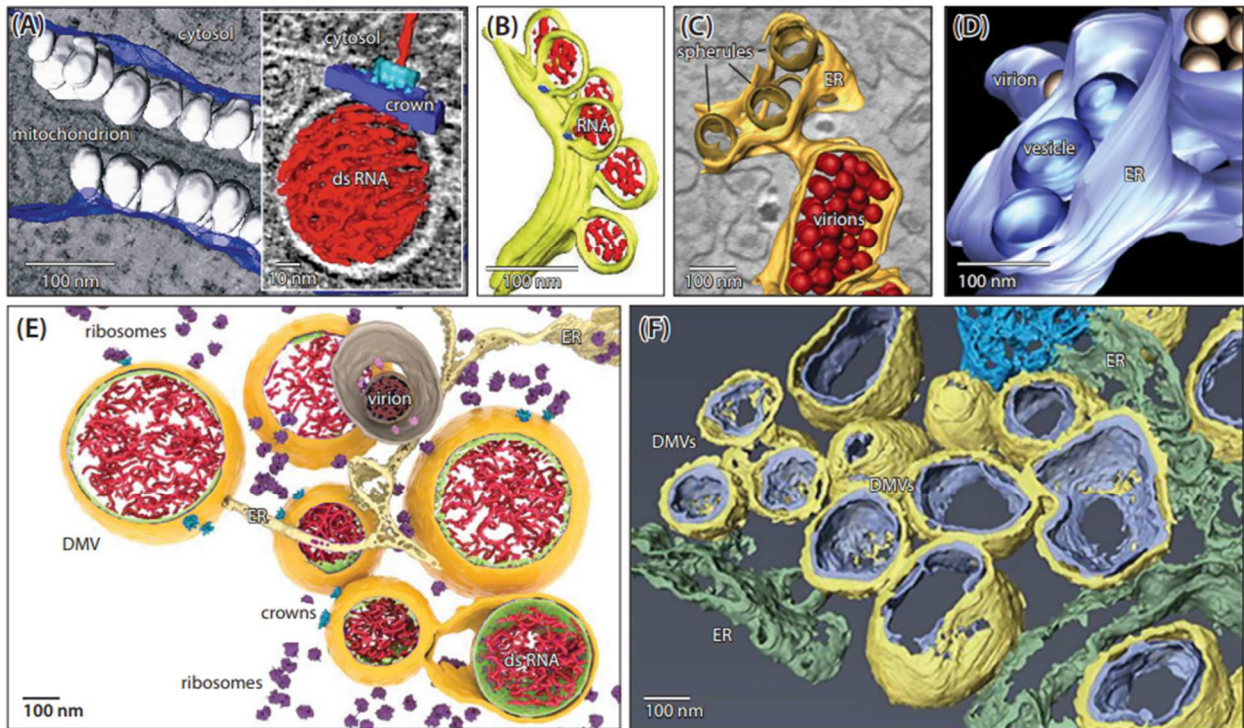


Abbildung 4: Übersicht über Membranstrukturen, welche in Zellen nach Infektion mit +ssRNA-Viren gebildet werden. Bei den Darstellungen handelt es sich um 3D-Rekonstruktionen von elektronenmikroskopischen Tomogrammen (ET) der ROs verschiedener +ssRNA-Viren: (A) Flock-House-Virus, (B) Chikungunya-Virus, (C) Dengue-Virus (DENV), (D) Zika-Virus (ZIKV), (E) *mouse hepatitis virus* (MHV) und (F) MERS-CoV. Entnommen aus (65), lizenziert durch Creative Commons-Lizenz (CC BY-NC-ND) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

1.2.1. Coronavirus-induzierte replikative Organelle

Alpha- und Betacoronaviren bilden im Laufe der Infektion DMVs mit einem Durchmesser zwischen 200 und 300 nm (48, 66). Die Bildung von DMVs findet unmittelbar nach der proteolytischen Prozessierung der nsps und somit zu einem relativ frühen Zeitpunkt im Infektionszyklus statt. DMVs sind an ihrer äußeren Membran mit Ribosomen dekoriert und sind untereinander und mit dem ER über sogenannte „*convoluted membranes*“ (CM) verbunden (67).

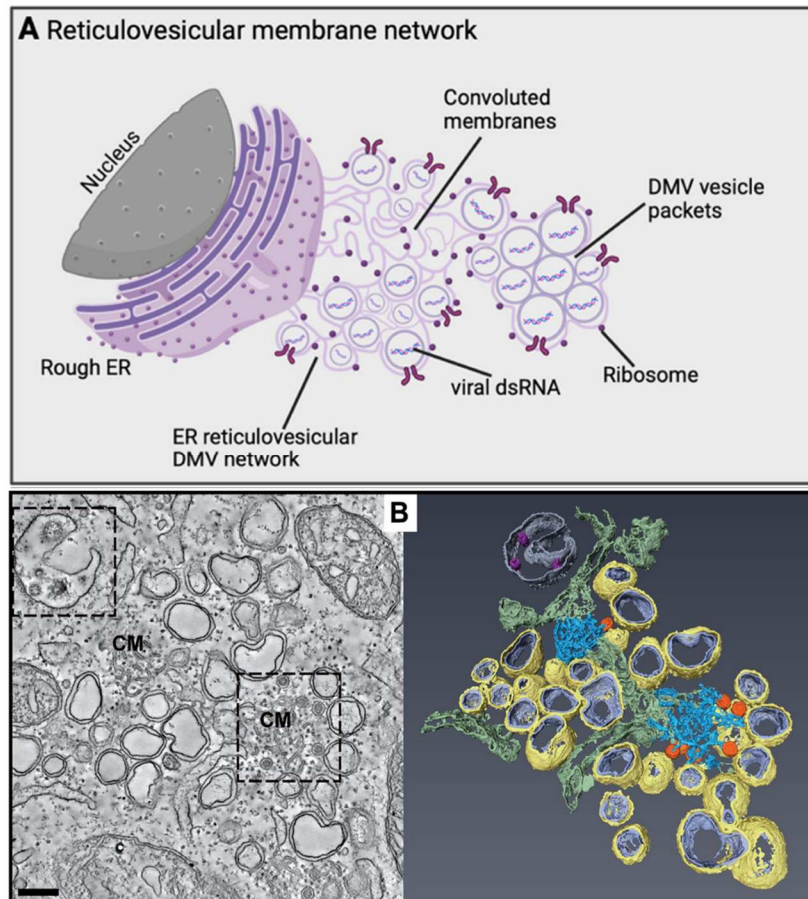


Abbildung 5: Überblick über die von Coronaviren gebildeten Strukturen, die Teil der ROs sind. (A) Schematische Darstellung vom retikulovesikulären Netzwerk, welches aus den Ribosomen-besetzten DMVs besteht, die miteinander und dem ER über CMs verbunden sind. **(B)** Aufnahme von MERS-CoV-induzierten ROs mittels Elektronentomographie. Entnommen aus (55) und (68), lizenziert durch Creative Commons-Lizenz (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Für Gamma- und Deltacoronaviren wurden zwar auch DMVs in infizierten Zellen beschrieben, diese liegen jedoch vermutlich isoliert und nicht über CMs verbunden vor (69, 70). Stattdessen wurden (zusätzlich zu den DMVs) noch sogenanntes „zippered“ ER (zER) und darin invaginierte Doppelmembran-Spherulen (DMS) gefunden.

Es lässt sich festhalten, dass bereits zwischen den Genera der verschiedenen *Orthocoronavirinae* Unterschiede hinsichtlich der induzierten Membranzusturierungen beschrieben wurden. Da in dieser Arbeit ausschließlich HCoV betrachtet werden, liegt der Fokus im Folgenden auf den von Alpha- und Betacoronaviren gebildeten Strukturen.

Für das Equine Arteritis-Virus (EAV), also für einen nahen Verwandten der Coronaviren aus der Familie der *Arteriviridae* (Ordnung *Nidovirales*), wurde ebenfalls die Produktion von DMVs als Hauptbestandteil der ROs im Laufe der Infektion gezeigt (71).

Einleitung

Interessanterweise wurde in einer Studie beschrieben, dass die Expression von nur zwei Transmembranproteinen von EAV, nsp 2 und nsp3, für die Bildung von RO-ähnlichen Strukturen in Zellen ausreichend ist.

Dieses artifizielle System wurde später auch für Betacoronaviren etabliert. Die den EAV-Proteinen nsp2 und nsp3 entsprechenden Transmembranproteine sind bei Coronaviren nsp3 und nsp4. Die Expression dieser nsps (koexprimiert oder als Fusionsprotein vorliegend) ist ausreichend, um die Bildung von ROs zu induzieren (48, 50). Es wurde in den zitierten Publikationen außerdem gezeigt, dass das nsp3-4-Fusionsprotein durch die PL^{pro} von nsp3 prozessiert wird und dass dieser Schritt essentiell für die Bildung von ROs ist.

Für Betacoronaviren wurden zwei Transmembrandomänen (TMs) in nsp3 und vier TMs in nsp4 beschrieben (72-74). Für die Interaktion von nsp3 mit nsp4 wird nur der C-terminale Abschnitt von nsp3 mit den beiden TMs und die dazwischenliegende 3Ecto-Domäne benötigt (75, 76). Für nsp4 wurde gezeigt, dass die Ladung und Glykosylierung bestimmter Bereiche des Proteins essentiell für die Interaktion mit nsp3 ist (76-78). Bei Betacoronaviren führt diese Interaktion (neben den daraus resultierenden Membranzustellungen) auch zur Bildung eines Porenkomplexes innerhalb der Membranen der DMVs (79, 80). Die Funktion des Porenkomplexes ist mutmaßlich der Export von neusynthetisierter viraler RNA und/oder weiterer Faktoren ins Zytosol, wo dann die Ribosomen-vermittelte Translation stattfindet.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein weiteres nsp, nsp6, eine wichtige Rolle in der Bildung von Coronavirus-induzierten ROs spielt, jedoch nicht essentiell für deren Bildung ist (51).

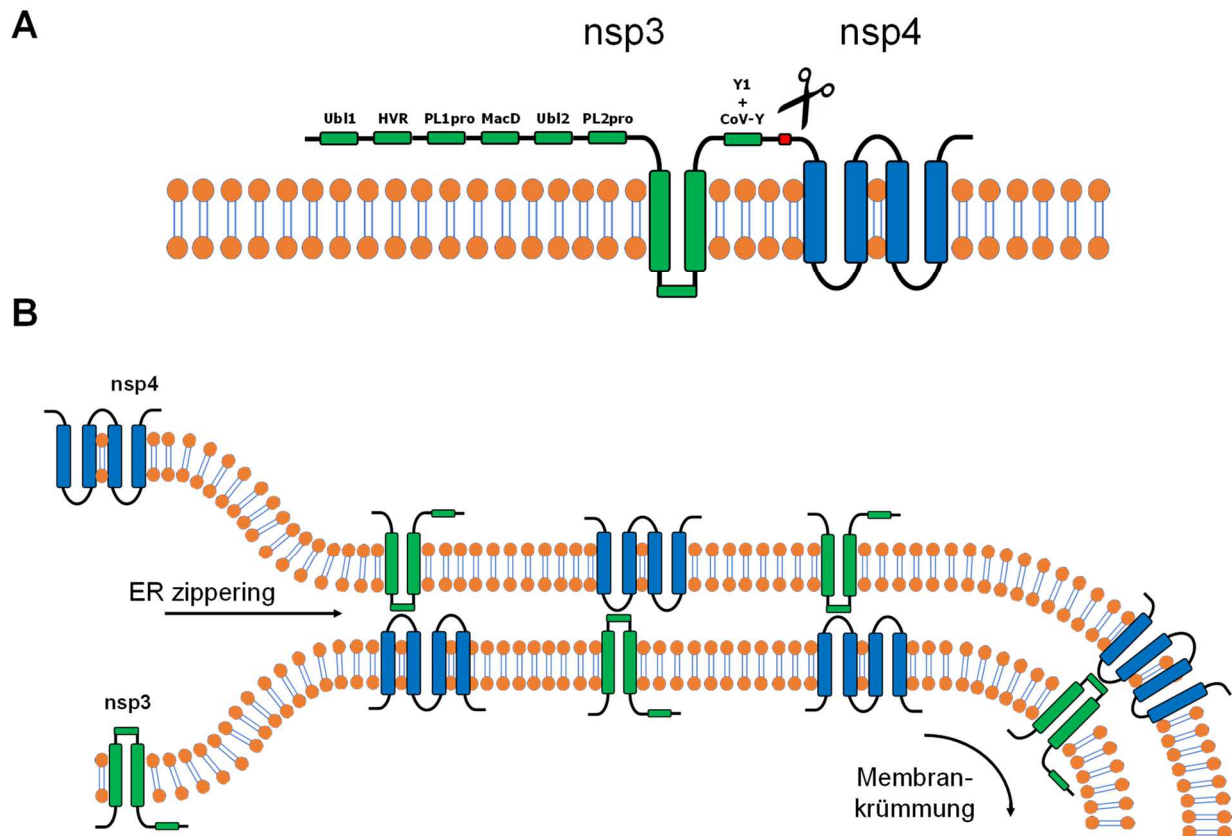


Abbildung 6: Schematische Darstellung der durch nsp3-4-Interaktionen vermittelten Membranveränderungen, die zur Bildung von RO führen. (A) Topologie und Aufbau von nsp3 und nsp4 von HCoV-229E, inklusive der in nsp3 enthaltenen Domänen (Ubl: Ubiquitin-ähnliche Domäne, HVR: Hypervariable Region, PL1^{pro} und PL2^{pro}: Papain-ähnliche Proteasen (1 und 2), MacD: Macrodomäne). Die Topologie der TMs basiert dabei auf den für Betacoronaviren beschriebenen Modellen. In rot ist außerdem die Schnittstelle zwischen nsp3 und nsp4 markiert. (B) Modell der durch nsp3-4-Interaktion vermittelten Bildung von zER-Strukturen. Aus diesen ER-Doppelmembranen entstehen anschließend ROs durch einen noch nicht vollends verstandenen Mechanismus. Basierend auf (75).

1.2.2. Rolle von zellulären Proteinen in der Bildung von replikativen Organellen

Eine Vielzahl von Interaktionspartnern von nsp3 und nsp4 wurden in den letzten Jahren durch Immunpräzipitationsexperimente oder sogenannte „*BioID-proximity-labeling*“-Technologien identifiziert (81-89). Durch genetische Ansätze wie CRISPR-Cas-Screens konnten ebenfalls Wirtszellproteine gefunden werden, die vermutlich als wesentliche Faktoren an der RO-Bildung von Coronaviren beteiligt sind (90-99). Im nachfolgenden Abschnitt wird auf eine Auswahl an Wirtszellfaktoren mit potentieller Bedeutung für die RO-Bildung von Coronaviren eingegangen.

Einleitung

(i) ER-ständige Reticulon-Proteine (RTN) spielen eine wichtige Rolle in der Vesikelbildung und Membranomorphogenese (100). RTN-Proteine sind für die Membranveränderungen während der RO-Bildung von Flaviviren (101), Enteroviren (102) und SARS-CoV-2 (103) notwendig.

(ii) Der REEP5-TRAM1-Komplex ist ebenfalls beteiligt, wobei REEP5 essentiell für die Induktion von Krümmungen in ER-Tubuli ist (104) und für TRAM1 eine Rolle in der Translokation von Proteinen im ER beschrieben wurde (105). Für diesen Komplex wurde eine Interaktion mit nsp3 von SARS-CoV-2 beschrieben sowie eine Rolle in SARS-CoV-2-induzierten Membranveränderungen (85).

(iii) Weiterhin sind die beiden Lipid-Scramblasen TMEM41B und VMP1 beteiligt, welche die Lipidverteilung in Membranen regulieren und für die Verbindung von Membranen zwischen verschiedenen Organellen verantwortlich sind (106). Es wurde nachgewiesen, dass TMEM41B und VMP1 essentiell für die Bildung von ROs bei Betacoronaviren sind (107). Eine Abhängigkeit von VMP1 und insbesondere TMEM41B wurde auch für eine Reihe weiterer Coronaviren und Flaviviren gezeigt (95, 96, 108, 109).

(iv) Funktionen von Proteinen der LC3-Familie in der RO-Bildung wurden für mehrere Vertreter der Nidoviren intensiver untersucht. LC3-Proteine sind von zentraler Bedeutung für die Bildung von Autophagosomen und sogenannten EDEMosomen und somit für zelluläre Abbauprozesse essentiell (110, 111). Es wurde gezeigt, dass LC3 mit ROs von Arteriviren und Coronaviren kolokalisieren, auch wenn die Datenlage zum Teil widersprüchlich ist und spezieabhängige Unterschiede zu existieren scheinen (112-116).

1.2.3. Rolle von zellulären Lipiden in der Bildung von replikativen Organellen

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Bildung von viralen ROs sind Wirtszelllipide, die als Grundbaustein für die RO-Bildung dienen. Nach aktuellem Verständnis entstehen ROs aus Membranen des ERs, jedoch werden auch spezifische Lipide und Enzyme des Lipidstoffwechsels für die RO-Bildung benötigt (117-120).

Grundbausteine aller Lipide sind Fettsäuren, die bei der zellulären Lipogenese gebildet werden. Die Inhibition der Fettsäure-Synthase, eines zentralen Enzyms der Lipogenese, resultiert in einer verringerten Replikation von Coronaviren (121-123). Lipidtröpfchen (eng. *lipid droplets*, LD) sind Organellen, welche unter anderem als Speicher für Fettsäuren in Form von Triacylglyceriden dienen. Es wurde für eine Vielzahl von RO-

bildenden Viren beschrieben, dass LDs mit den virus-induzierten ROs assoziiert sind (124). Außerdem wird vermutet, dass durch die beschriebene Verbindung von LDs und coronaviralen ROs ein Lipidtransfer stattfindet, wobei die dadurch transportierten Lipide entweder als Energielieferant für die Replikation oder als Baustein der ROs dienen könnten (51, 125, 126).

An der Bildung von viralen ROs sind viele weitere Lipidklassen beteiligt. Nachfolgend wird eine Auswahl von Lipidklassen mit Bedeutung für virale RO-Bildung gegeben, mit einem besonderen Fokus auf Coronaviren:

(i) Die Bildung von Phosphatidylinositolen, insbesondere von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P), wird von SARS-CoV-2 (sowie vom Hepatitis-C-Virus (HCV)) in infizierten Zellen stimuliert (50). Es wurde nachgewiesen, dass die Replikation von SARS-CoV-2 und dem Infektiösen Bronchitis-Virus infolge der Hemmung von VPS34, einer Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), und der dadurch sinkenden intrazellulären PI3P-Spiegel inhibiert wird (116, 123). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Inhibierung von VPS34 zu einer fast vollständigen Hemmung der Bildung von coronaviralen ROs in SARS-CoV-2-nsp3-4-transfizierten Zellen führt, was auf eine zentrale Rolle von PI3P in der Bildung der ROs hindeutet (50)

(ii) Es wurde gezeigt, dass die Bildung von coronaviralen ROs von der Aktivität der zytosolischen Phospholipase A2 α und den entstehenden Lysophospholipiden abhängt (127). Dabei wird vermutet, dass die Lysophospholipide entscheidend zu den Membrankrümmungen beitragen, die für die Ausbildung von Vesikeln benötigt werden.

(iii) Weiterhin wurde gezeigt, dass Sterol-Derivate die Replikation von SARS-CoV-2 und die Anzahl gebildeter ROs inhibieren, was auf eine Rolle von Sterolen in der RO-Bildung hinweist (128).

Eine weitere Lipidklasse, die eine wichtige Rolle in der RO-Bildung von Flaviviren innehat, sind die Sphingolipide (129-132). Für Coronaviren konnte zwar eine Deregulation verschiedenster Sphingolipid-Spezies nach Infektion gezeigt werden (122, 127, 133-135), ob und in welchem Schritt diese Lipide jedoch von Bedeutung für den viralen Lebenszyklus sind, wurde bisher nicht erforscht.

Einleitung

1.3. Sphingolipide

1.3.1. Allgemeines

Sphingolipide sind eine Hauptgruppe der eukaryotischen Lipide und sind Bestandteil jeder zellulären Membran. Ausgangsstruktur und einfachste Einheit der Sphingolipide sind die sogenannten Langketten-Basismoleküle (eng. *long-chain bases*, LCBs). In Säugetieren sind die am häufigsten vorkommenden LCBs Sphingosin (Sph) und Dihydrosphingosin (auch Sphinganin, dhSph), die zumeist aus 18 Kohlenstoffatomen bestehen (136). Durch Verlinkung der LCBs mit anderen Molekülen entstehen im Laufe des Sphingolipid-Metabolismus komplexere Sphingolipide (Abbildung 7). Typisch ist dabei eine O-Verlinkung des Sphingolipids mit einer sogenannten Kopfgruppe, z.B. Phosphorylcholin oder einer Phosphatgruppe, und eine Amid-Verknüpfung der LCBs mit einer Fettsäure variierender Länge (137). Ausgehend von den genannten Modifikationen und der daraus resultierenden Struktur erfüllen Sphingolipide eine Vielzahl von verschiedenen biologischen Funktionen. Als Bestandteil von zellulären Membranen haben Sphingolipide beispielsweise einen maßgeblichen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der Membranen, z.B. die Fluidität und Krümmung (138). Spezielle Mikrodomänen innerhalb der Zellmembranen mit hohen Konzentrationen an Sphingomyelin (SM), Cholesterol und Proteinen, auch bekannt als „*lipid rafts*“, haben des Weiteren entscheidenden Einfluss auf Vesikelbildung, Zellpolarität und zelluläre Signalwege (139). Generell werden Sphingolipide als bioaktive Lipide angesehen, die weitreichend in verschiedensten Signalwegen involviert sind, unter anderem Zelltod, Proliferation, und Entzündungen (140). Aufgrund ihrer Vielseitigkeit und ihrer essentiellen Bedeutung für die Zelle ist der Aufbau und die Metabolisierung von Sphingolipiden stark reguliert.

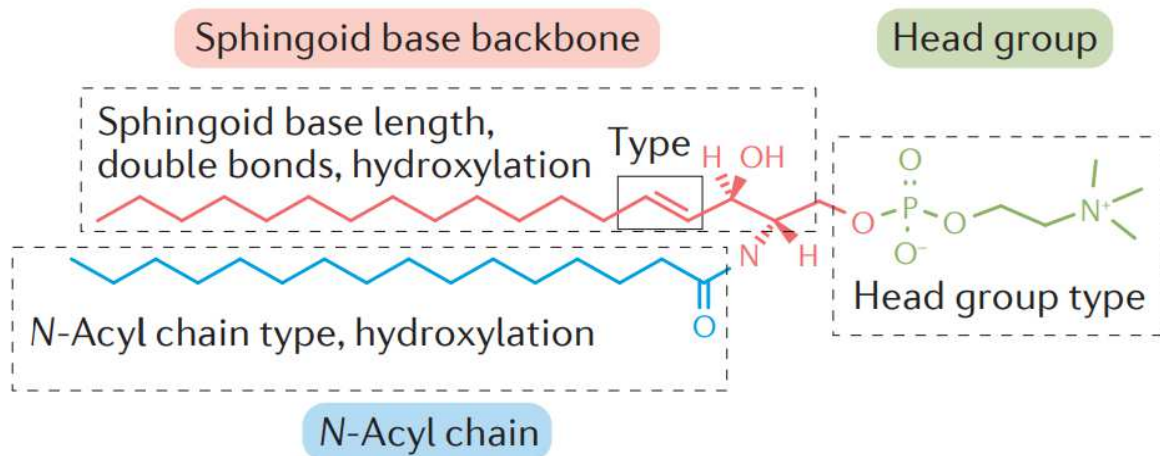


Abbildung 7: Aufbau eines komplexen Sphingolipids. Rückgrat der komplexeren Sphingolipide sind die LCBs, die mit einer Kopfgruppe (eng. *head group*) sowie einem Fettsäurerest verknüpft sind. Entnommen aus (138), mit Erlaubnis von und lizenziert durch Springer Nature <https://www.nature.com/>.

1.3.2. Sphingolipid-Metabolismus

Das Schlüssel-molekül des Sphingolipid-Metabolismus ist das Ceramid (Cer), welches aus Sph mit einem amidverknüpften Fettsäurerest besteht (141). Cer-Spezies können durch drei Wege innerhalb der Zelle gebildet werden, durch die *De-novo*-Synthese, den sogenannten „*salvage pathway*“ oder durch die Sphingomyelinasen (SMasen). Abbildung 8 gibt einen Überblick über die verschiedenen Synthesewege innerhalb des Sphingolipid-Metabolismus.

Bei der *De-novo*-Synthese wird Cer über mehrere Schritte (ausgehend von L-Serin und einer mittels Coenzym A aktivierten Fettsäure) neu gebildet (137).

Im „*salvage pathway*“ erfolgt die Bildung von Cer durch den Abbau von komplexeren Sphingolipiden. Komplexe Sphingolipide sind die sogenannten Glykosphingolipide (GSL) oder Phosphosphingolipide (PSL), welche durch das Anfügen von hydrophilen Kopfgruppen an die Hydroxy-Gruppe des C1-Atoms von Cer entstehen (136). Ein Beispiel hierfür wäre das Verlinken von Cer mit einem Phosphorylcholin durch eine Sphingomyelin-Synthase (SMS), was zur Bildung von SM führt (142).

Die Hydrolyse des SM in Cer und Phosphorylcholin durch die SMasen ist der dritte zelluläre Prozess, der zur Entstehung von Cer innerhalb der Zelle führt (143).

Cer-Spezies können durch Ceramidasen abgebaut werden, wodurch eine Fettsäure sowie Sph freigesetzt werden (144). Sph wiederum kann durch Sphingosin-Kinasen (SphK) phosphoryliert werden (145). Das hierdurch gebildete Sphingosin-1-Phosphat

Einleitung

(S1P) ist ein bedeutsames intra- und extrazelluläres Signalmolekül (146). Das Enzym S1P-Lyase katalysiert den irreversiblen Abbau von S1P in Hexadecanal und Phosphoethanolamin (147).

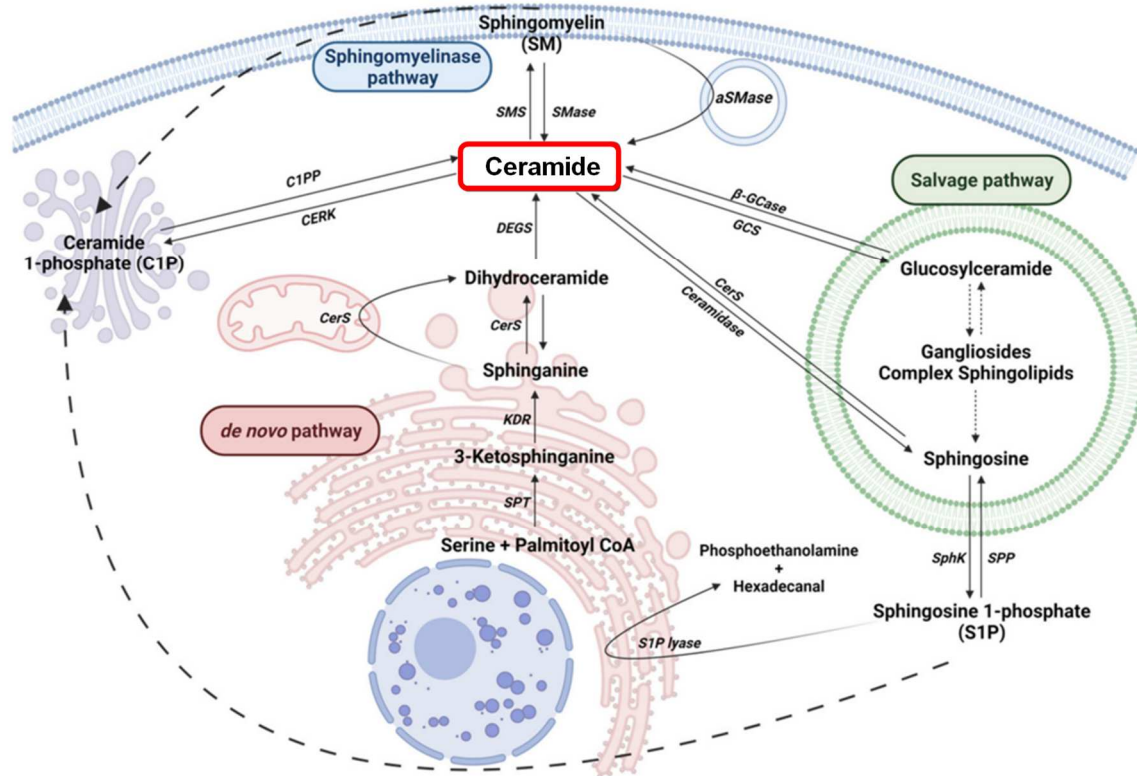


Abbildung 8: Schematische Übersicht über den Sphingolipid-Metabolismus. In dieser Übersicht wird Cer als Schlüsselmolekül hervorgehoben. Cer kann durch *De-novo*-Synthese im ER, durch Spaltung komplexer Sphingolipide („salvage pathway“) in Lysosomen oder durch Hydrolyse von SM (hier: an der Plasmamembran) gebildet werden. Das Cer kann wiederum entweder Baustein für die Bildung komplexerer Sphingolipide sein oder über Ceramidasen abgebaut werden. SPT: Serin-C-Palmitoyltransferase, KDR: 3-Ketodihydrosphingosin-Reduktase, CerS: Ceramid-Synthase, DEGS: Dihydroceramid-Desaturase, β-GCase: β-Glucocerebrosidase, GCS: Glycosylceramid-Synthase, SPP: Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatase, C1PP: Ceramid-1-Phosphat-Phosphatase, CERK: Ceramidkinase. Entnommen und modifiziert aus (148), lizenziert durch Creative Commons-Lizenz (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

1.3.3. Sphingomyelinasen

Abhängig von ihrem pH-Optimum werden die SMasen in drei Untergruppen klassifiziert: saure, neutrale und alkalische SMasen (143). Da die alkalische SMase bisher nur in Zellen des Gastrointestinaltrakts detektiert werden konnte (149) und in dieser Arbeit keine Zellen dieses Gewebes verwendet wurden, wird die alkalische SMase an dieser Stelle

nicht weiter betrachtet. Dagegen zeigen aSMase und nSMasen keine gewebespezifische Lokalisierung.

1.3.3.1. Saure Sphingomyelinase

Die saure Sphingomyelinase (engl. *acid sphingomyelinase*, aSMase) wurde als erste SMase im Jahr 1966 isoliert und beschrieben, inklusive des namensgebenden pH-Optimums des Enzyms (150). Es existieren zwei Isoformen der aSMase, die sich in ihrer Lokalisation unterscheiden (151). Einerseits existiert die sogenannte lysosomale aSMase, welche in Lysosomen und an der inneren Plasmamembran lokalisiert ist, und eine sekretierte aSMase, welche exportiert wird und außerhalb der Zelle aktiv ist. Die Lokalisierung und Prozessierung der Isoformen ist dabei abhängig vom Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und Sortilin (152). Ein durch genetische Defekte induzierter Verlust der aSMase-Aktivität führt beim Menschen und auch im Mausmodell zu einem Typ A oder Typ B des Niemann-Pick-Syndroms (153). Hierbei handelt es sich um eine lysosomale Speicherkrankheit, bei der SM und Cholesterol in den Lysosomen akkumulieren. Dieser Phänotyp verdeutlicht die zentrale Rolle der lysosomalen aSMase in der Regulation des Lipidhaushalts der Zelle. Weiterhin wurde für die lysosomale aSMase eine Translokation von Lysosomen zur inneren Seite der Plasmamembran infolge verschiedener Stimuli beschrieben, wo sie das Entstehen von Cer-angereicherten Mikrodomänen induziert (154). Das für die Aktivität der aSMase essentielle saure Milieu wird dabei durch die (zusammen mit der aSMase aus den Lysosomen rekrutierte) V1 H⁺-ATPase produziert (155).

Die sekretierte aSMase ist dagegen außerhalb der Zelle an der Außenseite der Plasmamembran aktiv und benötigt kein saures Milieu (156). Die genaue physiologische Bedeutung dieser Isoform ist derzeit noch unklar (157).

Interessanterweise wirken eine Vielzahl an zugelassenen Antidepressiva wie Fluoxetin und Desipramin als funktionelle Inhibitoren der aSMase (FIASMA) (158, 159). Antidepressiva mit FIASMA-Funktion wurden in einer Vielzahl von Studien als anti-coronavirale Substanzen identifiziert, wodurch sich erstmals Hinweise auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen aSMase-Aktivität und Coronavirus-Replikation ergaben (160-164).

1.3.3.2. Neutrale Sphingomyelinasen

Einleitung

Die neutralen Sphingomyelinasen (nSMasen) sind eine Gruppe von Enzymen, die ihr pH-Optimum im neutralem pH-Bereich (pH 7,4) haben und nur eine geringe Homologie zueinander aufweisen (165). Die Gruppe der nSMasen besteht aus gegenwärtig vier Mitgliedern: der nSMase1, nSMase2, nSMase3 und der Mitochondrium-assoziierten nSMase (MA-nSMase).

Die nSMase1 lokalisiert hauptsächlich im ER und Nukleus (166, 167) und hat eine zentrale Rolle in der Generierung von Cer zur Induktion von Apoptose in Folge von zellulärem Stress (168).

Die nSMase2 ist das am besten untersuchte Mitglied dieser Enzymklasse und wurde mit einer Vielzahl von zellulären Prozessen in Verbindung gebracht. Die nSMase2 ist primär im Golgi-Komplex (169) und der Plasmamembran (170, 171) lokalisiert. Dabei findet ein kontinuierlicher anterograder und retrograder Transport der nSMase2 zwischen den beiden Zellkompartimenten statt (172). Die nSMase2 ist Teil der TNF α - oder Interferon-vermittelten zellulären Entzündungsantwort (173). Der TNF α -Rezeptor besitzt hierbei eine nSMase-Aktivierungsdomäne (174), über welche der mit der nSMase-Aktivierung assoziierte Faktor (FAN oder auch NSMAF) rekrutiert wird, welcher dann die nSMase2 rekrutiert und mit dem TNF α -Rezeptor verbindet (175). Die über den TNF α -Signalweg vermittelte Aktivierung der nSMase2 und der daraus resultierende Anstieg des intrazellulären Cer-Spiegels kann sowohl Differenzierungsprozesse als auch Apoptose einleiten (176, 177). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass durch nSMase2-Aktivität generiertes Cer essentiell für die Produktion von Exosomen und extrazellulären Vesikeln ist (178-180)

Für die nSMase3 wurde zunächst eine Lokalisierung im ER und Golgi beschrieben (181). In späteren Arbeiten wurde auch eine Lokalisierung in der äußeren Kernmembran (182) sowie eine Interaktion dieses Enzyms mit Kernporen beschrieben (183). Diese Interaktion ist von Bedeutung für die Mitose; ein Mangel an nSMase3 führt zu neurologischen Entwicklungsstörungen und Mikrozephalie (184). Die nSMase3 spielt außerdem, ähnlich wie die nSMase2, eine Rolle im TNF-Signalweg (185).

Die MA-nSMase wurde als letzte der nSMasen in Säugetieren entdeckt und in Mitochondrien lokalisiert, wie der Name bereits impliziert (186). Da es zum gegenwärtigen Zeitpunkt kaum Studien zur MA-nSMase und ihrer zellulären Funktion gibt

und sie ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert ist, wurde die MA-nSMase nicht in die hier beschriebenen experimentellen Arbeiten einbezogen.

1.3.4. Sphingolipide in viralen Infektionen

Ein Zusammenhang zwischen Sphingolipiden und viralen Infektionen konnte in den letzten Jahren wiederholt gezeigt werden (187-190) (Abbildung 9). Ein wichtiger Schritt des viralen Replikationszyklus, an dem Sphingolipide beteiligt sind, ist der Viruseintritt in die Zelle. Hierbei können Sphingolipide, insbesondere GSL, als Eintrittsrezeptoren oder Kofaktoren für die Bindung von viralen Strukturproteinen an die Wirtszelle dienen (191-193). Weiterhin wurde gezeigt, dass verschiedene Viren eine Akkumulation von Cer in der Zellmembran induzieren und somit das Entstehen von Cer-angereicherten Mikrodomänen ermöglichen. Diese Cer-angereicherten Mikrodomänen können die Rekrutierung bestimmter Rezeptoren ermöglichen. Dies wurde beispielsweise im Falle von Infektionen mit dem Masernvirus nachgewiesen. Infolge der Bindung des Masernvirus an Moleküle der Zellmembran findet eine aSMase-induzierte Cer-Anreicherung in der Plasmamembran statt, welche die Translokation des Eintrittsrezeptors CD150 aus intrazellulären Speichern zur Plasmamembran induziert (194). Eine Beteiligung der aSMase am Viruseintritt wurde auch für eine Reihe weiterer Viren gezeigt, beispielsweise das Ebolavirus (EBOV) (195) und SARS-CoV-2 (162).

Sphingolipide wie S1P oder Cer spielen als bioaktive Lipide auch eine zentrale Rolle in zellulären Signalwegen, welche wiederum von Viren moduliert werden können. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass das Influenza-A-Virus (IAV) in infizierten Zellen die Expression der SpK1 hochreguliert und eine Inhibierung dieses Enzyms den Export von viralen Ribonukleoprotein-Komplexen aus dem Zellkern beeinträchtigt (196).

Weiterhin spielen Sphingolipide eine wichtige Rolle im Zusammenbau von neuen Viruspartikeln von behüllten Viren, unter anderem, weil Sphingolipide wesentlicher Bestandteil der vom Wirt stammenden Virushülle sind (197-199). Außerdem konnte beispielsweise für das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) gezeigt werden, dass die Inhibition der nSMase2 die Bildung der Virushülle blockiert (200).

Wie in Abschnitt 1.2.3 bereits beschrieben, sind für die Bildung von viralen ROs diverse Lipide notwendig. Für Viren der Familie *Flaviviridae* wurde nachgewiesen, dass Sphingolipide wesentlicher Bestandteil der Virus-induzierten ROs sind (129-132). Ein möglicher Zusammenhang zwischen Coronavirus-induzierten ROs und Sphingolipiden war zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie nicht untersucht worden.

Einleitung

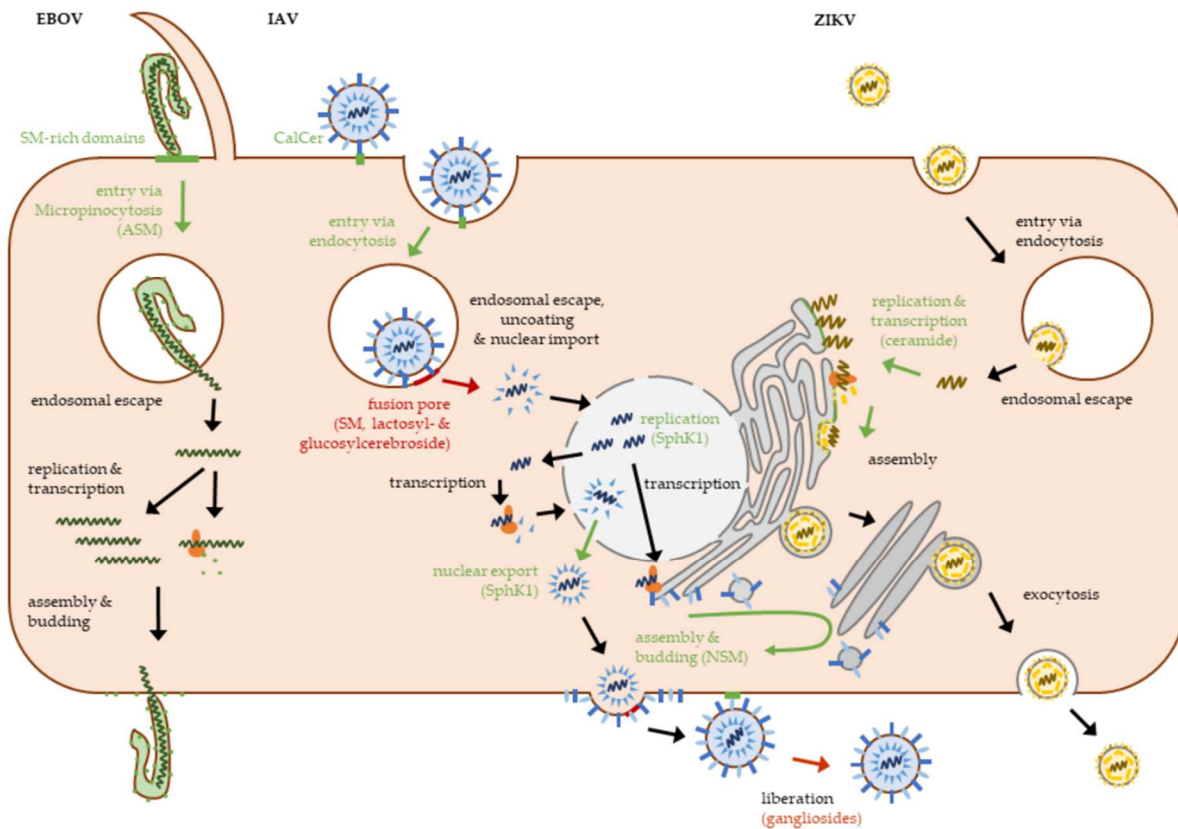


Abbildung 9: Rolle von Sphingolipiden in der Replikation verschiedener RNA-Viren. Der Replikationszyklus von EBOV, IAV und ZIKV zeigt verschiedene Schritte, in denen Sphingolipide von entscheidender Bedeutung sind. In grün markiert sind die Schritte des Replikationszyklus, in denen Sphingolipide eine unterstützende Rolle innehaben. In Rot sind die Schritte markiert, bei denen Sphingolipide inhibitorisch auf das jeweilige Virus und seinen Replikationszyklus wirken. Entnommen aus (188), lizenziert durch Creative Commons-Lizenz (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

1.4. Zielsetzung

Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass Lipide in nahezu jedem Schritt des coronaviralen Replikationszyklus von Bedeutung sind (118-120). Abgesehen vom Viruseintritt von SARS-CoV-2 ist die Rolle von Sphingolipiden und deren Metabolismus in Coronavirus-Infektionen bislang wenig untersucht. Um die Rolle von Sphingolipiden im coronaviralen Replikationszyklus (mit Fokus auf HCoV) zu untersuchen, sollten folgende Fragestellungen in dieser Arbeit bearbeitet werden:

1. Welche zeitabhängigen Veränderungen des zellulären Sphingolipidhaushaltes werden durch drei verschiedene Coronaviren (HCoV-229E, MERS-CoV und SARS-CoV-2) in verschiedenen Zellsystemen nach Infektion induziert? Gibt es bei diesen Viren (partiell oder komplett) übereinstimmende (konservierte) Deregulationsmuster ihres Sphingolipidhaushalts oder gibt es Virus-spezifische Veränderungen?
2. Welche Sphingolipidspezies und Enzyme des Sphingolipid-Metabolismus sind für die Replikation verschiedener Coronaviren relevant?
3. In welchen Schritten innerhalb des viralen Replikationszyklus sind Sphingolipide maßgeblich involviert?

Material und Methoden

2. Materialien und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Suszeptibilität	Referenz der Ursprungszelllinie
Huh-7-ACE2	Humane Zelllinie, die aus einem Leberkarzinom isoliert wurde. Wird standardmäßig zur Propagation von Coronaviren verwendet (201). Überexprimiert den humanen ACE2-Rezeptor, um Infektionen mit SARS-CoV-2 zu ermöglichen.	HCoV-229E SARS-CoV-2 MERS-CoV	Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) cell bank
A549-ACE2	Humane Zelllinie, die aus einem Adenokarzinom der Lunge isoliert wurde (202). Überexprimiert den humanen ACE2-Rezeptor, um Infektionen mit SARS-CoV-2 zu ermöglichen.	SARS-CoV-2	ATCC (CCL-185)
A549-CD13-TMPRSS2	Humane Zelllinie, die aus einem Adenokarzinom der Lunge isoliert wurde (202). Überexprimiert den humanen CD13-Rezeptor sowie die Protease TMPRSS2, um Infektionen mit HCoV-229E zu erlauben.	HCoV-229E	ATCC (CCL-185)
MRC-5	Humane Zelllinie, isoliert aus den Lungenfibroblasten eines 14 Wochen alten Embryos (203).	HCoV-229E MERS-CoV	ATCC (CCL-171)
HEK-293-ACE2	Humane Zelllinie, isoliert aus embryonalen Nierenzellen. Wird aufgrund ihrer bekanntermaßen hohen Transfektionseffizienz relativ häufig verwendet (204).	SARS-CoV-2	ATCC (CRL-1573)

Huh-7-ACE2-, A549-ACE2- und HEK-293-ACE2-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Friedemann Weber (Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. A549-CD13-TMPRSS2-Zellen (im Folgenden als A549-CD13

abgekürzt) wurden freundlicherweise von Prof. Krzysztof Pyrc (Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University).

2.1.2 Verwendete Medien und Zusätze

Die Kultivierung von Huh-ACE2-, A549-ACE2-, MRC5- und HEK-ACE2-Zellen erfolgte mit „*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*“ (DMEM, Gibco), welchem 10 % [v/v] fetales bovines Serum (FBS, Gibco), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) zugesetzt wurden. Um die kontinuierliche Überexpression des ACE2-Rezeptors zu erhalten, wurde dem Kultivierungsmedium für die Huh-7-ACE2-, A549-ACE2- und HEK-ACE2-Zellen 0,5 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich) zugefügt. Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5 % CO₂ kultiviert und bei Erreichen von submaximaler Konfluenz (90-95 %) passagiert. Hierfür wurde das Kultivierungsmedium von den Zellen entfernt, die Zellen mit 1x PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco, 1:10 verdünnt in 1x PBS) bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe der Trypsin/EDTA-Lösung verursacht ein Ablösen der adhären Zellen von der Kultivierungsschale durch Spaltung von Adhäsionsproteinen. Nach erfolgreichem Ablösen der Zellen wurde das Trypsin mittels Zugabe von FBS-haltigem Medium inaktiviert und die Zellsuspension mehrmals resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Abschließend wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung in neue Kultivierungsschalen überführt.

2.1.3 Auftauen von Zelllinien

Für die langfristige Aufbewahrung wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien in Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryo-Röhrchen aus dem Stickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Parallel wurde eine 10 cm²-Zellkulturschale mit 9 ml vorgewärmten Medium befüllt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde dann in die vorbefüllte Zellkulturschale pipettiert und im Anschluss in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um restliche Spuren des DMSO zu entfernen.

