

**Untersuchungen zu den Effekten chemischer Inhibitoren
der Proteinkinasen PERK und IKK β auf eine Infektion
von humanen HuH7, A549 und alveolaren Epithelzellen
mit dem humanen Coronavirus 229E.**

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

vorgelegt von Anna Sophie Geradts, geboren in Bremen

Gießen, 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 19. September 2024

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
1 EINLEITUNG	1
1.1 CORONAVIRIDAE	1
1.1.1 Die Historie der Coronaviren.....	1
1.1.2 Taxonomie.....	1
1.1.3 Aufbau und Genom	2
1.1.3.1 Das Genom.....	4
1.1.4 Replikationszyklus	5
1.1.5 SARS-CoV-2	7
1.1.5.1 COVID-19 und ARDS - Diagnostik und Therapie	8
1.2 DIE IMMUNREAKTION DES KÖRPERS	9
1.2.1 Proinflammatorische Signalwege	11
1.2.1.1 Interleukin-1 und der NF- κ B-Signalweg	11
1.2.1.2 <i>Unfolded Protein Response</i>	14
1.2.1.3 Crosstalk zwischen ER- Stress und IL-1 Signalweg	18
1.2.2.1 Funktionen von ausgewählten CoV-induzierten Zielgenen	20
1.3 ZIELSETZUNG	22
2 MATERIAL	23
2.1 VERBRAUCHSMATERIAL	23
2.2 GERÄTE	23
2.2.1 Zellkultur.....	23
2.2.2 Zentrifugen.....	23
2.2.3 Mikroskope.....	23
2.2.4 RNA Messung	24
2.2.5 <i>real-time</i> qPCR	24
2.2.6 Software.....	24
2.2.7 Andere	24
2.3 ZELLINIEN	25
2.4 MEDIEN UND ZUSÄTZE	25
2.5 PUFFER	26
2.5.1 Waschpuffer	26
2.6 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL	26
2.7 KITS, GEBRAUCHSFERTIGE REAGENZIEN UND ENZYME.....	26
2.8 ANTIKÖRPER	27
2.8.1 Primärantikörper	27
2.8.2 Sekundärantikörper.....	27
2.9 INHIBITOREN	28
2.10 OLIGONUKLEOTIDE	28
2.10.1 PCR	28
2.10.1.1 TaqMan Sonden	28
2.10.1.2 SYBR Green Oligonukleotide.....	28
2.10.2 RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	29
3 METHODEN	30
3.1 ZELLKULTUR.....	30
3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen	30
3.1.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen.....	30
3.1.2.1 Humane Alveolare Epithelzellen.....	31
3.1.3 Behandlung mit den Inhibitoren.....	32
3.1.4 Infektion, Inkubation und Ernte der Zellen.....	33
3.1.4.1 Virus-Propagation	34
3.1.4.2 Plaque Assay	34
3.2 MOLEKULAR BIOLOGISCHE VERFAHREN	36
3.2.1 RNA-Isolation und Messung	36
3.2.2 Reverse Transkription.....	36
3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	37

3.2.3.1 TaqMan™ Gene Expression Assay	38
3.2.3.2 Fast SYBR™ Green- Assay	39
3.3 ZELLBIOLOGISCHE VERFAHREN	40
3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz	40
3.3.2 Immuno-RNA-Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	41
3.3.2.1 Auswertung der Immuno-RNA-Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierungen	42
4 ERGEBNISSE	48
4.1 CHARAKTERISIERUNG DER INHIBITORWIRKUNG AUF DIE GENEXPRESSION DER MIT HCoV-229E INFIZIERTEN HUH7 ZELLEN	48
4.1.1 Konzentrationsreihe des Inhibitors GSK2606414 in HuH7 Zellen	49
4.1.2 Konzentrationsreihe des Inhibitors PHA-408 in HuH7 Zellen	53
4.2 AUSWIRKUNGEN DER HCoV-229E INFektion UND INHIBITORBEHANDLUNG AUF DIE EXPRESSION DER AUSGEWÄHLTEN GENE IN A549 ZELLEN	58
4.2.1 Etablierung der Infektionsbedingungen in A549 Zellen	59
4.2.2 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Genexpression auf Einzelzellebene in A549 Zellen ..	64
4.2.3 Konzentrationsreihe des Inhibitors GSK2606414 in A549 Zellen	70
4.2.4 Konzentrationsreihe des Inhibitors PHA-408 in A549 Zellen	74
4.3 UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION IN HUMANEN ALVEOLAREN EPITHELZELLEN NACH INFektion MIT HCoV-229E	78
4.3.1 Etablierung der Kultivierung und Infektion von HAEC	78
4.3.2 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Wirtszellantwort der humanen Alveolaren Epithelzellen auf Einzelzellebene	80
4.3.3 Untersuchung der Genexpression mittels <i>real-time</i> RT-qPCR in humanen Alveolaren Epithelzellen nach der Infektion mit HCoV-229E	84
5 DISKUSSION	86
5.1 DIE DYSREGULATION DER IMMUNANTWORT DURCH CORONAVIREN	86
5.1.1 HCoV-229E induziert proinflammatorische Signalwege in HuH7 und A549 Zellen	87
5.2 UNTERSUCHUNGEN DER GENEXPRESSION UND INHIBITORWIRKUNG IN MIT HCoV-229E INFIZIERTEN HUH7 UND A549 ZELLEN	89
5.2.1 Die Anpassung der Infektionsbedingungen in den A549 Zellen	89
5.2.2 Expressionsinduktion der Gene auf Einzelzellebene in A549 Zellen	90
5.2.3 Die simultane Inhibition der PERK- und IKK β -Signalwege hat eine additive supprimierende Wirkung auf die virusinduzierte Genexpression und Virusreplikation	92
5.3 KULTIVIERUNG UND INFektion DER HUMANEN ALVEOLAREN EPITHELZELLEN	97
5.4 FAZIT	100
6 ANHANG	102
LITERATURVERZEICHNIS	108
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	128
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	130
PORTFOLIO	132
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	133
DANKSAGUNG	134

Zusammenfassung

Die Familie der Coronaviridae (CoV) umfasst ein breites Spektrum an RNA Viren, welche unterschiedliche Wirtszellorganismen infizieren, inklusive des Menschen. Die Pandemien verursacht durch das *severe acute respiratory syndrome* (SARS)-CoV, SARS-CoV-2 und *middle east respiratory syndrome* (MERS)-CoV haben die Bedrohung dieser Viren für die globalisierte Gesellschaft verdeutlicht. Die hohen Mutationsraten und vielseitigen *Escape*-Mechanismen von CoV stellen zudem große Herausforderungen bei der Entwicklung neuer Therapien dar.

Das Ziel der Arbeit war es zu prüfen, ob die simultane Inhibition der ER-Stress und NF- κ B Signalwege mit dem PERK-Inhibitor GSK2606414 und dem IKK β -Inhibitor PHA-408 einen kooperativen Hemmeffekt auf die durch das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) induzierten Zielgene *ATF3*, *ANKRD1*, *CHAC1*, *IL8*, *AIP3*, *NFKBIA*, *EIF2AK3*, *FICD* und *FUT1* sowie die Virusreplikation bewirken kann. Ergebnisse von RT-qPCR Analysen zeigten, dass die Kombination der Inhibitoren in der humanen Leberkarzinomzelllinie HuH7 in einer stärkeren Suppression der Genexpression und Virusreplikation resultiert als die Einzelbehandlungen.

Des Weiteren wurde ein Protokoll für die Infektion und Behandlung mit Inhibitoren der humanen Lungenkarzinom Zelllinie A549 etabliert. Mittels Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen (Immuno-RNA-FISH) konnte auf Einzelzellebene eine signifikante Induktion der Zielgene *ATF3*, *ANKRD1*, *IL8*, *TNFAIP3*, *EIF2AK3* und *FICD* nach 96-stündiger Infektion mit HCoV-229E nachgewiesen werden. Auch in A549 Zellen wurde eine Suppression der mRNA Level der ER-Stress und NF- κ B Zielgene durch die Hemmung von PERK oder IKK β erreicht.

In einem dritten Ansatz wurden humanen alveolare Epithelzellen (HAEC) kultiviert und mit HCoV-229E infiziert. Trotz sehr geringer Zellzahlen konnte die erfolgreiche Infektion der HAEC mit HCoV-229E mittels Immuno-RNA-FISH gezeigt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine kombinierte chemische Inhibition der virusinduzierten PERK und IKK β Signalwege einen potenziellen Ansatz darstellt, um sowohl die Replikation der Viren als auch eine überschießende ER-Stress Reaktion und proinflammatorische NF- κ B-abhängige zelluläre Immunantwort zu supprimieren.

Abstract

The Coronaviridae (CoV) family comprises a broad spectrum of RNA viruses that infect different host cell organisms, including humans. The outbreaks of severe acute respiratory syndrome (SARS)-CoV, SARS-CoV-2 and middle east respiratory syndrome (MERS)-CoV highlight the threat these viruses constitute to a globalized society. The high mutation rates and versatile escape mechanisms of CoV also pose major challenges for the development of new therapies.

The aim of this thesis was to test whether a simultaneous inhibition of the ER stress and NF- κ B signaling pathways with the PERK inhibitor GSK2606414 and the IKK β inhibitor PHA-408 has a cooperative inhibitory effect on the human coronavirus 229E (HCoV-229E)-induced expression of the target genes *ATF3*, *ANKRD1*, *CHAC1*, *IL8*, *TNFAIP3*, *NFKB1A*, *EIF2AK3*, *FICD* and *FUT1* as well as on the virus replication. Results of RT-qPCR analyses showed that the combination of inhibitors in the human liver carcinoma cell line HuH7 resulted in a stronger suppression of gene expression and viral replication than the individual treatments.

Furthermore, a protocol for the infection and inhibitor treatment of the human lung carcinoma cell line A549 was established. Using immuno-RNA-fluorescence-in situ-hybridization (immuno-RNA-FISH), a significant induction of the target genes *ATF3*, *ANKRD1*, *IL8*, *TNFAIP3*, *EIF2AK3* and *FICD* was detected at the single cell level after 96 hours of infection with HCoV-229E. Suppression of the mRNA levels of ER stress and NF- κ B target genes was also achieved in A549 cells by inhibiting PERK or IKK β .

In a third approach, human alveolar epithelial cells (HAEC) were cultured and infected with HCoV-229E. Despite low cell numbers, the successful infection of HAEC with HCoV-229E was detected by immuno-RNA-FISH.

In summary, these results show that the combined chemical inhibition of virus-induced PERK and IKK β signaling pathways represents a potential approach to suppress viral replication as well as an exaggerated ER stress reaction and proinflammatory NF- κ B-dependent cellular immune response.

1 Einleitung

1.1 Coronaviridae

1.1.1 Die Historie der Coronaviren

Bereits 1937 entdeckten Fred Beaudette und Charles Hudson das *avian infectious bronchitis virus* (IBV), welches sich im Verlauf als das erste nachgewiesene Coronavirus herausstellte (Beaudette and Hudson, 1937)(Woo et al., 2009).

Dreißig Jahre später erhielten die neuentdeckten Viren ihren Namen, als David Tyrrell und June Almeida Erkältungsviren (HCoV-229E, HCoV-B814), die dem IBV morphologisch ähnelten, im Elektronenmikroskop untersuchten. Das Aussehen der Virionen mit den in der Membran verankerten Proteinen erinnerte an den Kranz der Sonne, weshalb sie den Namen Coronavirus (CoV) erhielten (lat. corona: Krone, Kranz) (Almeida and Tyrrell, 1967)(Tyrrell et al., 1968). 1975 wurden die Coronaviridae als eigenständige Familie klassifiziert (Tyrrell et al., 1975).

Coronaviren zeichnen sich durch eine große genetische Variabilität aus, was mit einem hohen Risiko für artübergreifende Übertragungen einhergeht (Hulswit et al., 2016).

Bis 2002 galten sie vor allem als Erreger eher harmloser oberer Atemwegserkrankungen. Dies änderte sich mit dem Ausbruch der *severe acute respiratory syndrome-related-CoV* (SARS-CoV)-Pandemie 2002. Die schweren pulmonalen Erkrankungen durch SARS-CoV offenbarten, welches Gefahrenpotential von zoonotische Virusvarianten ausgeht. Seitdem hat die Forschung rund um Coronaviridae stark zugenommen (Woo et al., 2009).

1.1.2 Taxonomie

Die Klassifikation von Viren erfolgte früher anhand der morphologischen Eigenschaften, den Charakteristiken des Genoms, der Größe der Virionen und dem Ort der Replikation (Modrow et al., 2021a). Seit Einführung der Genomsequenzierungen werden Viren nach der Organisation ihrer Genome und mit Hilfe spezifischer Aminosäuresequenzen eingeordnet (de Haan and Rottier, 2005)(de Vries et al., 1997). Die Einteilung wird von dem International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) veröffentlicht und regelmäßig aktualisiert (Lefkowitz et al., 2018).

Mit den Abnido-, Mesnido-, Monido-, Ronido- und Tornidovirineae gehört die Familie der Coronaviridae zu der Ordnung der Nidovirales. Die Coronaviridae werden wiederum in die Unterfamilien Letovirinae, Pitovirinae und Orthocoronavirinae unterteilt. Letzterer gehören die vier Gattungen Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronavirus an, denen

weitere Untergattungen zugeordnet sind. Alpha- und Betacoronaviren infizieren neben verschiedenen Säugetieren auch Menschen, wohingegen die Gamma- und Deltaviren bisher vor allem in Vögeln nachgewiesen wurden. Zu den bekanntesten Vertretern der Betacoronaviren zählen das *Middle East respiratory syndrome-related Virus* (MERS-CoV) und die *severe acute respiratory syndrome-related Viren* (SARS-CoV und SARS-CoV2) mit SARS-CoV-2 als Auslöser der weltweiten Pandemie 2019 (“Current ICTV Taxonomy Release | ICTV,” n.d.)(Helmy et al., 2020).

Ordnung	Familie	Unterfamilie	Gattung	Spezies (ausgewählte Vertreter)			
Nidovirales	Coronaviridae	Letovirinae	Alphaletovirus				
		Pitovirinae	Alphapironavirus				
		Orthocoronavirinae	Alphacoronavirus	Human coronavirus 229E	Human coronavirus NL63		
				Betacoronavirus	Human coronavirus HKU1	Murine coronavirus	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus
			Deltacoronavirus	Common moorhen coronavirus HKU21	Munia coronavirus HKU13		
				Gammacoronavirus	Goose coronavirus CB17	beluga whale coronavirus SW1	Avian coronavirus

Abb. 1: Taxonomie der Coronaviren.

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Einteilung einiger ausgewählter CoV. Modifiziert nach der von der ICTV 2021 veröffentlichten Taxonomie (“Current ICTV Taxonomy Release | ICTV,” n.d.).

1.1.3 Aufbau und Genom

Die Coronaviridae sind sphärische Viren mit einer durchschnittlichen Größe zwischen 80 und 120 nm. Sie sind von einer Phospholipiddoppelmembran umhüllt, in die bis zu vier Transmembranproteine eingelagert sind. Dazu gehören das *spike* Protein (S Protein), *membrane* Protein (M Protein), *envelope* Protein (E Protein) und bei Betacoronaviren zusätzlich eine Hämagglutininesterase (HE) (Lai and Cavanagh, 1997)(Masters, 2006)(Modrow et al., 2021b).

Diese Proteine bezeichnet man als Strukturproteine, da ihre Hauptfunktion in dem Aufbau und der Organisation der Virionenstruktur liegt. Dazu zählt auch das Nukleokapsid Protein (N Protein) im Inneren der Viren, welches für die Organisation des Genoms verantwortlich ist (siehe Kapitel 1.1.1.4). Das S Protein verleiht den Virionen das charakteristische kranzförmige Aussehen und initiiert als Rezeptorbindungsstelle die Adhäsion und Fusion der Viren mit den Wirtszellen (Collins et al., 1982)(Delmas et al.,

1992)(Lai and Cavanagh, 1997). Es handelt sich um ein stark glykosyliertes trimeres Klasse-I-Fusionsprotein (Bosch et al., 2003), welches mit bis zu 220 kilodalton das Größte der Strukturproteine ist (Hulswit et al., 2016). Als virales Antigen an der Oberfläche der Virionen stellt es ein Hauptziel der antikörpervermittelten Immunantwort dar (Hofmann et al., 2004). Im Rahmen der SARS-CoV-2 Pandemie machte man sich diese Aspekte bei der Entwicklung der Impfstoffe zunutze (Artika et al., 2020)(Tortorici et al., 2019).

Das S Protein unterliegt einer großen Variabilität und ist eine Determinante für den Tropismus der Viren und Treiber für artübergreifende Infektionen (Hulswit et al., 2016).

Das M Protein spielt eine zentrale Rolle beim Aufbau der neu replizierten Viruspartikel und ist von den Strukturproteinen das abundanteste. Es befindet sich in der äußeren Membran, im Bereich des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums (ER), sowie in dem dazwischen befindlichen *endoplasmic reticulum to golgi intermediate compartment* (ERGIC), wo unter anderem das *budding* der Virionen stattfindet (de Haan and Rottier, 2005)(Rottier, 1995)(Klumperman et al., 1994)(Krijnse-Locker et al., 1994).

Das E Protein ist das kleinste der Strukturproteine und nur ein geringer Anteil der exprimierten Proteine werden in die äußere Membran integriert. Es ist ebenso wie das M Protein überwiegend im ERGIC lokalisiert, wo es eine essenzielle Rolle bei der Membranformation und Knospung neuer Virionen innehat (Bos et al., 1996)(Lai and Cavanagh, 1997)(Vennema et al., 1996). Im Hinblick auf die Topologie des E Proteins gibt es Unterschiede innerhalb der Coronaviridae-Familie. Bei einigen der Viren (z.Bsp.: *murine hepatitis virus* (MHV), IBV, SARS-CoV, HCoV-229E) ließen sich Charakteristiken eines Viroporins mit Ionenkanal-Aktivität nachweisen (Madan et al., 2005)(Wilson et al., 2006, 2004). Welche Auswirkungen oder Funktionen diese Variabilität des E Proteins auf die Replikation und Pathogenität der Viren hat, ist nicht abschließend geklärt (Ruch and Machamer, 2012)(Schoeman and Fielding, 2019).

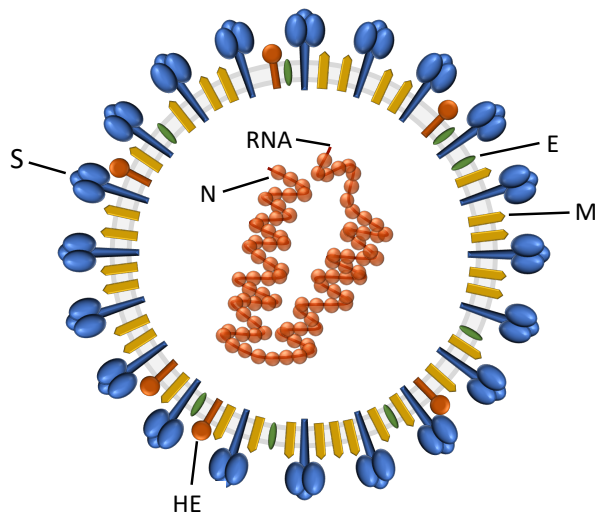


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Coronavirus.

Die Hülle besteht aus einer Phospholipiddoppelmembran, in welche die Strukturproteine eingelagert sind: das *spike* Protein (S), *membrane* Protein (M), *envelope* Protein (E) und bei einigen CoV zusätzlich die Hämagglutininesterase (HE). Im Inneren des Virions liegt die einzelsträngige RNA helikal an das Nukleokapsid Protein (N) gebunden vor.

1.1.1.4 Das Genom

Das Genom der CoV ist mit einer Länge von bis zu 32 Kilobasen (kb) das größte aller RNA-Viren und befindet sich in Form einer einzelsträngigen, plusstrangorientierten RNA an die Nukleokapsid Proteine (N) gebunden im Zytoplasma (Artika et al., 2020)(Lai and Stohlman, 1978). Durch die Interaktion mit dem N Protein nimmt die RNA eine helikale Konfiguration an (Chen et al., 2007)(Surjit and Lal, 2008).

Auf dem distalen Drittel des Genoms befinden sich die Gene der Strukturproteine. Die proximalen zwei Drittel kodieren die replikationsrelevanten Proteine. Diese sind in zwei *open reading frames* (ORF) ORF1a und ORF1b angeordnet. Durch die Translation und eine ribosomale Leseraster-Verschiebung entstehen daraus die Polyproteine Pp1a und Pp1ab, welche anschließend autoprotolytisch in insgesamt 16 *non-structural proteins* (nsp) gespalten werden (Brierley et al., 1987)(Masters, 2006)(Ziebuhr et al., 2000). Diese haben vor allem enzymatische und regulatorische Funktionen und bilden den *replicase transcription complex* (RTC) (Artika et al., 2020).

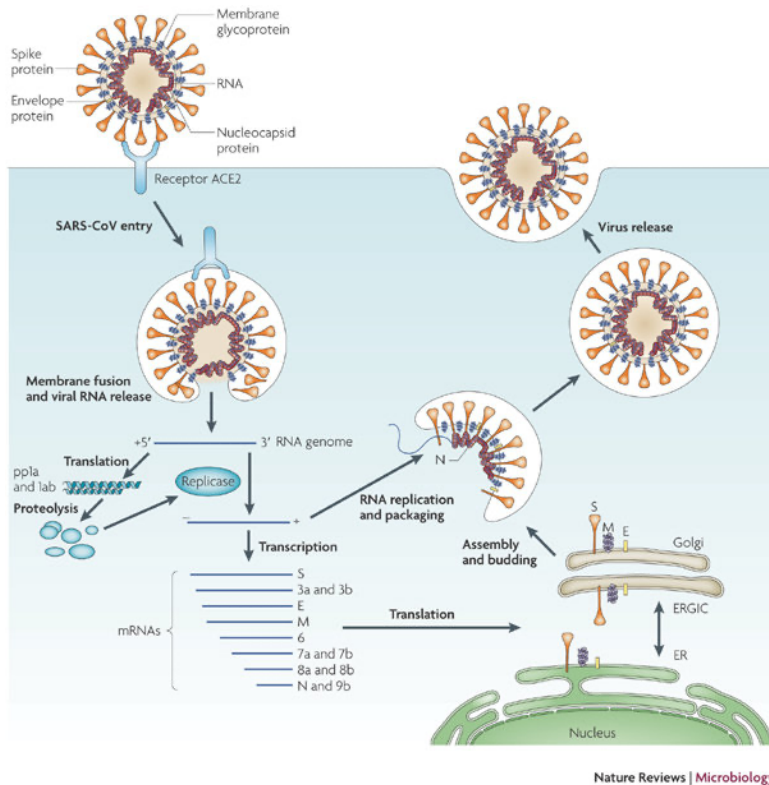


Abb. 3: Schematische Darstellung des SARS-CoV Replikationszyklus.

Das SARS-CoV bindet mit dem *spike* Protein an den ACE2-Rezeptor von Zellen des Respirationstrakts. Nach dem Eintritt in die Wirtszelle wird die virale RNA freigesetzt, translatiert und repliziert. Nach der Translation werden die viralen Proteine am Endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat und dem *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) gefaltet und mit dem RNA-Replikat zu neuen Virionen vereint (*assembly*). Anschließend erfolgt die Knospung der Viren

(*budding*). Die reifen umhüllten Virionen werden über Exozytose aus den Zellen freigesetzt. (Du et al., 2009), Lizenznummer: 5514110533792

1.1.4 Replikationszyklus

Da Viren für Ihre Replikation auf die Wirtszellorganellen angewiesen sind, ist das Ziel der Infektion das Einschleusen des viralen Genoms in die Zelle für die Synthese neuer Virionen.

Die Interaktion der Viren mit den Rezeptoren der Wirtszelloberfläche startet den viralen Replikationszyklus. Die jeweiligen Bindungsstellen der CoV unterscheiden sich je nach Spezies. SARS-CoV und SARS-CoV-2 binden an den *angiotensin-converting enzyme II*-Rezeptor (ACE2), HCoV-229E an die Aminopeptidase N und MERS-CoV an die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) (Hoffmann et al., 2020)(Yeager et al., 1992)(Li et al., 2003)(Wang et al., 2013).

Der virale Bindungspartner der Wirtszellrezeptoren ist das S Protein, welches damit wesentlich den Tropismus der Viren determiniert. Das S Protein hat die Charakteristiken eines Klasse-I-Fusionsproteins und lässt sich in zwei Einheiten unterteilen: der nach außen orientierte Abschnitt S1 mit der rezeptorbindenden Domäne und der transmembranöse Abschnitt S2, welcher die Membranfusion nach der Aktivierung durch eine proteolytische Spaltung der Untereinheiten, die Rezeptorbindung oder eine pH-Wert-Veränderung initiiert (Artika et al., 2020)(Bosch et al., 2003)(Hofmann and

Pöhlmann, 2004)(Kirchdoerfer et al., 2016)(Li et al., 2003)(Millet and Whittaker, 2015)(Taguchi, 1993).

Für umhüllte Viren sind unterschiedliche Varianten des Zelleintritts bekannt. Neben der direkten Membranfusion bei Rezeptorbindung gelangen viele der Viren per Endozytose in die Zellen. Die Membranfusion wird dann im Zytoplasma durch Konformationsänderungen der Fusionsproteine bei pH-Wert-Änderungen, proteolytischer Spaltung der Untereinheiten oder durch andere Mechanismen beim Transport der Endosomen initiiert (Harrison, 2008). Untersuchungen des MHV ergaben, dass das Virus durch Clathrin-vermittelte Endozytose und anschließende Spaltung des S Proteins durch lysosomale Proteasen ins Zytoplasma der Zellen gelangt (Burkard et al., 2014). HCoV-229E hingegen wird überwiegend über die Caveolae-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen (Nomura et al., 2004). Für SARS-CoV werden in der Literatur sowohl direkte Membranfusion, Clathrin-vermittelte Endozytose als auch Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose beschrieben (Inoue et al., 2007)(Qin et al., 2004)(Wang et al., 2008).

Die Replikation und Transkription der CoV laufen im Zytoplasma an viral-induzierten membranösen Kompartimenten ab, den sogenannten *double-membrane vesicles* (DMV) und *convoluted membranes* (CM) mit Verbindungen zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Gosert et al., 2002)(Hagemeijer et al., 2014)(Snijder et al., 2006)(Stertz et al., 2007).

Nachdem das Nukleokapsid ins Zytoplasma der Zellen freigesetzt wurde, findet zunächst die Translation der genomischen RNA (gRNA) durch Ribosomen der Wirtszelle statt. Die aus den ORF1a und ORF1b synthetisierten Polyproteine Pp1a und Pp1ab werden in die 16 *non-structural Proteine* (nsp) gespalten, welche den *replicase transcription complex* (RTC) bilden, der sich im Bereich der DMV formiert. Die im RTC enthaltene RNA-abhängige RNA-Polymerase transkribiert mit der gRNA als Matrize die komplementären negativ-orientierten Stränge. Daraus werden wiederum die Replikate der gRNA sowie die subgenomische RNA (sgRNA) synthetisiert. Durch Translation der sgRNA werden die Strukturproteine N, E, S und M sowie akzessorische Proteine gebildet (Lai and Cavanagh, 1997)(Masters, 2006).

Die S, E und M Proteine verbleiben in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, während das N Protein mit der gRNA die helikalen Nukleokapside bildet (Masters,

2006). Vom ER gelangen die membranständigen Strukturproteine zum ERGIC. Dort finden die Zusammensetzung (*assembly*) und Knospung (*budding*) der reifen Virionen statt (Klumperman et al., 1994)(Stertz et al., 2007)(Tooze et al., 1984). Abschließend werden die Virionen über *smooth-wall vesicles* zur Zellmembran transportiert und über Exozytose oder bei der Zellyse freigesetzt (Doughri et al., 1976)(Sturman and Holmes, 1983).

1.1.5 SARS-CoV-2

Ausbrüche viraler Erkrankungen begleiten bereits seit Jahrhunderten die Geschichte der Menschen und stellen eine wachsende Bedrohung für die Gesellschaft dar. Die Spanische Grippe, ausgelöst durch ein Influenza-Virus, forderte von 1918 bis 1919 zwischen 50 und 100 Millionen Opfer (Berche, 2022). Globalisierung, Erderwärmung, immer dichter besiedelte Städte und das Vordringen in fremde Lebensräume sind entscheidende Katalysatoren für die Entstehung und Verbreitung von Pandemien.

Spätestens seit 2019 ist einmal mehr deutlich geworden, welche dramatischen Folgen ein einzelnes Virus für unsere Gesellschaft haben kann. Die Anpassungsfähigkeit und hohe Mutationsraten der Viren stellen Forschende vor Herausforderungen bei der Entwicklung von Therapien und Impfstoffe.

Die *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19)- Pandemie ist bereits der dritte Ausbruch eines CoV innerhalb von zwanzig Jahren. 2002 trat erstmals in Hong-Kong eine bis dahin unbekannte schwere respiratorische Erkrankung, das *severe acute respiratory syndrom* (SARS), in Erscheinung. Als Erreger konnte ein Coronavirus identifiziert werden, welches dementsprechend den Namen SARS-CoV erhielt (Drosten et al., 2003)(Peiris et al., 2003a)(Tsang et al., 2003). SARS-CoV wurde gehäuft auf Tiermärkten in China nachgewiesen, was eine artübergreifende Transmission vermuten ließ. Später entdeckte man ein SARS-CoV ähnliches Virus in wilden Fledermäusen, von dem dieses wahrscheinlich abstammt (Lau et al., 2005). Das Virus infizierte insgesamt circa 8000 Menschen in unterschiedlichen Ländern und 774 verstarben an den Folgen. Das entspricht einer Letalitätätsrate von bis zu 9,5 % (Guarner, 2020).

2012 kam es zum nächsten Ausbruch eines Coronavirus in Saudi-Arabien. Das *Middle East respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV), welches ursprünglich von Dromedaren auf Menschen übertragen wurde, wies mit über 35 % eine noch höhere Sterblichkeitsrate auf ("Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)," n.d.)(Reusken et al., 2014)(Zumla et al., 2015).

Im Dezember 2019 kam es erneut zu einer Häufung atypischer Pneumonien in der chinesischen Großstadt Wuhan, die mit einem neuartigen Coronavirus in Verbindung gebracht wurden (Huang et al., 2020). Sequenzielle Analysen des Genoms ergaben eine enge Verwandtschaft zu SARS-CoV, weshalb es die Bezeichnung SARS-CoV-2 erhielt (Gorbalenya et al., 2020)(Zhu et al., 2020). Das Virus breitete sich sehr schnell aus und bereits am 11.03.2020 deklarierte die *World Health Organization* (WHO) die pandemische Lage (“Coronavirus Disease (COVID-19) - events as they happen,” n.d.). Trotz eines großen Anteils moderater und asymptomatischer Krankheitsverläufe (Letalitätsrate 2 - 3 %) verzeichnet die COVID-19-Pandemie neben den gravierenden ökonomischen und psychosozialen Folgen sehr hohe Fallzahlen mit über 600 Millionen Infektionen und 6,7 Millionen Toten weltweit (Stand 13.01.2023) (“Coronavirus disease (COVID-19) – World Health Organization,” n.d.). Verantwortlich gemacht wird dafür unter anderem eine hohe Ansteckungsrate ($R_0 = 2-5$) des SARS-CoV-2 (Petersen et al., 2020).

Aufgrund der schnellen Ausbreitung des Virus und mangelnder therapeutischer Möglichkeiten stellten *social distancing*, Hygieneregeln und das Tragen von Atemwegsmasken die Grundpfeiler zur Eindämmung der Pandemie dar. Dabei wurde viel Hoffnung in eine schnelle Entwicklung wirksamer Impfstoffe gesetzt. Bereits am 21.12.2020 erteilte die Europäische Kommission dem ersten COVID-19 Impfstoff, von BioNTech und Pfizer, eine bedingte Zulassung für den Europäischen Markt (“Der erste sichere und wirksame Impfstoff gegen COVID-19,” n.d.). Es folgten kurze Zeit später weitere Impfstoffzulassungen.

Trotz einer Vielzahl an effektiven Impfstoffen und der steigenden Immunität in der Bevölkerung zeigte sich, dass die hohen Mutationsraten des Virus und seine Escape-Mechanismen immer wieder zu neuen Infektionswellen durch Virusvarianten führen können (Kluge et al., 2022).

Deshalb ist neben der Anpassung und Weiterentwicklung der Impfstoffe das Erforschen weiterer Therapiemöglichkeiten unerlässlich.

1.1.5.1 COVID-19 und ARDS - Diagnostik und Therapie

COVID-19 bezeichnet die von einer SARS-CoV-2 Infektion hervorgerufene Erkrankung. Zu unterscheiden sind davon das *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) beziehungsweise das Lungenversagen oder *acute lunge injury* (ALI). Dabei handelt es

sich um schwere Komplikationen, die durch COVID-19, aber auch im Rahmen anderer Erkrankungen auftreten können.

Die Symptome einer SARS-CoV-2 Infektion können sehr unterschiedlich ausfallen. Zu den häufigsten zählen Schwäche, Kurzatmigkeit, trockener Husten und Fieber (Hu et al., 2021)(Wang et al., 2020). In der bildgebenden Diagnostik sind gehäuft Milchglasinfiltrate der Lunge als radiologisches Korrelat der Pneumonie zu finden (Guan et al., 2020).

Der Nachweis einer SARS-CoV-2 Infektion erfolgt bei klinischem Verdacht, nachgewiesenem Kontakt oder einem positiven Antigenschnelltest durch die PCR-Testung eines Nasopharynx-Abstriches (Kluge et al., 2022).

Die Leitlinie von 2022 zur COVID-19 Therapie empfiehlt neben supportiven Maßnahmen wie der Sauerstoffgabe, nicht-invasiven und invasiven Beatmungsformen auch den Einsatz von antiviralen Medikamenten bei Patienten mit erhöhtem Risiko für einen schweren Verlauf. Zu nennen sind hier Nirmatrelvir/Ritonavir und Remdesivir. Allerdings sollten diese Medikamente innerhalb der ersten fünf Tage nach Symptombeginn verabreicht werden, da sie die Virusreplikation hemmen und in der Frühphase der Infektion am wirksamsten sind. Zusätzlich kann in schweren Fällen die Gabe von Immunmodulatoren erwogen werden. Dazu zählen Dexamethason, der Januskinase-1 Antagonist Baricitinib und der Interleukin-6-Antagonist Tocilizumab. Diese Medikamente können auch im späteren Krankheitsverlauf eingesetzt werden und wirken der durch die Infektion ausgelösten überschießenden Immunantwort und Inflammation entgegen (Kluge et al., 2022). Auch Anakinra, ein Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist, ist von der Europäischen Arzneimittelagentur zur Therapie von COVID-19 Patienten unter Sauerstofftherapie mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Lungenversagens zugelassen worden (Kyriazopoulou et al., 2021)(Li et al., 2023).

1.2 Die Immunreaktion des Körpers

Das Immunsystem des Körpers dient der Erkennung und Abwehr von Pathogenen, wie Bakterien oder Viren und anderen potenziell gefährdenden körperfremden Molekülen. Man kann das Immunsystem vereinfacht in die angeborene und erworbene Immunabwehr unterteilen. Dabei geht die angeborene Immunreaktion in der Regel der erworbenen voraus, wobei es viele Überschneidungen gibt und eine strenge Abgrenzung der Systeme nicht immer eindeutig erfolgen kann.

Die angeborene Immunantwort beschreibt die unmittelbare evolutionär standardisierte Reaktion auf eingedrungene Fremdorganismen durch zum Beispiel das Komplementsystem, Makrophagen, Granulozyten oder andere Zellen. Bei der erworbenen Immunantwort handelt es sich um ein komplexes System, bei dem Antigen spezifische B- und T-Lymphozyten gebildet werden, die Rezeptoren und Antikörper besitzen beziehungsweise synthetisieren, um eine gezielte und effizientere Abwehr des Pathogenes zu ermöglichen (Voll et al., 2020).

Um Prozesse wie die Migration der Immunzellen zum Ort der Infektion, die Reifung der Lymphozyten und andere Kaskaden der systemischen Immunantwort in Gang zu setzen, bedarf es einer Kommunikation zwischen den Zellen über größere Distanzen. Hier kommen lösliche Moleküle zum Einsatz: die Zytokine. Dazu gehören die Interleukin-1-Familie, die Chemokine, die Hämatopoetinsuperfamilie, Tumornekrosefaktoren, und die Interferone (Murphy and Weaver, 2018). Zytokine setzen über unterschiedliche Rezeptoren Signalkaskaden in Gang, die wiederum proinflammatorisch wirksame Gene hochregulieren, Stoffwechselfvorgänge beeinflussen und eine Aktivierung anderer Immunzellen und Produktion weiterer Zytokine bewirken können.

Bei allen Signal- und Enzymkaskaden sind inhibierende Komponenten wichtig, um eine für den Körper schädliche Überaktivierung zu verhindern. Dazu gehören auch antiinflammatorisch wirksame Zytokine wie Interleukin-10 und regulatorische T-Zellen (Voll et al., 2020). Dennoch kann es passieren, dass proinflammatorische Signale überwiegen und eine Dysbalance mit Folge einer überschießenden Immunreaktion und schwerer Inflammation entsteht. Eine solche überschießende Immunreaktion mit sehr hohen Zytokinlevel bezeichnet man auch als Zytokinsturm. Im Rahmen von SARS-CoV, MERS-CoV und auch SARS-CoV-2 Infektionen wurden solche Veränderungen bei Patienten beobachtet (Huang et al., 2020, 2005)(Mehta et al., 2020)(Zhou et al., 2014), wobei es innerhalb der Coronaviren durchaus Unterschiede bezüglich der Auswahl induzierte oder supprimierter Zytokine gibt (Chu et al., 2014)(Lau et al., 2013).

Bildgebende Diagnostik und Autopsiebefunde von SARS-CoV-Patienten offenbarten zudem, dass die Infektion nicht auf den oberen Respirationstrakt beschränkt ist, sondern in der Lunge und anderen Organen zu schweren Entzündungsreaktionen mit Gewebestrukturdestruktionen führt (Farcas et al., 2005)(Gu et al., 2005)(Nicholls et al., 2003)(Peiris et al., 2003b). Das Virus konnte darüber hinaus in vielen unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen werden, darunter alveolare Epithelzellen und Immunzellen wie

Lymphozyten und Makrophagen. Dieser Zell- und Gewebetropismus fördert die Ausbreitung des Virus über den Respirationstrakt hinaus (Gu et al., 2005)(To et al., 2004) und den Progress in ein *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) oder *acute lunge injurie* (ALI) (He et al., 2006).

Die vielseitigen Mechanismen, über die das Virus die Immunantwort beeinflusst, sind noch nicht vollständig aufgedeckt. Mit den Immunmodulatoren gibt es bereits Therapieansätze, um die überschießende Immunreaktion zu hemmen und damit schwere Verläufe abzuwenden (Kluge et al., 2022).

1.2.1 Proinflammatorische Signalwege

Die klinischen Befunde deuten darauf hin, dass es durch eine Coronavirus Infektion zur Induktion proinflammatorischer Signalwege in den Wirtszellen kommt. In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass es durch Infektionen mit Coronaviren wie SARS-CoV, HCoV-229E, IBV und MHV zu einer verstärkten Expression proapoptotischer und proinflammatorischer Gene kommt. Viele der Gene konnten dem ER-Stress Signalweg und dem NF- κ B Signalweg zugeordnet werden (Liao et al., 2013)(M Poppe et al., 2017)(Tang et al., 2005)(Versteeg et al., 2007).

1.2.1.1 Interleukin-1 und der NF- κ B-Signalweg

Interleukin-1 (IL-1) gehört zu den wichtigsten Entzündungsmediatoren des Körpers und spielt eine große Rolle bei der Entstehung und dem Progress zahlreicher Krankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis und Arteriosklerose sowie auch Krebserkrankungen (Di Paolo and Shayakhmetov, 2016)(Gabay et al., 2010)(Lin et al., 2022)(Zhang et al., 2020). Zu der IL-1 Familie werden neben den ursprünglichen Vertretern IL-1 α und IL-1 β inzwischen elf Proteine gezählt (Dinarello, 2009)(Sims et al., 2001). Sie vermitteln lokale und systemische Entzündungsreaktionen und werden überwiegend von Zellen des angeborenen Immunsystems bei Kontakt mit Pathogenen freigesetzt (Dinarello, 2011).

Das angeborene Immunsystem hat die Aufgabe, unmittelbar auf potenziell gefährliche Fremddorgansimen zu reagieren. Um diese identifizieren zu können, gibt es die *pattern-recognition receptors* (PRR). Diese binden *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) der Mikroorganismen oder *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), die von geschädigten Zellen freigesetzt wurden, und initiieren dann die Immunantwort. Die bekanntesten PRRs sind die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) (Akira et al., 2006)(Martinon et al., 2009)(Medzhitov and Janeway, 1997).

Dabei handelt es sich um Transmembranproteine, deren zytoplasmatischer Anteil dem IL-1 Rezeptor (IL-1R) ähnelt, weshalb dieser als Toll/IL-1R (TIR)-Domäne bezeichnet wird (Narayanan and Park, 2015). Die Homologien der Rezeptoren hatte die Einführung einer übergeordneten IL-1R/Toll-like Rezeptor Superfamilie zur Folge (Bowie and O'Neill, 2000).

Die Aktivierung der TLR setzt eine Signalkaskade in Gang, welche die Translokation der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), *activator protein 1* (AP-1) und *interferon-regulatory factor* (IRF) -3 bewirken (Macleod et al., 2021). Diese regulieren die Expression von antimikrobiellen und proinflammatorisch wirksamen Peptiden wie dem IL-1 und Tumornekrosefaktor α (TNF α) (Murphy and Weaver, 2018). Demselben Mechanismus folgend führen die Zytokine zur Aktivierung und Verstärkung der Immunreaktion.

Die von IL-1 ausgelösten Signalkaskaden sind sehr komplex, weshalb sich der folgende Abschnitt auf die für diese Dissertation relevanten Aspekte der IL-1 vermittelten NF- κ B-Aktivierung fokussiert.

Im inaktiven Zustand liegt NF- κ B, bestehend aus den Untereinheiten p65 und p50, an den *inhibitor of nuclear factor kappa B* (I κ B) gebunden im Zytoplasma der Zellen vor (Baeuerle and Baltimore, 1989, 1988). I κ B verdeckt die Kernlokalisationssequenz des Transkriptionsfaktors und verhindert damit dessen Translokation in den Zellkern. Die Stimulation der Zellen durch PAMPs, DAMPs oder proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, TNF α) aktivierten Signalkaskaden, die in der Phosphorylierung, Ubiquitinierung und dem anschließendem proteasomalen Abbau von I κ B münden. In der Folge transloziert NF- κ B in den Zellkern und induziert dort als Transkriptionsfaktor die Expression der Zielgene (Chen et al., 1995)(Li et al., 1999). Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Enzyme wie die Cyclooxygenase 2, IL-6 und 8, sowie im Sinne eines positiven Feedbacks auch IL-1 und weitere pro- und antiinflammatorische Proteine (Dinarello, 1996)(Nakao et al., 2000).

Die Phosphorylierung von I κ B ist ein Schlüsselschritt, da diese wiederum die im Abbau von I κ B resultierenden Schritte initiiert. Diese erfolgt durch den *I κ B kinase complex* (IKK), bestehend aus drei Untereinheiten IKK α , IKK β und IKK γ /NEMO (DiDonato et al., 1997)(Zandi and Karin, 1999).

Die Aktivierung von IKK kann wiederum über unterschiedliche und miteinander in Wechselwirkung stehende Signalkaskaden erfolgen (Weber et al., 2010). Dazu gehören von *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) vermittelte Signalkaskaden, zum

Beispiel *stress-activated protein kinase* (SAPK) oder *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), p38 und die *extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK) (Gaestel et al., 2009)(Krause et al., 1998). Ein weiterer durch IL-1 initiiertes Mechanismus, der zu der Aktivierung des IKK führt, wird im Folgenden genauer beschrieben.

Das Binden des Liganden IL-1 an den IL-1-Rezeptor Typ 1 führt zu der Konformationsänderung des Rezeptors und Assoziation mit dem *IL-1 receptor accessory protein* (IL-1RacP) (Wesche et al., 1997). Der Komplex rekrutiert wiederum zwei weitere Signalproteine: das *myeloid differentiation primary response gene 88* (MYD88) und *interleukin-1 receptor-activated protein kinase 4* (IRAK4) (Brikos et al., 2007)(Cao et al., 1996a). Dies führt zur Autophosphorylierung der IRAK4, welche anschließend IRAK1 und 2 phosphoryliert und die Aktivierung und Ansammlung des *tumor necrosis factor-associated factor 6* (TRAF6) bewirkt (Cao et al., 1996b)(Weber et al., 2010). TRAF6 ist eine Ubiquitin-E3-Ligase, welche gemeinsam mit anderen Ubiquitin-Ligasen Zielmoleküle der Signalkaskade mit K63-gekoppelten Ubiquitinketten verknüpft (Deng et al., 2000). An diese K63-Ubiquitinketten lagert sich unter anderem die regulatorische Untereinheit IKK γ /NEMO des IKK-Komplexes an (Weber et al., 2010). Der aktivierte Kinasekomplex phosphoryliert schließlich sein Substrat I κ B. Darauf folgen K48-gekoppelte Ubiquitinierungen, die das Protein für den proteasomalen Abbau markieren (Chen et al., 1995)(Weber et al., 2010).

Parallel kommt es durch TRAF6 zur Rekrutierung von *TGF- β -activated kinase 1* (TAK1) und den TAK1 *binding proteins* (TAB) TAB1, TAB2 und TAB3. TAK1 phosphoryliert IKK β und aktiviert dadurch Signalwege, die über JNK und p38 zur Translokation von weiteren Transkriptionsfaktoren führen (Akira et al., 2006)(Wang et al., 2001).

Für die Terminierung und Regulierung des NF- κ B Signalweges sind negative Feedbackmechanismen entscheidend. Dazu gehört die Expression von TNFAIP3/A20, ein Zielgen von NF- κ B (Song et al., 1996). TNFAIP3/A20 ist in der Lage, Ubiquitinketten von Proteinen zu entfernen, was zur Terminierung der Signaltransduktion führt (Boone et al., 2004)(Shembade et al., 2010). Ebenfalls von NF- κ B induziert wird das für I κ B α kodierende Gen *NFKB1A*. Durch die Synthese von I κ B α kann NF- κ B erneut gebunden werden, woraufhin der Komplex von den Promotern dissoziiert und in das Zytoplasma zurück transportiert wird (Sun et al., 1993). Diese Mechanismen verhindern eine unkontrollierte Überaktivierung und beenden die Signaltransduktion bei fehlender Stimulation (Werner et al., 2008).

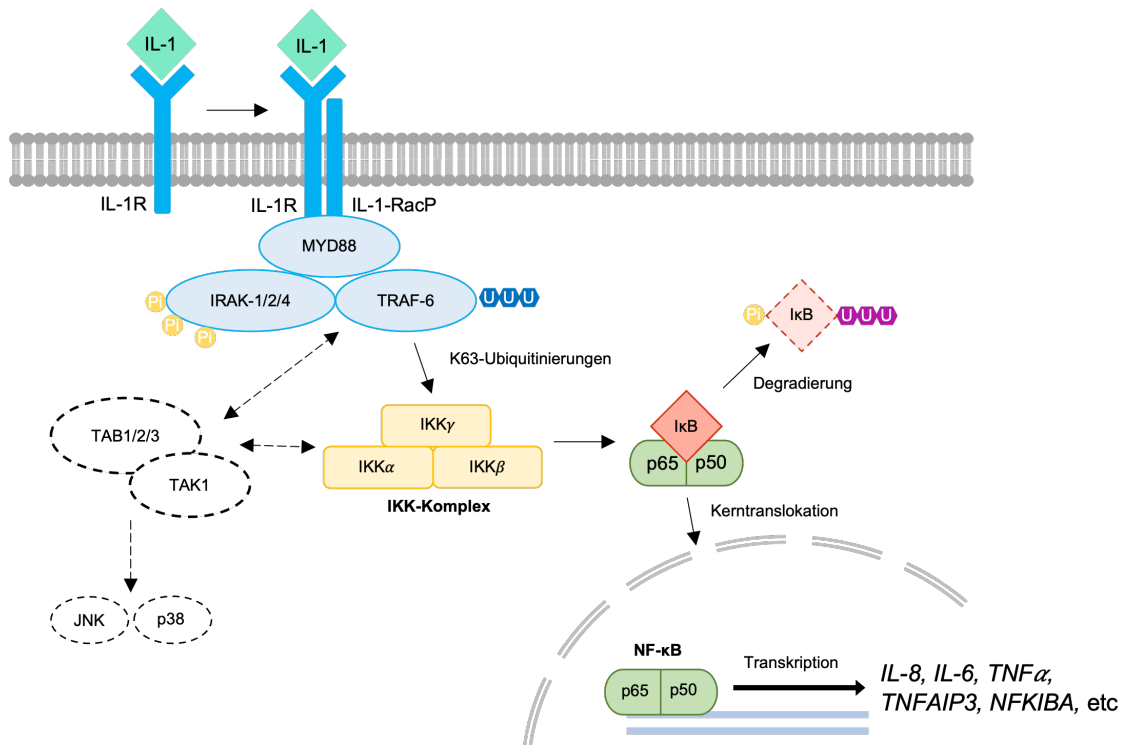


Abb. 4: NF-κB Aktivierung durch Interleukin-1.

