

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Der struktureller Aufbau des SARS-CoV-2	2
1.2 Der SARS-CoV-2 Viruseintritt	3
1.3 Der Replikationszyklus des Virus	6
1.4 Die COVID-19 Erkrankung	8
1.5 Entwicklung neuer Medikamente gegen SARS-CoV-2	8
1.6 Angriffspunkte und Beispiel für etablierte antivirale Therapien	11
1.7 Zielsetzung	14
2 Materialien	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Zelllinien	15
2.3 Dreidimensionale Zellsysteme	16
2.4 Viren	17
2.5 Synthesen	17
2.6 Seren	17
2.7 Lösungen, Puffer und Medien	18
2.8 Kits	18
2.9 Primer für RT-qPCR	19
2.10 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	19
2.11 Kits zur Färbung zellulärer Bestandteile	20
2.12 RNA-FISH-Hybridisierung	21
2.13 siRNA	21
2.14 Software	21

3 Methoden	23
3.1 Kultivierung der Zelllinien	23
3.2 Anzucht der Virenstämme	24
3.2.1 Kultivierung von SARS-CoV-2	24
3.2.2 Anzucht einer Influenza A-Kultur	24
3.2.3 Anzucht einer HIV-1-Kokultur	25
3.2.4 Anzucht einer Gelbfieber-Kultur	25
3.2.5 Anzucht einer mCMV-Kultur	25
3.3 Bestimmung der Zytotoxizität	26
3.3.1 Bestimmung der Zytotoxizität über die Zellwachstumsrate	26
3.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität mit einem Zellviabilitätstest	26
3.4 Infektion unterschiedlicher Zellsysteme mit SARS-CoV-2	27
3.4.1 Infektion von Zelllinien mit SARS-CoV-2	27
3.4.2 Infektion der PCLS mit SARS-CoV-2	27
3.4.3 Infektion der hiPSC-BCEC Organoide mit SARS-CoV-2	28
3.5 Infektion und Fixierung der infizierten Zellen für Immunfluoreszenz und RNA-FISH-Färbungen	30
3.6 Infektion und Fixierung der Zellen für Elektronenmikroskopie	30
3.7 Serum-Neutralisationstest bei SARS-CoV-2-Infektion	30
3.8 Bestimmung der Infektiosität von Viren	31
3.9 Bestimmung der ACE2-Expression auf der Cytoplasmamembran	32
3.10 Bestimmung der Infizierbarkeit von Zellen	32
3.11 Transfektion mit siRNA	33
3.12 Aufreinigung der viralen RNA aus Zellkulturüberstand	33
3.13 Isolation der zellulären RNA	34
3.14 Biochemische Isolation der Lysosomen	34
3.15 Bestimmung der viralen Genomkopien mit RT-qPCR	35
3.16 Fluoreszenzmarkierung der viralen Membran	36
3.17 Membranfärbung von Zellen	37
3.18 Lokalisation der Substanz durch Click-Chemie mit Fluorophor	37
3.19 Bestimmung des lysosomalen pH-Wertes	37