2.1.4 Lagerung von Zellen im Stickstoff

Zur langfristigen Aufbewahrung der verwendeten Zellen wurden die Zellen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -170 °C gelagert. Hierfür wurden die Zellen zuerst mittels Trypsin abgelöst (Abschnitt 2.1.3.) und die Zellen anschließend mit FBS-haltigem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend bei 500 x g für 5 min pelletiert.

Material und Methoden

Das entstandene Zellpellet wurde mit FBS-haltigem DMEM mit 10 % (v/v) DMSO (Carl Roth) resuspendiert und 1 ml der entstandenen Zellsuspension in Kryo-Röhrchen (Sarstedt) überführt. Die Kryo-Röhrchen wurden dann in einem Zelleinfrierbehälter (Corning) bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag in den Flüssigstickstofftank überführt.

2.1.5 Enzyminhibitoren

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Enzyminhibitoren.

Inhibitor	Zielprotein	Hersteller	Stockkonzentration
GW4869	nSMasen (179, 205, 206)	Sigma-Aldrich (D1692)	10 mM in DMSO
PDDC	nSMase 2 (207)	ProbeChem (PC-72748)	10 mM in DMSO
ARC39	aSMase (208)	Christoph Arenz (Humboldt-Universität zu Berlin)	1 mM in PBS
PCK	aSMase (unpubliziert)	Christoph Arenz (Humboldt-Universität zu Berlin)	10 mM in DMSO
Py-2	Zytosolische Phospholipase A2 α (127)	Merck Millipore (525143)	2 mM in DMSO
K22	Unbekannt (inhibiert die RO-Bildung von Nidoviren und Flaviviren) (59)	ProbeChem (PC-35651)	20 mM in DMSO

2.1.6 Bestimmung der zytotoxischen Konzentration 50 (CC₅₀)

Um den Einfluss der Inhibitoren auf die metabolische Aktivität der Zellen zu testen, wurden die zu testenden Zellen in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von ~ 95 % wurden die Zellen mit einer zuvor hergestellten Verdünnungsreihe der im Medium verdünnten Inhibitoren behandelt (n=8). Nach 24 h wurde die Inhibitorlösung entfernt und die Zellen mit in FBS-freiem Medium gelösten 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (0,5 mg/ml, Sigma-Aldrich) behandelt. Die Zellen wurden solange bei 37 °C inkubiert, bis die Bildung von violetten Formazankristallen unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte. Anschließend wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen getrocknet und die Formazankristalle durch Zugabe von 100 μ l Isopropanol gelöst. Die Absorption wurde dann an einem SPARK 10M Multimode-Mikroplatten-Reader (Tecan) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Die erhaltenen Messwerte wurden gemittelt und das

Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle in % berechnet. Die Prozentwerte wurden zur Berechnung des CC_{50} -Wertes mittels nicht-linearer Regression genutzt. Hierfür wurde die GraphPad-Prism-Software (Version 9.2.0, GraphPad) verwendet.

2.2 Virusinfektionen

2.2.1 Auflistung der verwendeten Viren

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Viren.

Virus	Familie	Biologische Sicherheitsstufe	Anzuchttemperatur	Referenzsequenz
HCoV-229E	<i>Coronaviridae</i>	BSL-2	33 und 37 °C	NC_002645.1
SARS-CoV-2	<i>Coronaviridae</i>	BSL-3	37 °C	SRX8975039
MERS-CoV	<i>Coronaviridae</i>	BSL-3	37 °C	NC_01984

2.2.2 Virusinfektionen

Sämtliche Infektionsexperimente wurden mit einer definierten Multiplizität (engl. *multiplicity of infection*, MOI) durchgeführt. Die MOI beschreibt dabei das Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu der im Versuch eingesetzten Anzahl an Zellen. Eine MOI von 1 entspricht daher dem Einsatz von einem infektiösen Viruspartikel pro Zelle. Für Infektionen von Zellkulturen mit bekannter Zellzahl wurden hochtitrige Viruspräparationen zunächst in FBS-freiem DMEM in geeigneter Weise verdünnt. Anschließend wurde das zum Erreichen der gewünschten MOI erforderliche Volumen dieser Viruslösung (auch Inokulationsmedium genannt) auf die Zellen gegeben und die Zellen für 1 h bei der für die Virusanzucht optimalen Temperatur (Tabelle 3) inokuliert. Anschließend wurde das Inokulationsmedium entfernt und neues FBS-freies Medium auf die Zellen gegeben.

2.2.3 Präparation von hochtitrigen Virusstocks

Die Herstellung von hochtitrigen Virusstocks in dieser Arbeit erfolgte ausschließlich unter Verwendung von Huh-7-ACE2-Zellen, die (nach der Inokulation mit Virus) in FBS-freiem DMEM kultiviert wurden. Der Ausschluss von FBS verhindert die Anwesenheit von Faktoren (e.g. Lipide, Enzyme), welche bei der Testung von Inhibitoren oder der Lipidanalyse stören könnten. Im Falle von HCoV-229E erfolgte die Anzucht von Virusstocks mit einer MOI von 0,001 bei 33 °C für ca. 72 h, die Anzucht von SARS-CoV-2 und MERS-CoV erfolgte dagegen mit einer MOI von 0,0001 bei 37°C für ca. 48 h. Sobald das Auftreten eines zytopathischen Effekts (eng. cytopathic effect, CPE) bei 30-70 % der Zellen beobachtet werden konnte, wurden die virushaltigen Überstände

Material und Methoden

abgenommen, bei 500 x g für 5 min zentrifugiert und aliquotiert. Die Lagerung der Virusstocks erfolgte bei -80 °C.

2.2.4 Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay

Die Titrationsen in dieser Arbeit wurden ausschließlich mit Huh-7-ACE2-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät. Nach Erreichen einer 100%-igen Konfluenz wurden die Zellen mit je 500 µl einer logarithmischen Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Viruslösung (10^{-1} - 10^{-6}) infiziert, um eine Verdünnung der initialen Viruslösung auf ≥ 10 Viruspartikel zu erreichen. Für SARS-CoV-2 oder MERS-CoV erfolgte die Inokulation für 1 h bei 37 °C, bei der Infektion mit HCoV-229E für 1 h bei 33 °C. Anschließend wurde das Inokulationsmedium entfernt und die Zellen mit dem Titrationsmedium (1 x MEM, Gibco; 1,25 % [w/v] Avicel, FMC BioPolymer; 10 % [v/v] FBS; 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) überschichtet. Bei Infektionen mit SARS-CoV-2 und MERS-CoV wurden die Zellen 48 h p. i. mit 1 x PBS gewaschen anschließend mit 3,7 % [v/v] Paraformaldehyd (PFA) für 1 h fixiert. Im Falle von HCoV-229E können Plaques erst ab 72 h p. i. detektiert werden, weshalb die Zellen in diesem Fall erst zu diesem späteren Zeitpunkt fixiert wurden (wie bereits oben beschrieben). Anschließend wurde das PFA entfernt und die Zellen mit einer 0,15 %-igen [w/v] Kristallviolettlösung (in 20 % [v/v] Ethanol) gefärbt. Bei der Färbung werden ausschließlich die Zellen angefärbt, die durch Zellyse entstandenen Plaques bleiben dagegen ungefärbt und können somit gezählt werden. Die Anzahl der Plaques bei einer definierten Verdünnungsstufe wird auf das eingesetzte Volumen bezogen und daraus der Virustiter der Lösung errechnet. Der errechnete Virustiter wird in *plaque forming units pro Milliliter* (pfu/ml) angegeben.

2.2.5 Testung von Substanzen auf antivirale Effekte

Zur Ermittlung des antiviralen Effektes der verwendeten Enzyminhibitoren (Tabelle 2) wurden die jeweiligen Zellen in einer Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von ~ 95 % wurden die Zellen mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle infiziert. Nach 1 Stunde Inokulation wurde das Inokulationsmedium entfernt und die Zellen mit einer zuvor hergestellten Verdünnungsreihe des zu testenden Inhibitors für 24 Stunden behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Virustiter im Überstand wurde anschließend mittels Plaque-Assay bestimmt.

2.3 DNA-Analyse

2.3.1 DNA-Konstrukte

Tabelle 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-DNA-Konstrukte.

Konstruktbezeichnung	Genprodukt
pcDNA3.1-nSMase2-eGFP	Humane nSMase2 mit C-terminalem eGFP-Tag
pcDNA3.1-nSMase2(H639A)-eGFP	Inaktive (209) humane nSMase2 mit C-terminalem eGFP-Tag
PC4-ss-FM4-Eqt-SM-oxGFP	Modifizierte, nicht-toxische Variante des Equinatoxin II (210) mit C-terminalen oxGFP –Tag
pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5	nsp3-4 von HCoV-229E, mit N-terminalem HA-Tag und C-terminalem V5-Tag
pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A	nsp3-4 von HCoV-229E, mit N-terminalem HA-Tag und C-terminalem V5-Tag, sowie mutierter Spaltstelle
pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_C1701A	nsp3-4 von HCoV-229E, mit N-terminalem HA-Tag und C-terminalem V5-Tag, sowie mutierter PL2 ^{pro}
pcDNA3.1-HA-nsp3	nsp3 von HCoV-229E, mit N-terminalem HA-Tag
pcDNA3.1-nsp4-V5	nsp4 von HCoV-229E, mit C-terminalem V5-Tag
pcDNA3.1-GFP	GFP
pcDNA3.1	-

Die pcDNA.3.1-Konstrukte zur Überexpression der (inaktiven) humanen nSMase2 mit C-terminalem GFP-Tag wurden freundlicherweise von Prof. Vera Kozjak-Pavlovic (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt zur Überexpression von Eqt-SM-oxGFP wurde freundlicherweise von Prof. Christopher G. Burd (Department of Cell Biology, Yale School of Medicine) zur Verfügung gestellt.

Um artifizielle ROs generieren zu können, wurden verschiedene getaggte nsp3- und nsp4-codierende HCoV-229E-Plasmid-DNA-Konstrukte generiert. Hierbei wurde das DNA-Konstrukt zur Überexpression von nsp3-4 codonoptimiert und in einem pcDNA3.1-Vektor synthetisiert (BioCat). Hierfür wurden die Aminosäuresequenzen für nsp3 und nsp4 von HCoV-229E aus der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Referenz-Sequenz: NC_002645.1) verwendet. Zusätzlich wurde an das 5'-Ende der kodierenden Sequenz von nsp3 ein Startcodon angefügt gefolgt von der kodierenden Sequenz für einen HA-Tag (YPYDVPDYA). An das 3'-Ende der nsp4-Nukleotidsequenz wurde die kodierende Sequenz für einen V5-Tag (GKPIPPLLGLDST) sowie ein Stoppcodon angefügt.

Material und Methoden

2.3.2 Mutagenese von DNA-Konstrukten

Zur Herstellung von DNA-Konstrukten, die entweder für nsp3 oder nsp4 allein oder für nsp3-4 mit veränderter Schnittstelle bzw. inaktivierter Protease codieren, wurden Mutagenesen mittels Polymerase-Kettenreaktion (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt. Für die Konstrukte pcDNA3.1-HA-nsp3 und pcDNA3.1-nsp4-V5 wurden Primerpaare ausgewählt, die die Regionen um die zu entfernende Sequenz flankieren. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass die Primerpaare eine mindestens 10 Basenpaare (bp) lange komplementäre Sequenz aufweisen, um eine homologe Rekombination der (veränderten) Enden des erzeugten PCR-Produkts (und damit die Rekonstitution einer zirkulären Plasmid-DNA) in transformierten *E.-coli*-Zellen (DH10B) zu ermöglichen. Die erfolgreiche PCR-vermittelte Mutagenese und Integrität der so erzeugten Plasmid-DNA-Konstrukte wurde durch Restriktionsanalyse (Abschnitt 2.3.3) und anschließende Sequenzierung (Abschnitt 2.3.7) bestätigt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der PCR-Reaktion für Mutagenesen.

Komponente	Volumen [μ l]
Phusion Polymerase (2 U/ μ l)	0,5
5xPhusion Puffer	10
Forward Primer (100 μ M)	0,5
Reverse Primer (100 μ M)	0,5
dNTPs (10 mM)	0,5
DMSO	1,5
DNA (1 μ g/ μ l)	0,3
Wasser	36,7

Tabelle 6: Das in dieser Arbeit verwendete PCR-Programm für Mutagenesen.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeitdauer [s]
Initiale Denaturierung	98	30
Denaturierung	98	10
Annealing	50	30
Extension	72	330
30 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
Final Extension	72	600

Tabelle 7: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer für Mutagenesen. In Kleinbuchstaben sind die Nukleotide gekennzeichnet, die von der Originalsequenz abweichen und zur Mutagenese führen.

Sequenz	Verwendung
AGCATCGTGGCCgcGCAGGGCGCCGGCGACGCTGGACATTC	Mutagenese pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A
CCGGCGCCCTGCgcGGCCACGATGCTGGTGGCAGGGATCT	Mutagenese pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A
GCGATAACAACgcTTGGGTGAATGCCGTGTG	Mutagenese pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_C1701A
CGGCATTCACCCAAgcGTTGTTATCGCTGGTCTTC	Mutagenese pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_C1701A
CAAGCTGGCTAGCATGGGCGACGCTGGACATTC	Deletion HA-nsp3 zur Erzeugung von pcDNA3.1-nsp4-V5
CATGCTAGCCAGCTTGGGTCTCCCTATAGTGAGTC	Deletion HA-nsp3 zur Erzeugung von pcDNA3.1-nsp4-V5
CAAGCAGGGCGCCTGAGCGGCCGCTCGAGTCTAG	Deletion nsp4-V5 zur Erzeugung von pcDNA3.1-HA-nsp3
GCGGCCGCTCAGGCGCCCTGCTTGGCCACGATGC	Deletion nsp4 zur Erzeugung von pcDNA3.1-HA-nsp3

2.3.3 Restriktionsverdau von DNA

Die im Rahmen der PCR-vermittelten Mutagenese von Plasmiden erzeugten PCR-Produkte wurden über Nacht mit dem Restriktionsenzym DpnI (NEB) bei 37 °C verdaut. DpnI ist ein Restriktionsenzym, welches methylierte DNA-Stränge spezifisch spaltet. Da nur die Plasmid-(Template)-DNA, die von *Escherichia coli* (*E. coli*) extrahiert wurde, methyliert ist, wird nur die nicht-mutagenisierte Plasmid-DNA, die als Matrize für die PCR verwendet wurde, gespalten. Dies soll das Vorkommen von Kolonien mit nicht-mutagenisierter Plasmid-DNA nach der Transformation verhindern. Für den DpnI-Verdau wurde folgender Ansatz pipettiert: 1 µl DpnI-Enzym (Thermo Fisher), 1 µl 10X FastDigest Puffer (ThermoFisher) und 8 µl PCR-Produkt. Der Ansatz wurde dann bei 37 °C für mindestens 4 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation des PCR-Produkts in *E. coli* DH10B (Abschnitt 2.3.5).

Im Falle der Klonierung von pcDNA3.1-HA-nsp3 und pcDNA3.1-nsp4-V5 wurde vor der Sequenzierung ein Restriktionsverdau zum Überprüfen der Klone durchgeführt. Für das Konstrukt pcDNA3.1-HA-nsp3 wurden die Restriktionsenzyme NheI und NotI (NEB) verwendet, für das Konstrukt pcDNA3.1-nsp4-V5 die Enzyme NheI und XhoI (NEB). Für die Restriktionsanalyse wurden 4 µl PCR-Produkt mit 0,5 µl der jeweiligen Enzyme und

Material und Methoden

1 µl 10X FastDigest Puffer pipettiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Die Produkte der Restriktionsspaltungen wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abschnitt 2.3.4).

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Überprüfung der erfolgreichen Deletion von DNA-Abschnitten mittels PCR wurden 5 µl des vorher erfolgten Restriktionsverdau (Abschnitt 2.3.3) mit 2 µl DNA-Farbstofflösung (30 % [v/v] Glycerol, 0,25% [w/v] Bromphenolblau und 0,25% [w/v] Xylencyanol FF) und 5 µl H₂O vermischt. Die so präparierten Proben wurden auf ein TAE-gepuffertes 1,5 % [w/v] Agarosegel (BioCat) geladen, welches sich in einer Elektrophoresekammer (Carl Roth) befüllt mit 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0, 20 mM Essigsäure und 1 mM EDTA) befand. Im Agarosegel befand sich zusätzlich Ethidiumbromid (0,1 µg/ml; Roth), welches als DNA-interkalierender Farbstoff die DNA durch Anregung mit UV-Licht sichtbar machen kann. Durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 45 min wurden die Fragmente aufgetrennt und konnten später mittels UV-Licht detektiert werden.

2.3.5 Transformation von DNA in *E. coli*

Für die Vervielfältigung von Plasmiden bzw. *In-vivo*-Rekombination (zur Rekonstitution zirkulärer Plasmide aus linearer DNA) wurden kompetente *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock behandelt und mit den geeigneten DNAs transformiert. Für die Konstrukte pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5, pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A, pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_C1701A, pcDNA3.1-HA-nsp3 und pcDNA3.1-nsp4-V5 wurde der *E. coli*-Stamm DH10B verwendet. Für alle anderen Konstrukte (Tabelle 4) wurde der *E. coli*-Stamm Top10F⁺ verwendet. Zunächst wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl Bakteriensuspension mit 1 µl Plasmid-DNA oder PCR-Produkt vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Reaktionsgefäß bei 42 °C für 90 s inkubiert und anschließend für 3 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (eng. *lysogeny broth medium*, Carl Roth) wurden die Bakterien für 1 h bei 30 °C (DH10B) oder 37 °C (Top10F⁺) unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Diese Inkubationszeit soll für das Ausprägen der Antibiotikaresistenz sorgen. Anschließend wurden die Bakterien bei 13.000 rpm für 1 min pelletiert, in 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin inkubiert.

Tabelle 8: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Bakterienstämme.

Bezeichnung	Genotyp
Top10F ⁻	F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL endA1 nupG
DH10B	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ-

2.3.6 Isolation von DNA aus Bakterien

Für die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* wurden Kolonien von zuvor auf Agarplatten ausplattierten Bakterien (Abschnitt 2.3.5) entnommen und in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicilin bei 30 °C (DH10B) bzw. 37 °C (Top10F⁻) bei 180 rpm für 24 h inkubiert. Hierbei wurden 4 ml LB-Medium und eine anschließende Plasmid-Isolation mittels innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0 (Innuscreen) für eine Plasmid-Sequenzierung verwendet.

Bei der Isolation von Plasmiden in größerem Maßstab für Transfektionen wurden 200 ml LB-Medium unter Verwendung des GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher) verwendet. Die Konzentration der isolierten Plasmide wurde im Anschluss mittels Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Peqlab) gemessen.

2.3.7 Sequenzierung von Plasmiden

Tabelle 9: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierprimer.

Sequenz	Verwendung
CGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
CACAGCCGAGCAGTGCATCAGGGGC	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
GCAAGCTGCAGAGACTGAGCAAGG	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
GCACCAGAAAGCTGAATAGACTGATG	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
GCGTGGCCTCCATCAACTCCGCC	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
GACCGTGAATGGCTACGCCAAGTCC	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
GGAGATACAATTTTCGACATCACCGAGTCC	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
CTGACAAAGGATCAGACACCTATC	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
CAAGCTGCCTGAGGTCATTGCC	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
GAAGCTGAAGAGCTACGCCGCTCC	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5
CTGCTCGGCTGTGTAACACCTCTCG	Sequenzierung pcDNA3.1-HA-nsp3
CGTACTTGTAGTAGGCATTGGCC	Sequenzierung pcDNA3.1- nsp4-V5

Material und Methoden

Für die Sequenzierung der mutagenisierten Konstrukte wurden jeweils 1 µg DNA mit 4 µl Sequenzierprimer (5 µM, Tabelle 9) vereint und an die Firma LGC Biosearch Technologies geschickt.

2.3.8 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen

Um die Bedeutung von bestimmten viralen und zellulären Proteinen und deren Lokalisation in der Replikation von Coronaviren zu untersuchen, wurden die zu untersuchenden Proteine mittels geeigneter Expressionskonstrukte (Tabelle 4) in Huh-7-ACE2-Zellen überexprimiert. Hierfür wurden die jeweiligen Expressionskonstrukte mittels Transfektion in die Zielzelle eingebracht. In dieser Arbeit wurden zwei chemische Transfektionsverfahren verwendet. Einerseits die Lipofektion, bei der durch Zugabe von Lipiden die DNA in Liposomen verpackt wird und so durch Membranfusion in die Zelle gelangen kann. In dieser Arbeit wurde Lipofectamine2000 (Invitrogen, Thermo Fisher) für die Lipofektion verwendet. Andererseits wurden kationische Polymere verwendet, die als Komplex mit der DNA an negativ geladene Polysaccharide an der Zelloberfläche binden und dadurch die Aufnahme des Komplexes mittels Endozytose ermöglichen. In dieser Arbeit wurde PEI Star (Bio-Techne GmbH) als kationisches Polymer für die Transfektion verwendet.

Unabhängig von der gewählten Transfektionsmethode wurden die Transfektionsansätze wie folgt vorbereitet: Das jeweilige Plasmid und das oben genannte Transfektionsreagenz wurden jeweils in einem Reaktionsgefäß mit Opti-MEM (Gibco) vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereint. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 Minuten wurden das DNA-Transfektionsreagenz-Gemisch auf die Zellen getropft und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten Volumina für Opti-MEM, DNA und Transfektionsreagenz können den untenstehenden Tabellen entnommen werden (Tabelle 10.)

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Volumina für DNA-Transfektion, abhängig vom gewählten Zellkulturgefäß.

Reagenz	Volumina (µl)		
	24 Vertiefungen	6 Vertiefungen	10 cm ² Zellkulturschale
Opti-MEM	100	250	2000
Lipofectamine2000	2	8	/
PEI STAR (1 µg/µl)	/	9	45
DNA (1 µg/µl)	0,75	3	15

2.4 RNA-Analyse

2.4.1 Auflistung der verwendeten small interfering RNAs (siRNAs)

Um (neben pharmakologischen Inhibitoren) den Einfluss zellulärer SMasen in der Replikation von Coronaviren zu charakterisieren, wurde die Expression von SMase-codierenden Transkripten unterdrückt. Für diese Arbeit wurden MISSION „endoribonuclease-prepared siRNA“ (esiRNA, Sigma Aldrich) verwendet. Die esiRNA wird durch die Spaltung eines langen doppelsträngigen RNA-Moleküls, welches komplementär zur Ziel-mRNA ist, gewonnen und stellt daher einen Pool an verschiedenen siRNA gegen dieselbe mRNA dar und erhöht somit die Effizienz des Knockdown. Als Kontrolle wurde die sogenannte MISSION siRNA-Universal-Negativkontrolle von Sigma-Aldrich verwendet. Eine Übersicht aller verwendeten esiRNAs wird in Tabelle 11 gegeben.

Tabelle 11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten MISSION esiRNA von Sigma-Aldrich.

Zielgen (Protein)	Herstellernummer
SMPD1 (aSMase)	EHU122691
SMPD2 (nSMase 1)	EHU120741
SMPD3 (nSMase 2)	EHU024631
SMPD4 (nSMase 3)	EHU116241
ANPEP (APN/CD13)	EHU037211
ACE2 (ACE2)	EHU033081
DPP4 (DPP4)	EHU058011
Universal-Negativkontrolle	SIC002

Material und Methoden

2.4.2 Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen

Für das Einbringen der verwendeten siRNAs (Tabelle 11) in Huh-7-ACE2-Zellen wurde Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Thermo Fisher) verwendet.

Hierfür wurden Huh-7-ACE2 Zellen in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und anschließend direkt transfiziert. In einem Reaktionsgefäß wurden 100 nM siRNA in 50 µl Opti-MEM angesetzt, während in einem separaten Reaktionsgefäß 3 µl Lipofectamine RNAiMAX in 50 µl Opti-MEM pipettiert wurden. Die Lösungen wurden anschließend miteinander gemischt und nach 5 min Inkubationszeit auf die Zellen getropft. Die behandelten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C inkubiert.

2.4.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Um die Knockdown-Effizienz der siRNAs zu validieren, wurde nach siRNA-Transfektion eine RT-qPCR zur Quantifizierung der Ziel-mRNA durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert. Für die RNA-Isolation wurde das RNeasy Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration der isolierten RNA wurde am Nanodrop 1000 Spectrophotometer (PepLab) gemessen und anschließend auf eine Konzentration von 5 ng/µl eingestellt. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Kits für die RT-qPCR verwendet: Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (NEB) und 4X CAPITAL™ 1-Step qRT-PCR Green Master Mix (Biotech Rabbit). Beide Kits ermöglichen eine sogenannte „one step-PCR“, d.h. eine reverse Transkriptase ist im Kit enthalten und schreibt zu Beginn der Reaktion zunächst die RNA in cDNA um. Als Haushaltsgen (eng. „housekeeping gene“) wurde in dieser Arbeit die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Der Vergleich der behandelten (siRNA-transfizierten) Proben gegen die Negativkontrolle erfolgte mittels der sogenannten delta-delta C_t-Methode (ΔΔC_t-Methode). Hierbei wird zunächst der ΔC_t-Wert aus der Differenz des C_t-Wertes des zu untersuchenden Gens („gene of interest“, GOI) und des C_t-Wertes des Haushaltsgens (HG) gebildet:

$$\Delta C_t = C_t (\text{GOI}) - C_t (\text{HG})$$

Der ΔΔC_t-Wert wird anschließend aus der Differenz des ΔC_t-Wertes der behandelten Proben und des ΔC_t-Wertes der Kontrolle errechnet:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{behandelt}) - \Delta C_t (\text{Kontrolle})$$

Material und Methoden

Der finale Wert für die relative Genexpression, der in dieser Arbeit verwendet wurde, wird wie folgt berechnet:

$$\text{relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Tabelle 12: Das in dieser Arbeit verwendete PCR-Programm für die RT-qPCR bei Verwendung des 4X CAPITAL™ 1-Step qRT-PCR Green Master Mix.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer [s]
Reverse Transkription	50	600
Initiale Denaturierung	95	180
Denaturierung	95	10
Annealing/Extension	62	30
45 Zyklen der Schritte 3 und 4		
Schmelzkurvenanalyse	72	600

Tabelle 13: Das in dieser Arbeit verwendete PCR-Programm für die RT-qPCR bei Verwendung des Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer [s]
Reverse Transkription	50	600
Initiale Denaturierung	98	60
Denaturierung	98	10
Annealing/Extension	72	330
30 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
Schmelzkurvenanalyse	72	600

Material und Methoden

Tabelle 14: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer für die RT-qPCR

Name	Sequenz
SMPD1_fwd	GCTGGCTCTATGAAGCGATGGC
SMPD1_rev	AGAGCCAGAAGTTCTCACGGGA
SMPD2_fwd	CAGGAGCTTACCCAGCACAT
SMPD2_rev	GTTGAGCACCATGCCACTTA
SMPD3_fwd	CGCATTCAAGGGCAATTACATTTT
SMPD3_rev	AAGTGAGGGTTGGTTTTGTGATT
SMPD4_fwd	TGGAGATGTGGCTGAGCTACCT
SMPD4_rev	CAGCAGGTTCTCCTGGACAAAG
CD13_fwd	GTAATACGACTCACTATAGGGCCAGGG
CD13_rev	AATTAACCCTCACTAAAGGGCCACCAG
ACE2_fwd	TGGGACTCTGCCATTTACTTAC
ACE2_rev	CCCAACTATCTCTCGCTTCATC
DPP4_fwd	GGCACCTGGGAAGTCATCGGGA
DPP4_rev	AGAGGGGCAGACCAGGACCG
GAPDH_fwd	CTGCTCCTCCTGTTCGACAGT
GAPDH_rev	CCGTTGACTCCGACCTTCAC

2.5 Protein-Analyse

2.5.1 Isolation von Proteinen aus Zellen

Für die Detektion der viralen Proteine nsp3 und nsp4 nach Transfektion mit Expressionskonstrukten (Tabelle 4) wurde eine Proteinisolation mit nachfolgendem Western Blot durchgeführt. Hierfür wurden HEK-293-ACE2-Zellen in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. 24 Stunden nach der Transfektion (h p. t.) (Abschnitt 2.3.7) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 150 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Dodecylmaltoside (ThermoFisher Scientific), 5% [v/v] Glycerol) pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden im Lysepuffer von der Zellkulturplatte abgekratzt und in Reagiergefäße überführt. Die Zellysate wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min mit 15.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Abschließend wurde der lösliche Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt. Die Lagerung der Lysate für die weitere Verwendung, soweit nicht direkt nachfolgend, erfolgte bei -20 °C.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den Zelllysaten wurde mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) durchgeführt. Für die Durchführung des BCA-Assays in dieser Arbeit wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörper wurden die Proteine innerhalb eines zu untersuchenden Zelllysates zunächst mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (engl. „sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis“) aufgetrennt. Dafür wurden im ersten Schritt die Zelllysate mit 3x Proteinprobenpuffer-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 20 % [v/v] Glycerol, 4% [w/v] SDS, 10 % [w/v] 2-Mercaptoethanol und 0,02 % [w/v] Bromphenolblau) vereint und für 20 min bei Raumtemperatur (RT) denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel geladen. Die Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele kann der Tabelle 15 entnommen werden. Die Proteine in den Proben wurden anschließend im Polyacrylamidgel durch Anlegen einer Stromstärke von 35 mA mit konstanter Spannung und Verwendung eines SDS-Laufpuffers (25 mM Tris, 0,192 M Glyzin, 0,1 % [w/v] SDS) aufgetrennt.

Tabelle 15: Komponenten für die Herstellung von Trenn- und Sammelgelen für SDS-Polyacrylamidgele. Die Angaben (in ml) beziehen sich auf die Herstellung von 2 großen Gelen.

Komponente	Trenngel			Sammelgel
	8 %	10 %	12%	
H ₂ O	7,5	6,4	5,4	4,7
30% Acrylamid-Bisacrylamid-Mix	4,2	5,3	6,3	0,91
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	3,9	3,9	3,9	-
0.5 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	0,875
10% [w/v] SDS	0,158	0,158	0,158	0,070
10% [w/v] APS	0,079	0,079	0,079	0,035
TEMED	0,0079	0,0079	0,0079	0,007
Total	~ 15,85	~ 15,85	~ 15,85	~ 6,6

Material und Methoden

2.5.4 Western Blot

Um den spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörper durchführen zu können, wurden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-ECL, GE Healthcare) transferiert. Dazu wurden drei Lagen Whatman-Filterpapier und die Membran in ein Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad) überführt. Das Polyacrylamidgel wurde auf die Membran platziert und mit weiteren drei Lagen Whatman-Papier bedeckt. Die Whatman-Papiere und die Nitrozellulosemembran wurden vorher mit Transferpuffer (25mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % [v/v] Methanol) befeuchtet. Das Blotting erfolgte mit einer Stromstärke von bis zu 1 A bei konstanter Spannung von 25 V für 30 min. Im Anschluss wurde die Membran zur Beurteilung des Transfererfolgs mit einer Ponceau-Färbelösung (1 % [w/v] Ponceau S, 10 % [v/v] Essigsäure) für 1 min gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt. Durch Blocken der Membran mit 5 % [w/v] BSA in 1x PBS für 1 h bei RT wurde eine mögliche unspezifische Bindung von Antikörpern vermindert. Zum spezifischen Nachweis der getaggen viralen Proteine wurde die Membran mit einem monoklonalen Maus-anti-HA-Antikörper (1:1000 verdünnt in 3 % [w/v] BSA in PBS, 26183, Invitrogen) und einem monoklonalen Kaninchen-anti-V5-Antikörper (1:1000 verdünnt in 3 % [w/v] BSA in PBS, #13202, Cell Signaling Technology) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein monoklonaler Maus-anti-GAPDH-Antikörper (1:5000 verdünnt in 3 % [w/v] BSA in PBS, ab8245, Abcam). Am Folgetag wurde die Membran 5x mit 0,1 % [v/v] Tween 20 in 1x PBS (PBST) gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (IRDye 800 Ziege-anti-Kaninchen-IgG oder IRDye 680 Ziege-anti-Maus-IgG [LI-COR], 1:25.000 verdünnt in 3 % [w/v] BSA in PBS) für zwei Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundene Sekundärantikörper wurden durch 5x Waschen mit 1x PBST entfernt. Die fluoreszenzmarkierten Proteine wurden mit einem Odyssey Infrared Imager (Model 9120, LI-COR) nachgewiesen. Die Bearbeitung von Western-Blot-Aufnahmen vom Odyssey Infrared Imager erfolgte mittels Fiji (Open Source).

2.6 Bildgebende Verfahren

2.6.1 Immunfluoreszenz

Für die Detektion von viralen und zellulären Proteinen mittels Immunfluoreszenz wurden Zellen in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen, in die vorher ein steriles Deckglaschen (Ø12 mm, Th. Geyer) platziert wurde, ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von

Material und Methoden

ungefähr 90 % wurden die Zellen entsprechend des Versuches mit (i) Coronaviren infiziert, (ii) mit den Konstrukten zur Überexpression von nsp3 und nsp4 transfiziert (Tabelle 4) und/oder (iii) mit Inhibitoren behandelt (Tabelle 2) und nach einer definierten Zeitspanne mit 3,7 % [v/v] PFA für mindestens 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit 1x PBS gewaschen und dann permeabilisiert. Hierbei kamen zwei unterschiedliche Verfahren zum Einsatz: Für die Detektion von Proteinen oder Nukleinsäuren wurden die Zellen mit 0,5 % [v/v] Triton X-100 in 1x PBS für mindestens 30 min bei RT permeabilisiert. Sollten dagegen Lipide (z. B. Ceramide) detektiert werden, so erfolgte die Permeabilisierung unter Verwendung von 0,5 % [w/v] Saponin (Sigma-Aldrich) in der Antikörperlösung. Ein wichtiger Unterschied zwischen Saponin und Triton als Reagenz für die Permeabilisierung ist hierbei die Tatsache, dass Saponin selektiv Cholesterol aus der Zellmembrane entfernt und somit zur Porenbildung führt, die den Eintritt der Antikörper für die intrazelluläre Färbung erlaubt. Triton X-100 dagegen entfernt nicht-selektiv Lipide und Proteine aus Membranen und kann somit auch Lipide (also die Zielmoleküle der Immunfluoreszenz in einigen der hier durchgeführten Experimente) aus der Zelle waschen. Nach Permeabilisierung der Zellen wurden die Deckgläschen 3x mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf einen Tropfen Antikörperlösung (1. Antikörper 1:100 verdünnt in 3 % [w/v] BSA in 1x PBS), welcher auf ein Stück Parafilm in einer feuchten Kammer pipettiert wurde, gelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper in dieser Arbeit sind in Tabelle 16 aufgeführt und werden bei Verwendung in den Abbildungsbeschriftungen unter dem jeweiligen Versuch im Ergebnisteil erwähnt. Anschließend wurden die Deckgläschen 3x mit PBS gewaschen und wieder in eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen platziert. Hier erfolgte nun die Inkubation für 2 h im Dunkeln mit dem passenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500 verdünnt in 3 % [w/v] BSA in 1x PBS, Tabelle 17). Zur Färbung des Zellkerns enthielt die Antikörperlösung zusätzlich zum 2. Antikörper auch 1:1000 verdünntes 4',6-Diamin-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich). Final wurde erneut 3x mit 1x PBS gewaschen und die Deckgläschen für 4 h bei RT im Dunklen mit Einbettmedium (Prolong Gold, Invitrogen) auf Objektträgern eingebettet. Anschließend konnten die gefärbten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 2.7.2 und 2.7.3) analysiert werden.

Material und Methoden

Tabelle 16: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper für die Immunfluoreszenz.

Antikörper	Spezies	Hersteller(nummer)
α -N HCoV-229E	Maus	Ingenasa (M.30.HCoV.11E7)
α -N SARS-CoV-2	Maus	Invitrogen (MA5-29981)
α -N MERS-CoV	Maus	Sino Biological (40068-MM10)
α -dsRNA	Maus	SCICONS English & Scientific Consulting Kft. (J2)
α -Ceramide	Maus	Enzo (ALX-804-196-Z050)
α -HA	Maus	Invitrogen (26183)
α -V5	Kaninchen	Cell Signaling Technologie (#13202)

Tabelle 17: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz.

Antikörper	Spezies	Hersteller(-nummer)
α -mouse Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen (A11001)
α -mouse Alexa Fluor 594	Ziege	Invitrogen (A11005)
α -mouse Alexa Fluor 633	Ziege	Invitrogen (A21050)
α -rabbit Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen (A11070)
α -rabbit Alexa Fluor 594	Ziege	Invitrogen (A32740)

2.7.2 Quantifizierung von fluoreszenzmarkierten Zellen

Um Infektionsraten oder Transfektionseffizienzen objektiv zu quantifizieren, wurden entsprechende Fluoreszenzmarker und das ImageXpress Pico Automated Cell Imaging System (Molecular Devices) verwendet. Dieses digitale Mikroskop erkennt automatisiert die Gesamtzellzahl anhand des DAPI-Signals. Zusätzlich wird automatisiert die Anzahl an Zellen bestimmt, die positiv für einen zuvor festgelegten Fluoreszenzmarker sind. Diese können mittels des Programms CellReporterXpress (Molecular Devices) in Relation gesetzt werden und somit Auskunft über Infektionsraten oder Transfektionseffizienzen einer adhärenen Zellpopulation geben.

2.7.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die Detektion der subzellulären Lokalisation von Zielstrukturen und -molekülen wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop SP05 (Leica) verwendet. Zur Analyse der gefärbten Zellen wurden die Laser 405 Diode, Argon, DPSS 561, HeNe594 und HeNe633 verwendet. Mikroskopiert wurde mit einem 63x Immersionsöl-Objektiv, wobei jeweils aus 4 Scans ein Durchschnittsbild erstellt wurde. Die Öffnung der Lochblende betrug 1 airy unit (AU), wodurch das beste Signal-zu-Rauschen-Verhältnis erhalten werden konnte.

2.7.4 Bildverarbeitung und Kolokalisationsrate

Konfokalmikroskopische Bilder wurden anhand des Programms LAS-X (Leica) und Imaris 8.4.2 (Bitplane) ausgewertet. Um Kolokalisationsraten zu ermitteln (z.B. die prozentuale Kolokalisationsrate von dsRNA-Signalen oder HA- oder V5-Tags mit Ceramiden, Eqt-SM oder der nSMase2) wurden die Bilder mit dem Programm Imaris 8.4.2 (Bitplane) unter der Verwendung der automatisierten Schwellenwerteinstellung (engl. *automatical threshold settings*) ausgewertet.

2.7.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die Untersuchung von artifiziell-erzeugten ROs mittels TEM wurden Huh-7-ACE2-Zellen in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5, pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A oder pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_C1701A unter Verwendung von PEI STAR transfiziert (Abschnitt 2.3.8.). Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit HCoV-229E mit einer MOI von 3 für 10 Stunden infiziert wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA3.1 transfiziert wurden. 24 Stunden nach Transfektion bzw. 10 Stunden nach Infektion wurde 1 ml einer Fixierlösung mit 4 % [v/v] PFA und 5 % [v/v] Glutaraldehyd in PBS zum Zellkulturüberstand pipettiert und die Zellen für 1 h vorfixiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen über Nacht mit 2 % [v/v] PFA und 2,5 % [v/v] Glutaraldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit 1 % Tanninsäure (Sigma-Aldrich) bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen von den Vertiefungen gekratzt und für 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Die fixierten Proben wurden anschließend für die weitere Bearbeitung an Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen übergeben. Dort erfolgte zunächst ein dreimaliges Waschen der Proben mit 0,15 M HEPES. Anschließend wurden die Proben für 2 h mit 1 % [v/v] Osmiumsäure (Merck) inkubiert, welches ein Nachfixieren der Probe, insbesondere der enthaltenen Lipide, zur Folge hat. Danach wurden die Proben dreimal mit H₂O gewaschen, gefolgt von einer Inkubation in 2 % [w/v] Uranylacetat (Merck) über Nacht. Das Uranylacetat dient der Kontrastierung der Proben durch das Einbringen von Schwermetallen. Nach erneutem Waschen mit H₂O erfolgte das Entwässern der Proben durch eine Alkoholreihe. Hierfür wurde Ethanol in aufsteigender Konzentration (30/50/70/80/90/96/100 %) jeweils für 15 min zu den Proben gegeben. Im Anschluss erfolgte die Einbettung der Proben in AGAR 100 (Agar Scientific Ltd). Nach Aushärten

Material und Methoden

des Agars wurden die Proben unter Verwendung eines Mikrotoms in ultradünne Schnitte geschnitten und auf Raster-Grids übertragen. Die Proben wurden dann mit Uranylacetat und einer Blei-(II)-Citrat-Lösung (Merck) gefärbt. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Proben am Transmissionselektronenmikroskop LEO 906 (Zeiss) mit einer 2 K CCD Kamera (TRS) bei einer Spannung von 80 kV.

2.7 Sphingolipid-Analyse

Um Veränderungen im Sphingolipidhaushalt zu untersuchen, die durch (i) verschiedene Coronaviren in verschiedenen Zellsystemen (Huh-7-ACE2, A549-ACE2, A549-CD13 und MRC-5) oder (ii) die Induktion von artifiziellen ROs durch Überexpression von HCoV-229E nsp3-4 hervorgerufen werden, wurde der zelluläre Sphingolipidgehalt mittels Massenspektrometrie quantifiziert.

2.7.1 Infektionen für Sphingolipid-Analyse

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich möglicher Veränderungen des zellulären Sphingolipidhaushaltes bei Infektionen mit verschiedenen Coronaviren zu untersuchen, wurden Huh-7-ACE2-, A549-ACE2, A549-CD13- oder MRC-5-Zellen in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. In einer der Vertiefungen wurden vorher Deckgläser platziert, um später eine Validierung des Infektionserfolges mittels Immunfluoreszenz durchführen zu können. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 95 % wurden die Zellen mit dem jeweiligen Coronavirus mit einer MOI von 3 inokuliert. Tabelle 1 zeigt die Suszeptibilität der verwendeten Zelllinien für die hier untersuchten Coronaviren. Nach 1 h wurde das Inokulationsmedium entfernt und die Zellen einmal mit FBS-freiem Medium gewaschen. Anschließend wurde frisches FBS-freies Medium zu den infizierten Zellen gegeben. Im Falle der Huh-7-ACE2-Zellen wurden die Zellen bereits nach 1 h und 6 h p. i. für die weiteren Untersuchungen aufbereitet (siehe unten). 12 h p. i. wurde der Überstand von den Zellen in Reaktionsgefäße überführt, um ihn für eine spätere Titration mittels Plaque-Assay (Abschnitt 2.2.4.) verwenden zu können. Daraufhin wurden die Zellen für die weiteren Untersuchungen aufbereitet.

Hierfür wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen von 5 Vertiefungen in 1 x PBS unter Verwendung von Zellschabern (Greiner) abgeschabt, in 2-ml-SafeSeal-Reaktionsgefäße transferiert und mit 1.000 x g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen in der Vertiefung mit den Deckgläsern mit 3,7 % Paraformaldehyd fixiert (in Vorbereitung auf eventuell nachfolgende

Immunfluoreszenz-Analysen) und bei 4 °C gelagert. Nach Abschluss der Zentrifugation wurde das PBS von den Zellpellets entfernt. Die Pellets wurden in 500 µl Methanol (ROTISOLV ≥ 99,95 %, LC-MS Grade, Carl Roth) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.7.2 Transfektionen für Sphingolipid-Analyse

Für die Analyse des Effektes der Überexpression des nsp3-4 von HCoV-229E auf den Sphingolipidhaushalt der transfizierten Zellen wurden Huh-7-ACE2-Zellen zunächst in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. In einer der Vertiefungen wurden vorher Deckgläser platziert, um später eine Validierung des Infektionserfolges mittels Immunfluoreszenz durchzuführen. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 95 % wurden die Zellen mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert (für das Transfektionsprotokoll siehe Abschnitt 2.3.8.). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für die weiteren Untersuchungen aufbereitet (Abschnitt 2.6.1.).

2.7.3 Sphingolipidisolierung und -analyse

Die Analyse der Sphingolipide in den in Methanol gelösten Proben aus Abschnitt 2.6.1 und 2.6.2. erfolgte durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Burkhard Kleuser (Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin). Zunächst wurde 1 ml eines Chloroform-Methanol-Gemischs (1:1 [v/v]) zusammen mit internen Lipidstandards zu den Proben gegeben. Als interne Lipidstandards dienten d7-dhSph, d7-Sph, d7-S1P, C17:0 Cer (d18:1/17:0), d31-C16:0 SM (d18:1/16:0-d31), 17:0 Glucosyl(β)-Cer (d18:1/17:0) und 17:0 Lactosyl(β)-Cer (d18:1/17:0) (Avanti Polar Lipids). Anschließend wurden die Proben für 16 h bei 48 °C und 120 rpm inkubiert. Die Proben wurden daraufhin für 10 min bei 4 °C gelagert und dann mit 150 µl Kaliumhydroxid (1 M) versetzt. Dieser Schritt diente der Verseifung der Proben und erfolgte für 2 h bei 37 °C und 120 rpm. Anschließend wurden die Proben wieder für 20 min bei 4 °C gelagert, 12 µl Eisessig zu den Proben pipettiert, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 3.600 rpm und 4 °C. Die organische Phase wurde abgenommen und in einer Savant SpeedVac (Thermo Fisher) getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 200 µl eines Acetonitril-Methanol-Wasser-Gemischs (47,5 [v/v] % Acetonitril, 47,5 % [v/v] Methanol, 0,1 % [v/v] Ameisensäure) aufgenommen und für 10 min bei 1.500 rpm geschüttelt, gefolgt von einer Zentrifugation bei 3.600 rpm und 4 °C für 10 min. Die Analyse der Proben erfolgte anschließend mittels „high-performance liquid chromatography“ (HPLC), gekoppelt an ein

Material und Methoden

Triple-Quadrupol „*time-of-flight*“ (QTOF) 6495C Massenspektrometer (Agilent Technologies) unter Verwendung von positiver Ionisierung (ESI+).