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der IL-1 vermittelten Signalkaskade. Die Bindung von IL-1 an den IL-1-Rezeptor (IL-1R) führt zur Konformationsänderung des Rezeptors und Dimerisierung mit dem *IL-1 receptor accessory protein* (IL-1RacP). Der entstandene Komplex rekrutiert im Zytoplasma der Zelle weitere Signalmoleküle, darunter MYD88 und die Kinasen IRAK1, 2 und 4. Dadurch wird die Ubiquitin-E3-Ligase TRAF6 aktiviert. Die von TRAF6 katalysierten K63-gekoppelten Ubiquitinierungen führen zur Rekrutierung und Aktivierung mehrerer Enzyme, darunter TAK1, TAB1/2/3 und der IKK-Komplex. Der Kinasekomplex phosphoryliert anschließend das an NF-κB gebundene IκB. Auf die Phosphorylierung folgen K48-gekoppelte Ubiquitinierungen, welche IκB für den proteasomalen Abbau (Degradierung) markieren. Der Komplex dissoziiert, und die Kernlokalisationssequenz von NF-κB wird freigelegt. Daraufhin transloziert der Transkriptionsfaktor in den Zellkern und induziert die Expression der Zielgene.

Pi= Phosphatgruppe. U(lila)= K48-verknüpfte Ubiquitinketten. U(blau)= K63-verknüpfte Ubiquitinketten. Zur besseren Übersicht sind nur vereinzelt Ubiquitinierungen und Phosphorylierungen dargestellt.

1.2.1.2 *Unfolded Protein Response*

Die Proteinbiosynthese findet in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle statt. Etwa ein Drittel der synthetisierten Proteine gelangen über den sekretorischen Weg zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat (Hetz et al., 2020). Nach der Transkription und Translation erfolgen insbesondere am ER die posttranslationalen Modifikationen und Formation der sekundären und tertiären Proteinstruktur. Die Faltung der Proteinstruktur wird von Chaperon-Proteinen unterstützt (Ellis, 1987). Die meisten Chaperone gehören der Familie der *heat shock proteins* (HSP) an (Hartl, 1996)(Hebert and Molinari, 2007). Bei der Proteinfaltung entstehen auch fehlerhafte und nicht

funktionale Proteine, welche von der Zelle über die *ER-associated degradation* (ERAD) abgebaut werden (Hebert and Molinari, 2007)(Hetz et al., 2020). Die fehlerhaften Proteine werden dafür mit Ubiquitinketten für den proteasomalen Abbau markiert. Wenn eine Überlastung der ERAD droht, werden von der Zelle Kompensationsmechanismen aktiviert, welche die Transkription, Translation und den Transport regulieren, sodass weniger Proteine am ER akkumulieren. Dies erfolgt über die *Unfolded Protein Response* (UPR), auch ER-Stress Signalweg genannt (Hetz et al., 2020).

Die UPR lässt sich anhand der Rezeptormoleküle in drei Achsen unterteilen: das *inositol-requiring protein-1* (IRE-1) (Tirasophon et al., 1998), die *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase* (PERK) (Harding et al., 1999) und der *activating transcription factor-6* (ATF6) (Yoshida et al., 1998).

Die im ER verankerten Transmembranproteine werden durch die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen aktiviert und lösen über die zytoplasmatische Domäne eine Signaltransduktion aus (Kozutsumi et al., 1988). Für die Detektion spielt das Chaperon *78-kDa glucose-regulated protein* (GRP78), beziehungsweise *heavy-chain binding protein* (BiP) oder *heat shock protein A5* (HSPA5) eine zentrale Rolle (Wang et al., 2009). Im inaktiven Zustand haben die Transmembranproteine IRE-1, PERK und ATF-6 BiP auf der luminalen Seite gebunden. In seiner Funktion als *heat shock protein* bindet BiP zusätzlich an fehlgefaltete Proteine im ER-Lumen. Wenn sich diese beim ER-Stress häufen, dissoziiert BiP von den Rezeptoren, und die Signalkaskaden der UPR werden aktiviert (Bertolotti et al., 2000).

Von den ER-Stress-Sensoren wurde IRE-1 als erstes in Hefebakterien entdeckt (Ron and Walter, 2007). Nach der Dissoziation von BiP oligomerisiert der Rezeptor und es kommt zur *trans* Autophosphorylierung durch die zytoplasmatische Kinase-Domäne. Das wiederum aktiviert die Endoribonuclease Aktivität von IRE-1 (Wang et al., 2009) und vermittelt das *splicing* der HAC-1 und *X-box binding protein 1* (XBP-1) kodierenden mRNA. Nach dem *splicing* werden die Transkriptionsfaktoren HAC-1P und XBP-1 synthetisiert, welche schließlich die Expression der UPR-Zielgene induziert. *XBP-1* wird zudem durch ATF6 induziert, und der Transkriptionsfaktor bindet an das *ER stress response element* (ERSE) der DNA (Yoshida et al., 2001, 1998).

Der zweite Rezeptor ATF6 beinhaltet am N-terminalen Ende einen Transkriptionsfaktor mit *basic leucine zipper* (bZIP)-Motif (Haze et al., 1999). Nach der Aktivierung wird ATF6 am Golgi-Apparat gespalten und der anschließend freigesetzte

Transkriptionsfaktor induziert im Nukleus die Genexpression von Chaperonen wie BiP/GRP78 und anderen für die Proteinfaltung am ER wichtigen Enzymen (Wang et al., 2009)(Ye et al., 2000).

Die dritte Achse des ER-Stress Signalweges wird durch PERK eingeleitet. PERK ist eine in den Inselzellen des Pankreas entdeckte Serin/Threonin-Kinase. Nach Dissoziation von BiP/GRP78 kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoren und *trans* Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne (Bertolotti et al., 2000)(Harding et al., 1999). Das hat die Rekrutierung und Phosphorylierung der α -Untereinheit des *eukaryotic translation initiation factor 2* (eIF-2) am Serin-51 zur Folge (Prostko et al., 1992)(Shi et al., 1998). EIF-2 ist ein Initiator der Translation, der mit GTP verknüpft einen Komplex mit der Start-tRNA an den Ribosomen bildet. Die Hydrolyse von eIF-2-GTP zu eIF-2-GDP liefert die für die Initiierung des Translationsvorgangs notwendige Energie (Shi et al., 1998). Das inaktive eIF-2-GDP dissoziiert schließlich vom Translationskomplex und wird von eIF-2B (bzw. *guanine nucleotide exchange factor*) recycelt, indem es den Nukleotid-Austausch katalysiert (De Haro et al., 1996). Die Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF-2 durch PERK hat eine stärkere Affinität von eIF-2B zu eIF-2-GDP zur Folge, wodurch sich ein inaktiver Komplex bildet und keine Regeneration des Translationsinitiators stattfindet (De Haro et al., 1996). Die Proteinbiosynthese ist gehemmt und es fallen weniger Proteine am ER an.

Zur Aktivierung der UPR kommt es auch im Rahmen vieler Virusinfektionen. Die Proteinbiosynthese und der Transport zwischen den Wirtszellorganellen sind essenziell für die Synthese neuer Virionen, weshalb ein großer Anteil der Virusreplikation am ER stattfindet. Bei der Faltung von Virusproteinen sind auch Chaperone wie Calnexin, Calreticulin und das BiP/GRP78 beteiligt (Choukhi et al., 1998)(Hurtley et al., 1989)(Pieren et al., 2005). Durch die Aktivierung der UPR kommt es zu einer gesteigerten Expression von Chaperonen, welche für die virale Replikation förderlich sind.

Dem gegenüber stehen Schutzmechanismen der Zelle, die ebenfalls durch die Interaktion der Viren mit dem ER eingeleitet werden. Ein Beispiel ist die Phosphorylierung von eIF-2 α , welche neben dem Drosseln der Translation auch zur Aktivierung proapoptotischer Signalwege führen kann. Zu den Kinasen, die eIF-2 phosphorylieren, gehört neben PERK die *double-stranded RNA-dependent Protein Kinase* (PKR) (Scheuner et al., 2006). Doppelsträngige RNA (dsRNA) entsteht bei der Replikation des viralen Genoms (Shi et al., 1998).

Für viele Virusinfektionen konnten eine Aktivierung der UPR beobachtet werden. Eine Infektion mit dem Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) führt über die Aktivierung von PKR und PERK zur Phosphorylierung von eIF-2 α (Cheng et al., 2005). Bei der Untersuchung von Gewebeproben an SARS-CoV verstorbener Patienten wurden Hinweise auf die virale Induktion proapoptotischer Signalwege gefunden (Wei et al., 2007)(Zhang et al., 2003). *In vitro* konnte zudem eine SARS-CoV induzierte Aktivierung der Kinasen PKR und PERK gezeigt werden (Krähling et al., 2009).

Welche Auswirkungen oder Funktionen die Wechselwirkungen der Viren mit Proteinen der UPR genau haben, ist noch nicht abschließend geklärt.

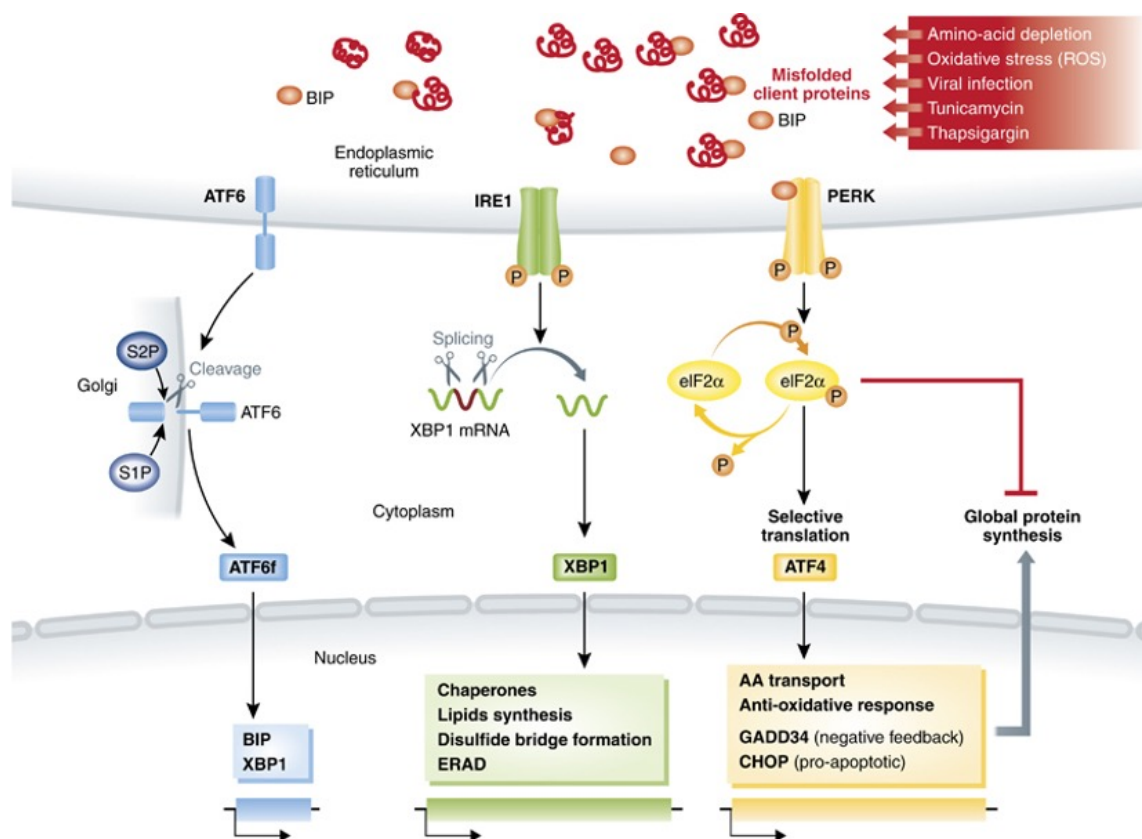


Abb. 5: Schematische Darstellung der *Unfolded Protein Response* des Endoplasmatischen Retikulums.

Die Abbildung zeigt die drei Achsen der *Unfolded Protein Response* (UPR). Der ER-Stress kann durch unterschiedlichste Faktoren ausgelöst werden. Dabei kommt es in der Konsequenz zu einer Anhäufung fehlgefalteter Proteine im Lumen des ER. Bei der Proteinfaltung assistieren sogenannte *heat shock proteins*, darunter auch das *heavy-chain binding protein* (BiP). Im inaktiven Zustand der ER-Stress-Rezeptoren (PERK, IRE1 und ATF6) haben diese BiP an der luminalen Seite gebunden. Bei Akkumulation fehlgefalteter Proteine im Lumen des ER dissoziiert BiP von den Rezeptoren, und es kommt zur Aktivierung der jeweiligen Signalkaskaden. Diese wirken dem ER-Stress auf Ebene der Transkription und Translation entgegen.

Aus: (Cláudio et al., 2013) Lizenznummer: 5552430840381

1.2.1.3 Crosstalk zwischen ER- Stress und IL-1 Signalweg

Die Reaktion einer Zelle auf einen externen oder internen Stimulus setzt sich meist aus einer Vielzahl von Signalkaskaden zusammen, die sich wiederum gegenseitig beeinflussen können. Dies dient der Amplifikation der Signale und hat außerdem regulatorische Funktionen. Die Überschneidungen können gemeinsame Enzyme, Transkriptionsfaktoren oder Modifikationen von Proteinen durch Phosphorylierungen beziehungsweise Ubiquitinierungen sein.

Auch zwischen dem ER-Stress Signalweg und der NF- κ B Signalkaskade konnten bereits mehrere Schnittstellen identifiziert werden. Die Behandlung mit chemischen Stressoren wie Thapsigargin oder Tunicamycin führt *in vitro* zu einer Aktivierung der UPR. In Versuchen mit den Stressoren wurde beobachtet, dass der ER-Stress Rezeptor IRE1 nach der Autophosphorylierung neben TRAF2 zusätzlich die Kinase IKK bindet, welche wiederum ein Schlüsselenzym der Signalkaskade des NF- κ B-Signalweges ist und den Abbau von I κ B initiiert (siehe Kapitel 1.2.1.1). Desweiteren führt die Aktivierung der PERK-Achse der UPR über die Phosphorylierung des Translationsinitiator eIF-2 α zu einer generellen Hemmung der Translation. Dadurch wird auch die Synthese von I κ B gehemmt, und es können weniger inaktive Komplexe mit NF- κ B gebildet werden. Die Abwesenheit von I κ B führt schließlich zur Kerntranslokation von NF- κ B. Diese Mechanismen führen bei Aktivierung des ER-Stress Signalweges zu einer partiellen Mitaktivierung des NF- κ B Signalweges (Schmitz et al., 2018).

1.2.2 Die Aktivierung der IKK/PERK-vermittelten Signalwege durch HCoV-229E

Viren sind für ihre eigene Replikation auf die Organellen der Zelle angewiesen (Modrow et al., 2021c). Diese Abhängigkeit führt zwangsläufig zu Wechselwirkungen zwischen der Wirtszelle und den viralen Proteinen. Es gibt zahlreiche Mechanismen, über die Viren die Wirtszellreaktion und Immunabwehr beeinflussen und steuern können, die bis heute nicht vollständig verstanden sind. Anhand von SARS-CoV, MERS-CoV und SARS-CoV-2 zeigt sich, welchen Einfluss dies auf die Pathogenität der Viren hat (siehe Kapitel 1.1.5). Deshalb ist das Charakterisieren der Interaktionen zwischen den Viren und der Wirtszelle essenziell und bildet das Fundament für die Entwicklung neuer Therapien.

In unserer Arbeitsgruppe wurden zu dem Zweck Untersuchungen der Wirtszellantwort von HuH7 und A549 Zellen auf die HCoV-229E-Infektion durchgeführt. Es zeigte sich eine Vielzahl von virusinduzierten Veränderungen auf Ebene des Transkriptom der Wirtszellen (M Poppe et al., 2017). In *microarray* und anderen Genexpressions-Analysen

konnten die dysregulierten Gene identifiziert und Signalwegen zugeordnet werden. Die Analyse der Daten aus HuH7 und A549 Zellen ergaben, dass eine Mehrzahl der virusinduzierten Gene den Signalwegen *response to endoplasmic reticulum stress* (GO:0034976) und *regulation of response to cytokine stimulus* (GO:0060759) angehören (M Poppe et al., 2017).

Daraufhin stellte sich die Frage, welche Relevanz diese Dysregulationen für die Virusreplikation haben und ob sich daraus ein therapeutischer Nutzen ergibt.

Die ersten Versuche mit dem PERK-Inhibitor GSK2606414 hatten eine verminderte Expression der virusinduzierten Gene ergeben. Im TCID₅₀-Assays konnten ergänzend verringerte Virustiter der Überstände in den mit 10 µM GSK2606414 behandelten und infizierten Proben gemessen werden. Außerdem hatte sich eine Reduktion der posttranslationalen Phosphorylierung des viralen N Proteins durch die Inhibition von PERK gezeigt (Poppe, 2017).

Zusammenfassend lässt sich daraus ableiten, dass die Aktivierung der PERK-Achse der UPR durch Coronaviren für die virale Replikation und die posttranslationalen Modifikationen der Virusproteine von Nutzen ist.

Die zusätzlich beobachtete Dysregulation der NF-κB-Zielgene passt gut zu den beschriebenen klinischen Befunden schwerer CoV-Infektionen. Bei genauerer Betrachtung der Mechanismen, über die HCoV-229E zu einer Induktion der NF-κB regulierten Gene führt, fielen einige Abweichungen von der bekannten Signalkaskade auf (Poppe, 2017). Typischerweise kommt es durch die IL-1-Stimulation über den kanonischen Signalweg zur Phosphorylierung von IκBα durch den IKK-Komplex. Darauf folgen Ubiquitinierungen und der proteasomale Abbau von IκBα. Das ermöglicht schließlich die Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors NF-κB und Induktion der Zielgene (siehe Kapitel 1.2.1.1)(Chen et al., 1995)(Li et al., 1999).

Bei der HCoV-229E-Infektion wurden Degradierungen der Untereinheiten des IKK-Komplexes IKKβ und IKKγ/NEMO und ein partieller Abbau von IκBα beobachtet. Die Phosphorylierungen an IκBα, die bei der durch IL-1 vermittelten Aktivierung auftreten, konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. In der IF wurde dennoch eine partielle Kerntranslokation von p65, einer Untereinheit von NF-κB, gesehen. Zusammenfassend lässt sich daraus ableiten, dass HCoV-229E über untypische Mechanismen und auf unterschiedlichen Ebenen zu einer Aktivierung der NF-κB-Signalkaskade führt (M Poppe et al., 2017).

In zusätzlich durchgeführten Versuchen mit dem IKK β -Inhibitor PHA-408 konnten ähnliche Effekte wie durch die PERK-Inhibition beobachtet werden. 5 μ M PHA-408 führten zu niedrigeren Virustitern im TCID₅₀-Assay und einer Suppression der induzierten Genexpression (M Poppe et al., 2017).

1.2.2.1 Funktionen von ausgewählten CoV-induzierten Zielgenen

Für die Untersuchung der Inhibitor-Wirkung auf die Genexpression in den infizierten Zellen wurde ein Set aus neun Zielgenen der *Unfolded Protein Response* und des NF- κ B Signalweges ausgewählt.

ATF3 kodiert für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor, der an die Promoter Sequenz *cAMP response element* (CRE) bindet und eine Hemmung der Transkriptionsaktivität in der Zelle bewirkt (Chen et al., 1996). Die Expression von ATF3 wird vor allem im Rahmen von Stressreaktionen der Zellen induziert, mit zum Teil unterschiedlichen Funktionen. Bei der Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade durch beispielsweise Zytokine bremst ATF3 die Überaktivierung und hat eine negativ regulierende Funktion auf die Transkription (Kwon et al., 2015). Beim ER-Stress-Signalweg, ausgelöst durch die Akkumulation fehlgefalteter Proteine am ER, ist die Reduktion neu synthetisierter Proteine hingegen das primäre Ziel (Jiang et al., 2004)(siehe Kapitel 1.2.1.2).

Die Transkription des proinflammatorischen Zytokins IL-8 wird genauso wie die von IL-1 auch von NF- κ B induziert. IL-8 vermittelt als Chemokin unter anderem die Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Immunreaktion (Hammond et al., 1995).

TNFAIP3 und *NFKBIA* sind Gene, die im Sinne einer negativen Rückkopplung durch NF- κ B induziert werden (siehe Kapitel 1.2.1.1). TNFAIP3 beziehungsweise A20 ist in der Lage, Ubiquitinierungen anderer Schlüsselenzymen der Signalkaskade abzubauen und dadurch die Signaltransduktion zu unterbrechen (Boone et al., 2004). Eine verringerte Expression und unterschiedliche Polymorphismen von TNFAIP3/A20 sind mit vielen chronischen und autoinflammatorischen Erkrankungen, zum Beispiel dem systemischen Lupus Erythematoses (Musone et al., 2008), der rheumatoiden Arthritis (Shimane et al., 2010), Multiplen Sklerose (Perga et al., 2017), Diabetes mellitus Typ 1 (Fukaya et al., 2016) sowie der Koronaren Herzerkrankung bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (Boonyasrisawat et al., 2007) assoziiert (Ma and Malynn, 2012).

NFKBIA kodiert für das Protein I κ B α , welches einen inaktiven Komplex mit NF- κ B bildet und dessen Kernlokalisationssequenz verdeckt. Bei Aktivierung der Signalkaskade

wird I κ B α degradiert, und NF- κ B transloziert in den Zellkern (siehe Kapitel 1.2.1.1) (Chen et al., 1995)(Li et al., 1999). Für die Terminierung der Signaltransduktion wird neu synthetisiertes I κ B α benötigt. Beide Proteine sind für eine ausbalancierte und kontrollierte Aktivität der NF- κ B Signalkaskade wichtig.

ANKRD1 beziehungsweise das *Ankyrin repeat domain-containing protein 1* gehört zu der Familie der *muscle ankyrin repeat proteins* und ist ein durch Stress induzierter Transkriptionsfaktor. In mit Hepatitis-C Viren infizierten Zellen konnte eine Hochregulation der Expression nachgewiesen werden (Than et al., 2016).

CHAC1 kodiert die Glutathion-spezifische Gamma-Glutamylcyclotransferase 1, ein Enzym, welches Glutathion spaltet (Kaur et al., 2017). Glutathion ist an zahlreichen Stoffwechselfvorgängen beteiligt, insbesondere als Puffer bei Redox-Reaktionen. Ein gestörter Glutathion-Kreislauf führt zu oxidativem Stress der Zelle bis hin zur Apoptose. Da jedoch sowohl zu kleine als auch zu große Mengen Glutathion der Zelle schaden können, ist das Aufrechterhalten der Homöostase aus Auf- und Abbau des Glutathions wichtig (Baudouin-Cornu et al., 2012). Als glutathionabbauendes Enzym wird die Expression von *CHAC1* durch ER-Stress induziert. Bei einer Überexpression wiederum hat CHAC1 proapoptisches Potential (Mungrue et al., 2009).

EIF2AK3 kodiert die *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3*, also PERK. Diese steht am Anfang einer der drei Signalkaskaden der UPR und phosphoryliert die α -Untereinheit des Translationsinitiators eIF-2, welches zur Hemmung der Translation und damit verringerten Proteinbiosynthese führt (Shi et al., 1998). Die Expressionsinduktion von *EIF2AK3* durch ER-Stress folgt damit dem Prinzip einer positiven Rückkopplung.

FICD ist eine Adenyltransferase, die ihre Substrate sowohl adenylieren als auch de-adenylieren kann (Worby et al., 2009). Im ungestressten Zustand wird das Chaperon HSP5A von FICD adenyliert und dadurch deaktiviert. Bei ER-Stress hingegen wirkt FICD als Phosphodiesterase und reaktiviert HSP5A, welches dann die Proteinfaltung am ER unterstützt (Sanyal et al., 2015).

Die Fucosyltransferase 1 beziehungsweise Galactoside 2- α -L-fucosyltransferase 1 (FUT1) katalysiert eine spezielle Form von Glykosylierungen: Fucosylierungen. Diese Modifikationen beeinflussen Proteinfunktionen und darüber viele Prozesse wie die Selektin-abhängigen Leukozytenadhäsion (Becker and Lowe, 2003). Außerdem werden Fucosylierungen mit der Entstehung beziehungsweise dem Progress von vielen chronischen Erkrankungen und Karzinomen in Verbindung gebracht (Li et al., 2018). Die

Expression von *FUT1* wird im Rahmen der UPR direkt durch das Binden von ATF4 an den *FUT1*-Promoter induziert (Loong et al., 2021).

1.3 Zielsetzung

In Transkriptomanalysen in mit HCoV-229E infizierten A549 und HuH7 Zellen wurden Gene identifiziert, deren Expression durch das Virus induziert wurde. Mit Hilfe von Anreicherungsanalysen konnten diese Gene Signalwegen zugeordnet werden (M Poppe et al., 2017). Dabei zeigte sich, dass es die Virusinfektion unter anderem zu einer Hochregulation von Zielgenen des ER-Stress und NF- κ B Signalweges führt. Diese Ergebnisse sind konsistent mit anderen Veröffentlichungen, die postulieren, dass Coronaviren in den Wirtszellen proinflammatorische Signalwege induzieren (Chu et al., 2014)(Shuid et al., 2015).

In Versuchen unserer Arbeitsgruppe (AG) mit dem PERK-Inhibitor GSK2606414 und dem *I κ B kinase complex* (IKK)-Inhibitor PHA-408 konnte eine Suppression der virusinduzierten Genexpression und der Virusreplikation durch die Inhibition der Schlüsselenzyme erreicht werden (M Poppe et al., 2017)(Poppe, 2017).

Aus diesen Ergebnissen und den Erkenntnissen zum *crossstalk* zwischen dem ER-Stress und dem NF- κ B Signalweg (Schmitz et al., 2018) wurde die Arbeitshypothese abgeleitet, dass eine kombinierte Inhibition der PERK- und IKK- vermittelten Signalwege einen, im Vergleich zur Einzelbehandlung, potenzierten Hemmeffekt auf die induzierte Genexpression und Virusreplikation haben könnte. Pharmakologisch wäre eine solche Kombinationstherapie zudem von Vorteil, wenn bei besserer oder gleichwertiger Wirksamkeit die Einzeldosen der Inhibitoren reduziert werden können, um das Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu senken.

Ein weiteres Ziel war die Etablierung einer Primärzell-Kultur und der Infektion dieser Zellen mit HCoV-229E. Im Rahmen einer Kooperation mit der AG Herold wurden hierfür humane alveolare Epithelzellen (HAEC) verwendet.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Einwegmaterialien und Plastikwaren wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner, IBIDI, Neolab, Nerbe plus, Nunc, Roth, Sarstedt bezogen.

2.2 Geräte

2.2.1 Zellkultur

6220 BBD CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific
Brutschrank CO ₂ Autozero	Heraeus
Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472	Thermo Scientific
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Scientific

2.2.2 Zentrifugen

Optima TM TLX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Microfuge 22R Centrifuge, Kühlzentrifuge	Beckman Coulter
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5427 R	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
MinuteniG, Tischzentrifuge	IKA

2.2.3 Mikroskope

OLYMPUS, CKX41	Olympus
Diavert	Leitz
DMi8	Leica
DMIRB	Leica

2.2.4 RNA Messung

Nano Drop ND-1000 Peqlab	Thermo Scientific
--------------------------	-------------------

2.2.5 real-time qPCR

7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific)
Thermocycler T Professional	Biometra

2.2.6 Software

Duolink®ImageTool	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
LasX	Leica
SigmaPlot 11.0	Systat Software Inc.
Icy 2.1.2.0	France-BioImaging und Institut Pasteur, (http://icy.bioimageanalysis.com)
GraphPad Prism 9.1.0	GraphPad Software, LLC (www.graphpad.com)

2.2.7 Andere

Vortexer	Heidolph
Schüttler Unimax 2010	Heidolph
Electronic Balance MP-3000, Waage	Chyo
Techne Hybridiser HB-1D, Hybridisierungssofen	thermo-DUX

2.3 Zelllinien

- A549: Humane epitheliale Zelllinie, abstammend von einem Adenokarzinom der Lunge. (ATCC, CCL185)
- HuH7: Humane epitheliale Zelllinie, abstammend von einem Hepatozellulären Karzinom (AG Ziebuhr, Universität Gießen)
- HAEC: Humane alveolare Epithelzellen aus Lungengewebe isoliert und aufgereinigt von der AG Herold (Universität Gießen). (Aktenzeichen 58/15, DZL-Gießen Biobank)

2.4 Medien und Zusätze

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech (#P04-03550)
2x Modified Eagle Medium (MEM)	Gibco (#21935-028)
Streptomycin/Penicillin	PAN Biotech (#P06-07100)
Filtrated Bovine Serum (FBS) Good Forte	PAN Biotech (#P40-47500)
L-Glutamin	PAN Biotech (#P04-80100)

- Zusammensetzung des Vollmediums für die Zellreihen HuH7, A549:

0,5 L DMEM

100 µg/mL Streptomycin

100 U/mL Penicillin

2 mM L-Glutamin

10 % (v/v) FBS

- Zusammensetzung Einfriermedium:

Vollmedium

80 % (v/v) FBS

20 % (v/v) DMSO

- Zusammensetzung des Mediums für Plaque Assays:

0,5 L MEM

100 µg/mL Streptomycin

100 U/mL Penicillin

2 mM L-Glutamin

10 % (v/v) FBS

1,25 % Avicel (Mikrokristalline Zellulose + Natriumcarboxycellulose) (FMC Biopolymer, #RC591)

(Stock: 2,5 %)

- Zusammensetzung des Mediums für die HAEC (von der AG Herold hergestellt):

0,5 L F12 Nutrient Medium

10 % (v/v) FBS

100 µg/mL Streptomycin

100 U/mL Penicillin

2 mM L-Glutamin

Amphotericin B

2.5 Puffer

2.5.1 Waschpuffer

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAN Biotech (#P04-36500)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	PAN Biotech (#P04-32505)

2.6 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roth, Roche, Serva und Sigma Aldrich bezogen.

2.7 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Enzyme

4 % Paraformaldehydlösung in DPBS	Santa Cruz (#sc-281692)
dNTP Mix	ThermoFisher Scientific (#R0192)
Fast SYBR™ Green Master Mix	Applied Biosystems (#4385612)
Hoechst 33342	ThermoFisher Scientific (#H3570)
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel (#740955.250)

Normal Donkey Serum	Jackson ImmunoResearch (#017-000-121)
Random Hexamer Primer	ThermoFisher Scientific (#SO142)
RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/μl)	ThermoFisher Scientific (# EP0441)
Saponin	Sigma-Aldrich (#S4521-10G)
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X)	Applied Biosystems (#4352042)
Trypsin/EDTA	PAN Biotech (#P10-023100)
ViewRNA ISH Cell Assay Kit	ThermoFisher Scientific (#QVC0001)

Die aufgeführten Kits wurden gemäß der Herstellerempfehlungen verwendet.

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper

N Protein	Spezies: Maus	Igenase Hybridoma (Überstand)	1:100
anti-NFκB, p65 (C-20)	Spezies: Kaninchen	Santa Cruz, # 372	1:200
nsp8	Spezies: Kaninchen	AG Ziebuhr	1:100

2.8.2 Sekundärantikörper

Cy3 (IgG)	Spezies: Maus	Merck Millipore (#AP192C)	1:100
Cy3 (IgG)	Spezies: Kaninchen	Merck Millipore (#AP182C)	1:100
Cy5 (IgG)	Spezies: Maus	Abcam (#ab6563)	1:2000
Dylight488 (IgG)	Spezies: Kaninchen	ImmunoReagent (#DkxRb-003D488NHSX)	1:100

Dylight488 (IgG)	Spezies: Maus	ImmunoReagent (#DkxMu- 003D488NHSX)	1:100
------------------	---------------	---	-------

2.9 Inhibitoren

GSK2606414	PERK-Inhibitor	Axon Medchem (#2233)
PHA-408	IKK β -Inhibitor	Axon Medchem (#1651)

2.10 Oligonukleotide

2.10.1 PCR

2.10.1.1 TaqMan Sonden

<i>ATF3</i>	ThermoFisher Scientific (#Hs00231069_m1)
<i>DNAJB9</i>	ThermoFisher Scientific (#Hs01573477_g1)
<i>GUSB</i>	ThermoFisher Scientific (#Hs99999908_m1)
<i>IL8</i>	ThermoFisher Scientific (#Hs00174103_m1)
<i>NFKBIA</i>	ThermoFisher Scientific (#Hs00153283_m1)
<i>TNFAIP3</i>	ThermoFisher Scientific (#Hs00234713_m1)

2.10.1.2 SYBR Green Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics hergestellt.

Bezeichnung	Primer sense (5'-3')	Primer antisense (5'-3')
<i>ANKRD1</i>	acgcaaagacagagaagga	ttctgccagtgtagcaccag
<i>ATF3</i>	gctgcaaagtgccgaaacaa	atacacgtgggccgatgaag
<i>FUT1</i>	ctaagggtgcaagggggaag	gcattttctctgtccaaggc
<i>CHAC1</i>	tggatttctgggtacggctc	cagggttctgctccccttg
<i>CTH</i>	ctcactgtccaccacgttca	ccttgttgtacagtactagecc
<i>FICD</i>	cgatcctgctctctcagc	ccgagaccatttcggttca

<i>EIF2AK3</i>	agagattgagactgcgtggc	tcccaaatacctctggttgct
<i>ERO1LB</i>	gctgaaccagagcgttaca	tttccatcatcttcgctcg
<i>NSP8</i> (virale RNA)	gctggtgcaaatggtcctcac	gatgcacattcttaccatcattatcc
<i>Spike Protein</i> (virale RNA)	tttcaggtgatgctcacatacc	acaaactcacgaactgtcttagg

2.10.2 RNA-*in situ*-Hybridisierung

<i>ATF3</i>	Affymetrix (#VA1-13532)
<i>ANKRD1</i>	Affymetrix (#VA4-3084804)
<i>CHAC1</i>	Affymetrix (#VA6-3180259)
<i>CTH</i>	Affymetrix (#VA1-3000328)
<i>FICD</i>	Affymetrix (#VA6-3175983)
<i>EIF2AK3</i>	Affymetrix (#VA1-3000647)
<i>ERO1LB</i>	Affymetrix (#VA6-3179204)
<i>FUT1</i>	Affymetrix (#VA1-19123)
<i>IL8</i>	Affymetrix (#VA6-13192)
<i>NFKB1A</i>	Affymetrix (#VA6-17971)
<i>TNFAIP3 (A20)</i>	Affymetrix (#VA1-20723)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zelllinien werden in einem Stickstoff-Tank in geeigneten Kryogefäßen gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße im Wasserbad kurz bei 37 °C erwärmt. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in Zellkulturgefäße mit Vollmedium gegeben und bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Bis zur Verwendung der Zellen wurden sie nach dem Auftauen mindestens zwei bis dreimal passagiert, um ein stabiles Wachstum zu gewährleisten.

Zum Einfrieren der Zellen wurden sie zunächst von der Zellkulturschale abgelöst (siehe 3.1.2) und für 5 min bei 900 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit Einfriermedium (siehe Kapitel 2.4) resuspendiert und anschließend in 1 mL pro Kryogefäß aliquotiert. Diese wurden dann zuerst bei -80 °C im Nalgene Cryo Freezing Container eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt, wo die Zellen dauerhaft gelagert werden.

3.1.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die Zelllinien A549 und HuH7 wurden in Vollmedium kultiviert. Dieses Medium wurde dem Kapitel 2.4 entsprechend angesetzt. Das Medium der HAEC wurde von der AG Herold hergestellt (siehe Kapitel 2.4). Die Zellen wurden in einem Brutschrank in Zellkulturschalen oder Flaschen bei 37 °C, 96 % Luftfeuchtigkeit und 6 % CO₂-Gehalt inkubiert. Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden regelmäßig im Lichtmikroskop kontrolliert und auf Kontaminationen kontrolliert.

Nach dem Erreichen der gewünschten Dichte wurden die Zellen passagiert.

Alle der verwendeten Medien und Zusätze wurden auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Zum Mobilisieren der Zellen in den Zellkulturschalen wurden sie zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA zum Lösen der interzellulären Verbindungen und Zell-Matrix-Kontakte benetzt (2 mL bei einer 145er Zellkulturschale) und 5 min im Brutschrank inkubiert. Die gelösten Zellen wurden mit Vollmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturschalen verteilt. Die Anzahl der ausgesäten Zellen pro Schale variierte je nach der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und dem gewünschten Zeitraum bis zur nächsten Passagierung sowie des geplanten

Versuchsansatzes. Das Auszählen der Zellen für die Aussaat erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer.

Für die Versuche wurden die Zellen wie folgt ausgesät:

Zelllinie	Zellzahl pro well/Kanal	Kulturgefäß	Versuche
HuH7	3,5 x 10 ⁵ Zellen	6-well-Platte	<i>real-time</i> qPCR
HuH7	15.000 Zellen	<i>μ-Slide</i>	Indirekte Immunfluoreszenz, Immuno-RNA-Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierungen
A549	3,5 x 10 ⁵ Zellen	6-well-Platte	<i>real-time</i> qPCR
A549	15-24.000 Zellen	<i>μ-Slide</i>	Indirekte Immunfluoreszenz, Immuno-RNA-Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierungen
HAEC	5 x 10 ⁵ - 1,7 x 10 ⁶ Zellen	6-well-Platte	<i>real-time</i> qPCR
HAEC	15-30.000 Zellen	<i>μ-Slide</i>	Indirekte Immunfluoreszenz, Immuno-RNA-Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierungen

Die ausgesäten Zellzahlen der HAEC haben variiert, da unterschiedliche Mengen aus den Präparationen hervorgingen und die Protokolle dementsprechend angepasst werden mussten.

Bei den A549 wurden die Zellzahlen aufgrund der langen Infektionszeiten dem Wachstumsverhalten entsprechend angepasst.

3.1.2.1 Humane Alveolare Epithelzellen

Die humanen alveolaren Epithelzellen (HAEC) wurden aus einer Kooperation mit der AG Herold bezogen (Aktenzeichen 58/15, DZL-Gießen Biobank). Die AG Herold erhielt das Lungengewebe von Patienten aus dem Universitätsklinikum Gießen, sowie der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim. Nähere Informationen zu den Patienten sind aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht bekannt. Die Resektate entstammten nach dem Ermessen der Präparateure aus gesundem Lungengewebe.

Das Lungenparenchym wurde anschließend von den Mitarbeitern der AG Herold mechanisch zerkleinert und mit Hilfe enzymatischer Puffer zum Herauslösen der Zellen bearbeitet.

Nach der Reinigung wurde eine Negativselektion mit Antikörpern gegen die Oberflächenmerkmale CD 45 und CD 31 durchgeführt, um Endothelzellen und

Leukozyten auszusortieren. Ein anschließender Adhärenz-Test diente der Separation der Fibroblasten.

Mit Hilfe der *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Analyse und Antikörpern gegen das Oberflächenantigen CD 326 wurde der Anteil der HAEC in der Zellsuspension, angegeben als Reinheit in Prozent, bestimmt. Bei allen durchgeführten Versuchen hatten die Präparationen eine Reinheit von mindestens 80 %.

3.1.3 Behandlung mit den Inhibitoren

In dieser Arbeit wurden die Auswirkung von zwei Inhibitoren auf mit HCoV-229E infizierte Zellen untersucht. GSK2606414 und PHA-408 sind in DMSO gelöst, daher wurden bei allen Versuchen mit einer Inhibitorbehandlung DMSO-Kontrollen integriert, um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Resultate ausschließen zu können. GSK2606414 ist ein kommerziell erhältlicher ATP kompetitiver reversibler Inhibitor der Proteinkinase PERK (protein kinase RNA-activated (PRKR)-like endoplasmic reticulum kinase), einem Rezeptor der UPR (siehe Kapitel 1.2.1.2), welcher von der Firma Sigma Aldrich bezogen wurde (Axtén et al., 2012)(“PERK-Inhibitor I, GSK2606414, CAS-Nr. 1337531-89-1, Calbiochem GSK2606414 is a cell-permeable, highly potent inhibitor of EIF2AK3/PERK (IC₅₀ = 0.4 nM; [ATP] = 5 μM). Targets PERK in its inactive DFG conformation at the ATP-binding region. | Sigma-Aldrich,” n.d.). PHA-408 ist ebenfalls ein ATP kompetitiver Inhibitor der IκB Kinase 2 (IKKβ) des IKK-Komplexes, ein Schlüsselenzym des NF-κB Signalweges (siehe Kapitel 1.2.1.1)(Mbalaviele et al., 2009)(“PHA-408 ≥98% (HPLC) | 503555-55-3,” n.d.).

Die Behandlung der Zellen erfolgte eine halbe Stunde vor der Infektion. Aufgrund der standardmäßig bei 33 °C durchgeführten Infektion der Zellen mit dem HCoV-229E wurden auch die Inhibitorbehandlungen bei dieser Temperatur durchgeführt und die Zellen zunächst zur Adaptation bei dieser Temperatur vorinkubiert.

Für die Inhibitorbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen wurden Vorverdünnungen mit Vollmedium angesetzt und dann die entsprechenden Volumina der Inhibitorverdünnung in die *wells* pipettiert.

Verwendete Inhibitorkonzentrationen:

GSK2606414 (Stock: 10 mM): 1 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM, 10 μM

PHA-408 (Stock: 100 μM): 1 μM, 3 μM, 5 μM

3.1.4 Infektion, Inkubation und Ernte der Zellen

Das verwendete humane Coronavirus 229E (HCoV-229E, *gene bank accession* no. AF304460) wurden von der AG Kracht propagiert (siehe 3.1.4.2), nachdem es der AG Kracht von Prof. Dr. John Ziebuhr zur Verfügung gestellt wurde (AG Ziebuhr, Universität Gießen). Die Virusstocks wurden bei -80 °C gelagert. Die Inkubation der infizierten Zellen erfolgte bei 33 °C. Vor der Infektion wurden die Zellen für eine Stunde bei 33 °C vorinkubiert.

Die Infektion erfolgte anhand der *multiplicity of infection* (MOI). Die MOI beschreibt die Anzahl viraler Partikel pro Zelle. Eine MOI von 1 bedeutet, dass auf eine Zelle ein Viruspartikel kommt.

Die MOI wurde anhand des TCID₅₀ des jeweiligen Virusstocks wie folgt berechnet:

$$\text{TCID}_{50} \times 0,7 = \text{Virionen/mL (MOI 1)}$$

Die Zellzahl pro *well* oder μ -Slide- Kanal wurde durch die Virionen pro Milliliter dividiert und das errechnete Volumen des Virusstocks dem Ansatz hinzugefügt.

Die Infektionszeiten der Zelllinien betragen:

- HuH7 24 h
- A549 96 h
- HAEC 96 h

Die Infektionszeit der HuH7 Zellen entsprechen den in der AG bereits etablierten Protokollen (M Poppe et al., 2017). Für die anderen Zelllinien wurden die Zeiten mit Infektionskinetiken ermittelt (siehe Kapitel 4.2.1).

Aufgrund der deutlich längeren Inkubationszeiten wurde bei den HAEC und A549 zusätzlich alle zwei Tage p.I. ein Mediumwechsel integriert.

Die Ernte der Zellen erfolgte auf Eis, um eine Destabilisierung durch RNasen zu verhindern. Zuerst wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen dem Protokoll des NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey-Nagel) entsprechend mit einem beta-Mercaptoethanol-Puffer lysiert und das Zelllysate bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.1.4.1 Virus-Propagation

Für die Virus-Propagation wurden $2,8 \times 10^7$ HuH7 Zellen pro Zellkulturschalen (145 cm^2) ausgesät und einen Tag in Kultur gehalten. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach der Vorinkubation bei $33 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einem HCoV-229E Virusstock infiziert. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank bei $33 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde frisches Vollmedium hinzugefügt und die Schalen für zwei weitere Tage bei $33 \text{ }^\circ\text{C}$ in Kultur gehalten.

Nach zwei Tagen wurde der Überstand abpipettiert und für 10 min bei 500 g und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert, um im Überstand enthaltene Zellbestandteile zu entfernen. Für die Lagerung wurde der neue Virusstock aliquotiert und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Nach erfolgter Propagation wurde der Titer des neuen Virusstocks im TCID₅₀-Assay bestimmt (M Poppe et al., 2017).

3.1.4.2 Plaque Assay

Um die Wirkung der Inhibitorbehandlung auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden vor der Zellernte die Überstände aus den *wells* entnommen und asserviert. Mit den Überständen der ausgewählten Versuchsansätze wurden Plaque Assays durchgeführt und die Virustiter bestimmt. Durch den Vergleich mit den Titern der Überstände in den nicht mit Inhibitoren behandelten Zellen konnten Rückschlüsse die Virusreplikation getroffen werden.

Das angewandte Protokoll ist angelehnt an das von Baer und Kehn-Hall (Baer and Kehn-Hall, 2014). Im Plaque Assay wird sich der zytopathische Effekt des Virus zu Nutze gemacht. Tote und abgelöste Zellen können in einem konfluenten Zellrasen als Plaques sichtbar gemacht werden (Weil et al., 2022).

Der Plaque Assay wurde mit HuH7 Zellen durchgeführt, die im konfluenten Zellrasenverbund in 12-*well*-Platten ausgesät und dann für 24 h in Kultur gehalten wurden. Mit den Virusüberständen wurden Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-7} erstellt und entsprechend dem Schema in der Abbildung 6 je $500 \text{ } \mu\text{L}$ der Verdünnung inklusive technischer Replikate in die *wells* gegeben. Für die *mock* Kontrollen (nicht-infizierte Proben) wurden 10^{-3} Verdünnungen der Überstände des nicht infizierten Ansatzes verwendet. Die Platten wurden für eine Stunde bei $33 \text{ }^\circ\text{C}$ kubiert und im Anschluss die Überstände aus den *wells* entfernt und die Zellen mit $500 \text{ } \mu\text{L}$ der angesetzten Avicel/MEM-Lösung (siehe Kapitel 2.4) eingedeckt, um die Virionen zu immobilisieren. Nach 72 h Inkubation bei $33 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Lösung vorsichtig mit deionisiertem Wasser gelöst und abgewaschen. Es folgte die Färbung mit 1 % Kristallviolett (Kristallviolett 20

% in Ethanol 20 %) und eine dreiminütige Inkubation. Nach Entfernen der Kristallviolett Lösung wurden die Platten fotografiert und die Plaques der *wells* gezählt. Aus den technischen Replikaten wurde der Mittelwert gebildet.

Die Verdünnung, die weniger als 50 und mehr als 5 Plaques enthält, wurde für die Berechnung des Titers verwendet (in der Abbildung 6 rot umrandet).

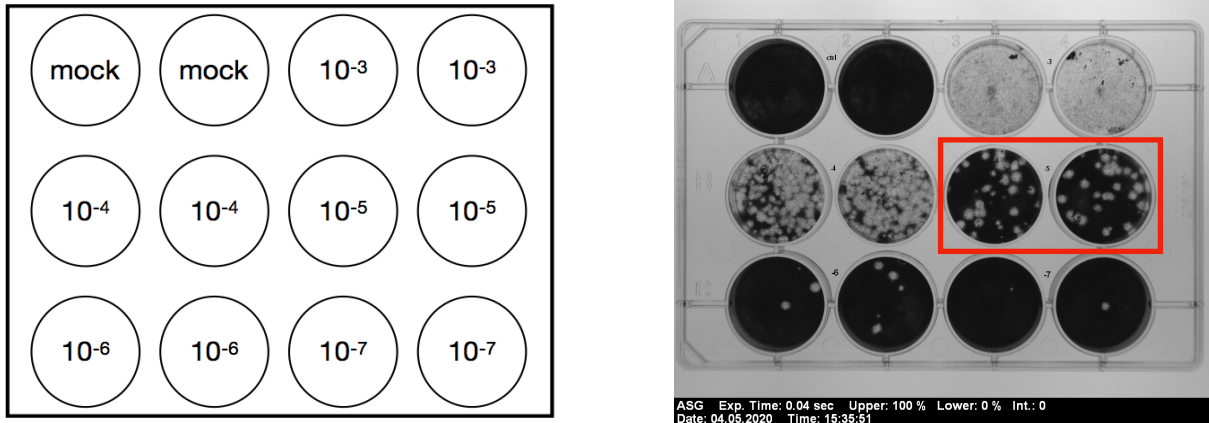


Abb. 6: Plaque Assay Aufbau.

Dargestellt ist die 12-*well* Platte eines Plaque Assays in HuH7 Zellen (aus dem Versuch 4.1.3) und daneben das Pipettier-Schema der Verdünnungen. In der *mock* Kontrolle sind keine Plaques zu erkennen. In den *wells* mit der höchsten Viruskonzentration (10⁻³) sind dagegen kaum noch adhärenente Zellen vorhanden. Mit zunehmender Verdünnung des Überstandes ist eine Abnahme der *pfu* zu sehen. Das rote Rechteck markiert die für die Auswertung verwendeten *wells*.

Anzahl der Plaques/Verdünnung = *plaque forming units* (pfu)/*well*

pfu/*well* x 2 = pfu/mL

In dem Beispiel wurden je 29 Plaques in den *wells* der Verdünnung 10⁻⁵ gezählt. Daraus ergibt sich folgender Titer:

$$29/10^{-5} = 2,9 \times 10^6 \text{ pfu/well}$$

$$2,9 \times 10^6 \times 2 = 5,8 \times 10^6 \text{ pfu/mL}$$

Zum Vergleich der Virustiter wurden zusätzlich Plaque Assays der nur mit Virus behandelten und der mit Virus und DMSO behandelten Ansätze erstellt (siehe Kapitel 4.1.3).

3.2 Molekular Biologische Verfahren

3.2.1 RNA-Isolation und Messung

Die RNA-Isolation erfolgte dem Protokoll des NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey-Nagel) entsprechend. Die Zellysate (siehe 3.1.4) wurden dafür in verschiedenen Schritten gereinigt, mit gebrauchsfertigen Puffern gewaschen und mit einer rekombinanten DNase behandelt, um in der Probe enthaltene DNA zu entfernen. Zuletzt wurde die RNA in Wasser gelöst. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nano Drop ND-1000 Peqlab von Thermo Scientific gemessen. Das Verfahren beruht auf der Messung der Absorption von Licht mit 260 nm Wellenlänge. Je mehr Licht dieser Wellenlänge absorbiert wird, desto größer ist der Gehalt an Nukleinsäuren in der Probe. Anhand des Extinktionskoeffizienten kann daraus die RNA-Konzentration bestimmt werden.