Inhaltsverzeichnis	xv
4 Ergebnisse	39
4.1 Infektionsmodell zum Verständnis der SARS-CoV-2 Pathogenese	39
4.1.1 Die Blut-Hirn-Schranke dient als Eintrittsweg für SARS-CoV-2 in cerebrale Strukturen	40
4.2 Analyse des Viruseintritts	43
4.2.1 Die ACE2-Expression bestimmt die Eintrittseffizienz von SARS-CoV-2	43
4.2.2 Etablierung von RNAs gegen ACE2 und virale Transkripte zur antiviralen Therapie	47
4.2.3 Analyse des Viruseintritts mit direkt fluoreszenz-markierten Viren	49
4.2.3.1 Herstellung von fluoreszenz-markierten Viren	51
4.2.3.2 Die Infektiosität der fluoreszenz-markierten Viren ist nicht reduziert	52
4.2.3.3 Mikroskopische Visualisierung der fluoreszenz-markierten Viren	56
4.2.3.4 Visualisierung einer mCMV-Infektion in einer Lebendzelle	59
4.3 Immunisierung durch Impfungen und Infektionen ist nicht ausreichend	62
4.3.1 Die Antikörper gegen SARS-CoV-2 nach Impfung und Infektion genügen nicht	63
4.4 Indirekt wirkende Substanzen gegen SARS-CoV-2	65
4.4.1 Die saure Ceramidase ist ein SARS-CoV-2 Wirtsfaktor	66
4.4.1.1 Synthese eines Fluoxetin-Derivates ohne ASM-Aktivität	66
4.4.1.2 Das Fluoxetin-Derivat AKS-466 inhibiert die Replikation in Zellkultur	67
4.4.1.3 AKS-466 inhibiert die SARS-CoV-2 RNA-Synthese	70
4.4.1.4 AKS-466 reduziert die SARS-CoV-2 RNAs in der Zelle	71
4.4.1.5 AKS-466 reichert SARS-CoV-2 im lysosomalen Replikationskompartiment an	72

4.4.1.5.1	Ko-Lokalisierung von AKS-466 mit Lysosomen	73
4.4.1.5.2	Aufreinigung der Lysosomen mit Quantifizierung der viralen RNA	75
4.4.1.6	AKS-466 behandelte Zellen zeigen Doppelmembranstrukturen	77
4.4.1.7	AKS-466 und Fluoxetin blockieren die Deazidifizierung der Lysosomen	78
4.4.1.8	Inhibition der sauren Ceramidase supprimiert die SARS-CoV-2 Replikation	80
4.4.1.9	C6-Ceramide und AC-Inhibitoren wirken antiviral gegen SARS-CoV-2	80
4.4.1.10	Erhöhte Ceramid-Mengen inhibieren den SARS-CoV-2-Austritt	83
4.4.2	Aspirin inhibiert die SARS-CoV-2-Replikation <i>in vitro</i> und in human-nahem Replikationssystem	86
4.4.2.1	ASA und SA inhibieren die virale Replikation in unterschiedlichen Zelllinien	86
4.4.2.2	ASA und SA zeigen antivirale Wirkung in humanen PCLS	89
4.4.2.3	ASA und SA interagieren nicht mit dem Viruseintritt	90
4.4.2.4	ASA und SA hemmen die Virusreplikation vor oder während der Genexpression	92
4.5	Entwicklung direkt wirkender Substanzen gegen SARS-CoV-2	94
4.5.1	Inhibition der SARS-CoV-2-Protease M ^{Pro} durch Protease-inhibitoren ist zelltyp-spezifisch	94
4.5.1.1	Bestimmung der Zytotoxizität der potentiellen M ^{Pro} -Inhibitoren	97
4.5.1.2	Indol-Pyridinyl-Ester und peptid-ähnliche Strukturen wirken antiviral	98
4.5.1.3	Zwei der Proteaseinhibitoren zeigen auch eine antivirale Wirkung in hPCLS	102

4.5.2 Naphthylisochinoline zeigen antivirale Wirkung gegen SARS-CoV-2	103
4.5.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität der Substanzen Korupensamin A und B	104
4.5.2.2 Korupensamin A inhibiert die SARS-CoV-2-Replikation und wirkt als M ^{Pro} -Inhibitor	104
5 Diskussion	107
5.1 Mechanismus der SARS-CoV-2 Infektionen des Zentralen Nervensystems	108
5.2 Die ACE2-Expression bestimmt die Infizierbarkeit der Zellen	109
5.3 Ceramide regulieren die SARS-CoV-2 Replikation	110
5.4 Acetylsalicylsäure und Salicylsäure beeinflussen die NF-κB-Aktivierung	113
Eigene Publikationsliste	115
Literaturverzeichnis	117