2.8 Statistik

Statistische Auswertungen wurden in dieser Arbeit mittels Excel 2016 (Microsoft) oder GraphPad Prism Version 9.2.0 (GraphPad) ausgewertet. Um die Signifikanz von Unterschieden zwischen verschiedenen Messwerten festzustellen, wurden statistische Tests aus dem Analysetool der Software GraphPad Prism verwendet. Der jeweils angewandte statistische Test wird in den Abbildungsbeschriftungen im Ergebnisteil benannt und die zugehörigen Signifikanzniveaus (p-Werte) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Die Rolle von zellulären Sphingomyelinasen in der Replikation von Coronaviren

3.1.1 Sphingolipidanalyse von Coronavirus-infizierten Huh-7-ACE2-Zellen

3.1.1.1 Huh-7-ACE2-Zellen sind ein geeignetes Zellkulturmodell für die Infektion mit verschiedenen Coronaviren

Diverse Publikationen der letzten Jahre haben aufgezeigt, dass Viren im Replikationsverlauf den Lipidstoffwechsel ihrer Wirtszelle deregulieren (118-120). Die hierdurch veränderten Lipidkonzentrationen haben entscheidenden Einfluss auf zelluläre Prozesse und Membraneigenschaften und somit auch auf verschiedenste Schritte des Replikationszyklus von Viren, welche in jedem Schritt des Replikationszyklus auf Wirtsmembranen angewiesen sind. Speziell für Sphingolipide wurde hierbei mehrfach, wie für verschiedene Vertreter der *Flaviviridae* gezeigt (129-132), eine wichtige Rolle beschrieben.

In dieser Arbeit sollte daher zunächst die Frage geklärt werden, welche zeitabhängigen Veränderungen des Sphingolipidhaushaltes durch Infektionen mit verschiedenen Coronaviren herbeigeführt werden. Hierbei sollten vor allem Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen verschiedenen Alpha- (HCoV-229E) und Betacoronaviren (SARS-CoV-2 und MERS-CoV) festgestellt werden. Grundvoraussetzung für die geplante vergleichende Lipidomanalyse sind dabei vergleichbare Replikationskinetiken und Infektionsraten in einem Zellsystem. Es wurden zunächst Huh-7-ACE2-Zellen verwendet, da sie von allen drei Viren infiziert werden können.

Hierbei zeigten alle drei Viren ähnliche Replikationskinetiken in Huh-7-ACE2-Zellen, wie aus den gemessenen Virustitern im zeitlichen Verlauf ersichtlich ist (Abbildung 10A). Nach 16 h p. i. wurden für alle drei Viren Titer von etwa 1×10^6 PFU/ml gemessen. Die Analyse der Infektionsrate erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Die Färbung mit einem anti-dsRNA-Antikörper zeigte, dass nach Infektion mit allen drei Viren die ersten dsRNA-Signale nach 8 h p. i. nachweisbar wurden (Abbildung 10B). Nach 16 h p. i. waren nahezu alle Zellen, unabhängig vom verwendeten Coronavirus, dsRNA-positiv. Zu diesem Zeitpunkt waren demzufolge fast alle Zellen der Kultur nachweisbar infiziert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse bestätigten, dass Huh-7-ACE2-Zellen permissiv für die drei verwendeten Coronaviren sind und zum Zeitpunkt 16 h p. i. vergleichbare Virustiter produzieren und ähnliche Infektionsraten aufweisen.

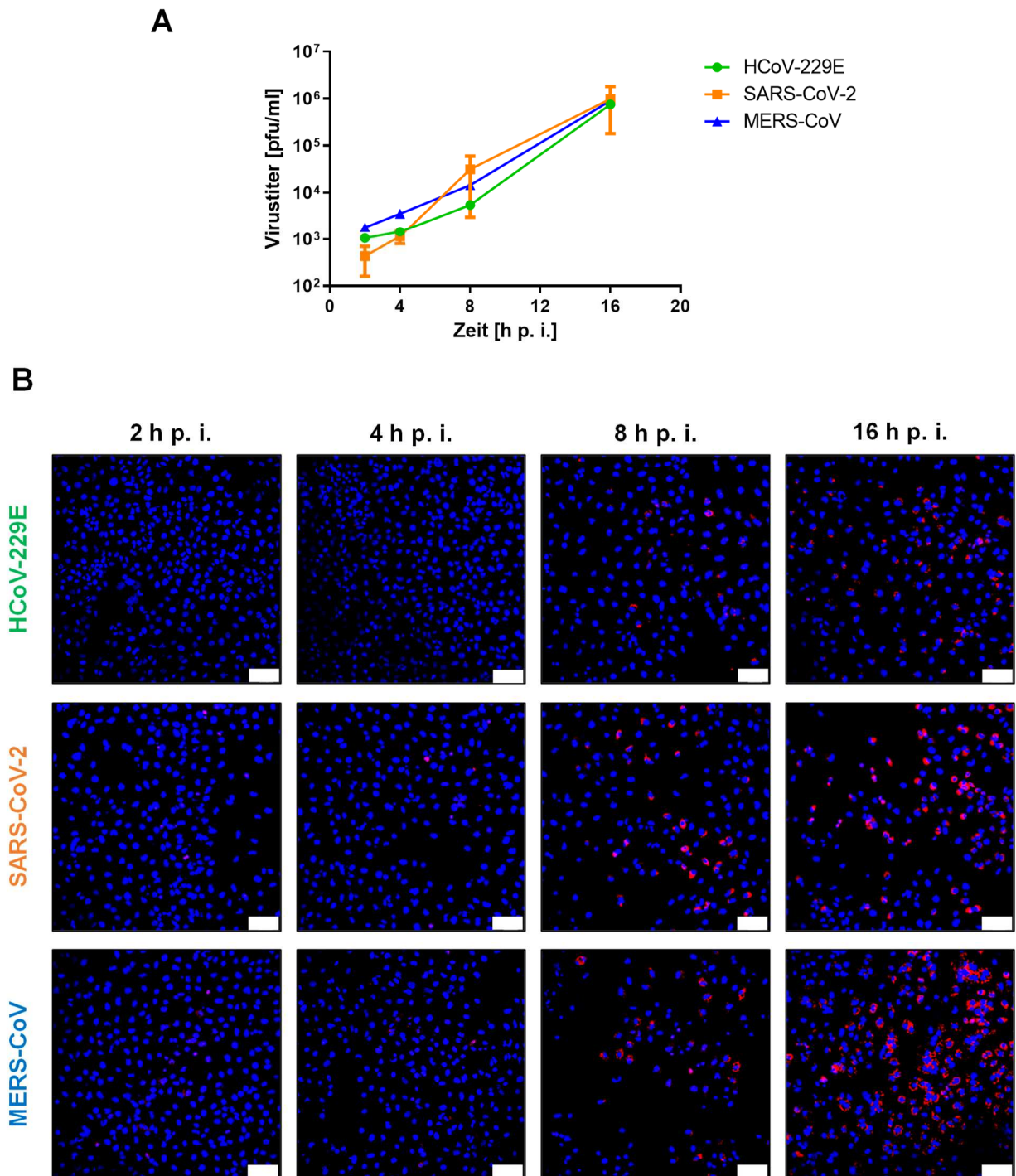


Abbildung 10: Wachstumskinetiken und Bildung von ROs von verschiedenen Coronaviren in ACE2-überexprimierenden Huh-7-Zellen (Huh-7-ACE2). Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV (MOI=3) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die Virustiter wurden mittels Plaque-Assay bestimmt (**A**). Zur Detektion der viralen ROs (**B**) wurden die Zellen gewaschen, mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert und anschließend mit einem monoklonalen Maus-anti-ds-RNA Antikörper angefärbt (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Dargestellt sind repräsentative Abbildungen von zwei biologisch unabhängigen Replikaten. Die dargestellten Messbalken entsprechen 100 μ m.

Ergebnisse

3.1.1.2 Sphingolipidanalyse der infizierten Huh-7-ACE2 zeigt eine zeitabhängige Deregulation der Sphingolipidhomöostase

Um den Einfluss verschiedener Schritte des coronaviralen Replikationszyklus auf den Sphingolipidhaushalt der infizierten Zellen zu untersuchen, wurden drei Zeitpunkte in der frühen, mittleren und späten Phase der exponentiellen Virusreplikation untersucht: 1, 6 und 12 h p. i. Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen.

Für die Validierung der Infektionseffizienz wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten die Virustiter im Zellkulturüberstand der infizierten Zellen bestimmt. Für alle drei Viren wurden 12 h p. i. Titer im Bereich von 10^5 bis 10^6 PFU/ml nachgewiesen (Abbildung 11A). Weiterhin wurde die Infektionsrate der Viren in den infizierten Zellen mittels immunologischer Färbung des viralen N-Proteins untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass über 90 % der mit MERS-CoV infizierten Huh-7-ACE2-Zellen N-positiv waren (Abbildung 11B). Für SARS-CoV-2 und HCoV-229E wurde dagegen eine etwas geringerer Anteil (<70 %) N-positiver Zellen gemessen.

Abbildung 11C zeigt die infektionsinduzierten Veränderungen ausgewählter Lipide im Vergleich zu uninfizierten Kontrollzellen zu den drei gewählten Zeitpunkten. Insgesamt zeigen die hier erhobenen Daten, dass die Infektion mit unterschiedlichen Coronaviren zu einer vergleichbaren zeitabhängigen Deregulation verschiedener Sphingolipidspezies führt.

Nach 1 h p. i. konnten nur minimale Veränderungen in den verschiedenen Sphingolipidspezies detektiert werden. So konnten für HCoV-229E zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. Die Infektion mit MERS-CoV führte nur zu einer einzigen signifikanten Änderung nach 1 h p. i., nämlich einer Reduktion von dhSM 20:0. Auffällig ist eine signifikante Hochregulation von zwei Cer-Spezies in den SARS-CoV-2-infizierten Zellen nach 1 h p. i., die nach Infektion mit den beiden anderen Coronaviren nicht nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte eine signifikante Herabregulation von einzelnen dhCer-, dhSM- und SM-Spezies nachgewiesen werden. 6 h p. i. konnte infolge der Infektion mit den drei Viren ein Anstieg mehrerer dhCer- und Cer-Spezies detektiert werden. Am deutlichsten waren diese Veränderungen in den SARS-CoV-2-infizierten Zellen. Die Cer-Spezies Cer 24:0 und Cer 24:1 wurden infolge der Infektion mit jedem der drei Viren signifikant hochreguliert, was ein erster Hinweis auf einen konservierten Mechanismus innerhalb der Coronaviren ist.

Nach 12 h p. i. konnten die deutlichsten Veränderungen der Sphingolipidspiegel infizierter Zellen festgestellt werden. Für HCoV-229E konnte eine signifikante Veränderung von 26 Sphingolipidspezies beobachtet werden, für SARS-CoV-2 von 28 und für MERS-CoV von 26 Sphingolipidspezies. Hervorzuheben ist dabei, dass die Infektion mit allen drei Viren übereinstimmend eine Hochregulation von Cer und dhCer nach 12 hpi zur Folge hatte, während für SM eine Herabregulation bestätigt wurde. Weiterhin konnte eine Herabregulation von LacCer nach Infektion mit allen drei Viren festgestellt werden. Es konnten jedoch auch Unterschiede zwischen den drei Coronaviren nachgewiesen werden. Die Infektion mit HCoV-229E führte zu einer signifikanten Reduktion verschiedener dhSM-Spezies, die jedoch nicht in vergleichbarer Weise für Zellen nachweisbar war, die mit den anderen beiden Coronaviren infiziert worden waren. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Infektionen mit SARS-CoV-2 zu einem Anstieg von HexCer 16:0 führen, während bei den anderen beiden Coronaviren keine Änderung im Vergleich zu uninfizierten Zellen festgestellt wurde. Hingegen führten Infektionen mit HCoV-229E und MERS-CoV zu einer signifikanten Absenkung von HexCer 24:1, während die Infektion mit SARS-CoV-2 keinen Effekt hatte.

Um übereinstimmende Deregulationsmuster des Sphingolipidhaushaltes coronavirus-infizierter Zellen graphisch darzustellen, wurden Venn-Diagramme erstellt (Abbildung 11D). Die Venn-Diagramme verdeutlichen die bereits beschriebene Beobachtung, dass die Infektion mit allen drei Viren zu einer Hochregulation von bestimmten Cer- und dhCer-Spezies führt, während SM-Spezies herabreguliert wurden.

Dieser Effekt deutet auf eine Beteiligung von SMasen hin. SMasen sind zelluläre Enzyme, die die Hydrolyse von SM zu Cer und Phosphorylcholin katalysieren. Eine vermehrte Produktion oder Aktivierung von SMasen infolge der Coronavirus-Infektion wäre eine Erklärungsmöglichkeit für den beobachteten Phänotyp der Cer-Erhöhung und SM-Reduktion. Die mögliche Beteiligung von SMasen an der Infektion und Replikation von Coronaviren wurde daher in einem weiteren Schritt näher untersucht.

Ergebnisse

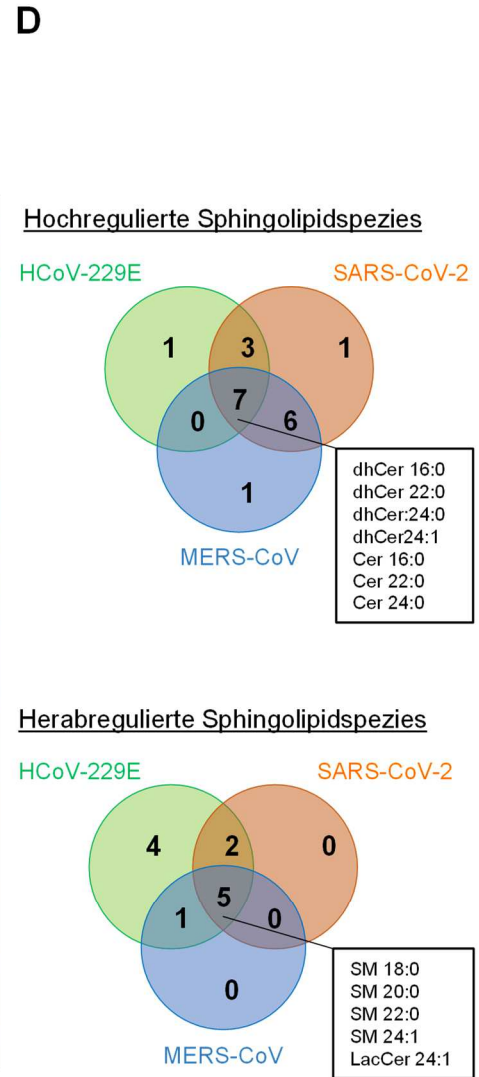
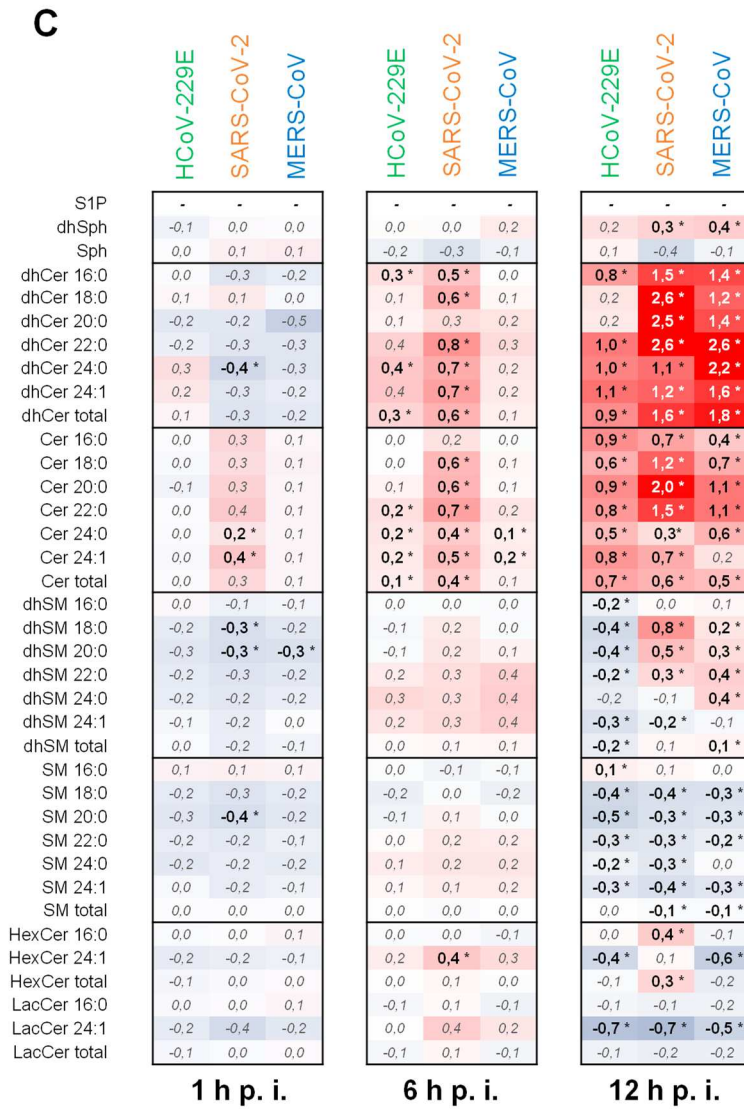
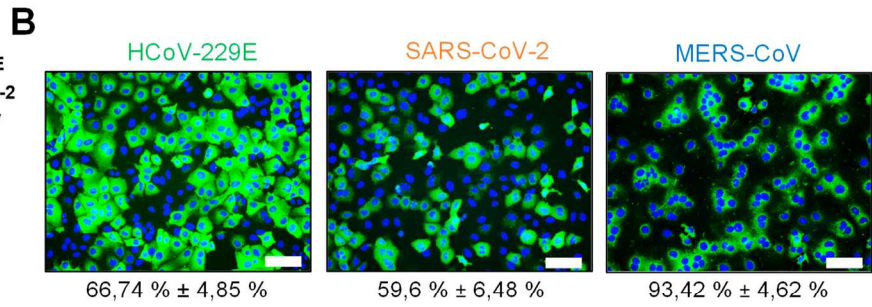
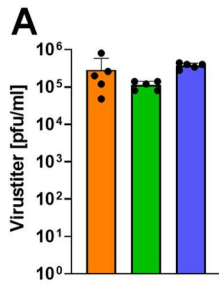


Abbildung 11: Analyse des Sphingolipidoms coronavirus-infizierter Huh-7-ACE2-Zellen.

Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=3). Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, pelletiert und in Methanol aufgenommen. Nach 12 h p. i. wurden die Überstände für die Titerbestimmung mittels Plaque-Assay **(A)** abgenommen. Parallel wurden infizierte Zellen in einer separaten Vertiefung gewaschen und mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert für die weitere Untersuchung mittels Immunfluoreszenz **(B)**. Zur Detektion des coronaviralen N-Proteins wurden monoklonale Maus-Antikörper gegen das N-Protein des jeweiligen CoVs verwendet (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Unter dem jeweiligen repräsentativen Bild ist die relative Anzahl N-positiver Zellen in % angegeben. Die Größe des Messbalkens entspricht 100 µm. **(C)** Für die eigentliche Sphingolipidanalyse wurden die extrahierten Lipide mittels HPLC-MS/MS analysiert. Zur Quantifizierung dienten deuterierte Sphingolipide als interne Standards. Die erhaltenen Daten wurden auf den Gesamtlipidgehalt normalisiert und die Änderung zur unbehandelten, uninfizierten Kontrolle berechnet. Die dargestellten Heatmaps zeigen die log₂-fachen Veränderungen der Sphingolipid-Spezies zwischen infizierten und nicht infizierten Proben von 5 Messwerten (aus 2 biologisch unabhängigen Replikaten). Fett markierte und mit einem Stern gekennzeichnete Zahlenwerte entsprechen einer signifikanten Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($P < 0,05$, *one-way ANOVA*, Dunnett-Test für mehrere Vergleiche). **(D)** Venn-Diagramme zur Darstellung von Sphingolipidspezies, die 12 h p. i. bei Infektionen mit einem der drei Coronaviren übereinstimmend als signifikant hoch- bzw. runterreguliert bestätigt wurden.

3.1.2 Untersuchung der Effekte von pharmakologischer und genetischer Inhibition von SMasen auf die Replikation von Coronaviren

3.1.2.1 Pharmakologische Inhibition von SMasen zeigt unterschiedliche Abhängigkeit der coronaviralen Replikation von SMasen

Das Verhältnis von SM zu Cer ist von wesentlicher Bedeutung für die biophysikalischen Eigenschaften von zellulären Membranen. Auf zellulärer Ebene wird dieses Verhältnis unter anderem durch die SMasen reguliert, die die hydrolytische Spaltung von SM zu Cer und Phosphorylcholin katalysiert. Aufgrund der zentralen Bedeutung der SMasen wurden in den letzten Jahren verschiedene Inhibitoren entwickelt, die die Aktivität unterschiedlicher SMasen blockieren. Für viele dieser Inhibitoren konnte bereits eine antivirale Wirkung gezeigt werden, unter anderem für die funktionalen Inhibitoren der aSMase (FIASMA, Beispiele: Amitryptilin, Desipramin, Fluoxetine) (162-164) und Inhibitoren der verschiedenen nSMasen (Beispiele: GW4869, PDDC) (200, 211-213). Aufgrund der Vermutung, dass SMasen eine Rolle in der Replikation von Coronaviren haben, wurden verschiedene SMase-Inhibitoren auf ihre antivirale Wirkung getestet:

Ergebnisse

(i) Für die Inhibition der aSMase wurden die Moleküle ARC39 und PCK310 verwendet, welche von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Arenz (Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin) entwickelt wurden.

(ii) Für die Inhibition der nSMasen wurden die Moleküle GW4869 und PDDC verwendet. GW4869 ist ein nichtkompetitiver, unspezifischer Inhibitor der nSMasen 1, 2 und 3 (179, 205, 206), während PDDC ein nichtkompetitiver, selektiver Inhibitor der nSMase2 ist (207).

Zunächst wurde die Zytotoxizität der verschiedenen Inhibitoren in Huh-7-ACE2-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt und anschließend mittels MTT-Assay die metabolische Aktivität der Zellen untersucht. Durch Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle kann somit festgestellt werden, ob die Inhibitoren die Zellviabilität reduzieren und somit auch unabhängig von ihrer eigentlichen (spezifischen) Funktion einen negativen Einfluss auf die virale Replikation durch mögliche zytotoxische Nebeneffekte haben.

Für den aSMase Inhibitor ARC39 konnte bei einem Behandlungszeitraum von 24 h kein zytotoxischer Effekt auf die Zellen bis zu einer Konzentration von 100 μM festgestellt werden (Abbildung 12). Gleiches gilt für den Inhibitor PCK310, jedoch wurde dieser nur bis zu einer Konzentration von 1 μM getestet und verwendet, da hier eine bessere Aufnahme durch die Zellen zu erwarten war (Christoph Arenz, persönliche Mitteilung). Die beiden Inhibitoren der nSMasen GW4869 und PDDC wurden mit Konzentrationen bis maximal 100 μM im MTT-Assay getestet (Abbildung 12). Für GW4869 konnte keine Zytotoxizität im verwendeten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden, während für PDDC in den Huh-7-ACE2-Zellen ein CC_{50} -Wert von 72,29 μM festgestellt wurde. Daher wurde für die antivirale Testung von PDDC eine Konzentration von maximal 10 μM verwendet.

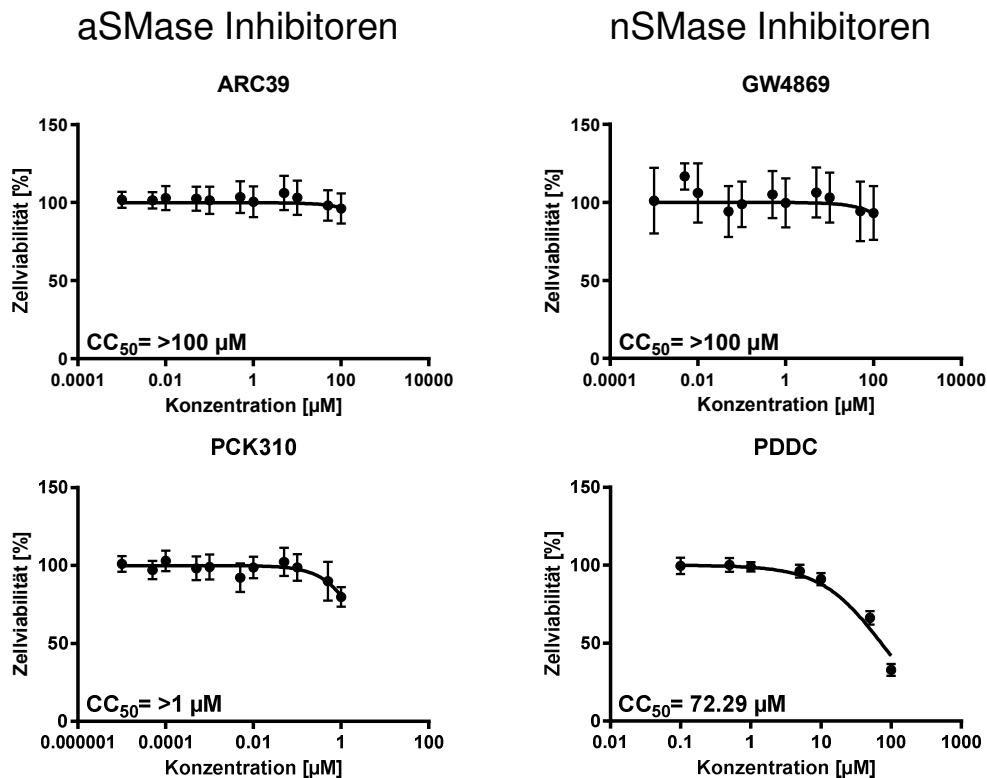


Abbildung 12: Bestimmung der Zellviabilität von Huh-7-ACE2-Zellen nach Behandlung mit den verwendeten SMase-Inhibitoren. Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Inhibitoren der aSMase (**A**) und Inhibitoren der nSMase (**B**) für 24 h behandelt. Die Zellviabilität wurde anschließend mittels MTT-Assay bestimmt. Aus den erhaltenen Messwerten ($n = 8$) für die behandelten und unbehandelten Zellen wurde ein Quotient gebildet, der hier in einer Prozentdarstellung mit der zugehörigen Standardabweichung (SD) gezeigt wird.

Nach der Bestimmung der Konzentrationsbereiche, in denen die Inhibitoren der SMasen keine Zytotoxizität zeigten, wurden die Inhibitoren auf potenzielle antivirale Effekte untersucht. Als Positivkontrolle wurden hierbei unbehandelte, infizierte Zellen verwendet. Für HCoV-229E und MERS-CoV konnte keine Reduktion der viralen Titer bei Verwendung der aSMase-Inhibitoren ARC39 oder PCK310 nachgewiesen werden (Abbildung 13). Beide Inhibitoren reduzierten jedoch die Replikation von SARS-CoV-2 mit der höchsten verwendeten, nichttoxischen Konzentration signifikant.

Ergebnisse

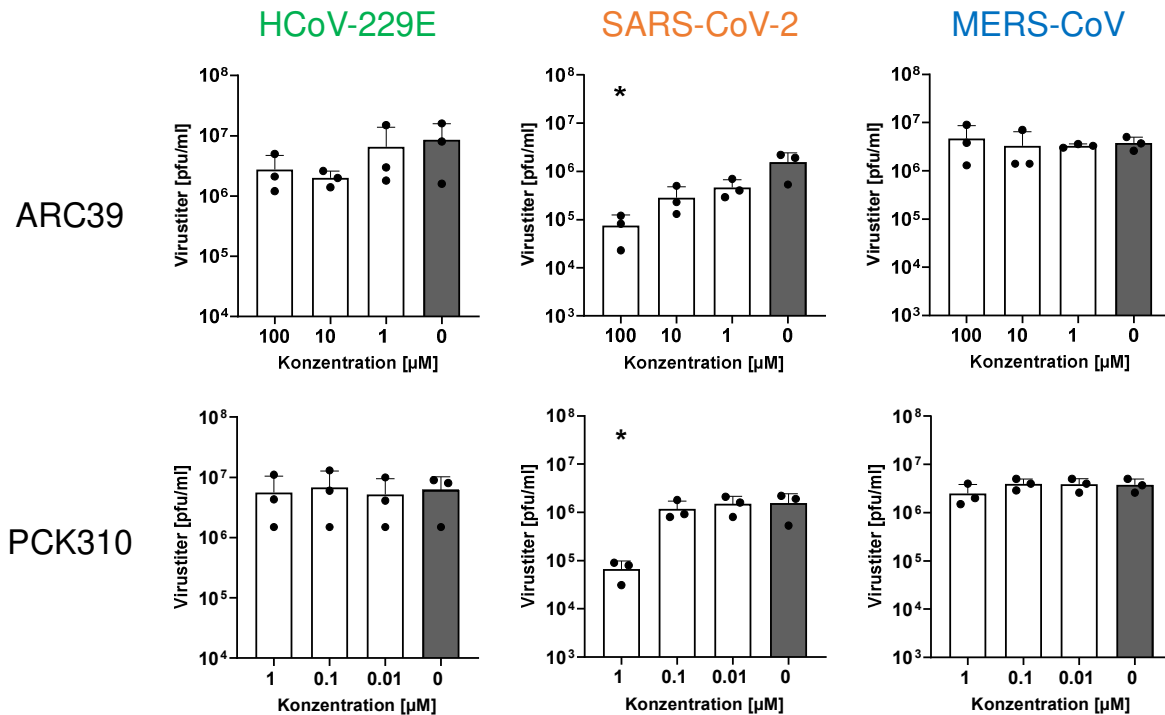


Abbildung 13: Effekt der Inhibitoren der aSMase auf die virale Replikation von verschiedenen Coronaviren in Huh-7-ACE2-Zellen. Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=0,1). Nach einer Stunde Inokulation wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium mit den angegebenen Konzentrationen von entweder ARC39 oder PCK310 ersetzt. Nach 24 h p. i. wurden die Überstände abgenommen und die Virusiter mittels Plaque Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen biologischen Replikaten mit den zugehörigen Standardabweichungen. Unterschiede zwischen den behandelten Proben und der unbehandelten Kontrolle wurden mittels t-test bestimmt (* P<0,05).

Im Gegensatz zu den oben gezeigten Daten zu den aSMase-Inhibitoren zeigten die hier verwendeten Inhibitoren der nSMasen einen antiviralen Effekt auf alle drei Coronaviren (Abbildung 14). Der unspezifische nSMase-Inhibitor GW4869 sowie der selektive nSMase2-Inhibitor PDDC reduzierte bei Verwendung der höchsten Konzentration die Titer von allen drei Coronaviren statistisch signifikant. Dieser inhibierende Effekt war am stärksten bei SARS-CoV-2 ausgeprägt; hier führte der Einsatz von 10 µM PDDC zu einer Reduktion der Titer um zwei Logstufen. Auch konnte bei Einsatz der nächstniedrigeren Konzentration von 5 µM eine statistisch signifikante Reduktion der SARS-CoV-2-Replikation festgestellt werden. Der Einsatz von 5 µM PDDC verursachte bei HCoV-229E und MERS-CoV dagegen keine erkennbare Veränderung der viralen Titer.

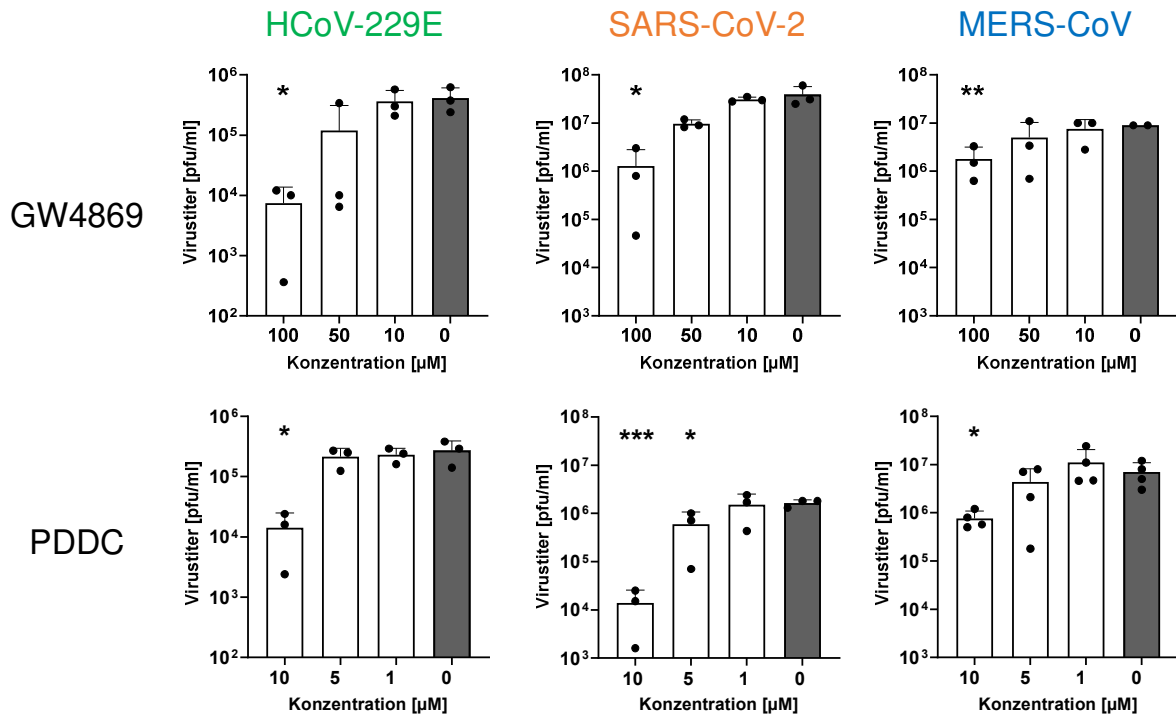


Abbildung 14: Effekt der Inhibitoren der nSMasen auf die virale Replikation von verschiedenen Coronaviren in Huh-7-ACE2-Zellen. Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=0,1). Nach einer Stunde Inokulation wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium mit GW4869 oder PDDC in den angegebenen Konzentrationen ersetzt. Nach 24 h p. i. wurden die Überstände abgenommen und die Virus-titer mittels Plaque-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten mit den zugehörigen Standardabweichungen. Unterschiede zwischen den behandelten Proben und der unbehandelten Kontrolle wurden mittels t-test bestimmt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Die gewonnenen SMase-Inhibitor-Daten unterstützen in ihrer Gesamtheit die Hypothese, dass bestimmte zelluläre SMasen die coronavirale Replikation beeinflussen. Während eine Inhibition von nSMasen zu einer Titerreduktion aller drei verwendeten Viren führte, reduzierte eine Inhibition der aSMase ausschließlich die Replikation von SARS-CoV-2. Die Ergebnisse deuten also darauf hin, dass es – hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von zellulären SMasen – Unterschiede zwischen verschiedenen Coronaviren gibt.

Um dieses Ergebnis zu validieren und etwaige unspezifische Effekte der Inhibitoren ausschließen zu können, wurden als nächstes mögliche Effekte von genetischen Knockdowns von SMasen auf die Replikation von Coronaviren untersucht.

Ergebnisse

3.1.2.2 Knockdown der zellulären SMasen vermindert die Vermehrung von MERS-CoV und SARS-CoV-2

Um den Einfluss von genetischen Knockdowns von SMasen auf die Replikation von Coronaviren zu untersuchen, wurden spezifische siRNAs für die einzelnen SMase-codierenden Transkripte verwendet (Tabelle 11). Als Positivkontrolle wurden siRNAs verwendet, die die mRNAs von coronaviralen Eintrittsrezeptorproteinen als Ziel hatten (z.B. CD13 für HCoV-229E, ACE2 für SARS-CoV-2 und DPP4 für MERS-CoV). Die MISSION siRNA-Universal-Negativkontrolle wurde als Negativkontrolle genutzt, welche aus kurzen RNA-Abschnitten besteht, die keine relevante Homologie zu humanen Genen aufweisen.

Zunächst wurde die Effizienz des Knockdowns für jede verwendete siRNA mittels RT-qPCR untersucht. Hierfür wurden die Huh-7-ACE2-Zellen mit den siRNAs transfiziert, die zelluläre Gesamt-RNA nach einem definierten Zeitraum isoliert und anschließend mittels RT-qPCR die spezifischen Transkripte quantifiziert. Es konnte für alle verwendeten siRNA eine statistisch signifikante Reduktion der ausgewählten Ziel-Transkripte nachgewiesen werden (Abbildung 15).

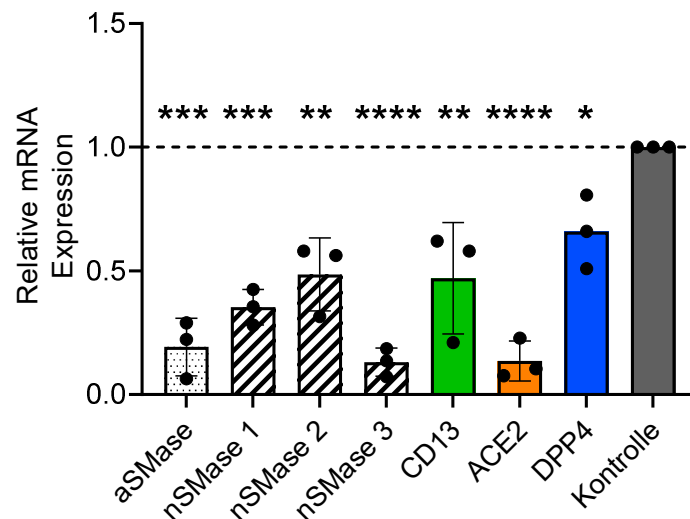


Abbildung 15: Validierung des siRNA-induzierten Knockdowns von Transkripten, die für Sphingomyelinasen oder coronavirale Rezeptorproteine kodieren. Huh-7-ACE2-Zellen wurden direkt nach Aussaat mit 100 nM der korrespondierenden siRNA (50 nM im Fall von CD13) in Kombination mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMAX transfiziert. Nach 48 h p. t. (24 h im Fall von nSMase2) wurde die zelluläre Gesamt-RNA mittels Qiagen-RNeasy-Mini-Kit isoliert. Zur Quantifizierung der zellulären RNA wurde eine RT-qPCR durchgeführt und die erhaltenen C_t -Werte auf ein sogenanntes „housekeeping“-Gen normalisiert. Mittels $\Delta\Delta$ -Ct-Methode wurden die relativen Expressionslevel im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten ($n=3$) mit den zugehörigen Standardabweichungen. Unterschiede zwischen den spezifischen siRNAs und der Negativkontrolle wurden mittels t-Test statistisch analysiert (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$).

Um den Effekt der siRNAs auf die Vermehrung von Coronaviren zu untersuchen, wurde ein Immunfluoreszenz-basierter Assay etabliert. Hierfür wurden die Huh-7-ACE2-Zellen mit den für SMasen-spezifischen siRNAs und den siRNAs für Positiv- sowie Negativkontrolle transfiziert und infiziert. Die infizierten Zellen wurden fixiert und das virale N-Protein immunologisch angefärbt und mittels ImageXpress Pico quantifiziert (Abbildung 16).

Die Infektion mit HCoV-229E konnte nur bei Verwendung der CD13-spezifischen siRNA statistisch signifikant reduziert werden. Der Einsatz von SMase-spezifischen siRNA hatte dagegen keinen reproduzierbaren negativen Effekt auf die Vermehrung von HCoV-229E. Somit konnte der beobachtete inhibierende Effekt der nSMase-Inhibitoren auf die HCoV-229E Replikation mit den siRNA nicht bestätigt werden (vgl. Abbildung 14).

Infektionen mit SARS-CoV-2 konnten sowohl durch die ACE2-spezifische siRNA als auch alle SMase-spezifischen siRNAs signifikant reduziert werden. Somit konnte bestätigt

Ergebnisse

werden, dass sowohl die aSMase als auch die verschiedenen nSMasen einen positiven Effekt auf die Vermehrung von SARS-CoV-2 haben.

Infektionen mit MERS-CoV konnten durch Einsatz der aSMase-spezifischen siRNA nicht reduziert werden. Nur die Verwendung der DPP4-spezifischen sowie der nSMase2-spezifischen siRNA verminderten die MERS-CoV-Replikation statistisch signifikant. Auch dieses Resultat steht im Einklang mit den Daten vorangegangener Experimente, bei der die pharmakologische Inhibition der nSMase2, aber nicht der aSMase, eine Reduktion von MERS-CoV-Titern zur Folge hatte (vgl. Abbildung 14).

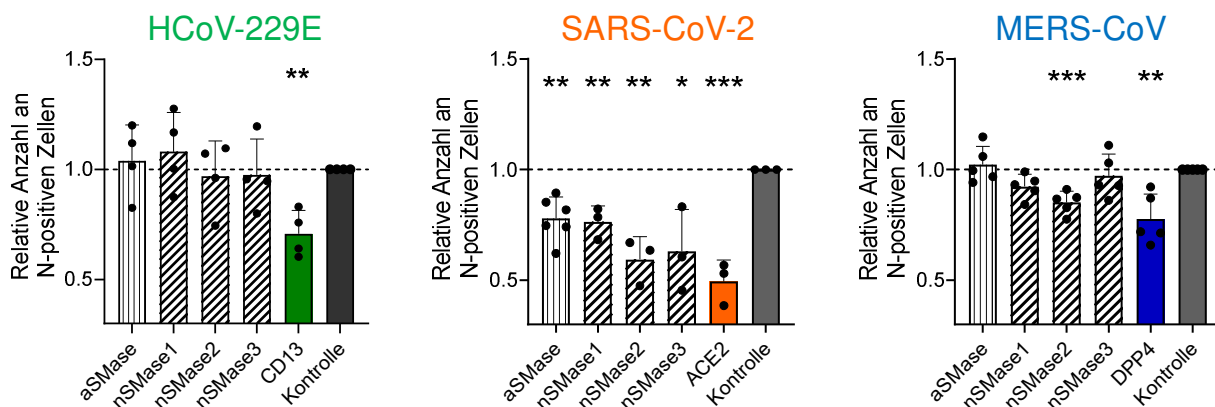


Abbildung 16: Effekt des siRNA-Knockdowns von SMasen auf die Reproduktion von Coronaviren.

Huh-7-ACE2-Zellen wurden direkt nach Aussaat mit 100 nM der korrespondierenden siRNA (50 nM im Fall von CD13) in Kombination mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMAX transfiziert. 48 h p. t. wurden die Zellen mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=0,1). 12 h p. i. wurden die Zellen mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert für die weitere Auswertung mittels Immunfluoreszenz. Zum Nachweis des coronaviralen N-Proteins (grün) wurden monoklonale Maus-anti-N-Antikörper verwendet sowie ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (Alexa-Fluor-488-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die Quantifizierung der N-positiven Zellen erfolgte dann mit dem automatisierten Zell-Imaging-System ImageXpress Pico. Unterschiede zwischen den mit spezifischen siRNAs behandelten Zellen und der Kontroll-siRNA wurden mittels t-Test statistisch ausgewertet (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001).

Die gewonnenen Daten lassen den Schluss zu, dass eine pharmakologisch oder genetisch ausgelöste Verminderung der aSMase-Aktivität oder -Expression die Replikation von SARS-CoV-2 negativ beeinflusst, während sie keine erkennbare Auswirkung auf die Replikation von HCoV-229E und MERS-CoV hat. Somit scheint die aSMase-vermittelte Umwandlung von SM zu Cer nur für die Replikation von SARS-CoV-2 von Bedeutung zu sein. Welcher Unterschied ursächlich für diese unterschiedliche Abhängigkeit der Coronaviren von der aSMase ist, wird in dieser Arbeit nicht weiter

untersucht. Stattdessen liegt der Fokus auf der nSMase2, da hier für alle drei Viren gezeigt werden konnte, dass die pharmakologische Inhibition dieses Enzym zu einer verminderten Replikation führt. Diese Schlussfolgerung konnte für SARS-CoV-2 und MERS-CoV durch siRNA-Daten zusätzlich gestützt werden. Hingegen hatte keine der verwendeten siRNAs einen messbaren Einfluss auf die Vermehrung von HCoV-229E.

3.1.2.3 Inhibition der nSMase2 beeinflusst einen Schritt in der Virusreplikation nach dem Viruseintritt, jedoch vor der Freisetzung neugebildeter Viruspartikel

Nachdem erste Untersuchungen auf eine potentielle Beteiligung der nSMase2 in der Replikation von Coronaviren hindeuteten, wurde als nächstes die Rolle dieses Enzyms im Replikationszyklus näher untersucht. Hierfür wurden in einem Experiment HCoV-229E-infizierte Zellen (MOI=3) für definierte Zeitintervalle mit dem selektiven nSMase2-Inhibitor PDDC (10 μ M) behandelt (Abbildung 17A). Mögliche Effekte auf die Virusreplikation sollten Hinweise darauf geben, an welchem Schritt des viralen Replikationszyklus die Aktivität der nSMase2 beteiligt sein könnte. Um gewährleisten zu können, dass sämtliche im Infektionsverlauf freigesetzten Viruspartikel für die Titrations verwendet wurden, wurden alle im Verlauf des Experiments abgenommenen Zellüberstände gesammelt und am Ende des Versuchs mit dem zugehörigen Überstand am Zeitpunkt 12 h p. i. vereinigt. Mit diesem Pool wurden dann die Titrations durchgeführt, um die über den Gesamtverlauf freigesetzten infektiösen Virionen bestimmen zu können. Als Kontrolle dienten unbehandelte infizierte Zellen.

Es konnte festgestellt werden, dass die Behandlung von Zellen mit PDDC für einen Zeitraum kurz vor bis kurz nach der Infektion (-2-2 h p. i.) zu keiner signifikanten Reduktion der Virustiter führte (Abbildung 17B). Ebenfalls keine Änderung konnte für eine Behandlung mit PDDC zu einem späten Zeitpunkt im Infektionsverlauf (8-12 h p. i.) detektiert werden. Für sämtliche gewählten Zeitintervalle der PDDC-Zugabe zwischen 0 und 10 h p. i. konnte dagegen eine signifikante Reduktion der Virustiter von HCoV-229E festgestellt werden. Aus diesem Resultat kann geschlussfolgert werden, dass frühe Schritte des Infektionszyklus, wie z. B. Virusbindung an die Wirtszelle und Viruseintritt, sowie späte Schritte, wie die Bildung neuer infektiöser Viruspartikel oder die Freisetzung neuer Viruspartikel, nicht von einer Hemmung der nSMase2-Aktivität durch PDDC betroffen sind. Stattdessen deutet die signifikante Reduzierung von Virustitern zwischen

Ergebnisse

0 und 10 h p. i. auf einen Schritt direkt nach dem Viruseintritt hin, der über einen Zeitraum von mehreren Stunden abläuft und im späten Infektionsverlauf bereits abgeschlossen ist.