Zusätzlich wurde die Absorption zwei weiterer Wellenlängen gemessen, um die Reinheit der Probe zu überprüfen. Der Quotient aus 260 nm/280 nm ist ein Maß für Proteinkontaminationen in der Probe. Dieser Wert sollte idealerweise bei 2 liegen. Der Quotient der Wellenlängen 260 nm/230 nm sollte zwischen 1,8 und 2,2 betragen, um Kohlenhydratkontaminationen ausschließen zu können.

3.2.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT) dient der Synthese eines komplementären DNA-Stranges (cDNA) der RNA, damit dieser in der PCR amplifiziert und detektiert werden kann (siehe Kapitel 3.2.3).

Der Mechanismus der RT wurde erstmals in Retroviren beobachtet, die mit Hilfe eines Enzyms ihr RNA-Genom in einen RNA-cDNA-Hybriddoppelstrang umschreiben können (Baltimore, 1970)(Mizutani et al., 1970). Diese Entdeckung hat nicht nur dazu beigetragen, entsprechende antivirale Medikation herzustellen, sondern konnte auch in der Forschung Verwendung finden (Hu and Hughes, 2012).

Das Enzym, die Reverse Transkriptase, liest den RNA-Strang ab und synthetisiert aus Nukleotiden einen komplementären DNA-Strang. Da die Reverse Transkriptase Oligonukleotide benötigt, werden dem Ansatz zufällige Hexamerprimer hinzugefügt, die an beliebigen Stellen der messenger RNA (mRNA) binden.

In dieser Arbeit wurde die RNA-abhängigen DNA-Polymerase *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase* (M-MuLV) verwendet. Der Puffer 5X Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), das Enzym

(*RevertAid reverse transcriptase*) und die weiteren Zusätze wurden von ThermoFisher Scientific bezogen (Mülhardt, 2008).

Zusammensetzung eines Ansatzes für die Reverse Transkription (20 µL):

- 4 µL 5X Reaction Buffer
- 0,5 µL Random Hexamer Primer
- 0,5 µL dNTP Mix
- 0,5 µL RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µL)
- 1 µg Gesamt-RNA
- mit ddH₂O wird aufgefüllt, bis das Zielvolumen von 20 µL erreicht ist

Im Anschluss wurden die Proben in dem Thermocycler T-Professional auf die für die RT benötigten Temperaturen erhitzt:

1. 23 °C (10 min)
2. 37 °C (60 min)
3. 95 °C (5 min)

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Sequenzen.

Das Grundprinzip der PCR besteht aus drei Schritten:

1. Die Denaturierung des untersuchten *templates*:

Bei 95 °C trennen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen des Doppelstranges und es entstehen Einzelstränge.

2. *Annealing*:

Die dem Ansatz hinzugefügten Oligonukleotide (Primer) lagern sich den DNA-Einzelsträngen an und bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die dafür optimale Temperatur der jeweiligen Primer wird anhand der enthaltenen Basen (Adenosin, Guanin, Thymin und Cytosin) nach Rychlik & Rhoads berechnet (Rychlik and Rhoads, 1989):

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

3. Die Elongation durch die Taq-Polymerase:

Das Temperaturoptimum der hier verwendeten Taq-Polymerase liegt bei 72 °C. Im letzten Schritt verlängert die DNA-abhängige DNA-Polymerase die Primer-Sequenzen und synthetisiert komplementäre Doppelstränge des *templates*.

Diese drei Schritte werden in vielen Zyklen wiederholt. Welche DNA-Sequenzen dabei amplifiziert werden, ist über die verwendeten Primersequenzen festgelegt.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich *real-time* quantitative PCRs (qPCR) durchgeführt. Bei der qPCR wird ein laserinduziertes Fluoreszenzsignal in Echtzeit gemessen, worüber indirekt auf die Menge des amplifizierten DNA-*templates* geschlossen werden kann. Aus der Anzahl der Zyklen und der detektierten Fluoreszenzsignale kann die Menge der cDNA in der untersuchten Probe errechnet werden. Durch die vorangegangene RT erlaubt dies Rückschlüsse auf die in der Probe enthaltenen mRNA Menge (Mullis et al., 1986). Für die PCR wurden zwei unterschiedliche Assays verwendet.

3.2.3.1 TaqMan™ Gene Expression Assay

Der Assay von Applied Biosystems besteht aus einem Primerpaar und einer TaqMan *probe*. Diese *probe* hat am 5'-Ende einen fluoreszierender *Reporter* FAM (Carboxyfluorescein) gekoppelt. Zusätzlich trägt die TaqMan *probe* am 3'-Ende einen *Quencher* (Tetramethylrhodamin), der die Förster resonance energy transfer (FRET) induzierte Emission des Fluoreszenzsignals des FAM-Farbstoffes absorbiert. Dadurch wird verhindert, dass ein messbares Fluoreszenzsignal emittiert wird, solange der *Quencher* in der Nähe des *Reporters* lokalisiert ist. Die TaqMan *probe* bindet sequenzspezifisch an die *template*-DNA.

Nach dem *annealing* ist das Primerpaar an das *template* gebunden und die Elongation beginnt. Hierbei wird die gebundene DNA-Sequenz der TaqMan *probe* durch die endogene 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert und die Distanz zwischen dem *Quencher* und dem *Reporter* ist groß genug, damit das Laser induzierte Fluoreszenzsignal des FAM-Farbstoffes emittiert werden kann. Das Signal ist proportional zu der Anzahl der amplifizierten DNA und wird in Echtzeit gemessen.

Die restlichen Reagenzien inklusive der AmpliTaq® DNA-Polymerase sind in dem verwendeten Master Mix bereits enthalten.

Die PCR wurde den Empfehlungen von Applied Biosystems entsprechend in 96-*well*-Platten inklusive technischer Duplikate angesetzt.

Zusammensetzung eines 10 µL-Ansatzes:

- 5 µL TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X)
- 0,25 µL TaqMan Assay on Demand Sonde
- 3,5 µL ddH₂O
- 1 µL der RT-Probe (cDNA)

Für die PCR wurde das 7500 Fast Real Time PCR System mit folgenden Einstellungen verwendet:

1. 95°C (20 Sekunden)
2. 95°C (3 Sekunden)
3. 60°C (30 Sekunden)

Der 2. und 3. Schritt wurde für 40 Zyklen wiederholt.

Für die Auswertung ist die Anzahl der Zyklen, bei der das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert überschreitet, entscheidend. Dies ist der sogenannte *Cycle threshold* (Ct-Wert) (Pfaffl, 2006).

Als Referenz der Ct-Werte wurde das nicht regulierte Gen *humanes GusB* gemessen, welches die β-Glucuronidase kodiert. Die für das Zielgen gemessenen Ct-Werte wurden anschließend von denen des Referenzgenes subtrahiert ($Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{hGusB} = \Delta Ct$) und der errechnete ΔCt -Wert im Anschluss auf einen festgelegten Kontrollansatz normiert ($\Delta Ct_{\text{ctrl}} - \Delta Ct_{\text{Ansatz x}} = \Delta \Delta Ct$).

Als Letztes erfolgte die Umrechnung mit der Formel: $2^{-\Delta \Delta Ct} = n$ -fache Induktion des Genes. Die Werte wurde in den Abbildungen als *x-folds* eingetragen.

3.2.3.2 Fast SYBR™ Green- Assay

Der Assay basiert auf dem SYBR® Green I Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Je mehr doppelsträngige DNA vorhanden ist, desto mehr Fluoreszenzsignal wird von dem Farbstoff emittiert und vom Gerät gemessen.

Die verwendeten Oligonukleotide müssen genspezifisch sein. Um Primerdimere, die das Fluoreszenzsignal der qPCR verfälschen würde, auszuschließen, wurden Schmelzkurvenanalysen der verwendeten Primerpaare durchgeführt.

Die Auswertung und Einstellungen des 7500 Fast Real Time PCR System erfolgte, wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben.

3.3 Zellbiologische Verfahren

3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der Indirekten Immunfluoreszenz (IF) werden intrazelluläre Proteine mittels fluoreszierender Antikörper dargestellt.

Dafür wurden zwei Antikörpern verwendet. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das jeweilige Antigen und der mit dem Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Sekundärantikörper (Cy3, Cy5 und Dylight488) speziesspezifisch an den Primärantikörper. Das vom Sekundärantikörper emittierte Signal kann anschließend im Mikroskop gesehen werden.

Die Zellen wurden für die Versuche in μ -Slides VI 0.4 (Ibidi, #80606) in 30 μ L Suspensionen mit Vollmedium ausgesät (Zellzahlen siehe Kapitel 3.1.2). Nach einer Stunde im Brutschrank bei 37 °C wurden die Reservoirs mit 100 μ L des Mediums vorsichtig aufgefüllt, ohne dabei die Zellen aus dem dazwischenliegenden Kanal zu spülen. Nach 24 h in Kultur wurden die Zellen dem Versuchsaufbau entsprechend infiziert.

Bei den HAEC wurden einige Versuche in Kollagen IV- beschichteten μ -Slides (Ibidi, #80602) und μ -Slides VI 0.5 Glass Bottom (Ibidi, #80607) durchgeführt.

Nach der Inkubationszeit (siehe Kapitel 3.1.4) bei 33 °C wurde das Medium aus den μ -Slides entfernt und die Zellen wurden zweimal innerhalb von 5 min mit 150 μ L HBSS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 μ L 4 % Paraformaldehyd fixiert und für 5 min inkubiert. Die fixierten Zellen wurden zwei weitere Mal für je 5 min mit HBSS gewaschen und mit 100 μ L einer Blockierlösung aus 10 % (v/v) *normal donkey serum* in 0,1 % (w/v) Saponin/HBSS für 20 min inkubiert. Das Saponin in der Lösung diente der Permeabilisierung der Zellmembranen.

Nachdem unspezifische Bindungsstellen durch das *normal donkey serum* blockiert wurden, erfolgte die Zugabe von 100 μ L der Primärantikörper-Lösungen (Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in 0,1 % (w/v) Saponin/HBSS) auf die Zellen. Zu den IF-Kontrollen wurden 100 μ L des 0,1 % (w/v) ohne zugesetzten Primärantikörper Saponin/HBSS gegeben.

Nach 2 h wurden die Zellen erneut dreimal für je 10 min mit 150 μ L 0,1 % (w/v) Saponin/HBSS gewaschen und im Anschluss 100 μ L der Sekundärantikörperlösung (Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in 0,1 % (w/v))

Saponin/HBSS) für 2 h im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe der Sekundärantikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen wurde im Dunkeln weitergearbeitet, um die Intensität der Fluoreszenzsignale bis zur Auswertung zu erhalten. Nach der Inkubation der Sekundärantikörperlösung erfolgte ein weiterer Waschschrift für dreimal 10 min mit HBSS. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Proben mit je 100 µL einer 1 µM Hoechst-Lösung (in HBSS) für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein letztes Mal für zweimal 5 min mit HBSS gewaschen und zum Schluss mit 100 µL 30 % (v/v) Glycerol/HBSS eingedeckt.

Die Aufnahme und Prozessierung der Bilder erfolgte an dem Mikroskop DMi8 (Leica) mit dem Software-Programm LasX (Leica). Die Auswertung erfolgte mit Duolink®ImageTool.

3.3.2 Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ist eine Methode zur Detektion von Proteinen und mRNA nach dem *branched DNA-probes* System. Die mRNAs werden dafür von komplementären Oligonukleotiden (*probe sets*) gebunden. An diese *probe sets* wiederum binden die *preamplifier* und *amplifier* zur Signalverstärkung und zuletzt noch Fluorophor-gebundene *label probes*. Die Darstellung der Proteine erfolgt mittels der Indirekter Immunofluoreszenz (siehe Kapitel 3.3.1).

Die Experimente wurden mit dem Kit Quantigene View RNA ISH Cell Assay von Affymetrix (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. In das Protokoll wurden die Arbeitsschritte der IF integriert und angepasst.

Die Aussaat der Zellen erfolgte wie im Kapitel 3.3.1 beschrieben. Die Fixierung wurde nach zwei Waschschriften mit DPBS innerhalb von 5 min mit 100 µL 4 % Paraformaldehyd durchgeführt. Die mit Paraformaldehyd eingedeckten Zellen wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen dreimal für 3 min mit 150 µL DPBS gewaschen. Um die Membranen der Zellen für die Oligonukleotide durchlässig zu machen, wurden 50 µL einer Detergenzlösung für 5 min auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen zweimal für 3 min mit DPBS gewaschen und mit je 50 µL der *probe sets* für 3 h bei 40 °C in einer feuchten Kammer hybridisiert.

Nach der Inkubation und einem Waschgang mit Waschpuffer für dreimal 3 min erfolgte die Hybridisierung mit 50 µL der vorgewärmten *preamplifier*-Lösung für 30 min im

Hybridisierungssofen bei 40 °C. Danach wurde erneut dreimal für 3 min mit Waschpuffer gewaschen und die Zellen für 30 min im Hybridisierungssofen bei 40 °C mit 50 µL der *amplifier*-Lösung inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal für je 3 min mit Waschpuffer gewaschen. Da die *label-probes* die Fluoreszenzfarbstoffe tragen, wurde ab diesem Schritt im Dunkeln weitergearbeitet. 50 µL der *label-probe*-Lösungen wurden in die jeweiligen *µ-Slides* gegeben und bei 40 °C für 30 min inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit je 2 min und ein Waschschrte mit 10 min des Waschpuffers. Danach erfolgte die indirekte Immunfluoreszenz, und die Zellen wurden zweimal für 1 min mit 0,1 % (w/v) Saponin/HBSS gewaschen und anschließend mit 100 µL einer Blockierlösung aus 10 % (v/v) *normal goat serum* in 0,1 % (w/v) Saponin/HBSS für 30 min inkubiert. Die weiteren Arbeitsschrte entsprachen denen des IF-Protokolls mit Anpassung der Inkubationszeiten der Antikörperlösungen, die von 2 h bei Raumtemperatur auf 1 h bei 37 °C im Hybridisierungssofen verkürzt wurden. Als letztes wurden die Zellen mit 100 µL Fluoromount G eingedeckt.

Die Aufnahme und Prozessierung der Bilder erfolgte an dem Mikroskop DMi8 (Leica) mit dem Programm LasX, Leica.

3.3.2.1 Auswertung der Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen

Die Auswertung erfolgte mit der Software Icy (2.1.2.0) von France-BioImaging und Institut Pasteur (<http://icy.bioimageanalysis.com>). Zur besseren Nachvollziehbarkeit sind die beschriebenen Arbeitsschrte in den Screenshots dargestellt.

Für jeden Kanal der *µ-Slides* wurden 120 Zellen aus vier Aufnahmen ausgewählt und die Zellgrenzen markiert. Dafür wurden die Phasenkontrastbilder in dem Programm geöffnet und mit Hilfe des Tools „Polygon“ die „Region Of Interest“ (ROI) der Zellgrenzen entsprechend markiert.

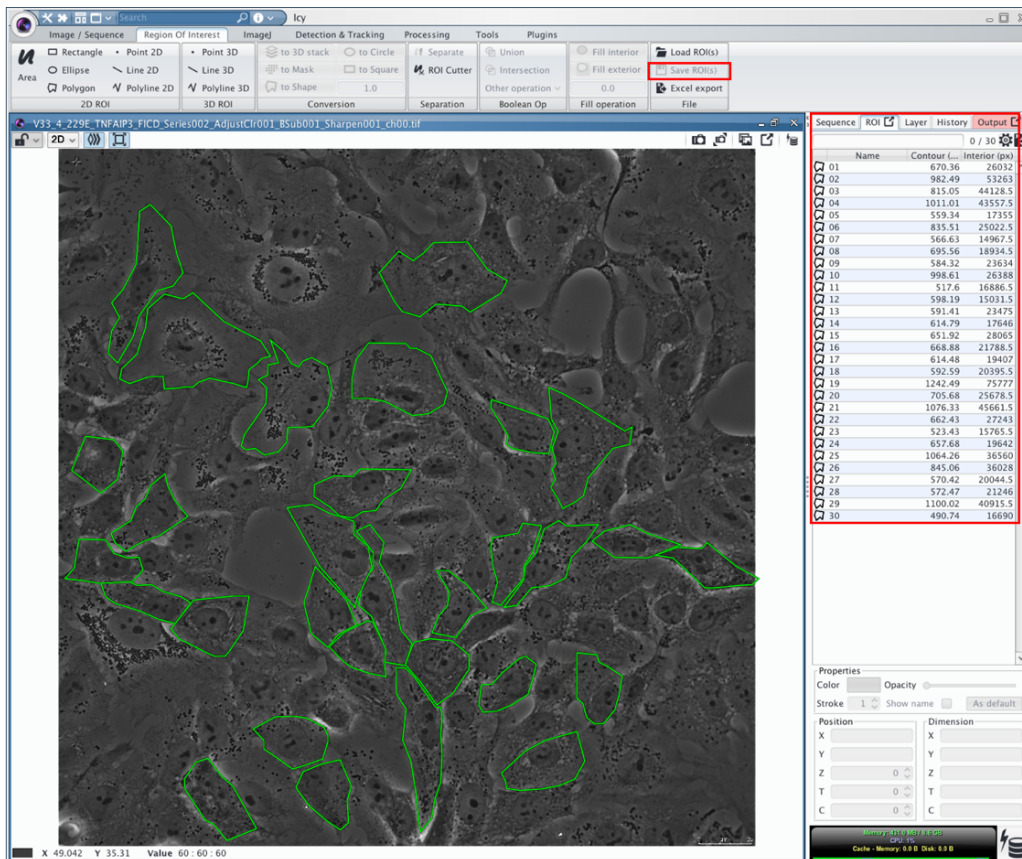
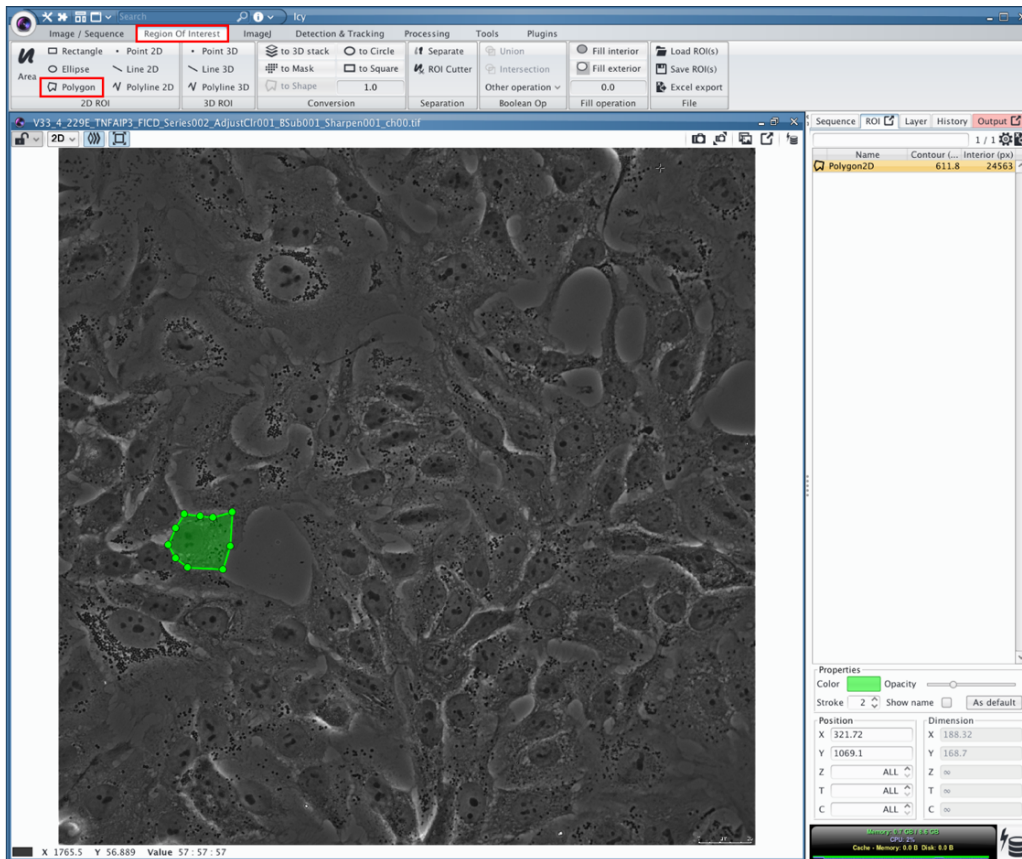
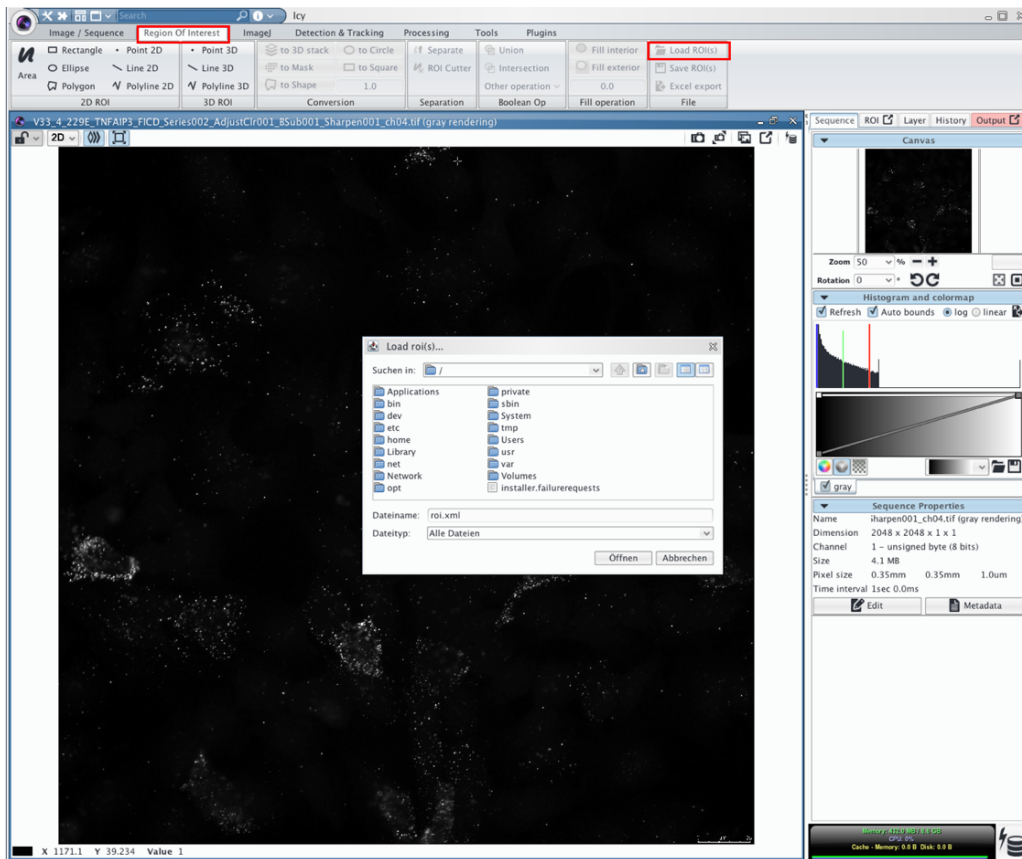
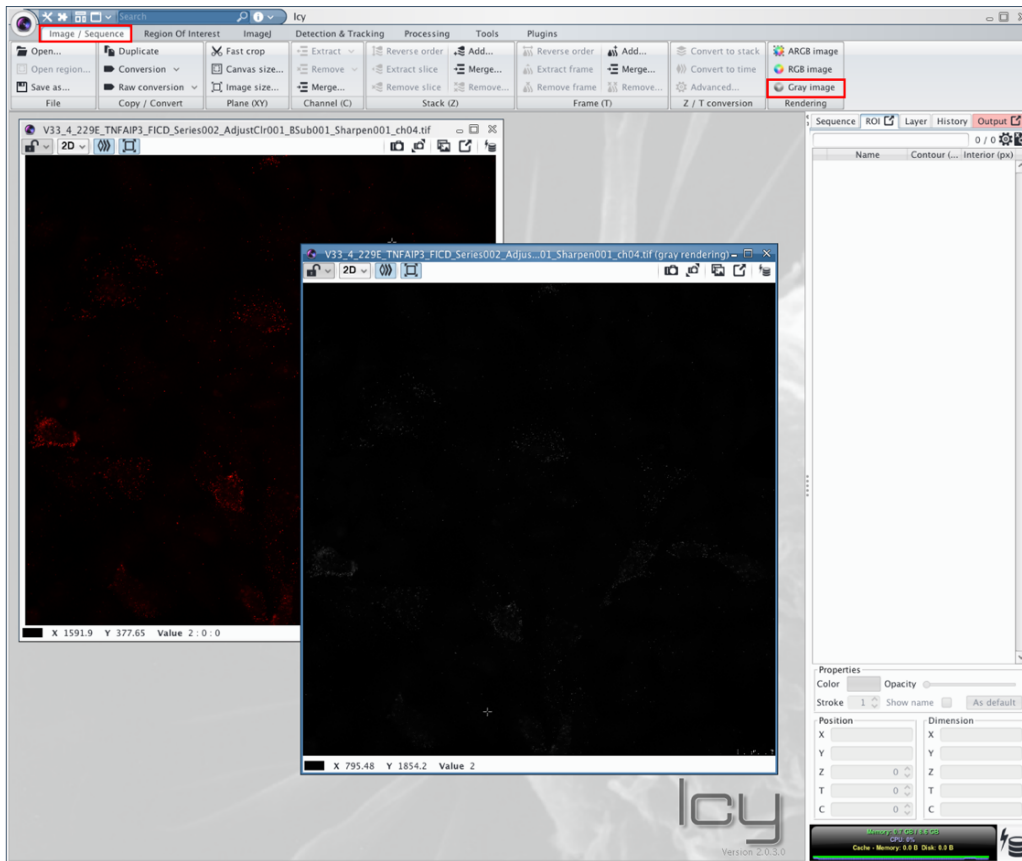


Abb. 7: Festlegen der Region of Interest.

Im Anschluss wurden die ROI in der rechten Spalte nummeriert und gespeichert.



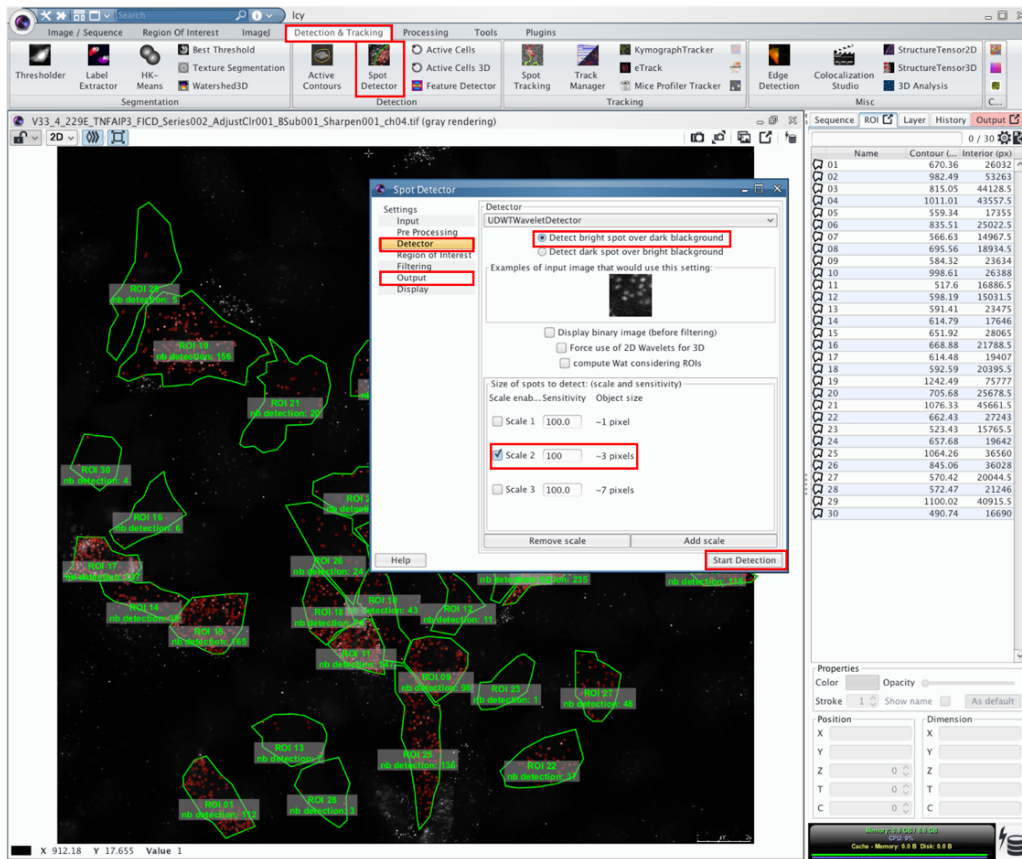
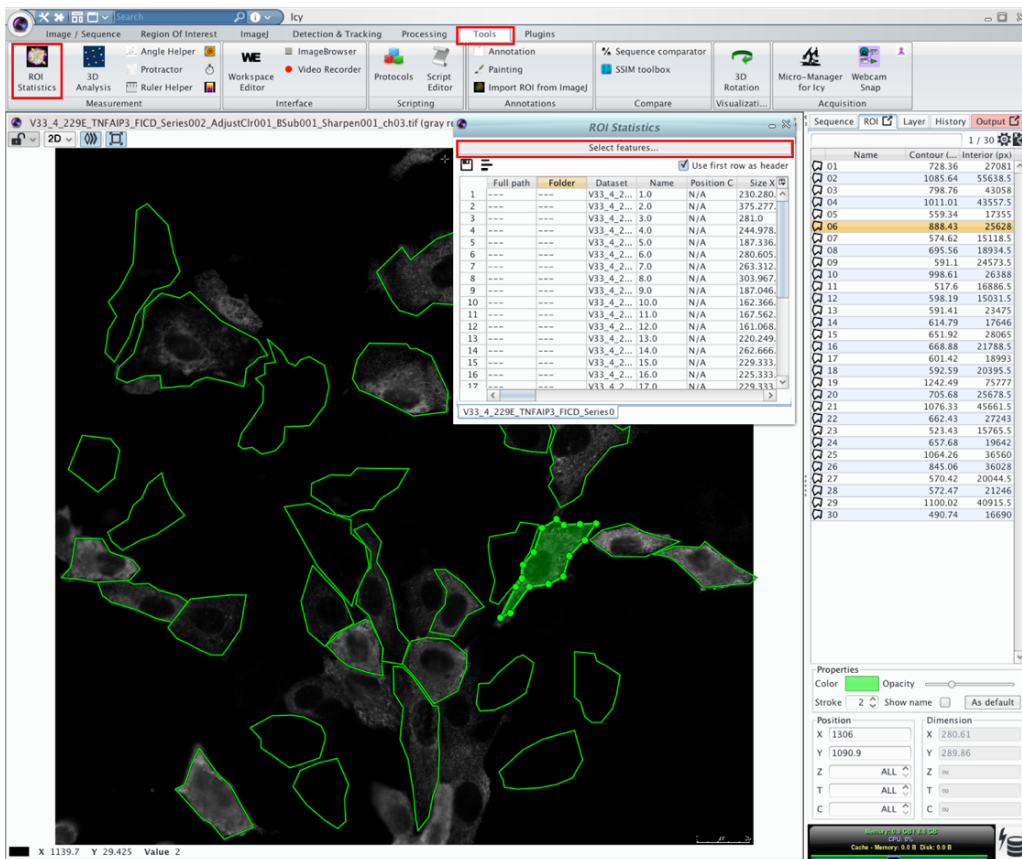
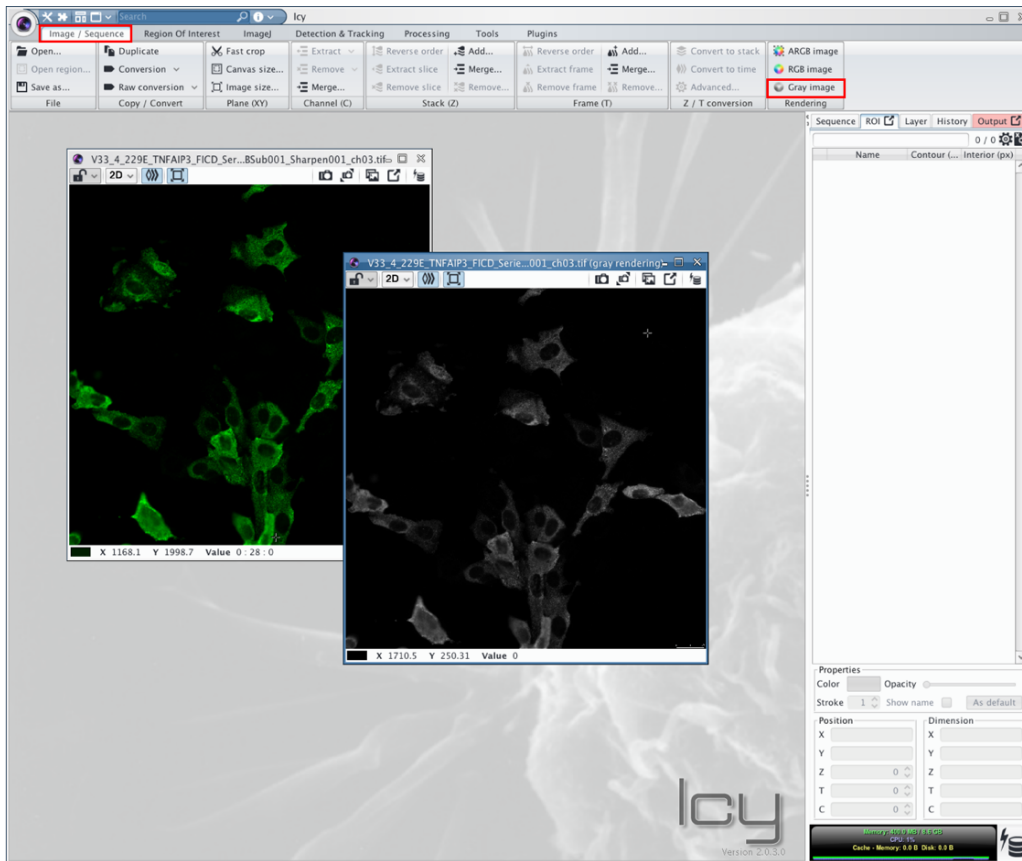


Abb. 8: Detektion der mRNA Signale in den ROI.

Als nächstes wurden die Bilder der einzelnen Kanäle geladen, um die Fluoreszenz-Signale der mRNA in den ausgewählten Zellen zu zählen. Dafür wurde das schwarz-weiße Bild der Aufnahme erstellt und die zuvor gespeicherten ROI der Zellen geladen. In der Spalte „Sequence“ wurde die Helligkeit des Bildes angepasst, damit die Signale auf dem Bildschirm gut zu erkennen waren. Nach der Auswahl des „Spot Detectors“ wurde durch Zoomen auf die markierten Signale überprüft, ob die Sensitivität des Detektors angepasst werden musste. Für jede Detektion wurde die Sensitivität kontrolliert und gegebenenfalls optimiert. Zum Schluss wurden die erfassten Parameter über „Output“ exportiert.



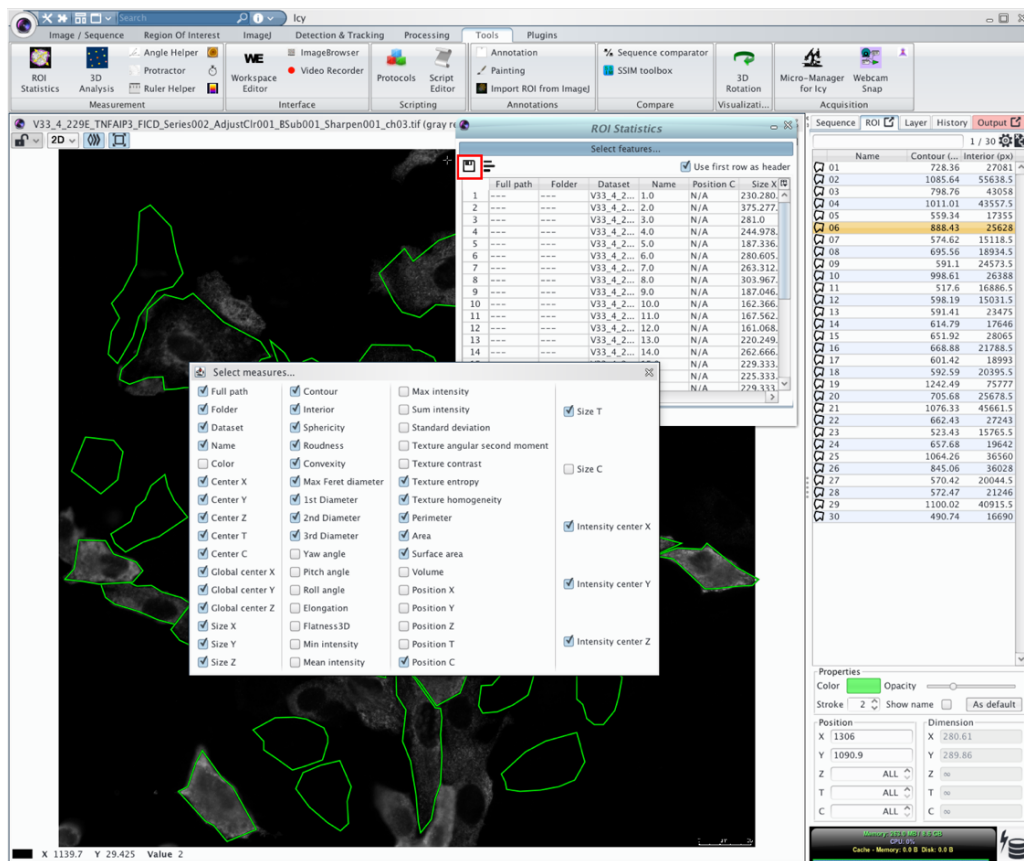


Abb. 9: Messen der N Protein-Fluoreszenz.

Zur Unterscheidung in infizierte und nicht infizierte Zellen wurde die Gesamtfluoreszenz des N Protein-Antikörpers pro Zelle gemessen. Dafür wurde das Bild des Kanals geladen und in ein schwarz-weißes Bild konvertiert.

Nach Laden der ROI's wurden über den Reiter „ROI Statistics“ und „Select Features“ die gewünschten Parameter ausgewählt. Mit dem Disketten-Symbol wurden die Ergebnisse gespeichert. Darunter auch der Quotient aus der gemessenen Fluoreszenz der Zelle und ihrer Fläche.

Anhand der Werte, der auf die Fläche normierten N Protein-Fluoreszenz in den nicht infizierten Kanälen (*mock*) und der IF-Kontrollen wurde ein *Cut-off*-Wert für die Gesamtfluoreszenz des N Protein Antikörpers ermittelt, ab dem eine Zelle als infiziert gewertet wurde.

Die gespeicherten Daten wurden in einer Excel Tabelle zusammengeführt. Mit Hilfe der Nummerierungen der ROI konnte jeder Zelle die Anzahl der detektierten mRNA Signale und die N Protein-Fluoreszenz zugeordnet werden.

4 Ergebnisse

Auf Grundlage der Ergebnisse aus der Dissertation von Michael Poppe (Poppe, 2017) wurden anhand des Ausmaßes der viralen Induktion sowie der verfügbaren Sonden ein Set repräsentativer CoV-regulierter Zielgene für die Analyse der PERK- und NF- κ B Signalwege ausgewählt, dessen Expression mittels *real-time* RT-qPCR und Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen untersucht wurden (siehe Kapitel 1.2.2).

Die Suppression der induzierten Genexpression und Virusreplikation durch die Hemmung der Schlüsselenzyme (PERK, IKK) des jeweiligen Signalweges konnte bereits durch Michael Poppe gezeigt werden (Poppe, 2017). Es stellte sich daher die Frage, ob eine simultane Inhibition beider Signalwege diesen Hemmeffekt verstärken und eine Reduktion der Einzeldosen der Inhibitoren bei erhaltener Wirkung ermöglichen könnte. Insbesondere im Hinblick auf unerwünschte Nebenwirkungen ist eine spezifische Inhibition in geringer Dosierung erstrebenswert.

Um die Hypothese der synergistischen Hemmwirkung zu überprüfen, wurden Experimente mit Konzentrationsreihen der beiden Inhibitoren in HuH7 und A549 Zellen durchgeführt. In der *real time* RT-qPCR wurden im Anschluss an die Infektion und Inhibitorbehandlung die mRNA Transkripte der Zielgene und der viralen Proteine gemessen.

Für die Versuche wurden die in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Inhibitoren, der PERK-Inhibitor GSK2606414 und der IKK β -Inhibitor PHA-408, verwendet. Beide Inhibitoren sind in DMSO gelöst, weshalb DMSO-Kontrollen in den Versuchsaufbau integriert wurden.

Die Protokolle für die Viruspropagation von HCoV-229E sowie die Kultivierung und Infektion der HuH7 Zellen waren in der Arbeitsgruppe bereits etabliert (siehe Kapitel 3.1.4.1).

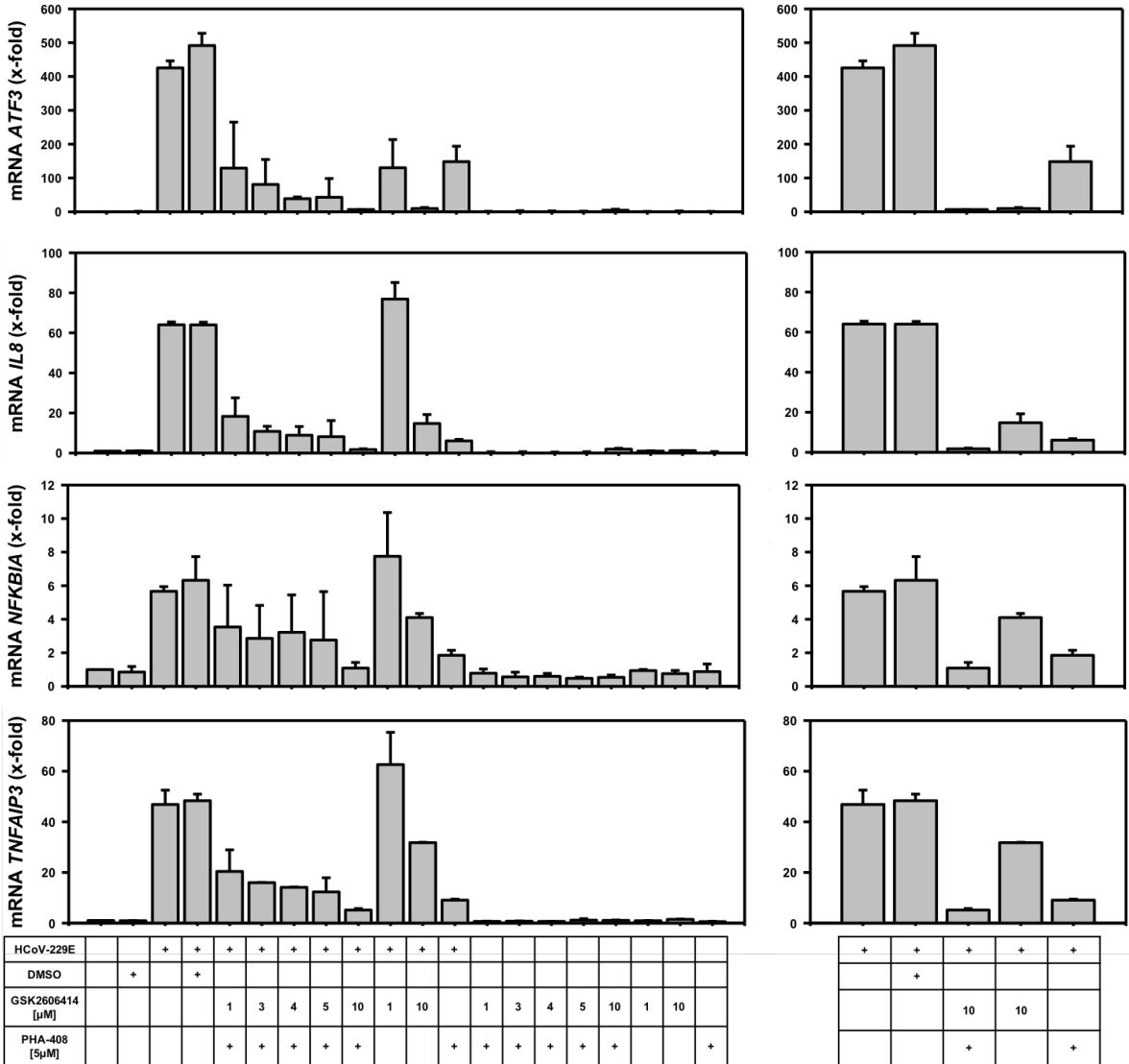
4.1 Charakterisierung der Inhibitorwirkung auf die Genexpression der mit HCoV-229E infizierten HuH7 Zellen

Um die Hypothese eines additiven Hemmeffektes der Inhibitoren zu untersuchen, wurden Experimente mit Konzentrationsreihen der Inhibitoren entworfen. Dafür wurde die Dosierung eines der Inhibitoren titriert, in fester Kombination mit dem anderen in gleichbleibender Konzentration. Das Ziel war es, die Kombination zu finden, bei der die stärkste Suppression der virusinduzierten Genexpression auftritt. Als Referenz dienten

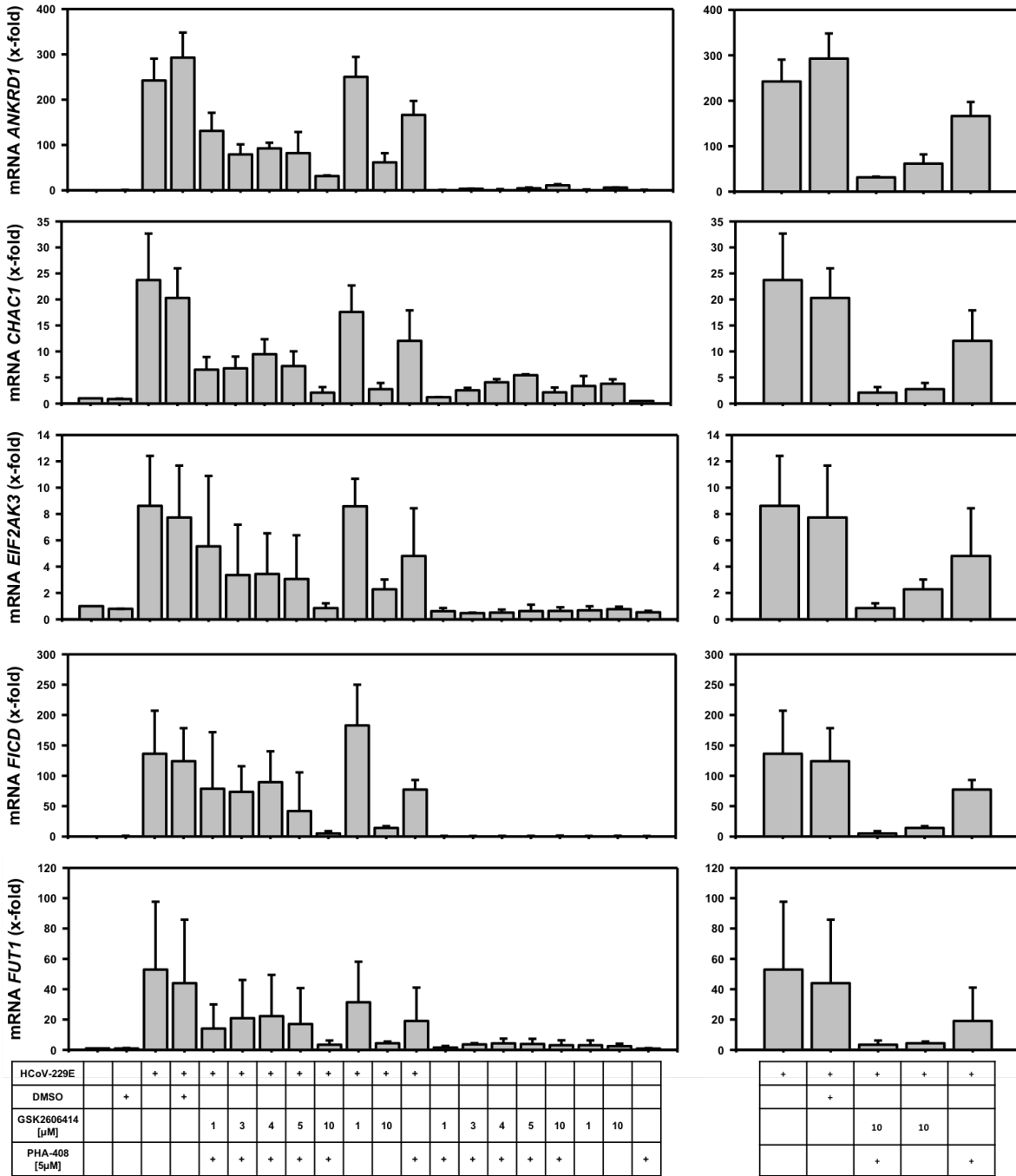
Ansätze, in denen die Inhibitoren allein in der jeweils höchsten Konzentration eingesetzt wurden, für die aus den Vorergebnissen eine Suppression der Genexpression gesehen wurde.