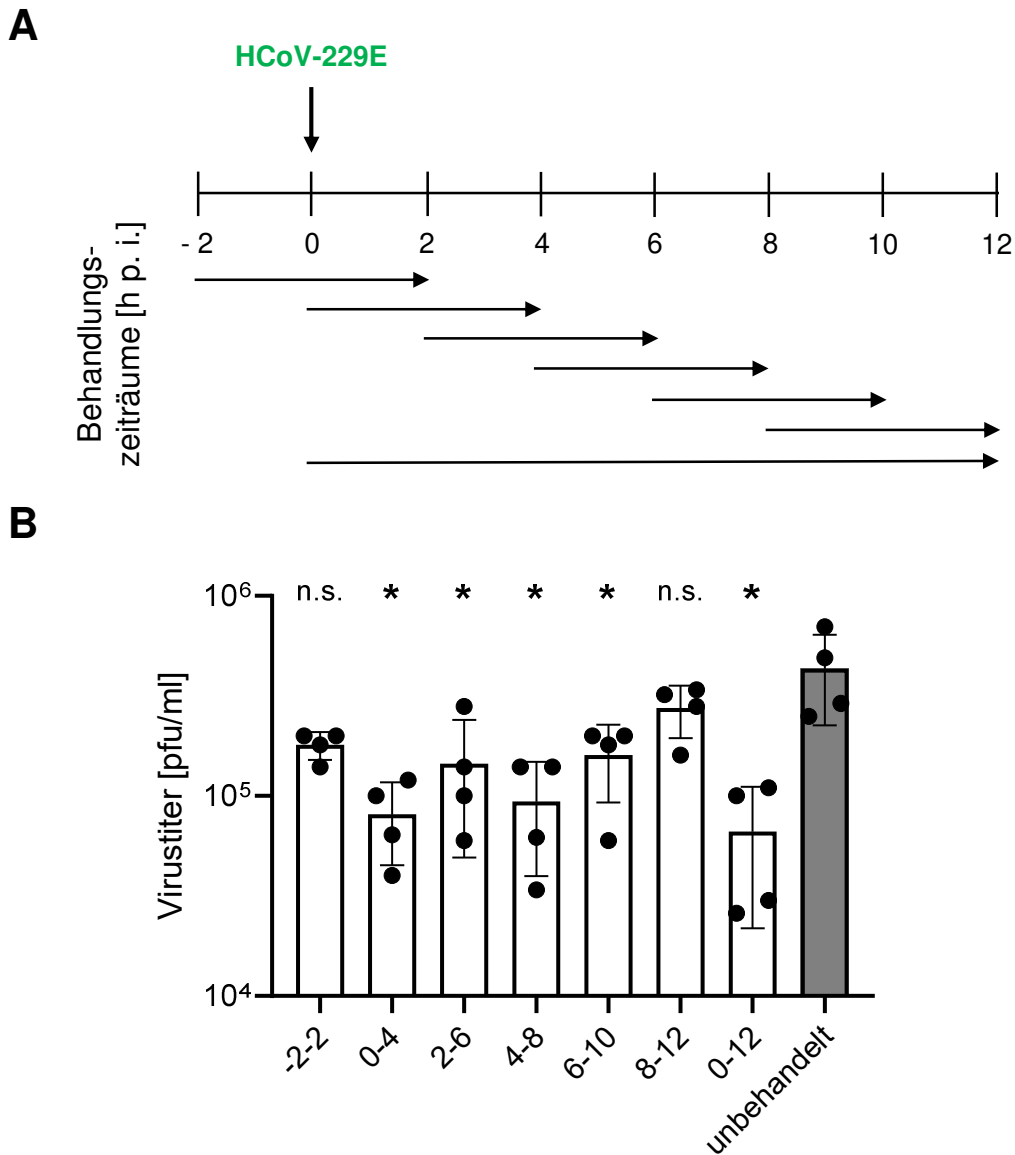


Abbildung 17: Virusreplikation von HCoV-229E bei zeitabhängiger Gabe von PDDC. Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI=3) infiziert. In den angegebenen Zeiträumen wurden die infizierten Zellen in Medium mit PDDC (10 μ M) kultiviert. Anschließend wurde das PDDC-haltige Medium mit frischem Medium ersetzt. Am Ende des Experiments (12 h p. i.) wurden die aus den jeweiligen Versuchsansätzen gesammelten Überstände vereinigt, und die Virustiter in diesen gepoolten Zellkulturüberständen wurden mittels Plaque-Assay bestimmt. Unterschiede zwischen PDDC-behandelten (weiße Balken) und unbehandelten (grauer Balken) HCoV-229E-infizierten Zellen aus vier unabhängigen Experimenten wurden mittels t-Test bestimmt (* $P < 0,05$).

3.1.2.4 Der nSMase2-Inhibitor PDDC reduziert die Bildung coronaviraler ROs

Die Bildung von viralen ROs findet nach Viruseintritt und Synthese der viralen Nichtstrukturproteine statt und geht mit massiven Umstrukturierungen von Membranen der infizierten Wirtszelle einher. Es konnte bereits für verschiedene Flaviviren gezeigt werden, dass Cer wichtige Bestandteile der neugebildeten viralen ROs sind (129, 132). Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Inhibition der nSMase2 durch PDDC die Bildung von coronaviralen ROs negativ beeinflusst. Hierfür wurden Huh-7-ACE2-Zellen mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV mit einer MOI von 3 infiziert. Nach 1 h p. i. wurde das Inokulationsmedium abgenommen und frisches Medium mit 10 μ M PDDC dazugegeben. Als Positivkontrollen dienten zwei Inhibitoren, die nachweislich die Bildung coronaviraler ROs beeinflussen: (i) Py-2, ein Pyrrolidin-Derivat, das die zytosolische Phospholipase 2 α inhibiert und so die Ausbildung von ROs verschiedenster +ssRNA-Viren blockiert (127). (ii) K22, welches mittels eines noch unbekanntem Mechanismus die Bildung von nidoviralen und flaviviralen ROs inhibiert (60, 214). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte infizierte Zellen. Die Zellen wurden nach 8 h p. i. fixiert und anschließend mit einem Antikörper gegen dsRNA gefärbt, welcher als Marker für virale ROs diente.

Die Analyse der Immunfluoreszenz (dargestellt durch repräsentative Bilder in Abbildung 18) ergab wie erwartet eine Reduktion von dsRNA-Signalen in infizierten Zellen nach Behandlung mit Py-2 oder mit K22. Auch die Verwendung von PDDC führte zu einer erkennbaren Reduktion des Anteils dsRNA-positiver Zellen.

Ergebnisse

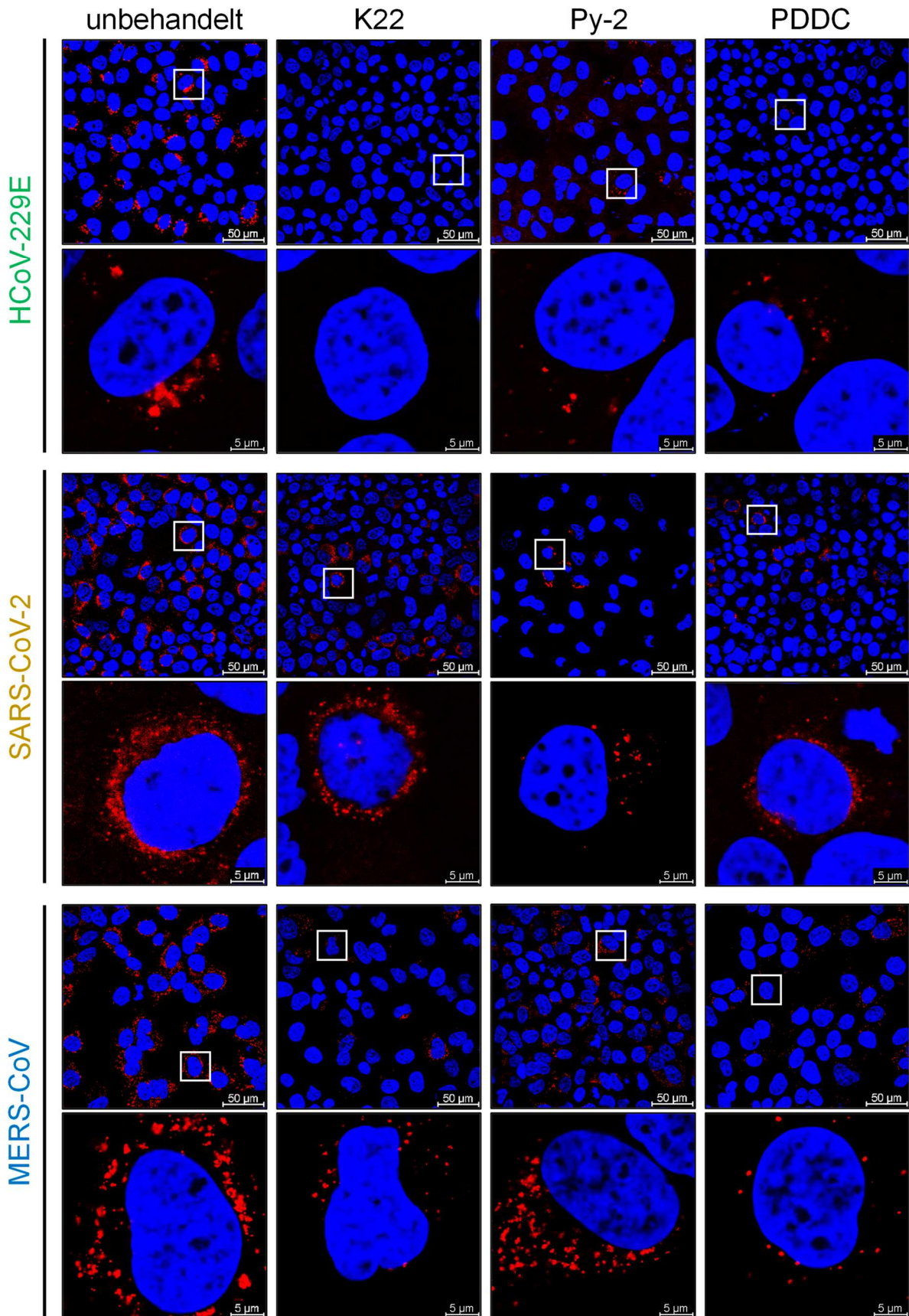


Abbildung 18: Effekt von PDDC sowie bekannten Inhibitoren der coronaviralen RO-Bildung auf die Anzahl RO-positiver Zellen nach Infektion. Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=3). Nach einer Stunde Inokulation wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium mit K22 (40 μ M), Py-2 (20 μ M) oder PDDC (10 μ M) ersetzt. Nach 8 h p. i. wurden die Zellen mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert. Zur Detektion der viralen ROs wurde ein monoklonaler Maus-anti-dsRNA-Antikörper verwendet (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

Um den inhibierenden Effekt auf die Bildung der viralen ROs zu quantifizieren und die Auswirkungen des Einsatzes verschiedener Inhibitoren miteinander zu vergleichen, wurden die Signale für dsRNA mittels ImageXpress Pico quantifiziert. Anschließend wurden die relativen Änderungen der Anzahl RO-positiver Zellen nach Inhibitor-Behandlung im Vergleich zu unbehandelter Kontrolle berechnet. Abbildung 19 zeigt, dass alle drei Inhibitoren die Anzahl RO-positiver Zellen nach Infektion mit einem der drei Coronaviren statistisch signifikant reduzierten. Es kann somit geschlossen werden, dass eine Hemmung der nSMase-Aktivität durch PDDC die Bildung von coronaviralen ROs blockiert. Die beobachteten Effekte waren vergleichbar mit denen der beiden Kontrollsubstanzen (K22, Py-2), die – wie bereits erwähnt – die RO-Bildung durch andere Mechanismen blockieren können. In ihrer Gesamtheit unterstützen diese Daten die postulierte funktionelle Bedeutung der nSMase-Aktivität für eine effiziente Bildung von ROs im Laufe der coronaviralen Infektion.

Ergebnisse

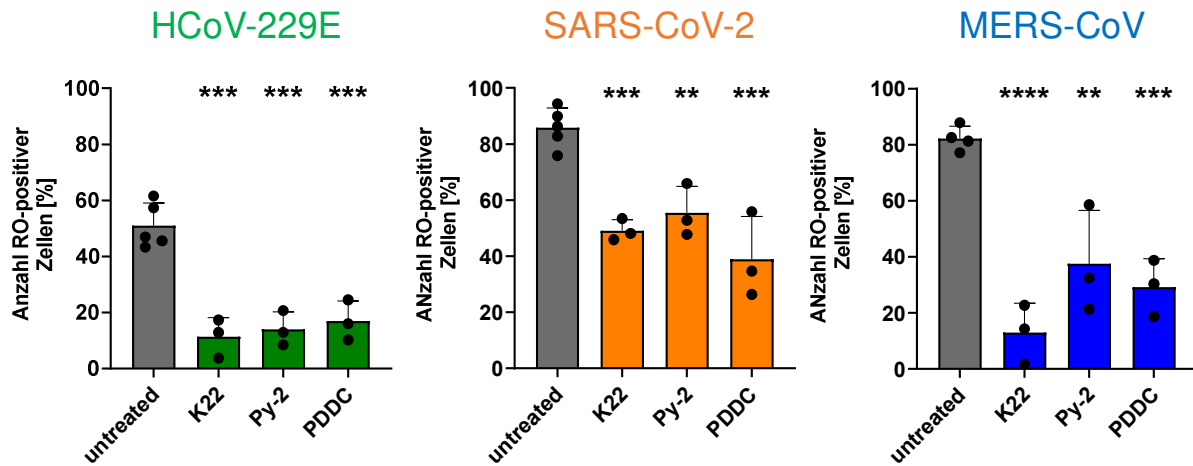


Abbildung 19: Quantifizierung der Effekte von PDDC auf die die Bildung von ROs nach Infektion.

Quantifizierung des Anteils RO-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl. Die Anzahl dsRNA-positiver Zellen wurden mittels Pico ImageXpress automatisch bestimmt und auf die Gesamtzahl der gezählten Zellen normalisiert. Unterschiede zwischen behandelten (farbige Balken) und unbehandelten (grauer Balken) infizierten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wurden mittels t-Test bestimmt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

3.1.3 Nachweis der nSMase2 und Cer in coronaviralen ROs

3.1.3.1 Cer kolokalisieren mit coronaviralen ROs

Die erhobenen Daten zeigten (wie oben dargestellt) eine zeitabhängige Hochregulierung von Cer im Infektionsverlauf sowie eine mögliche Beteiligung der nSMase2 an der Bildung coronaviraler ROs. Um die daraus resultierende Hypothese zu validieren, dass Cer (als Produkt der nSMase2) ein Bestandteil coronaviraler ROs ist, wurden weitere Experimente durchgeführt. Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert und nach 8 h p. i. fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper angefärbt, der verschiedene endogene Cer-Spezies spezifisch nachweist. Für den Nachweis der viralen ROs wurde erneut der dsRNA-Antikörper verwendet. Für die Permeabilisierung der Zellen wurde dabei Saponin benutzt. Saponin hat gegenüber Triton den Vorteil, dass es ausschließlich und selektiv Cholesterin aus der Membran entfernt, während andere Lipide und auch Proteine erhalten bleiben.

Es konnte für alle drei Coronaviren gezeigt werden, dass die gebildeten ROs mit Cer kolokalisieren (Abbildung 20). Es konnten Kolokalisationsraten von über 75 % für jedes der drei Viren gezeigt werden. Außerdem ergaben die Experimente eine Anreicherung von Cer-Spezies in der perinukleären Region, in welcher sich auch die viralen ROs befinden. In uninfizierten Zellen konnte dagegen eine diffuse Verteilung von Cer in der

gesamten Zelle festgestellt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass (bereits vorhandene) zelluläre Cer relokalisieren und in die ROs eingebaut werden und/oder Cer in größerem Umfang neu gebildet werden müssen, insbesondere an den für die RO-Bildung genutzten Membranbereichen.

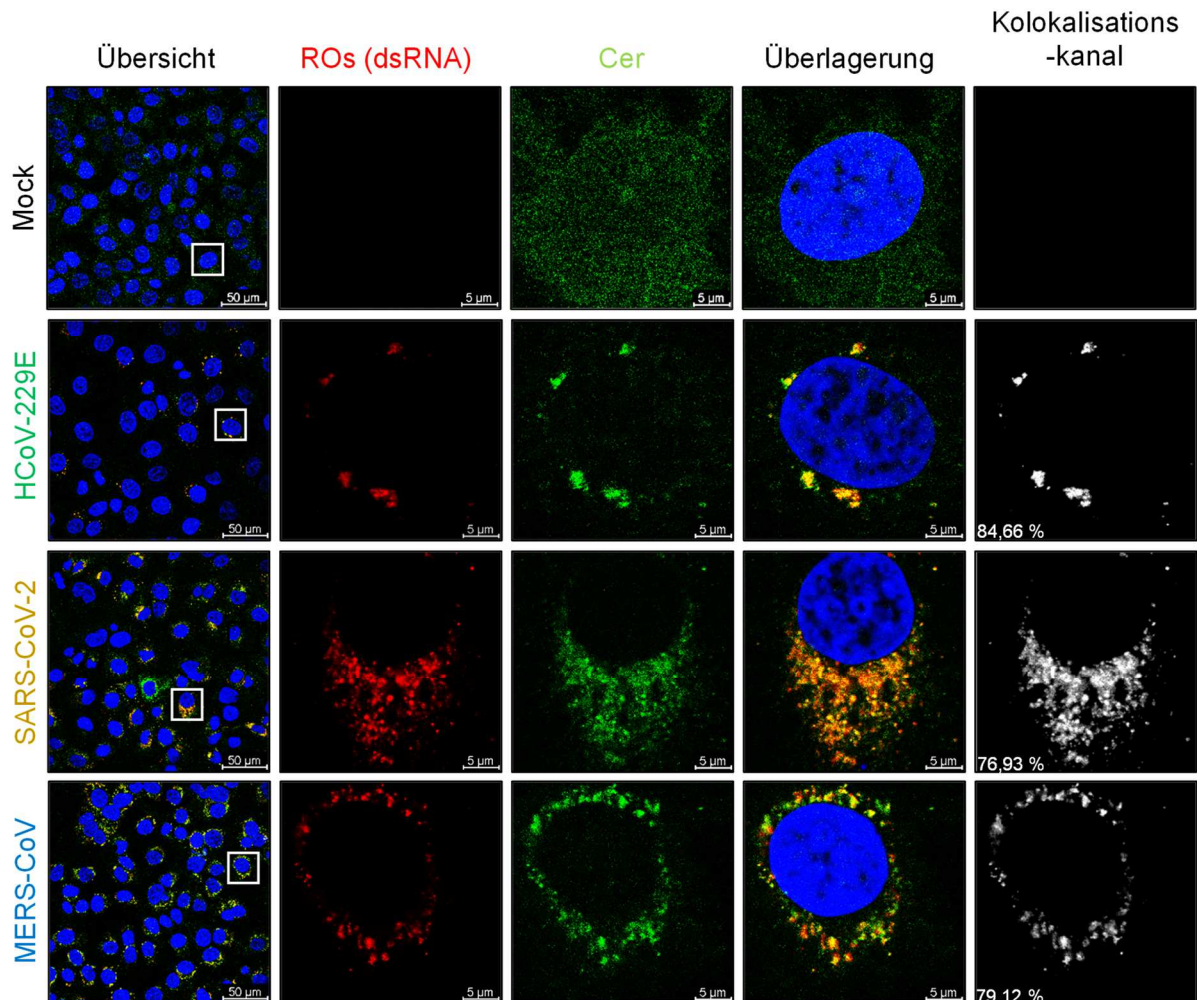


Abbildung 20: Lokalisation von Coronavirus-induzierten ROs im Vergleich mit Ceramiden. Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=3) und nach 8 h p. i. mit 3,7 % PFA fixiert. Die Zellen wurden anschließend mit 0,5 % Saponin permeabilisiert. Zur Detektion der viralen ROs wurde ein monoklonaler Maus-anti-dsRNA-Antikörper verwendet, an den ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (Alexa-Fluor-488-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper, rot) gekoppelt wurde. Die Detektion von Ceramiden erfolgte durch Verwendung eines monoklonalen Ceramid-spezifischen Antikörpers (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die dargestellten Zellen werden in den Übersichtsbildern durch Markierungen hervorgehoben (weiße Kästen). Für die überlagerten Bilder wurden Kolokalisationssignale und -raten (in %) bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Ergebnisse

3.1.3.2 SM kolokalisiert nicht mit coronaviralen ROs

Die nSMase2 katalysiert (wie alle SMasen) die Hydrolyse von SM zu Cer. Aufgrund der erhaltenen starken Hinweise auf eine Beteiligung der nSMase2 an der Bildung von coronaviralen ROs (Abschnitt 3.1.2.4) und der nachgewiesenen Kolokalisation von Cer und ROs (Abschnitt 3.1.3.1) wurde in einem weiteren Schritt die Lokalisierung von SM während der Bildung von ROs untersucht. Hierfür wurden Huh-7-ACE2-Zellen mit einem Konstrukt transfiziert, das für eine inaktive Form des Equinatoxins II (Eq) kodiert. Das Eq gehört zur Familie der Actinoproteine, einer Gruppe von porenbildenden Toxinen, welche von Seeanemonen gebildet werden (215). Das Eq erkennt spezifisch SM-reiche Membranen und bildet nach Oligomerisierung eine Pore in der Zellmembran, was zur Lyse der betroffenen Zelle führt. Das hier verwendete Eq-Expressionskonstrukt codiert für eine Variante des Toxins, die über keine zytolytische Aktivität verfügt, aber weiterhin die SM-Bindungsdomäne enthält. Dadurch eignet sich dieses Protein mit einem oxGFP-Tag als spezifischer Marker zur Lokalisation von intrazellulärem SM (210, 216).

Zur Lokalisation von SM während der Infektion wurden die Zellen 48 h nach Transfektion der pC4-ss-FM4-Eq-oxGFP-Plasmid-DNA mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert und 8 h p. i. fixiert. Zur Anfärbung der viralen ROs wurde erneut der dsRNA-Antikörper verwendet. Die ROs von allen drei Coronaviren zeigten keine Kolokalisation mit dem durch Eq-markierten SM (Abbildung 21); die Kolokalisationsraten lagen bei unter 2,5 %. Während die dsRNA-Signale (wie erwartet) punktuell in der perinukleären Region detektiert wurden, konzentrierte sich das GFP-Signal in einer anderen Region der Zelle (vermutlich dem Golgi-Komplex) und wurde von der Infektion nicht erkennbar beeinflusst. Zusammenfassend scheint SM, im Gegensatz zu Cer, nicht mit coronaviralen ROs assoziiert zu sein.

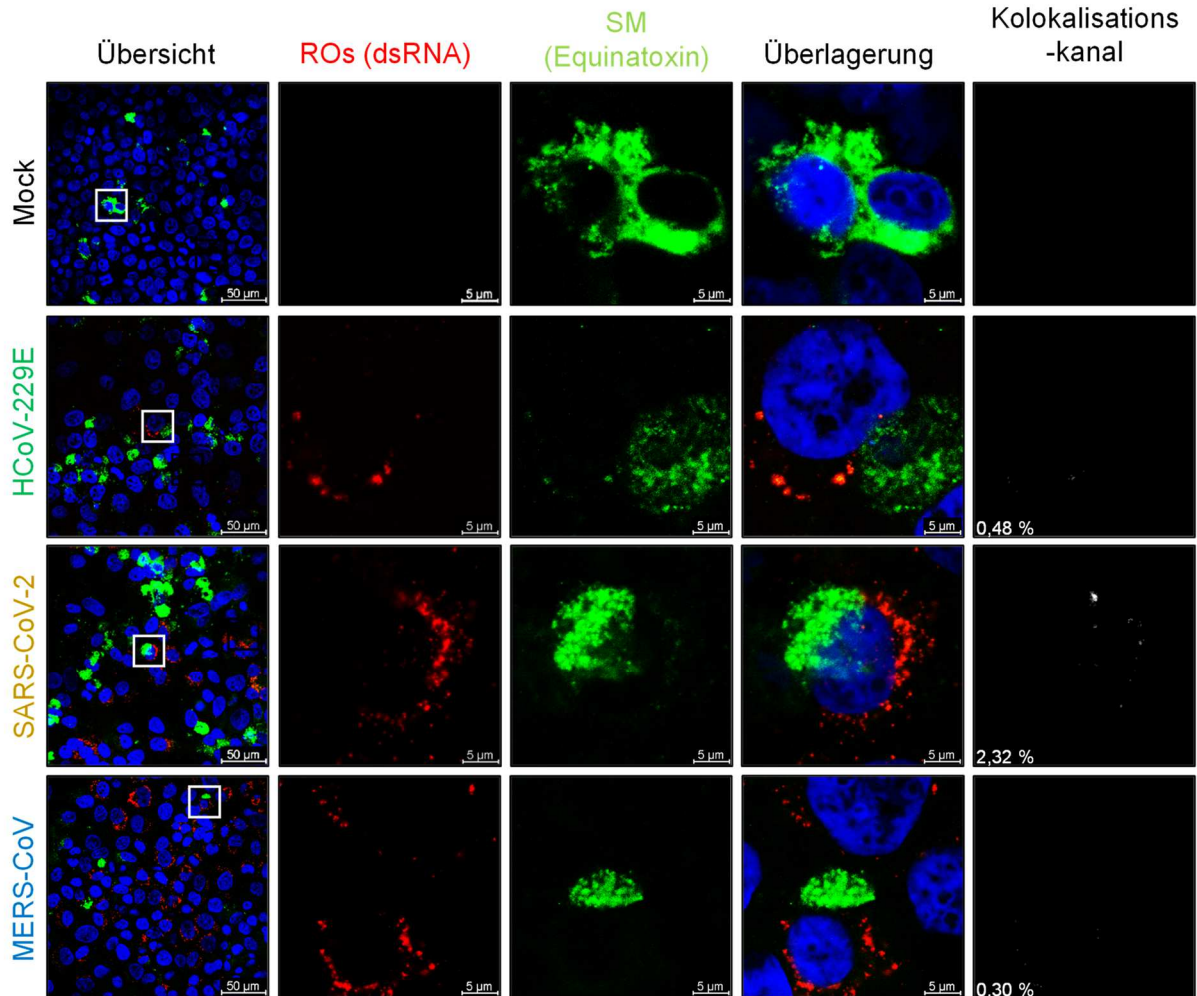


Abbildung 21: Lokalisation von Coronavirus-induzierten ROs im Vergleich mit Sphingomyelin.

Huh-7-ACE2-Zellen wurden direkt nach Aussaat mit 0,75 μg pC4-ss-FM-Eqt-SM-oxGFP (grün) in Kombination mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 transfiziert. Das dadurch gebildete Eqt-SM-oxGFP diente dem Nachweis von intrazellulärem SM. Nach 48 h p. t. wurden die Zellen mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=3) und nach 8 h p. i. mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert. Zur Detektion der viralen ROs wurde ein monoklonaler Maus-anti-dsRNA-Antikörper verwendet (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die dargestellten Zellen werden in den Übersichtsbildern durch Markierungen hervorgehoben (weiße Kästen). Für die überlagerten Bilder wurden Kolokalisationssignale und -raten (in %) bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Ergebnisse

3.1.3.3 Die nSMase2 kolokalisiert mit coronaviralen ROs, unabhängig von ihrer Aktivität

Nachdem gezeigt wurde, dass Cer, nicht jedoch SM, mit coronaviralen ROs kolokalisiert, sollte geklärt werden, ob die nSMase2, welche für die Umwandlung von SM in Cer verantwortlich ist und dessen Inhibition auch die Bildung von ROs reduziert, ebenfalls mit den ROs kolokalisiert. Da für den spezifischen Nachweis der endogenen nSMase2 keine geeigneten Antikörper zur Verfügung stehen (217), wurde hierfür ein Expressionskonstrukt verwendet, das für eine eGFP-konjugierte nSMase2 codiert (pcDNA3.1-nSMase2-eGFP). Durch den C-terminalen eGFP-Tag wird eine fluoreszenzmikroskopische Lokalisation der nSMase2 innerhalb der Zelle ermöglicht. Die transfizierten Zellen wurden 48 h p. t. mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV mit einer MOI von 3 infiziert und 8 h p. i. fixiert. Für die Detektion der viralen ROs wurde erneut der dsRNA-Antikörper verwendet.

Für alle drei Coronaviren konnte eine starke Kolokalisation von ROs mit der nSMase2 gezeigt werden (Abbildung 22). Bei allen drei Viren kolokalisierten die RO-Signale zu über 95 % mit den Signalen des nSMase2-eGFP. Darüber hinaus konnte die nSMase2 in der Zellmembran und Vesikeln innerhalb der Zelle sowohl in nichtinfizierten als auch in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Kolokalisation viraler ROs mit eGFP-positiven Vesikeln beschränkte sich ausschließlich auf die perinukleäre Region. Es ergaben sich hingegen keine Hinweise auf eine mögliche infektionsinduzierte Relokalisation der nSMase2 (z.B. durch eine Umverteilung von der Zellmembran in andere zelluläre Kompartimente).

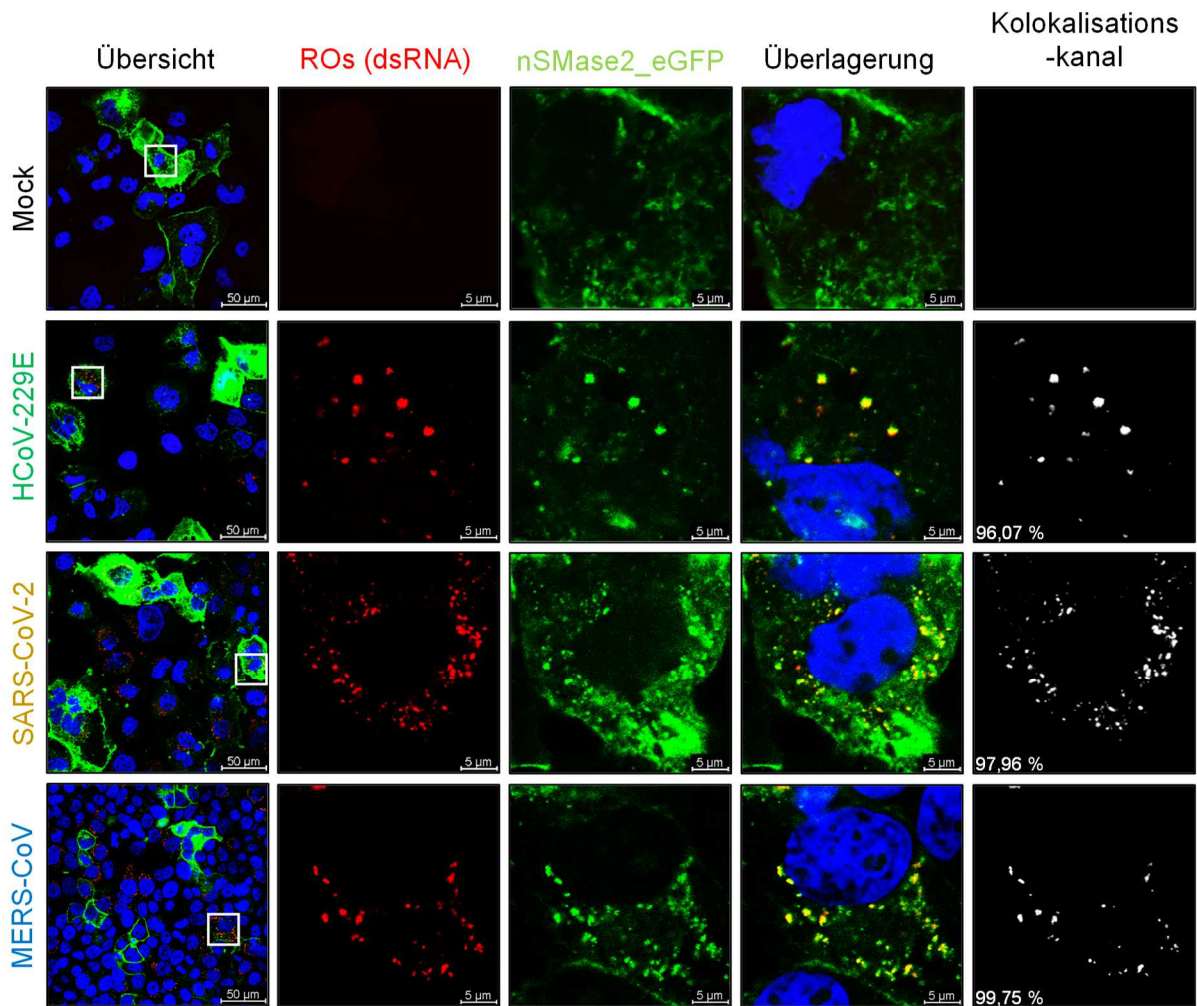


Abbildung 22: Kolokalisation von Coronavirus-induzierten ROs mit der humanen nSMase2. Huh-7-ACE2-Zellen wurden direkt nach Aussaat mit 0,75 µg pcDNA3.1-nSMase2-eGFP (grün) in Kombination mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 transfiziert. 48 h p. t. wurden die Zellen mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=3) und 8 h p. i. mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert. Zur Detektion der viralen ROs wurde ein monoklonaler Maus-anti-dsRNA-Antikörper verwendet (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die dargestellten Zellen werden in den Übersichtsbildern durch Markierungen hervorgehoben (weiße Kästen). Für die überlagerten Bilder wurden Kolokalisationssignale und –raten (in %) bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Aktivität der nSMase2 eine Rolle bei der lokalen Anreicherung dieses Enzyms an den ROs spielt. Hierfür wurden Huh-7-ACE2-Zellen mit einem pcDNA3.1-nSMase2-eGFP transfiziert, bei der im aktiven Zentrum das Histidin an Position 638 der nSMase2 durch ein Alanin ersetzt wurde (nSMase2(H639A)-eGFP). Anschließend wurden die transfizierten Zellen, wie oben für die Wildtyp-nSMase2 beschrieben, infiziert und gefärbt. Es konnte für alle drei Coronaviren auch für die inaktive

Ergebnisse

Mutante eine Kolokalisation von ROs mit der nSMase2 gezeigt werden (Abbildung 23). Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Rekrutierung der nSMase2 für die RO-Bildung unabhängig von der Aktivität des Enzymes stattfindet.

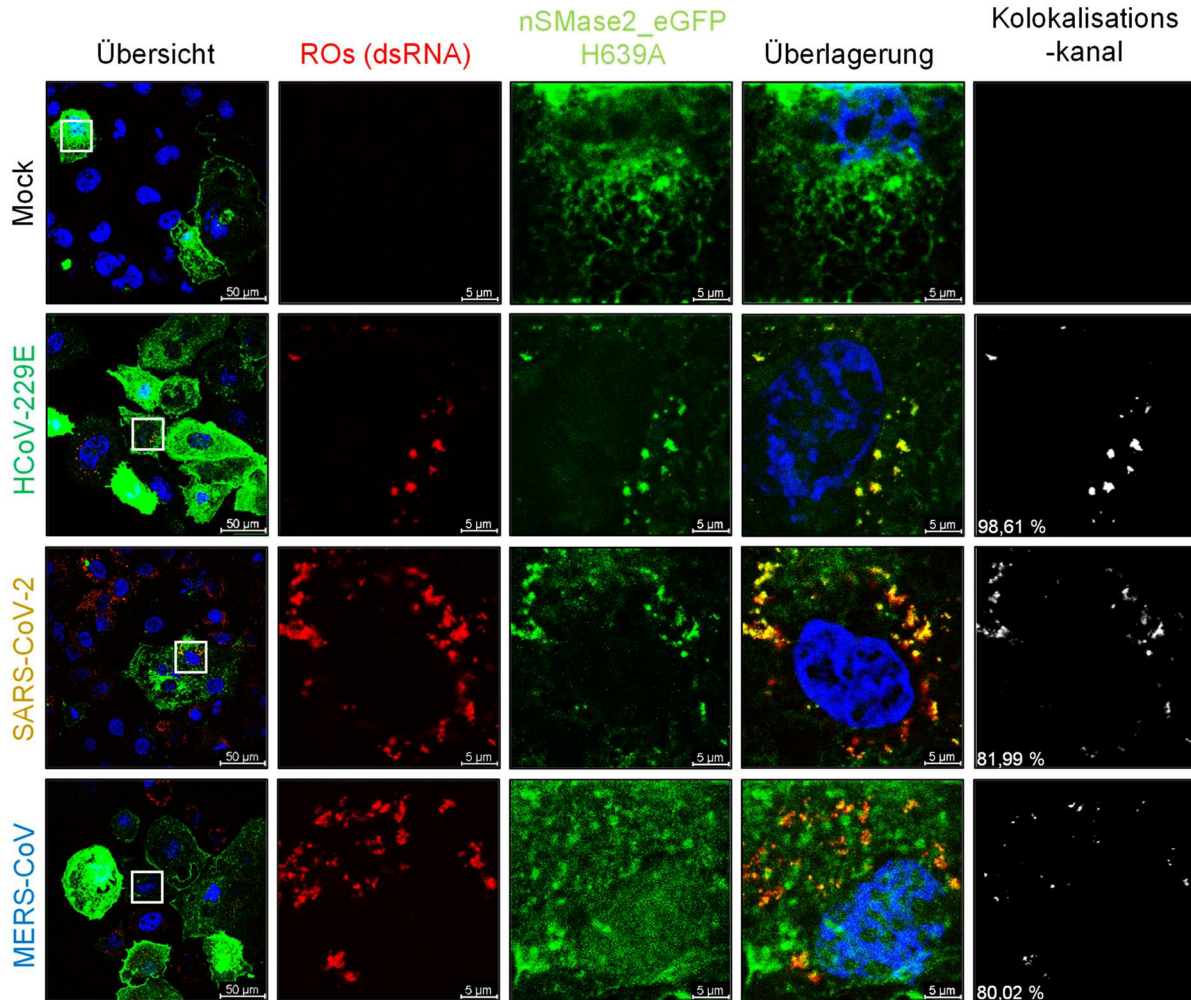


Abbildung 23: Lokalisation von Coronavirus-induzierten ROs im Vergleich mit der inaktiven nSMase2. Huh-7-ACE2-Zellen wurden direkt nach Aussaat mit 0,75 µg pcDNA3.1-nSMase2(H639A)-eGFP (grün) in Kombination mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 transfiziert. 48 h p. t. wurden die Zellen mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=3) und 8 h p. i. mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert. Zur Detektion der viralen ROs wurde ein monoklonaler Maus-anti-Doppelstrang-RNA-Antikörper verwendet (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die dargestellten Zellen werden in den Übersichtsbildern durch Markierungen hervorgehoben (weiße Kästen). Für die überlagerten Bilder wurden Kolokalisationssignale und -raten (in %) bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Als zusätzliche Negativkontrolle wurden die Zellen außerdem mit einem pcDNA3.1-GFP-Konstrukt transfiziert. Hierdurch sollte bestätigt werden, dass der GFP-Anteil im nSMase2-eGFP-Fusionsprotein keinen Beitrag zur beobachteten Kolokalisation

von GFP-Signalen und RO-Signalen leistet. Es konnte nach Infektion der mit pcDNA3.1-GFP-transfizierten Zellen eine deutlich geringere Kolokalisation der ROs mit dem GFP-Signal im Vergleich zur Verwendung von nSMase2_eGFP gezeigt werden (Abbildung 14). Eine spezifische Rekrutierung des GFP anstelle der nSMase2 durch virale oder zelluläre Proteine zu viralen ROs kann somit ausgeschlossen werden.

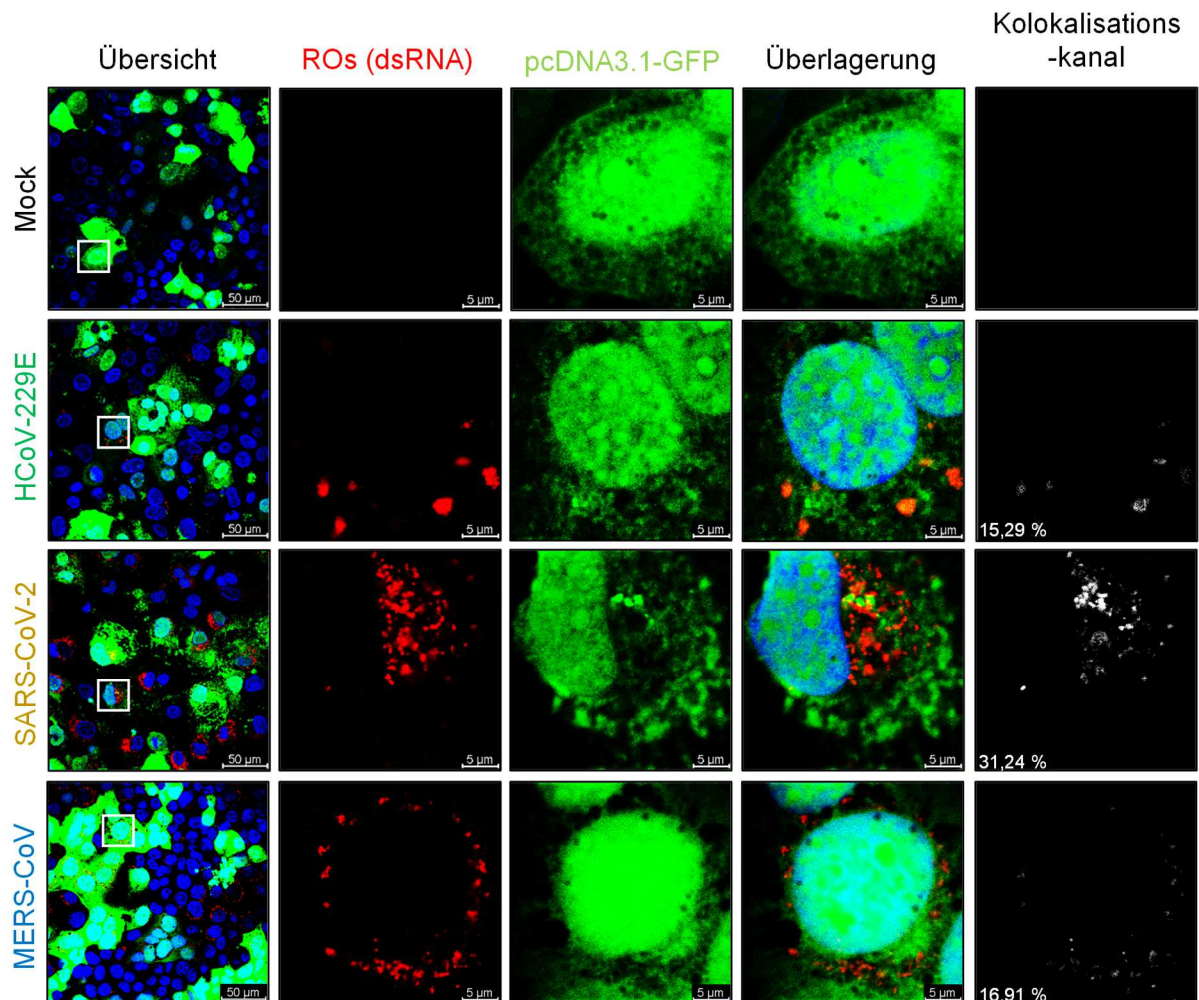


Abbildung 24: Lokalisation von Coronavirus-induzierten ROs im Vergleich mit GFP. Huh-7-ACE2 Zellen wurden direkt nach Aussaat mit 0,75 µg pcDNA3.1-GFP (grün) in Kombination mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 transfiziert. 48 h p. t. wurden die Zellen mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=3) und 8 h p. i. mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert. Zur Detektion der viralen ROs wurde ein monoklonaler Maus-anti-Doppelstrang-RNA-Antikörper verwendet (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die dargestellten Zellen werden in den Übersichtsbildern durch Markierungen hervorgehoben (weiße Kästen). Für die überlagerten Bilder wurden Kolokalisationssignale und -raten (in %) bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Ergebnisse

3.1.4 Sphingolipidanalyse von weiteren, biologisch relevanteren Zellkulturmodellen

3.1.4.1 Sphingolipidanalyse der infizierten A549- und MRC-5-Zellen deutet auf eine zelltypabhängige Deregulation der Sphingolipide hin

Die bisher gewonnenen Daten unterstützen die Hypothese, dass die zelluläre nSMase2 und dessen Produkt Cer an der viralen RO-Bildung beteiligt sind. Jedoch wurden bislang alle Versuche in der gentechnisch veränderten humanen Hepatomzelllinie Huh-7-ACE2 durchgeführt. Wie bereits beschrieben, ist diese Zelllinie für die Vermehrung von verschiedenen Coronaviren geeignet und kann daher als Modellzelllinie für vergleichende Analysen verwendet werden. Da es sich um eine Lebertumor-Zelllinie handelt, ist die biologische Relevanz von Daten, die für respiratorische Viren mit diesem Zellsystem gewonnen werden, jedoch etwas eingeschränkt. Der natürliche Infektions- und Replikationsort der hier untersuchten Coronaviren sind Epithelzellen der Atemwege.

Um die mit Huh-7-ACE2-Zellen gewonnenen Daten und die daraus gezogenen Schlüsse zu validieren, wurden weitere Analysen des Sphingolipidhaushaltes in primären und in permanenten Lungenzellen nach einer Coronavirusinfektion durchgeführt. Dabei wurden humane Lungen-Adenokarzinomzellen (A549-Zellen) verwendet, die entweder den humanen ACE2-Rezeptor (A549-ACE2) oder den humanen CD13-Rezeptor in Kombination mit TMPRSS2 exprimierten (A549-CD13) und somit mit SARS-CoV-2 oder HCoV-229E infiziert werden können. Außerdem wurden MRC-5-Zellen verwendet, welche mit HCoV-229E und MERS-CoV, nicht jedoch mit SARS-CoV-2, infiziert werden können. MRC-5-Zellen sind Fibroblasten, die aus der Lunge eines 14 Wochen alten Fötus isoliert wurden (203).

Ähnlich zur vorherigen Analyse des Sphingolipidhaushaltes (Abschnitt 3.1.1.2), wurden die A549- und MRC-5-Zellen mit den entsprechenden Viren infiziert (MOI=3) und die Veränderungen der Sphingolipidspezies 12 h p. i. im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen (als Kontrolle) analysiert.

Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit mit den zuvor für Huh-7-ACE2-Zellen erhobenen Daten wurde die Infektionseffizienz zum Zeitpunkt 12 h p. i. mittels Immunfluoreszenz und Titration der Überstände bestimmt. Für SARS-CoV-2 in den A549-ACE2-Zellen und MERS-CoV in den MRC-5-Zellen wurden jeweils nach 12 h p. i. Titer im Bereich von 10^5 PFU/ml gemessen (Abbildung 25A). Für HCoV-229E wurde in den MRC-5- und A549-

CD13-Zellen ein deutlich niedrigerer Titer von ungefähr 10^4 PFU/ml gemessen. Immunfluoreszenzanalysen infizierter Zellen unter Verwendung eines N-Protein-spezifische Antikörpers bestätigte, dass im Fall von HCoV-229E nur weniger als 50 % der MRC-5-Zellen infiziert waren (Abbildung 25B). In den HCoV-229E-infizierten A549-CD13-Zellen wurde hingegen eine Infektionsrate von über 70 % erreicht. Nach Infektion der A549-ACE2-Zellen mit SARS-CoV-2 waren ca. 75 % der Zellen N-positiv. Im Fall von MERS-CoV-Infektionen der MRC-5-Zellen waren über 85 % der Zellen N-positiv. Zusammengefasst konnten in A549- und MRC-5-Zellen ähnliche Infektionsraten erreicht werden wie in den Huh-7-ACE2-Zellen. Die einzige Ausnahme bildeten HCoV-229E-infizierte MRC-5-Zellen, für die Infektionsraten von unter 50 % erreicht wurden.