4.1.1 Konzentrationsreihe des Inhibitors GSK2606414 in HuH7 Zellen

A



B



C

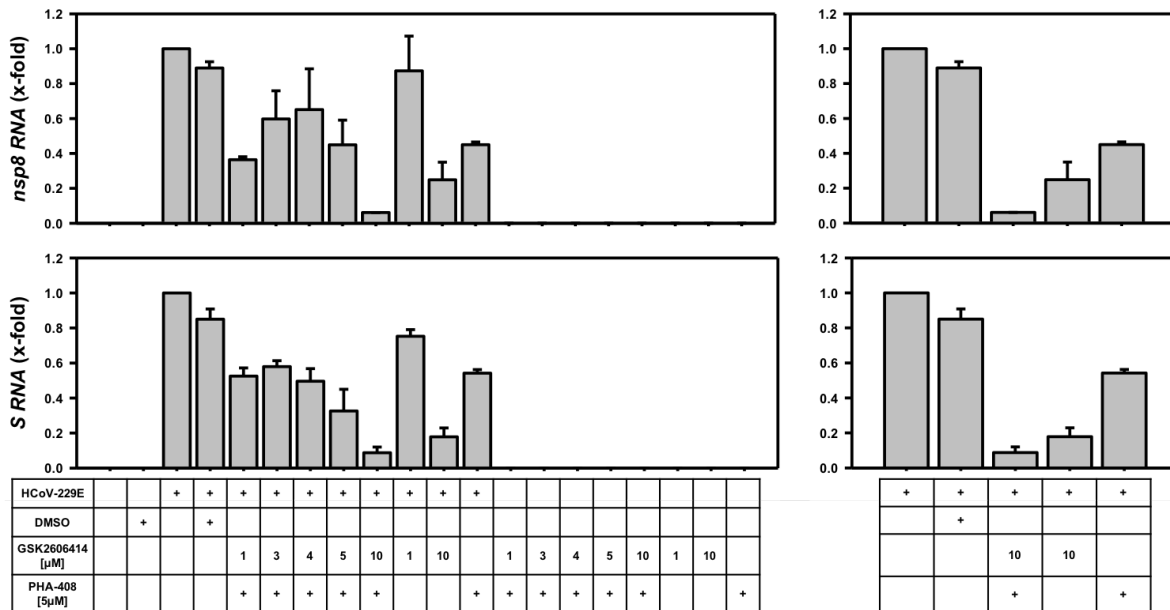


Abb. 10: Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Inhibitors GSK2606414 in Kombination mit PHA-408 auf die mRNA Expression von Genen des NF-κB Signalweges (A), des ER-Stress Signalweges (B) und der viralen Proteine (C) in HuH7 Zellen nach Infektion mit HCoV-229E.

Für die Konzentrationsreihe wurden $3,5 \times 10^5$ HuH7 Zellen pro *well* ausgesät und für 24 h in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des PERK-Inhibitors GSK2606414 und mit $5 \mu\text{M}$ des IKKβ-Inhibitors PHA-408 behandelt und nach 30 min mit HCoV-229E infiziert (MOI= 1). Nach 24 h Inkubationszeit bei $33 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und mit $1 \mu\text{g}$ der RNA die Reverse Transkription durchgeführt. Die Messung der mRNA Level der Gene erfolgte in der *real-time* qPCR (n= 2). **A, B:** Dargestellt sind die x-fachen (*x-folds*) Änderungen der detektierten mRNA Menge, normiert auf die nicht infizierte und nicht behandelte Kontrolle. **C:** Die virale RNA wurde auf die infizierte, nicht behandelte Kontrolle normiert. Die RNA Level der viralen Proteine *nsp8* (*nsp8 RNA*) und S Protein (*S RNA*) indizieren eine erfolgreiche Infektion der Zellen und geben Aufschluss über die Wirkung der Inhibitorbehandlung auf die virale Replikation. Vor der Ernte der Zellen wurden von beiden biologischen Replikaten die Überstände für Titermessungen (siehe Kapitel 4.1.3) asserviert und eingefroren. In den Abbildungen auf der rechten Seite sind die Ergebnisse mit den Maximalkonzentrationen der Inhibitoren zur besseren Vergleichbarkeit nebeneinander dargestellt.

Der Nachweis der viralen RNA bestätigt die erfolgreiche Infektion der Zellen in den mit Virus behandelten Zellkulturen. Alle untersuchten Gene zeigen einen Anstieg der Transkriptmengen in den mit HCoV-229E infizierten *wells*. Dies bestätigt die aus den Vorergebnissen bekannte Aktivierung der Signalwege in den HuH7 durch HCoV-229E. Für die Bewertung der Inhibitorwirkung wurde zunächst überprüft, ob das Lösungsmittel der Inhibitoren DMSO einen Einfluss auf die mRNA Mengen hat. DMSO ist ein weitverbreitetes Lösungsmittel, welches die Permeabilität von biologischen Membranen erhöhen kann (Horita and Weber, 1964). Mit Hilfe der Kontrollen kann der Einfluss des DMSO von der eigentlichen Inhibitorwirkung abgegrenzt werden. Die Abweichung der

x-folds von der infizierten Kontrolle zu der DMSO Kontrolle ist deutlich geringer als die der Inhibitorbehandlung.

Der supprimierende Effekt des PERK-Inhibitors auf die induzierte Genexpression und die Virusreplikation ist deutlich an der Abnahme der *x-folds* der Gene und viralen RNA zu erkennen. Mit steigender GSK-Konzentration fallen auch die Werte der *x-folds*. Die stärkste Suppression der mRNA Level aller Gene bewirkt die Kombination beider Inhibitoren in der Höchstdosis (10 μ M GSK2606414 + 5 μ M PHA-408). Die (Rest)Expression der Gene ist fast auf dem Niveau der nicht infizierten Probe.

Bei Betrachtung der einzelnen Graphen fällt auf, dass die Tendenzen der mRNA Level für die Zielgene eines Signalweges vergleichbar sind, das Ausmaß der Induktion jedoch stark variiert. Während sich bei *ATF3*, *IL8*, *ANKRD1* und *FICD* die *x-folds* nach Infektion im dreistelligen Bereich befinden, zeigen sich für *CHAC1* und *NFKBIA* geringere Werte. Bei Vergleich der Graphen in **A)** und **B)** fällt auf, dass die Inhibitoren auf die Expression der Zielgene des von jeweils Ihnen gehemnten Signalweges auch den stärksten supprimierenden Effekt haben.

Auf die virale RNA (**C**) hat die Einzelbehandlung mit dem PERK-Inhibitor in seiner Höchstkonzentration (10 μ M) einen stärkeren Hemmeffekt als die des IKK β -Inhibitors (5 μ M). Der Ansatz mit beiden Inhibitoren in ihrer jeweiligen Höchstdosis zeigt die geringsten viralen RNA Level aller infizierter *wells*.

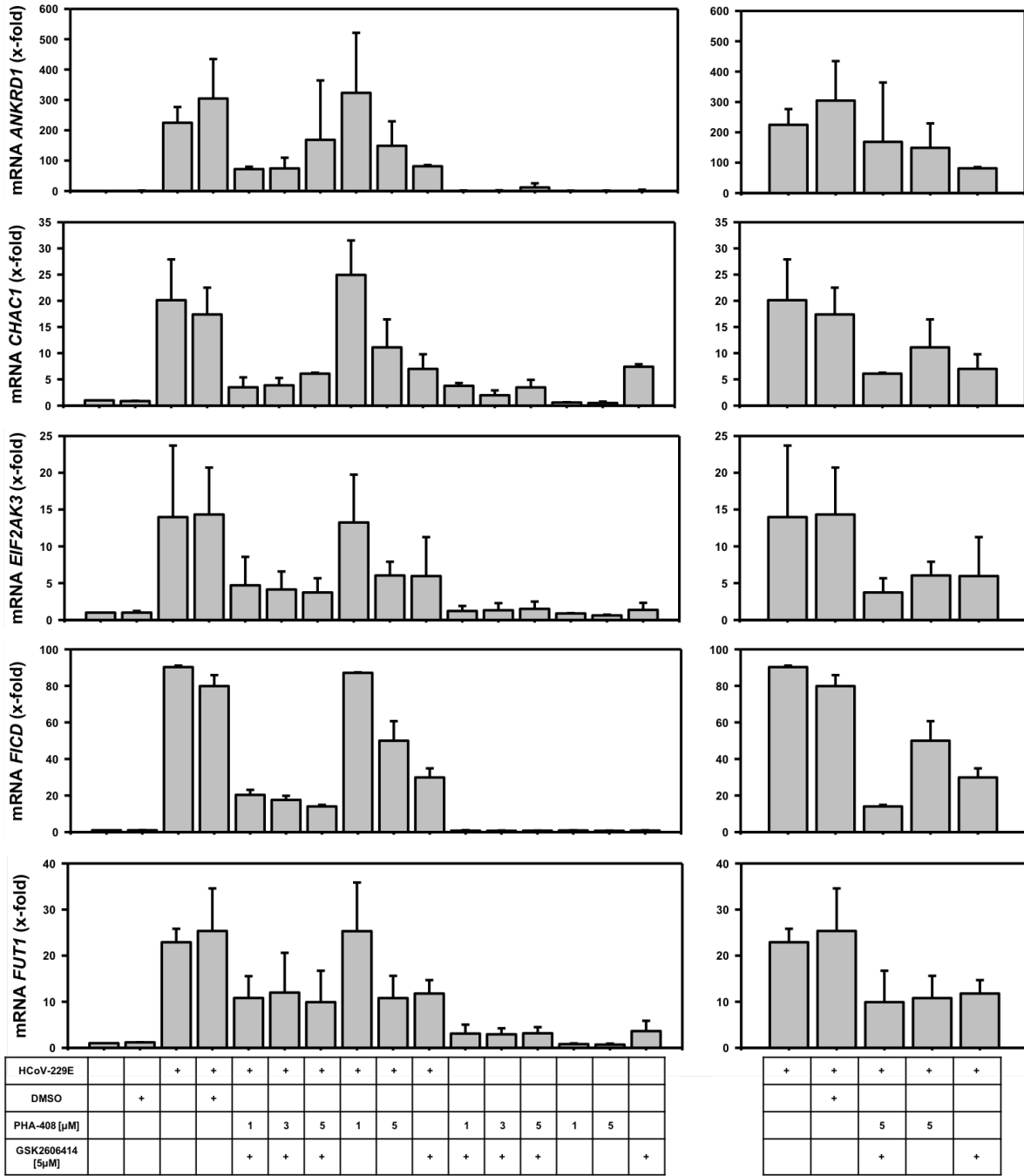
Die kleinen Abbildungen auf der rechten Seite dienen der besseren Veranschaulichung des Effektes der jeweiligen Maximaldosis der Inhibitoren und dessen Kombination. Bei *EIF2AK3*, *ANKRD1*, *IL8* und *nsp8 RNA* und *S RNA* ist eine stärkere Abnahme der *x-folds* bei der Kombination der Inhibitoren im Vergleich zu den Einzeldosen zu erkennen.

Für eine statistische Testung sind weitere Replikate notwendig, um zu überprüfen, ob die Differenz zwischen den Einzeltherapien und der Kombination signifikant ist.

Aus der Reduktion der viralen RNA Mengen kann geschlossen werden, dass die Replikation von HCoV-229E durch die Inhibitoren gehemmt wird. Um dies zu validieren, wurden die Virustiter von ausgewählten Überständen der Konzentrationsreihe im Plaque Assay bestimmt (siehe Kapitel 4.1.3).

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen verschiedener PHA-408-Konzentrationen, auf die hochregulierten Gene und viralen RNA untersucht und nach dem gleichen Schema eine Konzentrationsreihe für PHA-408 mit 5 μ M GSK2606414 durchgeführt.

B



C

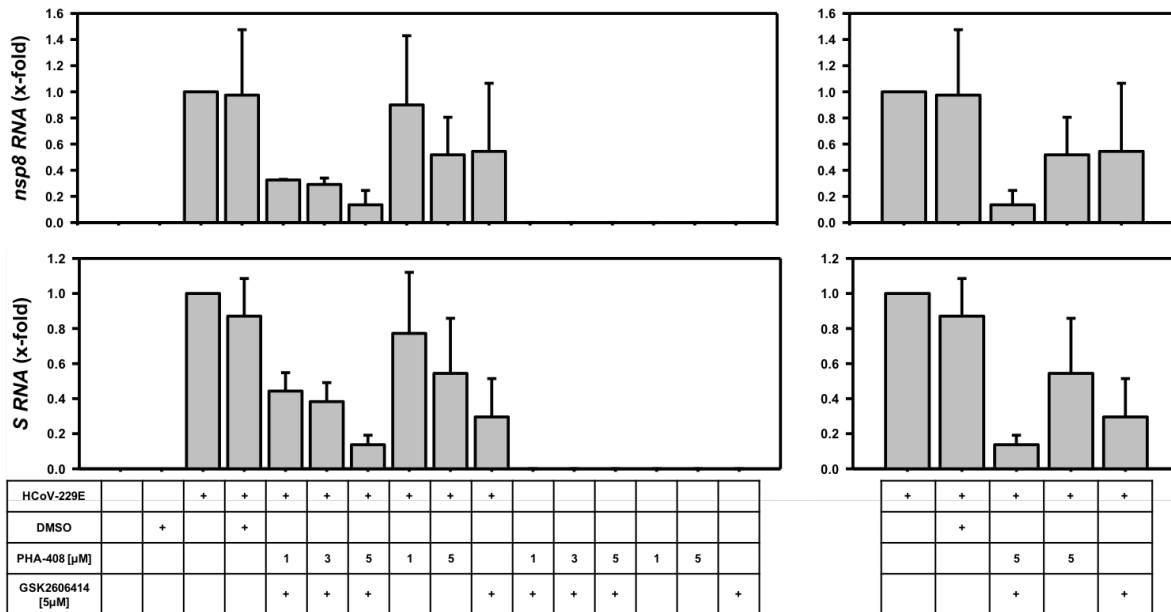


Abb. 11: Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Inhibitors PHA-408 in Kombination mit 5 µM GSK2606414 auf die mRNA Expression von Genen des NF-κB Signalweges (A), des ER-Stress Signalweges (B) und der viralen Proteine (C) in HuH7 Zellen nach Infektion mit HCoV-229E.

Für die Konzentrationsreihe wurden $3,5 \times 10^5$ HuH7 Zellen pro *well* ausgesät und für 24 h in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des IKKβ-Inhibitors PHA-408 und 5 µM des PERK-Inhibitors GSK2606414 behandelt und nach 30 min mit HCoV-229E infiziert (MOI= 1). Nach 24 h in Kultur bei 33°C wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und mit 1 µg der RNA die Reverse Transkription durchgeführt. Die Messung der mRNA Level der Gene erfolgte in der *real-time* qPCR (n=2). **A, B:** Dargestellt sind die x-fachen (*x-folds*) Änderungen der detektierten mRNA Menge, normiert auf die nicht infizierte und nicht behandelte Kontrolle. **C:** Die virale RNA wurde auf die infizierte, nicht behandelte Kontrolle normiert. Die RNA Level der viralen Proteine *nsp8* (*nsp8 RNA*) und S Protein (*S RNA*) indizieren eine erfolgreiche Infektion der Zellen und geben Aufschluss über die Wirkung der Inhibitorbehandlung auf die virale Replikation. Vor der Ernte der Zellen wurden von beiden biologischen Replikaten die Überstände für Titermessungen (siehe Kapitel 4.1.3) asserviert und eingefroren. In den Abbildungen auf der rechten Seite sind die Maximalkonzentrationen der Inhibitoren zur besseren Vergleichbarkeit nebeneinander dargestellt.

Analog zu den Ergebnissen der GSK-Konzentrationsreihe (siehe Kapitel 4.1.1) ist eine Induktion der Genexpression durch die Infektion mit HCoV-229E deutlich zu erkennen. Die virale RNA konnte ebenfalls in allen infizierten Proben nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Expressionsänderung deckt sich mit den Ergebnissen aus der GSK-Konzentrationsreihe. Die stärkste Induktion durch die Virusinduktion zeigt sich für *IL8*, *ATF3*, *ANKRD1* und *FICD*. Die Effekte der Inhibitorbehandlungen decken sich ebenfalls mit den bereits in der GSK-Konzentrationsreihe gemachten Beobachtungen. Die stärkste Suppression der mRNA Level ist im Ansatz mit der Kombination der Höchstdosen beider Inhibitoren (5 µM PHA-408 mit 5 µM GSK2606414) zu sehen. Auch die geringere Wirkung von PHA-408 im Vergleich zu GSK2606414 auf die Genexpression des ER-

Stress Signalweges bestätigt sich. Für die Gene des NF- κ B Signalweges wiederum bestätigt sich der stärkere Hemmeffekt des IKK β -Inhibitors. Dass beide Inhibitoren dennoch auf die Expression der Gene des jeweils anderen Signalweges einen Hemmeffekt haben, könnte auf die geringere Replikation und damit einhergehend abgeschwächte virale Induktion zurückzuführen sein oder auf den *crosstalk* zwischen den Signalwegen (siehe Kapitel 1.2.1.3)(Schmitz et al., 2018).

In den kleinen Abbildungen der Höchstkonzentrationen der Inhibitoren ist die Differenz zwischen den Einzelkonzentrationen und der Kombination geringer ausgeprägt als dies bei der GSK-Konzentrationsreihe der Fall war. Dennoch lässt sich erst durch die simultane Inhibition beider Signalwege eine deutliche Suppression aller untersuchten Gene sowie der viralen RNA erreichen.

Die differenzierte Beurteilung der Konzentrationen ist bei zum Teil großen Fehlerbalken der Graphen nur eingeschränkt möglich. Es deutet sich an, dass der IKK β -Inhibitor in der Kombination mit dem PERK-Inhibitor auch in geringerer Dosierung (z.B. 3 μ M) eingesetzt werden könnte, da der Effekt höherer Dosierungen von GSK2606414 stärker ist.

Vorausgesetzt, dass eine Suppression der Genexpression und der viralen RNA Mengen einhergeht mit einer verminderten Virusreplikation, lässt sich aus den Ergebnissen der Konzentrationsreihen schlussfolgern, dass die stärkste Suppression der viralen Replikation durch Einsatz der Höchstkonzentrationen beider Inhibitoren in Kombination erreicht werden kann. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden ergänzend Plaque Assays mit asservierten Überständen beider Konzentrationsreihen durchgeführt und die Virustiter verglichen.

4.1.3 Plaque Assays mit ausgewählten Überständen aus der Inhibitor-Konzentrationsreihen in HuH7 Zellen

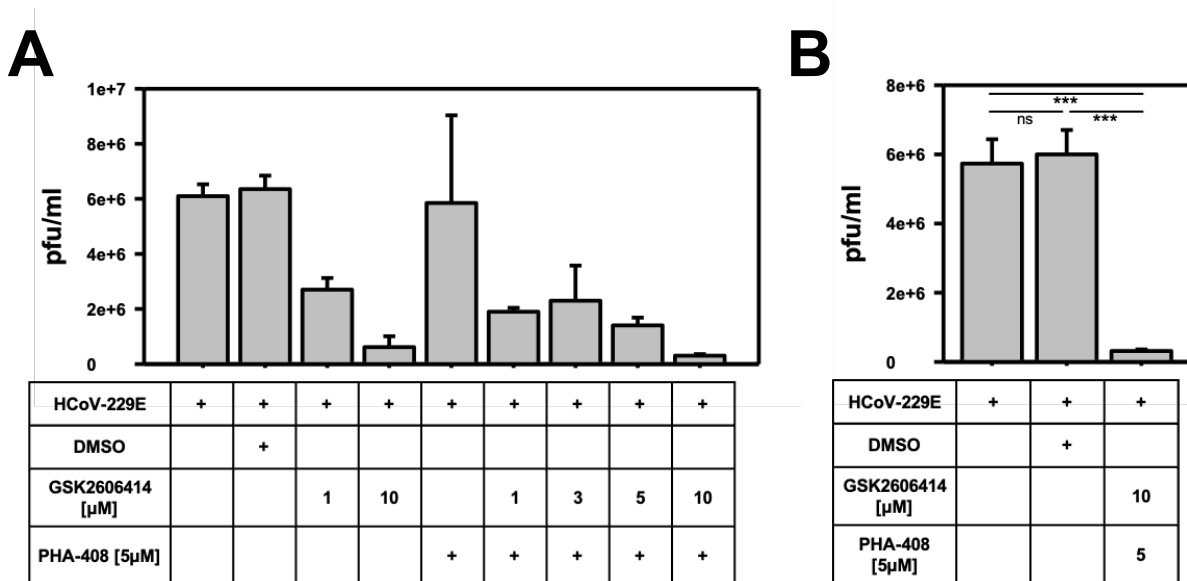


Abb. 12: Auswirkung der Inhibitorbehandlungen auf die Virustiter.

Mit den asservierten Überständen der Konzentrationsreihen aus den Versuchen 4.1.1 und 4.1.2 wurden Plaque Assays durchgeführt. Dafür wurden 2×10^5 HuH7 Zellen in 12-well-Platten ausgesät und mit den Verdünnungen der Überstände infiziert. Die Platten wurden für 72 h bei 33 °C mit Avicel/MEM inkubiert. Nach der Färbung mit Kristallviolett erfolgte die manuelle Auszählung der *plaque forming units* (pfu) (siehe Kapitel 3.1.4.2). **A**) $n=2$. **B**) Zusätzliches biologisches Replikat der Maximalkonzentration der Inhibitoren, $n=3$. Zur statistischen Testung wurde eine normalverteilte Stichprobe angenommen und der t-test verwendet (**= $p<0,001$; ns= nicht signifikant). Die Aufnahmen der 12-well-Platten eines Replikates befinden sich im Anhang (siehe Abb.Anh. 1).

Die Ergebnisse der Plaque Assays bestätigen, was sich bereits an den viralen mRNA Mengen in den Konzentrationsreihen andeutete. Die Überstände der mit Inhibitor behandelten Proben haben geringere Virustiter im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Den kleinsten Titer weist der Überstand der mit 10 μM GSK2606414 und 5 μM PHA-408 behandelten Probe auf. Das ist auch der Ansatz, mit der stärksten Reduktion der Expression der Gene und viralen RNA in der GSK-Konzentrationsreihe. Beim Vergleich zu den Einzelkonzentrationen 5 μM PHA-408 und 10 μM GSK2606414, ist die Differenz der Titer zwischen dem Ansatz mit nur 10 μM GSK2606414 und der Kombination mit 5 μM PHA-408 eher gering. Das würde bedeuten, dass die Hemmung des PERK-Enzymes einen stärkeren Hemmeffekt auf die Replikation hat als die des IKK-Komplexes. Allerdings variieren die Titer des Ansatzes mit 5 μM PHA-408 innerhalb der Replikate so stark (**A**), dass sich keine abschließende Aussage dazu treffen lässt.

Zusammengefasst stützen die Ergebnisse des Plaque Assays die aufgestellte Hypothese, dass eine Reduktion der viralen RNA in den Zellen durch die PERK/ IKK- Inhibitoren mit einer eingeschränkten Replikation einhergeht. Zudem konnte mit der Kombination der Inhibitoren eine signifikante Reduktion der Virustiter im Vergleich zur nicht inhibierten Kontrolle (**B**) erreicht werden.

4.2 Auswirkungen der HCoV-229E Infektion und Inhibitorbehandlung auf die Expression der ausgewählten Gene in A549 Zellen

Die HuH7 Zellen wurden als Infektionsmodell ausgewählt, weil sie sich innerhalb einer kurzen Inkubationszeit sehr homogen mit HCoV-229E infizieren lassen. Als Leberkarzinomzellen sind sie mit den *in vivo* überwiegend betroffenen Zellen des Respirationstraktes zwar nicht verwandt, stellen aber aufgrund der einfachen Infektionsbedingungen ungeachtet dessen ein weitverbreitetes Modell in der CoV-Forschung dar (Tang et al., 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass CoV auch andere Gewebe infizieren (Hoffmann et al., 2020).

Ergänzend zu den Versuchen mit den HuH7 Zellen sollten die Daten zur Inhibitorbehandlung und Genexpression daher in einer weitere Zelllinie erhoben werden, den A549 Zellen. Dabei handelt es sich um Zellen eines Alveolarzellkarzinoms, die sich ebenfalls mit HCoV-229E infizieren lassen (Funk et al., 2012). Im Hinblick auf die Versuche mit Primärzellen wurden die A549 zudem genutzt, um die Protokolle für längere Infektionszeiten zu testen und anzupassen. Aufgrund des begrenzten Kontingents an Primärzellen ist es wichtig, den Versuchsaufbau im Voraus bereits bestmöglich zu optimieren.

Die ersten Experimente unserer Arbeitsgruppe mit den A549 Zellen hatten bereits offenbart, dass deutlich längere Infektionszeiten als bei den HuH7 Zellen benötigt werden, um eine ausreichende Infektionsrate zu erreichen. Dass es durch die Infektion mit HCoV-229E in den A549 Zellen ebenfalls zu einer Dysregulation der Zielgene kommt, konnte in mit Hilfe von Lasermikrodissektion selektierten, infizierten Zellen gezeigt werden (M Poppe et al., 2017).

4.2.1 Etablierung der Infektionsbedingungen in A549 Zellen

Für die Inhibitorversuche in den A549 Zellen musste zunächst der optimale Infektionszeitraum mit ausreichend vielen infizierten Zellen ermittelt werden, um Expressionsänderungen in der RT-qPCR nachweisen zu können.

In der initialen Infektionskinetik wurden die Zeiträume 24, 48, 72, 96 und 120 h untersucht. Die Infektion erfolgte wie in den HuH7 ohne Entfernen des Virusüberstandes nach der Infektion. Die Zellen wurden insgesamt für 144 h in Kultur gehalten. Um die Infektionsrate in der Indirekten Immunfluoreszenz ermitteln zu können, wurde das virale N Protein mit Hilfe eines rot fluoreszierenden Antikörpers dargestellt.

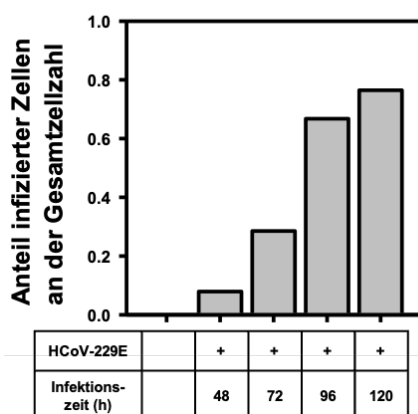
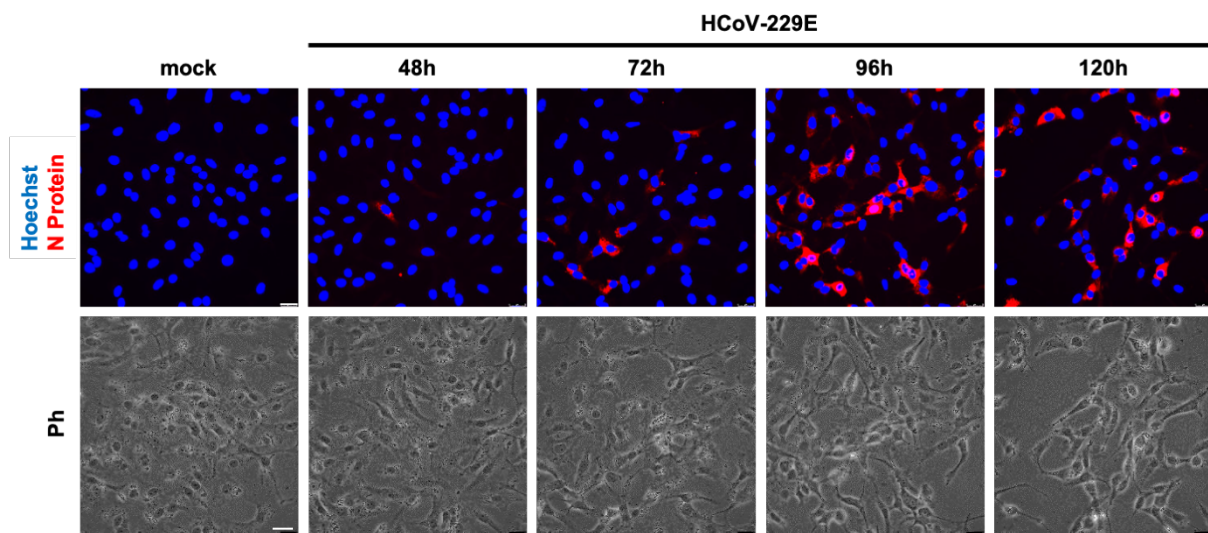


Abb. 13: Infektionskinetik von HCoV-229E in A549 Zellen mittels Indirekter Immunfluoreszenz.

Für die Infektionskinetik wurden die A549 Zellen in μ -Slides ausgesät und nach 24 h mit HCoV-229E-Virusüberstand (MOI= 1) zu den jeweiligen Zeitpunkten infiziert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und die IF durchgeführt. Zum Nachweis der Infektion wurde ein N Protein-Antikörper (1:100; mouse) eingesetzt und mit einem Cy3-Sekundärantikörper markiert (rot). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst (blau). Die IF-Kontrollen wurden nicht mit dem Primärantikörper behandelt. Die Aufnahme und Prozessierung der Bilder

erfolgte an dem Mikroskop Dmi8 (Leica) mit dem Programm LasX, Leica. Zur Berechnung der Infektionsraten wurden die Bilder mit der DuoLink Software ausgewertet und der Anteil rot-fluoreszierender Zellen (N Protein positiv) gezählt. Die Ergebnisse sind im Balkendiagramm dargestellt. N= 1. Maßstabsbalken= 25 μ m. Ph= Phasenkontrast.

Es lässt sich gut erkennen, dass mit längerer Infektionszeit die Anzahl infizierter Zellen ansteigt. Die höchste Infektionsrate wurde nach 120 h Infektion mit bis zu 80 % erreicht. Die Zellen wurden jeden Tag im Lichtmikroskop untersucht. Dabei fiel auf, dass sich die Morphologie der Zellen mit zunehmender Inkubationszeit stark verändert hat. Das ist vermutlich auf den zytopathischen Effekt des Virus zurückzuführen. Das Medium enthielt immer mehr abgelöste Zellen und der Farbindikator des Mediums veränderte sich zum Ende der Inkubationszeit stark. Die Zellzahlen in allen Kanälen waren nach den 144 h in Kultur deutlich reduziert. In Zusammenschau mit dem veränderten Farbindikator des Mediums, was den Verbrauch der enthaltenen Nährstoffe anzeigt, wurde beschlossen einen regelmäßigen Austausch des Mediums in das Protokoll zu integrieren. Die Wirtszellreaktion und Aktivierung der Signalwege durch HCoV-229E, könnte durch ein hohes basales Stresslevel der Zellen, beispielsweise bedingt durch einen Nährstoffmangel, beeinflusst werden.

Da bereits nach 96 h Inkubationszeit über 60 % der Zellen infiziert waren, wurde das ganze Protokoll zusätzlich um 24 h verkürzt.

Es wurde eine weitere Infektionskinetik durchgeführt, bei der die Zellen insgesamt nur 120 h in Kultur gehalten wurden. Zudem wurde der Virusüberstand eine Stunde nach der Infektion entfernt und durch frisches Vollmedium ersetzt. Alle 48 h erfolgte ein weiterer Mediumwechsel. Im Lichtmikroskop zeigte sich am Ende der Inkubationszeit ein nur gering farbverändertes Medium, sowie höhere Zellzahlen als bei der ersten Infektionskinetik.

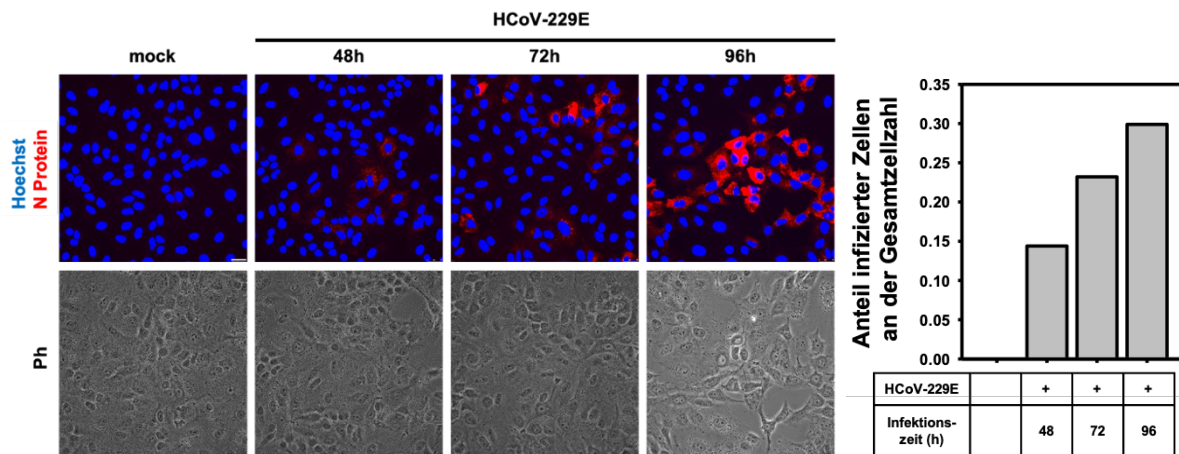


Abb. 14: Infektionskinetik von HCoV-229E in A549 Zellen unter regelmäßigem Mediumwechsel mittels Indirekter Immunfluoreszenz.

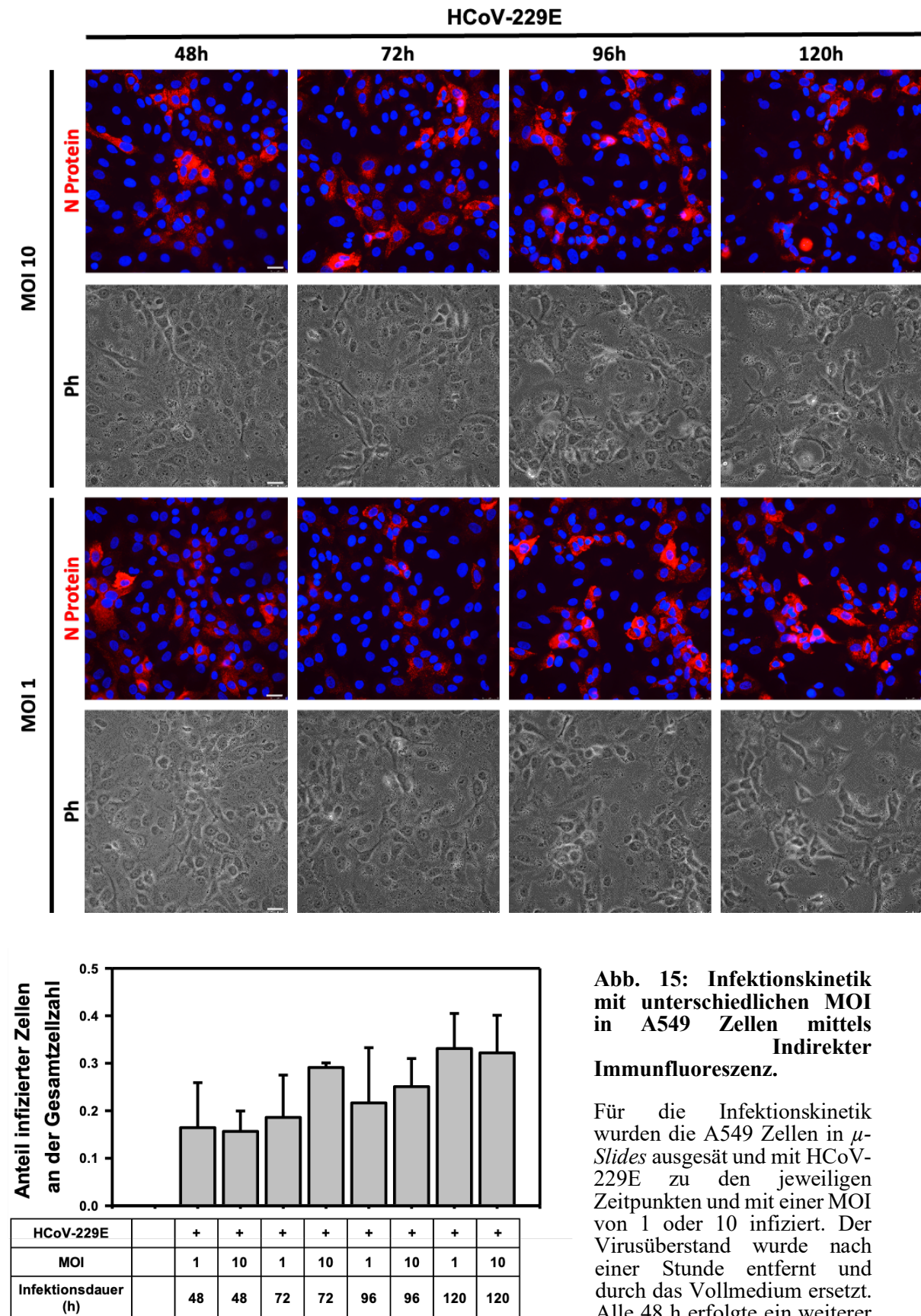
Für die Infektionskinetik wurden die A549 Zellen in μ -Slides ausgesät und mit HCoV-229E-Virusüberstand (MOI= 1) zu den jeweiligen Zeitpunkten infiziert. Der Virusüberstand wurde nach einer Stunde entfernt und durch das Vollmedium ersetzt. Alle 48 h erfolgte ein weiterer Mediumwechsel. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und die IF durchgeführt. Zum Nachweis der Infektion wurde ein N Protein-Antikörper (1:100; mouse) eingesetzt und mit einem Cy3-Sekundärantikörper markiert (rot). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst (blau). Die IF-Kontrollen wurden nicht mit dem Primärantikörper behandelt. Die Aufnahme und Prozessierung der Bilder erfolgte an dem Mikroskop DMi8 (Leica) mit dem Programm LasX, Leica. Zur Berechnung der Infektionsraten wurden die Bilder mit der DuoLink Software ausgewertet und der Anteil rot-fluoreszierenden Zellen (N Protein positiv) gezählt. Die Ergebnisse sind im Balkendiagramm dargestellt. n= 1. Maßstabsbalken= 25 μ m. Ph= Phasenkontrast.

Die Infektionsraten fielen im Vergleich zum Vorversuch deutlich geringer aus, mit nur 30 % infizierten Zellen nach 96 h. In beiden Versuchen waren die infizierten Zellen in den Kanälen inhomogen verteilt. Es zeigten sich Bereiche, insbesondere am Rand der Kulturgefäße, in denen die Infektionsraten höher waren und bis zu 50 % erreichten. Dieses Ergebnis passt zu der von Michael Poppe beschriebenen Ausbreitung der Infektion in den A549, mit Clustern infizierter Zellen am Außenrand der Kulturgefäße (Poppe, 2017).

Dadurch, dass nicht alle Zellen der Kanäle ausgezählt worden sind, können die Ergebnisse nur als Näherung betrachtet werden. Bei der Aufnahme der Bilder wurde zwar darauf geachtet, möglichst repräsentative Bereiche der Kanäle im Phasenkontrast auszuwählen, die Randbereiche konnten aber aufgrund der entstehenden Artefakte nicht gut erfasst werden und sind dementsprechend nicht in die Auswertung mit eingeflossen. Die tatsächliche Infektionsrate wurde daher vermutlich eher unterschätzt.

Die Morphologie der Zellen im Lichtmikroskop und der Zustand des Mediums zeigten eine bessere Konstanz über die Dauer der Inkubation, weshalb sich dafür entschieden wurde, den Mediumwechsel in das Protokoll der A549 zu integrieren. Um die

Infektionseffizienz zu verbessern, wurde eine weitere IF mit zwei unterschiedlichen MOI angefertigt.



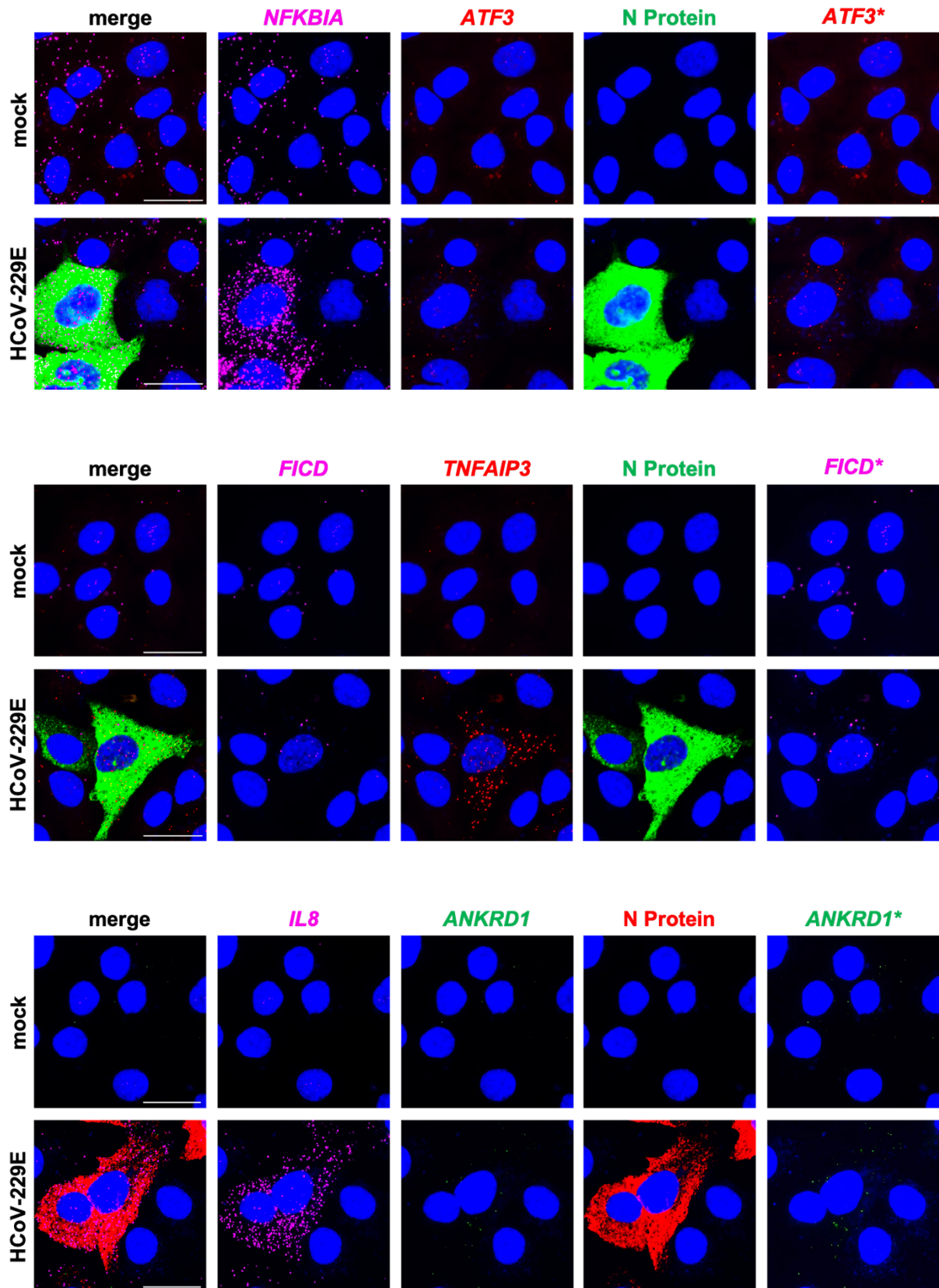
Mediumwechsel. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und die IF durchgeführt. Zum Nachweis der Infektion wurde ein N Protein-Antikörper (1:100; *mouse*) eingesetzt und mit einem Cy3-Sekundärantikörper markiert (rot). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst (blau). Die IF-Kontrollen wurden nicht mit dem Primärantikörper behandelt. Die Aufnahme und Prozessierung der Bilder erfolgte an dem Mikroskop DMi8 (Leica) mit dem Programm LasX, Leica. Zur Berechnung der Infektionsraten wurden die Bilder mit der DuoLink Software ausgewertet und der Anteil rot-fluoreszierender Zellen (N Protein positiv) gezählt. Die Ergebnisse sind im Balkendiagramm dargestellt. n= 2. Maßstabsbalken= 25 µm. Ph= Phasenkontrast.

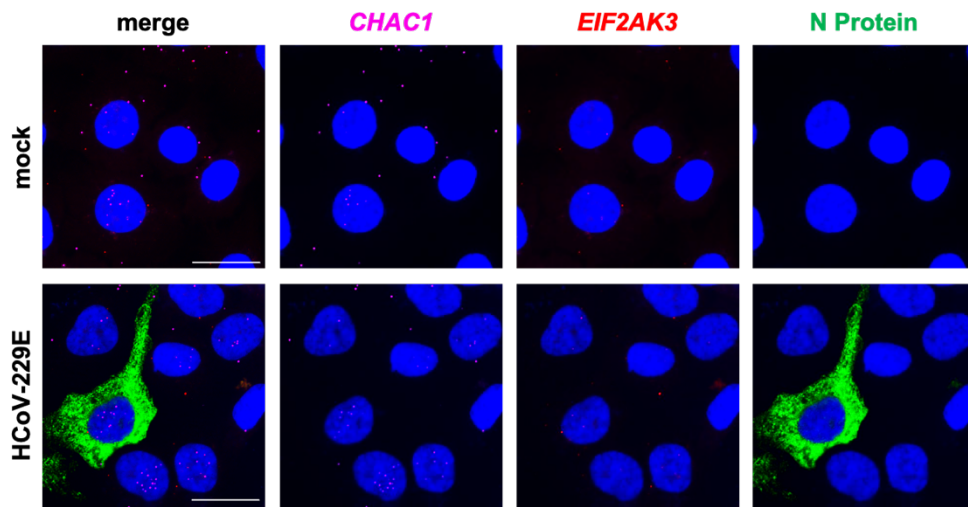
Die Auswertung der Kinetiken zeigte starke Schwankungen der Infektionsraten innerhalb der Replikate, was die Vergleichbarkeit der Infektionsraten der beiden MOI erschwert. Im Kanal der Zellen, welche für 120 h infiziert wurden, waren im Lichtmikroskop erneut viele abgelöste und morphologisch veränderte Zellen zu sehen. Beim Betrachten durch das Mikroskop konnten in den Zellkulturen, die mit einer MOI von 10 infiziert wurden, mehr infizierte Zellen gesehen werden, was sich allerdings nicht in der Auswertung widerspiegelt. Durch die Auswahl der Bilder im Phasenkontrast wurden eher Bereiche ohne Artefakte aufgenommen, die allerdings auch weniger infizierte Zellen beinhalteten. Aufgrund der reduzierten Zellzahl und stark veränderten Morphologie der Zellen nach der 120-stündigen Infektion wurde sich trotz der hohen Infektionsrate gegen den längeren Zeitraum entschieden. Die im Mikroskop wahrgenommene höhere Infektionsrate in den mit der MOI von 10 infizierten Kanälen führte zur Festlegung des folgenden Infektionsschemas in den A549: Infektion mit einer MOI von 10 für 96 h, Entfernen des Virusüberstandes nach 1 h und ein Mediumwechsel alle 48 h.

Als nächstes wurde die Expression der Zielgene in den A549 Zellen nach einer 96-stündigen Infektion mit HCoV-229E auf Einzelzellebene untersucht.