Abbildung 25C zeigt die infektionsinduzierten Veränderungen in A549-CD13-, A549-ACE2- und MRC-5-Zellen im Vergleich zu uninfizierten Kontrollzellen am Zeitpunkt 12 h p. i.

Bei einer HCoV-229E-Infektion von A549-CD13-Zellen wurde (im Vergleich mit Huh-7-ACE2-Zellen) eine deutlich geringere Zahl deregulierter Sphingolipidspezies gefunden. Insgesamt waren nur 5 Sphingolipidspezies signifikant verändert. Eine Herabregulation wurde für keines der untersuchten Sphingolipide nachgewiesen. Hingegen wurde für drei Sphingolipidklassen eine Erhöhung festgestellt: (i) dhCer-Spezies, wobei ausschließlich dhCer 18:0 signifikant erhöht war, (ii) Cer-Spezies, mit einer signifikanten Erhöhung von Cer 22:0, Cer 24:1 sowie Gesamt-Cer, (iii) LacCer-Spezies, wobei auch hier nur eine einzige Spezies (LacCer 24:1) signifikant erhöht war.

Für SARS-CoV-2-infizierte A549-ACE2-Zellen wurde eine signifikante Veränderung von 16 Sphingolipidspezies gefunden. Besonders auffallend war dabei die Klasse der dhCer, bei denen alle untersuchten Spezies signifikant erhöht waren. Darüber hinaus wurde eine signifikante Erhöhung einzelner Cer-Spezies (Cer 20:0, 22:0 und 24:0) sowie von dhSM 24:0 festgestellt. Eine signifikante Senkung zeigte sich hingegen für dhSPh, Sph, Gesamt-SM und LacCer 24:1.

Für HCoV-229E-infizierte MRC-5-Zellen wurde 12 h p. i. eine signifikante Veränderung von 12 Sphingolipidspezies festgestellt, während in MERS-CoV-infizierten MRC-5-Zellen nur 7 Spezies signifikant verändert waren. Beide Viren führten zu einer signifikanten Senkung von S1P und Sph. Weiterhin zeigte sich übereinstimmend für beide Viren, dass in den infizierten MRC-5-Zellen sowohl dhCer 24:0 als auch drei dhSM-Spezies (dhSM 22:0, 24:0 und 24:1) signifikant erhöht waren. Die HCoV-229E-Infektion führte

Ergebnisse

außerdem in diesen Zellen zu einer signifikanten Steigerung von dhCer 22:0, Gesamt-dhCer, dhSM 18:0 und 20:0 sowie von SM 20:0 und 22:0. In MERS-CoV-infizierten MRC-5-Zellen fand sich hingegen nur eine einzige MERS-CoV-spezifische Deregulation, nämlich eine Erhöhung des HexCer 24:1-Spiegels.

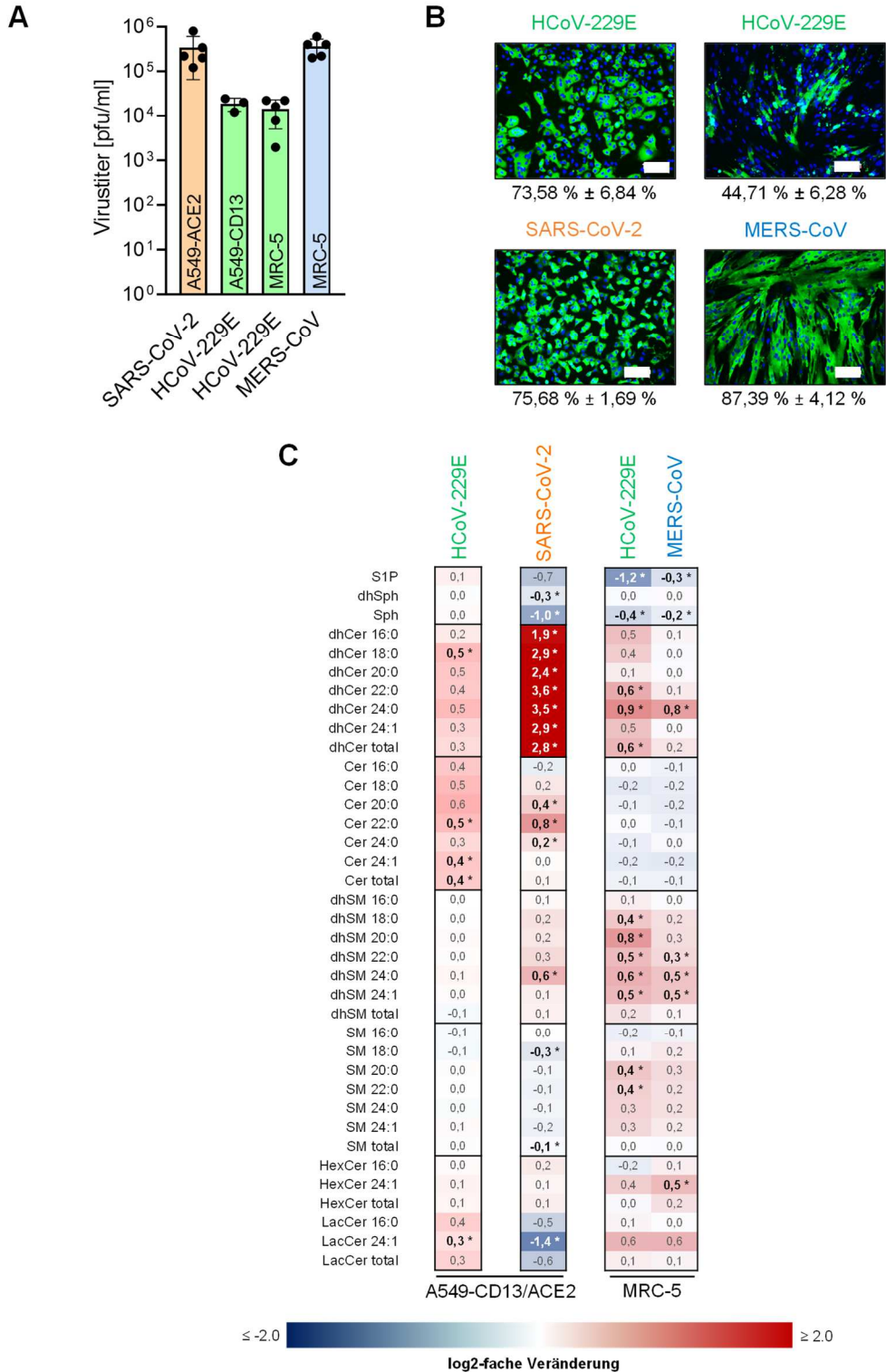


Abbildung 25: Veränderungen der einzelnen Sphingolipidspezies in Coronavirus-infizierten A549-CD13-, A549-ACE2- oder MRC-5-Zellen. A549-CD13 und A549-ACE2-Zellen wurden entweder mit HCoV-229E oder SARS-CoV-2 infiziert und MRC-5-Zellen wurden mit HCoV-229E oder MERS-CoV infiziert (jeweils MOI=3). Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, pelletiert und in Methanol aufgenommen. 12 h p. i. wurden des Weiteren die Überstände für die Titerbestimmung mittels Plaque-Assay **(A)** abgenommen. Eine separate Zellvertiefung mit infizierten Zellen wurde ebenfalls gewaschen und mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert und für die anschließende Immunfluoreszenz-Analyse verwendet **(B)**. Zur Detektion des coronaviralen N-Proteins (grün) wurde ein monoklonaler Maus-anti-N-Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Unter dem jeweiligen repräsentativen Bild ist die relative Anzahl N-positiver Zellen in % angegeben. Die Größe des Messbalkens entspricht 100 µm. **(C)** Für die eigentliche Sphingolipidanalyse wurden die extrahierten Lipide mittels HPLC-MS/MS analysiert. Zur Quantifizierung dienten deuterierte Sphingolipide als interne Standards. Die erhaltenen Daten wurden auf den totalen Lipidgehalt normalisiert und die Änderung zur unbehandelten, uninfizierten Kontrolle berechnet. Die dargestellten Heatmaps zeigen die log₂-fachen Veränderungen der Sphingolipid-Spezies im Vergleich von infizierten mit nicht infizierten Proben von 5 Messwerten (2 biologische Replikate). Fett gedruckte und mit Stern gekennzeichnete Zahlenwerte entsprechen einer signifikanten Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($P < 0,05$, *one-way ANOVA*, Dunnett-Test für mehrere Vergleiche).

Ein Vergleich der Daten für coronavirus-induzierte Sphingolipid-Veränderungen in Huh-7-ACE2-Zellen (Abbildung 11) mit den für A549-ACE2-, A549-CD13- und MRC-5-Zellen erhobenen Daten (Abbildung 25) ergab interessante Gemeinsamkeiten und Unterschiede. Hinsichtlich der Cer- und SM-Level bestehen gewisse Gemeinsamkeiten zwischen Huh-7-ACE2-Zellen einerseits und A549-CD13- bzw. A549-ACE2-Zellen andererseits (Abbildung 26). In allen drei Zelllinien wurde nach erfolgter Infektion, unabhängig vom verwendeten Coronavirus, eine (allgemeine) Cer-Erhöhung und eine (allgemeine) SM-Absenkung gemessen. Bei Betrachtung der einzelnen Lipid-Spezies fallen jedoch deutliche Unterschiede auf. So war nur eine einzige Cer-Spezies (Cer 22:0) in allen drei Zelllinien signifikant erhöht. Sowohl für infizierte Huh-7-ACE2- als auch für infizierte A549-ACE2-Zellen wurde eine signifikante Senkung von SM 18:0 festgestellt, nicht jedoch für HCoV-229E-infizierte A549-CD13-Zellen.

Für die MRC-5-Zellen konnte der in den anderen Zelltypen beobachtete Phänotyp einer infektionsinduzierten Cer-Hochregulation und SM-Herabregulation nicht reproduziert werden. Es wurde stattdessen für HCoV-229E eine signifikante Herabregulation von zwei SM-Spezies (SM20:0 und SM22:0) festgestellt, während die Infektion mit MERS-CoV zu keiner signifikanten Änderung der Cer- oder SM-Level führte. Die Daten lassen den

Ergebnisse

Schluss zu, dass Infektionen mit HCoV-229E und MERS-CoV eine Cer- und SM-Deregulation in verschiedenen Zelltypen hervorrufen, die jedoch hinsichtlich ihrer Details einige Unterschiede aufweist und auch nicht für alle Zelltypen zu beobachten ist.

In Bezug auf andere Sphingolipidspezies konnte in allen Zelllinien, unabhängig vom verwendeten Coronavirus, eine Hochregulation von dhCer-Spezies beobachtet werden. Abseits von dieser Beobachtung konnten jedoch keine zwischen den Zelllinien konservierten Veränderungen von Sphingolipidspezies detektiert werden. Bei einem Vergleich unterschiedlicher Zelltypen, die mit dem gleichen Virus infiziert wurden, konnten dagegen mehr Gemeinsamkeiten festgestellt werden. SARS-CoV-2-Infektionen induzierten sowohl in Huh-7-ACE2- als auch in A549-ACE2-Zellen eine signifikante Herabregulation von LacCer 24:1. Für MERS-CoV-Infektionen konnte sowohl in Huh-7-ACE2- als auch in MRC-5-Zellen eine Erhöhung von dhSM-Spezies detektiert werden. Dabei lagen sowohl dhSM 22:0 als auch dhSM 24:0 in beiden Zelllinien signifikant erhöht vor. In HCoV-229E-infizierten Zellen konnten dagegen keine zwischen den Zelllinien konservierte Deregulationen festgestellt werden.

Zusammengefasst zeigte der Vergleich der verschiedenen Zelllinien, dass Infektionen mit Coronaviren zu zelltypabhängigen Deregulationen von Sphingolipiden führen. Ausschließlich die Gruppe der dhCer scheint unabhängig vom Zellsystem und Virus infolge von Infektionen hochreguliert zu werden.

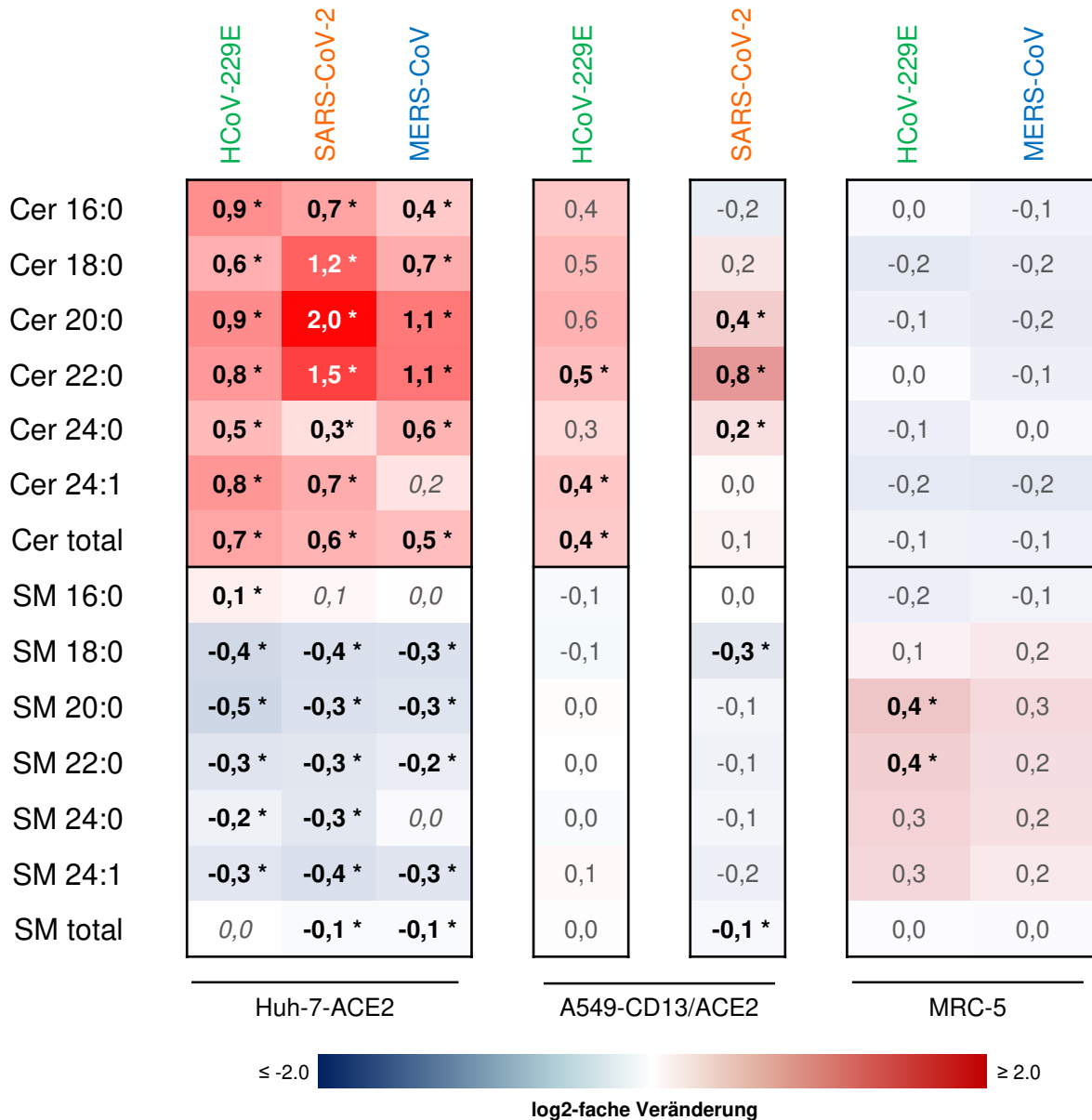


Abbildung 26: Vergleich der relativen Änderungen von Cer und SM nach Infektionen mit den verschiedenen Coronaviren (MOI=3; 12 h p. i.) in den verschiedenen Zelltypen.

Die relativen Anteile der verschiedenen Sphingolipidklassen in den untersuchten Zelltypen (Abbildung 27) zeigte ebenfalls auffällige Unterschiede zwischen den permanenten Zelllinien (Huh-7-ACE2-, A549CD13- und A549-ACE2-Zellen) und den primären MRC-5-Zellen. So enthielten MRC-5-Zellen vergleichsweise hohe Mengen an Cer-Spezies (14 %) und einen geringeren Anteil an SM-Spezies (69 %). Sowohl Huh-7-ACE2-Zellen als auch A549-CD13- und A549-ACE2-Zellen enthielten höhere Mengen an SM-Spezies (> 75 %) und deutlich geringere Mengen an Cer-Spezies (ca. 2 bis 4 %). Auch für die weiteren Sphingolipidklassen wurden teils erhebliche Unterschiede

Ergebnisse

nachgewiesen. Diese unterschiedlichen relativen Mengen der Sphingolipidklassen könnten ein möglicher Erklärungsansatz für die beobachteten unterschiedlichen Lipidregulationsmuster nach Infektionen in den einzelnen Zelltypen sein.

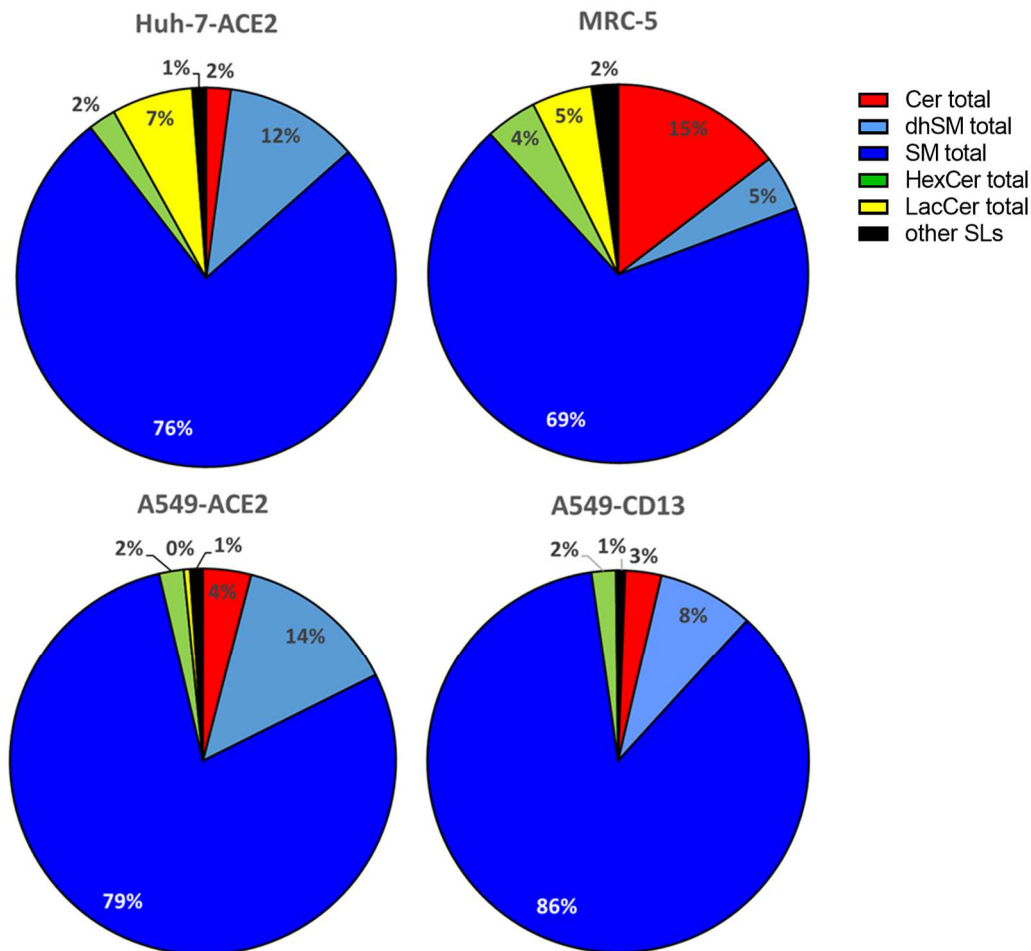


Abbildung 27: Kreisdiagramme zur Darstellung der relativen Anteile der verschiedenen Sphingolipidklassen in den verschiedenen uninfizierten Zelltypen.

3.1.4.2. Effekte von nSMase-Inhibitoren auf die Replikation der CoV in MRC-5 und A549-Zellen

Nachdem festgestellt wurde, dass zwischen verschiedenen Ziellinien teilweise deutliche Unterschiede bezüglich der infektionsassoziierten Deregulation von Sphingolipiden bestehen, wurde im nächsten Schritt die Rolle der nSMase2 in A549- und MRC-5-Zellen untersucht. Hierfür wurde erneut der selektive nSMase2-Inhibitor PDDC verwendet, nachdem überprüft wurde, dass die bisher verwendete Konzentration nicht toxisch in den anderen Zellsystemen ist (Abbildung 28). In allen drei untersuchten Zellsystemen (A549-CD13, A549-ACE2 und MRC-5) führte die Inhibition der nSMase2 durch PDDC zu keiner

Änderung der Replikation von Coronaviren (Abbildung 28). Somit zeigt sich ein deutlich anderer Phänotyp im Vergleich zu den Huh-7-ACE2-Zellen, in denen PDDC die Replikation aller drei Coronaviren signifikant reduzierte. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass zelltypabhängige Unterschiede und Erfordernisse bezüglich (der Regulation) der Sphingolipidspiegel und der daran beteiligten Enzyme bestehen, um eine effiziente Virusreplikation zu ermöglichen.

Ergebnisse

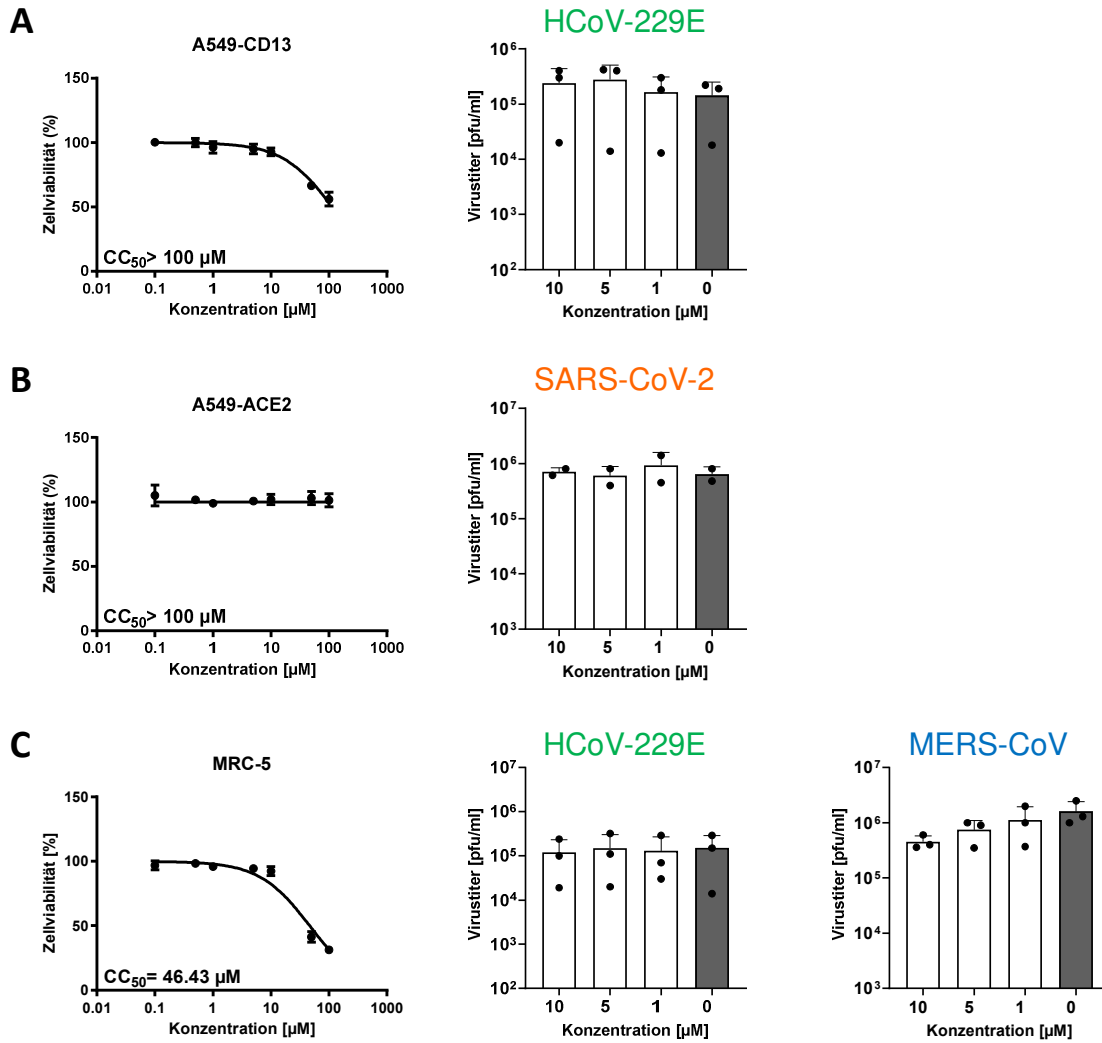


Abbildung 28: Effekt von PDDC auf die virale Replikation von verschiedenen Coronaviren in A549-CD13-, A549-ACE2- und MRC-5-Zellen. A549-CD13- (A), A549-ACE2- (B) oder MRC-5- (C) Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von PDDC für 24 h behandelt. Die Zellviabilität wurde anschließend mittels MTT-Assay bestimmt. Aus den erhaltenen Messwerten ($n = 8$) für die behandelten und unbehandelten Zellen wurde ein Quotient gebildet, der hier in einer Prozentdarstellung mit der zugehörigen Standardabweichung (SD) gezeigt wird. A549-CD13-Zellen wurden mit HCoV-229E, A549-ACE2-Zellen mit SARS-CoV-2 und MRC-5 Zellen mit HCoV-229E oder MERS-CoV infiziert (MOI=0.1). Nach einer Stunde Inokulation wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium mit den angegebenen Konzentrationen von PDDC ersetzt. 24 h p. i. wurden die Überstände abgenommen und die Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten mit den zugehörigen Standardabweichungen. Unterschiede zwischen den behandelten Proben und der unbehandelten Kontrolle wurden mittels t-Test bestimmt.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die zuvor in Huh-7-ACE2-Zellen beobachtete Kolokalisation von Cer mit coronaviralen ROs auch in Lungenzell-Systemen reproduziert werden kann. Hierfür wurden A549-CD13-, A549-ACE2- und MRC-5-Zellen mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert und 8 h p. i. fixiert.

Es konnte für alle drei Zellsysteme gezeigt werden, dass die coronaviralen ROs mit Cer kolokalisieren (Abbildung 29). Es wurden Kolokalisationsraten von über 90 % für jede Zelllinie und unabhängig vom verwendeten Coronavirus bestimmt. Eine Anreicherung von Cer-Spezies in der perinukleären Region, welche für infizierte Huh-7-ACE2-Zellen beobachtet wurde (Abbildung 20), wurde auch für Coronavirus-Infektionen von A549-CD13-, A549-ACE2- und MRC-5-Zellen festgestellt. Diese Daten unterstützen die Aussage, dass Cer unabhängig vom Zelltyp infolge von Coronavirus-Infektionen zum Ort der RO-Bildung rekrutiert wird oder dort neu gebildet wird.

Ergebnisse

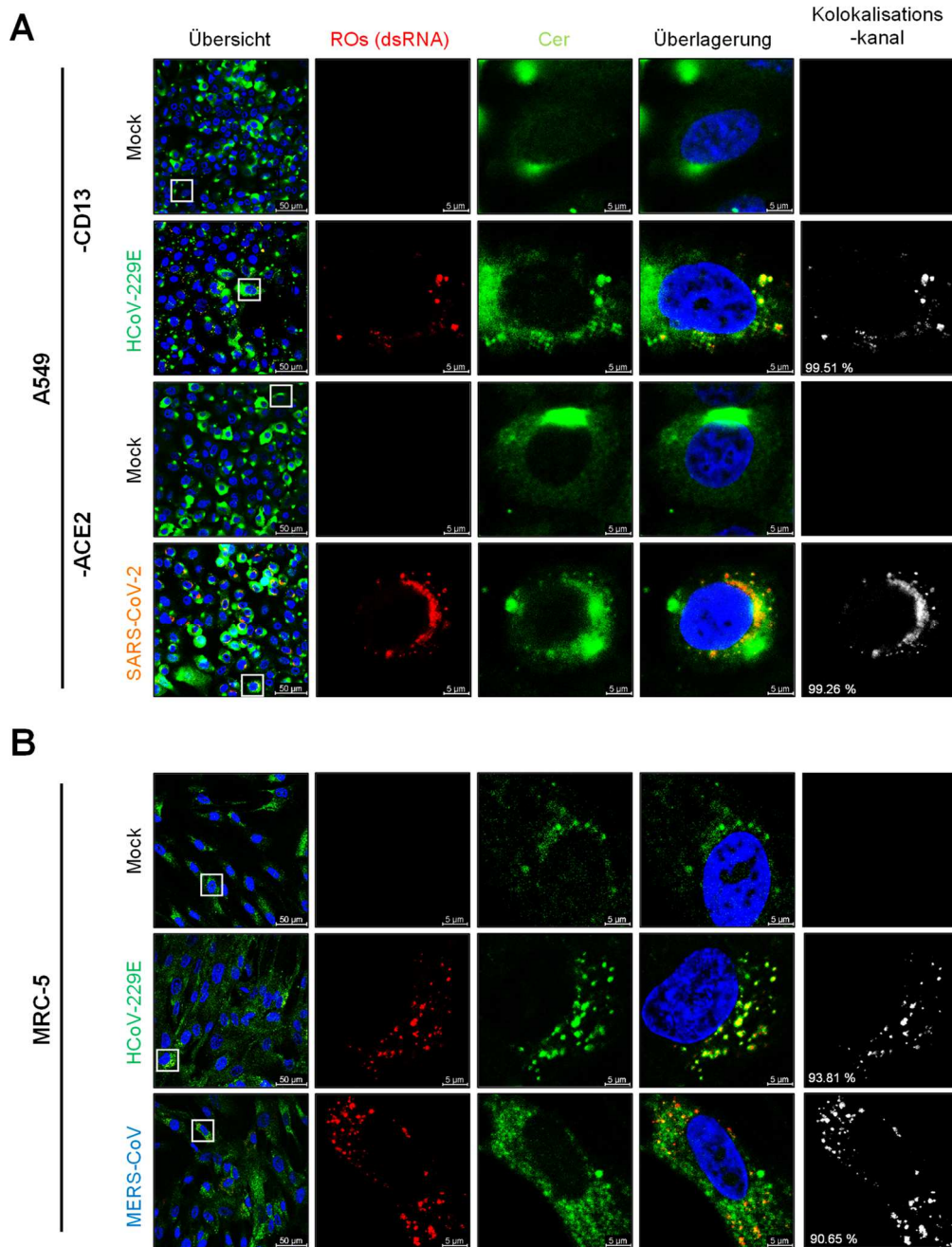


Abbildung 29: Kolokalisation von Coronavirus-induzierten ROs mit Ceramiden in primären und permanenten pulmonalen Zellsystemen. A549-CD13- und A549-ACE2-Zellen (**A**) oder MRC-5-Zellen (**B**) wurden mit HCoV-229E, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV infiziert (MOI=3) und 8 h p. i. mit 3,7 % PFA fixiert. Die Zellen wurden anschließend mit 0,5 % Saponin permeabilisiert. Zum Nachweis der viralen ROs wurde ein monoklonaler Maus-anti-Doppelstrang-RNA-Antikörper verwendet (rot). Zum Nachweis von Ceramiden wurde ein monoklonaler Ceramid-spezifischer Antikörper verwendet (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die dargestellten Zellen werden in den Übersichtsbildern durch Markierungen hervorgehoben (weiße Kästen). Für die überlagerten Bilder wurden Kolokalisationssignale und -raten bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen biologischen Replikaten.

3.2 Ceramide – essentielle Bestandteile von coronaviralen ROs?

3.2.1 Etablierung eines experimentellen Systems zur Erzeugung von artifiziellen coronaviralen ROs

Die bisher erhobenen Daten zeigten eine durch unterschiedliche Coronaviren ausgelöste Kollokalisierung von Cer mit Coronavirus-induzierten ROs. Gleichzeitig konnte für Huh-7-ACE2-Zellen gezeigt werden, dass die Inhibierung eines Cer-synthetisierenden Enzyms, der nSMase2, zu einer Reduktion von ROs im Infektionsverlauf führt. Diese Befunde ließen vermuten, dass Cer-Spezies wichtige Bestandteile coronaviraler ROs sind. Um diese Hypothese zu stärken, wurde in dieser Arbeit erstmals ein Minimalsystem zur Induktion von RO-ähnlichen Membranveränderungen für ein Alphacoronavirus (HCoV-229E) etabliert. Im Falle von Betacoronaviren konnte bereits gezeigt werden, dass die gleichzeitige Überexpression von zwei viralen Transmembranproteinen, nsp3 und nsp4, zur Bildung von RO-ähnlichen Strukturen führt. Für die Etablierung dieses Systems für HCoV-229E wurde ein pcDNA3.1-Vektor synthetisiert, welcher für nsp3 und nsp4 von HCoV-229E als Fusionsprotein codiert (pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5). Durch die im HCoV-229E-nsp3 enthaltene PL2^{pro} wird dieses Fusionsprotein in die beiden Produkte nsp3 und nsp4 gespalten. Um den Nachweis der beiden Proteine zu erleichtern, wurde außerdem die kodierende Sequenz für einen HA-Tag an das 5`-Ende der nsp3-codierenden Sequenz und die kodierende Sequenz für einen V5-Tag an das 3`-Ende der nsp4-Sequenz angefügt.

Zusätzlich wurden zwei Konstrukte erzeugt und verwendet, die nicht in die beiden Einzelproteine nsp3 und nsp4 gespalten werden, was in früheren Studien mit Betacoronaviren zu einem Defekt der RO-Bildung geführt hatte (48, 86). Hierfür wurde einerseits der katalytische Cysteinrest im aktiven Zentrum der PL2^{pro} von HCoV-229E (C1071) durch ein Alanin substituiert (pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_C1701A). Es wurde bereits gezeigt, dass dieser Cysteinrest essentiell für die proteolytische Aktivität der PL2^{pro} ist, und der Austausch gegen ein Alanin zur Akkumulation von ungespaltenem nsp3-4 führt (218). Weiterhin wurde ein Konstrukt erzeugt, bei dem die Schnittstelle zwischen nsp3 und nsp4 verändert wurde, um so die Spaltung zu verhindern. Hierfür wurde ein Lysin an der P4-Position (K2481) der Schnittstelle zwischen nsp3 und nsp4 zu einem Alanin mutiert (pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass die vierte Aminosäure vor der Schnittstelle essentiell für die Erkennung der Schnittstelle durch die PL^{pro} ist (45, 219, 220). Außerdem wurden Konstrukte erzeugt,

Ergebnisse

die entweder nur für nsp3 (pcDNA3.1-HA-nsp3) oder nur für nsp4 (pcDNA3.1-nsp4-V5) mit den jeweiligen Tags codieren. Eine Übersicht der generierten Konstrukte wird in Abbildung 30A gegeben.

Zur Überprüfung der erzeugten Konstrukte wurden diese sequenziert. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die eingeführten Mutationen (Cys1701A zu Ala und Lys2481 zu Ala) nach Expression tatsächlich die Spaltung des pp verhindern. Hierfür wurden Western Blots mit Zelllysaten von transfizierten HEK-ACE2-Zellen durchgeführt (Abbildung 18B). Die Expression von pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5 resultierte in der Detektion von drei Banden im Western Blot. Eine Bande auf Höhe von 230 kDa entspricht dem ungespaltenen pp, sowie zwei Banden mit geringerem Molekulargewicht darunter für die Spaltprodukte (nsp3 bei ca. 180 kDa und nsp4 bei ca. 45 kDa). Die Spaltprodukte laufen somit auf identischer Höhe wie die Einzelprotein HA-nsp3 und nsp4-V5. Die eingebrachten Mutationen führten dagegen nur zur Bildung des pp, es konnten keine weiteren Banden für die Spaltprodukte nsp3 und nsp4 detektiert werden. Die Generierung von Konstrukten, welche für ein nicht-spaltbares nsp3-4-pp codieren, war somit erfolgreich.

Als nächstes wurde die Lokalisierung der gebildeten Proteine nach Transfektion in Huh-7-ACE2-Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abbildung 18C). Für HA-nsp3-4-V5 konnte eine punktuelle Lokalisation im perinukleären Bereich detektiert werden. Diese Lokalisierung entspricht der Lokalisation von dsRNA-Signalen, die nach Infektionen mit HCoV-229E in Huh-7-ACE2-Zellen detektiert werden konnten (Abbildung 18). Somit kann spekuliert werden, dass die Überexpression von nsp3 und nsp4 auch in HCoV-229E zu der Bildung von RO-ähnlichen Strukturen führt. Interessanterweise konnte auch nach Transfektion der Konstrukte, die für das nicht-spaltbare nsp3-4-pp kodieren, eine vergleichbare punktuelle Lokalisierung festgestellt werden. Die Lokalisierung der Einzelproteine dagegen ist diffus und scheint nicht auf einen bestimmten Bereich der Zelle beschränkt zu sein. Eine Doppeltransfektion von pcDNA3.1-HA-nsp3 und pcDNA3.1-nsp4-V5 führt dagegen zu derselben punktuellen Lokalisierung im perinukleären Bereich wie bei Expression der nsp3-4-pp. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die gemeinsame Expression von nsp3 und nsp4, unabhängig von der proteolytischen Prozessierung, zu einer Lokalisierung der Proteine in distinkte Areale um den Zellkern führt.

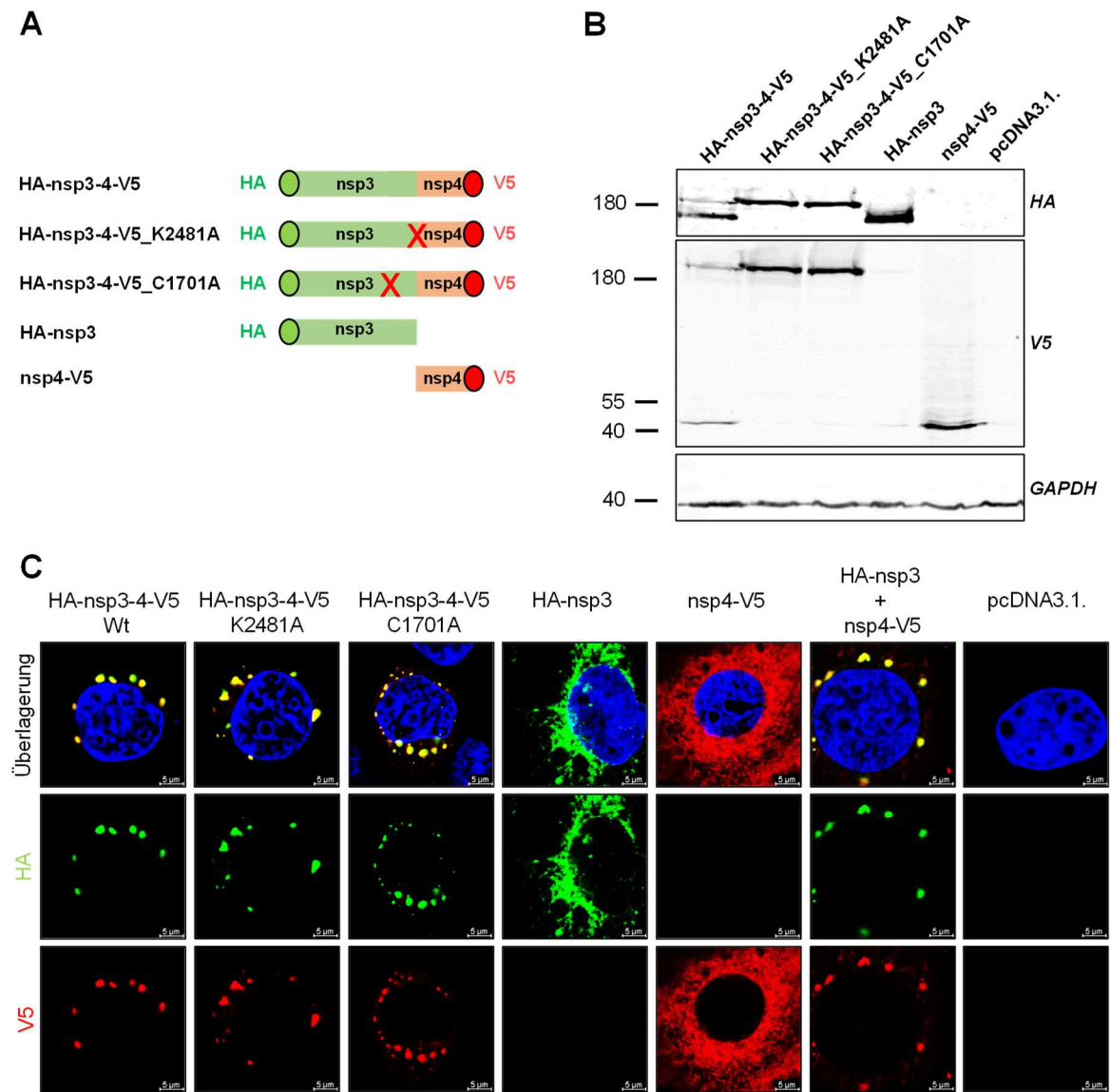


Abbildung 30: Etablierung eines experimentellen Systems zur Produktion von ROs in Zellen mittels Transfektion von HCoV-229E nsp3-4. (A) Schematische Darstellung der für diese Arbeit angefertigten nsp3-4-Konstrukte. Sämtliche Konstrukte basieren auf dem pcDNA_3.1-Plasmid, in das codonoptimierte Sequenzen eingesetzt wurden. Zur Detektion wurden ein HA-Tag an den N-Terminus von nsp3 und ein V5-Tag an den C-Terminus von nsp4 angefügt. (B) HEK-ACE2-Zellen wurden mit dem jeweiligen Expressionsplasmid (0,75 μg DNA) unter Verwendung von Lipofectamin2000 transfiziert. Nach 24 h p. t. wurden die Zellen lysiert und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die überexprimierten viralen Proteine wurden mit folgenden Antikörpern nachgewiesen: monoklonaler Maus-anti-HA-Antikörper und monoklonaler Kaninchen-anti-V5-Antikörper. (C) Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit dem jeweiligen Expressionsplasmid (0,75 μg DNA) unter Verwendung von Lipofectamin2000 transfiziert. 24 h p. t. wurden die Zellen mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert. Zur Detektion der überexprimierten Proteine mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde sowohl ein monoklonaler Maus-anti-HA-Antikörper (grün) als auch ein monoklonaler Kaninchen-anti-V5-Antikörper (rot) verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

Ergebnisse

Um abschließend zu klären, ob nach einer Überexpression von pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5 Membranveränderungen erfolgen, die mit den in coronavirus-infizierten Huh-7-ACE2-Zellen gebildeten ROs vergleichbar sind, wurden die transfizierten Zellen mittels Elektronenmikroskopie analysiert und mit HCoV-229E-infizierten Zellen verglichen (Abbildung 31). Typischerweise können durch Coronaviren induzierte DMVs mit einer Größe von ungefähr 200-300 nm nach wenigen Stunden in den infizierten Zellen detektiert werden (48, 66). Wie bereits erwähnt, hatte die Expression von SARS-CoV-2- oder MERS-CoV-nsp3-4 in früheren Arbeiten ebenfalls zur Bildung von DMVs in transfizierten Zellen geführt.

Die elektronenmikroskopische Analyse von HCoV-229E-infizierten Huh-7-ACE2-Zellen zeigte die Präsenz von Vesikeln in der perinukleären Region. Für einige dieser Vesikel konnte eine Doppelmembran nachgewiesen werden, was zu der Vermutung führt, dass diese Vesikel Virus-induzierte DMVs sind. Jedoch war die Anzahl an Vesikeln mit nachweisbar Doppelmembran äußerst gering, was möglicherweise auf eine unzureichende strukturelle Erhaltung dieser Strukturen während der Probenpräparation hindeuten könnte.

Die Expression der pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5-Konstrukte führte ebenfalls zu einer Bildung von Vesikeln, die hinsichtlich ihrer Größe (ca. 200-300 nm) und Form den für HCoV-229E-Infektionen beschriebenen Vesikeln entsprachen. Es konnten jedoch erneut nur relativ wenige Doppelmembranstrukturen detektiert werden. Vesikel ähnlicher Größe, jedoch gänzlich ohne Doppelmembranen, konnten auch nach Transfektion mit dem Leervektor (pcDNA3.1) nachgewiesen werden.

Zusammengefasst konnte bestätigt werden, dass die heterologe Expression von HCoV-229E-nsp3-4 in Zellen zur Bildung von Vesikeln führte, die morphologisch den von HCoV-229E-Infektionen gebildeten DMVs entsprachen. Für die Bildung dieser Vesikel war eine proteolytische Spaltung von nsp3-4 nicht erforderlich.

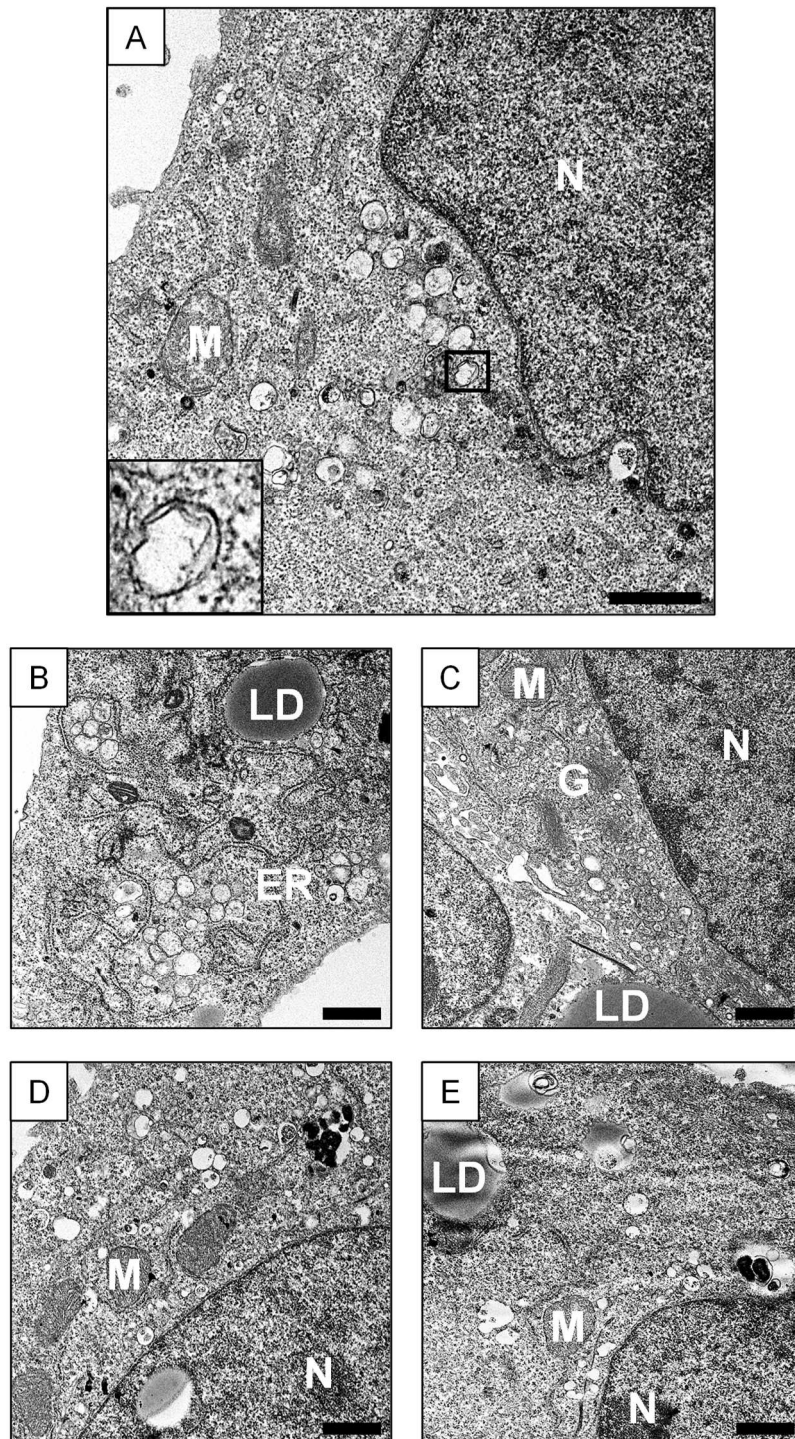


Abbildung 31: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Bildung von ROs nach Transfektion von pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5. Huh-7-Ace2-Zellen wurden entweder mit HCoV-229E für 10 h infiziert (MOI=3) (A) oder mit pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5 (B), pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A (C), pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_C1701A (D) oder pcDNA3.1 für 24 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 % PFA und 2,5 % Glutaraldehyd fixiert und für die weitere Analyse aufgearbeitet. Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop Leo 906 bei 80 kV. Der dargestellte Messbalken entspricht einer Länge von 500 nm. ER = Endoplasmatisches Retikulum; G = Golgi-Apparat; LD = Lipidtröpfchen; M = Mitochondrium; N = Nucleus.

Ergebnisse

3.2.2. Sphingolipidanalyse von Huh-7-ACE2-Zellen nach Transfektion von HCoV-229E-nsp3-4-Expressionsplasmiden

Nachdem die Induktion von artifiziellen ROs durch die Expression von nsp3 und nsp4 etabliert wurde (Abschnitt 3.2.1), kann dieses Minimalsystem für weiterführende Sphingolipidanalysen verwendet werden.

Die bisher in dieser Arbeit erhobenen Daten deuten darauf hin, dass CoV-Infektionen eine vermehrte Bildung von Cer-Spezies in den infizierten Zellen auslösen und diese Cer-Spezies in die CoV-induzierten ROs eingebaut werden. Daher wurde nach Etablierung des Systems zur Bildung artifizieller ROs mittels Überexpression von nsp3 und nsp4 untersucht, ob die Induktion dieser artifiziellen ROs in Zellen zu ähnlichen Änderungen der Sphingolipidspezies führt wie nach einer Virusinfektion. Hierfür wurden Huh-7-ACE2-Zellen mit pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5 sowie den Konstrukten, die für die nicht spaltbaren nsp3-4-Varianten codieren (pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A und pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_C1701A), transfiziert. Als Negativkontrolle dienten Huh-7-ACE2-Zellen, die mit einem Leervektor (pcDNA3.1) transfiziert wurden.

Die Zellen wurden 24 h p. t. für die Lipidanalyse aufbereitet und die Transfektionseffizienz wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie in Abbildung 32 dargestellt, lag die Transfektionseffizienz für pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5 und pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_C1701A bei über 40 %. Für pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A lag die Transfektionseffizienz etwas niedriger bei knapp über 35 %. Dennoch zeigten sich bei Überexpression von HA-nsp3-4-V5_K2481A die meisten signifikanten Änderungen unterschiedlicher Sphingolipid-Spezies (20 Spezies). Für HA-nsp3-4-V5 konnten 9 signifikante deregulierte Sphingolipidspezies detektiert werden, für HA-nsp3-4-V5_C1701A insgesamt 17 signifikant deregulierte Spezies.

Alle drei Konstrukte sorgten nach Transfektion für eine Erhöhung der LCBs, wobei nur die Erhöhung der dhSph-Level signifikant war. Ebenfalls nach Transfektion erhöht waren die Level aller dhCer-Spezies. Unabhängig vom verwendeten Konstrukt waren all diese Änderungen im Vergleich zur Transfektion mit dem Leervektor signifikant erhöht. Die Überexpression von nsp3-4 führte außerdem zu einer Erhöhung der Level der Cer-Spezies in den transfizierten Zellen. Für HA-nsp3-4-V5 konnte jedoch nur eine einzige signifikante Erhöhung, für Cer 16:0, nachgewiesen werden. Nach Transfektion mit pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5_K2481A waren alle Cer-Spezies signifikant erhöht, außer Cer

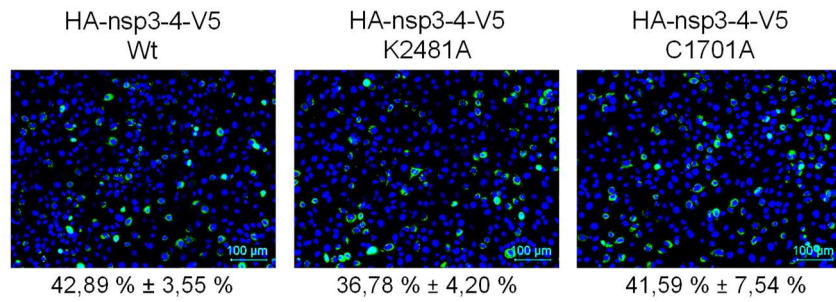
24:0. Bei HA-nsp3-4-V5_C1701A wurde eine signifikante Erhöhung von Cer 18:0 und Cer 20:0 festgestellt.

Hinsichtlich der dhSM-Level konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten festgestellt werden. So konnte für HA-nsp3-4-V5_C1701A eine signifikante Hochregulation von fünf dhSM-Spezies festgestellt werden. Für HA-nsp3-4-V5 und HA-nsp3-4-V5_K2481A konnte dagegen eine Herabregulation der dhSM-Level beobachtet werden, im Fall von HA-nsp3-4-V5_K2481A war diese Herabregulation für vier Spezies signifikant. Bezüglich der SM-Level konnten keine signifikanten Änderungen für eines der Konstrukte festgestellt werden. In Bezug auf die GlcCer konnten erneut Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten festgestellt. Für HA-nsp3-4-V5_K2481A konnte eine Hochregulierung von LacCer 16:0 festgestellt werden, für HA-nsp3-4-V5_C1701A dagegen eine Herabregulation der LacCer 16:0 und für HA-nsp3-4-V5 keine signifikanten Änderungen.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Überexpression von HCoV-229E-nsp3-4 zu einer Erhöhung von LCBs, dhCer- und Cer-Spezies führt, unabhängig von der Spaltung von nsp3-4 in nsp3 und nsp4. Die eingeführten Mutationen scheinen jedoch einen Effekt auf die Regulation der dhSM- und GlcCer-Level in der Zelle zu haben. Eine vergleichbare Erhöhung von dhCer- und Cer-Spezies war auch nach Infektion mit HCoV-229E beobachtet worden (siehe Abbildungen 11 und 25), ebenso eine Kolo-kalisation von Cer mit den CoV-induzierten ROs (siehe Abbildungen 20 und 29). Die gefundene Erhöhung der Cer-Spezies nach Überexpression von nsp3-4 befindet sich somit im Einklang mit der bereits zuvor aufgestellten Hypothese (siehe Kapitel 3.1), dass Cer essentielle Bestandteile der CoV-induzierten ROs sind.

Ergebnisse

A



B

	HA-nsp3-4-V5 Wt	HA-nsp3-4-V5 K2481A	HA-nsp3-4-V5 C1701A
S1P	0,5	0,4	0,3
dhSph	0,5 *	0,3 *	0,5 *
Sph	0,2	0,2	0,1
dhCer 16:0	1,0 *	1,1 *	0,9 *
dhCer 18:0	0,9 *	1,2 *	1,2 *
dhCer 20:0	0,7 *	1,0 *	1,2 *
dhCer 22:0	0,6 *	0,8 *	1,0 *
dhCer 24:0	0,5 *	0,7 *	0,8 *
dhCer 24:1	0,5 *	0,7 *	0,9 *
dhCer total	0,7 *	0,9 *	1,0 *
Cer 16:0	0,5 *	0,7 *	0,2
Cer 18:0	0,4	0,8 *	0,4 *
Cer 20:0	0,2	0,7 *	0,5 *
Cer 22:0	0,2	0,5 *	0,3
Cer 24:0	-0,1	0,2	0,0
Cer 24:1	0,0	0,4 *	0,2
Cer total	0,2	0,5 *	0,1
dhSM 16:0	0,0	-0,1	0,2 *
dhSM 18:0	0,0	0,0	0,3 *
dhSM 20:0	-0,1	-0,1	0,2 *
dhSM 22:0	-0,1	-0,3 *	0,1 *
dhSM 24:0	-0,2	-0,3 *	0,0
dhSM 24:1	-0,1	-0,3 *	0,1
dhSM total	-0,1	-0,2 *	0,1 *
SM 16:0	0,0	0,1	0,0
SM 18:0	0,0	0,0	0,0
SM 20:0	-0,1	0,0	0,0
SM 22:0	0,0	-0,1	0,0
SM 24:0	-0,1	-0,1	-0,1
SM 24:1	0,0	-0,2	0,0
SM total	0,0	0,0	0,0
HexCer 16:0	0,2	0,3	0,1
HexCer 24:1	-0,2	0,1	0,0
HexCer total	0,0	0,2	0,0
LacCer 16:0	0,1	0,2 *	-0,2 *
LacCer 24:1	-0,2	0,1	-0,2
LacCer total	0,0	0,2 *	-0,2 *



Abbildung 32: Veränderungen der einzelnen Sphingolipidspezies in mit pcDNA3.1-HA-nsp3-4-V5 transfizierten Huh-7-ACE2-Zellen. Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit 3 µg der angegebenen Konstrukte und 9 µg PEI STAR transfiziert. Als Kontrolle dienten Huh-7-ACE2-Zellen, die mit pcDNA3.1 transfiziert wurden. 24 h p. t. wurden die Zellen mit PBS gewaschen, pelletiert und in Methanol aufgenommen. Eine separate Zellvertiefung mit transfizierten Zellen wurde ebenfalls gewaschen und mit 3,7 % PFA + 0,5 % Triton-X100 fixiert und permeabilisiert für die weitere Untersuchung mittels Immunfluoreszenz **(A)**. Zur Detektion der coronaviralen nsps wurde ein monoklonaler Maus-anti-HA-Antikörper verwendet (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). **(C)** Für die eigentliche Sphingolipidanalyse wurden die extrahierten Lipide mittels HPLC-MS/MS analysiert. Zur Quantifizierung dienten deuterierte Sphingolipide als interne Standards. Die erhaltenen Daten wurden auf den Gesamtlipid-Gehalt normalisiert und die Änderung zur unbehandelten, uninfizierten Kontrolle berechnet. Die dargestellten Heatmaps zeigen die log₂-fachen Veränderungen der Sphingolipid-Spezies zwischen infizierten und nicht infizierten Proben von 5 Messwerten (2 biologische Replikate). Fett gedruckte und mit einem Stern markierte Zahlenwerte zeigen signifikante Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($P < 0,05$, *one-way ANOVA*, Dunnett-Test für mehrere Vergleiche).

3.2.3. Ceramide kolokalisieren mit den artifiziell gebildeten ROs

Es konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass die durch Coronavirus-Infektionen induzierten ROs mit Ceramiden kolokalisieren (Abbildung 20). Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob die durch das etablierte Minimalsystem induzierten ROs ebenfalls mit Cer-Spezies kolokalisieren.

Hierfür wurden Huh-7-ACE2-Zellen mit den nsp3-4-Konstrukten transfiziert und eine mögliche Kolokalisation mit Cer mittels Immunfluoreszenz untersucht. Für HA-nsp3-4-V5 sowie HA-nsp3-4-V5_K2481A und HA-nsp3-4-V5_C1701A konnte eine Kolokalisation mit Ceramiden nachgewiesen werden (Abbildung 33). Die Kolokalisationsrate lag hierbei bei über 90 %. Für die Einzelproteine nsp3 und nsp4 konnte aufgrund der diffusen Verteilung ebenfalls eine Kolokalisation mit Ceramiden gezeigt werden; die Kolokalisationsraten lagen hier jedoch unter 90 %. Bei einem Vergleich der Cer-Lokalisierung fällt auf, dass nach der Transfektion von nsp3-4 eine klare, fokale, perinukleäre Akkumulation erfolgt, während die Einzelproteine nsp3 und nsp4 deutlich breiter in der Zelle verteilt sind. Außerdem fällt wiederum eine Konzentrierung von Cer in der perinukleären Region auf. Dieser Phänotyp ist vergleichbar zu den für Coronavirus-Infektionen erhaltenen Daten zur Kolokalisation von Cer mit ROs (Abbildung 20) und unterstützt erneut die Hypothese, dass Cer-Spezies Bestandteile von coronaviralen ROs sind und während der Bildung von ROs synthetisiert oder rekrutiert werden.

Ergebnisse

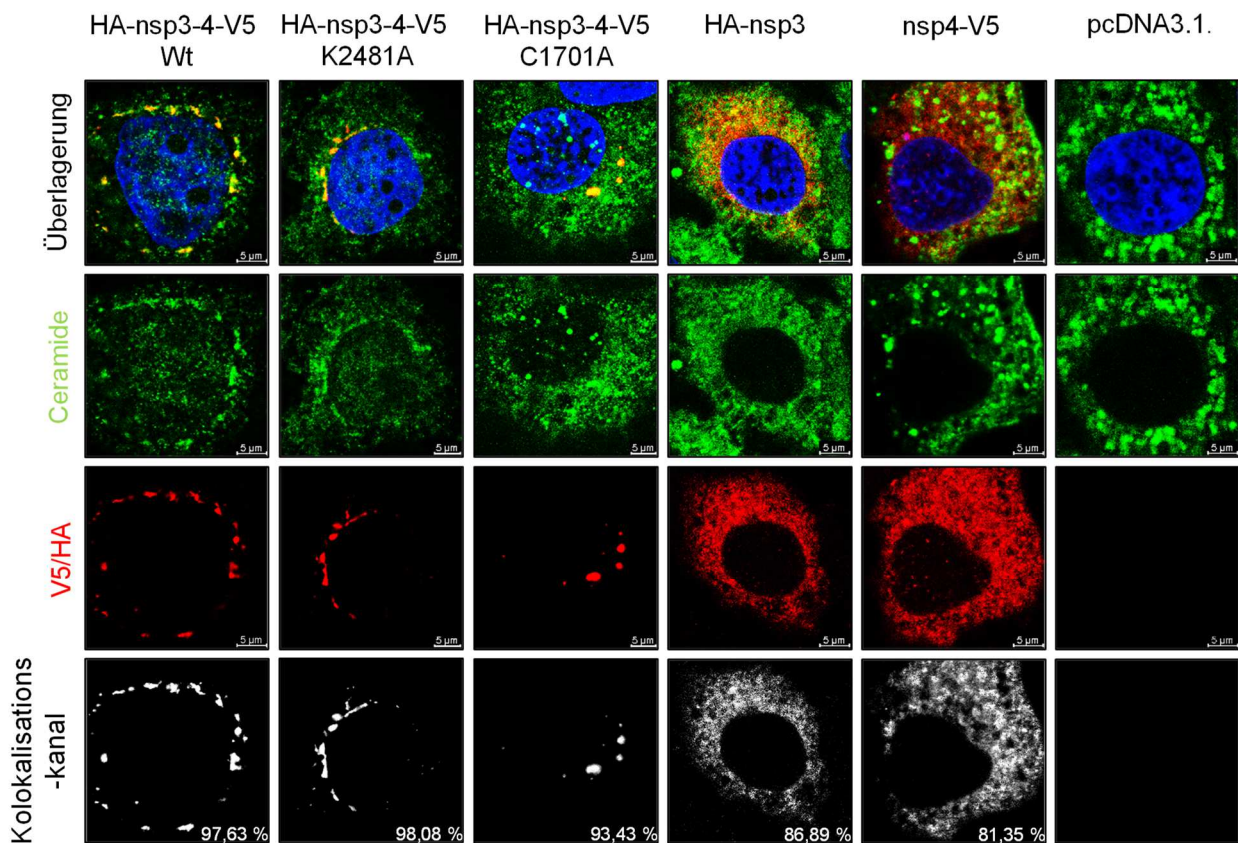


Abbildung 33: Kolokalisation von künstlich induzierten ROs mit Ceramiden. Huh-7-ACE2-Zellen wurden mit dem jeweiligen Plasmid (0,75 µg DNA) unter Verwendung von Lipofectamin2000 transfiziert. 24 h p. t. wurden die Zellen mit 3,7 % PFA fixiert. Die Zellen wurden anschließend mit 0,5 % Saponin permeabilisiert. Zur Detektion der viralen nsps wurde ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet, der spezifisch für die verwendeten Tags (HA oder V5) war. Der Nachweis von Ceramiden erfolgte mit einem monoklonalen Ceramid-spezifischen Antikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Für die überlagerten Bilder wurden Kolokalisationssignale und -raten bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen biologischen Replikaten.

4. Diskussion

4.1 Verschiedene Coronaviren induzieren abhängig vom infizierten Zelltyp ähnliche Veränderungen des Sphingolipidhaushaltes

Coronaviren sind in jedem Schritt ihrer Replikation auf Wirtszellfaktoren angewiesen. In den letzten Jahren ist dabei die Rolle von zellulären Lipiden, und inwiefern deren Synthese und Verteilung durch coronavirale Infektionen beeinflusst werden, mehr und mehr in den Fokus gerückt (118-120). Coronaviren induzieren im Laufe ihrer Replikation umfassende Membranzumstrukturierungen, unter anderem zur Bildung der für die Replikation essentiellen ROs. Welche zellulären Proteine und Lipide an der RO-Bildung beteiligt sind, ist bislang wenig untersucht worden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen coronavirale Infektionen auf die zellulären Level von Sphingolipiden haben. Hierfür wurden zunächst vergleichende Sphingolipidomanalysen eines Zelltyps (Huh-7-ACE2-Zellen) durchgeführt, der mit unterschiedlichen Coronaviren infiziert wurde. Weiterhin wurden Analysen des Sphingolipidoms in weiteren pulmonalen Zellsystemen nach Infektionen durchgeführt.

Für die Huh-7-ACE2-Zellen konnte dabei gezeigt werden, dass alle drei verwendeten Coronaviren zu einer zeitabhängigen Deregulation des Sphingolipidhaushaltes in den infizierten Huh-7-ACE2-Zellen führen (siehe Abbildung 11). Am auffälligsten war dabei, dass alle drei Coronaviren eine signifikante Hochregulierung von dhCer- und Cer-Leveln bei gleichzeitiger Absenkung von SM-Leveln 12 h p. i. induzierten. Ähnliche Effekte konnten auch für SARS-CoV-2 in A549-ACE2- und für HCoV-229E in A549-CD13-Zellen gezeigt werden, wobei diese Effekte jedoch weniger stark ausgeprägt waren (siehe Abbildung 25).

Diese Lipid-Unterschiede könnten auf unterschiedlichen Replikationskinetiken der Coronaviren in den verschiedenen Zelltypen beruhen. Gegenüber den Virustitern von ca. $1 \cdot 10^5$ PFU/ml, die mit HCoV-229E-Infektionen in Huh-7-ACE2-Zellen erreicht wurden, führten Infektionen von A549-CD13-Zellen mit HCoV-229E zu zehnfach niedrigeren Virustitern. Für SARS-CoV-2-infizierte A549-ACE2-Zellen wurde auch bereits in einer früheren Studie eine deutlich höhere Deregulation von Sphingolipiden für den Zeitpunkt 48 h p. i. berichtet, inklusive einer vergleichsweise stärkeren Erhöhung von Cer-Leveln. Es kann somit spekuliert werden, dass längere Infektionszeiten in den verschiedenen A549-Zellen zu deutlicheren Veränderungen in den Sphingolipidleveln führen könnten. Eine gewisse Zelltypabhängigkeit kann jedoch ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Diskussion

Eine solche Zelltypabhängigkeit wird besonders deutlich für MRC-5-Zellen. Interessanterweise konnten für MRC-5-Zellen nach Infektion mit HCoV-229E oder MERS-CoV komplett gegensätzliche Effekte auf die Cer- und SM-Level gezeigt werden (siehe Abbildung 26).

Die einzige Änderung, die in allen Zelltypen nach Infektion mit jedem Coronavirus beobachtet werden konnte, ist ein Anstieg der dhCer-Level. Ein solcher Anstieg von dhCer-Level ist jedoch auch in Zellen nach Infektionen mit Bakterien, Pilzen und anderen Viren gezeigt worden ((221), Fabian Schumacher, persönliche Mitteilung). Die gefundene Hochregulation von dhCer-Spezies könnte daher auch eine unspezifische Stressreaktion auf eine Infektion mit (irgend)einem Pathogen sein.

Bei genauer Betrachtung der Sphingolipidlevel der uninfizierten Zelltypen ist auffällig, dass MRC-5-Zellen relativ hohe prozentuale Cer-Level im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Zelltypen aufweisen (siehe Abbildung 27). Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass MRC-5-Zellen Fibroblasten sind, die aus einem Embryo gewonnen wurden (203). Dieser Hintergrund wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die hohen basalen Cer-Level im Vergleich zu den anderen hier untersuchten permanenten Zelltypen sowie weiteren permanenten Zelllinien aus der Literatur (222).

Es kann weiterhin vermutet werden, dass in MRC-5-Zellen die zusätzliche Produktion von Cer während der Infektion lokal begrenzt ausfällt und daher die globalen Level nicht weiter beeinflusst werden oder dass MRC-5-Zellen bereits über ausreichend hohe basale Cer-Level verfügen und somit keine zusätzliche Produktion infolge der Infektion erfolgen muss.

Letztere Hypothese wird unterstützt durch den Befund, dass die Replikation von Coronaviren in MRC-5 durch nSMase2-Inhibition unbeeinträchtigt bleibt. Um abschließend zu klären, inwieweit MRC-5-Zellen eine Sonderposition hinsichtlich ihrer Cer-Level einnehmen, müssen weitere Sphingolipidomanalysen mit relevanten primären Zellmodellen durchgeführt werden.

Die hier erhobenen Daten stimmen zum Großteil (mit Ausnahme der MRC-5-Zellen) mit den Resultaten anderer, zum Teil erst kürzlich publizierter, Studien überein. So konnte ein signifikanter Anstieg von Cer-Spezies in HCoV-229E-infizierten Huh-7 Zellen (127), in MERS-CoV-infizierten Calu-3-Zellen (133) und für SARS-CoV-2-Infektionen in A549-ACE2 und HEK-293T-ACE2-Zellen (122), sowie in VeroE6-Zellen (134, 135) gezeigt werden.

Ähnliche Auswirkungen auf den zellulären Sphingolipidhaushalt wurden auch für weitere +ssRNA-Viren beobachtet. So konnte für verschiedene Mitglieder der Familie *Flaviviridae* eine Erhöhung von Cer-Leveln in infizierten Zellen nachgewiesen werden (223). Interessanterweise wurde in einer vergleichenden Studie gezeigt, dass Rhinovirus A (ein RO-bildendes +ssRNA-Virus) und IAV (ein im Zellkern replizierendes –ssRNA-Virus) in Calu-3-Zellen eine starke Deregulation von Sphingolipiden auslösen, mit einer signifikanten Herabregulation von verschiedenen SM-Spezies (224). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Viren auch unabhängig von einer RO-Bildung Sphingolipide in vergleichbarem Umfang deregulieren. Zudem induzieren verschiedene DNA-Viren aus der Familie der *Orthoherpesviridae* ebenfalls eine Hochregulation von Cer-Spezies und eine Reduktion von SM-Spezies in infizierten Zellen (225).

Dies könnte darauf hindeuten, dass entweder ein potenziell konservierter viraler Mechanismus existiert, der unabhängig von der RO-Bildung ähnliche Deregulationen des Sphingolipidhaushaltes in infizierten Zellen induziert oder aber die beobachteten Veränderungen der Sphingolipide Teil einer infektionsinduzierten Stressantwort der infizierten Zellen sind.

4.2. Die Rolle von zellulären Sphingomyelinasen in der Replikation von Coronaviren

4.2.1 Coronaviren zeigen eine unterschiedliche Abhängigkeit von verschiedenen zellulären Sphingomyelinasen

Der in einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen beobachtete Anstieg von Cer-Leveln bei gleichzeitiger Reduktion der SM-Level führte zu der Hypothese, dass SMasen an der Replikation von Coronaviren beteiligt sein könnten. Die SMasen bilden eine Gruppe von Enzymen, die anhand ihres pH-Optimums unterschieden werden (143). Für die aSMase wurde bereits eine wichtige Rolle beim Eintrittsprozess von SARS-CoV-2 in die Zelle beschrieben (162, 226). Eine Rolle von nSMasen in der Replikation von Coronaviren wurde bisher nicht im Detail untersucht, konnte jedoch für andere Viren, wie das West-Nil-Virus (WNV), ZIKV oder HIV, nachgewiesen werden (129, 132, 200).

Interessanterweise resultierte die Inhibition der aSMase mit zwei spezifischen Inhibitoren (ARC39 und PCK310) nur bei SARS-CoV-2 (im Einklang mit bereits publizierten Studien) in einer signifikant verminderten Replikation (siehe Abbildung 13). Dieser Befund wird durch die Knockdown-Daten insoweit bestätigt (siehe Abbildung 16), dass eine Reduktion

Diskussion

der aSMase-Expression nur die SARS-CoV-2-Replikation, nicht jedoch die Replikation der anderen Coronaviren, verminderte. Dieser Befund befindet sich auch im Einklang mit bereits publizierten Daten. So wurde beispielsweise mit virusähnlichen Partikeln (virus-like particles), die das SARS-CoV-2-S-Protein präsentieren und somit den ACE2-abhängigen Eintritt von SARS-CoV-2 imitieren können, nachgewiesen, dass der Eintritt von SARS-CoV-2 in die Zelle von der Aktivität der aSMase abhängig ist (162). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass infolge der Interaktion des SARS-CoV-2-S-Proteins mit dem ACE2-Rezeptor eine Relokalisierung der aSMase zur äußeren Zellmembran stattfindet (226).

Es kann daher vermutet werden, dass der Effekt der aSMase auf den Viruseintritt abhängig vom verwendeten Eintrittsrezeptor sein könnte. SARS-CoV-2 verwendet, ebenso wie SARS-CoV und HCoV-NL63, den humanen ACE2-Rezeptor (36, 37, 227). HCoV-229E und MERS-CoV verwenden dagegen andere Rezeptoren (CD13/APN beziehungsweise DPP4) (34, 35). Um diese Hypothese zu prüfen, könnten die Experimente auf weitere Coronaviren, wie z. B. SARS-CoV und HCoV-NL63, die ebenfalls ACE2 als Rezeptor nutzen, ausgeweitet werden.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass Antidepressiva eine antivirale Wirkung gegen Coronaviren *in vitro* haben (160-164). Dazu gehören insbesondere FIASMAs (funktionelle Inhibitoren der sauren SMase), deren antivirale Wirkung gegen SARS-CoV-2 im Wesentlichen durch die Hemmung der zellulären aSMase-Aktivität vermittelt wird (162, 163). Überraschenderweise konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass FIASMAs auch eine Wirkung auf MERS-CoV haben (164). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten legen jedoch nahe, dass die inhibierenden Effekte der Antidepressiva auf MERS-CoV nicht im Zusammenhang mit ihrer FIASMA-Aktivität stehen. Es bleibt zu untersuchen, ob die (auf der Grundlage von Docking-Daten) postulierte Bindung dieser Antidepressiva an das coronavirale S-Protein und die 3CL^{pro} (164) zu dieser antiviralen Wirkung beitragen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nSMasen, vor allem die nSMase2, wichtige Wirtszellfaktoren sind, die die Replikation von Coronaviren in Huh-7-ACE2-Zellen unterstützen. Die pharmakologische Inhibierung der nSMasen (durch GW4869) oder nSMase2 (durch PDDC) reduzierte die Replikation aller drei verwendeten Coronaviren signifikant (siehe Abbildung 14). Um unspezifische Effekte der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren auszuschließen, wurden außerdem genetische Knockdowns der

zellulären Sphingomyelinasen mittels siRNAs durchgeführt. Der Einsatz von SMase-Transkript-spezifischen siRNAs bestätigte, dass alle nSMasen für SARS-CoV-2-Infektionen von Bedeutung sind, während nur die nSMase2 eine Rolle für die MERS-CoV-Infektion zu spielen scheint (siehe Abbildung 16). Für HCoV-229E-Infektionen zeigte der Knockdown von nSMase-Transkripten keine nachweisbare Wirkung. Mögliche Ursachen für diesen Befund müssten in weiteren Studien im Detail untersucht werden. Erste experimentelle Daten zeigten bereits, dass auch Doppel- oder Dreifach-Knockdowns von zellulären nSMasen keine signifikante Hemmung der HCoV-229E-Replikation in Huh-7-ACE2-Zellen verursachten (Daten hier nicht gezeigt), wobei in dem verwendeten experimentellen Protokoll jedoch nicht sichergestellt war, dass die transfizierten Zellen tatsächlich (alle) 2 oder 3 unterschiedlichen siRNAs aufgenommen hatten.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass zwischen verschiedenen Coronaviren Unterschiede bestehen hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von zellulären Sphingomyelinasen. Da nur die Hemmung der nSMase2-Aktivität zu einer signifikanten Unterdrückung der Virusreplikation aller hier untersuchten Coronaviren führte, habe ich mich bei den nachfolgenden Arbeiten auf dieses Enzym konzentriert.

4.2.2 Die neutrale Sphingomyelinase 2 ist ein wichtiger Wirtszellfaktor für die Bildung von coronaviralen replikativen Organellen in Huh-7-ACE2-Zellen

Um die Rolle der nSMase2 in der viralen Replikation zu charakterisieren, wurden Experimente durchgeführt, in denen geeignete Inhibitoren der nSMase-Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der HCoV-229E-Infektion zugegeben wurden. Hierbei wurde festgestellt, dass der nSMase2-Inhibitor PDDC einen frühen Schritt der Replikation beeinträchtigt, nicht jedoch den Viruseintritt (siehe Abbildung 17). Für verschiedene Vertreter der *Flaviviridae* war bereits gezeigt worden, dass Cer-Spezies zu den wesentlichen Lipidbestandteilen von viralen ROs gehören (129, 132), die bereits kurz nach dem Eintritt des Virus in die Zelle vermehrt gebildet werden. Daher wurde als nächstes getestet, ob der nSMase2-Inhibitor PDDC die Bildung von coronaviralen ROs in infizierten Zellen reduziert. Die Inhibition der nSMase2 mittels PDDC führte zu ähnlich Bildung viraler ROs in infizierten Zellen wie sie auch bei Verwendung bereits bekannter RO-Inhibitoren (Py-2 und K22) gefunden wird (127, 214) (siehe Abbildungen 18 und 19).

Diskussion

Jedoch kann anhand dieses Versuches nicht ausgeschlossen werden, dass vorangehende Schritte des viralen Replikationszyklus, wie z.B. Translation der viralen Genom-RNA oder Spaltung der viralen Replikase-Polyproteine, bereits durch PDDC gehemmt werden und somit zu einer Beeinträchtigung der RO-Bildung führen könnten.

Um die Hypothese einer nSMase2-Beteiligung an der coronaviralen RO-Biogenese weiter zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt Kolokalisationsstudien von nSMase2, Cer (Produkt der nSMase2) und SM (Substrat der nSMase2) mit coronaviralen ROs durchgeführt. Im Einklang mit den zuvor erhobenen Daten konnte eine Kolokalisierung von Cer und nSMase2, aber nicht von SM, mit viralen ROs festgestellt werden (siehe Abbildungen 20-22). Der Nachweis von Cer erfolgte dabei mittels eines spezifischen Antikörpers. Da keine geeigneten Antikörper zum Nachweis von endogenem SM verfügbar sind, wurde die intrazelluläre Lokalisation von SM mit Hilfe eines SM-Bindeproteins, Eqt, bestimmt (210). Es gibt weitere SM-Bindeproteine, z.B. Lysenin, die in weiteren Studien zur unabhängigen Bestätigung der hier gezeigten Daten verwendet werden könnten (228).

Der Nachweis der Kolokalisation der nSMase2 mit coronaviralen ROs gelang in dieser Arbeit durch Verwendung eines Expressionskonstrukts, das eine Überexpression der nSMase2 als Fusionsprotein mit einem C-terminalen eGFP in transfizierten Zellen ermöglichte. Die gefundene Kolokalisation der nSMase2 mit ROs war dabei nicht von der katalytischen Aktivität der nSMase2 abhängig, wie die bei Verwendung einer inaktiven nSMase2-Mutante gewonnenen Daten zeigten (siehe Abbildung 23). Einschränkend muss jedoch festgehalten werden, dass aus der starken Überexpression der nSMase2 nur bedingt Rückschlüsse auf die Lokalisation der nSMase2 unter physiologisch relevanten Bedingungen gezogen werden können. Diese Einschränkung gilt vor allem auch deshalb, weil nach Überexpression von eGFP (also ohne nSMase2-Anteil) eine partielle Kolokalisation (wenn auch in deutlich geringerem Umfang) beobachtet wurde (siehe Abbildung 24).

Die Kolokalisation coronaviraler ROs mit Cer und nSMase2, nicht jedoch mit SM, spricht für eine Beteiligung der nSMase2-Aktivität an der Biogenese coronaviraler ROs in Huh-7-ACE2-Zellen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass bisherige Interaktionsstudien von coronaviralem nsp3 bzw. nsp4 mit nSMase2 keine Hinweise für stabile Interaktionen ergeben haben. Andere Studien brachten jedoch Hinweise auf Interaktionen zwischen nSMase3 und nsp3 (85, 89). Somit bleibt die Frage offen, ob es eine zelltypabhängige

bzw. virusabhängige Rekrutierung bestimmter nSMase-Typen durch nsp3 und/oder nsp4 gibt oder aber eine generelle Redundanz besteht und aufgrund ihrer höheren Abundanz im ER bisher ausschließlich die nSMase3 als Bindungspartner identifiziert werden konnte.

Eine Kolo-kalisation von Cer mit viralen ROs bei gleichzeitiger Abwesenheit von SM wurde auch für einige Viren aus der Familie *Flaviviridae* gezeigt. Interessanterweise scheint jedoch der beobachtete Phänotyp (die Kolo-kalisation von Cer mit viralen ROs bei gleichzeitiger Abwesenheit von SM) unter den Mitgliedern der *Flaviviridae* nicht konserviert zu sein. Für HCV wurde beispielsweise SM statt Cer als essentieller Bestandteil der ROs beschrieben (130). Für WNV-infizierten Zellen wurde berichtet, dass sowohl Cer als auch SM Bestandteil der ROs sind (131, 132). Für das DENV wurde beschrieben, dass Cer-Spezies nicht mit den viralen ROs lokalisieren und eine Inhibition der *De-novo*-Synthese von Ceramiden die virale Replikation erhöht (132). Das ZIKV induziert jedoch Veränderungen, die mit den für Coronaviren erhobenen Daten vergleichbar sind. So konnte beispielsweise eine Kolo-kalisation von Cer mit viralen ROs nachgewiesen werden, bei gleichzeitiger Abwesenheit von SM (nachgewiesen durch das Eq) (129). Die Daten lassen somit den Schluss zu, dass die Kolo-kalisation von Cer mit viralen ROs ein bei Coronaviren konserviertes Muster darstellt, das jedoch (nach aktueller Datenlage) nicht für alle +ssRNA-Viren in gleicher Weise gilt.

4.2.3 Die neutrale Sphingomyelinase 2 ist kein zelltypübergreifender Wirtsfaktor der coronaviralen Replikation

Wie in Abschnitt 4.1 bereits besprochen, konnte in infizierten MRC-5-Zellen keine Erhöhung der Cer-Level beobachtet werden. Da MRC-5-Zellen grundsätzlich höhere Cer-Spiegel als andere Zelltypen aufweisen, besteht möglicherweise in diesem Zelltyp keine Notwendigkeit, durch zusätzliche SMase-vermittelte Cer-Bildung die effiziente Replikation von Coronaviren in MRC-5-Zellen sicherzustellen.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde der Effekt des nSMase2-Inhibitors PDDC auf die Replikation von Coronaviren sowohl in MRC-5- als auch A549-Zellen getestet (siehe Abbildung 28). Die Resultate unterstützen die Hypothese, dass die nSMase2 für die Replikation von Coronaviren in MRC-5-Zellen keine wesentliche Rolle spielt.

Überraschenderweise führte auch die Inhibition der nSMase2 zu keiner Senkung der Virustiter von SARS-CoV-2 oder HCoV-229E in A549-Zellen. Somit scheint die nSMase2 auch in A549-Zellen nicht essentiell für die coronavirale Replikation zu sein. Jedoch

Diskussion

zeigte die hier durchgeführte sowie weitere publizierte Sphingolipidanalysen, dass A549-Zellen infolge von Coronavirus-Infektionen (im Gegensatz zu MRC-5-Zellen) signifikant erhöhte Cer-Level aufweisen (122). Daher kann spekuliert werden, dass andere Enzyme des Sphingolipidmetabolismus möglicherweise an der Entstehung von Cer in Coronavirus-infizierten A549-Zellen beteiligt sind. Ausgehend von der Sphingolipidanalyse der infizierten Zellen kann eine generell erhöhte *De-novo*-Synthese von Sphingolipiden als Quelle der erhöhten Cer-Level ausgeschlossen werden. Eine erhöhte *De-novo*-Synthese würde mit erhöhten dhSph-Leveln einhergehen, welches ein Zwischenprodukt bei der Entstehung von Cer in der *De-novo*-Synthese ist (Abbildung 34). In infizierten A549-Zellen konnte jedoch keine Erhöhung der dhSph-Level festgestellt werden (Abbildung 25).

In den SARS-CoV-2 infizierten A549-ACE2-Zellen konnte allerdings eine signifikante Reduktion von Sph- und dhSph-Leveln detektiert werden. Der gleichzeitige Anstieg von Cer- und dhCer-Leveln deutet auf eine Involvierung der Ceramid-Synthasen (CerS) hin, welche die Bildung von (dh)Cer aus (dh)Sph katalysieren (229). Auffällig ist in infizierten A549-ACE2-Zellen außerdem die signifikante Herabregulierung von LacCer-Spezies. Ein erhöhter Abbau dieser GSL könnte somit auch die erhöhten Cer-Level in den infizierten Zellen erklären.

In den HCoV-229E-infizierten A549-CD13-Zellen konnte keine signifikante Reduktion von einer der untersuchten Sphingolipid-Spezies nachgewiesen werden. Jedoch ist auffällig, dass die Hochregulation von dhCer-Spezies deutlich geringer ausfällt, als in SARS-CoV-2 infizierten A549-ACE2-Zellen. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Beobachtungen möglicherweise ihre Ursache in einer erhöhten Aktivität des Enzyms Dihydroceramid-Desaturase (DEGS) in HCoV-229E-infizierten A549-Zellen haben. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Cer aus dhCer durch das Einbringen einer Doppelbindung in das Sphingolipid-Rückgrat (230).

Um eine Beteiligung der oben diskutierten Enzyme in der Replikation von Coronaviren nachzuweisen, könnten zum Beispiel weitere Inhibitorstudien sowie siRNA-vermittelte Knockdowns mit infizierten A549-Zellen durchgeführt werden. Eine Übersicht über potentielle Cer-generierende Enzyme, welche in A549-Zellen während Coronavirus-Infektionen von Bedeutung sein könnten, wird in Abbildung 33 gegeben.

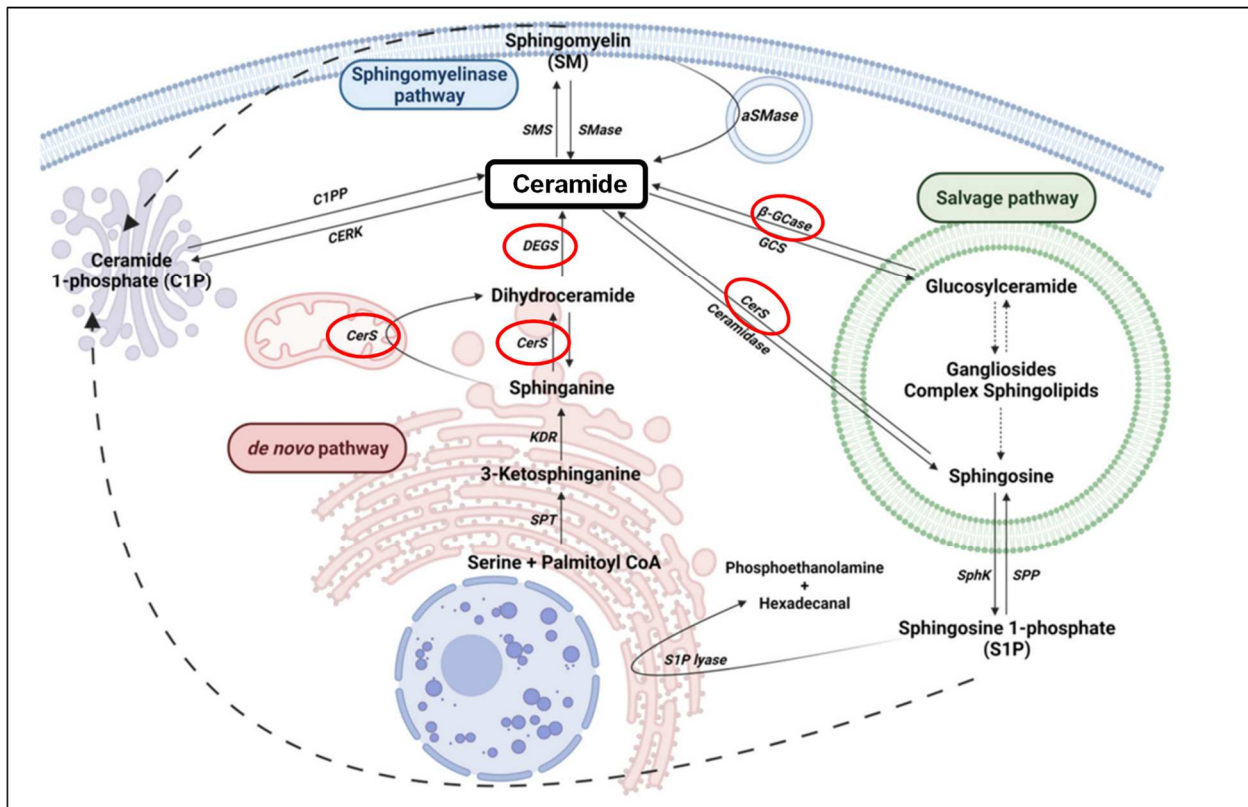


Abbildung 34: Übersicht über den Sphingolipid-Metabolismus mit Hervorhebung von Enzymen, die in Coronavirus-infizierten A549-Zellen Cer generieren könnten. Basierend auf den Änderungen des Sphingolipidhaushaltes in Coronavirus-infizierten A549-Zellen könnten verschiedene Enzyme der *De-novo*-Synthese oder des „salvage pathway“ infolge von Coronavirus-Infektionen zur vermehrten Bildung von Cer beitragen. Diese Enzyme sind hier in rot markiert. Entnommen und modifiziert aus (148), lizenziert durch Creative Commons-Lizenz (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

4.4 Überexpression von HCoV-229E-nsp3-4 induziert die Bildung von RO-ähnlichen Membranveränderungen

Coronavirus-induzierte ROs bestehen primär aus DMVs, die über CMs untereinander und mit dem ER verbunden sind (67). Es wurde bereits für Betacoronaviren gezeigt, dass die Plasmid-vermittelte Expression von zwei nsps, nsp3 und nsp4, ausreichend für die Bildung von artifiziellen ROs ist. In dieser Arbeit wurde dieses System zum ersten Mal für ein Alphacoronavirus (HCoV-229E) etabliert.

Hierfür wurde ein Expressionsvektor (pcDNA3.1) für HCoV-229E-nsp3-4 generiert. Durch Einfügen von Mutationen (Cys1701 zu Ala und Lys2481 zu Ala) wurden nsp3-4-Varianten generiert, deren Spaltung durch Inaktivierung der PL2^{pro} (C1701A) oder Veränderung der Schnittstelle (K2481A) verhindert werden sollte. Als zusätzliche Kontrollen wurden Konstrukte generiert, die für die einzelnen nsps, also nur nsp3 oder nur nsp4, kodieren. Für den immunologischen Nachweis des nsp3-4-Fusionsproteins und der Einzelproteine

Diskussion

mittels spezifischer Antikörper wurden geeignete Epitope an die Termini der Proteine angefügt (HA an den N-Terminus von nsp3 und V5 an den C-Terminus von nsp4).

Die zelluläre Expression und proteolytische Prozessierung des HA-nsp3-4-V5-Fusionsproteins wurden mittels Westernblot und die Expression und Lokalisation der Proteine durch Immunfluoreszenz untersucht. Die eingebrachten Mutationen in PL2^{pro} (C1701A) und Schnittstelle (K2481A) verhinderten, wie erwartet, die Spaltung von nsp3-4 in die beiden Prozessierungsendprodukte nsp3 und nsp4 (siehe Abbildung 30).