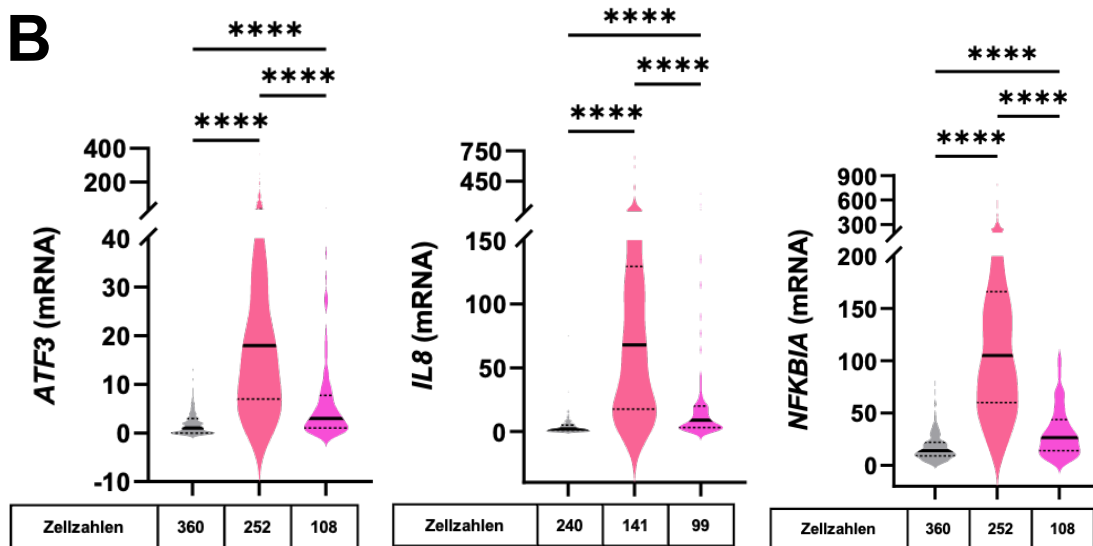
4.2.2 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Genexpression auf Einzelzellebene in A549 Zellen

A

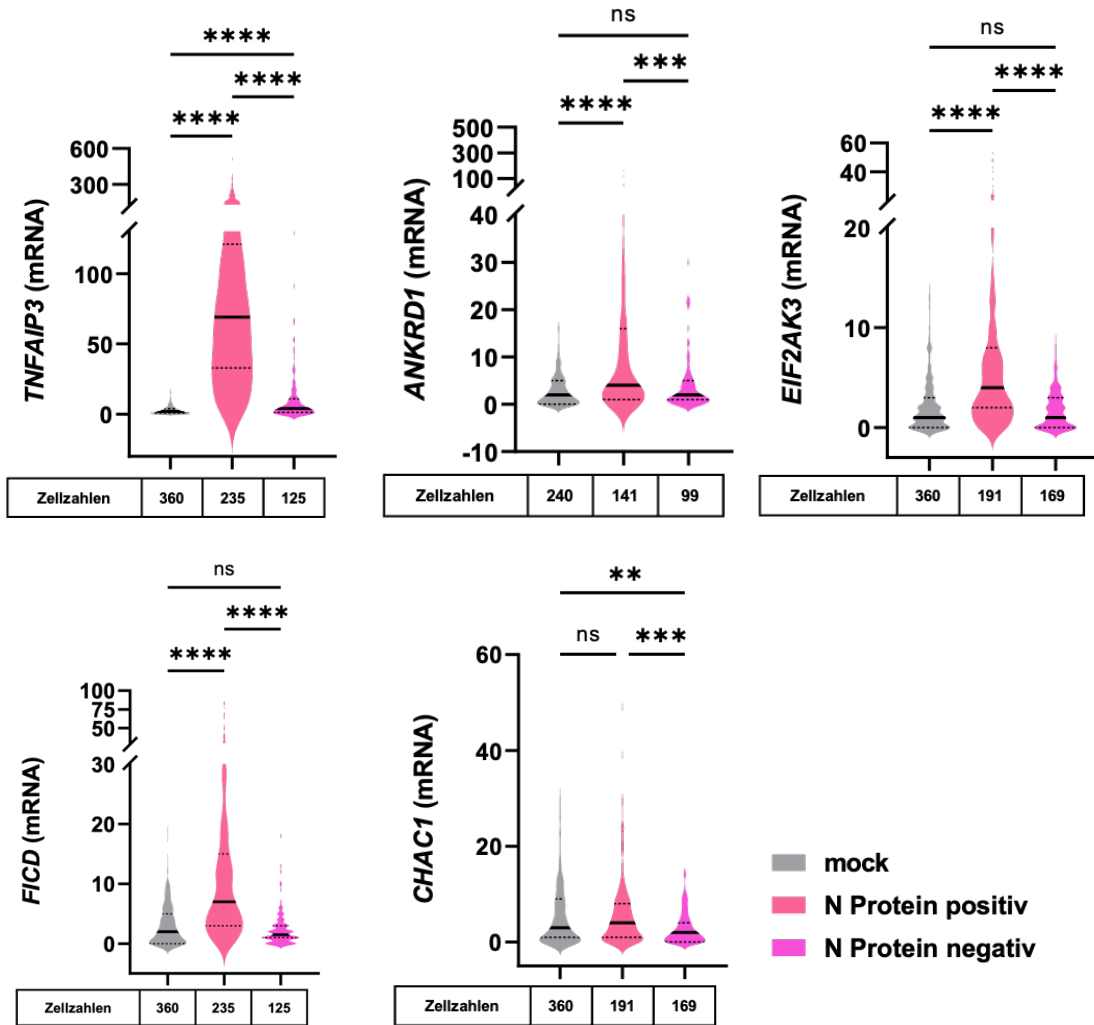




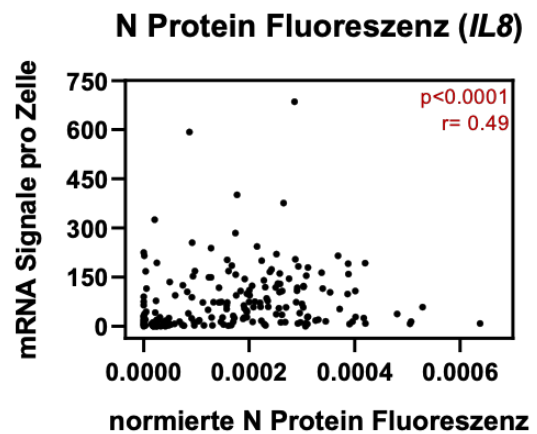
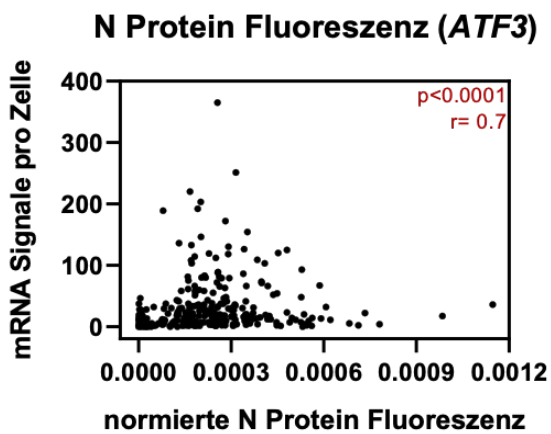
B



- mock
- N Protein positiv
- N Protein negativ



C



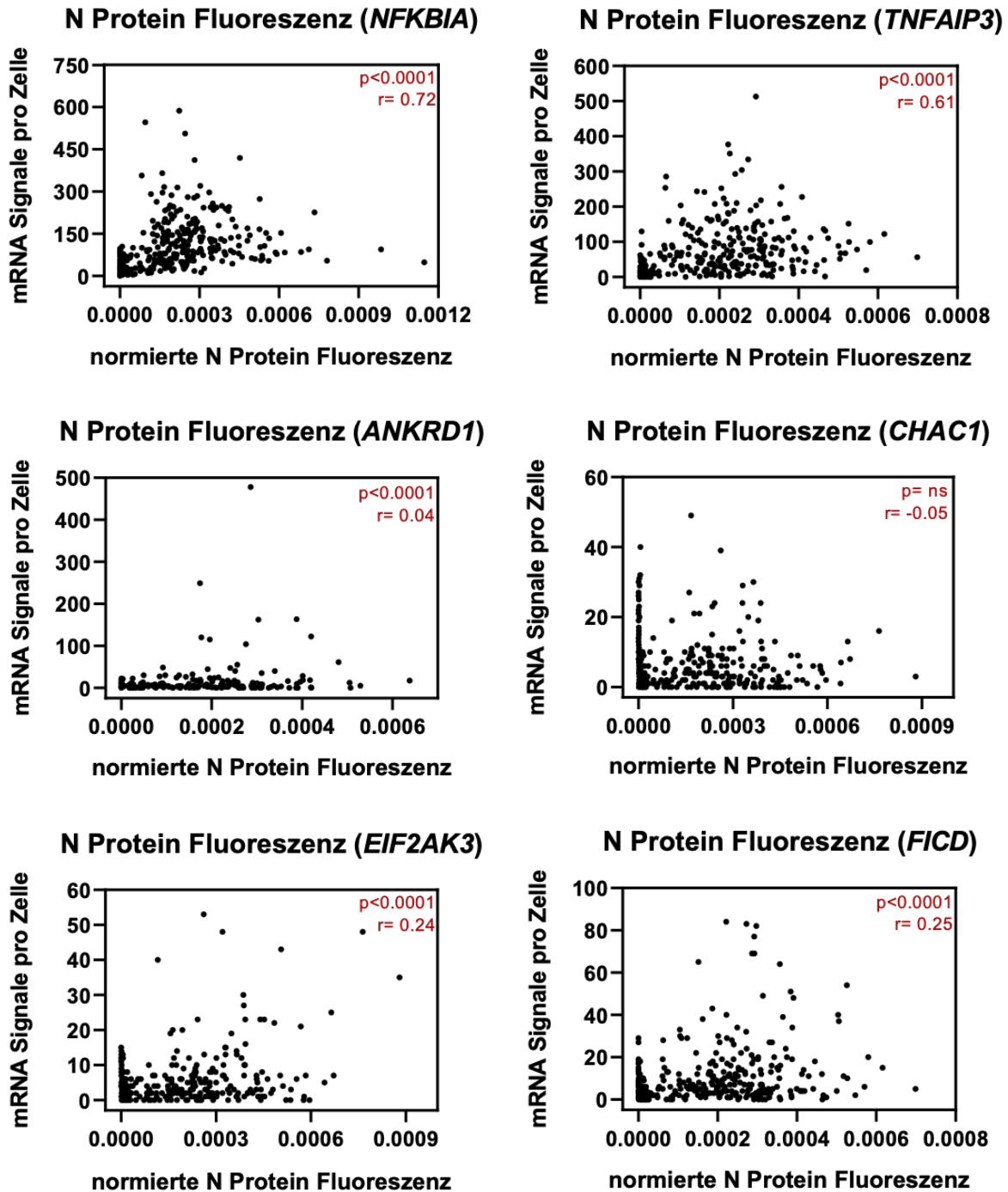


Abb. 16: Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in A549 Zellen nach 96-stündiger Infektion mit HCoV-229E.

Die A549 Zellen wurden in μ -Slides ausgesät und nach 24 h in Kultur mit HCoV-229E infiziert (MOI= 10). Nach einer Stunde wurde der Virusüberstand entfernt und die Reservoire mit Vollmedium aufgefüllt. Alle zwei Tage wurde das Medium erneut gewechselt. Nach 96 h Inkubationszeit bei 33 °C wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und die Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Die Darstellung des N Proteins erfolgte mittels Indirekter Immunfluoreszenz. Die IF-Kontrolle wurde ohne Primärantikörper behandelt. Die Aufnahme und Prozessierung der Bilder erfolgte an dem Mikroskop DMi8 (Leica) mit dem Programm LasX, Leica. Für die Auswertung der Bilder wurden für 120 Zellen pro Bedingung die Zellgrenzen manuell festgelegt und mit dem Programm Icy 2.1.2.0 von France-BioImaging und

dem Institut Pasteur (<http://icy.bioimageanalysis.com>), die mRNA Transkripte pro Zelle gezählt. Zur Differenzierung zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen wurde die Gesamtfluoreszenz des Sekundäntikörpers (Dylight488 bzw Cy3), der an den N Protein-Antikörper (1:100; *mouse*) bindet, gemessen. Anhand der IF-Kontrollen und der *mock* Kanäle wurde zudem der *Cut-off*-Wert festgelegt, ab dem eine Zelle im mit Virus infizierten Kanal als N Protein positiv oder negativ klassifiziert wurde. Die Graphen (**B**, **C**) und die Signifikanztestung wurden mit GraphPad Prism 9.2.1 für MacIntosh, GraphPad Software, SanDiego, California USA, www.graphpad.com, angefertigt.

A: Vergrößerungen von Bildausschnitten aus einer der Versuchsreihen. Maßstabsbalken= 25 µm. *= Helligkeit des Bildes erhöht. Die Übersichtsaufnahmen aller Replikate befinden sich im Anhang (Abb.Anh. 2).

B: Quantitative Darstellung der detektierten mRNA Signale des *mock* und mit HCoV-229E behandelten Kanals, mit zusätzlicher Unterteilung in N Protein positive und negative Zellen des infizierten Kanals. Die Daten wurden in drei unabhängigen biologischen Replikaten erhoben und mittels GraphPad Prism 9.2.1 in Violin Blots zusammengetragen (schwarzer Balken: Median; gestrichelte Linien 25. Perzentile und 75. Perzentile). Es wurde keine normalverteilte Stichprobe angenommen und dementsprechend eine nicht-parametrische Signifikanztestung durchgeführt. Für die Signifikanzanalyse wurde der Kruskal-Wallis-Test und *Dunnett's multiple comparison* verwendet, mit den folgenden Signifikanzniveaus: $p < 0,0001 = ****$; $p < 0,0002 = ***$; $p < 0,0021 = **$; $p < 0,00332 = *$; ns= nicht signifikant.

C: Darstellung der detektierten mRNA Signale in Abhängigkeit von der auf die Zellfläche normierten N Protein Fluoreszenz pro Zelle in Scatter Blots mit GraphPad Prism 9.2.1. Es wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. $p =$ Signifikanzniveau, $r =$ Korrelationskoeffizient.

Auf den Bildausschnitten in **A** kann man die Signale der mRNA Sonden als Punkte der jeweiligen Fluoreszenzfarbe erkennen. In den nicht infizierten Kanälen sind vereinzelt Signale zu sehen, *NFKBIA*, *FICD*, *CHAC1* haben dabei eine höhere basale Expression als die anderen Gene. Die ausgewählten Bildausschnitte zeigen infizierte Zellen mit hohen Transkriptmengen von *NFKBIA*, *TNFAIP3* und *IL8*. In den Kanälen von *CHAC1* und *EIF2AK3* ist hingegen kein deutlicher Unterschied zwischen den infizierten und nicht infizierten Zellen zu sehen. Für *CHAC1* bestätigt sich diese Beobachtung auch in der quantitativen Auswertung (**B**). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl detektierter mRNA Signale in den *mock* Kontrollen und den infizierten Zellen. In den Scatter Blots (**C**) zeigt sich ergänzend keine signifikante Korrelation zwischen der N Protein Fluoreszenz der Zellen und den erfassten *CHAC1* Transkripten.

Für die anderen Gene konnten sowohl signifikant mehr Transkripte in N Protein positiven Zellen im Vergleich zu den *mock* Kanälen als auch zu den N Protein negativen Zellen nachgewiesen werden (**B**). Das bestätigt die Annahme, dass die ER Stress und NF-κB Zielgene vorwiegend in den infizierten Zellen induziert werden.

Interessant ist der Vergleich der Transkriptmengen in den Zellen des *mock* Kanals und den N Protein negativen Zellen in mit HCoV-229E behandelten Kanälen (**B**). Insbesondere bei den Zielgenen des NF-κB Signalweges sind die mRNA Signale in den N Protein negativen Zellen im Vergleich zu denen im *mock* Kanal signifikant erhöht. Dies

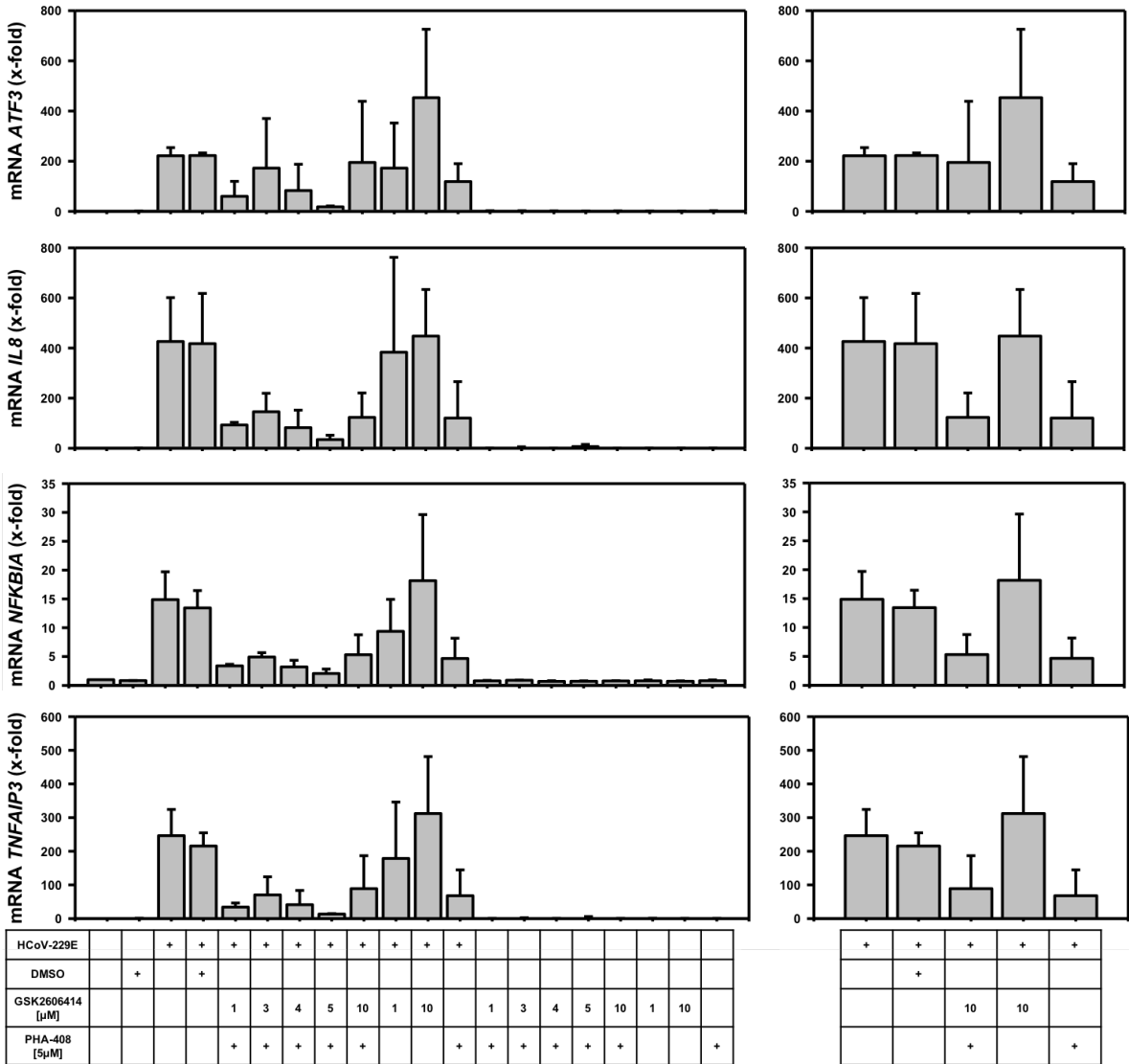
könnte auf parakrine Effekte, z.B. der Freisetzung von IL-1 oder anderen proinflammatorischen Zytokinen aus den infizierten Zellen zurückzuführen sein.

Die Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen der gemessenen N Protein Fluoreszenz und den in der Zelle detektierten mRNA Signalen fielen weniger eindeutig aus (C). Für die Gene *NFKBIA*, *ATF3*, *TNFAIP3* ist eine Korrelation zwischen der N Protein Fluoreszenz und den Transkriptmengen als eher wahrscheinlich zu bewerten. Für die anderen Gene ist ein solcher Zusammenhang bei den Werten der Korrelationskoeffizienten hingegen nicht anzunehmen. Das könnte auch an der insgesamt schwächeren Induktion dieser Gene liegen, insbesondere der des ER-Stress Signalweges. Die Einzelzellanalysen konnten somit nachweisen, dass eine HCoV-229E-Infektion mit Ausnahme des Genes *CHAC1* mit einer signifikanten Expressionsinduktion der untersuchten prototypischen ER Stress und NF- κ B Zielgene einhergeht.

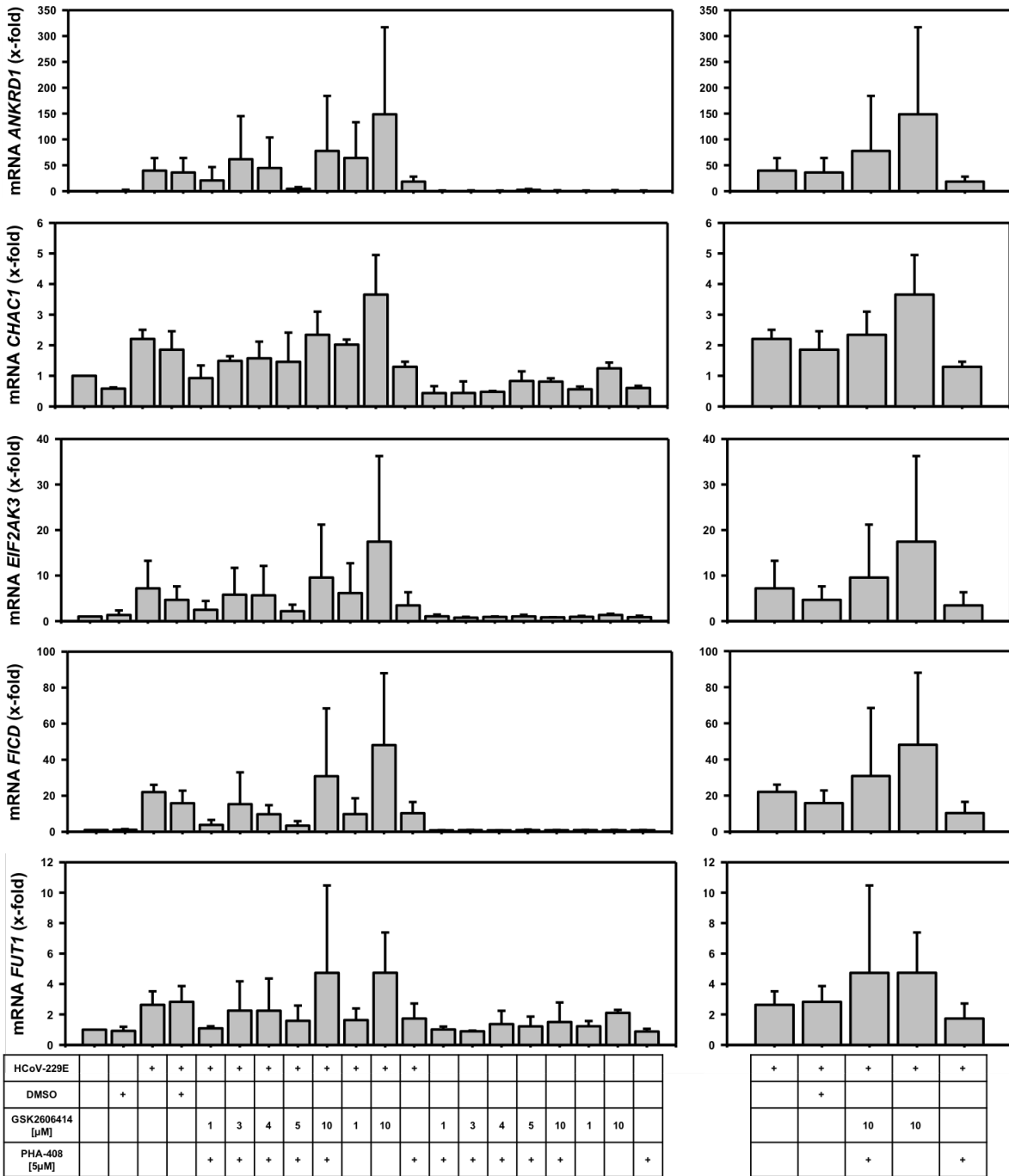
Um die Wirkung der Hemmung der Schlüsselenzyme der aktivierten Signalwege (PERK, IKK) auf die Genexpression in den A549 Zellen zu untersuchen, wurden Konzentrationsreihen mit den Inhibitoren GSK2606414 und PHA-408 durchgeführt.

4.2.3 Konzentrationsreihe des Inhibitors GSK2606414 in A549 Zellen

A



B



dagegen keine Effekte durch die Virusbehandlung zu erkennen, was für *CHAC1* bereits in den Einzelzellanalysen erfasst wurde.

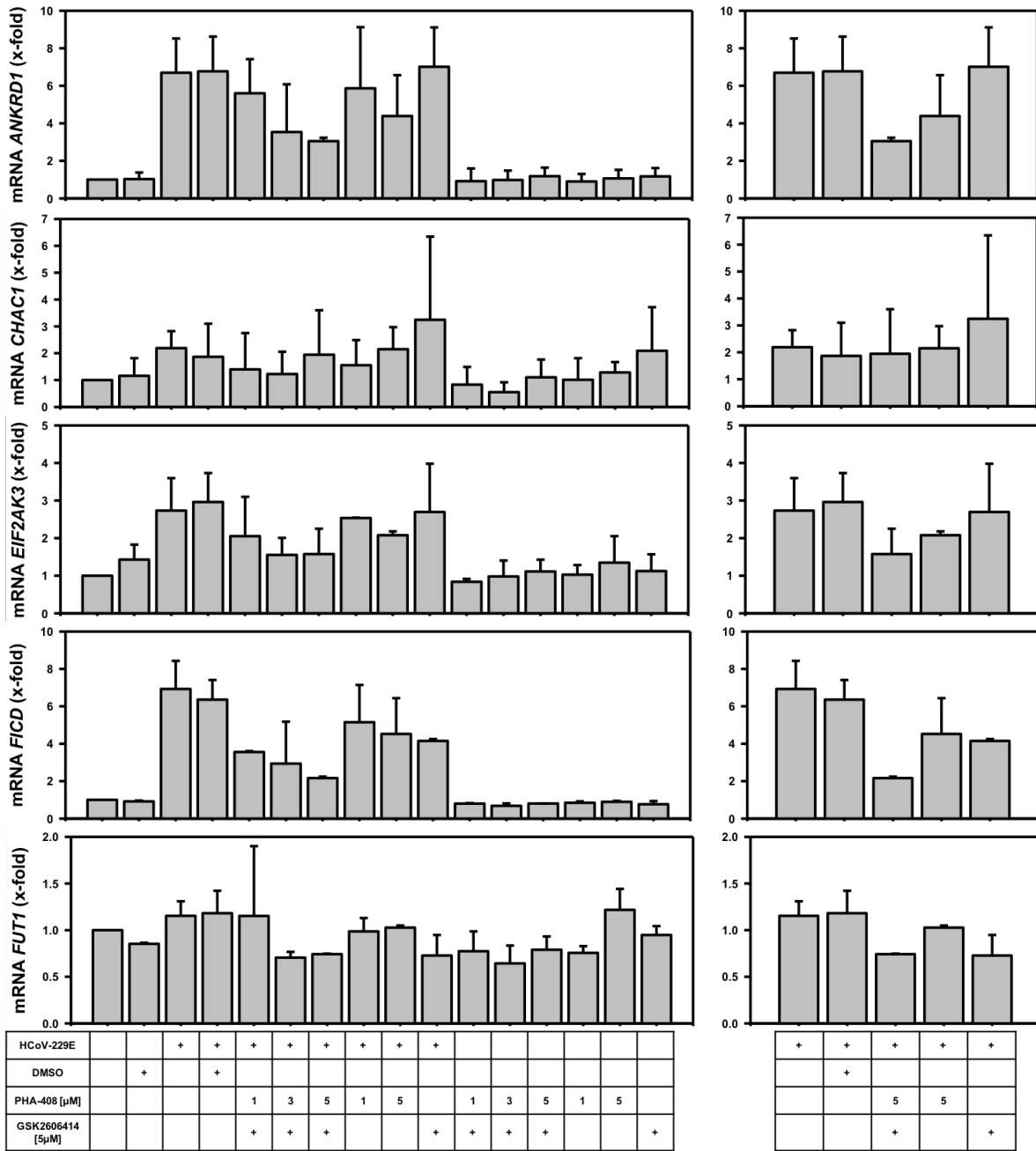
Bei der Beurteilung der einzelnen Inhibitorkonzentrationen müssen die großen Fehlerbalken berücksichtigt werden, die durch die unterschiedlich stark ausgeprägte Induktion der Gene in den biologischen Replikaten zu Stande kommt. Innerhalb der Replikate zeigen sich die gleichen Trends der mRNA Level nach Virus und Inhibitorbehandlungen, was zumindest eine vorsichtige Bewertung der Ergebnisse ermöglicht.

Beim Vergleich der Graphen mit denen der HuH7 Zellen fallen einige Abweichungen auf. Überraschenderweise hat die Kombination der Maximalkonzentrationen von 10 μM GSK2606414 und 5 μM PHA-408 nicht die erwartete starke Suppression der mRNA Level bewirkt. Der alleinige Einsatz von 10 μM des PERK-Inhibitors scheint im Gegenteil sogar die Induktion der Genexpression zu verstärken. Die viralen RNA Mengen zeigen ebenfalls einen starken Anstieg der *x-folds* in dem mit 10 μM GSK2606414 behandelten Ansatz. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Konzentrationsreihen in den HuH7 Zellen. Der Einsatz des PERK-Inhibitors in der verwendeten Höchstdosis hat in den A549 Zellen eine Induktion der Genexpression und Zunahme der Replikation bewirkt.

Ein besserer Hemmeffekt deutet sich bei den Ansätzen mit geringeren GSK-Konzentrationen an. Für *IL8*, *NFKBIA*, *ATF3*, *TNFAIP3*, *ANRKD1*, *FICD* und die virale RNA hat die Kombination aus 5 μM PHA-408 mit 5 μM GSK2606414 die stärkste Reduktion der *x-folds* zur Folge. Sogar für 1 μM GSK2606414 mit 5 μM PHA-408 deutet sich bereits ein effektiver Hemmeffekt an. Aufgrund der großen Fehlerbalken sind feinere Unterschiede innerhalb der mit geringeren Konzentrationen behandelten *wells* nicht zu erkennen.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe können bestätigen, dass es nach der Infektion mit HCoV-229E zu einer Induktion der Genexpression in A549 Zellen kommt und diese sich durch den Einsatz von PERK- und IKK-Inhibitoren supprimieren lässt. Es zeigen sich aber auch deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen der Konzentrationsreihen in den HuH7 Zellen, wie die schwache beziehungsweise fehlende Induktion von *CHAC1* und *FUT1*. Zudem sind in den A549 Zellen geringere Dosierungen der Inhibitoren einzusetzen, um die Virusreplikation und Geninduktion effektiv zu supprimieren. Der auffälligste Befund ist der sich andeutende provirale Effekt der Höchstdosis des PERK-Inhibitors.

B



C

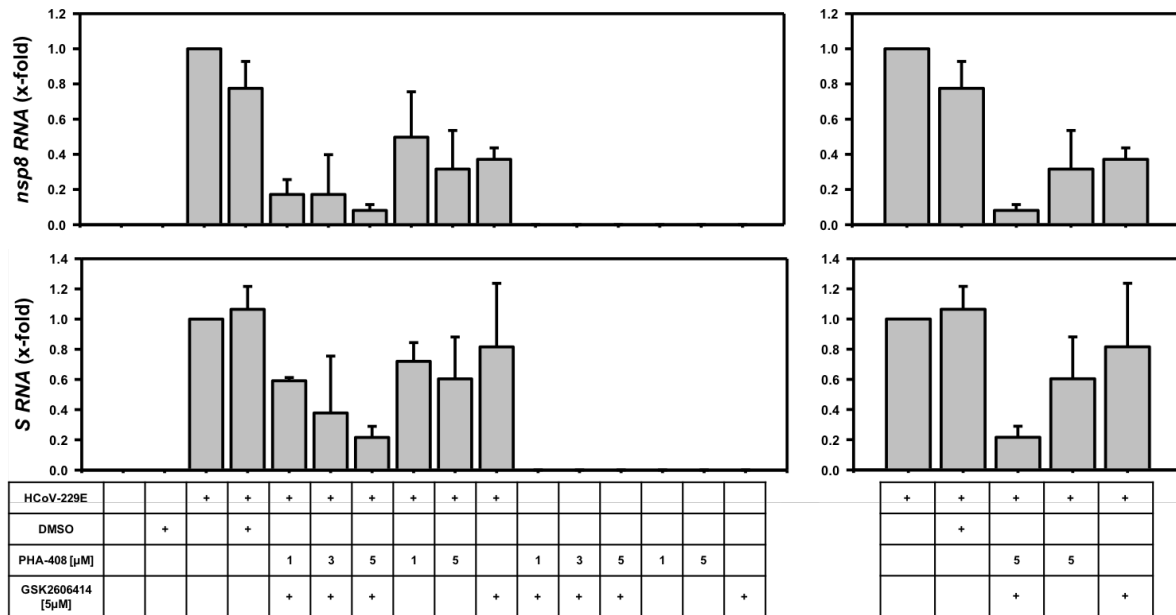


Abb. 18: Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Inhibitors PHA-408 in Kombination mit 5 μM GSK2606414 auf die mRNA Expression ausgewählter Gene des NF-κB Signalweges (A), des ER-Stress Signalweges (B) und der viralen RNA (C) in A549 Zellen nach Infektion mit HCoV-229E.

Für die Konzentrationsreihe wurden $3,5 \times 10^5$ der A549 Zellen pro *well* ausgesät und für 24 h in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des IKKβ-Inhibitors PHA-408 in Kombination mit 5 μM des PERK-Inhibitors GSK2606414 behandelt und nach 30 min mit HCoV-229E infiziert (MOI= 10). Nach 1 h wurde der Virusüberstand entfernt und durch Vollmedium ersetzt. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zellen erneut mit den Inhibitoren behandelt und das Medium gewechselt. Nach 96 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und mit 1 μg der RNA die Reverse Transkription durchgeführt. Die Messung der mRNA Level der Gene erfolgte in der *real-time* qPCR (n= 2). **A, B:** Dargestellt sind die x-fachen (*x-folds*) Änderungen der detektierten mRNA Menge, normiert auf die nicht infizierte und nicht behandelte Kontrolle. **C:** Die virale RNA wurde auf die infizierte, nicht behandelte Kontrolle normiert. Die RNA Level der viralen Proteine *nsp8* (*nsp8 RNA*) und S Protein (*S RNA*) sind Indikatoren einer erfolgreichen Infektion und geben Aufschluss über die Wirkung der Inhibitorbehandlung auf die virale Replikation. In den Abbildungen auf der rechten Seite sind die Maximalkonzentrationen der Inhibitoren zum besseren Vergleich nebeneinander dargestellt.

Die Ergebnisse der PHA-408-Konzentrationsreihe bestätigen erneut anhand der erhöhten Expression der Zielgene, dass es durch HCoV-229E auch in den A549 Zellen zur Aktivierung der Signalwege kommt. Die Expressionsinduktion ist dabei für die Gene des ER-Stress-Signalweges schwächer ausgeprägt. An *CHAC1*, *EIF2AK3* und *FUT1* hat sich das auch in den Einzelzellanalysen und der GSK-Konzentrationsreihe gezeigt. Die Ergebnisse der Replikate weisen untereinander erneut starke Schwankungen der *x-folds* auf, was sich in den Fehlerbalken widerspiegelt.

Wie bereits in der GSK-Konzentrationsreihe beobachtet, deutet sich der beste Hemmeffekt durch die Kombination von 5 μ M GSK2606414 mit 5 μ M PHA-408 an. In der direkten Gegenüberstellung der Einzelbehandlungen mit der Kombination der Inhibitoren in den kleinen Abbildungen lässt sich eine stärkere supprimierende Wirkung auf die virale RNA und die Genexpression durch die Kombination erkennen.

Aufgrund der fehlenden oder nur sehr geringen Expressionsinduktion von CHAC1, EIF2AK3 und FUT1 ist der Effekt bei diesen Genen nicht zu erkennen. Gegebenenfalls könnte mit Hilfe weiterer Replikate eine Induktion der Gene noch sichtbar gemacht werden.

Bei beiden Konzentrationsreihen in den A549 Zellen fallen die starken Schwankungen der detektierten mRNA Mengen auf, was mit den langen Inkubationsperioden und variierenden Infektionsraten zusammenhängen könnte. Es deutet sich an, dass eine Verwendung niedrigerer Konzentrationen der Inhibitoren in den A549 Zellen zielführender wäre. Mit Hilfe weiterer Replikate könnte eine Signifikanztestung angeschlossen werden und gegebenenfalls kleinere Änderungen in der Expression der Gene sichtbar gemacht werden.

4.3 Untersuchung der Genexpression in humanen Alveolaren Epithelzellen nach Infektion mit HCoV-229E

4.3.1 Etablierung der Kultivierung und Infektion von HAEC

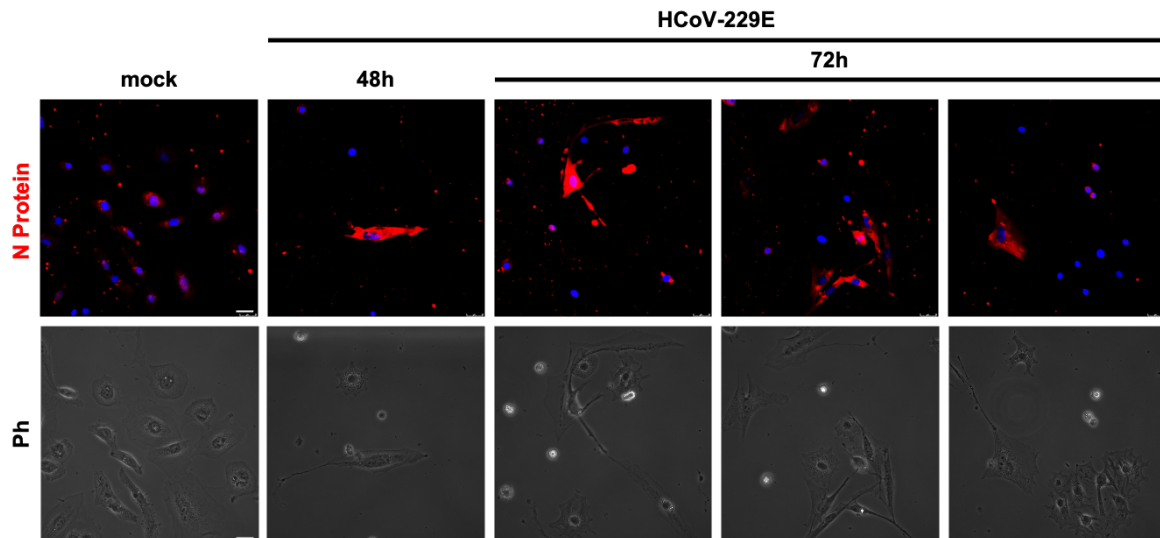


Abb. 19: Kultivierung der humanen Alveolaren Epithelzellen (HAEC) und Untersuchung der Infektionseffizienz nach 48 und 72 h mit HCoV-229E in μ -Slides.

Die Zellen wurden von der AG Herold isoliert und die Reinheit der Präparation mittels FACS-Analyse bestimmt. Für die Versuche wurden 15000 der Zellen pro μ -Slide ausgesät und bei 37 °C in Kultur gehalten, bis die Zellen adhärent waren. Alle zwei Tage wurde das Medium in den Reservoirs gewechselt. Nach vier Tagen wurden die Zellen dreier Kanäle mit HCoV-229E (MOI= 10) infiziert und für 72 h bei 33 °C inkubiert. Die Zellen des vierten Kanals wurden einen Tag später infiziert und für 48 h inkubiert. Der Virusüberstand wurde jeweils nach einer Stunde entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und eine Indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Zum Nachweis der Infektion wurde ein N Protein-Antikörper (1:100; *mouse*) eingesetzt und mit einem Cy3-Sekundärantikörper markiert (rot). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst (blau). n= 1. Die Aufnahme und Prozessierung der Bilder wurde an dem Mikroskop DMi8 (Leica) mit dem Programm LasX, Leica durchgeführt. Maßstabsbalken= 25 μ m. Ph= Phasenkontrast. Die Reinheit der Präparation betrug 82 % in der FACS-Analyse.

Aufgrund der eher geringen Zellzahlen, die aus den Präparationen der AG Herold hervorgingen, wurde sich für Versuchsansätze in μ -Slides entschieden. Mit Hilfe der Indirekten Immunfluoreszenz konnte überprüft werden, ob die Infektion der Zellen erfolgreich war. Das Medium für die Kultur der Primärzellen wurde von der AG Herold zusammengesetzt und zur Verfügung gestellt (siehe Kapitel 2.4).

Bei der Aussaat in den μ -Slides wurden zunächst 30 μ L der Zellsuspension an den Eingang des Kanals pipettiert und 1 h später das Medium in den Reservoiren vorsichtig aufgefüllt. Das Ziel dieser Vorgehensweise beim Aussäen war es, so wenige der nicht adhären Zellen wie möglich aus dem Kanal in die Reservoirs zu spülen, da sie dort nicht gut im Mikroskop zu sehen sind. Anschließend verblieben die Zellen bis zu vier Tage lang im Brutschrank der AG Herold, um Kontaminationen auszuschließen und den Zellen ausreichend Zeit zu geben, adhären zu werden. Nach Freigabe der Zellen wurden sie in das Labor der AG Kracht überführt und dort mit den Virusstocks infiziert. Bereits innerhalb der ersten Tage der Kultur war deutlich zu erkennen, dass die Primärzellen, verglichen mit den Tumorzelllinien, weniger schnell adhären werden und nur ein geringer Anteil der ausgesäten Zellzahl in den Kanälen tatsächlich anwächst. In den Aufnahmen im Phasenkontrast zeigte sich eine große morphologische Varianz der Zellen und es befanden sich viele zusätzliche Bestandteile, mutmaßlich Zellreste, im Kanal. Trotz der geringen Zellzahlen konnten in den Kanälen eine Handvoll N Protein positive Zellen nachgewiesen werden. Für eine quantitative Auswertung der Infektionseffizienz war dies jedoch nicht ausreichend.

Der erste Versuch mit den Primärzellen zeigte, dass eine Kultivierung und Infektion der HAEC in μ -Slides technisch funktioniert, allerdings noch optimiert werden musste.

4.3.2 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Wirtszellantwort der humanen Alveolaren Epithelzellen auf Einzelzellebene

Mit der Präparation aus 4.3.1 wurde parallel eine Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Glas- μ -Slides durchgeführt, um die Genexpression auf Einzelzellebene zu untersuchen.

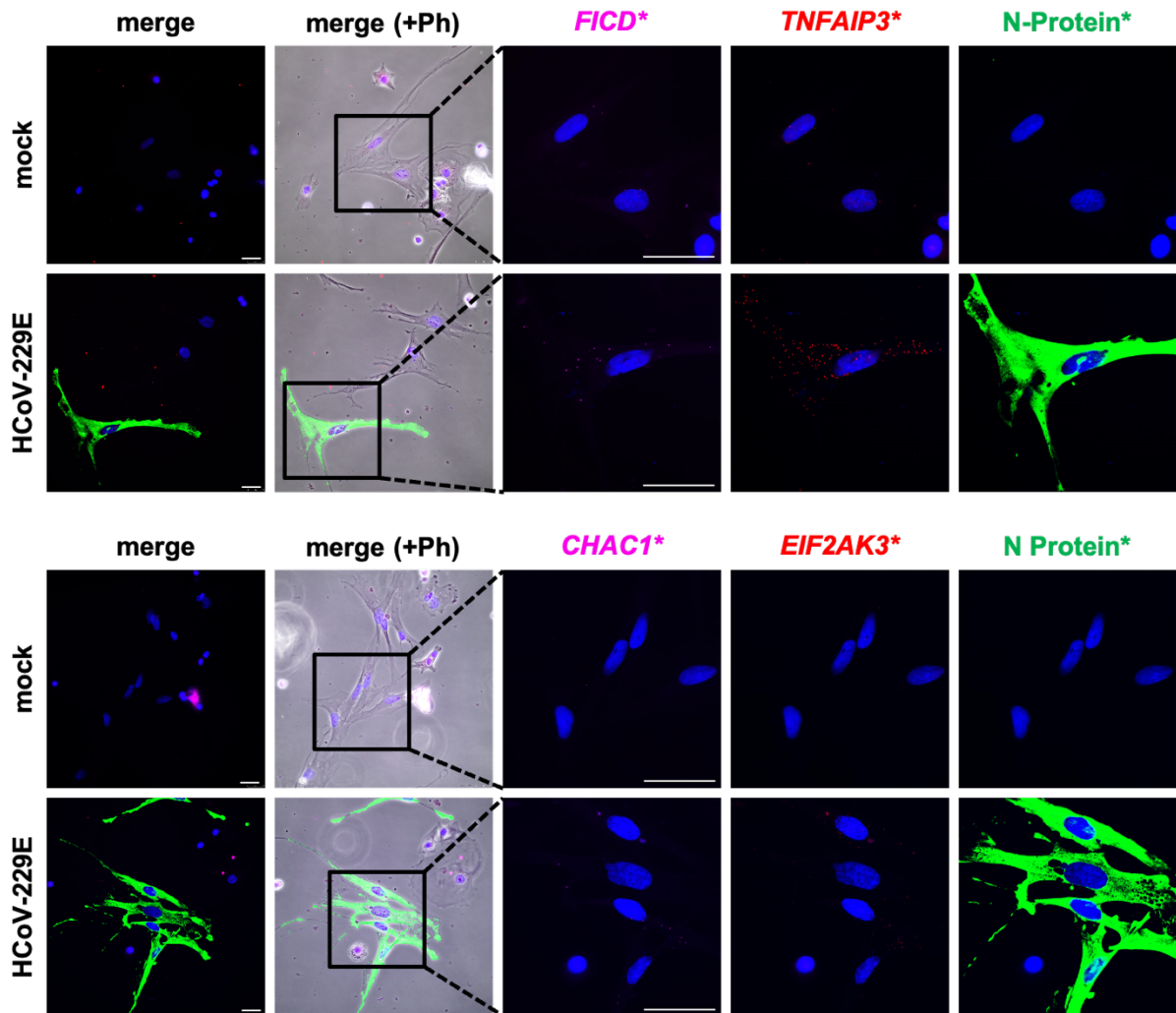


Abb. 20: Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in humanen Alveolaren Epithelzellen nach Infektion mit HCoV-229E für 72 h in Glas- μ -Slides.

Die HAEC wurden mit 15000 Zellen pro μ -Slide ausgesät und bei 37 °C in Kultur gehalten, bis sie adhären waren. Alle zwei Tage wurde das Medium in den Reservoiren gewechselt. Nach vier Tagen wurden die Zellen mit HCoV-229E infiziert (MOI= 10). Der Virusüberstand wurde nach einer Stunde entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Nach 72 h bei 33 °C wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und eine Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Zum Nachweis der Infektion wurde ein N Protein-Antikörper (1:100; *mouse*) eingesetzt und mit einem Dylight488-Sekundärantikörper markiert (grün). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst (blau). Die IF-Kontrolle wurde nicht mit dem Primärantikörper behandelt. Die Aufnahme und Prozessierung der Bilder erfolgte mit dem Mikroskop DMi8 (Leica) und dem Programm LasX von Leica. n= 1. Maßstabsbalken= 25 μ m. Ph= Phasenkontrast. Die Reinheit der Präparation betrug 82 % in der FACS-Analyse. *= Helligkeit erhöht.

Die Problematik, dass zu wenige Zellen in den Kanälen adhären wurden, zeigte sich auch in der Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung. Trotz dessen konnten einzelne infizierte Zellen und Fluoreszenzsignale der mRNA Sonden gesehen werden, was die Funktionalität des Protokolls und der Methodik bestätigte. Auf dem gezeigten Bildausschnitt ist zu erkennen, dass die infizierte Zelle mehr Transkripte der Gene *TNFAIP3* und *FICD* enthielt als die benachbarten nicht infizierten Zellen. Für die *CHAC1* und *EIF2AK3* Sonden sind insgesamt nur sehr wenige Signale zu sehen. Angesichts der Ergebnisse der Einzelzellanalysen in den A549 Zellen war das kein unerwartetes Ergebnis. Eine quantitative Auswertung der Ergebnisse wurde aufgrund der geringen Zellzahlen nicht vorgenommen.

Die Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung bestätigte die erfolgreiche Infektion der HAEC mit HCoV-229E. Zudem zeigten sich erste Hinweise für eine Expressionsinduktion der Zielgene in den infizierten Zellen. Um dies evaluieren zu können, bedarf es einer höheren Zelldichte in den μ -Slides.

Nachdem die Ergebnisse der Infektionskinetiken und Einzelzellanalysen in den A549 Zellen (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) vorlagen, wurden die Protokolländerungen für die Infektion in den HAEC entsprechend übernommen. Bei der nächsten Präparation wurden die Zellen für 96 h mit einer MOI von 10 infiziert. Zudem wurden die Primärzellen für die Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in mit Kollagen IV beschichtete μ -Slides ausgesät, um die Adhärenzzeit der Zellen zu verkürzen. Zusätzlich wurden mehr Zellen pro Kanal ausgesät und die *CHAC1* und *EIF2AK3* Sonden wurden durch *IL8* und *NFKB1A* ersetzt. Diese zeigten eine starke Induktion durch HCoV-229E in den A549 Zellen.

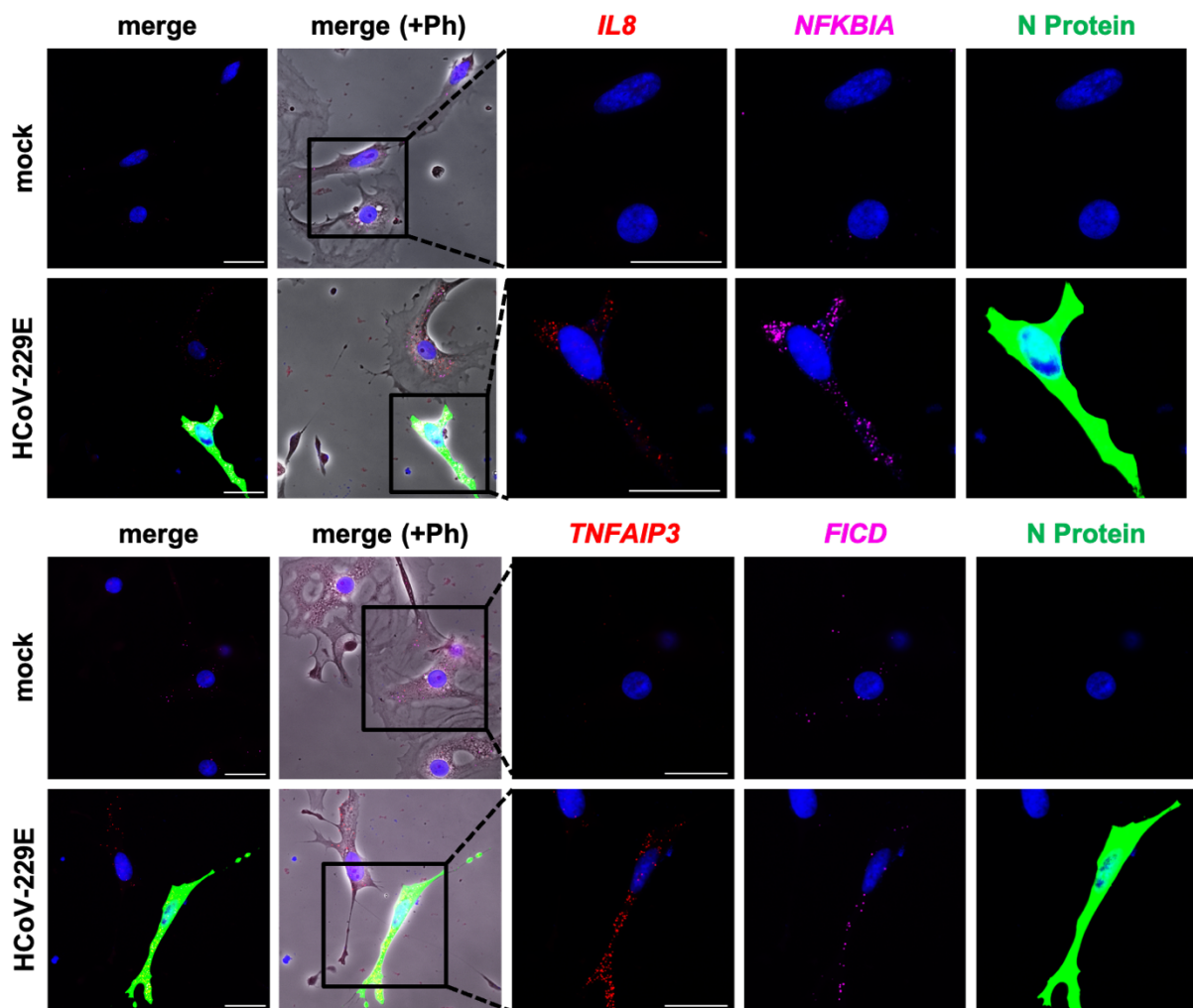


Abb. 21: Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in humanen Alveolaren Epithelzellen nach Infektion mit HCoV-229E für 96 h in Kollagen IV-beschichteten μ -Slides.