Zusätzlich wurde getestet, ob die Spaltung des nsp3-4, wie zuvor für MERS-CoV und SARS-CoV-2 gezeigt (48, 50), essentiell für die Entstehung von RO-ähnlichen Strukturen ist. Hierbei zeigte sich, dass die Plasmid-vermittelte Expression des HCoV-229E-nsp3-4, unabhängig von der proteolytischen Prozessierung, zu einer lokalen Anreicherung im perinukleären Bereich der Zelle führte (siehe Abbildung 30). Die beobachtete punktförmige Akkumulation entsprach im Wesentlichen den in infizierten Zellen beobachteten Lokalisationsmustern viraler ROs. Ein vergleichbares perinukleäres punktuelltes Verteilungsmuster konnte hingegen nicht beobachtet werden, wenn nsp3 oder nsp4 einzeln produziert wurden. In letzterem Fall waren die beiden Proteine jeweils eher diffus in der Zelle verteilt.

Die Bildung von RO-ähnlichen Strukturen durch die heterologe Expression von HA-nsp3-4-V5 wurde auch durch elektronenmikroskopische Analysen bestätigt (wie bereits zuvor für Betacoronaviren gezeigt (48, 50). Die Bildung von vesikulären Strukturen (partiell mit Doppelmembranen) konnte auch für die beiden nicht spaltbaren nsp3-4-Varianten (HA-nsp3-4-V5_K2481A und HA-nsp3-4-V5_C1701A) nachgewiesen werden. Es kann daher vermutet werden, dass die proteolytische Prozessierung des nsp3-4-Fusionsproteins nicht essentiell für die Bildung von ROs von HCoV-229E ist. Für EAV wurden vergleichbare Resultate gefunden (231), jedoch konnten für Betacoronaviren keine ROs bei ausbleibender Spaltung von nsp3 und nsp4 beobachtet werden (48). Es kann daher spekuliert werden, dass es Unterschiede zwischen den verschiedenen Genera der Coronaviren bezüglich der Notwendigkeit der proteolytischen Prozessierung von nsp3-4 für die Ausbildung von ROs gibt.

Auffällig war weiterhin, dass sowohl in den transfizierten als auch in HCoV-229E-infizierten Proben nur in einigen Fällen Doppelmembranen für die vesikulären Strukturen nachgewiesen werden konnten. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass eine chemische Fixierung (wie hier mit PFA und Glutaraldehyd durchgeführt) zu einer

mangelhaften Konservierung von DMVs in infizierten Zellen führen kann (47). Als Alternative sollte daher die Durchführung der Kryoelektronenmikroskopie (Cryo-EM) in Betracht gezogen werden, da diese bekanntermaßen zu einer besseren Konservierung von DMVs führt (47).

4.5 Ceramide sind wesentliche Bestandteile coronaviraler ROs

4.5.1 Ceramide sind Bestandteile artifiziell-induzierter ROs

Nachdem das System zur Erzeugung artifizieller ROs mittels Überexpression des HCoV-229E-nsp3-4 etabliert wurde und die Entstehung von RO-ähnlichen Strukturen mittels Elektronenmikroskopie bestätigt wurde, erfolgte anschließend die Analyse des Sphingolipidoms von Zellen, die Plasmid-vermittelt das nsp3-4 überexprimierten. Diese Analyse sollte die Frage beantworten, ob auch unter Verwendung des RO-induzierenden Minimalsystems (also unabhängig vom Kontext eines kompletten viralen Replikationszyklus) Sphingolipidveränderungen nachgewiesen werden können, die den in virusinfizierten Zellen gefundenen Veränderungen ähneln oder gleichen.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Induktion von artifiziellen ROS durch die Überexpression des nsp3-4 (im Vergleich zum Leervektor, der kein virales Protein kodiert) zu einer Erhöhung der Cer-Level führt (siehe Abbildung 32). Die Änderungen im Lipidmuster glichen (wenn auch in etwas geringerem Ausmaß) den Änderungen, die für HCoV-229E-infizierte Huh-7-ACE2-Zellen gefunden worden waren. Dies lässt den Schluss zu, dass die beobachteten Cer-Anstiege zumindest teilweise mit der Bildung von ROs assoziiert sind. Die schwächere Deregulation im Vergleich zu infizierten Zellen könnte an einer geringeren Transfektionsrate (ca. 40 %) im Vergleich zur Infektionsrate (über 65 % in HCoV-229E-infizierten Huh-7-ACE2-Zellen) liegen. Zudem sind unterschiedliche Zeitpunkte nach Infektion (12 h p. i.) bzw. Transfektion (24 h p. t.) verglichen worden. Des Weiteren könnte auch das Fehlen weiterer viraler Faktoren (z.B. nsp6) im Minimalsystem zu Unterschieden in der Deregulierung der Sphingolipide führen. Es wurde gezeigt, dass nsp6 eine unterstützende Rolle in der Bildung des RO-Netzwerkes haben (51). Nsp6 ist entbehrlich für die Bildung von ROs (48). Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression von SARS-CoV-2-nsp6 zusammen mit dem korrespondierendem nsp3-4 zur Bildung von DMVs führt, deren Durchmesser denen von infektionsinduzierten DMVs entsprach. Zudem wurde eine vermehrte Ausbildung von CMs beobachtet (51). Interessanterweise zeigte auch die Überexpression beider ungespaltenen nsp3-4-Varianten ähnliche Deregulationsmuster der Sphingolipide wie

Diskussion

das Wildtyp-Konstrukt. Es konnte für die Spaltstellen-Mutante (K2481A) sogar eine stärkere Erhöhung der Cer-Level festgestellt werden. Dies bestätigt, dass nsp3-4-Moleküle (auch ohne eine proteolytische Prozessierung durch die PL2^{pro}) Membranzumstrukturierungen in der Zelle herbeiführen können und in diesem Kontext auch eine Lipid-Deregulation induzieren.

Nachdem festgestellt wurde, dass die Bildung artifizieller ROs (nach Überexpression des HCoV-229E-nsp3-4) zum Anstieg von zellulären Cer-Leveln führt, wurde die Lokalisation von Cer mit artifiziellen ROs untersucht. Ähnlich zu infizierten Zellen, konnte auch hier gezeigt werden, dass Cer mit artifiziellen ROs in HA-nsp3-4-V5-überexprimierenden Zellen kolokalisiert (siehe Abbildung 33). Diese Kolokalisation erforderte interessanterweise keine Spaltung von nsp3-4. Dies bestätigt erneut, dass nsp3-4-induzierte Membranzumstrukturierungen von nsp3-4 unabhängig von der proteolytischen Prozessierung dieses Proteins erfolgen können. Jedoch konnte, anders als bei den infizierten Zellen, auch Cer detektiert werden, das nicht mit ROs kolokalisiert. Beim Vergleich der Sphingolipidwerte der Leervektor-transfizierten Huh-7-ACE2-Zellen mit uninfizierten Huh-7-ACE2-Zellen aus der vorangegangenen Analyse fällt jedoch auf, dass die Transfektion allein zu einer Erhöhung der zellulären Cer-Level führt (um das ca. 1,8-fache). Somit könnte das nicht mit ROs kolokalisierende Cer unspezifisch durch die Transfektion gebildet worden sein und daher diffus in der Zelle verteilt vorkommen.

Die Daten belegen in ihrer Gesamtheit, dass (in Huh-7-ACE2-Zellen) Cer sowohl mit Coronavirus-induzierten ROs als auch mit ROs, die durch HA-nsp3-4-V5-Expression generiert wurden, kolokalisiert.

4.5.2 Cer kolokalisiert zelltypunabhängig mit ROs

Da die oben beschriebenen Kolokalisationsstudien ausschließlich in infizierten oder transfizierten Huh-7-ACE2-Zellen durchgeführt wurden, sollte abschließend überprüft werden, ob der verwendete Zelltyp darüber (mit)entscheidet, ob bestimmte Cer-Spezies an der Bildung viraler ROs beteiligt sind. Interessanterweise konnte auch für A549- und MRC-5-Infizierte Zellen eine starke Kolokalisation von Cer mit coronaviralen ROs bestätigt werden (siehe Abbildung 29). Dieses Resultat weist darauf hin, dass Cer-Spezies vermutlich zelltypunabhängig ein Bestandteil coronaviraler ROs sind. Auch wenn in MRC-5-Zellen keine globale Erhöhung der Cer-Level gefunden werden konnte, könnte es möglicherweise dennoch zu einer lokalen Cer-Produktion und/oder -Akkumulation kommen, deren Nachweis in unseren bisherigen Analysen aufgrund der hohen basalen

Cer-Level jedoch nicht möglich war. Angesichts der zum gegenwärtigen Zeitpunkt begrenzten Datenlage bleibt diese Möglichkeit jedoch relativ spekulativ und erfordert weitere Untersuchungen zu ihrer Bestätigung.

4.5.3 Mögliche Rollen von Cer in der Bildung von coronaviralen ROs

Cer-Spezies haben aufgrund ihrer konischen Form eine bedeutende Rolle in der Induktion von Membrankrümmungen (232). Durch Bildung von Cer-angereicherten Regionen in zellulären Membranen werden Prozesse wie Endozytose, Membranfusion, Membraninvagination oder Exozytose induziert (233, 234). Die Expression von nsp3-4 (im Kontext einer Infektion oder durch heterologe Expression des Proteins) könnte somit zur Anreicherung von konisch-geformten Cer-Spezies in ER-Membranen führen, die wiederum Krümmungen und eventuell sogar Invaginationen von ER-Membranen auslösen.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Wirtszellfaktoren (sowohl Proteine als auch Lipide) beschrieben, die eine wichtige Rolle in der Bildung von coronaviralen ROs spielen (82, 85, 86, 89, 96, 118, 119). Es erscheint daher äußerst unwahrscheinlich, dass die Cer-Anreicherung allein für die nsp3-4-induzierten Membranzustukturierungen ausreichend ist. Es wurde bereits gezeigt, dass Cer-angereicherte Mikrodomänen zu einer Rekrutierung von Membranproteinen führen können (194, 235). Es wäre somit denkbar, dass die durch nsp3-4-Produktion induzierte Cer-Anreicherung zu einer Rekrutierung von Wirtszellfaktoren führt, die zu den Membranveränderungen und somit zur Bildung viraler ROs beitragen.

Nachfolgend gebe ich eine Auswahl von Wirtszellfaktoren, die an der coronaviralen RO-Bildung beteiligt sind, und potentiell durch Cer-angereicherte Mikrodomänen rekrutiert werden könnten:

(i) Die Familie der RTN-Proteine: RTN3 und RTN4 wurden als wichtige Wirtszellfaktoren für die RO-Bildung in SARS-CoV-2-infizierten Zellen nachgewiesen (103). Ein Knockdown von je einem der beiden RTN-Proteine resultierte im (fast) vollständigen Fehlen von viralen ROs in den infizierten Zellen. Die primäre Funktion von RTN-Proteinen ist die Generierung von tubulären Strukturen aus dem ER, wobei die Membran-Topologie der RTN-Proteine zu einer Krümmung der ER-Membran führt (236). Für RTN-Proteine wurde außerdem eine Sphingolipid-Bindedomäne nachgewiesen (237). Es lässt sich daher spekulieren, dass RTN-Proteine durch die Cer-Anreicherung zu den nsp3-4-

Diskussion

induzierten zER-Strukturen rekrutiert wird und dort an der Induktion von Membran-Krümmungen beteiligt ist.

(ii) Der REEP5-TRAM1-Komplex: Es wurde gezeigt, dass der REEP5-TRAM1-Komplex an nsp3 von SARS-CoV-2 bindet und ein REEP-Knockout zu einer reduzierten RO-Bildung führt (85). REEP5 besitzt eine Reticulon-Homologie-Domäne und ist ebenfalls an der Entstehung von gekrümmten, tubulären Strukturen aus dem ER beteiligt (104). TRAM1 ist beteiligt an der Translokation von Proteinen ins ER (105) und wurde interessanterweise als Cer-Bindeprotein beschrieben (238). Es kann gemutmaßt werden, dass TRAM1 in Cer-angereicherten Mikrodomänen angereichert wird und dort zusammen mit nsp3 REEP5 rekrutiert, um die Krümmung der zER-Membranen zu induzieren.

(iii) Die Lipid-Scambblasen TMEM41B und VMP1: Sowohl TMEM41B als auch VMP1 wurden in einer Vielzahl von Studien als wichtige Wirtszellfaktoren mit einer Beteiligung an der viralen RO-Bildung beschrieben (91, 95-97, 107, 108). Beide Transmembranproteine fungieren als Phospholipid-Scramblasen und regulieren die Lipidzusammensetzung von Membranen, insbesondere die Verteilung von Phosphatidylserin und Cholesterol (106). Sowohl für TMEM41B als auch VMP1 existieren Hinweise, dass sie über eine Sphingolipid-Bindedomäne verfügen (Doktorarbeit von L.-C. Förster, unpubliziert). Auch für diese beiden Proteine lässt sich spekulieren, dass sie infolge von nsp3-4-induzierten Cer-Anreicherungen rekrutiert werden und anschließend die Lipidzusammensetzung der gezipperten Membranen weiter verändern, was schlussendlich die Bildung von ROs fördern könnte.

(iv) Der Autophagie-Faktor LC3: LC3-Proteine sind an der zellulären Vesikelbildung beteiligt und gelten als Marker für Autophagosomen und die sogenannten EDEMosomen (110, 111). Eine Kolo-kalisation von LC3 mit ROs von Arteriviren und Coronaviren konnte ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch existieren hier widersprüchliche Daten (112-116). Interessanterweise haben Studien zu den Identifikationspartnern von LC3 gezeigt, dass LC3 mit NSMAF interagiert (239). In einer weiteren Publikation wurde eine Rekrutierung der nSMase2 mittels NSMAF-LC3-Interaktion zu Multivesikel-Körperchen beschrieben, wobei durch nSMase2-generierte Cer-angereicherte Mikrodomänen die Bildung von intraluminalen Vesikeln durch Invagination auslösen (240). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Präsenz von Cer in Membranen die Bindung von LC3 erhöht (241). Es kann vermutet werden, dass LC3 nach nsp3-4-vermittelter Cer-Akkumulierung rekrutiert wird und anschließend weitere Faktoren, die z.B. bei der Reifung von Autophagosomen

beteiligt sind, rekrutiert und somit die Vesikelbildung stimuliert. Zelltypabhängig könnte ebenso durch LC3 eine Rekrutierung der nSMase2 stattfinden, welche dann in einem möglichen positiven Feedbackloop mehr Cer generiert und somit mehr LC3 rekrutiert.

Aus den hier dargelegten Daten und den oben erwähnten Überlegungen lässt sich folgende Hypothese für die Bildung von coronaviralen ROs bilden (Abbildung 35):

Die Infektion führt zu einer Expression von nsp3 und nsp4, welche in ER-Membranen inseriert werden. Durch Interaktionen von nsp3 und 4 entstehen zER-Membranen. Durch nsp3-4 werden Faktoren (z.B. die nSMase2 in Huh-7-ACE2-Zellen) rekrutiert, welche zu einer lokalen Anreicherung von Cer-Spezies in den zER-Membranen führt. Es kann spekuliert werden, dass in bestimmten Zelltypen (z.B. MRC-5) bereits hohe Cer-Mengen vorhanden sind und daher kaum zusätzliche Cer-Bildung stattfindet. Letztendlich führt die Virus-induzierte Bildung von Cer-angereicherten Mikrodomänen durch (i) ihre biophysikalischen Eigenschaften sowie (ii) die Rekrutierung von Wirtszellfaktoren zur Krümmung der gezippten Membranen, was schlussendlich zur Ausbildung von ROs führt.

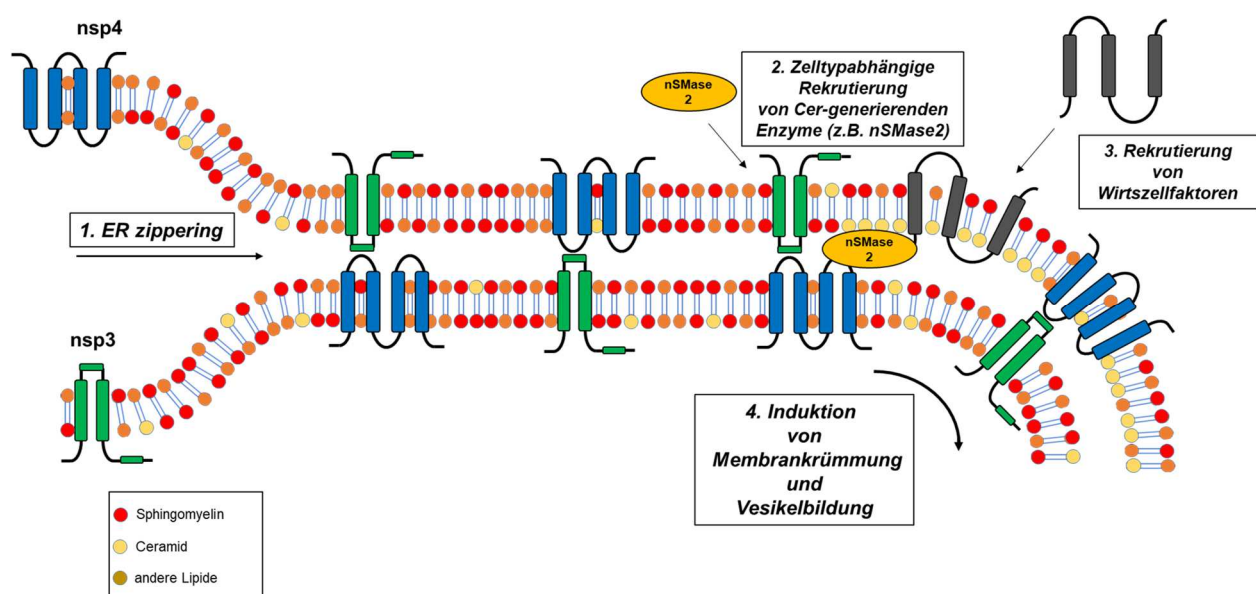


Abbildung 35: Schematisches Modell der Entstehung von coronaviralen ROs durch nsp3 und nsp4 mittels Generierung von Cer-angereicherten Mikrodomänen. Die Transmembranproteine nsp3 und nsp4 werden kurz nach erfolgter Infektion mit Coronaviren in den infizierten Zellen exprimiert und in ER-Membranen inseriert. Dort sorgen die nsps durch Interaktion miteinander für das sogenannte „ER

Diskussion

zippering“ (1.). Anschließend werden zelluläre Cer-generierende Enzyme rekrutiert (hier: nSMase2, wie für Huh-7-ACE2 gezeigt), wobei zelltypabhängige Unterschiede zu bestehen scheinen (2.). Es kommt zur Anreicherung von Cer und dem Entstehen von Cer-angereicherten Mikrodomänen. Die Cer-angereicherten Mikrodomänen rekrutieren verschiedene Wirtszellfaktoren (3.). Diese Wirtszellfaktoren mit membrankrümmenden Eigenschaften sowie die Anreicherung der konischen Cer-Spezies sorgt für die Krümmung der Doppelmembran und schlussendlich für die Vesikelbildung (4.).

4.6 Zusammenfassung

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Coronavirus-Infektionen zeit- und zelltypabhängige Deregulationen des Sphingolipidhaushaltes in infizierten Zellen auslösen. Auffällig war dabei, dass in einem Großteil der untersuchten infizierten Zellen ein Anstieg von zellulären Cer-Leveln bei gleichzeitigem Abfall von SM-Leveln zu beobachten war. Dies führte zu der Hypothese, dass zelluläre SMasen in der Replikation von Coronaviren beteiligt sein könnten. Es konnte bestätigt werden, dass SARS-CoV-2 auf die Aktivität der aSMase in der Infektion angewiesen ist, jedoch konnte dieser Befund nicht für die anderen beiden Coronaviren bestätigt werden. Die nSMase2 konnte dagegen als konservierter Faktor für die Biogenese von coronaviralen ROs in infizierten Huh-7-ACE2-Zellen identifiziert werden. Jedoch konnte festgestellt werden, dass Coronaviren in anderen Zellsystemen nicht auf die Aktivität der nSMase2 für die virale RO-Bildung angewiesen sind. Ein konservierter Faktor hinsichtlich der verwendeten Coronaviren und Zelllinien waren jedoch Cer, welche als essentielle Faktoren von sowohl infektionsinduzierten als auch artifiziell induzierten ROs nachgewiesen wurden.

4.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen vermuten, dass Cer ein essentieller Bestandteil von Coronavirus-induzierten ROs sein könnte. Um dies zu bestätigen, wäre eine Lipidanalyse von isolierten und aufgereinigten ROs aus infizierten und nsp3-4-überexprimierenden Zellen denkbar. Weiterhin würde ein Vergleich von infektions- mit artifiziell induzierten ROs weitere Einblicke in die Rolle von nsp3 und nsp4 sowie von potentiellen weiteren viralen Faktoren in der Bildung von ROs geben.

Weiterhin offen bleibt die Frage, welche Proteine durch die Cer-Anreicherung rekrutiert werden und an der RO-Bildung beteiligt sind. Obwohl in Abschnitt 4.5.3 einige aussichtsreiche Kandidaten beschrieben wurden, fehlen bisher experimentelle Nachweise. Es wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden entwickelt, um Cer-bindende Proteine zu identifizieren. So können unter anderem klickbare Cer-Spezies (242, 243) oder Lipid-beschichtete Beads (244) verwendet werden, um Cer-

Bindeproteine aus Zelllysaten aufzureinigen und mittels Massenspektrometrie zu bestimmen. Solche Versuche könnten auch mit Coronavirus-infizierten Zellen sowie nsp3-4-überexprimierenden Zellen durchgeführt werden, um Cer-bindende Wirtszellfaktoren mit Bedeutung für die virale RO-Bildung zu identifizieren. Ebenfalls denkbar wären Versuche, bei denen das nSMase2-eGFP-Fusionsprotein mittels Immunpräzipitation aus HCoV-229E-infizierten Huh-7-ACE2-Zellen aufgereinigt wird. Anschließend könnten die Bindungspartner des nSMase2-GFP-Fusionsproteins identifiziert und mit denen aus einer uninfizierten Kontrolle verglichen werden. Alternativ wäre auch die Nutzung eines bereits etablierten nSMase2-APEX2-Fusionsproteins denkbar (245). APEX2 ist eine Peroxidase, welche Moleküle in unmittelbarer Umgebung und in Präsenz von H₂O₂ biotinyliert. Biotinylierte Proteine könnten dann mittels Streptavidin-Tags aus Zelllysaten aufgereinigt und anschließend mittels MS identifiziert werden. Diese Methode gäbe somit Auskunft über Proteine in der unmittelbaren Umgebung (Radius von ungefähr 20 nm (246)) der nSMase2, jedoch nicht über eine direkte Interaktion. Beide Ansätze könnten unterstützende Informationen über die Umgebung der nSMase2 während coronaviraler Infektionen liefern und Hinweise darauf geben, welche Proteine potentiell durch die Cer-Akkumulation rekrutiert werden.

Eine weitere offene Frage ist, ob Cer an der RO-Bildung von weiteren +ssRNA-Viren beteiligt ist. Dagegen sprechen die widersprüchlichen Resultate, die für verschiedene Mitglieder der *Flaviviridae* in Bezug auf Sphingolipide als Bestandteil der ROs gewonnen wurden (129-132). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Cer ein potentiell essentieller Wirtsfaktor für eine Vielzahl von +ssRNA-Viren ist. Zunächst sind Versuche mit nicht-humanen Coronaviren geplant, um zu bestätigen, dass Cer pan-coronaviral an der Entstehung von viralen ROs beteiligt sind. Im Anschluss würden weitere Vertreter der Ordnung *Nidovirales*, zum Beispiel Arteriviren in die Untersuchungen aufgenommen werden. Entsprechende Versuche mit Mitgliedern weiterer Virusfamilien (z.B. *Togaviridae* und *Picornaviridae*) könnten in weiterer Zukunft durchgeführt werden, um die Rolle von Cer in der Replikation von verschiedenen +ssRNA-Viren zu klären.

Eine wichtige Limitation der hier durchgeführten Studien zur Ermittlung von Coronavirus-induzierten Veränderungen des zellulären Sphingolipidhaushaltes ist der Fokus auf intrazelluläre Sphingolipide. Sphingolipide dienen nicht nur als wichtige Membranbausteine, sondern sind auch als bioaktive Biolipide in Signalwegen involviert und werden hierfür unter anderem sekretiert bzw. exportiert, um extrazelluläre Prozesse

Diskussion

zu regulieren (247). Da der Schwerpunkt der hier durchgeführten Studie auf der Rolle intrazellulärer Lipide lag, ist die Charakterisierung der Rolle von sezernierten Sphingolipiden in coronaviralen Infektionen Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Weiterhin war eine vergleichende Analyse des Proteoms (mit einem Schwerpunkt auf den Enzymen des Sphingolipidmetabolismus) von infizierten Zellen geplant. Allerdings befand sich der Großteil der Enzyme des Sphingolipidmetabolismus unter dem Detektionslimit von herkömmlichen Massenspektrometern.

Eine weitere Limitation dieser Studie ist, dass die Detektion von SM nur durch die Überexpression eines SM-Bindeproteins untersucht wurde. Zukünftig könnten zur Visualisierung von Sphingolipiden auch sogenannte klickbare Sphingolipide verwendet werden. Durch minimale Modifikation (Addition einer Alkyl- oder Azido-Gruppe) können Sphingolipide durch Kupfer-freie Klickreaktionen mit Fluorophoren gelabelt werden, wobei bei Verwendung eines Sphingolipids mit Azido-Funktion auch die Detektion in lebenden, nicht-fixierten Zellen möglich wäre (248). Bei der Verwendung von klickbaren Sphingolipiden ist jedoch zu beachten, dass die Modifikationen die Lokalisation und den Metabolismus des Sphingolipids verändern kann und für die Nutzung eine Überladung der Zelle mit dem klickbaren Sphingolipid notwendig ist und somit eine unphysiologische Lokalisation nicht ausgeschlossen werden kann.

Generell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Coronavirus-Infektionen zu einer Sphingolipid-Deregulation in den infizierten Zellen führen; am prominentesten war dabei die Hochregulation von Cer in den meisten untersuchten Zelltypen. Daraus lässt sich vermuten, dass der Sphingolipid-Metabolismus (insbesondere die Cer-Produktion) ein mögliches Ziel für antivirale Therapien sein könnte. Wie bereits erwähnt, befinden sich Antidepressiva, welche als Nebeneffekt die aSMase hemmen, gegenwärtig in klinischen Studien zur Behandlung von COVID-19 Patienten (249-251). Jedoch erscheint es anhand der hier gezeigten Daten unwahrscheinlich, dass Medikamente mit FIASMA-Funktion als pan-coronavirale Therapiemöglichkeit zum Einsatz kommen können, da die Abhängigkeit von der aSMase-Aktivität nicht konserviert zu sein scheint. Die Entwicklung neuer oder die Testung vorhandener nSMase-Inhibitoren für die Behandlung von Coronavirus-infizierten Patienten erscheint aufgrund der Zelltypabhängigkeit ebenfalls weniger vielversprechend. Dennoch sollten chemische Verbindungen, die mit dem Cer-Metabolismus interferieren, für eine potentielle Behandlung von Coronavirus-Infektionen auch in zukünftigen Studien ihren Platz finden. Da sich diese Verbindungen gegen

Wirtszellfaktoren richten, wären daraus resultierende Medikamente wenig anfällig gegenüber Resistenzentwicklungen in den (aufgrund ihres RNA-Genoms) genetisch variablen Coronaviren. Ein solches Medikament wäre daher ein idealer Kandidat für eine Kombinationstherapie mit dem bisher zugelassenen Medikament Paxlovid, welches mit der 3CL^{pro} ein virales Zielmolekül hat und daher von Mutationen des viralen Genoms betroffen sein könnte.

Referenzen

5. Referenzen

1. **Schalk A F.** 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc* **78**:413-423.
2. **Woo PCY, de Groot RJ, Haagmans B, Lau SKP, Neuman BW, Perlman S, Sola I, van der Hoek L, Wong ACP, Yeh S-H.** 2023. ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. *Journal of General Virology* **104**.
3. **Zhou Z, Qiu Y, Ge X.** 2021. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Anim Dis* **1**:5.
4. **Haake C, Cook S, Pusterla N, Murphy B.** 2020. Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. *Viruses* **12**.
5. **Hamre D, Procknow JJ.** 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* **121**:190-3.
6. **van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PME, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B.** 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine* **10**:368-373.
7. **McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM.** 1967. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**:933-40.
8. **Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY.** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* **79**:884-95.
9. **Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguière AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW.** 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**:1967-76.
10. **Stadler K, Masignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk H-D, Rappuoli R.** 2003. SARS — beginning to understand a new virus. *Nature Reviews Microbiology* **1**:209-218.
11. **Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA.** 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* **367**:1814-20.
12. **Killerby ME, Biggs HM, Midgley CM, Gerber SI, Watson JT.** 2020. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Transmission. *Emerg Infect Dis* **26**:191-198.
13. WHO. 2018. <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>. Accessed 08.04.2025 14:21.
14. **Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W.** 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **382**:727-733.
15. **Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L.** 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* **19**:141-154.
16. WHO. 2024. <https://data.who.int/dashboards/covid19>. Accessed 08.04.2025 14:30.
17. **Liu Y, Li D, Han J.** 2024. COVID-19 vaccines and beyond. *Cellular & Molecular Immunology* **21**:207-209.

18. EMA. 2022. <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1625.htm>. Accessed 08.04.2025 14:36.
19. **Wise J.** 2020. Covid-19: Remdesivir is recommended for authorisation by European Medicines Agency. *BMJ* **369**:m2610.
20. **Duan Y, Zhou H, Liu X, Iketani S, Lin M, Zhang X, Bian Q, Wang H, Sun H, Hong SJ, Culbertson B, Mohri H, Luck MI, Zhu Y, Liu X, Lu Y, Yang X, Yang K, Sabo Y, Chavez A, Goff SP, Rao Z, Ho DD, Yang H.** 2023. Molecular mechanisms of SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. *Nature* **622**:376-382.
21. **Gandhi S, Klein J, Robertson AJ, Peña-Hernández MA, Lin MJ, Roychoudhury P, Lu P, Fournier J, Ferguson D, Mohamed Bakhsh SAK, Catherine Muenker M, Srivathsan A, Wunder EA, Kerantzas N, Wang W, Lindenbach B, Pyle A, Wilen CB, Ogbuagu O, Greninger AL, Iwasaki A, Schulz WL, Ko AI.** 2022. De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report. *Nature Communications* **13**:1547.
22. **Masters PS.** 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **66**:193-292.
23. **Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H.** 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**:3-20.
24. **Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, Rottier PJ.** 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *Embo j* **15**:2020-8.
25. **de Groot RJ.** 2006. Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconjugate Journal* **23**:59-72.
26. **Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ.** 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* **117**:17-37.
27. **Schochetman G, Stevens RH, Simpson RW.** 1977. Presence of infectious polyadenylated RNA in coronavirus avian bronchitis virus. *Virology* **77**:772-82.
28. **Lai MM, Stohlman SA.** 1981. Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses. *J Virol* **38**:661-70.
29. **Manfredonia I, Incarnato D.** 2021. Structure and regulation of coronavirus genomes: state-of-the-art and novel insights from SARS-CoV-2 studies. *Biochem Soc Trans* **49**:341-352.
30. **Brierley I, Bournsnel ME, Binns MM, Bilimoria B, Blok VC, Brown TD, Inglis SC.** 1987. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *The EMBO Journal* **6**:3779-3785-3785.
31. **Fang P, Fang L, Zhang H, Xia S, Xiao S.** 2021. Functions of Coronavirus Accessory Proteins: Overview of the State of the Art. *Viruses* **13**.
32. **Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG.** 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol* **81**:20-9.
33. **Millet JK, Jaimes JA, Whittaker GR.** 2021. Molecular diversity of coronavirus host cell entry receptors. *FEMS Microbiol Rev* **45**.
34. **Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellicchio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV.** 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**:420-2.
35. **Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Müller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JA, Zaki A, Fouchier RA, Thiel V, Drosten C, Rottier PJ, Osterhaus AD, Bosch BJ, Haagmans BL.** 2013. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* **495**:251-4.

Referenzen

36. **Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M.** 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**:450-4.
37. **Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL.** 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**:270-273.
38. **Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H.** 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**:3-20.
39. **Liu DX, Brown TD.** 1995. Characterisation and mutational analysis of an ORF 1a-encoding proteinase domain responsible for proteolytic processing of the infectious bronchitis virus 1a/1b polyprotein. *Virology* **209**:420-7.
40. **Ziebuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE.** 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol* **81**:853-79.
41. **Ziebuhr J, Thiel V, Gorbalenya AE.** 2001. The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond. *J Biol Chem* **276**:33220-32.
42. **Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA.** 2022. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**:21-39.
43. **Park GJ, Osinski A, Hernandez G, Eitson JL, Majumdar A, Tonelli M, Henzler-Wildman K, Pawłowski K, Chen Z, Li Y, Schoggins JW, Tagliabracci VS.** 2022. The mechanism of RNA capping by SARS-CoV-2. *Nature* **609**:793-800.
44. **Yuan S, Balaji S, Lomakin IB, Xiong Y.** 2021. Coronavirus Nsp1: Immune Response Suppression and Protein Expression Inhibition. *Front Microbiol* **12**:752214.
45. **Barretto N, Jukneliene D, Ratia K, Chen Z, Mesecar AD, Baker SC.** 2005. The papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus has deubiquitinating activity. *J Virol* **79**:15189-98.
46. **Lindner HA, Fotouhi-Ardakani N, Lytvyn V, Lachance P, Sulea T, Ménard R.** 2005. The papain-like protease from the severe acute respiratory syndrome coronavirus is a deubiquitinating enzyme. *J Virol* **79**:15199-208.
47. **Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, Bárcena M.** 2020. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends Microbiol* **28**:1022-1033.
48. **Oudshoorn D, Rijs K, Limpens R, Groen K, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Bárcena M.** 2017. Expression and Cleavage of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp3-4 Polyprotein Induce the Formation of Double-Membrane Vesicles That Mimic Those Associated with Coronaviral RNA Replication. *mBio* **8**.
49. **Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ.** 2013. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio* **4**.
50. **Twu WI, Lee JY, Kim H, Prasad V, Cerikan B, Haselmann U, Tabata K, Bartenschlager R.** 2021. Contribution of autophagy machinery factors to HCV and SARS-CoV-2 replication organelle formation. *Cell Rep* **37**:110049.
51. **Ricciardi S, Guarino AM, Giaquinto L, Polishchuk EV, Santoro M, Di Tullio G, Wilson C, Panariello F, Soares VC, Dias SSG, Santos JC, Souza TML, Fusco G, Viscardi M, Brandi S, Bozza PT, Polishchuk RS, Venditti R, De Matteis MA.**

2022. The role of NSP6 in the biogenesis of the SARS-CoV-2 replication organelle. *Nature* **606**:761-768.
52. **Saraste J, Prydz K.** 2021. Assembly and Cellular Exit of Coronaviruses: Hijacking an Unconventional Secretory Pathway from the Pre-Golgi Intermediate Compartment via the Golgi Ribbon to the Extracellular Space. *Cells* **10**.
 53. **Tooze J, Tooze SA, Fuller SD.** 1987. Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. *J Cell Biol* **105**:1215-26.
 54. **Prydz K, Saraste J.** 2022. The life cycle and enigmatic egress of coronaviruses. *Mol Microbiol* **117**:1308-1316.
 55. **Denker L, Dixon AM.** 2024. The cell edit: Looking at and beyond non-structural proteins to understand membrane rearrangement in coronaviruses. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **752**:109856.
 56. **Miller S, Krijnse-Locker J.** 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* **6**:363-74.
 57. **Neufeldt CJ, Cortese M.** 2022. Membrane architects: how positive-strand RNA viruses restructure the cell. *J Gen Virol* **103**.
 58. **Rehwinkel J, Gack MU.** 2020. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology* **20**:537-551.
 59. **Lundin A, Dijkman R, Bergström T, Kann N, Adamiak B, Hannoun C, Kindler E, Jónsdóttir HR, Muth D, Kint J, Forlenza M, Müller MA, Drosten C, Thiel V, Trybala E.** 2014. Targeting Membrane-Bound Viral RNA Synthesis Reveals Potent Inhibition of Diverse Coronaviruses Including the Middle East Respiratory Syndrome Virus. *PLOS Pathogens* **10**:e1004166.
 60. **García-Nicolás O, V'Kovski P, Vielle NJ, Ebert N, Züst R, Portmann J, Stalder H, Gaschen V, Vieyres G, Stoffel M, Schweizer M, Summerfield A, Engler O, Pietschmann T, Todt D, Alves MP, Thiel V, Pfaender S.** 2018. The Small-Compound Inhibitor K22 Displays Broad Antiviral Activity against Different Members of the Family Flaviviridae and Offers Potential as a Panviral Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* **62**.
 61. **Kopek BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P.** 2007. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol* **5**:e220.
 62. **Fontana J, López-Iglesias C, Tzeng WP, Frey TK, Fernández JJ, Risco C.** 2010. Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology* **405**:579-91.
 63. **Grimley PM, Levin JG, Berezsky IK, Friedman RM.** 1972. Specific membranous structures associated with the replication of group A arboviruses. *J Virol* **10**:492-503.
 64. **Thaa B, Biasiotto R, Eng K, Neuvonen M, Götte B, Rheinemann L, Mutso M, Utt A, Varghese F, Balistreri G, Merits A, Ahola T, McInerney GM.** 2015. Differential Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-mTOR Activation by Semliki Forest and Chikungunya Viruses Is Dependent on nsP3 and Connected to Replication Complex Internalization. *J Virol* **89**:11420-37.
 65. **den Boon JA, Nishikiori M, Zhan H, Ahlquist P.** 2024. Positive-strand RNA virus genome replication organelles: structure, assembly, control. *Trends Genet* **40**:681-693.
 66. **Snijder EJ, van der Meer Y, Zevenhoven-Dobbe J, Onderwater JJ, van der Meulen J, Koerten HK, Mommaas AM.** 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J Virol* **80**:5927-40.

Referenzen

67. **Knoops K, Kikkert M, Worm SH, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ.** 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* **6**:e226.
68. **Snijder EJ, Limpens R, de Wilde AH, de Jong AWM, Zevenhoven-Dobbe JC, Maier HJ, Faas F, Koster AJ, Barcena M.** 2020. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol* **18**:e3000715.
69. **Maier HJ, Hawes PC, Cottam EM, Mantell J, Verkade P, Monaghan P, Wileman T, Britton P.** 2013. Infectious bronchitis virus generates spherules from zippered endoplasmic reticulum membranes. *mBio* **4**:e00801-13.
70. **Doyle N, Hawes PC, Simpson J, Adams LH, Maier HJ.** 2019. The Porcine Deltacoronavirus Replication Organelle Comprises Double-Membrane Vesicles and Zippered Endoplasmic Reticulum with Double-Membrane Spherules. *Viruses* **11**.
71. **van der Hoeven B, Oudshoorn D, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Bárcena M.** 2016. Biogenesis and architecture of arterivirus replication organelles. *Virus Res* **220**:70-90.
72. **Kanjanahaluethai A, Chen Z, Jukneliene D, Baker SC.** 2007. Membrane topology of murine coronavirus replicase nonstructural protein 3. *Virology* **361**:391-401.
73. **Oostra M, Hagemeijer MC, van Gent M, Bekker CP, te Lintelo EG, Rottier PJ, de Haan CA.** 2008. Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J Virol* **82**:12392-405.
74. **Oostra M, te Lintelo EG, Deijs M, Verheije MH, Rottier PJ, de Haan CA.** 2007. Localization and membrane topology of coronavirus nonstructural protein 4: involvement of the early secretory pathway in replication. *J Virol* **81**:12323-36.
75. **Hagemeijer MC, Monastyrska I, Griffith J, van der Sluijs P, Voortman J, van Bergen en Henegouwen PM, Vonk AM, Rottier PJ, Reggiori F, de Haan CA.** 2014. Membrane rearrangements mediated by coronavirus nonstructural proteins 3 and 4. *Virology* **458-459**:125-35.
76. **Sakai Y, Kawachi K, Terada Y, Omori H, Matsuura Y, Kamitani W.** 2017. Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication. *Virology* **510**:165-174.
77. **Gadlage MJ, Sparks JS, Beachboard DC, Cox RG, Doyle JD, Stobart CC, Denison MR.** 2010. Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. *J Virol* **84**:280-90.
78. **Beachboard D, Anderson-Daniels J, Denison M.** 2015. Mutations across Murine Hepatitis Virus nsp4 Alter Virus Fitness and Membrane Modifications. *Journal of virology* **89**.
79. **Wolff G, Limpens R, Zevenhoven-Dobbe JC, Laugks U, Zheng S, de Jong AWM, Koning RI, Agard DA, Grünewald K, Koster AJ, Snijder EJ, Bárcena M.** 2020. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science* **369**:1395-1398.
80. **Zimmermann L, Zhao X, Makroczyova J, Wachsmuth-Melm M, Prasad V, Hensel Z, Bartenschlager R, Chlanda P.** 2023. SARS-CoV-2 nsp3 and nsp4 are minimal constituents of a pore spanning replication organelle. *Nat Commun* **14**:7894.

81. **V'Kovski P, Gerber M, Kelly J, Pfaender S, Ebert N, Braga Lagache S, Simillion C, Portmann J, Stalder H, Gaschen V, Bruggmann R, Stoffel MH, Heller M, Dijkman R, Thiel V.** 2019. Determination of host proteins composing the microenvironment of coronavirus replicase complexes by proximity-labeling. *Elife* **8**.
82. **Almasy KM, Davies JP, Plate L.** 2021. Comparative Host Interactomes of the SARS-CoV-2 Nonstructural Protein 3 and Human Coronavirus Homologs. *Mol Cell Proteomics* **20**:100120.
83. **May DG, Martin-Sancho L, Anschau V, Liu S, Chrisopulos RJ, Scott KL, Halfmann CT, Díaz Peña R, Pratt D, Campos AR, Roux KJ.** 2022. A BioID-Derived Proximity Interactome for SARS-CoV-2 Proteins. *Viruses* **14**:611.
84. **Zhou Y, Liu Y, Gupta S, Paramo MI, Hou Y, Mao C, Luo Y, Judd J, Wierbowski S, Bertolotti M, Nerkar M, Jehi L, Drayman N, Nicolaescu V, Gula H, Tay S, Randall G, Wang P, Lis JT, Feschotte C, Erzurum SC, Cheng F, Yu H.** 2023. A comprehensive SARS-CoV-2-human protein-protein interactome reveals COVID-19 pathobiology and potential host therapeutic targets. *Nat Biotechnol* **41**:128-139.
85. **Li J, Gui Q, Liang FX, Sall J, Zhang Q, Duan Y, Dhabaria A, Askenazi M, Ueberheide B, Stapleford KA, Pagano M.** 2023. The REEP5/TRAM1 complex binds SARS-CoV-2 NSP3 and promotes virus replication. *J Virol* **97**:e0050723.
86. **Pahmeier F, Lavacca TM, Goellner S, Neufeldt CJ, Prasad V, Cerikan B, Rajasekharan S, Mizzon G, Haselmann U, Funaya C, Scaturro P, Cortese M, Bartenschlager R.** 2023. Identification of host dependency factors involved in SARS-CoV-2 replication organelle formation through proteomics and ultrastructural analysis. *J Virol* **97**:e0087823.
87. **Li M, Hou Y, Zhou Y, Yang Z, Zhao H, Jian T, Yu Q, Zeng F, Liu X, Zhang Z, Zhao YG.** 2024. LLPS of FXR proteins drives replication organelle clustering for β -coronaviral proliferation. *J Cell Biol* **223**.
88. **Zhang Y, Shang L, Zhang J, Liu Y, Jin C, Zhao Y, Lei X, Wang W, Xiao X, Zhang X, Liu Y, Liu L, Zhuang MW, Mi Q, Tian C, Wang J, He F, Wang PH, Wang J.** 2022. An antibody-based proximity labeling map reveals mechanisms of SARS-CoV-2 inhibition of antiviral immunity. *Cell Chem Biol* **29**:5-18.e6.
89. **Shi R, Feng Z, Zhang X.** 2021. Integrative Multi-omics Landscape of Non-structural Protein 3 of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronaviruses. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **19**:707-726.
90. **Wang R, Simoneau CR, Kulsuptrakul J, Bouhaddou M, Travisano KA, Hayashi JM, Carlson-Stevermer J, Zengel JR, Richards CM, Fozouni P, Oki J, Rodriguez L, Joehnk B, Walcott K, Holden K, Sil A, Carette JE, Krogan NJ, Ott M, Puschnik AS.** 2021. Genetic Screens Identify Host Factors for SARS-CoV-2 and Common Cold Coronaviruses. *Cell* **184**:106-119.e14.
91. **Schneider WM, Luna JM, Hoffmann HH, Sánchez-Rivera FJ, Leal AA, Ashbrook AW, Le Pen J, Ricardo-Lax I, Michailidis E, Peace A, Stenzel AF, Lowe SW, MacDonald MR, Rice CM, Poirier JT.** 2021. Genome-Scale Identification of SARS-CoV-2 and Pan-coronavirus Host Factor Networks. *Cell* **184**:120-132.e14.
92. **Daniloski Z, Jordan TX, Wessels HH, Hoagland DA, Kasela S, Legut M, Maniatis S, Mimitou EP, Lu L, Geller E, Danziger O, Rosenberg BR, Phatnani H, Smibert P, Lappalainen T, tenOever BR, Sanjana NE.** 2021. Identification of Required Host Factors for SARS-CoV-2 Infection in Human Cells. *Cell* **184**:92-105.e16.

Referenzen

93. **Wei J, Alfajaro MM, DeWeirdt PC, Hanna RE, Lu-Culligan WJ, Cai WL, Strine MS, Zhang SM, Graziano VR, Schmitz CO, Chen JS, Mankowski MC, Filler RB, Ravindra NG, Gasque V, de Miguel FJ, Patil A, Chen H, Oguntuyo KY, Abriola L, Surovtseva YV, Orchard RC, Lee B, Lindenbach BD, Politi K, van Dijk D, Kadoch C, Simon MD, Yan Q, Doench JG, Wilen CB.** 2021. Genome-wide CRISPR Screens Reveal Host Factors Critical for SARS-CoV-2 Infection. *Cell* **184**:76-91.e13.
94. **Hoffmann HH, Sánchez-Rivera FJ, Schneider WM, Luna JM, Soto-Feliciano YM, Ashbrook AW, Le Pen J, Leal AA, Ricardo-Lax I, Michailidis E, Hao Y, Stenzel AF, Peace A, Zuber J, Allis CD, Lowe SW, MacDonald MR, Poirier JT, Rice CM.** 2021. Functional interrogation of a SARS-CoV-2 host protein interactome identifies unique and shared coronavirus host factors. *Cell Host Microbe* **29**:267-280.e5.
95. **Trimarco JD, Heaton BE, Chaparian RR, Burke KN, Binder RA, Gray GC, Smith CM, Menachery VD, Heaton NS.** 2021. TMEM41B is a host factor required for the replication of diverse coronaviruses including SARS-CoV-2. *PLoS Pathog* **17**:e1009599.
96. **Sun L, Zhao C, Fu Z, Fu Y, Su Z, Li Y, Zhou Y, Tan Y, Li J, Xiang Y, Nie X, Zhang J, Liu F, Zhao S, Xie S, Peng G.** 2021. Genome-scale CRISPR screen identifies TMEM41B as a multi-function host factor required for coronavirus replication. *PLOS Pathogens* **17**:e1010113.
97. **Kratzel A, Kelly JN, V'Kovski P, Portmann J, Brüggemann Y, Todt D, Ebert N, Shrestha N, Plattet P, Staab-Weijnitz CA, von Brunn A, Steinmann E, Dijkman R, Zimmer G, Pfaender S, Thiel V.** 2021. A genome-wide CRISPR screen identifies interactors of the autophagy pathway as conserved coronavirus targets. *PLoS Biol* **19**:e3001490.
98. **Rebendenne A, Roy P, Bonaventure B, Chaves Valadão AL, Desmarests L, Arnaud-Arnould M, Rouillé Y, Tauziet M, Giovannini D, Touhami J, Lee Y, DeWeirdt P, Hegde M, Urbach S, Koulali KE, de Gracia FG, McKellar J, Dubuisson J, Wencker M, Belouzard S, Moncorgé O, Doench JG, Goujon C.** 2022. Bidirectional genome-wide CRISPR screens reveal host factors regulating SARS-CoV-2, MERS-CoV and seasonal HCoVs. *Nature Genetics* **54**:1090-1102.
99. **Biering SB, Sarnik SA, Wang E, Zengel JR, Leist SR, Schafer A, Sathyan V, Hawkins P, Okuda K, Tau C, Jangid AR, Duffy CV, Wei J, Gilmore RC, Alfajaro MM, Strine MS, Nguyenla X, Van Dis E, Catamura C, Yamashiro LH, Belk JA, Begeman A, Stark JC, Shon DJ, Fox DM, Ezzatpour S, Huang E, Olegario N, Rustagi A, Volmer AS, Livraghi-Butrico A, Wehri E, Behringer RR, Cheon DJ, Schaletzky J, Aguilar HC, Puschnik AS, Button B, Pinsky BA, Blish CA, Baric RS, O'Neal WK, Bertozzi CR, Wilen CB, Boucher RC, Carette JE, Stanley SA, Harris E, Konermann S, Hsu PD.** 2022. Genome-wide bidirectional CRISPR screens identify mucins as host factors modulating SARS-CoV-2 infection. *Nat Genet* **54**:1078-1089.
100. **Yang YS, Strittmatter SM.** 2007. The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biol* **8**:234.
101. **Aktepe TE, Liebscher S, Prier JE, Simmons CP, Mackenzie JM.** 2017. The Host Protein Reticulon 3.1A Is Utilized by Flaviviruses to Facilitate Membrane Remodelling. *Cell Rep* **21**:1639-1654.
102. **Tang WF, Yang SY, Wu BW, Jheng JR, Chen YL, Shih CH, Lin KH, Lai HC, Tang P, Horng JT.** 2007. Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *J Biol Chem* **282**:5888-98.

103. **Williams JM, Chen YJ, Cho WJ, Tai AW, Tsai B.** 2023. Reticulons promote formation of ER-derived double-membrane vesicles that facilitate SARS-CoV-2 replication. *J Cell Biol* **222**.
104. **Hu J, Shibata Y, Voss C, Shemesh T, Li Z, Coughlin M, Kozlov MM, Rapoport TA, Prinz WA.** 2008. Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. *Science* **319**:1247-50.
105. **Görllich D, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA.** 1992. A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* **357**:47-52.
106. **Li YE, Wang Y, Du X, Zhang T, Mak HY, Hancock SE, McEwen H, Pandzic E, Whan RM, Aw YC, Lukmantara IE, Yuan Y, Dong X, Don A, Turner N, Qi S, Yang H.** 2021. TMEM41B and VMP1 are scramblases and regulate the distribution of cholesterol and phosphatidylserine. *J Cell Biol* **220**.
107. **Ji M, Li M, Sun L, Zhao H, Li Y, Zhou L, Yang Z, Zhao X, Qu W, Xue H, Zheng Z, Li Y, Deng H, Zhao YG.** 2022. VMP1 and TMEM41B are essential for DMV formation during β -coronavirus infection. *Journal of Cell Biology* **221**.
108. **Hoffmann HH, Schneider WM, Rozen-Gagnon K, Miles LA, Schuster F, Razooky B, Jacobson E, Wu X, Yi S, Rudin CM, MacDonald MR, McMullan LK, Poirier JT, Rice CM.** 2021. TMEM41B Is a Pan-flavivirus Host Factor. *Cell* **184**:133-148.e20.
109. **Yousefi M, Lee WS, Yan B, Cui L, Yong CL, Yap X, Tay KSL, Qiao W, Tan D, Nurazmi NI, Linster M, Smith GJD, Lee YH, Carette JE, Ooi EE, Chan KR, Ooi YS.** 2022. TMEM41B and VMP1 modulate cellular lipid and energy metabolism for facilitating dengue virus infection. *PLOS Pathogens* **18**:e1010763.
110. **Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T.** 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* **117**:2805-12.
111. **Calì T, Galli C, Olivari S, Molinari M.** 2008. Segregation and rapid turnover of EDEM1 by an autophagy-like mechanism modulates standard ERAD and folding activities. *Biochem Biophys Res Commun* **371**:405-10.
112. **Reggiori F, Monastyrska I, Verheije MH, Calì T, Ulasli M, Bianchi S, Bernasconi R, de Haan CA, Molinari M.** 2010. Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe* **7**:500-8.
113. **Monastyrska I, Ulasli M, Rottier PJ, Guan JL, Reggiori F, de Haan CA.** 2013. An autophagy-independent role for LC3 in equine arteritis virus replication. *Autophagy* **9**:164-74.
114. **Shaban MS, Muller C, Mayr-Buro C, Weiser H, Meier-Soelch J, Albert BV, Weber A, Linne U, Hain T, Babayev I, Karl N, Hofmann N, Becker S, Herold S, Schmitz ML, Ziebuhr J, Kracht M.** 2021. Multi-level inhibition of coronavirus replication by chemical ER stress. *Nat Commun* **12**:5536.
115. **Diao F, Jiang C, Sun Y, Gao Y, Bai J, Nauwynck H, Wang X, Yang Y, Jiang P, Liu X.** 2023. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection triggers autophagy via ER stress-induced calcium signaling to facilitate virus replication. *PLOS Pathogens* **19**:e1011295.
116. **Song G, Zhang C, Yu X, Li J, Fan Q, Liu F, He Q, Shang C, Li X.** 2024. Infectious bronchitis virus (IBV) triggers autophagy to enhance viral replication by activating the VPS34 complex. *Microbial Pathogenesis* **190**:106638.
117. **Paul D, Bartenschlager R.** 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* **2**:32-48.

Referenzen

118. **Strating JR, van Kuppeveld FJ.** 2017. Viral rewiring of cellular lipid metabolism to create membranous replication compartments. *Curr Opin Cell Biol* **47**:24-33.
119. **Zhang Z, He G, Filipowicz NA, Randall G, Belov GA, Kopek BG, Wang X.** 2019. Host Lipids in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Frontiers in Microbiology* **10**.
120. **Ketter E, Randall G.** 2019. Virus Impact on Lipids and Membranes. *Annu Rev Virol* **6**:319-340.
121. **Chu J, Xing C, Du Y, Duan T, Liu S, Zhang P, Cheng C, Henley J, Liu X, Qian C, Yin B, Wang HY, Wang R-F.** 2021. Pharmacological inhibition of fatty acid synthesis blocks SARS-CoV-2 replication. *Nature Metabolism* **3**:1466-1475.
122. **Farley SE, Kyle JE, Leier HC, Bramer LM, Weinstein JB, Bates TA, Lee J-Y, Metz TO, Schultz C, Tafesse FG.** 2022. A global lipid map reveals host dependency factors conserved across SARS-CoV-2 variants. *Nature Communications* **13**:3487.
123. **Williams CG, Jureka AS, Silvas JA, Nicolini AM, Chvatal SA, Carlson-Stevermer J, Oki J, Holden K, Basler CF.** 2021. Inhibitors of VPS34 and fatty-acid metabolism suppress SARS-CoV-2 replication. *Cell Rep* **36**:109479.
124. **Herker E.** 2024. Lipid Droplets in Virus Replication. *FEBS Letters* **598**:1299-1300.
125. **Dias SSG, Soares VC, Ferreira AC, Sacramento CQ, Fintelman-Rodrigues N, Temerozo JR, Teixeira L, Nunes da Silva MA, Barreto E, Mattos M, de Freitas CS, Azevedo-Quintanilha IG, Manso PPA, Miranda MD, Siqueira MM, Hottz ED, Pao CRR, Bou-Habib DC, Barreto-Vieira DF, Bozza FA, Souza TML, Bozza PT.** 2020. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog* **16**:e1009127.
126. **Yue M, Hu B, Li J, Chen R, Yuan Z, Xiao H, Chang H, Jiu Y, Cai K, Ding B.** 2023. Coronaviral ORF6 protein mediates inter-organelle contacts and modulates host cell lipid flux for virus production. *Embo j* **42**:e112542.
127. **Müller C, Hardt M, Schwudke D, Neuman BW, Pleschka S, Ziebuhr J.** 2018. Inhibition of Cytosolic Phospholipase A(2) α Impairs an Early Step of Coronavirus Replication in Cell Culture. *J Virol* **92**.
128. **Ohashi H, Wang F, Stappenbeck F, Tsuchimoto K, Kobayashi C, Saso W, Kataoka M, Yamasaki M, Kuramochi K, Muramatsu M, Suzuki T, Sureau C, Takeda M, Wakita T, Parhami F, Watashi K.** 2021. Identification of Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Oxysterol Derivatives In Vitro. *Int J Mol Sci* **22**.
129. **Leier HC, Weinstein JB, Kyle JE, Lee J-Y, Bramer LM, Stratton KG, Kempthorne D, Navratil AR, Tafesse EG, Hornemann T, Messer WB, Dennis EA, Metz TO, Barklis E, Tafesse FG.** 2020. A global lipid map defines a network essential for Zika virus replication. *Nature Communications* **11**:3652.
130. **Gewaid H, Aoyagi H, Arita M, Watashi K, Suzuki R, Sakai S, Kumagai K, Yamaji T, Fukasawa M, Kato F, Hishiki T, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Hanada K, Muramatsu M, Wakita T, Aizaki H.** 2020. Sphingomyelin Is Essential for the Structure and Function of the Double-Membrane Vesicles in Hepatitis C Virus RNA Replication Factories. *J Virol* **94**.
131. **Martín-Acebes MA, Gabandé-Rodríguez E, García-Cabrero AM, Sánchez MP, Ledesma MD, Sobrino F, Saiz JC.** 2016. Host sphingomyelin increases West Nile virus infection in vivo. *J Lipid Res* **57**:422-32.
132. **Aktepe TE, Pham H, Mackenzie JM.** 2015. Differential utilisation of ceramide during replication of the flaviviruses West Nile and dengue virus. *Virology* **484**:241-250.

133. **Nakayasu ES, Nicora CD, Sims AC, Burnum-Johnson KE, Kim YM, Kyle JE, Matzke MM, Shukla AK, Chu RK, Schepmoes AA, Jacobs JM, Baric RS, Webb-Robertson BJ, Smith RD, Metz TO.** 2016. MPLEx: a Robust and Universal Protocol for Single-Sample Integrative Proteomic, Metabolomic, and Lipidomic Analyses. *mSystems* **1**.
134. **Vitner EB, Avraham R, Politi B, Melamed S, Israely T.** 2022. Elevation in sphingolipid upon SARS-CoV-2 infection: possible implications for COVID-19 pathology. *Life Sci Alliance* **5**.
135. **Abdel-Megied AM, Monreal IA, Zhao L, Apffel A, Aguilar HC, Jones JW.** 2023. Characterization of the cellular lipid composition during SARS-CoV-2 infection. *Anal Bioanal Chem* **415**:5269-5279.
136. **Quinville BM, Deschenes NM, Ryckman AE, Walia JS.** 2021. A Comprehensive Review: Sphingolipid Metabolism and Implications of Disruption in Sphingolipid Homeostasis. *Int J Mol Sci* **22**.
137. **Gault CR, Obeid LM, Hannun YA.** 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol* **688**:1-23.
138. **Harayama T, Riezman H.** 2018. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**:281-296.
139. **Bieberich E.** 2018. Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of analysis. *Chem Phys Lipids* **216**:114-131.
140. **Hannun YA, Obeid LM.** 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**:139-150.
141. **Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA.** 2008. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal* **20**:1010-8.
142. **Chen Y, Cao Y.** 2017. The sphingomyelin synthase family: proteins, diseases, and inhibitors. *Biological Chemistry* **398**:1319-1325.
143. **Xiang H, Jin S, Tan F, Xu Y, Lu Y, Wu T.** 2021. Physiological functions and therapeutic applications of neutral sphingomyelinase and acid sphingomyelinase. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **139**:111610.
144. **Coant N, Sakamoto W, Mao C, Hannun YA.** 2017. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Adv Biol Regul* **63**:122-131.
145. **Alemany R, van Koppen CJ, Danneberg K, ter Braak M, Meyer zu Heringdorf D.** 2007. Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **374**:413-428.
146. **Spiegel S, Milstien S.** 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**:397-407.
147. **Serra M, Saba JD.** 2010. Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Adv Enzyme Regul* **50**:349-62.
148. **Custodia A, Aramburu-Núñez M, Correa-Paz C, Posado-Fernández A, Gómez-Larrauri A, Castillo J, Gómez-Muñoz A, Sobrino T, Ouro A.** 2021. Ceramide Metabolism and Parkinson's Disease-Therapeutic Targets. *Biomolecules* **11**.
149. **Duan R-D, Bergman T, Xu N, Wu J, Cheng Y, Duan J, Nelander S, Palmberg C, Nilsson Å.** 2003. Identification of Human Intestinal Alkaline Sphingomyelinase as a Novel Ecto-enzyme Related to the Nucleotide Phosphodiesterase Family*. *Journal of Biological Chemistry* **278**:38528-38536.
150. **Barnholz Y, Roitman A, Gatt S.** 1966. Enzymatic Hydrolysis of Sphingolipids: II. HYDROLYSIS OF SPHINGOMYELIN BY AN ENZYME FROM RAT BRAIN. *Journal of Biological Chemistry* **241**:3731-3737.

Referenzen

151. **Jenkins RW, Canals D, Hannun YA.** 2009. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal* **21**:836-46.
152. **Ni X, Morales CR.** 2006. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* **7**:889-902.
153. **Horinouchi K, Erlich S, Perl DP, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, Desnick RJ, Stewart CL, Schuchman EH.** 1995. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet* **10**:288-93.
154. **Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R, Gulbins E.** 2001. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **276**:20589-96.
155. **Xu M, Xia M, Li XX, Han WQ, Boini KM, Zhang F, Zhang Y, Ritter JK, Li PL.** 2012. Requirement of translocated lysosomal V1 H(+)-ATPase for activation of membrane acid sphingomyelinase and raft clustering in coronary endothelial cells. *Mol Biol Cell* **23**:1546-57.
156. **Schissel SL, Jiang X, Tweedie-Hardman J, Jeong T, Camejo EH, Najib J, Rapp JH, Williams KJ, Tabas I.** 1998. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem* **273**:2738-46.
157. **Breiden B, Sandhoff K.** 2021. Acid Sphingomyelinase, a Lysosomal and Secretory Phospholipase C, Is Key for Cellular Phospholipid Catabolism. *Int J Mol Sci* **22**.
158. **Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Muehlbacher M, Groemer TW, Gulbins E.** 2010. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem* **26**:9-20.
159. **Gulbins E, Palmada M, Reichel M, Lüth A, Böhmer C, Amato D, Müller CP, Tischbirek CH, Groemer TW, Tabatabai G, Becker KA, Tripal P, Staedtler S, Ackermann TF, van Brederode J, Alzheimer C, Weller M, Lang UE, Kleuser B, Grassmé H, Kornhuber J.** 2013. Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat Med* **19**:934-8.
160. **Jarvis MA, Hansen FA, Rosenke K, Haddock E, Rollinson C, Rule S, Sewell G, Hughes A, Feldmann H.** 2020. Evaluation of drugs for potential repurposing against COVID-19 using a tier-based scoring system. *Antivir Ther* **25**:223-231.
161. **Hamed MGM, Hagag RS.** 2020. The possible immunoregulatory and anti-inflammatory effects of selective serotonin reuptake inhibitors in coronavirus disease patients. *Med Hypotheses* **144**:110140.
162. **Carpinteiro A, Edwards MJ, Hoffmann M, Kochs G, Gripp B, Weigang S, Adams C, Carpinteiro E, Gulbins A, Keitsch S, Sehl C, Soddemann M, Wilker B, Kamler M, Bertsch T, Lang KS, Patel S, Wilson GC, Walter S, Hengel H, Pöhlmann S, Lang PA, Kornhuber J, Becker KA, Ahmad SA, Fassbender K, Gulbins E.** 2020. Pharmacological Inhibition of Acid Sphingomyelinase Prevents Uptake of SARS-CoV-2 by Epithelial Cells. *Cell Rep Med* **1**:100142.
163. **Schloer S, Brunotte L, Goretzko J, Mecate-Zambrano A, Korthals N, Gerke V, Ludwig S, Rescher U.** 2020. Targeting the endolysosomal host-SARS-CoV-2 interface by clinically licensed functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMA) including the antidepressant fluoxetine. *Emerg Microbes Infect* **9**:2245-2255.
164. **Kutkat O, Moatasim Y, Al-Karmalawy AA, Abulkhair HS, Gomaa MR, El-Taweel AN, Abo Shama NM, GabAllah M, Mahmoud DB, Kayali G, Ali MA, Kandeil A, Mostafa A.** 2022. Robust antiviral activity of commonly prescribed

- antidepressants against emerging coronaviruses: in vitro and in silico drug repurposing studies. *Sci Rep* **12**:12920.
165. **Clarke CJ, Wu BX, Hannun YA.** 2011. The neutral sphingomyelinase family: identifying biochemical connections. *Adv Enzyme Regul* **51**:51-8.
 166. **Tomiuk S, Zumbansen M, Stoffel W.** 2000. Characterization and Subcellular Localization of Murine and Human Magnesium-dependent Neutral Sphingomyelinase*. *Journal of Biological Chemistry* **275**:5710-5717.
 167. **Mizutani Y, Tamiya-Koizumi K, Nakamura N, Kobayashi M, Hirabayashi Y, Yoshida S.** 2001. Nuclear localization of neutral sphingomyelinase 1: biochemical and immunocytochemical analyses. *J Cell Sci* **114**:3727-36.
 168. **Yabu T, Shiba H, Shibasaki Y, Nakanishi T, Imamura S, Touhata K, Yamashita M.** 2015. Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of nSMase1 by JNK signaling. *Cell Death Differ* **22**:258-73.
 169. **Hofmann K, Tomiuk S, Wolff G, Stoffel W.** 2000. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5895-900.
 170. **Karakashian AA, Giltiay NV, Smith GM, Nikolova-Karakashian MN.** 2004. Expression of neutral sphingomyelinase-2 (NSMase-2) in primary rat hepatocytes modulates IL- β -induced JNK activation. *The FASEB Journal* **18**:968-970.
 171. **Marchesini N, Osta W, Bielawski J, Luberto C, Obeid LM, Hannun YA.** 2004. Role for Mammalian Neutral Sphingomyelinase 2 in Confluence-induced Growth Arrest of MCF7 Cells*. *Journal of Biological Chemistry* **279**:25101-25111.
 172. **Milhas D, Clarke CJ, Idkowiak-Baldys J, Canals D, Hannun YA.** 2010. Anterograde and retrograde transport of neutral sphingomyelinase-2 between the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1801**:1361-74.
 173. **Shamseddine AA, Airola MV, Hannun YA.** 2015. Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Adv Biol Regul* **57**:24-41.
 174. **Adam D, Wiegmann K, Adam-Klages S, Ruff A, Krönke M.** 1996. A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J Biol Chem* **271**:14617-22.
 175. **Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, Krönke M.** 1996. FAN, a Novel WD-Repeat Protein, Couples the p55 TNF-Receptor to Neutral Sphingomyelinase. *Cell* **86**:937-947.
 176. **Kim MY, Linardic C, Obeid L, Hannun Y.** 1991. Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* **266**:484-9.
 177. **Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S.** 1994. Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:73-7.
 178. **Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M.** 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**:1244-7.
 179. **Menck K, Sönmezer C, Worst TS, Schulz M, Dihazi GH, Streit F, Erdmann G, Kling S, Boutros M, Binder C, Gross JC.** 2017. Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane. *J Extracell Vesicles* **6**:1378056.

Referenzen

180. **Choezom D, Gross JC.** 2022. Neutral sphingomyelinase 2 controls exosome secretion by counteracting V-ATPase-mediated endosome acidification. *J Cell Sci* **135**.
181. **Krut O, Wiegmann K, Kashkar H, Yazdanpanah B, Krönke M.** 2006. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J Biol Chem* **281**:13784-13793.
182. **Magini P, Smits DJ, Vandervore L, Schot R, Columbaro M, Kasteleijn E, van der Ent M, Palombo F, Lequin MH, Dremmen M, de Wit MCY, Severino M, Divizia MT, Striano P, Ordonez-Herrera N, Alhashem A, Al Fares A, Al Ghamdi M, Rolfs A, Bauer P, Demmers J, Verheijen FW, Wilke M, van Slegtenhorst M, van der Spek PJ, Seri M, Jansen AC, Stottmann RW, Hufnagel RB, Hopkin RJ, Aljeaid D, Wiszniewski W, Gawlinski P, Laure-Kamionowska M, Alkuraya FS, Akleh H, Stanley V, Musaev D, Gleeson JG, Zaki MS, Brunetti-Pierri N, Cappuccio G, Davidov B, Basel-Salmon L, Bazak L, Shahar NR, Bertoli-Avella A, Mirzaa GM, Dobyns WB, Pippucci T, et al.** 2019. Loss of SMPD4 Causes a Developmental Disorder Characterized by Microcephaly and Congenital Arthrogyrosis. *Am J Hum Genet* **105**:689-705.
183. **Piët ACA, Post M, Dekkers D, Demmers JAA, Fornerod M.** 2022. Proximity Ligation Mapping of Microcephaly Associated SMPD4 Shows Association with Components of the Nuclear Pore Membrane. *Cells* **11**.
184. **Smits DJ, Schot R, Krusy N, Wiegmann K, Utermöhlen O, Mulder MT, den Hoedt S, Yoon G, Deshwar AR, Kresge C, Pletcher B, van Mook M, Ferreira MS, Poot RA, Slotman JA, Kremers GJ, Ahmad A, Albash B, Bastaki L, Marafi D, Dekker J, van Ham TJ, Nguyen L, Mancini GMS.** 2023. SMPD4 regulates mitotic nuclear envelope dynamics and its loss causes microcephaly and diabetes. *Brain* **146**:3528-3541.
185. **Moylan JS, Smith JD, Wolf Horrell EM, McLean JB, Deevska GM, Bonnell MR, Nikolova-Karakashian MN, Reid MB.** 2014. Neutral sphingomyelinase-3 mediates TNF-stimulated oxidant activity in skeletal muscle. *Redox Biology* **2**:910-920.
186. **Wu BX, Rajagopalan V, Roddy PL, Clarke CJ, Hannun YA.** 2010. Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5. *J Biol Chem* **285**:17993-8002.
187. **Yager EJ, Konan KV.** 2019. Sphingolipids as Potential Therapeutic Targets against Enveloped Human RNA Viruses. *Viruses* **11**.
188. **Beckmann N, Becker KA.** 2021. Ceramide and Related Molecules in Viral Infections. *Int J Mol Sci* **22**.
189. **Schneider-Schaulies S, Schumacher F, Wigger D, Schöl M, Waghmare T, Schlegel J, Seibel J, Kleuser B.** 2021. Sphingolipids: Effectors and Achilles Heels in Viral Infections? *Cells* **10**.
190. **Thomas S, Samuel SV, Hoch A, Sypchurs C, Diray-Arce J.** 2023. The Implication of Sphingolipids in Viral Infections. *Int J Mol Sci* **24**.
191. **Hammache D, Yahi N, Piéroni G, Ariasi F, Tamalet C, Fantini J.** 1998. Sequential interaction of CD4 and HIV-1 gp120 with a reconstituted membrane patch of ganglioside GM3: implications for the role of glycolipids as potential HIV-1 fusion cofactors. *Biochem Biophys Res Commun* **246**:117-22.
192. **Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA.** 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *Embo j* **22**:4346-55.

193. **Taube S, Jiang M, Wobus CE.** 2010. Glycosphingolipids as receptors for non-enveloped viruses. *Viruses* **2**:1011-1049.
194. **Avota E, Gulbins E, Schneider-Schaulies S.** 2011. DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS Pathog* **7**:e1001290.
195. **Miller ME, Adhikary S, Kolokoltssov AA, Davey RA.** 2012. Ebola virus requires acid sphingomyelinase activity and plasma membrane sphingomyelin for infection. *J Virol* **86**:7473-83.
196. **Seo YJ, Pritzi CJ, Vijayan M, Bomb K, McClain ME, Alexander S, Hahn B.** 2013. Sphingosine kinase 1 serves as a pro-viral factor by regulating viral RNA synthesis and nuclear export of viral ribonucleoprotein complex upon influenza virus infection. *PLoS One* **8**:e75005.
197. **Kalvodova L, Sampaio JL, Cordo S, Ejsing CS, Shevchenko A, Simons K.** 2009. The lipidomes of vesicular stomatitis virus, semliki forest virus, and the host plasma membrane analyzed by quantitative shotgun mass spectrometry. *J Virol* **83**:7996-8003.
198. **Merz A, Long G, Hiet MS, Brügger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2011. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* **286**:3018-32.
199. **Gerl MJ, Sampaio JL, Urban S, Kalvodova L, Verbavatz J-M, Binnington B, Lindemann D, Lingwood CA, Shevchenko A, Schroeder C, Simons K.** 2012. Quantitative analysis of the lipidomes of the influenza virus envelope and MDCK cell apical membrane. *Journal of Cell Biology* **196**:213-221.
200. **Yoo SW, Waheed AA, Deme P, Tohumeken S, Rais R, Smith MD, DeMarino C, Calabresi PA, Kashanchi F, Freed EO, Slusher BS, Haughey NJ.** 2023. Inhibition of neutral sphingomyelinase 2 impairs HIV-1 envelope formation and substantially delays or eliminates viral rebound. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**:e2219543120.
201. **Freytmuth F, Vabret A, Rozenberg F, Dina J, Petitjean J, Gouarin S, Legrand L, Corbet S, Brouard J, Lebon P.** 2005. Replication of respiratory viruses, particularly influenza virus, rhinovirus, and coronavirus in HuH7 hepatocarcinoma cell line. *J Med Virol* **77**:295-301.
202. **Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP.** 1973. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **51**:1417-1423.
203. **Jacobs JP.** 1976. The status of human diploid cell strain MRC-5 as an approved substrate for the production of viral vaccines. *Journal of Biological Standardization* **4**:97-99.
204. **Baldi L, Hacker DL, Adam M, Wurm FM.** 2007. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters* **29**:677-684.
205. **Luberto C, Hassler DF, Signorelli P, Okamoto Y, Sawai H, Boros E, Hazen-Martin DJ, Obeid LM, Hannun YA, Smith GK.** 2002. Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* **277**:41128-39.
206. **Pavlic A, Poelman H, Wasilewski G, Wichapong K, Lux P, Maassen C, Lutgens E, Schurgers LJ, Reutelingsperger CP, Nicolaes GAF.** 2023. Inhibition of Neutral Sphingomyelinase 2 by Novel Small Molecule Inhibitors

Referenzen

- Results in Decreased Release of Extracellular Vesicles by Vascular Smooth Muscle Cells and Attenuated Calcification. *International Journal of Molecular Sciences* **24**:2027.
207. **Rojas C, Sala M, Thomas AG, Datta Chaudhuri A, Yoo SW, Li Z, Dash RP, Rais R, Haughey NJ, Nencka R, Slusher B.** 2019. A novel and potent brain penetrant inhibitor of extracellular vesicle release. *Br J Pharmacol* **176**:3857-3870.
208. **Naser E, Kadow S, Schumacher F, Mohamed ZH, Kappe C, Hessler G, Pollmeier B, Kleuser B, Arenz C, Becker KA, Gulbins E, Carpinteiro A.** 2020. Characterization of the small molecule ARC39, a direct and specific inhibitor of acid sphingomyelinase in vitro. *J Lipid Res* **61**:896-910.
209. **Schempp R, Eilts J, Schöl M, Grijalva Yépez MF, Fekete A, Wigger D, Schumacher F, Kleuser B, van Ham M, Jänsch L, Sauer M, Avota E.** 2024. The Role of Neutral Sphingomyelinase-2 (NSM2) in the Control of Neutral Lipid Storage in T Cells. *Int J Mol Sci* **25**.
210. **Deng Y, Rivera-Molina FE, Toomre DK, Burd CG.** 2016. Sphingomyelin is sorted at the trans Golgi network into a distinct class of secretory vesicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:6677-82.
211. **Martín-Acebes MA, Merino-Ramos T, Blázquez AB, Casas J, Escribano-Romero E, Sobrino F, Saiz JC.** 2014. The composition of West Nile virus lipid envelope unveils a role of sphingolipid metabolism in flavivirus biogenesis. *J Virol* **88**:12041-54.
212. **Huang Y, Li Y, Zhang H, Zhao R, Jing R, Xu Y, He M, Peer J, Kim YC, Luo J, Tong Z, Zheng J.** 2018. Zika virus propagation and release in human fetal astrocytes can be suppressed by neutral sphingomyelinase-2 inhibitor GW4869. *Cell Discov* **4**:19.
213. **Waheed AA, Zhu Y, Agostino E, Naing L, Hikichi Y, Soheilian F, Yoo SW, Song Y, Zhang P, Slusher BS, Haughey NJ, Freed EO.** 2023. Neutral sphingomyelinase 2 is required for HIV-1 maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**:e2219475120.
214. **Rappe JCF, de Wilde A, Di H, Muller C, Stalder H, V'Kovski P, Snijder E, Brinton MA, Ziebuhr J, Ruggli N, Thiel V.** 2018. Antiviral activity of K22 against members of the order Nidovirales. *Virus Res* **246**:28-34.
215. **Anderluh G, Macek P.** 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* **40**:111-24.
216. **Bakrač B, Kladnik A, Maček P, McHaffie G, Werner A, Lakey JH, Anderluh G.** 2010. A Toxin-based Probe Reveals Cytoplasmic Exposure of Golgi Sphingomyelin*. *Journal of Biological Chemistry* **285**:22186-22195.
217. **Mueller N, Avota E, Collenburg L, Grassmé H, Schneider-Schaulies S.** 2014. Neutral sphingomyelinase in physiological and measles virus induced T cell suppression. *PLoS Pathog* **10**:e1004574.
218. **Ziebuhr J, Schelle B, Karl N, Minskaia E, Bayer S, Siddell SG, Gorbalenya AE, Thiel V.** 2007. Human coronavirus 229E papain-like proteases have overlapping specificities but distinct functions in viral replication. *J Virol* **81**:3922-32.
219. **Han YS, Chang GG, Juo CG, Lee HJ, Yeh SH, Hsu JT, Chen X.** 2005. Papain-like protease 2 (PLP2) from severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV): expression, purification, characterization, and inhibition. *Biochemistry* **44**:10349-59.
220. **Yang X, Chen X, Bian G, Tu J, Xing Y, Wang Y, Chen Z.** 2014. Proteolytic processing, deubiquitinase and interferon antagonist activities of Middle East respiratory syndrome coronavirus papain-like protease. *J Gen Virol* **95**:614-626.

221. **Batliner M, Schumacher F, Wigger D, Vivas W, Prell A, Fohmann I, Köhler T, Schempp R, Riedel A, Vaeth M, Fekete A, Kleuser B, Kurzai O, Nieuwenhuizen NE.** 2024. The *Candida albicans* quorum-sensing molecule farnesol alters sphingolipid metabolism in human monocyte-derived dendritic cells. *mBio* **15**:e0073224.
222. **Prell A, Wigger D, Huwiler A, Schumacher F, Kleuser B.** 2024. The sphingosine kinase 2 inhibitors ABC294640 and K145 elevate (dihydro)sphingosine 1-phosphate levels in various cells. *J Lipid Res* **65**:100631.
223. **Hehner J, Schneider L, Weitalla A, Ott B, Vu KCT, Schöbel A, Hain T, Schwudke D, Herker E.** 2024. Glycerophospholipid remodeling is critical for orthoflavivirus infection. *Nat Commun* **15**:8683.
224. **Dissanayake TK, Yan B, Ng AC, Zhao H, Chan G, Yip CC, Sze KH, To KK.** 2021. Differential role of sphingomyelin in influenza virus, rhinovirus and SARS-CoV-2 infection of Calu-3 cells. *J Gen Virol* **102**.
225. **Steinhart WL, Busch JS, Oettgen P, Howland JL.** 2008. Sphingolipid Metabolism during Infection of Human Fibroblasts by Herpes Simplex Virus Type 1. *Intervirology* **21**:70-76.
226. **Wang J, Pendurthi UR, Yi G, Rao LVM.** 2021. SARS-CoV-2 infection induces the activation of tissue factor-mediated coagulation via activation of acid sphingomyelinase. *Blood* **138**:344-349.
227. **Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pöhlmann S.** 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:7988-93.
228. **Kishimoto T, Ishitsuka R, Kobayashi T.** 2016. Detectors for evaluating the cellular landscape of sphingomyelin- and cholesterol-rich membrane domains. *Biochim Biophys Acta* **1861**:812-829.
229. **Levy M, Futerman AH.** 2010. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* **62**:347-56.
230. **Geeraert L, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP.** 1997. Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochemical Journal* **327**:125-132.
231. **Posthuma CC, Pedersen KW, Lu Z, Joosten RG, Roos N, Zevenhoven-Dobbe JC, Snijder EJ.** 2008. Formation of the Arterivirus Replication/Transcription Complex: a Key Role for Nonstructural Protein 3 in the Remodeling of Intracellular Membranes. *Journal of Virology* **82**:4480-4491.
232. **Kaltenegger M, Kremser J, Frewein MPK, Zihler P, Bonthuis DJ, Pabst G.** 2021. Intrinsic lipid curvatures of mammalian plasma membrane outer leaflet lipids and ceramides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1863**:183709.
233. **Holopainen JM, Angelova MI, Kinnunen PK.** 2000. Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophys J* **78**:830-8.
234. **Utermöhlen O, Herz J, Schramm M, Krönke M.** 2008. Fusogenicity of membranes: The impact of acid sphingomyelinase on innate immune responses. *Immunobiology* **213**:307-314.
235. **Grassmé H, Schwarz H, Gulbins E.** 2001. Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem Biophys Res Commun* **284**:1016-30.
236. **Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA.** 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* **124**:573-86.

Referenzen

237. **Piña F, Yan B, Hu J, Niwa M.** 2023. Reticulons bind sphingolipids to activate the endoplasmic reticulum cell cycle checkpoint, the ER surveillance pathway. *Cell Reports* **42**.
238. **Deng Y, You L, Lu Y, Han S, Wang J, Vicas N, Chen C, Ye J.** 2021. Identification of TRAMs as sphingolipid-binding proteins using a photoactivatable and clickable short-chain ceramide analog. *J Biol Chem* **297**:101415.
239. **Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW.** 2010. Network organization of the human autophagy system. *Nature* **466**:68-76.
240. **Leidal AM, Huang HH, Marsh T, Solvik T, Zhang D, Ye J, Kai F, Goldsmith J, Liu JY, Huang Y-H, Monkkonen T, Vlahakis A, Huang EJ, Goodarzi H, Yu L, Wiita AP, Debnath J.** 2020. The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles. *Nature Cell Biology* **22**:187-199.
241. **Varela YR, Alonso A.** 2023. LC3/GABARAP binding to fluid membranes is potentiated by ceramide. *Autophagy* **19**:1371-1373.
242. **Bockelmann S, Mina JM, Korneev S, Hassan DG, Müller D, Hilderink A, Vlieg HC, Raijmakers R, Heck AR, Haberkant P, Holthuis JM.** 2018. A search for ceramide binding proteins using bifunctional lipid analogs yields CERT-related protein StarD7. *Journal of Lipid Research* **59**:515-530.
243. **Schulte-Zweckel J, Schneidewind T, Abad JL, Brockmeyer A, Janning P, Triola G.** 2018. Azide-tagged sphingolipids for the proteome-wide identification of C16-ceramide-binding proteins. *Chemical Communications* **54**:13742-13745.
244. **Morito M, Yasuda H, Matsufuji T, Kinoshita M, Matsumori N.** 2024. Identification of lipid-specific proteins with high-density lipid-immobilized beads. *Analyst* **149**:3747-3755.
245. **Schöl M, Schempp R, Hennig T, Wigger D, Schumacher F, Kleuser B, Stigloher C, van Ham M, Jänsch L, Schneider-Schaulies S, Dölken L, Avota E.** 2024. Dynamic changes in the proximitome of neutral sphingomyelinase-2 (nSMase2) in TNF α stimulated Jurkat cells. *Front Immunol* **15**:1435701.
246. **Lam SS, Martell JD, Kamer KJ, Deerinck TJ, Ellisman MH, Mootha VK, Ting AY.** 2015. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods* **12**:51-4.
247. **Kuo A, Hla T.** 2024. Regulation of cellular and systemic sphingolipid homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **25**:802-821.
248. **Jamecna D, Höglinger D.** 2024. The use of click chemistry in sphingolipid research. *J Cell Sci* **137**.
249. **Lenze EJ, Mattar C, Zorumski CF, Stevens A, Schweiger J, Nicol GE, Miller JP, Yang L, Yingling M, Avidan MS, Reiersen AM.** 2020. Fluvoxamine vs Placebo and Clinical Deterioration in Outpatients With Symptomatic COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **324**:2292-2300.
250. **Hoertel N, Sanchez-Rico M, Vernet R, Beeker N, Jannot AS, Neuraz A, Salamanca E, Paris N, Daniel C, Gramfort A, Lemaitre G, Bernaux M, Bellamine A, Lemogne C, Airagnes G, Burgun A, Limosin F, Collaboration A-HUIC-R, Initiative A-HCC.** 2021. Association between antidepressant use and reduced risk of intubation or death in hospitalized patients with COVID-19: results from an observational study. *Mol Psychiatry* **26**:5199-5212.
251. **Darquennes G, Le Corre P, Le Moine O, Loas G.** 2021. Association between Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs) and Reduced Risk of Death in COVID-19 Patients: A Retrospective Cohort Study. *Pharmaceuticals* **14**:226.

Abkürzungsverzeichnis

+ssRNA	Plus- und einzelsträngige RNA
3CL ^{pro}	3C-like Protease
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
aSMase	Saure (eng. <i>acid</i>) Sphingomyelinase
APN/CD13	Aminopeptidase N bzw. CD13
ATCC	American Type Culture Collection
β-GCase	β-Glycosylcerebrosidase
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C1PP	Ceramid-1-Phosphat-Phosphatase
ca.	circa
CC ₅₀	Zytotoxische Konzentration 50 % (eng. <i>cytotoxic concentration</i> 50 %)
Cer	Ceramid(e) (Singular/Plural)
CERK	Ceramid-Kinase
CerS	Ceramid-Synthase
CM	Eng. <i>convoluted membranes</i>
CPE	Zytopathischer Effekt (eng. <i>cytopathic effect</i>)
C _t -Wert	Eng. <i>cycle treshold</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
dhCer	Dihydroceramid
dhSph	Dihydrosphingosin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEGS	Dihydroceramid-Dehydrogenase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMS	Doppelmembranspherulen
DMV	Doppelmembranvesikel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPP4	Dipeptidylpeptidase IV

Abkürzungsverzeichnis

dsRNA	Doppelstrang-RNA
E-Protein	Hüll-Protein (eng. <i>envelope protein</i>)
EAV	<i>Equines arteritis virus</i>
EBOV	<i>Ebola virus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-Intermediärkompartiment
ESI	Elektronenspray-Ionisierung
FIASMA	Funktionelle Inhibitoren der α SMase
FBS	Fetales bovines Serum
g	Gramm
x g	Standardwert für die Normalfallbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS	Glykosylceramid-Synthase
GOI	Eng. <i>gene of interest</i>
GSL	Glykosphingolipide
h	Stunde
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
h p. i.	Stunden nach Infektion
h p. t.	Stunden nach Transfektion
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HCoV	Humanes Coronavirus
HE	Hämagglutinin-Esterase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (eng. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IAV	<i>Influenza A virus</i>
KDR	Ketosphinganin-Dereduktase
LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>
LCB	Langketten-Basismoleküle (eng. <i>long-chain basis</i>)
LD	Lipidtröpfchen (eng. <i>lipid droplets</i>)
M	Molar
M-Protein	Membran-Protein

Abkürzungsverzeichnis

MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
MERS-CoV	<i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>
MHV	<i>Murine hepatitis virus</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	Eng. <i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Eng. <i>messenger mRNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
nm	Nanometer
NSMAF (auch: FAN)	Neutrale Sphingomyelinase 2 aktivierender Faktor
nSMase	Neutrale Sphingomyelinase
nsp	Nichtstrukturprotein
ORF	Eng. <i>Open reading frame</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
pfu	Eng. <i>Plaque-forming units</i>
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PL ^{pro}	<i>Papain-like protease</i>
pp	Polyprotein
qPCR	Quantitative PCR
REEP5	Eng. <i>receptor expression-enhancing protein 5</i>
RIG-I	Eng. <i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTC	Replikations-/Transkriptionskomplex
RTN	Reticulon
RO	Replikative Organelle
s	Sekunde
S-Protein	Spike-Protein
S1P	Sphingosin-1-Phosphat

Abkürzungsverzeichnis

SARS-CoV	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SDS	Eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
sgmRNA	Subgenomische messenger RNA
Sph	Sphingosin
SphK	Sphingosin-Kinase
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
SPP	Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatase
SPT	Serin-C-Palmitoyltransferase
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TM	Transmembran-Domäne
TMEM41B	Transmembranprotein 41B
TMPRSS2	Transmembran-Serinprotease 2
TRAM1	Translationsassoziiertes Membranprotein 1
u.a.	unter anderem
UTR	Untranslatierte Region
vgl	vergleiche
VMP1	Vakuolen-Membranprotein
VPS34	Klasse III PI3K, von eng. <i>vacuole protein sorting</i>
WNV	West-Nil-Virus
z.B.	zum Beispiel
ZIKV	<i>Zika virus</i>

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlichst bei allen bedanken, die zu dieser Arbeit beigetragen haben:

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. John Ziebuhr für die Möglichkeit, in seinem Labor den Großteil der hier aufgeführten Experimente durchzuführen und die Doktorarbeit unter seiner Aufsicht anzufertigen. Ebenso bedanken möchte ich mich für die exzellente Betreuung und die vielen wertvollen und kritischen wissenschaftlichen Diskussionsbeiträge.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Dr. Christin Müller-Ruttloff bedanken. Insbesondere für die optimalste Betreuung, die vielen anregenden Diskussionen und ihre grenzlose Unterstützung, sowohl bei arbeitsbezogenen als auch bei privaten Angelegenheiten. Ich freue mich auf viele Monate der weiteren Zusammenarbeit!

Ich möchte mich weiterhin bei allen Kooperationspartnern bedanken, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Vor allem hervorzuheben sind dabei Prof. Burkhard Kleuser und Dr. Fabian Schumacher für die massenspektrometrischen Analysen sowie Dr. Ulrich Gärtner und Tamara Papadakis für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern des GRK2581 für den wissenschaftlichen Austausch und die vielen tollen „*social events*“ bedanken.

Ein großer Dank gilt außerdem allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie, mit denen ich zusammenarbeiten durfte. Besonders zu erwähnen ist dabei Julia Schultheis. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung und Empathie wären die vergangenen Jahre deutlich schwieriger gewesen. Außerdem hätte es deutlich weniger Spaß und Freude bei der Arbeit und in den Arbeitspausen gegeben (und ich wäre wahrscheinlich deutlich weniger koffeinabhängig). Weiterhin erwähnen möchte ich Dr. Heiko Slanina (für die vielen äußerst lehrreichen Konversationen über die faszinierende Welt der Tiere und der Mikrobiologie), bei Nadja Karl (für die hervorragende technische Unterstützung und als super Gesprächspartnerin für Filme und Serien) sowie unsere unersetzbare Sekretärin Sibylle Hirzmann. Ein weiterer Dank gilt außerdem meinen Büronachbarn Elisa Raso und Jara Göbel als auch Fiona Gockel und Jorina Eckersberg, im Besonderen für all die Stunden mit lustigen und mitunter speziellen Gesprächen bei uns im Büro. Außerdem möchte ich mich bei den beiden

Danksagung

Masterstudenten Julia Henninger und Felix Dettler für ihre Unterstützung im Labor bedanken.

Ich möchte mich außerdem bei all den Freunden bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt, aufgemuntert oder einfach nur Zeit mit mir verbracht haben. Namentlich möchte ich hierbei besonders Franziska Hülers und Ines Tapken (danke auch für die Möglichkeit euch immer in meiner Lieblingsstadt Hannover besuchen zu können!), bei Stella Buchwald (die mich schon seit Beginn des Bachelorstudiums erträgt) sowie Max Probst (ohne den ich nicht wüsste, dass ein Meter Pizza eine durchaus machbare Portion darstellt) erwähnen.

Ein abschließender großer, großer Dank an meine Familie: meinen Vater Mike, meine Mutter Eva-Maria und Ahmad, mein Onkelchen Stefan und Tante Sarah sowie meinem Cousin Gaspard, und natürlicher meinen beiden Großeltern. Vielen Dank für all die Jahre eurer Unterstützung und Liebe!

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

Datum

Unterschrift (Florian Salisch)