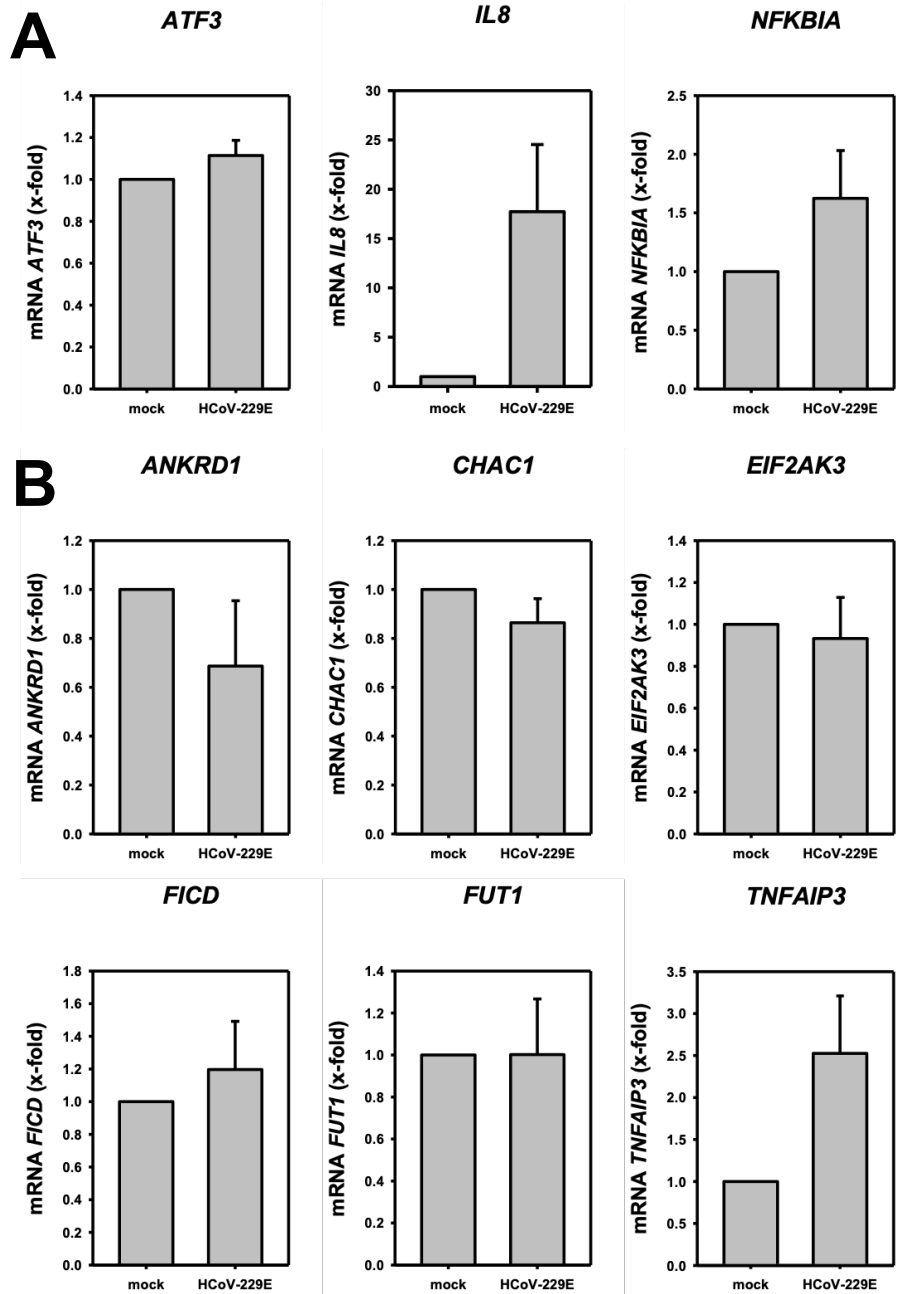
20-30000 HAEC wurden in mit Kollagen IV beschichtete μ -Slides ausgesät. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach sechs Tagen wurden die Zellen mit HCoV-229E infiziert (MOI= 10). Der Virusüberstand wurde nach einer Stunde entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Nach 96 h Inkubationszeit bei 33 °C wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und eine Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Zum Nachweis infizierter Zellen wurde ein N Protein-Antikörper (1:100; *mouse*) eingesetzt und mit einem Dy488-Sekundärantikörper markiert (grün). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst (blau). Die IF-Kontrolle wurde ohne Primärantikörper behandelt. Die Aufnahme und Prozessierung der Bilder erfolgte mit dem Mikroskop DMi8 (Leica) und dem Programm LasX von Leica. n= 1. Maßstabsbalken= 25 μ m. Ph= Phasenkontrast. Die Reinheit der Präparation betrug 89 % in der FACS-Analyse.

Bei Betrachtung im Mikroskop konnten mehr Zellen in den Kanälen gesehen werden als bei den Vorversuchen, jedoch lag noch kein konfluenter Zellrasen vor. Auch die Zahl der infizierten Zellen war in den Kanälen im einstelligen Bereich. Die ausgewählten Bildausschnitte zeigen zwei infizierte Zellen, in denen größere Mengen der mRNA von *TNFAIP3* und *FICD* beziehungsweise *IL8* und *NFKBIA* zu sehen sind.

Die Verwendung der Kollagen IV-beschichteten μ -Slides hatte in der subjektiven Wahrnehmung einen positiven Effekt auf die Adhärenz der Zellen. Die ausgesäte Zellzahl sollte dennoch deutlich höher gewählt werden, um sich einem konfluenten Zellverbund anzunähern. Bei der Arbeit mit Primärzellen ist der Einfluss auf die Verfügbarkeit und die Anzahl der isolierten Zellen jedoch stark eingeschränkt.

Dennoch gelang es, nachgewiesen sowohl in der Indirekten Immunfluoreszenz als auch in der RNA-*in situ* Hybridisierungen, erfolgreich HAEC zu kultivieren und mit HCoV-229E zu infizieren. Der Nachweis von Fluoreszenzsignalen der mRNA-Sonden in den infizierten Zellen bestätigt außerdem die Funktionalität des verwendeten Protokolls und zeigt erste Hinweise auf eine Induktion der Zielgene durch HCoV-229E in den HAEC.

4.3.3 Untersuchung der Genexpression mittels *real-time* RT-qPCR in humanen Alveolaren Epithelzellen nach der Infektion mit HCoV-229E



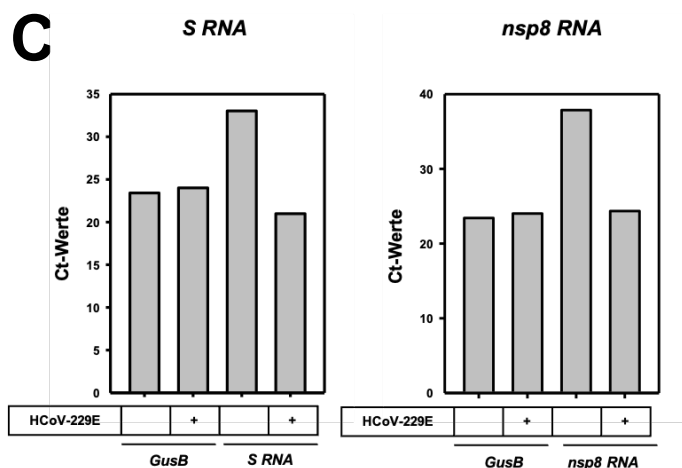


Abb. 22: Auswirkung der HCoV-229E Infektion auf die mRNA Expression ausgewählter Gene des NF- κ B Signalweges (A), des ER-Stress Signalweges (B) und der viralen Proteine (C) in humanen Alveolaren Epithelzellen.

Die HAEC wurden mit $1,5-1,7 \cdot 10^6$ Zellen pro *well* ausgesät und für vier Tage bei 37°C in Kultur gehalten. Die Zellen wurden im Anschluss mit HCoV-229E infiziert (MOI= 10). Nach 1 h wurde der Virusüberstand entfernt und durch Medium ersetzt. Alle zwei Tage wurde ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt. Nach 96 h Inkubation bei 33°C wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und mit $1\ \mu\text{g}$ der RNA die Reverse Transkription durchgeführt. Die Messung der mRNA Level der Gene erfolgte in der *real-time* qPCR (n= 3). C: Die exemplarisch für ein Replikat gezeigten Ct-Werte der viralen RNA bestätigen die Infektion der Zellen. Zum Vergleich sind die Ct-Werte von *humanen GusB* dargestellt (für die Werte aller Replikate siehe im Anhang Abb.Anh. 3). Die Reinheit der Präparationen betragen 88 %, 89 % und 93 % in der FACS-Analyse.

Die Ergebnisse der RT-qPCR bestätigen, dass die Kultivierung und Infektion der HAEC möglich ist. Im Lichtmikroskop zeigte sich trotz der hohen Anzahl ausgesäter Zellen kein konfluenter Zellrasen. Aufgrund der Vorergebnisse in den Einzelzellanalysen und den Ct-Werten der viralen RNA ist davon auszugehen, dass zum Ende der Inkubationszeit nur wenig infizierte Zellen vorlagen. Bei einer geringen Infektionsrate können sich Veränderungen der Genexpression in den infizierten Zellen nicht von der Gesamtheit innerhalb des *wells* abheben. Die virale Induktion von *IL8* war als einziges mit einer Zunahme der *x-folds* auf 25 zu erkennen. Für *TNFAIP3* und *NFKIBA* wurden nur minimal erhöhte Mengen der mRNA in den infizierten Ansätzen gemessen. Bei den anderen Genen waren die Differenzen zwischen der infizierten Probe und der *mock* Kontrolle so gering, dass sich kein Einfluss der Infektion auf die Expression der Gene erkennen lässt. Wenn für die qPCR keine ausreichend hohen Infektionsraten in den HAEC erreicht werden können, stellt die Einzelzellanalyse eine geeignetere Methode dar, um auch bei geringen Infektionsraten Expressionsänderungen erfassen zu können.

5 Diskussion

5.1 Die Dysregulation der Immunantwort durch Coronaviren

Mit dem Auftreten der ersten schweren CoV-Pneumonien 2002 stellte sich die Frage, welche Eigenschaften das neuentdeckte SARS-CoV von den bis dato bekannten humanen CoV unterscheidet (Tsang et al., 2003).

Aus den klinischen Verläufen, den stark erhöhten Zytokinlevel im Labor und den histologischen Befunden mit schweren lokalen Entzündungen wurde ersichtlich, dass die Dysregulation der Immunantwort einen Hauptpathogenitätsfaktor des Virus darstellt (Channappanavar and Perlman, 2017)(Gu et al., 2005)(He et al., 2006)(Lee et al., 2003). Die Kombination aus Gewebetropismus und dysregulierter Immunantwort resultiert in einer hohen Morbidität und Mortalität der hochvirulenten CoV-Spezies SARS-CoV, MERS-CoV in PatientInnen ohne vorherigen Kontakt zu diesen Viren (Arabi et al., 2014)(Zumla et al., 2015).

Die Aktivierung der Immunantwort bei einer Infektion mit CoV ist grundsätzlich eine natürliche und erwünschte Reaktion des Körpers auf eine Infektion. Kommt es jedoch, wie bei CoV beobachtet, zu einer überschießenden Immunreaktion, kann dies dem Organismus zusätzlichen Schaden zufügen. Diese Dysregulationen sind begleitet von einem überproportionalen Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, TNF α , IL-1, IL-6, CLC-2, IFN- γ und stehen im Zusammenhang mit einem schlechteren *outcome* der Patienten (Cheung et al., 2005)(He et al., 2006)(Huang et al., 2020)(Mehta et al., 2020)(Wong et al., 2004).

Die hohen Mengen proinflammatorischer Zytokine bis hin zum sogenannten Zytokinsturm bei SARS-CoV Patienten veranlassten klinische und experimentelle Arbeitsgruppen bereits während des ersten CoV-Ausbruches 2002 dazu, erste Therapieversuche mit Immunmodulatoren wie dem Glucocorticoid Dexamethason zu starten (Auyeung et al., 2005)(He et al., 2006)(Ho et al., 2003). Für COVID-19 konnte eine geringere 28-Tages-Mortalität beatmeter PatientInnen nach Dexamethason-Gabe nachgewiesen werden (RECOVERY Collaborative Group et al., 2021). Eine solche unspezifische Hemmung des Immunsystems kann allerdings auch mit vielen unerwünschten Arzneimittelwirkungen einhergehen. Es fehlt an spezifischen Therapien, die in der späten, post-virämischen Phase der Infektion ansetzen, in der proinflammatorische Prozesse dominieren und antivirale Substanzen wie Remdesivir und Nirmatrelvir/Ritonavir vermutlich weniger wirksam sind (Kluge et al., 2022) (“RKI -

Coronavirus SARS-CoV-2 - COVID-19: Therapiehinweise und Empfehlungen,” n.d.). Daher wäre eine zielgerichtete und für das Virus spezifisch angepasste Therapie zu bevorzugen. Das setzt ein besseres Verständnis der Wirtszell-Virus-Interaktionen voraus, um die Signalwege und Schlüsselenzyme zu identifizieren, die sich für pharmakologische Interventionen eignen.

5.1.1 HCoV-229E induziert proinflammatorische Signalwege in HuH7 und A549 Zellen

Dass es durch CoV zu einer Induktion von proinflammatorischen Signalwegen in den Wirtszellen kommt, ist aufgrund der klinischen Befunde eine naheliegende Hypothese. Um diese zu überprüfen, wurden Transkriptom-Analysen infizierter Zellen durchgeführt, z.B. in der von einem hepatozellulären Karzinom abgeleitete Modellzelllinie HuH7, welche sich sowohl mit HCoV-229E, als auch mit SARS-CoV infizieren lässt (Hofmann et al., 2004)(Simmons et al., 2004)(Tang et al., 2005). Frühe *microarray* Analysen ergaben eine Vielzahl deregulierter Gene in den mit HCoV-229E und SARS-CoV infizierten Zellen. Dabei fielen insbesondere die Expressionsänderungen von Genen des Immunsystems, proapoptotischer und proinflammatorischer Signalwege wie *IL8* und *NFKBIA* auf. Die SARS-CoV Infektion bewirkte stärkere und ausgedehntere Veränderungen des Transkriptoms als das weniger pathogene HCoV-229E (Tang et al., 2005). Für andere CoV wie das *murine hepatitis virus* (MHV) (Versteeg et al., 2007) oder dem *infectious bronchitis virus* (IBV) (Cong et al., 2013)) konnten ähnliche Ergebnisse erhoben werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurden die in *microarray* Analysen identifizierten dysregulierten Gene mittels *overrepresentation analysis* Signalwegen und anderen zelluläre Prozessen zugeordnet. Dafür wurden zwei unterschiedliche humane Zelllinien mit HCoV-229E infiziert, die schon erwähnte HuH7 Zelllinie sowie die Alveolarkarzinomzelllinie A549. Die Ergebnisse zeigten, dass es nach der Infektion mit HCoV-229E zu einer Expressionsinduktion von Genen des NF- κ B Signalweges und des ER-Stress Signalweges (*Unfolded Protein Response*) kommt. Anhand von mit inaktiviertem Virusüberstand behandelten Kontrollen konnte der Einfluss von im Virusstock enthaltenen Bestandteilen auf die Signalwege ausgeschlossen werden (M Poppe et al., 2017)(Poppe, 2017). Auf diesen Daten basiert die Auswahl der Gene, anhand derer die Effekte der Virusinfektion und Inhibitorbehandlung auf die Zellreihen im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Die Ergebnisse der Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen von Inhibitoren der NF- κ B und ER-Stress Systeme (siehe Kapitel 4.1) zeigen einen deutlichen Anstieg der Transkriptmengen für die untersuchten Gene in den infizierten, nicht mit Inhibitor behandelten Ansätzen. Das bestätigt die zitierte Beobachtung, dass die Expression der Zielgene des ER-Stress und NF- κ B Signalweges durch HCoV-229E in den HuH7 Zellen induziert wird.

Die *Unfolded Protein Response* (UPR) oder ER-Stress Signalkaskade ist ein Kompensationsmechanismus, mit dem die Zelle auf eine Anhäufung von unvollständig oder fehlgefalteten Proteinen am ER reagiert und die Proteinbiosynthese drosselt (Hetz et al., 2020). Da die Virusreplikation, insbesondere das *budding* und *assembly* der Virionen, am ER stattfindet und daran auch Chaperone der Zelle beteiligt sind, können Infektionen zur Aktivierung der UPR führen (Fung and Liu, 2014)(Masters, 2006). Zusätzlich gibt es zelleigene Abwehrmechanismen, welche die bei der Replikation des viralen Genoms entstandene doppelsträngige RNA (dsRNA) detektieren. Die dsRNA aktiviert die *double-stranded RNA-dependent Protein Kinase* (PKR), welche wiederum den Translationsinitiator eIF-2 α phosphoryliert, wodurch die Translation heruntergefahren wird (Clemens and Elia, 1997)(De Haro et al., 1996). Bei einer dauerhaften Aktivierung der UPR kommt es schließlich zur Induktion proapoptotischer Signalwege, beispielsweise über die Expression des Transkriptionsfaktors *C/EBP homologous protein* (CHOP oder auch GADD153) (Fung and Liu, 2014)(Marciniak et al., 2004).

Für viele Viren wie Influenza A (Bercovich-Kinori et al., 2016), HIV-1 (Ventoso et al., 2001) oder HSV-1 (Dauber et al., 2014) und auch Coronaviren (Chan et al., 2006)(Hilton et al., 1986)(Kamitani et al., 2006)(Raaben et al., 2007) konnte gezeigt werden, dass sie die ER-Stressachse aktivieren und die Wirtszelltranslation herunterfahren (*host-shutoff*). Als Konsequenz wird die Produktion der viralen Proteine beschleunigt und die Synthese antiviral wirksamer Proteine gehemmt (He, 2006)(Schulz, 2016)(Thompson and Sarnow, 2000). Dieser Mechanismus könnte Grund dafür sein, dass die Hemmung der ER-Stressachse mit dem PERK-Inhibitor GSK2606414 zu einer verringerten Replikation von HCoV-229E führt. Das wird durch die Ergebnisse der Plaque Assays bestätigt (siehe Abb. 12), in denen niedrigere Virustiter in den Überständen der mit GSK2606414 behandelten Ansätze im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollen nachgewiesen werden konnten.

Die Aktivierung der UPR durch CoV ist daher vermutlich nicht nur ein Nebeneffekt des Zellstresses durch die Infektion oder ausschließlich auf die Abwehrreaktion der Zelle zurückzuführen, sondern ein sehr spezifischer und feinregulierter Mechanismus (Shaban et al., 2021), über den Coronaviren direkt oder indirekt auch ihre Replikation vorantreiben und die Immunreaktion der Wirtszellen beeinflussen können. Es bietet sich also an, die virale Induktion dieser Signalwege für pharmakologische Interventionen zu nutzen.

Da sowohl die Zielgene des ER-Stress Signalweges als auch die des NF- κ B Signalweges durch HCoV-229E induziert werden, war es naheliegend, zusätzlich einen Inhibitor der NF- κ B-Signalkaskade zu verwenden. In Tierversuchen mit Mäusen wurde zudem eine reduzierte NF- κ B-Aktivierung mit höheren Überlebensraten einer SARS-CoV Infektionen in Verbindung gebracht (DeDiego et al., 2014). Auch bei der Suche nach neuen COVID-19-Therapien sind Inhibitoren der NF- κ B Signalkaskade in den Fokus der Forschung gerückt (Kircheis et al., 2020).

5.2 Untersuchungen der Genexpression und Inhibitorwirkung in mit HCoV-229E infizierten HuH7 und A549 Zellen

5.2.1 Die Anpassung der Infektionsbedingungen in den A549 Zellen

Humane CoV infizieren *in vivo* nicht nur die Zellen des Respirationstraktes (Jonsdottir and Dijkman, 2016), sondern auch Zellen anderer Organe, wie der Niere, Leber und des Darmes (Gu et al., 2005). Deshalb ist es wichtig, auch *in vitro* die Wirtszellreaktion und Inhibitorwirkung in unterschiedlichen Zellkulturmodellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Experimente sowohl in HuhH7 als auch in A549 Zelllinien durchgeführt. Es hatten sich allerdings bereits im Zuge der Transkriptomanalysen unserer Arbeitsgruppe Problematiken aufgezeigt, welche die Infektionsversuche mit den A549 Zellen erschwerten. Bei vergleichbarer MOI und Infektionszeit wie in den HuH7 Zellen waren deutlich weniger Zellen infiziert, und die Infektion breitete sich unregelmäßig und eher im Randbereich der Zellkulturgefäße aus (Poppe, 2017).

Für die Versuche in den A549 Zellen musste dementsprechend das Infektionsprotokoll angepasst werden, um eine ausreichend hohe Infektionseffizienz zu erreichen. Die zu dem Zweck angefertigten Infektionskinetiken zeigten eine Zunahme der Zahl infizierter Zellen mit steigender Inkubationsdauer (siehe Kapitel 4.2.1). Aufgrund der Beschaffenheit des Mediums und der stark reduzierten Zellzahl am Ende der 120-stündigen Infektion wurde sich, zu Lasten der Infektionsrate, für die kürzere Inkubationszeit von 96 h entschieden.

Zusätzlich wurde ein Mediumwechsel 1 h nach der Infektion und anschließend alle zwei Tage durchgeführt.

Die während der Inkubationszeit replizierten und freigesetzten Virionen wurden durch den Mediumwechsel aus dem Überstand entfernt, was die Virustiter und die Infektionsausbreitung zusätzlich reduzieren könnte. Die direkte Übertragung von Zelle zu Zelle ist dann ausschlaggebend für die Infektionsrate. *In vivo* macht dies für viele Viren ohnehin den größeren Anteil der Ausbreitungsform aus, da hierdurch Abwehrzellen, neutralisierende Antikörper und andere Faktoren, die die Übertragungen von Virionen über größere Distanzen erschweren, vermieden werden (Sattentau, 2008)(Sewald et al., 2016). Für SARS-CoV-2 konnte die *cell-to-cell transmission* bereits in der Zellkultur nachgewiesen werden (Zeng et al., 2022). In den HuH7 Zellen wird sich diese Form der Ausbreitung bei der Titerbestimmung im Plaque Assay zu Nutze gemacht (Weil et al., 2022)(siehe Kapitel 3.1.4.2). Das clusterähnliche Muster, in dem sich die HCoV-229E-infizierten Zellen im Ibidi μ -Slide verteilen, deutet daraufhin, dass der *cell-to-cell spread* auch in den A549 Zellen einen großen Anteil an der Infektionsausbreitung hat. Der Einfluss des Mediumwechsels auf die Infektionseffizienz dürfte eher gering ausfallen und wurde als limitierender Faktor in Kauf genommen, um die Zellen mit ausreichend Medium- und Serumbestandteilen zu versorgen. Die Infektionszeit wurde auf 96 h festgelegt, da sich hier die ersten zytopathischen Effekte zeigten, ohne dass sich bereits zu viele Zellen abgelöst hatten.

5.2.2 Expressionsinduktion der Gene auf Einzelzellebene in A549 Zellen

Um für die festgelegten Kulturbedingungen und Infektionszeiträume die Induktion der Zielgene auf Einzelzellebene zu überprüfen, wurden Immun-RNA *in situ* Hybridisierungen in den A549 Zellen durchgeführt (Kapitel 4.2.2). Die Auswertung zeigt eine signifikante Induktion der Expression von *ATF3*, *IL8*, *NFKBIA*, *TNFAIP3*, *FICD*, *ANKRD1* und *EIF2AK3* in den A549 Zellen durch HCoV-229E. Die Expressionsänderung in den N Protein positiven Zellen war sowohl im Vergleich zu den *mock* Kontrollen als auch zu den in derselben Kultur befindlichen N Protein negativen Zellen signifikant. Diese Ergebnisse sind mit Befunden aus mittels Lasermikrodissektion separierten infizierten und nicht-infizierten A549 Zellen von Poppe *et al.* konsistent (M Poppe et al., 2017).

Für *CHAC1* konnte keine Expressionsänderung im Vergleich zu *mock* Kontrollen nachgewiesen werden (siehe Abb.16, B). Lediglich innerhalb der mit Virus behandelten

Zellkultur findet sich eine Zunahme der Transkripte in den N Protein positiven Zellen. *CHAC1* wird als proapoptotisches Protein charakterisiert, dessen Expression unter anderem von der UPR reguliert wird (Mungrue et al., 2009). Möglicherweise steigt die Expressionsrate von *CHAC1* erst zu deutlich späteren Zeitpunkten der Infektion in den A549 Zellen an, wenn es zu einer vermehrten Aktivierung proapoptotischer Signalwege kommt.

Die Unterschiede der beiden Zelllinien A549 und Huh7 hinsichtlich der Wirtszellreaktion auf die Infektion mit HCoV-229E können vielfältige Gründe haben. Für SARS-CoV und SARS-CoV-2 liegen Studien vor, in denen unterschiedliche Zellsysteme und die Effekte auf die Virusreplikation untersucht wurden (Bartolomeo et al., 2022)(Chu et al., 2020)(Hamming et al., 2004).

Zentral für die Infektion ist die Expression der Rezeptoren und weiterer Enzyme, welche am Eintritt der Virionen in die Zellen beteiligt sind und die Ausbreitung der Infektion beeinflussen, wie die *surface proteases like type II transmembrane protease serine 2* (TMPRSS2) und ACE2 (Bartolomeo et al., 2022)(Hoffmann et al., 2020)(Liu et al., 2021)(Shulla et al., 2011). Für SARS-CoV-2 konnte außerdem gezeigt werden, dass die HuH7-Zellkultur eine höhere virale Replikationsrate aufweist als die der A549 Zellen (Bartolomeo et al., 2022). Die HuH7 Zellen enthielten die höchste Menge von ATP5H, eine Untereinheit einer ATP-Synthase. Da eine hohe metabolische Aktivität mit einer begünstigten Virusreplikation in Verbindung gebracht wird, wäre dieses ein weiterer Faktor, der die Virusreplikation in HuH7 fördert (Bartolomeo et al., 2022).

Bei den Genen des NF- κ B Signalweges ist die Expression in den N Protein negativen Zellen der mit Virus behandelten Zellkulturen im Vergleich zu denen der *mock* Kontrolle erhöht. Diese Induktion fällt aber deutlich geringer aus als bei den infizierten Zellen. Dabei muss beachtet werden, dass die bei der Auswertung als N Protein negativ gewerteten Zellen durchaus infiziert sein könnten, aber zu geringe Mengen des N Proteins enthielten, um den festgelegten *Cut-off*-Wert für die Fluoreszenz zu überschreiten. Zudem variieren die Zellzahlen der einzelnen Proben, da das Verhältnis zwischen N Protein positiven und negativen Zellen innerhalb der Ibidi-Kanäle nicht konstant war.

Um einen Zusammenhang zwischen der N Protein Menge in den Zellen und der Anzahl der Transkripte zu untersuchen, wurden aus den Datensätzen zusätzlich Korrelationsanalysen erstellt und mittels *scatter plots* visualisiert (Abb. 16, C). Vereinfacht wurde dafür angenommen, dass die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers mit

der Menge des N Proteins korreliert. Die Gegenüberstellung der Gesamtfluoreszenzsignale des N Protein Antikörpers mit den in der jeweiligen Zelle detektierten mRNA Signalen zeigt für die stark induzierten Gene *NFKBIA*, *ATF3* und *TNFAIP3* eine wahrscheinliche positive Korrelation. Das könnte auf eine vermehrte Stimulation der Signalwege durch höhere Mengen des viralen N Protein hindeuten. Es konnten Interaktionen des N Proteins von SARS-CoV-2 mit PKR nachgewiesen werden, über die die Bildung antiviraler *stress granule* gehemmt wird (Zheng et al., 2021). Ebenso ist denkbar, dass die hohe Expression der Gene die Replikation beschleunigt und dadurch mehr virale Proteine synthetisiert werden. Interessant wäre es zu überprüfen, ob ein solcher Zusammenhang auch für andere virale Proteine besteht. Daraus könnte abgeleitet werden, welche Proteine von HCoV-229E mit den Signalkaskaden interagieren.

Für SARS-CoV-2 liegen bereits erste Daten vor, die den viralen Proteinen spezifische Interaktionen mit der Wirtszelle zuordnen (Minkoff and tenOever, 2023). Bei der Stimulation von BV-2 Mikroglia mit der S1 Untereinheit des S Proteins von SARS-CoV-2 wurde beispielsweise eine Induktion der NF- κ B-Transkriptionsaktivität beobachtet (Olajide et al., 2022).

Um die Ergebnisse aus den Einzelzellanalysen in Bezug auf die Wirtszellreaktion besser interpretieren und einordnen zu können, sollte ergänzend überprüft werden, ob die erhöhten mRNA Mengen sich auch auf Ebene des Proteoms widerspiegeln. Insbesondere aufgrund des nachgewiesenen Translations *shut down* durch Coronaviren ist es sogar wahrscheinlich, dass die hochregulierte Genexpression nicht gleichermaßen mit einer vermehrten Synthese der Proteine einhergeht (Finkel et al., 2021)(Versteeg et al., 2007). In mit HCoV-229E und MERS-CoV infizierten HuH7 Zellen konnte eine Dissoziation zwischen der mRNA-Expression und den Proteinmengen der Komponenten des ER-Stress Signalweges bestätigt werden (Shaban et al., 2021).

5.2.3 Die simultane Inhibition der PERK- und IKK β -Signalwege hat eine additive supprimierende Wirkung auf die virusinduzierte Genexpression und Virusreplikation

In Versuchen der Arbeitsgruppe mit den Inhibitoren zeigte sich, dass die Vorbehandlung von mit HCoV-229E infizierten HuH7 Zellen mit 10 μ M GSK2606414 oder 5 μ M PHA-408 zu einer relativen Reduktion der Genexpression und Virustiter in den Überständen führt (M Poppe et al., 2017). Die Behandlung mit den Inhibitoren erfolgte dem im Labor etablierten Protokoll entsprechend eine halbe Stunde vor der Infektion bei 33 °C.

Die Konzentrationsreihen der Inhibitoren in den HuH7 Zellen (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.2) konnten die Reduktion der Transkripte der Zielgene durch die Behandlung mit 10 μM GSK2606414 beziehungsweise 5 μM PHA-408 reproduzieren. Die Therapie mit 10 μM GSK2606414 vor der Infektion mit HCoV-229E führt zu einer deutlich geringeren Expression der Gene und der viralen RNA (siehe Abb. 10). Die gleichen Ergebnisse zeigen sich bei der Behandlung der HuH7 Zellen mit 5 μM PHA-408 (siehe Abb. 11).

Die Kombination der Inhibitoren in der Höchstdosis (10 μM GSK2606414 und 5 μM PHA-408) hat die stärkste Reduktion der *x-folds* bewirkt, und bei der Mehrzahl der Gene ist eine stärkere Suppression im Vergleich zu den Monobehandlungen zu erkennen. In der PHA-408-Konzentrationsreihe zeigt sich dieser Effekt weniger stark ausgeprägt beim Vergleich von 5 μM GSK2606414 und 5 μM PHA-408 einzeln und kombiniert (siehe Abb. 11). Die RNA Level der viralen Transkripte sind in beiden Konzentrationsreihen am geringsten in den Ansätzen mit beiden Inhibitoren (siehe Abb.10, Abb. 11).

Die Ergebnisse können aufgrund der kleinen Stichprobe einen additiven Hemmeffekt der Inhibitoren weder ausschließen noch nachweisen. Die Tendenzen der gemessenen mRNA-Mengen jedoch deuten für einige der Gene daraufhin, dass es zu einer stärkeren Suppression der Expression durch die kombinierte Behandlung kommt. Dies müsste mit weiteren Replikaten und einer statistischen Testung überprüft werden.

Ungeachtet dessen hat der duale Ansatz einen Vorteil gegenüber den Einzelbehandlungen, da keiner der Inhibitoren eine starke Suppression aller untersuchten Zielgene bewirkt hat.

Die Ergebnisse der Plaque Assays zeigen signifikant niedrigere Virustiter der Überstände in den mit beiden Inhibitoren behandelten Ansätzen verglichen mit der infizierten Kontrolle (siehe Abb.12). Eine Verstärkung des Effektes durch noch im Überstand enthaltene Inhibitoren auf die Replikation der Viren im Plaque Assay ist möglich. Um das auszuschließen, könnte analog zu dem Protokoll in den A549 Zellen auch in den HuH7 Zellen ein Mediumwechsel eine Stunde nach der Infektion durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz lässt sich schlussfolgern, dass die Inhibition beider Signalwege eine starke supprimierende Wirkung auf die Virusreplikation hat.

Beim Vergleich der Konzentrationsreihen des IKK β -Inhibitors und des PERK-Inhibitors fällt auf, dass die Hemmung von PERK eine stärkere Suppression der Expression und Virusreplikation bewirkt als die des IKK-Komplexes. Dies könnte auf zusätzliche

provirale Funktionen von PERK oder PERK-regulierten Faktoren bei der Replikation oder auch auf PERK-abhängige posttranslationale Modifikationen viraler Proteine zurückzuführen sein (Poppe, 2017). In Bezug auf die Effekte der IKK Inhibition wurde bereits beschrieben, dass CoV auf mehreren Ebenen die Signalkaskade von NF- κ B beeinflussen kann, auch distal des IKK Komplexes (Liao et al., 2011)(Mizutani et al., 2006), weshalb möglicherweise die Hemmung von IKK β die virale Induktion nur partiell abschwächt. Es wäre daher interessant, zusätzlich andere Inhibitoren der NF- κ B Signaltransduktion einzusetzen und bezüglich des Effektes auf die Genexpression und Virusreplikation zu vergleichen. In p65 *knockdown* Experimenten konnte bereits eine Reduktion der virusinduzierten Genexpression und der Virustiter beobachtet werden. Ergänzend dazu wiesen *TNFAIP3 knockdowns* ebenfalls eine deutliche Reduktion der Infektionsrate auf. Die Ergebnisse verdeutlichen außerdem, wie ausbalanciert die Aktivierung der Signalkaskade durch HCoV-229E ist, so dass einerseits die virale Replikation unterstützt wird und andererseits antivirale, NF- κ B-abhängige Mechanismen minimiert werden (M Poppe et al., 2017).

Für MHV und SARS-CoV-2 konnte eine Reduktion der Virusreplikation durch etablierte chemische Inhibitoren aller drei Achsen der UPR erreicht werden. Dabei stellte sich die Kombination des IRE-1 α -Inhibitors STF-083010 mit AEBSF, einem Inhibitor des ATF6 Signalweges, als der effektivste Ansatz im Hinblick auf die Reduktion der Virustiter heraus. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit angewandten Protokollen wurden die Inhibitoren nach der Infektion zu den Proben gegeben (Echavarría-Consuegra et al., 2021). Das ist im Hinblick auf die Behandlung *in vivo* ein sinnvoller Zeitpunkt, da eine Therapie in der Regel erst bei eingetretener bzw. nachgewiesener Infektion erfolgt. Die Effekte von unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten mit Kombinationen aus PERK und IKK-Inhibitoren sollten daher in zukünftigen Experimenten überprüft werden.

In den letzten Jahren hat die Erforschung von Inhibitoren der UPR stark zugenommen. Die UPR steht bei zahlreichen Erkrankungen im Verdacht, an der Pathogenese beteiligt zu sein. Inhibitoren des PERK Signalweges werden unter anderem als Therapie verschiedener neurodegenerativer Krankheiten untersucht (Rozpędek-Kamińska et al., 2020). Auch in der Krebsforschung haben UPR-Inhibitoren bereits Einzug gefunden (Tian et al., 2021). Ein Vergleich der unterschiedlichen PERK-Inhibitoren könnte noch wirksamere Komponenten und neue Kombinationsmöglichkeiten aufdecken.

Insbesondere der Einsatz von Inhibitoren, die *downstream* von PERK ansetzen, könnten die genaueren Mechanismen der virusinduzierten UPR Aktivierung weiter differenzieren.

Die Ergebnisse der Konzentrationsreihen der Inhibitoren in den A549 Zellen sind weniger eindeutig als in den HuH7 Zellen. Aus starken Schwankungen der gemessenen mRNA Mengen innerhalb der Replikate resultierten große Fehlerbalken, die eine eindeutige Beurteilung der Effekte erschweren. Durch die lange Inkubationszeit der A549 Zellen können sich schon minimale Abweichungen in der Ausführung, Zelldichte und Infektionsrate der Versuche zu stark unterschiedlichen Ergebnissen führen. Der Versuchsaufbau mit mehrmaligem Mediumwechsel und einer Nachapplikation der Inhibitoren birgt zudem gleich mehrere Variablen, die Einfluss auf die Reproduzierbarkeit haben. Auch das Wachstumsverhalten der Zellen war über die längeren Zeiträume unterschiedlich, trotz initial gleich ausgesäter Zellzahlen. Die Dichte der Zellen kann nicht nur die Ausbreitung der Infektion beeinflussen (Sewald et al., 2016), sondern auch die basale Aktivität von Signalwegen und der *stress-response* der Zellen verändern (Barbeau et al., 2022). Bei einer quantitativen Analyse wie der RT-qPCR wird die RNA aller geernteten Zellen gepoolt und dann gemessen. Dadurch ergeben Replikate mit höheren Infektionsraten stärkere Änderungen der Genexpression. Um diese Schwankungen zu minimieren, bedarf es weiterer Replikate.

Trotz der großen Fehlerbalken ließen sich vergleichbare Tendenzen der Genexpressionsänderungen in Bezug auf die Inhibitorbehandlungen erkennen. Die Induktion der Genexpression durch das Virus fiel insgesamt geringer aus als in den HuH7 Zellen. Das könnte mit der deutlich geringeren Infektionsrate in den A549 Zellen zusammenhängen (siehe Kapitel 4.2.1) und ist nicht zwangsläufig gleichzusetzen mit einer verringerten Aktivierung der Signalwege. Zudem passen diese Ergebnisse auch zu der Beobachtung, dass die Replikationsrate von HCoV-229E in den HuH7 Zellen höher ist als in den A549 Zellen (Bartolomeo et al., 2022).

Für *CHAC1*, *FUT1* und *EIF2AK3* konnte keine eindeutige Induktion nachgewiesen werden, was sich mit den Ergebnissen aus den Einzelzellanalysen (siehe Kapitel 4.2.2) deckt.

Die anderen Gene, insbesondere die des NF- κ B Signalweges, zeigen wie erwartet eine Zunahme der Transkripte in den infizierten Proben. Interessanterweise hat die Kombination geringerer Konzentrationen der Inhibitoren eine stärkere Suppression der

mRNA Mengen zur Folge als höhere Dosierungen, was auf die HuH7 Zellen nicht zutrifft. Aufgrund der unterschiedlichen Versuch-Designs mit der Nachbehandlung in den A549 Zellen lassen sich die Konzentrationen bezüglich ihrer Wirkungen in den beiden Zellreihen nicht direkt vergleichen. Es wäre auch interessant, die intrazellulären Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren in A549 Zellen über den langen Zeitraum in Zellkultur zu überprüfen, was geeignete Nachweisverfahren erfordern würde. Alternativ könnte die Hemmwirkung auf PERK bzw. IKKs mittels geeigneter Phosphospezifischer Antikörper gegen die Kinasen oder ihre Substrate in *Westernblot* Experimenten aus Zellextrakten überprüft werden.

Ein Wert, der in den Graphen der GSK-Konzentrationsreihen der A549 Zellen deutlich hervorsteht, ist der Anstieg der Genexpression von ATF3, NFKBIA, FICD, TNFAIP3, ANKRD1, EIF2AK3 und der viralen RNA in den mit 10 µM GSK2606414 behandelten Proben. Bei der Aktivierung der UPR durch die Viren handelt es sich um einen sehr fein regulierten und ausbalancierten Mechanismus, und die Dosierungen der Inhibitoren muss dementsprechend exakt abgestimmt sein (Poppe, 2017)(Shaban et al., 2021). Eine zu hohe Konzentration des PERK-Inhibitors scheint die Suppression der induzierten Genexpression zu revidieren und sogar provirale Effekte zu haben. Dabei könnten Kompensationsmechanismen der Zelle eine Rolle spielen, zum Beispiel durch die Synthese neuer nicht inhibierter PERK Enzyme oder die Hochregulation alternativer Signalwege, wie den anderen Achsen der UPR. Das stützen auch die Ergebnisse von Szaruga et al., in denen gezeigt werden konnte, dass ATP-kompetitive Inhibitoren von PERK, darunter auch GSK2606414, zwar in nanomolaren Konzentrationen PERK hemmen, in höheren Konzentrationen allerdings eine Aktivierung alternativer Achsen der *integrated stress response* über *general control nonderepressible 2* (GCN2) bewirken (Szaruga et al., 2023).

Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei der Untersuchung von UPR-Inhibitoren in MHV infizierten Zellen gemacht. Neben GSK2606414 wurde ein weiterer etablierter Inhibitor *downstream* von PERK verwendet, der *integrated stress response inhibitor* (ISRIB). Beide Inhibitoren konnten eine Reduktion der Virustiter bewirken. Dennoch fiel in *Westernblot* Analysen unerwartet ein Anstieg der Menge des viralen N Proteins auf, ohne dass dies mit erhöhten Virustitern einherging (Echavarría-Consuegra et al., 2021). Folglich sollten in zukünftigen Experimenten Plaque Assays aus den Medium-Überständen von mit PERK Inhibitoren behandelten A549 Zellen durchgeführt werden,

um zu überprüfen, ob die erhöhten viralen RNA Mengen auch mit höheren Virustitern einhergehen. Ist dies nicht der Fall, ist die Replikationsrate trotz erhöhter viraler RNA Mengen reduziert, zum Beispiel auf Ebene der Proteinfaltung, posttranslationalen Modifikationen oder bei dem *assembly* und *budding* der Virionen.

5.3 Kultivierung und Infektion der humanen alveolaren Epithelzellen

Das Übertragen von Ergebnissen und Erkenntnissen aus *in vitro* Experimenten auf die *in vivo* vorherrschenden Verhältnisse unterliegt natürlich Limitationen. Dennoch ist es das Ziel, einen Versuchsaufbau so gut es geht den *in vivo* Bedingungen anzugleichen. Eine große Rolle spielt dabei die Wahl der Zellkultursysteme. Die Verwendung von humanen Primärzellen dafür wäre theoretisch die beste Wahl, birgt allerdings viele Schwierigkeiten in der Umsetzung. Deshalb ist die Verwendung von Tumorzelllinien weit verbreitet. Schon die Verfügbarkeit von Primärzellen ist natürlicherweise eingeschränkt. Wenn es sich, wie in dieser Arbeit, um Gewebe aus klinischen Biopsien oder Resektionen handelt, müssen die Versuche zum Teil sehr kurzfristig geplant werden. Dazu kommt, dass auch individuelle Patienteneigenschaften, Vorerkrankungen und Medikationen einen Einfluss auf die Ergebnisse haben können. Es ist zum Beispiel bekannt, dass es durch Rauchen zu weitreichenden Veränderungen der Immunreaktion und zur Aktivierung proinflammatorischer Signalwege wie dem NF- κ B Signalweg kommt (Ahn and Aggarwal, 2005). Auch Alter und Geschlecht der Patienten haben mit großer Wahrscheinlichkeit einen Einfluss darauf, wie die Zellen auf die Infektion und Inhibitorbehandlung reagieren (Müller et al., 2019). Für die in dieser Dissertation verwendeten Präparationen liegen die zugehörigen Patientendaten leider nicht vor.

Die Präparation und Aufbereitung der humanen alveolaren Epithelzellen wurde im Zuge der Kooperation von der AG Herold durchgeführt. Die Zellen wurden dafür sowohl mechanisch als auch chemisch aus ihrem Gewebeverbund gelöst und anschließend gereinigt und selektiert (siehe Kapitel 3.1.2.1). Diese Manipulationen der Zellen stellen potentielle Stressoren da, welche die Induzierbarkeit der untersuchten Signalwege und Genexpressionen durch das Virus beeinflussen könnten. Insbesondere für die UPR ist das nicht zu vernachlässigen, da Chaperone nachweislich eine wichtige Rolle bei der Bewältigung von mechanischem Stress durch die *chaperone-assisted selective autophagy* spielen (Kathage et al., 2017)(Ulbricht et al., 2013).

Bei den durchgeführten Versuchen mit den HAEC stand die Etablierung und Optimierung der Kultur und Infektion im Vordergrund. Die ersten Kultivierungsversuche zeigten ein sehr langsames Anwachsen der ausgesäten Primärzellen. Mit der Verwendung von Kollagen-IV beschichteten Kulturgefäßen konnte eine Verbesserung gesehen werden (siehe Abb. 21). Kollagen-IV ist ein Molekül der Extrazellulärmatrrix beziehungsweise der Lamina densa der Basallamina, über welche die Zellen verankert sind (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). Daher ist es naheliegend, dass Kollagen-IV die Adhärenz der Zellen in beschichteten Kulturgefäßen verbessert. Ob die Beschichtung tatsächlich einen messbaren Effekt auf das Anwachsverhalten der Zellen hatte, müsste in einem gesonderten Versuchsaufbau geprüft werden. Aufgrund der geringen Zellzahlen, die zur Verfügung standen, konnte keine Validierung der Beobachtung erfolgen. Es liegen jedoch Ergebnisse vor, die die verbesserte Adhäsion und Differenzierung von Zellen durch die Anwesenheit von Kollagen-IV in der Zellkultur stützen (Chevallard et al., 1993)(Chua and Lim, 2023).

Die Infektion humaner Atemwegs-Epithelzellen mit HCoV-229E wurde bereits unter anderen Zellkulturbedingungen und Präparationsprotokollen durchgeführt (Wang et al., 2000).

In insgesamt drei Versuchen aus zwei unterschiedlichen Präparationen konnten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls erfolgreich mit HCoV-229E infizierte Primärzellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 19, 20, 21).

Als nächstes sollte die virale Induktion der Signalwege in den HAEC untersucht werden. Die Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridsierungen (siehe Kapitel 4.3.2) wurden aufgrund der geringen Zellzahlen nicht quantitativ ausgewertet, bestätigen aber die technische Durchführbarkeit. Vereinzelt sind infizierte Zellen mit sehr hohen Mengen von *FICD* und *TNFAIP3* zu sehen, was auf eine potenzielle Induktion der Gene in den HAEC hindeutet. Für eine validierte Untersuchung der Transkriptom- und Proteomveränderungen durch HCoV-229E müssen allerdings deutlich höhere Infektionsraten erreicht werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten RT-qPCR (siehe Kapitel 4.3.3) lassen bis auf die Induktion von *IL8* und dem Nachweis viraler RNA keine eindeutigen Expressionsänderungen erkennen. Angesichts der geringen Zellzahlen und niedriger Infektionsrate, ist das Ergebnis jedoch nicht gleichzusetzen mit einer fehlenden Induktion. Die HAEC-Kultur muss zunächst weiter optimiert werden, um einen annähernd konfluenten Zellrasen zu erhalten, der eine *cell-to-cell transmission*

gewährleisten kann (Sattentau, 2008). Erst bei einer hohen Anzahl infizierter Zellen können Expressionsänderungen sicherer nachgewiesen beziehungsweise ausgeschlossen werden.

Die Erforschung von Zellkultursystemen, die den *in vivo* Verhältnissen näherkommen, hat in den letzten Jahren viele Alternativen hervorgebracht. Der Trend geht von dem hier verwendeten klassischen zweidimensionalen Zellkultursystem weg, hin zu dreidimensionalen Modellen. Dabei wird der physiologische Zellverband simuliert oder von vornherein erhalten (Vazquez-Armendariz et al., 2022). Ein Beispiel dafür sind Hydrogele, die die Extrazellulärmatrix imitieren und zudem in ihrer Zusammensetzung verändert und angepasst werden können (Almany and Seliktar, 2005)(Cushing and Anseth, 2007)(Ruedinger et al., 2015). Eine weitere Methode, die an Bedeutung gewonnen hat, sind *precision cut lung slices* (PCLS). Hierbei werden sehr dünne Lungengewebs-Schnitte im Ganzen in Kultur gehalten. Das ist insofern ein sehr attraktives, wenn auch technisch anspruchsvolles Modell, als dass die natürliche Architektur und Zellzusammensetzung der Lunge dabei erhalten bleibt (Liu et al., 2019). Für SARS-CoV-2 konnte bereits erfolgreich die Infektion und Replikation in PCLS nachgewiesen werden (Zimniak et al., 2021). Die Untersuchung der Wirtszellreaktion auf eine HCoV-229E Infektion und der chemischen Inhibition der Signalwege in den PCLS wäre also durchaus denkbar und eine Möglichkeit, die Problematik der mangelnden Zelldichte in der zweidimensionalen Kultur zu umgehen.

5.4 Fazit

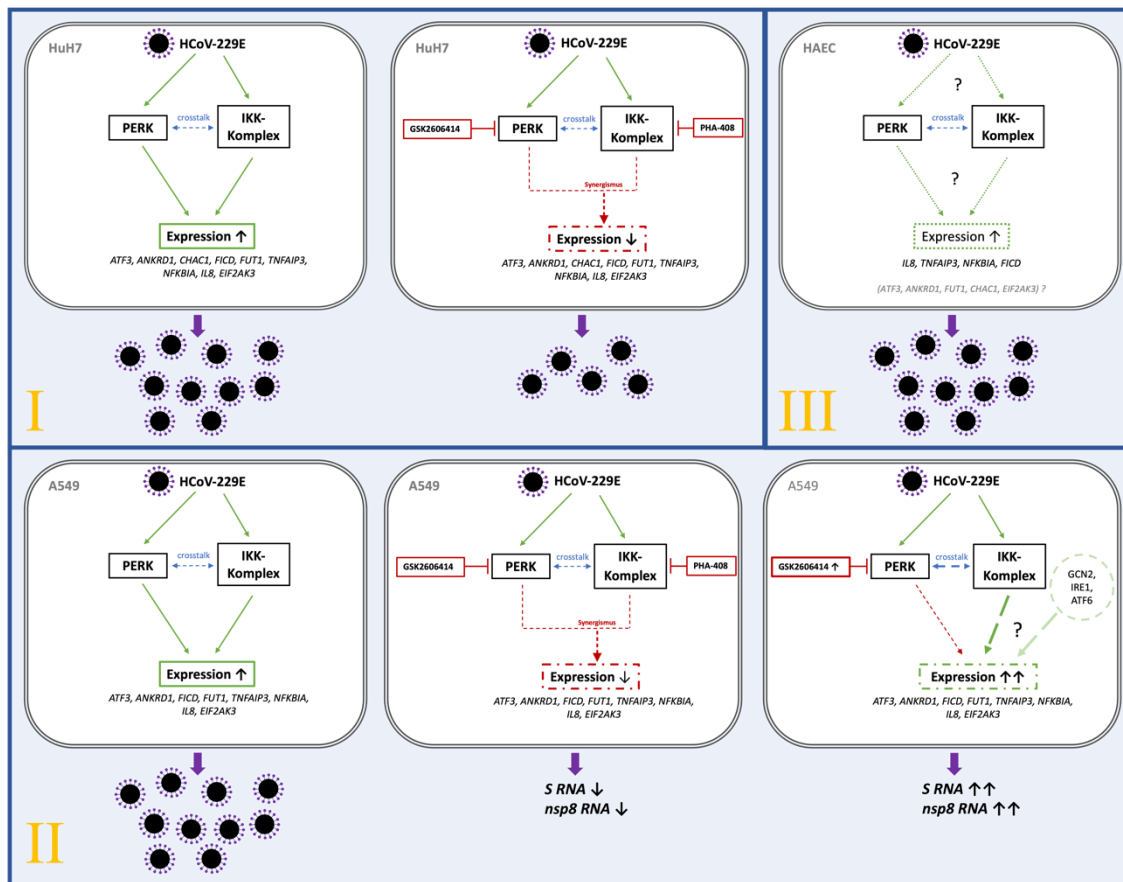


Abb. 23: Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Wirkung von HCoV-229E auf die Genexpression der Wirtszelle und die Effekte von PERK bzw. IKK β Inhibitoren in den Zelllinien HuH7 (I), A549 (II) und HAEC (III).

Die spezifische chemische Inhibition der von HCoV-229E aktivierten PERK und IKK-Signalwege in HuH7 und A549 Zellen hemmt die Virusreplikation und kann zusätzlich über die verringerte Expression proinflammatorischer Zytokine die überschießende Immunreaktion eindämmen. Damit ist dieser Ansatz eine Alternative zu den etablierten antiviralen Medikamenten, die ausschließlich die Virus-Replikation beeinflussen. Die Wirkung kann durch eine Kombinationstherapie der Inhibitoren zusätzlich verstärkt werden, da sich ein additiver Effekt auf die Suppression der Zielgene und die Virusreplikation abzeichnete. Die dafür optimale Dosierung der Inhibitoren variiert für die unterschiedlichen Zellkultursysteme und muss sehr fein abgestimmt sein, da es ansonsten sogar zu einer paradoxen Hochregulation der Stress induzierten Signalwege kommen kann.

Die HAEC konnten *in vitro* erfolgreich mit HCoV-229E infiziert werden. Es bedarf allerdings weiterhin einer Optimierung des Versuchsdesigns, um die Effekte der Infektion und Inhibitorwirkung auf den ER-Stress und NF- κ B Signalweg verlässlich erheben und

quantifizieren zu können. Hierfür könnten auch alternative Kultursysteme und andere Methoden der Zellisolierung- und aufbereitung exploriert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die spezifische Inhibition von virusinduzierten Signalwegen ein Potential zur therapeutischen Anwendung bei Coronavirus-Infektionen hat. Es wird in Zukunft immer wichtiger werden, die Interaktionen zwischen den Viren und ihren Wirtszellen aufzudecken und zu verstehen, um auf neuartige Virusinfektionen schneller reagieren zu können und frühzeitig Therapiestrategien zu entwickeln und anzupassen.

6 Anhang

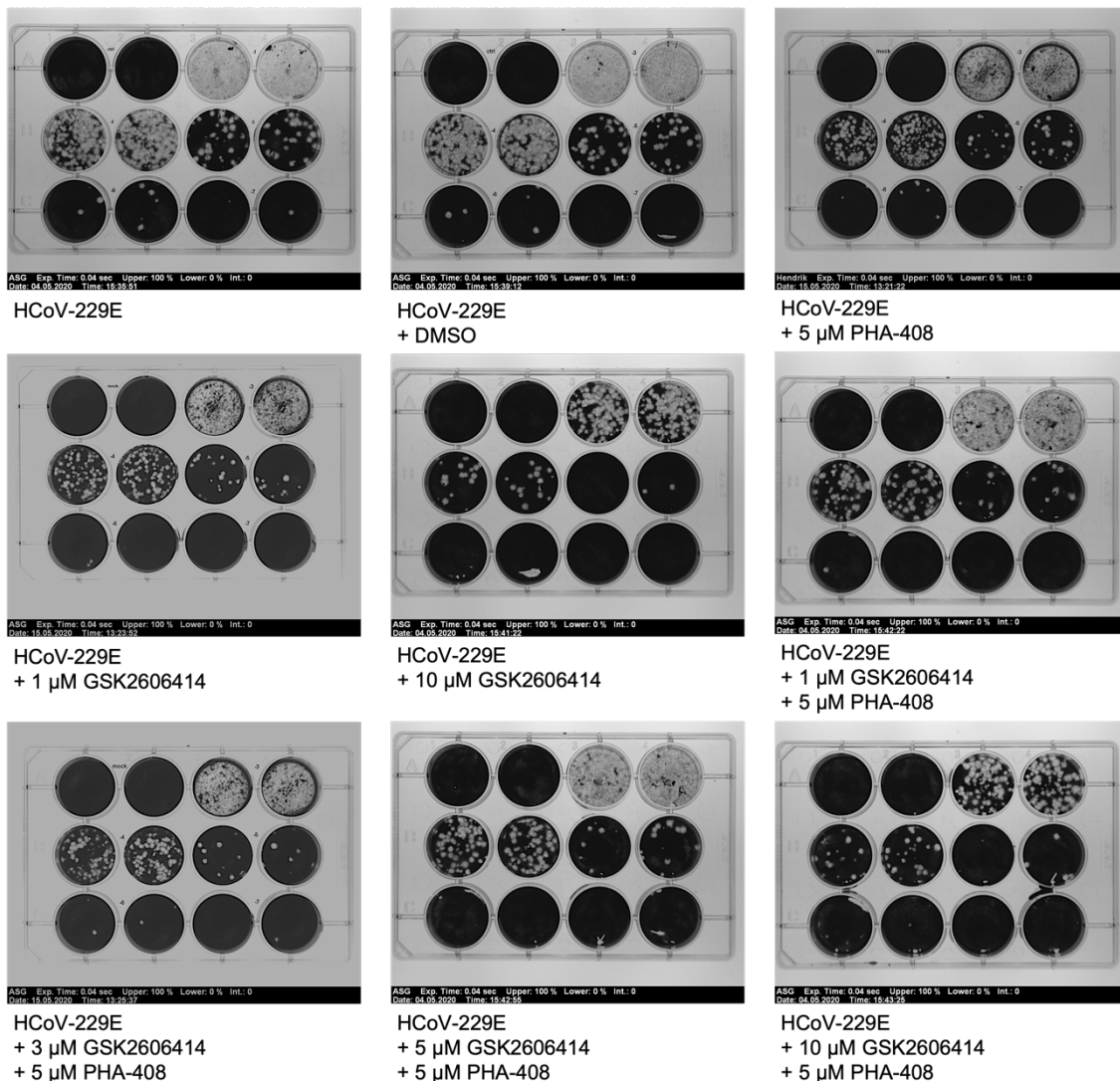
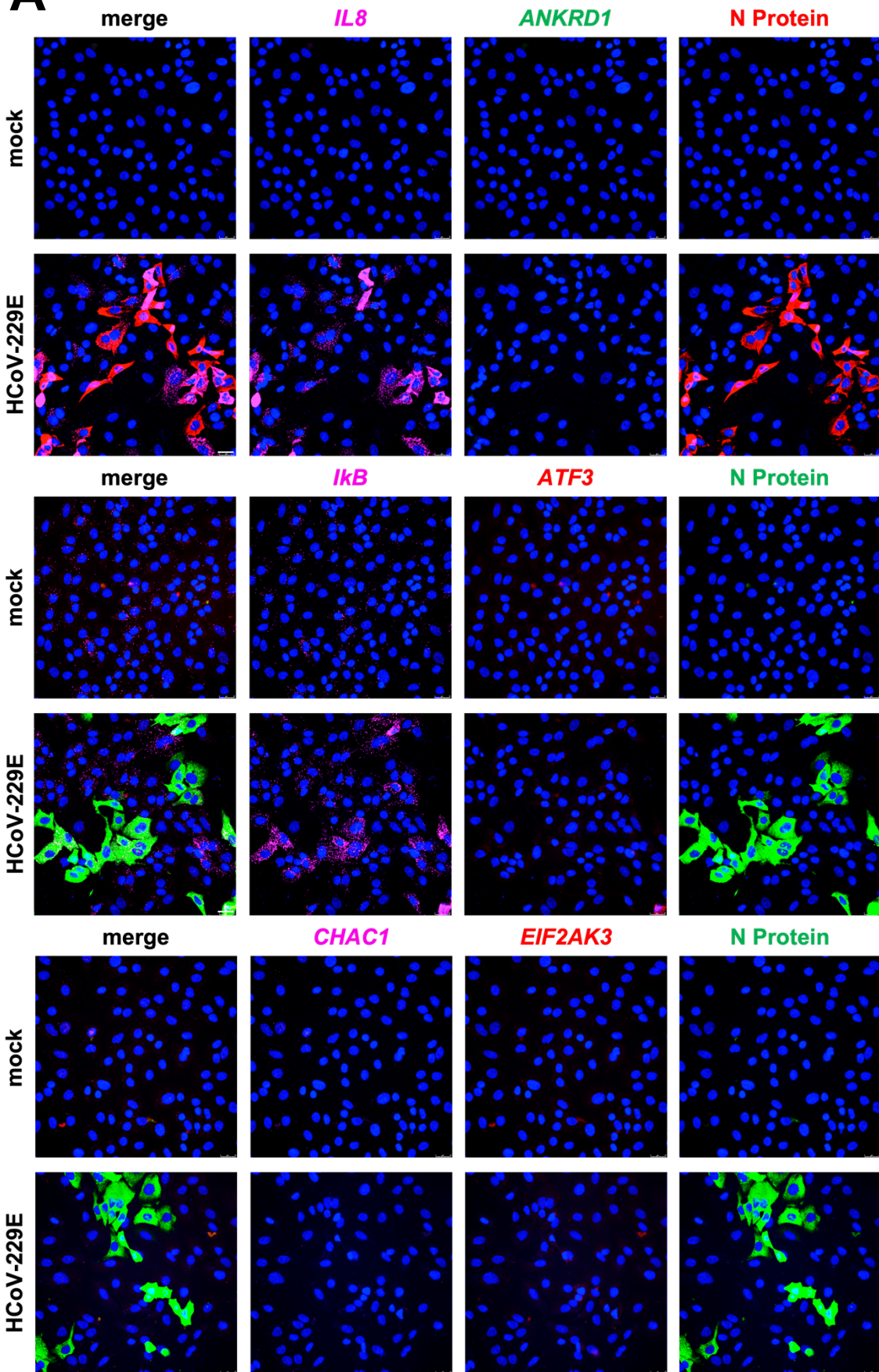
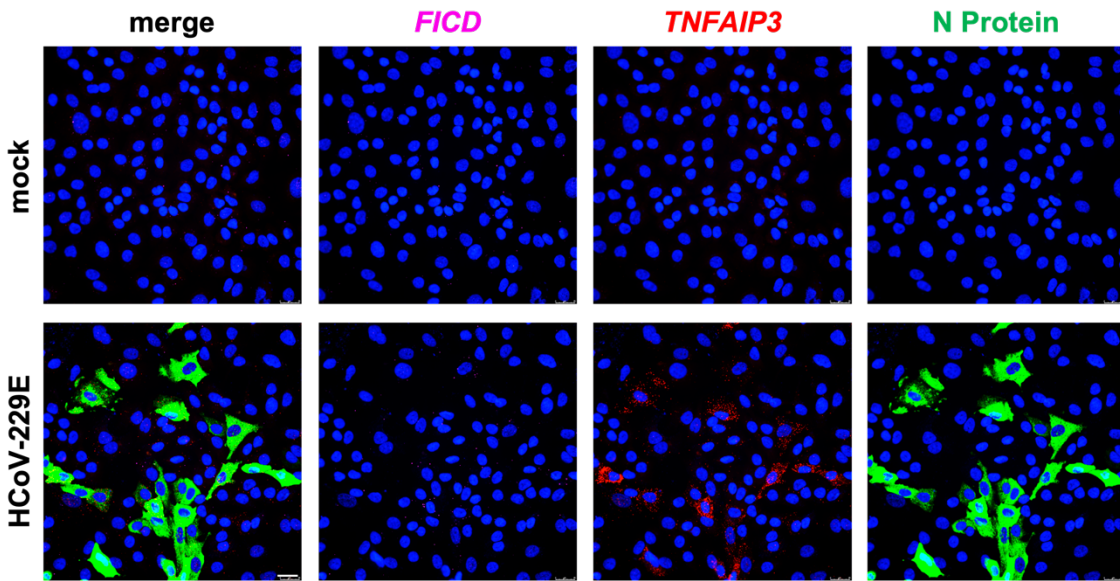


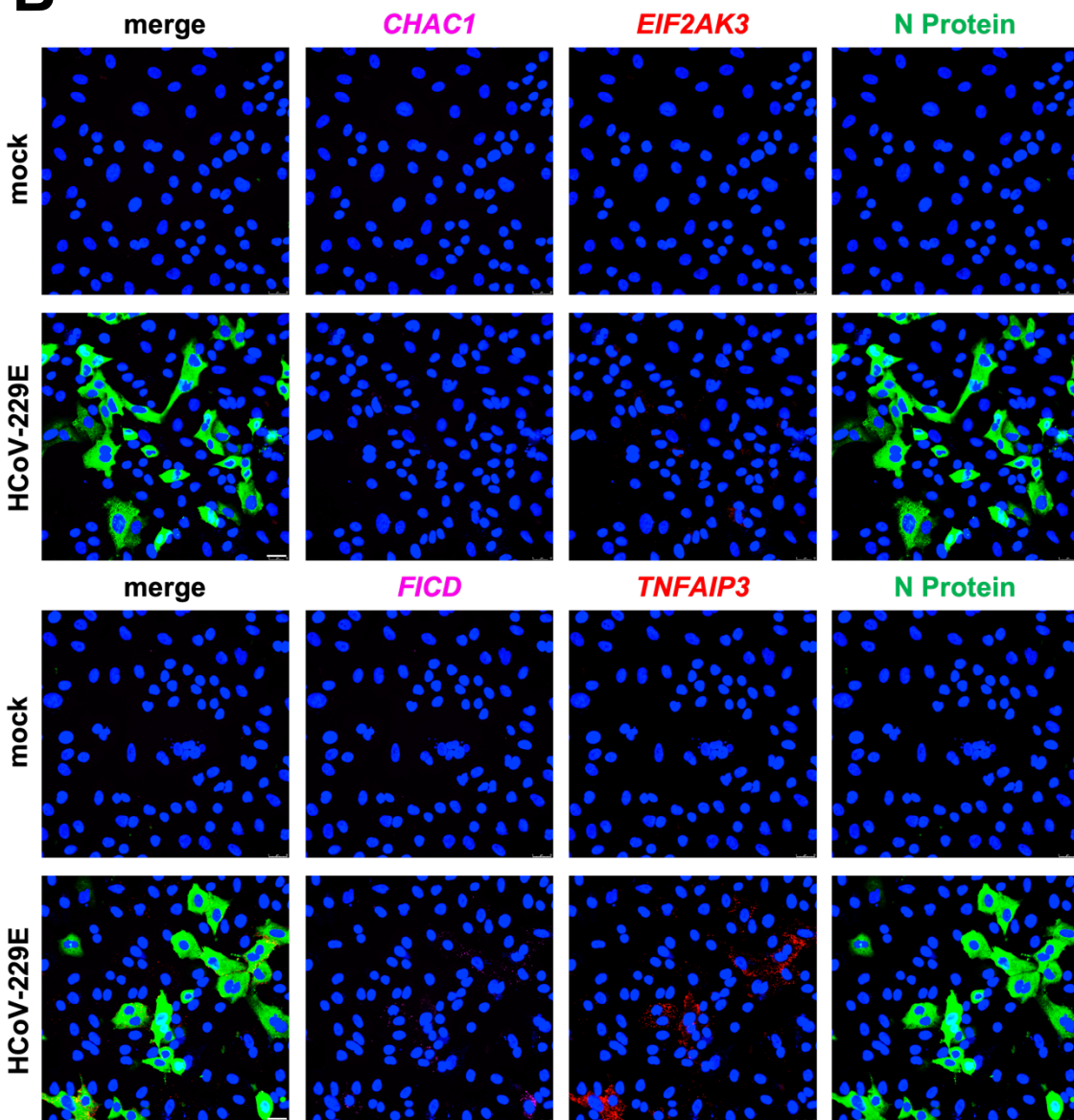
Abb.Anh. 1: Bilder vom Plaque Assay mit asservierten Überständen der GSK2606414-Konzentrationsreihe in HuH7 Zellen.

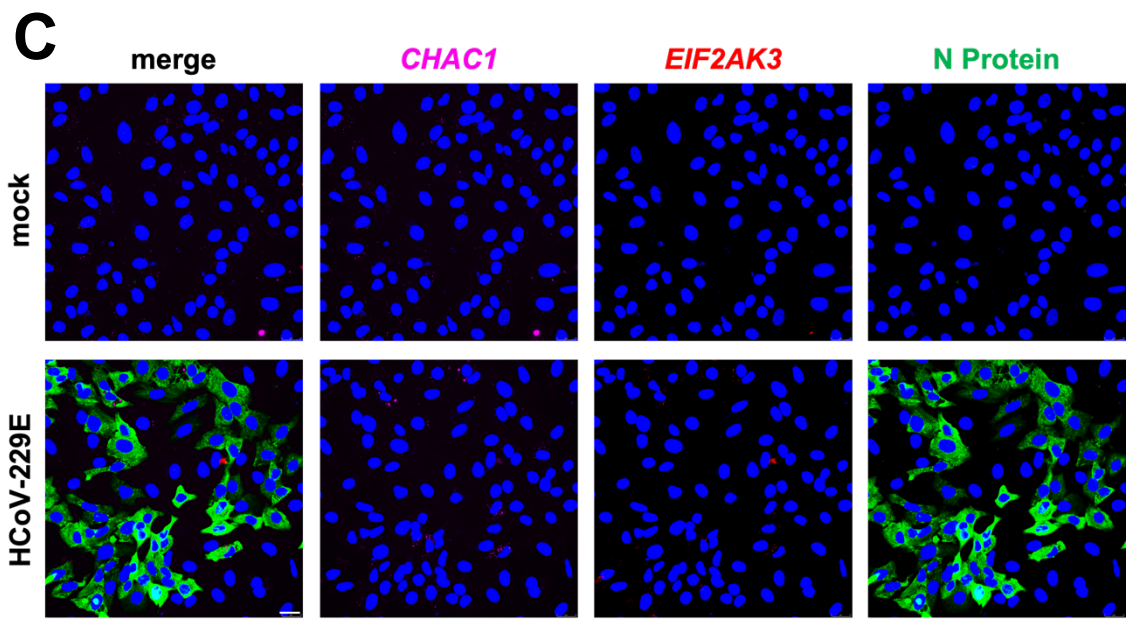
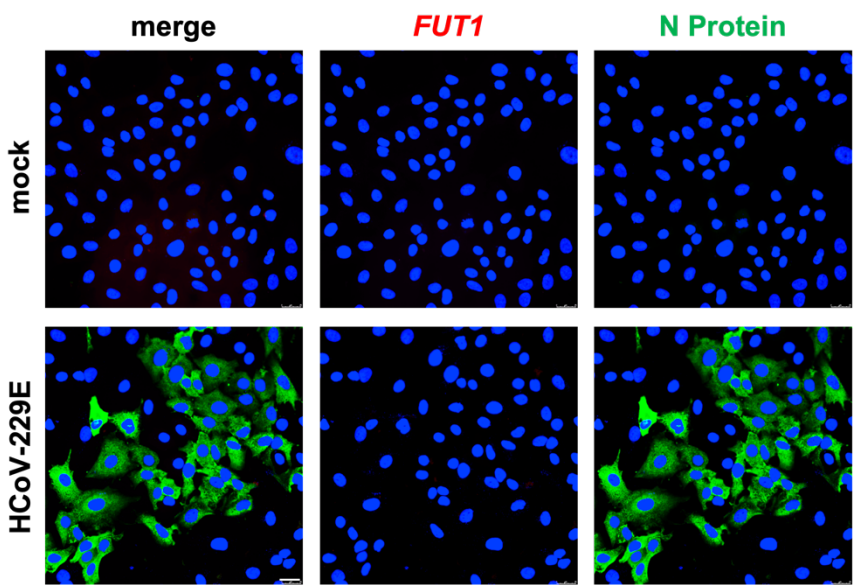
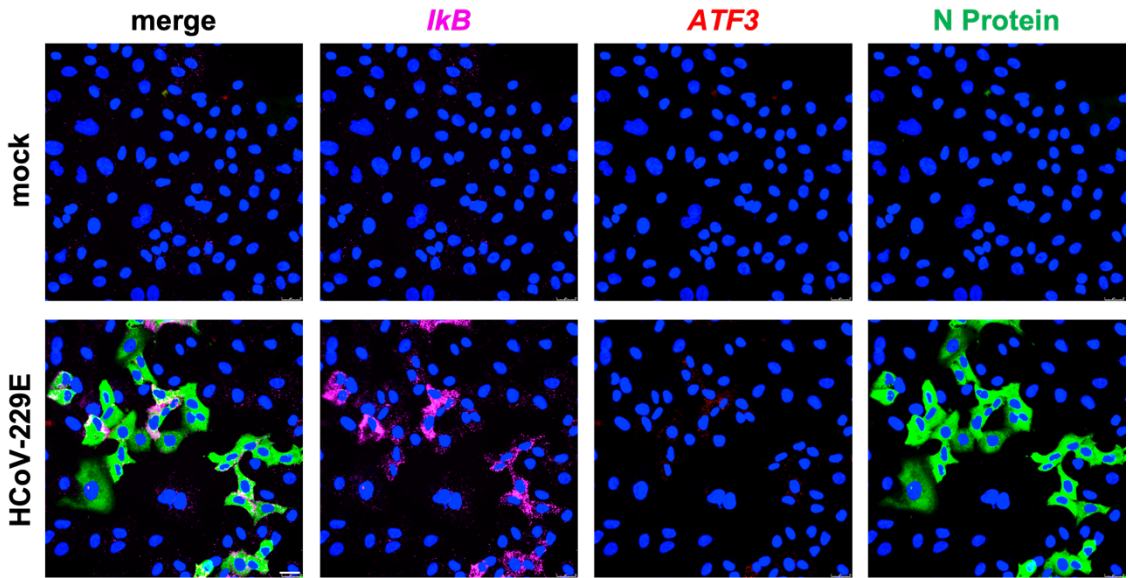
Dargestellt sind die 12-well Platten eines der Replikate der Titermessungen aus Kapitel 4.1.3 (Abb.12). Es wurden 2×10^5 HuH7 Zellen in 12-well-Platten ausgesät und mit den Verdünnungen der Überstände aus 4.1.1 infiziert. Die Platten wurden für 72 h bei 33 °C mit Avicel/MEM inkubiert. Nach der Färbung mit Kristallviolett erfolgte die manuelle Auszählung der plaque forming units (pfu) (siehe Kapitel 3.1.4.2).

A



B





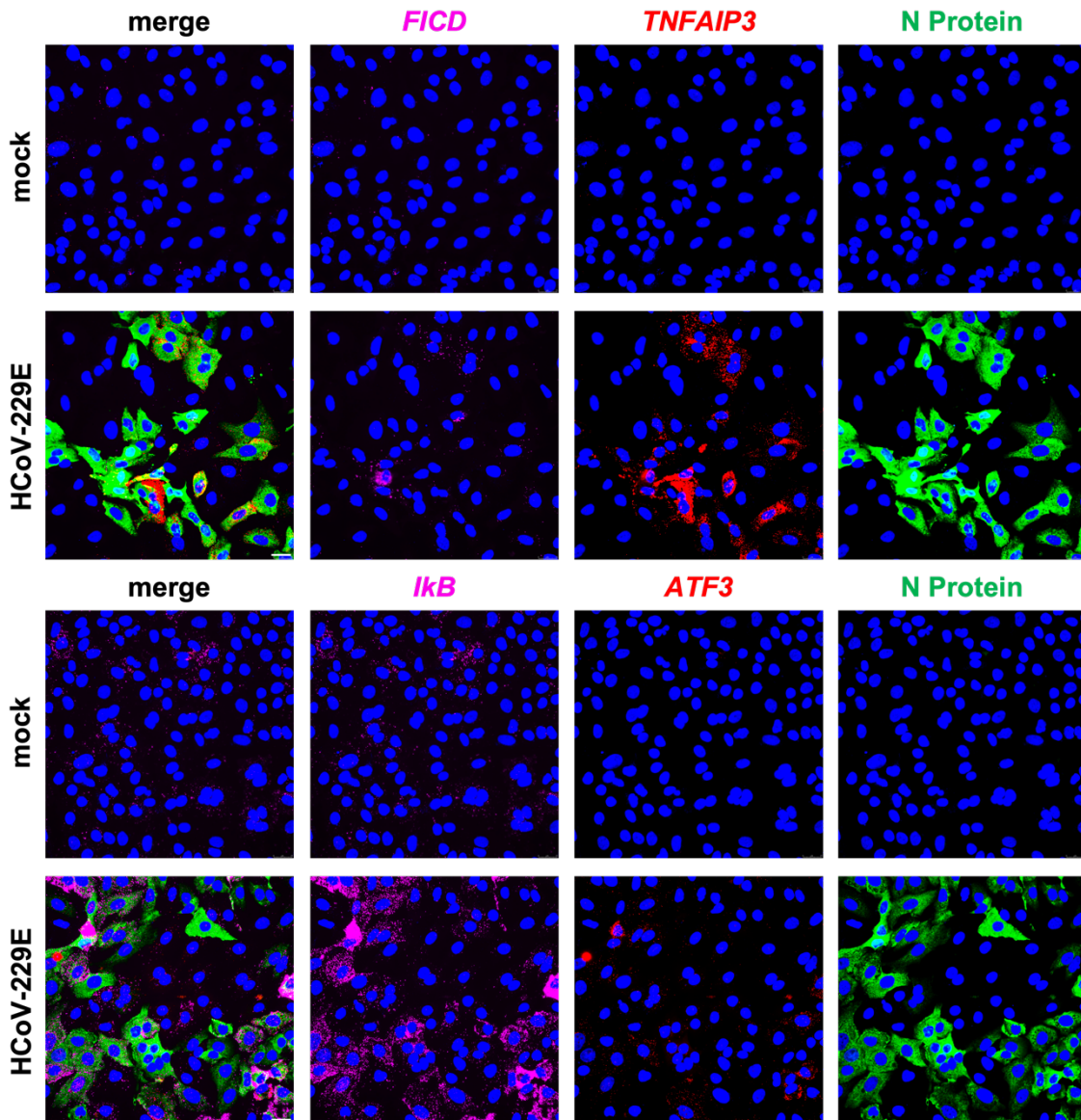


Abb.Anh. 2: Übersichtsaufnahmen der Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in A549 Zellen nach 96-stündiger Infektion mit HCoV-229E.

Die A549 Zellen wurden in μ -Slides ausgesät und nach 24 h in Kultur mit HCoV-229E infiziert (MOI= 10). Nach einer Stunde wurde der Virusüberstand entfernt und die Reservoirire mit Vollmedium aufgefüllt. Alle zwei Tage wurde das Medium erneut gewechselt. Nach 96 h Inkubationszeit bei 33 °C wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und die Immuno-RNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Die Darstellung des N Protein erfolgte mittels Indirekter Immunfluoreszenz (N Protein AK; 1:100; mouse). Maßstabsbalken= 25 μ m. Die Bilder sind die Übersichtsaufnahmen, zu den in Kapitel 4.2.2. verwendeten Bildausschnitten (A) und den biologischen Replikaten (B, C).

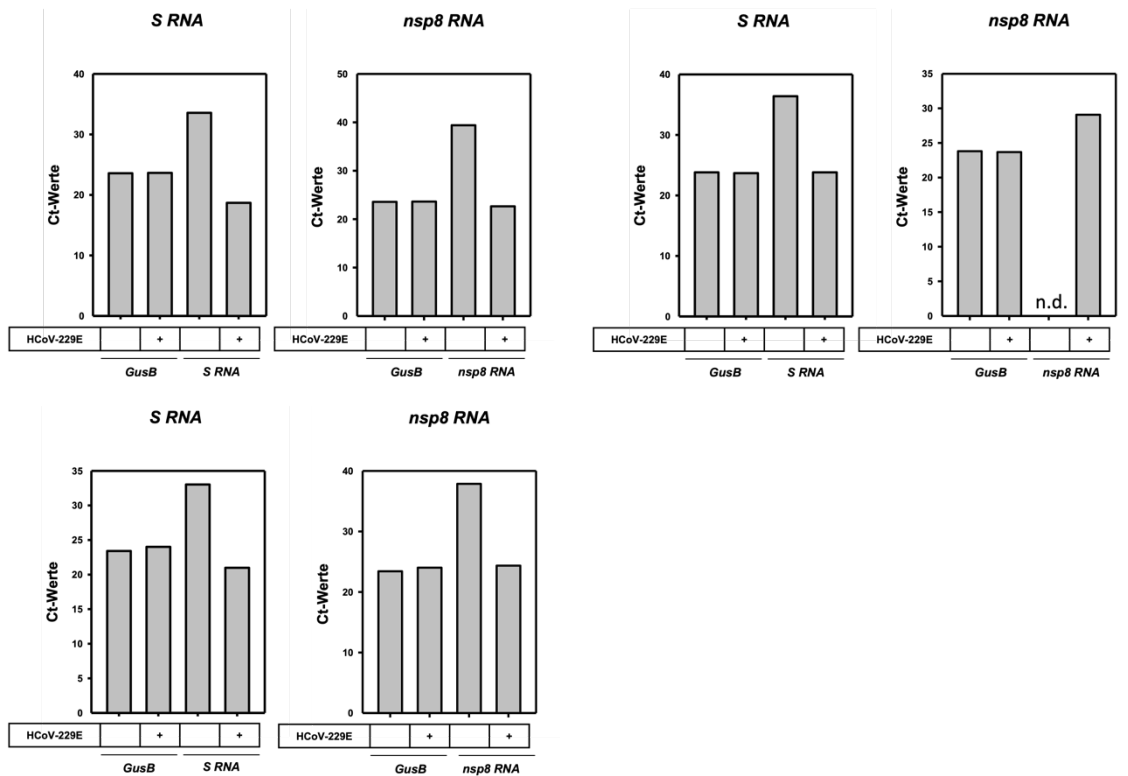


Abb.Anh. 3: Ct-Werte der viralen RNA aus *real time* RT-qPCR Versuchen in für 96 h mit HCoV-229E infizierten HAEC.

Die HAEC wurden mit $1,5-1,7 \cdot 10^6$ Zellen pro *well* ausgesät und für vier Tage bei 37 °C in Kultur gehalten. Die Zellen wurden im Anschluss mit HCoV-229E infiziert (MOI= 10). Nach 1 h wurde der Virusüberstand entfernt und durch Medium ersetzt. Alle zwei Tage wurde ein weiterer Mediumwechsel vollführt. Nach 96 h Inkubation bei 33 °C wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und mit 1 µg der RNA die Reverse Transkription durchgeführt. Die Messung der mRNA Level der Gene erfolgte mit *real-time* qPCR (n= 3). Die Reinheit der Präparationen betragen 88 %, 89 % und 93 % in der FACS-Analyse.

Dargestellt sind die Ct-Werte der viralen RNA und von *humanen GusB* der drei Replikate zu dem Versuch in Kapitel 4.3.3.

Literaturverzeichnis

- Ahn, K.S., Aggarwal, B.B., 2005. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056, 218–233.
<https://doi.org/10.1196/annals.1352.026>
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Almany, L., Seliktar, D., 2005. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. *Biomaterials* 26, 2467–2477.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.047>
- Almeida, J.D., Tyrrell, D.A.J.Y. 1967, 1967. The Morphology of Three Previously Uncharacterized Human Respiratory Viruses that Grow in Organ Culture. *J. Gen. Virol.* 1, 175–178. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-1-2-175>
- Arabi, Y.M., Arifi, A.A., Balkhy, H.H., Najm, H., Aldawood, A.S., Ghabashi, A., Hawa, H., Alothman, A., Khaldi, A., Al Raiy, B., 2014. Clinical course and outcomes of critically ill patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Ann. Intern. Med.* 160, 389–397.
<https://doi.org/10.7326/M13-2486>
- Artika, I.M., Dewantari, A.K., Wiyatno, A., 2020. Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. *Heliyon* 6, e04743.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04743>
- Auyeung, T.W., Lee, J.S.W., Lai, W.K., Choi, C.H., Lee, H.K., Lee, J.S., Li, P.C., Lok, K.H., Ng, Y.Y., Wong, W.M., Yeung, Y.M., 2005. The use of corticosteroid as treatment in SARS was associated with adverse outcomes: a retrospective cohort study. *J. Infect.* 51, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.09.008>
- Axten, J.M., Medina, J.R., Feng, Y., Shu, A., Romeril, S.P., Grant, S.W., Li, W.H.H., Heerding, D.A., Minthorn, E., Mencken, T., Atkins, C., Liu, Q., Rabindran, S., Kumar, R., Hong, X., Goetz, A., Stanley, T., Taylor, J.D., Sigethy, S.D., Tomberlin, G.H., Hassell, A.M., Kahler, K.M., Shewchuk, L.M., Gampe, R.T., 2012. Discovery of 7-methyl-5-(1-{3-(trifluoromethyl)phenyl}acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J. Med. Chem.* 55, 7193–7207.
<https://doi.org/10.1021/jm300713s>
- Baer, A., Kehn-Hall, K., 2014. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *J. Vis. Exp.*
<https://doi.org/10.3791/52065>
- Baeuerle, P.A., Baltimore, D., 1989. A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes Dev.* 3, 1689–1698.
<https://doi.org/10.1101/gad.3.11.1689>
- Baeuerle, P.A., Baltimore, D., 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242, 540–546.
<https://doi.org/10.1126/science.3140380>
- Baltimore, D., 1970. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature* 226, 1209–1211.
<https://doi.org/10.1038/2261209a0>
- Barbeau, S., Joushomme, A., Chappe, Y., Cardouat, G., Baudrimont, I., Freund-Michel, V., Guibert, C., Marthan, R., Berger, P., Vacher, P., Percherancier, Y., Quignard, J.-F., Ducret, T., 2022. Cell Confluence Modulates TRPV4 Channel Activity in Response to Hypoxia. *Biomolecules* 12, 954.
<https://doi.org/10.3390/biom12070954>

- Bartolomeo, C.S., Lemes, R.M.R., Morais, R.L., Pereria, G.C., Nunes, T.A., Costa, A.J., de Barros Maciel, R.M., Braconi, C.T., Maricato, J.T., Janini, L.M.R., Okuda, L.H., Lee, K.S., Prado, C.M., Ureshino, R.P., Stilhano, R.S., 2022. SARS-CoV-2 infection and replication kinetics in different human cell types: The role of autophagy, cellular metabolism and ACE2 expression. *Life Sci.* 308, 120930. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120930>
- Baudouin-Cornu, P., Lagniel, G., Kumar, C., Huang, M.-E., Labarre, J., 2012. Glutathione Degradation Is a Key Determinant of Glutathione Homeostasis. *J. Biol. Chem.* 287, 4552–4561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315705>
- Beaudette, E.R., Hudson, C.B., 1937. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* 51–60.
- Becker, D.J., Lowe, J.B., 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13, 41R-53R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg054>
- Berche, P., 2022. The Spanish flu. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 51, 104127. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104127>
- Bercovich-Kinori, A., Tai, J., Gelbart, I.A., Shitrit, A., Ben-Moshe, S., Drori, Y., Itzkovitz, S., Mandelboim, M., Stern-Ginossar, N., 2016. A systematic view on influenza induced host shutoff. *eLife* 5, e18311. <https://doi.org/10.7554/eLife.18311>
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332. <https://doi.org/10.1038/35014014>
- Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.-C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., McNally, E., Pickart, C., Ma, A., 2004. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat. Immunol.* 5, 1052–1060. <https://doi.org/10.1038/ni1110>
- Boonyasrisawat, W., Eberle, D., Bacci, S., Zhang, Y.-Y., Nolan, D., Gervino, E.V., Johnstone, M.T., Trischitta, V., Shoelson, S.E., Doria, A., 2007. Tag polymorphisms at the A20 (TNFAIP3) locus are associated with lower gene expression and increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 499–505. <https://doi.org/10.2337/db06-0946>
- Bos, E.C.W., Luytjes, W., Meulen, H. van der, Koerten, H.K., Spaan, W.J.M., 1996. The Production of Recombinant Infectious DI-Particles of a Murine Coronavirus in the Absence of Helper Virus. *Virology* 218, 52–60. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0165>
- Bosch, B.J., van der Zee, R., de Haan, C.A.M., Rottier, P.J.M., 2003. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J. Virol.* 77, 8801–8811. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>
- Bowie, A., O'Neill, L.A.J., 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67, 508–514. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.4.508>
- Brierley, I., Bournnell, M.E., Binns, M.M., Bilimoria, B., Blok, V.C., Brown, T.D., Inglis, S.C., 1987. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J.* 6, 3779–3785.
- Brikos, C., Wait, R., Begum, S., O'Neill, L.A.J., Saklatvala, J., 2007. Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 6, 1551–1559. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600455-MCP200>

- Burkard, C., Verheije, M.H., Wicht, O., van Kasteren, S.I., van Kuppeveld, F.J., Haagmans, B.L., Pelkmans, L., Rottier, P.J.M., Bosch, B.J., de Haan, C.A.M., 2014. Coronavirus Cell Entry Occurs through the Endo-/Lysosomal Pathway in a Proteolysis-Dependent Manner. *PLoS Pathog.* 10, e1004502. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004502>
- Cao, Z., Henzel, W.J., Gao, X., 1996a. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271, 1128–1131. <https://doi.org/10.1126/science.271.5252.1128>
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., Goeddel, D.V., 1996b. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443–446. <https://doi.org/10.1038/383443a0>
- Chan, C.-P., Siu, K.-L., Chin, K.-T., Yuen, K.-Y., Zheng, B., Jin, D.-Y., 2006. Modulation of the Unfolded Protein Response by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein. *J. Virol.* 80, 9279–9287. <https://doi.org/10.1128/JVI.00659-06>
- Chan, J.F.-W., Chan, K.-H., Choi, G.K.-Y., To, K.K.-W., Tse, H., Cai, J.-P., Yeung, M.L., Cheng, V.C.-C., Chen, H., Che, X.-Y., Lau, S.K.-P., Woo, P.C.-Y., Yuen, K.-Y., 2013. Differential Cell Line Susceptibility to the Emerging Novel Human Betacoronavirus 2c EMC/2012: Implications for Disease Pathogenesis and Clinical Manifestation. *J. Infect. Dis.* 207, 1743–1752. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit123>
- Channappanavar, R., Perlman, S., 2017. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin. Immunopathol.* 39, 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
- Chen, B.P., Wolfgang, C.D., Hai, T., 1996. Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1157–1168. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.3.1157>
- Chen, C.-Y., Chang, C., Chang, Y.-W., Sue, S.-C., Bai, H.-I., Riang, L., Hsiao, C.-D., Huang, T., 2007. Structure of the SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein RNA-binding Dimerization Domain Suggests a Mechanism for Helical Packaging of Viral RNA. *J. Mol. Biol.* 368, 1075–1086. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.069>
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., Maniatis, T., 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 9, 1586–1597. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1586>
- Cheng, G., Feng, Z., He, B., 2005. Herpes Simplex Virus 1 Infection Activates the Endoplasmic Reticulum Resident Kinase PERK and Mediates eIF-2 α Dephosphorylation by the γ 134.5 Protein. *J. Virol.* 79, 1379–1388. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1379-1388.2005>
- Cheung, C.Y., Poon, L.L.M., Ng, I.H.Y., Luk, W., Sia, S.-F., Wu, M.H.S., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., Gordon, S., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2005. Cytokine Responses in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Infected Macrophages In Vitro: Possible Relevance to Pathogenesis. *J. Virol.* 79, 7819–7826. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7819-7826.2005>
- Chevillard, M., Hinnrasky, J., Pierrot, D., Zahm, J.M., Klossek, J.M., Puchelle, E., 1993. Differentiation of human surface upper airway epithelial cells in primary culture on a floating collagen gel. *Epithelial Cell Biol.* 2, 17–25.
- Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C., Dubuisson, J., 1998. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus

- glycoproteins. *J. Virol.* 72, 3851–3858. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.5.3851-3858.1998>
- Chu, H., Chan, J.F.-W., Yuen, T.T.-T., Shuai, H., Yuan, S., Wang, Y., Hu, B., Yip, C.C.-Y., Tsang, J.O.-L., Huang, X., Chai, Y., Yang, D., Hou, Y., Chik, K.K.-H., Zhang, X., Fung, A.Y.-F., Tsoi, H.-W., Cai, J.-P., Chan, W.-M., Ip, J.D., Chu, A.W.-H., Zhou, J., Lung, D.C., Kok, K.-H., To, K.K.-W., Tsang, O.T.-Y., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2020. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe* 1, e14–e23. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30004-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5)
- Chu, H., Zhou, J., Ho-Yin Wong, B., Li, C., Cheng, Z.-S., Lin, X., Kwok-Man Poon, V., Sun, T., Choi-Yi Lau, C., Fuk-Woo Chan, J., Kai-Wang To, K., Chan, K.-H., Lu, L., Zheng, B.-J., Yuen, K.-Y., 2014. Productive replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus in monocyte-derived dendritic cells modulates innate immune response. *Virology* 454, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.018>
- Chua, P., Lim, W.K., 2023. The strategic uses of collagen in adherent cell cultures. *Cell Biol. Int.* 47, 367–373. <https://doi.org/10.1002/cbin.11966>
- Cláudio, N., Dalet, A., Gatti, E., Pierre, P., 2013. Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. *EMBO J.* 32, 1214–1224. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.80>
- Clemens, M.J., Elia, A., 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 17, 503–524. <https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.503>
- Collins, A.R., Knobler, R.L., Powell, H., Buchmeier, M.J., 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* 119, 358–371. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90095-2)
- Cong, F., Liu, X., Han, Z., Shao, Y., Kong, X., Liu, S., 2013. Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection. *BMC Genomics* 14, 743. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-743>
- Coronavirus Disease (COVID-19) - events as they happen [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen> (accessed 1.16.23).
- Coronavirus disease (COVID-19) – World Health Organization [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (accessed 1.16.23).
- Current ICTV Taxonomy Release | ICTV [WWW Document], n.d. URL <https://ictv.global/taxonomy> (accessed 11.30.22).
- Cushing, M.C., Anseth, K.S., 2007. Hydrogel Cell Cultures. *Science* 316, 1133–1134. <https://doi.org/10.1126/science.1140171>
- Dauber, B., Saffran, H.A., Smiley, J.R., 2014. The Herpes Simplex Virus 1 Virion Host Shutoff Protein Enhances Translation of Viral Late mRNAs by Preventing mRNA Overload. *J. Virol.* 88, 9624–9632. <https://doi.org/10.1128/JVI.01350-14>
- de Haan, C.A.M., Rottier, P.J.M., 2005. Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 64, 165–230. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)64006-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(05)64006-7)
- De Haro, C., Méndez, R., Santoyo, J., 1996. The eIF-2 α kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J.* 10, 1378–1387. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.12.8903508>

- de Vries, A.A.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., de Groot, R.J., 1997. The Genome Organization of the Nidovirales: Similarities and Differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Semin. Virol.* 8, 33–47. <https://doi.org/10.1006/smv.1997.0104>
- DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Regla-Nava, J.A., Jimenez-Guardeño, J.M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castaño-Rodriguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., 2014. Inhibition of NF- κ B-Mediated Inflammation in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Infected Mice Increases Survival. *J. Virol.* 88, 913–924. <https://doi.org/10.1128/JVI.02576-13>
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, Sjöström, H., Norén, Laude, H., 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357, 417–420. <https://doi.org/10.1038/357417a0>
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., Chen, Z.J., 2000. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351–361. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00126-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00126-4)
- Der erste sichere und wirksame Impfstoff gegen COVID-19 [WWW Document], n.d. . Eur. Comm. - Eur. Comm. URL https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/de/ip_20_2466 (accessed 3.7.23).
- Di Paolo, N.C., Shayakhmetov, D.M., 2016. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat. Immunol.* 17, 906–913. <https://doi.org/10.1038/ni.3503>
- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., Karin, M., 1997. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388, 548–554. <https://doi.org/10.1038/41493>
- Dinarello, C.A., 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117, 3720–3732. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417>
- Dinarello, C.A., 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Dinarello, C.A., 1996. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. *Blood* 87, 2095–2147. <https://doi.org/10.1182/blood.V87.6.2095.bloodjournal8762095>
- Doughri, A.M., Storz, J., Hajer, I., Fernando, H.S., 1976. Morphology and morphogenesis of a coronavirus infecting intestinal epithelial cells of newborn calves. *Exp. Mol. Pathol.* 25, 355–370. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(76\)90045-9](https://doi.org/10.1016/0014-4800(76)90045-9)
- Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A.M., Berger, A., Burguière, A.-M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.-C., Müller, S., Rickerts, V., Stürmer, M., Vieth, S., Klenk, H.-D., Osterhaus, A.D.M.E., Schmitz, H., Doerr, H.W., 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1967–1976. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>
- Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B., Jiang, S., 2009. The spike protein of SARS-CoV - A target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 226–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>
- Echavarría-Consuegra, L., Cook, G.M., Busnadiago, I., Lefèvre, C., Keep, S., Brown, K., Doyle, N., Dowgier, G., Franaszek, K., Moore, N.A., Siddell, S.G., Bickerton, E., Hale, B.G., Firth, A.E., Brierley, I., Irigoyen, N., 2021. Manipulation of the unfolded protein response: A pharmacological strategy

- against coronavirus infection. *PLoS Pathog.* 17.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009644>
- Ellis, J., 1987. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328, 378–379.
<https://doi.org/10.1038/328378a0>
- Farcas, G.A., Poutanen, S.M., Mazzulli, T., Willey, B.M., Butany, J., Asa, S.L., Faure, P., Akhavan, P., Low, D.E., Kain, K.C., 2005. Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Is Associated with Multiorgan Involvement by Coronavirus. *J. Infect. Dis.* 191, 193–197. <https://doi.org/10.1086/426870>
- Finkel, Y., Gluck, A., Nachshon, A., Winkler, R., Fisher, T., Rozman, B., Mizrahi, O., Lubelsky, Y., Zuckerman, B., Slobodin, B., Yahalom-Ronen, Y., Tamir, H., Ulitsky, I., Israely, T., Paran, N., Schwartz, M., Stern-Ginossar, N., 2021. SARS-CoV-2 uses a multipronged strategy to impede host protein synthesis. *Nature* 594, 240–245. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03610-3>
- Fukaya, M., Brorsson, C.A., Meyerovich, K., Catrysse, L., Delaroché, D., Vanzela, E.C., Ortis, F., Beyaert, R., Nielsen, L.B., Andersen, M.L., Mortensen, H.B., Pociot, F., van Loo, G., Størling, J., Cardozo, A.K., 2016. A20 Inhibits β -Cell Apoptosis by Multiple Mechanisms and Predicts Residual β -Cell Function in Type 1 Diabetes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 30, 48–61.
<https://doi.org/10.1210/me.2015-1176>
- Fung, T.S., Liu, D.X., 2014. Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Front. Microbiol.* 5, 296. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00296>
- Funk, C.J., Wang, J., Ito, Y., Travanty, E.A., Voelker, D.R., Holmes, K.V., Mason, R.J., 2012. Infection of human alveolar macrophages by human coronavirus strain 229E. *J. Gen. Virol.* 93, 494–503. <https://doi.org/10.1099/vir.0.038414-0>
- Gabay, C., Lamacchia, C., Palmer, G., 2010. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 232–241.
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.4>
- Gaestel, M., Kotlyarov, A., Kracht, M., 2009. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 480–499.
<https://doi.org/10.1038/nrd2829>
- Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S., de Groot, R.J., Drosten, C., Gulyaeva, A.A., Haagmans, B.L., Lauber, C., Leontovich, A.M., Neuman, B.W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L.L.M., Samborskiy, D.V., Sidorov, I.A., Sola, I., Ziebuhr, J., Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., Baker, S.C., 2002. RNA Replication of Mouse Hepatitis Virus Takes Place at Double-Membrane Vesicles. *J. Virol.* 76, 3697–3708. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.3697-3708.2002>
- Gu, J., Gong, E., Zhang, B., Zheng, J., Gao, Z., Zhong, Y., Zou, W., Zhan, J., Wang, S., Xie, Z., Zhuang, H., Wu, B., Zhong, H., Shao, H., Fang, W., Gao, D., Pei, F., Li, X., He, Z., Xu, D., Shi, X., Anderson, V.M., Leong, A.S.-Y., 2005. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J. Exp. Med.* 202, 415–424.
<https://doi.org/10.1084/jem.20050828>
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Yu, Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D.S.C., Du, B., Li, L., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., Li, S., Wang, Jin-lin, Liang, Z., Peng, Y., Wei, L., Liu, Y., Hu, Ya-hua, Peng, P., Wang, Jian-ming, Liu, J., Chen, Z., Li, G., Zheng, Z., Qiu, S., Luo, J., Ye, C., Zhu, S., Zhong, N., for 2019-nCoV, on behalf of

- C.M.T.E.G., 2020. Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in China. <https://doi.org/10.1101/2020.02.06.20020974>
- Guarner, J., 2020. Three Emerging Coronaviruses in Two Decades. *Am. J. Clin. Pathol.* 153, 420–421. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa029>
- Hagemeyer, M.C., Monastyrska, I., Griffith, J., van der Sluijs, P., Voortman, J., van Bergen en Henegouwen, P.M., Vonk, A.M., Rottier, P.J.M., Reggiori, F., de Haan, C.A.M., 2014. Membrane rearrangements mediated by coronavirus nonstructural proteins 3 and 4. *Virology* 458, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.027>
- Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M., Lely, A., Navis, G., van Goor, H., 2004. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 203, 631–637. <https://doi.org/10.1002/path.1570>
- Hammond, M.E., Lapointe, G.R., Feucht, P.H., Hilt, S., Gallegos, C.A., Gordon, C.A., Giedlin, M.A., Mullenbach, G., Tekamp-Olson, P., 1995. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 1428–1433.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274. <https://doi.org/10.1038/16729>
- Harrison, S.C., 2008. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 690–698. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1456>
- Hartl, F.U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571–580. <https://doi.org/10.1038/381571a0>
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 10, 3787–3799. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>
- He, B., 2006. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ.* 13, 393–403. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401833>
- He, L., Ding, Y., Zhang, Q., Che, X., He, Y., Shen, H., Wang, H., Li, Z., Zhao, L., Geng, J., Deng, Y., Yang, L., Li, J., Cai, J., Qiu, L., Wen, K., Xu, X., Jiang, S., 2006. Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-CoV-infected ACE2+ cells in SARS patients: relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. *J. Pathol.* 210, 288–297. <https://doi.org/10.1002/path.2067>
- Hebert, D.N., Molinari, M., 2007. In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases. *Physiol. Rev.* 87, 1377–1408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2006>
- Helmy, Y.A., Fawzy, M., Elawad, A., Sobieh, A., Kenney, S.P., Shehata, A.A., 2020. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *J. Clin. Med.* 9, 1225. <https://doi.org/10.3390/jcm9041225>
- Hetz, C., Zhang, K., Kaufman, R.J., 2020. Mechanism, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Hilton, A., Mizzen, L., MacIntyre, G., Cheley, S., Anderson, R., 1986. Translational control in murine hepatitis virus infection. *J. Gen. Virol.* 67 (Pt 5), 923–932. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-5-923>
- Ho, J.C., Ooi, G.C., Mok, T.Y., Chan, J.W., Hung, I., Lam, B., Wong, P.C., Li, P.C., Ho, P.L., Lam, W.K., Ng, C.K., Ip, M.S., Lai, K.N., Chan-Yeung, M., Tsang,

- K.W., 2003. High-dose pulse versus nonpulse corticosteroid regimens in severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 1449–1456. <https://doi.org/10.1164/rccm.200306-766OC>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S., 2020. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hofmann, H., Hattermann, K., Marzi, A., Gramberg, T., Geier, M., Krumbiegel, M., Kuate, S., Überla, K., Niedrig, M., Pöhlmann, S., 2004. S Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Mediates Entry into Hepatoma Cell Lines and Is Targeted by Neutralizing Antibodies in Infected Patients. *J. Virol.* 78, 6134–6142. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6134-6142.2004>
- Hofmann, H., Pöhlmann, S., 2004. Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol.* 12, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.08.008>
- Horita, A., Weber, L.J., 1964. Skin penetrating property of drugs dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and other vehicles. *Life Sci.* 3, 1389–1395. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(64\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(64)90079-7)
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., Shi, Z.-L., 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Hu, W.-S., Hughes, S.H., 2012. HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., Cao, B., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* 395, 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Huang, K., Su, I., Theron, M., Wu, Y., Lai, S., Liu, C., Lei, H., 2005. An interferon- γ -related cytokine storm in SARS patients. *J. Med. Virol.* 75, 185–194. <https://doi.org/10.1002/jmv.20255>
- Hulswit, R.J.G., de Haan, C.A.M., Bosch, B.-J., 2016. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv. Virus Res.* 96, 29–57. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.004>
- Hurtley, S.M., Bole, D.G., Hoover-Litty, H., Helenius, A., Copeland, C.S., 1989. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J. Cell Biol.* 108, 2117–2126. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.6.2117>
- Inoue, Y., Tanaka, N., Tanaka, Y., Inoue, S., Morita, K., Zhuang, M., Hattori, T., Sugamura, K., 2007. Clathrin-Dependent Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus into Target Cells Expressing ACE2 with the Cytoplasmic Tail Deleted. *J. Virol.* 81, 8722–8729. <https://doi.org/10.1128/JVI.00253-07>
- Jiang, H.-Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Lu, D., Hai, T., Harding, H.P., Wang, X., Ron, D., Cavener, D.R., Wek, R.C., 2004. Activating Transcription Factor 3 Is Integral to the Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1365–1377. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.3.1365-1377.2004>
- Jonsdottir, H.R., Dijkman, R., 2016. Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. *Virol. J.* 13, 24. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0479-5>

- Kamitani, W., Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Ikegami, T., Ito, N., Kubo, H., Makino, S., 2006. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12885–12890. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603144103>
- Kathage, B., Gehlert, S., Ulbricht, A., Lüdecke, L., Tapia, V.E., Orfanos, Z., Wenzel, D., Bloch, W., Volkmer, R., Fleischmann, B.K., Fürst, D.O., Höhfeld, J., 2017. The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.007>
- Kaur, A., Gautam, R., Srivastava, R., Chandel, A., Kumar, A., Karthikeyan, S., Bachhawat, A.K., 2017. ChaC2, an Enzyme for Slow Turnover of Cytosolic Glutathione. *J. Biol. Chem.* 292, 638–651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.727479>
- Kaye, M., Druce, J., Tran, T., KostECKi, R., Chibo, D., Morris, J., Catton, M., Birch, C., 2006. SARS-associated Coronavirus Replication in Cell Lines. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 128–133. <https://doi.org/10.3201/eid1201.050496>
- Kirchdoerfer, R.N., Cottrell, C.A., Wang, N., Pallesen, J., Yassine, H.M., Turner, H.L., Corbett, K.S., Graham, B.S., McLellan, J.S., Ward, A.B., 2016. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* 531, 118–121. <https://doi.org/10.1038/nature17200>
- Kircheis, R., Haasbach, E., Lueftenegger, D., Heyken, W.T., Ocker, M., Planz, O., 2020. NF- κ B Pathway as a Potential Target for Treatment of Critical Stage COVID-19 Patients. *Front. Immunol.* 11, 598444. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.598444>
- Kluge, S., Janssens, U., Welte, T., Weber-Carstens, S., Schälte, G., Spinner, C.D., Malin, J.J., Gastmeier, P., Langer, F., Bracht, H., Westhoff, M., Pfeifer, M., Rabe, K.F., Hoffmann, F., Böttiger, B.W., Weinmann-Menke, J., Kersten, A., Berlit, P., Krawczyk, M., Haase, R., Müller, O.J., Specker, C., Nothacker, M., Marx, G., Karagiannidis, C., 2022. S3-Leitlinie - Empfehlungen zur stationären Therapie von Patienten mit COVID-19.
- Klumperman, J., Locker, J.K., Meijer, A., Horzinek, M.C., Geuze, H.J., Rottier, P.J., 1994. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J. Virol.* 68, 6523–6534.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.-J., Sambrook, J., 1988. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462–464. <https://doi.org/10.1038/332462a0>
- Krähling, V., Stein, D.A., Spiegel, M., Weber, F., Mühlberger, E., 2009. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Triggers Apoptosis via Protein Kinase R but Is Resistant to Its Antiviral Activity. *J. Virol.* 83, 2298–2309. <https://doi.org/10.1128/JVI.01245-08>
- Krause, A., Holtmann, H., Eickemeier, S., Winzen, R., Szamel, M., Resch, K., Saklatvala, J., Kracht, M., 1998. Stress-activated Protein Kinase/Jun N-terminal Kinase Is Required for Interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 Gene Expression in the Human Epidermal Carcinoma Cell Line KB *. *J. Biol. Chem.* 273, 23681–23689. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23681>
- Krijnse-Locker, J., Ericsson, M., Rottier, P.J., Griffiths, G., 1994. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J. Cell Biol.* 124, 55–70. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.1.55>

- Kwon, J.-W., Kwon, H.-K., Shin, H.-J., Choi, Y.-M., Anwar, M.A., Choi, S., 2015. Activating transcription factor 3 represses inflammatory responses by binding to the p65 subunit of NF- κ B. *Sci. Rep.* 5, 14470. <https://doi.org/10.1038/srep14470>
- Kyriazopoulou, E., Poulakou, G., Millionis, H., Metallidis, S., Adamis, G., Tsiakos, K., Fragkou, A., Rapti, A., Damoulari, C., Fantoni, M., Kalomenidis, I., Chrysos, G., Angheben, A., Kainis, I., Alexiou, Z., Castelli, F., Serino, F.S., Tsilika, M., Bakakos, P., Nicastrì, E., Tzavara, V., Kostis, E., Dagna, L., Koufargyris, P., Dimakou, K., Savvanis, S., Tzatzagou, G., Chini, M., Cavalli, G., Bassetti, M., Katrini, K., Kotsis, V., Tsoukalas, G., Selmi, C., Bliziotis, I., Samarkos, M., Doulas, M., Ktena, S., Masgala, A., Papanikolaou, I., Kosmidou, M., Myrodi, D.-M., Argyraki, A., Cardellino, C.S., Koliakou, K., Katsigianni, E.-I., Rapti, V., Giannitsioti, E., Cingolani, A., Micha, S., Akinosoglou, K., Liatsis-Douvitsas, O., Symbardi, S., Gatselis, N., Mouktaroudi, M., Ippolito, G., Florou, E., Kotsaki, A., Netea, M.G., Eugen-Olsen, J., Kyprianou, M., Panagopoulos, P., Dalekos, G.N., Giamarellos-Bourboulis, E.J., 2021. Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: a double-blind, randomized controlled phase 3 trial. *Nat. Med.* 27, 1752–1760. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01499-z>
- Lai, M.M., Stohlman, S.A., 1978. RNA of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* 26, 236–242.
- Lai, M.M.C., Cavanagh, D., 1997. The Molecular Biology of Coronaviruses, in: Maramorosch, K., Murphy, F.A., Shatkin, A.J. (Eds.), *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 1–100. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9)
- Lau, S.K.P., Lau, C.C.Y., Chan, K.-H., Li, C.P.Y., Chen, H., Jin, D.-Y., Chan, J.F.W., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., 2013. Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: implications for pathogenesis and treatment. *J. Gen. Virol.* 94, 2679–2690. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055533-0>
- Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Li, K.S.M., Huang, Y., Tsoi, H.-W., Wong, B.H.L., Wong, S.S.Y., Leung, S.-Y., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 14040–14045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>
- Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G.M., Ahuja, A., Yung, M.Y., Leung, C.B., To, K.F., Lui, S.F., Szeto, C.C., Chung, S., Sung, J.J.Y., 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* 348, 1986–1994. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030685>
- Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., Smith, D.B., 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 46, D708–D717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Li, G., Hilgenfeld, R., Whitley, R., De Clercq, E., 2023. Therapeutic strategies for COVID-19: progress and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* 22, 449–475. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00672-y>
- Li, J., Hsu, H.-C., Mountz, J.D., Allen, J.G., 2018. Unmasking Fucosylation: from Cell Adhesion to Immune System Regulation and Diseases. *Cell Chem. Biol.* 25, 499–512. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.02.005>
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H., Farzan, M., 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>

- Li, Z.-W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., Karin, M., 1999. The IKK β Subunit of I κ B Kinase (IKK) is Essential for Nuclear Factor κ B Activation and Prevention of Apoptosis. *J. Exp. Med.* 189, 1839–1845.
- Liao, Y., Fung, T.S., Huang, M., Fang, S.G., Zhong, Y., Liu, D.X., 2013. Upregulation of CHOP/GADD153 during Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Infection Modulates Apoptosis by Restricting Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *J. Virol.* 87, 8124–8134. <https://doi.org/10.1128/JVI.00626-13>
- Liao, Y., Wang, X., Huang, M., Tam, J.P., Liu, D.X., 2011. Regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase and dual-specificity phosphatase 1 feedback loop modulates the induction of interleukin 6 and 8 in cells infected with coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* 420, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.003>
- Lin, D., Mei, Y., Lei, L., Binte Hanafi, Z., Jin, Z., Liu, Y., Song, Y., Zhang, Y., Hu, B., Liu, C., Lu, J., Liu, H., 2022. Immune suppressive function of IL-1 α release in the tumor microenvironment regulated by calpain 1. *Oncoimmunology* 11, 2088467. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2088467>
- Liu, D.X., Liang, J.Q., Fung, T.S., 2021. Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). *Encycl. Virol.* 428–440. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X>
- Liu, G., Betts, C., Cunoosamy, D.M., Åberg, P.M., Hornberg, J.J., Sivars, K.B., Cohen, T.S., 2019. Use of precision cut lung slices as a translational model for the study of lung biology. *Respir. Res.* 20, 162. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1131-x>
- Loong, J.H.C., Wong, T.-L., Tong, M., Sharma, R., Zhou, L., Ng, K.-Y., Yu, H.-J., Li, C.-H., Man, K., Lo, C.-M., Guan, X.-Y., Lee, T.K., Yun, J.-P., Ma, S.K.Y., 2021. Glucose deprivation–induced aberrant FUT1-mediated fucosylation drives cancer stemness in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Invest.* 131. <https://doi.org/10.1172/JCI143377>
- Lüllmann-Rauch, R., Asan, E., 2019. Extrazellulärmatrix, in: *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, Stuttgart.
- Ma, A., Malynn, B.A., 2012. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 774–785. <https://doi.org/10.1038/nri3313>
- Macleod, T., Berekmeri, A., Bridgewood, C., Stacey, M., McGonagle, D., Wittmann, M., 2021. The Immunological Impact of IL-1 Family Cytokines on the Epidermal Barrier. *Front. Immunol.* 12, 808012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808012>
- Madan, V., García, M. de J., Sanz, M.A., Carrasco, L., 2005. Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. *Febs Lett.* 579, 3607–3612. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.046>
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18, 3066–3077. <https://doi.org/10.1101/gad.1250704>
- Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J., 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 229–265. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715>
- Masters, P.S., 2006. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)

- Mbalaviele, G., Sommers, C.D., Bonar, S.L., Mathialagan, S., Schindler, J.F., Guzova, J.A., Shaffer, A.F., Melton, M.A., Christine, L.J., Tripp, C.S., Chiang, P.-C., Thompson, D.C., Hu, Y., Kishore, N., 2009. A Novel, Highly Selective, Tight Binding I κ B Kinase-2 (IKK-2) Inhibitor: A Tool to Correlate IKK-2 Activity to the Fate and Functions of the Components of the Nuclear Factor- κ B Pathway in Arthritis-Relevant Cells and Animal Models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329, 14–25. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.143800>
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4–9. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(97\)80152-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(97)80152-5)
- Mehta, P., McAuley, D.F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R.S., Manson, J.J., 2020. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet Lond. Engl.* 395, 1033–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
- Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) [WWW Document], n.d. URL [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov)) (accessed 1.15.23).
- Millet, J.K., Whittaker, G.R., 2015. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 202, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
- Minkoff, J.M., tenOever, B., 2023. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 21, 178–194. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00839-1>
- Mizutani, S., Boettiger, D., Temin, H.M., 1970. A DNA-dependent DNA Polymerase and a DNA Endonuclease in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* 228, 424–427. <https://doi.org/10.1038/228424a0>
- Mizutani, T., Fukushi, S., Ishii, K., Sasaki, Y., Kenri, T., Saijo, M., Kanaji, Y., Shirota, K., Kurane, I., Morikawa, S., 2006. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.086>
- Modrow, S., Truyen, U., Schätzl, H., 2021a. Viren: Definition, Aufbau, Einteilung, in: *Molekulare Virologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 13–27. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61781-6_2
- Modrow, S., Truyen, U., Schätzl, H., 2021b. Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in Plusstrangorientierung, in: *Molekulare Virologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 163–321. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61781-6_14
- Modrow, S., Truyen, U., Schätzl, H., 2021c. Virusvermehrung und Replikation, in: *Molekulare Virologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 29–34. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61781-6_3
- Mülhardt, C., 2008. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*, 6. Aufl. 2009 Edition. ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Müller, L., Di Benedetto, S., Pawelec, G., 2019. The Immune System and Its Dysregulation with Aging, in: Harris, J.R., Korolchuk, V.I. (Eds.), *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science, Subcellular Biochemistry*. Springer, Singapore, pp. 21–43. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_2
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction [WWW Document]. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Mungrue, I.N., Pagnon, J., Kohannim, O., Gargalovic, P.S., Lusic, A.J., 2009. CHAC1/MGC4504 Is a Novel Proapoptotic Component of the Unfolded Protein

- Response, Downstream of the ATF4-ATF3-CHOP Cascade. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 182, 466–476.
- Murphy, K., Weaver, C., 2018. Die induzierten Reaktionen der angeborenen Immunität, in: *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 95–173. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4_3
- Musone, S.L., Taylor, K.E., Lu, T.T., Nititham, J., Ferreira, R.C., Ortmann, W., Shifrin, N., Petri, M.A., Kamboh, M.I., Manzi, S., Seldin, M.F., Gregersen, P.K., Behrens, T.W., Ma, A., Kwok, P.-Y., Criswell, L.A., 2008. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 40, 1062–1064. <https://doi.org/10.1038/ng.202>
- Nakao, S., Ogata, Y., Shimizu-Sasaki, E., Yamazaki, M., Furuyama, S., Sugiya, H., 2000. Activation of NFkappaB is necessary for IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human gingival fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 209, 113–118. <https://doi.org/10.1023/a:1007155525020>
- Narayanan, K.B., Park, H.H., 2015. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 20, 196–209. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1073-1>
- Nicholls, J.M., Poon, L.L., Lee, K.C., Ng, W.F., Lai, S.T., Leung, C.Y., Chu, C.M., Hui, P.K., Mak, K.L., Lim, W., Yan, K.W., Chan, K.H., Tsang, N.C., Guan, Y., Yuen, K.Y., Malik Peiris, J., 2003. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 361, 1773–1778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13413-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13413-7)
- Nomura, R., Kiyota, A., Suzaki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T., Fujimoto, T., 2004. Human Coronavirus 229E Binds to CD13 in Rafts and Enters the Cell through Caveolae. *J. Virol.* 78, 8701–8708. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8701-8708.2004>
- Olajide, O.A., Iwuanyanwu, V.U., Adegbola, O.D., Al-Hindawi, A.A., 2022. SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 Induces Neuroinflammation in BV-2 Microglia. *Mol. Neurobiol.* 59, 445–458. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02593-6>
- Peiris, J.S.M., Lai, S.T., Poon, L.L.M., Guan, Y., Yam, L.Y.C., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K.S., Yan, W.W., Cheung, M.T., Cheng, V.C.C., Chan, K.H., Tsang, D.N.C., Yung, R.W.H., Ng, T.K., Yuen, K.Y., SARS study group, 2003a. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 361, 1319–1325. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13077-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13077-2)
- Peiris, J.S.M., Yuen, K.Y., Osterhaus, A.D.M.E., Stöhr, K., 2003b. The severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 349, 2431–2441. <https://doi.org/10.1056/NEJMra032498>
- Perga, S., Martire, S., Montarolo, F., Navone, N.D., Calvo, A., Fuda, G., Marchet, A., Leotta, D., Chiò, A., Bertolotto, A., 2017. A20 in Multiple Sclerosis and Parkinson’s Disease: Clue to a Common Dysregulation of Anti-Inflammatory Pathways? *Neurotox. Res.* 32, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9724-y>
- PERK-Inhibitor I, GSK2606414, CAS-Nr. 1337531-89-1, Calbiochem GSK2606414 is a cell-permeable, highly potent inhibitor of EIF2AK3/PERK (IC₅₀ = 0.4 nM; [ATP] = 5 μM). Targets PERK in its inactive DFG conformation at the ATP-binding region. | Sigma-Aldrich [WWW Document], n.d. URL <http://www.sigmaaldrich.com/> (accessed 3.7.23).
- Petersen, E., Koopmans, M., Go, U., Hamer, D.H., Petrosillo, N., Castelli, F., Storgaard, M., Al Khalili, S., Simonsen, L., 2020. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect. Dis.* 20, e238–e244. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30484-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30484-9)

- Pfaffl, M., 2006. Relative quantification, in: *Real Time PCR BIOS Advanced Methods*. Taylor&Francis, pp. 58–62.
- PHA-408 \geq 98% (HPLC) | 503555-55-3 [WWW Document], n.d. URL <http://www.sigmaaldrich.com/> (accessed 3.7.23).
- Pieren, M., Galli, C., Denzel, A., Molinari, M., 2005. The Use of Calnexin and Calreticulin by Cellular and Viral Glycoproteins *. *J. Biol. Chem.* 280, 28265–28271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501020200>
- Poppe, M., 2017. Untersuchung der humanen Coronavirus-induzierten Wirtsreaktion auf mRNA- und Proteomebene.
- Poppe, M., Wittig, S., Jurida, L., Bartkuhn, M., Wilhelm, J., Müller, H., Beuerlein, K., Karl, N., Bhujju, S., Ziebuhr, J., Schmitz, M., Kracht, M., 2017. The NF- κ B-dependent and -independent transcriptome and chromatin landscapes of human coronavirus 229E-infected cells. *PLoS Pathog.* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006286>
- Prostko, C.R., Brostrom, M.A., Malara, E.M., Brostrom, C.O., 1992. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78. *J. Biol. Chem.* 267, 16751–16754.
- Qinfen, Z., Jinming, C., Xiaojun, H., Huanying, Z., Jicheng, H., Ling, F., Kunpeng, L., Jingqiang, Z., 2004. The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J. Med. Virol.* 73, 332–337. <https://doi.org/10.1002/jmv.20095>
- Raaben, M., Groot Koerkamp, M.J.A., Rottier, P.J.M., De Haan, C.A.M., 2007. Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies. *Cell. Microbiol.* 9, 2218–2229. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00951.x>
- RECOVERY Collaborative Group, Horby, P., Lim, W.S., Emberson, J.R., Mafham, M., Bell, J.L., Linsell, L., Staplin, N., Brightling, C., Ustianowski, A., Elmahi, E., Prudon, B., Green, C., Felton, T., Chadwick, D., Rege, K., Fegan, C., Chappell, L.C., Faust, S.N., Jaki, T., Jeffery, K., Montgomery, A., Rowan, K., Juszczak, E., Baillie, J.K., Haynes, R., Landray, M.J., 2021. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 384, 693–704. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436>
- Reusken, C.B., Farag, E.A., Jonges, M., Godeke, G.J., El-Sayed, A.M., Pas, S.D., Raj, V.S., Mohran, K.A., Moussa, H.A., Ghobashy, H., Alhajri, F., Ibrahim, A.K., Bosch, B.J., Pasha, S.K., Al-Romaihi, H.E., Al-Thani, M., Al-Marri, S.A., AlHajri, M.M., Haagmans, B.L., Koopmans, M.P., 2014. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 19, 20829. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.23.20829>
- RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - COVID-19: Therapiehinweise und Empfehlungen [WWW Document], n.d. URL https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Therapie/Therapie_Tab.html?nn=13490888 (accessed 1.3.24).
- Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
- Rottier, P.J.M., 1995. The Coronavirus Membrane Glycoprotein, in: Siddell, S.G. (Ed.), *The Coronaviridae*. Springer US, Boston, MA, pp. 115–139. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1531-3_6

- Rozpędek-Kamińska, W., Siwecka, N., Wawrzynkiewicz, A., Wojtczak, R., Pytel, D., Diehl, J.A., Majsterek, I., 2020. The PERK-Dependent Molecular Mechanisms as a Novel Therapeutic Target for Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2108. <https://doi.org/10.3390/ijms21062108>
- Ruch, T.R., Machamer, C.E., 2012. The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses* 4, 363–382. <https://doi.org/10.3390/v4030363>
- Ruedinger, F., Lavrentieva, A., Blume, C., Pepelanova, I., Scheper, T., 2015. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 623–636. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6253-y>
- Rychlik, W., Rhoads, R., 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA [WWW Document]. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/17.21.8543>
- Sanyal, A., Chen, A.J., Nakayasu, E.S., Lazar, C.S., Zbornik, E.A., Worby, C.A., Koller, A., Mattoo, S., 2015. A Novel Link between Fic (Filamentation Induced by cAMP)-mediated Adenylylation/AMPylation and the Unfolded Protein Response. *J. Biol. Chem.* 290, 8482–8499. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618348>
- Sattentau, Q., 2008. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 815–826. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1972>
- Scheuner, D., Patel, R., Wang, F., Lee, K., Kumar, K., Wu, J., Nilsson, A., Karin, M., Kaufman, R.J., 2006. Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 21458–21468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603784200>
- Schmitz, M.L., Shaban, M.S., Albert, B.V., Gökçen, A., Kracht, M., 2018. The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathways with NF-κB: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection. *Biomedicines* 6, 58. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020058>
- Schoeman, D., Fielding, B.C., 2019. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J.* 16, 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
- Schulz, T.F., 2016. Infektionsverlauf und Pathogenität, in: *Medizinische Mikrobiologie Und Infektiologie*, Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 437–445.
- Sewald, X., Motamedi, N., Mothes, W., 2016. Viruses exploit the tissue physiology of the host to spread in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol., Cell organelles* 41, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.04.008>
- Shaban, M.S., Müller, C., Mayr-Buro, C., Weiser, H., Meier-Soelch, J., Albert, B.V., Weber, A., Linne, U., Hain, T., Babayev, I., Karl, N., Hofmann, N., Becker, S., Herold, S., Schmitz, M.L., Ziebuhr, J., Kracht, M., 2021. Multi-level inhibition of coronavirus replication by chemical ER stress. *Nat. Commun.* 12, 5536. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25551-1>
- Shembade, N., Ma, A., Harhaj, E.W., 2010. Inhibition of NF-κB Signaling by A20 Through Disruption of Ubiquitin Enzyme Complexes. *Science* 327, 1135–1139. <https://doi.org/10.1126/science.1182364>
- Shi, Y., Vattem, K.M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., Wek, R.C., 1998. Identification and Characterization of Pancreatic Eukaryotic Initiation Factor 2 α-Subunit Kinase, PEK, Involved in Translational Control. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7499–7509.
- Shimane, K., Kochi, Y., Horita, T., Ikari, K., Amano, H., Hirakata, M., Okamoto, A., Yamada, R., Myouzen, K., Suzuki, A., Kubo, M., Atsumi, T., Koike, T.,

- Takasaki, Y., Momohara, S., Yamanaka, H., Nakamura, Y., Yamamoto, K., 2010. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.* 62, 574–579. <https://doi.org/10.1002/art.27190>
- Shuid, A.N., Safi, N., Haghani, A., Mehrbod, P., Haron, M.S.R., Tan, S.W., Omar, A.R., 2015. Apoptosis transcriptional mechanism of feline infectious peritonitis virus infected cells. *Apoptosis* 20, 1457–1470. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1172-7>
- Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., Gallagher, T., 2011. A Transmembrane Serine Protease Is Linked to the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor and Activates Virus Entry. *J. Virol.* 85, 873–882. <https://doi.org/10.1128/JVI.02062-10>
- Simmons, G., Reeves, J.D., Rennekamp, A.J., Amberg, S.M., Piefer, A.J., Bates, P., 2004. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4240–4245. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306446101>
- Sims, J.E., Pan, Y., Smith, D.E., Nicklin, M.J.H., Barton, J.L., Bazan, J.F., Kastelein, R.A., Busfield, S.J., Ford, J.E., Lin, H., Mulero, J.J., Kumar, S., Pan, J. (Guohua), Young, P.R., 2001. A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends Immunol.* 22, 536–537. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02040-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02040-3)
- Snijder, E.J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J.J.M., van der Meulen, J., Koerten, H.K., Mommaas, A.M., 2006. Ultrastructure and Origin of Membrane Vesicles Associated with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Complex. *J. Virol.* 80, 5927–5940. <https://doi.org/10.1128/JVI.02501-05>
- Song, H.Y., Rothe, M., Goeddel, D.V., 1996. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6721–6725.
- Stertz, S., Reichelt, M., Spiegel, M., Kuri, T., Martínez-Sobrido, L., García-Sastre, A., Weber, F., Kochs, G., 2007. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* 361, 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.027>
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., 1983. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 28, 35–112. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60721-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60721-6)
- Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., Greene, W.C., 1993. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912–1915. <https://doi.org/10.1126/science.8096091>
- Surjit, M., Lal, S.K., 2008. The SARS-CoV nucleocapsid protein: A protein with multifarious activities. *Infect. Genet. Evol.* 8, 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.07.004>
- Szaruga, M., Janssen, D.A., de Miguel, C., Hodgson, G., Fatalska, A., Pitera, A.P., Andreeva, A., Bertolotti, A., 2023. Activation of the integrated stress response by inhibitors of its kinases. *Nat. Commun.* 14, 5535. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40823-8>
- Taguchi, F., 1993. Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. *J. Virol.* 67, 1195–1202. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.3.1195-1202.1993>
- Tang, B.S.F., Chan, K., Cheng, V.C.C., Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lam, C.C.K., Chan, T., Wu, A.K.L., Hung, I.F.N., Leung, S., Yuen, K., 2005. Comparative Host Gene Transcription by Microarray Analysis Early after Infection of the Huh7

- Cell Line by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Human Coronavirus 229E. *J. Virol.* 79, 6180–6193.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6180-6193.2005>
- Than, T.T., Tran, G.V.Q., Son, K., Park, E.-M., Kim, S., Lim, Y.-S., Hwang, S.B., 2016. Ankyrin Repeat Domain 1 is Up-regulated During Hepatitis C Virus Infection and Regulates Hepatitis C Virus Entry. *Sci. Rep.* 6, 20819.
<https://doi.org/10.1038/srep20819>
- Thompson, S.R., Sarnow, P., 2000. Regulation of host cell translation by viruses and effects on cell function. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 366–370.
[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00106-5)
- Tian, X., Zhang, S., Zhou, L., Seyhan, A.A., Hernandez Borrero, L., Zhang, Y., El-Deiry, W.S., 2021. Targeting the Integrated Stress Response in Cancer Therapy. *Front. Pharmacol.* 12, 747837. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.747837>
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., Kaufman, R.J., 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 12, 1812–1824. <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1812>
- To, K., Tong, J.H., Chan, P.K., Au, F.W., Chim, S.S., Allen Chan, K., Cheung, J.L., Liu, E.Y., Tse, G.M., Lo, A.W., Dennis Lo, Y., Ng, H., 2004. Tissue and cellular tropism of the coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome: an in-situ hybridization study of fatal cases. *J. Pathol.* 202, 157–163.
<https://doi.org/10.1002/path.1510>
- Tooze, J., Tooze, S., Warren, G., 1984. Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell Biol.* 33, 281–293.
- Tortorici, M.A., Walls, A.C., Lang, Y., Wang, C., Li, Z., Koerhuis, D., Boons, G.-J., Bosch, B.-J., Rey, F.A., de Groot, R.J., Veesler, D., 2019. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 481–489. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0233-y>
- Tsang, K.W., Ho, P.L., Ooi, G.C., Yee, W.K., Wang, T., Chan-Yeung, M., Lam, W.K., Seto, W.H., Yam, L.Y., Cheung, T.M., Wong, P.C., Lam, B., Ip, M.S., Chan, J., Yuen, K.Y., Lai, K.N., 2003. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* 348, 1977–1985.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa030666>
- Tyrrell, D.A.J., Almeida, J.D., Berry, D.M., McIntosh, K., Mallucci, L., Hofstad, M.S., Hamre, D., Cunningham, C.H., 1968. Virology: Coronaviruses. *Nature* 220, 650.
<https://doi.org/10.1038/220650b0>
- Tyrrell, D.A.J., Almeida, J.D., Cunningham, C.H., Dowdle, W.R., Hofstad, M.S., McIntosh, K., Tajima, M., Zakstelskaya, L.Ya., Easterday, B.C., Kapikian, A., Bingham, R.W., 1975. Coronaviridae. *Intervirology* 5, 76–82.
<https://doi.org/10.1159/000149883>
- Ulbricht, A., Eppler, F.J., Tapia, V.E., van der Ven, P.F.M., Hampe, N., Hersch, N., Vakeel, P., Stadel, D., Haas, A., Saftig, P., Behrends, C., Fürst, D.O., Volkmer, R., Hoffmann, B., Kolanus, W., Höhfeld, J., 2013. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr. Biol.* CB 23, 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.064>
- Vazquez-Armendariz, A.I., Barroso, M.M., El Agha, E., Herold, S., 2022. 3D In Vitro Models: Novel Insights into Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathophysiology and Drug Screening. *Cells* 11, 1526. <https://doi.org/10.3390/cells11091526>
- Vennema, H., Godeke, G.J., Rossen, J.W., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.J., Rottier, P.J., 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like

- particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* 15, 2020–2028. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00553.x>
- Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C., Carrasco, L., 2001. HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12966–12971. <https://doi.org/10.1073/pnas.231343498>
- Versteeg, G.A., van de Nes, P.S., Bredenbeek, P.J., Spaan, W.J.M., 2007. The Coronavirus Spike Protein Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Upregulation of Intracellular Chemokine mRNA Concentrations. *J. Virol.* 81, 10981–10990. <https://doi.org/10.1128/JVI.01033-07>
- Voll, R., Lamprecht, P., Warnatz, K., Schulze-Koops, H., Peter, H., Pichler, W., 2020. Physiologische Grundlagen der Immunfunktion, in: Blum, H., Müller-Wieland, D. (Eds.), *Klinische Pathophysiologie*. Thieme, Stuttgart.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., Chen, Z.J., 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346–351. <https://doi.org/10.1038/35085597>
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., Peng, Z., 2020. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 323, 1061–1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- Wang, G., Deering, C., Macke, M., Shao, J., Burns, R., Blau, D.M., Holmes, K.V., Davidson, B.L., Perlman, S., McCray, P.B., 2000. Human Coronavirus 229E Infects Polarized Airway Epithelia from the Apical Surface. *J. Virol.* 74, 9234–9239.
- Wang, H., Yang, P., Liu, K., Guo, F., Zhang, Y., Zhang, G., Jiang, C., 2008. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res.* 18, 290–301. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.15>
- Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., Lee, A.S., 2009. Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2307–2316. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2485>
- Wang, N., Shi, X., Jiang, L., Zhang, S., Wang, D., Tong, P., Guo, D., Fu, L., Cui, Y., Liu, X., Arledge, K.C., Chen, Y.-H., Zhang, L., Wang, X., 2013. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res.* 23, 986–993. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.92>
- Weber, A., Wasiliew, P., Kracht, M., 2010. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci. Signal.* 3, cm1–cm1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1>
- Wei, L., Sun, S., Xu, C., Zhang, J., Xu, Y., Zhu, H., Peh, S., Korteweg, C., McNutt, M.A., Gu, J., 2007. Pathology of the thyroid in severe acute respiratory syndrome. *Hum. Pathol.* 38, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.06.011>
- Weil, T., Lawrenz, J., Seidel, A., Münch, J., Müller, J.A., 2022. Immunodetection assays for the quantification of seasonal common cold coronaviruses OC43, NL63, or 229E infection confirm nirmatrelvir as broad coronavirus inhibitor. *Antiviral Res.* 203, 105343. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105343>
- Werner, S.L., Kearns, J.D., Zadorozhnaya, V., Lynch, C., O’Dea, E., Boldin, M.P., Ma, A., Baltimore, D., Hoffmann, A., 2008. Encoding NF- κ B temporal control in response to TNF: distinct roles for the negative regulators I κ B α and A20. *Genes Dev.* 22, 2093–2101. <https://doi.org/10.1101/gad.1680708>

- Wesche, H., Korherr, C., Kracht, M., Falk, W., Resch, K., Martin, M.U., 1997. The Interleukin-1 Receptor Accessory Protein (IL-1RAcP) Is Essential for IL-1-induced Activation of Interleukin-1 Receptor-associated Kinase (IRAK) and Stress-activated Protein Kinases (SAP Kinases)*. *J. Biol. Chem.* 272, 7727–7731. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7727>
- Wilson, L., Gage, P., Ewart, G., 2006. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology* 353, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.05.028>
- Wilson, L., Mckinlay, C., Gage, P., Ewart, G., 2004. SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology* 330, 322–331. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.033>
- Wong, C.K., Lam, C.W.K., Wu, A.K.L., Ip, W.K., Lee, N.L.S., Chan, I.H.S., Lit, L.C.W., Hui, D.S.C., Chan, M.H.M., Chung, S.S.C., Sung, J.J.Y., 2004. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 136, 95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Huang, Y., Yuen, K.-Y., 2009. Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. *Exp. Biol. Med.* 234, 1117–1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
- Worby, C.A., Mattoo, S., Kruger, R.P., Corbeil, L.B., Koller, A., Mendez, J.C., Zekarias, B., Lazar, C., Dixon, J.E., 2009. The fic domain: regulation of cell signaling by adenylylation. *Mol. Cell* 34, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.03.008>
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355–1364. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00133-7)
- Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellicchio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T., Holmes, K.V., 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357, 420–422. <https://doi.org/10.1038/357420a0>
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 33741–33749. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33741>
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881–891. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00611-0)
- Zandi, E., Karin, M., 1999. Bridging the Gap: Composition, Regulation, and Physiological Function of the I κ B Kinase Complex. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4547–4551.
- Zeng, C., Evans, J.P., King, T., Zheng, Y.-M., Oltz, E.M., Whelan, S.P.J., Saif, L.J., Peeples, M.E., Liu, S.-L., 2022. SARS-CoV-2 spreads through cell-to-cell transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119, e2111400119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111400119>
- Zhang, Q., Ding, Y., He, L., Wang, W., Zhang, J., Wang, H., Cai, J., Geng, J., Lu, Y., Luo, Y., 2003. [Detection of cell apoptosis in the pathological tissues of patients with SARS and its significance]. *1 Jun Yi Xue Xue Bao Acad. J. First Med. Coll. PLA* 23, 770–773.

- Zhang, W., Borchering, N., Kolb, R., 2020. IL-1 Signaling in Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1240, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2_1
- Zheng, Z.-Q., Wang, S.-Y., Xu, Z.-S., Fu, Y.-Z., Wang, Y.-Y., 2021. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein impairs stress granule formation to promote viral replication. *Cell Discov.* 7, 38. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00275-0>
- Zhou, J., Chu, H., Li, C., Wong, B.H.-Y., Cheng, Z.-S., Poon, V.K.-M., Sun, T., Lau, C.C.-Y., Wong, K.K.-Y., Chan, J.Y.-W., Chan, J.F.-W., To, K.K.-W., Chan, K.-H., Zheng, B.-J., Yuen, K.-Y., 2014. Active Replication of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus and Aberrant Induction of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Human Macrophages: Implications for Pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 209, 1331–1342. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit504>
- 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, G.F., Tan, W., 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* 81, 853–879. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-4-853>
- Zimniak, M., Kirschner, L., Hilpert, H., Geiger, N., Danov, O., Oberwinkler, H., Steinke, M., Sewald, K., Seibel, J., Bodem, J., 2021. The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2 in human lung tissue. *Sci. Rep.* 11, 5890. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85049-0>
- Zumla, A., Hui, D.S., Perlman, S., 2015. Middle East respiratory syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 386, 995–1007. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60454-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60454-8)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Taxonomie der Coronaviren.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Coronavirus.	4
Abb. 3: Schematische Darstellung des SARS-CoV Replikationszyklus.	5
Abb. 4: NF- κ B Aktivierung durch Interleukin-1.	14
Abb. 5: Schematische Darstellung der Unfolded Protein Response des Endoplasmatischen Retikulums.	17
Abb. 6: Plaque Assay Aufbau.	35
Abb. 7: Festlegen der Region of Interest.....	43
Abb. 8: Detektion der mRNA Signale in den ROI.....	45
Abb. 9: Messen der N Protein-Fluoreszenz.	47
Abb. 10: Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Inhibitors GSK2606414 in Kombination mit PHA-408 auf die mRNA Expression von Genen des NF- κ B Signalweges (A), des ER-Stress Signalweges (B) und der viralen Proteine (C) in HuH7 Zellen nach Infektion mit HCoV-229E.	51
Abb. 11: Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Inhibitors PHA-408 in Kombination mit 5 μ M GSK2606414 auf die mRNA Expression von Genen des NF- κ B Signalweges (A), des ER-Stress Signalweges (B) und der viralen Proteine (C) in HuH7 Zellen nach Infektion mit HCoV-229E.	55
Abb. 12: Auswirkung der Inhibitorbehandlungen auf die Virustiter.	57
Abb. 13: Infektionskinetik von HCoV-229E in A549 Zellen mittels Indirekter Immunfluoreszenz.	59
Abb. 14: Infektionskinetik von HCoV-229E in A549 Zellen unter regelmäßigem Mediumwechsel mittels Indirekter Immunfluoreszenz.	61
Abb. 15: Infektionskinetik mit unterschiedlichen MOI in A549 Zellen mittels Indirekter Immunfluoreszenz.	62
Abb. 16: Immuno-RNA-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung in A549 Zellen nach 96-stündiger Infektion mit HCoV-229E.	67
Abb. 17: Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Inhibitors GSK2606414 in Kombination mit PHA-408 auf die mRNA Expression ausgewählter Gene des NF- κ B Signalweges (A), ER-Stress Signalweges (B) und der viralen Proteine (C) in A549 Zellen nach Infektion mit HCoV-229E.	72
Abb. 18: Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Inhibitors PHA-408 in Kombination mit 5 μ M GSK2606414 auf die mRNA Expression ausgewählter Gene des NF- κ B Signalweges (A), des ER-Stress Signalweges (B) und der viralen RNA (C) in A549 Zellen nach Infektion mit HCoV-229E.	76
Abb. 19: Kultivierung der humanen Alveolaren Epithelzellen (HAEC) und Untersuchung der Infektionseffizienz nach 48 und 72 h mit HCoV-229E in μ -Slides... 78	
Abb. 20: Immuno-RNA-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung in humanen Alveolaren Epithelzellen nach Infektion mit HCoV-229E für 72 h in Glas- μ -Slides.	80
Abb. 21: Immuno-RNA-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung in humanen Alveolaren Epithelzellen nach Infektion mit HCoV-229E für 96 h in Kollagen IV-beschichteten μ -Slides.	82
Abb. 22: Auswirkung der HCoV-229E Infektion auf die mRNA Expression ausgewählter Gene des NF- κ B Signalweges (A), des ER-Stress Signalweges (B) und der viralen Proteine (C) in humanen Alveolaren Epithelzellen.	85
Abb. 23: Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Wirkung von HCoV-229E auf die Genexpression der Wirtszelle und die Effekte von PERK bzw. IKK β Inhibitoren in den Zelllinien HuH7 (I), A549 (II) und HAEC (III).	100

Abb.Anh. 1: Bilder vom Plaque Assay mit asservierten Überständen der GSK2606414-Konzentrationsreihe in HuH7 Zellen.	102
Abb.Anh. 2: Übersichtsaufnahmen der Immuno-RNA-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung in A549 Zellen nach 96-stündiger Infektion mit HCoV-229E.	106
Abb.Anh. 3: Ct-Werte der viralen RNA aus real time RT-qPCR Versuchen in für 96 h mit HCoV-229E infizierten HAEC.	107

Abkürzungsverzeichnis

%Prozent	IBVavian infectious bronchitis virus
°C Grad Celsius	ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses
ACE2angiotensin-converting enzyme II	IFIndirekte Immunfluoreszenz
AGArbeitsgruppe	IgG Immunglobulin G
ALIacute lunge injury	IKKI κ B kinase complex
AP-1activator protein 1	IL-1 Interleukin-1
ARDSacute respiratory distress syndrom	IL-1R Interleukin-1 Rezeptor
ATF6activating transcription factor-6	IL-1RacPIL-1 receptor accessory protein
ATPAdenosintriphosphat	IRAK4 interleukin-1 receptor-activated protein kinase 4
BiP heavy-chain binding protein	IRE-1 inostol-requiring protein-1
CDcluster of differentiation	IRFinterferon-regulatory factor
cDNAcomplementary deoxyribonucleic acid	ISRIB integrated stress response inhibitor
CM convoluted membranes	I κ Binhibitor of nuclear factor kappa B
cm ² Quadratzentimeter	JNKc-Jun N-terminal kinase
CO ₂Kohlenstoffdioxid	kbkilobasen
CoVCoronavirus	kDAKilodalton
COVID-19 Coronavirus Disease 2019	LLiter
CRE cAMP response element	M Protein membrane Protein
Ct-WertCycle threshold	MAPKsmitogen-activated protein kinases
DAMPs danger-associated molecular patterns	MEMModified Eagle Medium
ddH ₂ Odoppelt destilliertes Wasser	MERS-CoV Middle East respiratory syndrome-related-CoV
DMEMDulbecco's Modified Eagle Medium	MHVmurine hepatitis virus
DMSO Dimethylsulfoxid	minMinuten
DMVdouble-membrane vesicles	mLMilliliter
DNAdeoxyriboucleic acid	mM Millimolar
dNTP deoxynucleotide triphosphate	MOImultiplicity of infection
DPBS Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	mRNAmessenger RNA
dsRNA doppelsträngige RNA	MYD88 myeloid differentiation primary response gene 88
E Proteinenvelope Protein	n Größe der Stichprobe
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	n.d.nicht detektiert
eIF-2 eukaryotic translation initiation factor 2	N ProteinNukleokapsid Protein
EREndoplasmatisches Retikulum	NF- κ B nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
ERAD ER-associated degradation	nm Nanometer
ERGIC endoplasmic reticulum to golgi intermediate compartment	nsp non-structural protein
ERKextracellular signal-regulated protein kinase	ORF open reading frame
FACS fluorescence activated cell sorting	p.i.post infection
FBS Filtrated Bovine Serum	PAMPs pathogen-associated molecular patterns
FRET Förster resonance energy transfer	PCLS precision cut lung slices
gErdbeschleunigung	PCRpolymerase chain reaction
GCN2general control nonderepressible 2	PERKprotein kinase RNA (PKR)-like ER kinase
gRNAgenomische RNA	pfuplaque forming units
GRP78 78-kDa glucose-regulated protein	Pi Phosphatgruppe
h Stunde	PKR double-stranded RNA-dependent Protein Kinase
HAEChumane alveolare Epithelzellen	qPCR quantitative polymerase chain reaction
HBSSHank's Balanced Salt Solution	RNA ribonucleic acid
HCoV-229E Humanes Coronavirus 229E	ROI Region of Interest
HE Hämagglutininesterase		
HSP heat shock protein		
HSV-1 Herpes simplex Virus 1		

RT..... *Reverse Transkription*
 RTC.....*replicase transcription complex*
 S Protein*spike Protein*
 SAPK..... *stress-activated protein kinase*
 SARS-CoV *severe acute respiratory
 syndrome-related-CoV*
 sgRNA.....*subgenomische RNA*
 TAB*TAK1 binding proteins*
 TAK1*TGF- β -activated kinase 1*
 TLR..... *Toll-Like-Rezeptor*
 TNF α *Tumornekrosefaktor α*
 TRAF6*tumor necrosis factor-associated
 factor 6*

U *Unit*
 UPR.....*Unfolded Protein Response*
 v/v *Volumen pro Volumen*
 w/v *Gewicht pro Volumen*
 WHO*World Health Organization*
 XBP-1 *X-box binding protein 1*
 z.Bsp *zum Beispiel*
 α *alpha*
 β *beta*
 γ *gamma*
 Δ *delta*
 μg *Mikrogramm*
 μM *Mikromolar*

Portfolio

Wissenschaftliche Poster:

- 88. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (2022):
“Investigation of the impact of chemical inhibitors on different epithelial cells infected with the human coronavirus 229E”
(Michael Kracht, Christin Mayr-Buro, Anna Sophie Geradts)

- Internationales Symposium der KFO309 und SFB1021 Projekte in Marburg (19-21. September 2018):
„Virus-host interactions that drive and control epithelial injury in coronavirus infections”
(Christin Mayr-Buro, Anna Sophie Geradts, Anke Gökcen, Knut Beuerlein, Christin Müller, Nadja Karl, John Ziebuhr, Michael Kracht)

Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich bei der ganzen Arbeitsgruppe des Rudolf-Buchheim-Instituts bedanken für die herzliche Aufnahme und Unterstützung von jeder(m) Einzelnen bei meiner Dissertation. Angefangen mit Hendrik Weiser, der mich mit einer tollen Einarbeitung im Labor willkommen geheißen hat und mir auch danach noch mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem möchte ich auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Susanne Herold für die unkomplizierte Zusammenarbeit danken.

Selbstverständlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Kracht für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit im Institut für Pharmakologie machen zu können. Ich habe in meiner Zeit bei Ihnen sehr viel Neues lernen können und einen Einblick in einen Bereich bekommen, der mir ein neues Verständnis für Forschung und darauf basierte Medizin lehrte.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei Dr. Christin Mayr-Buro bedanken für die schier endlose Geduld und eine Betreuung, wie ich Sie mir nicht besser hätte vorstellen können.