

BestMasters

RESEARCH

Nina Geiger

Charakterisierung des Wirkmechanismus von Selektiven Serotonin- Wiederaufnahme- Inhibitoren (SSRI) bei Infektion mit SARS-CoV-2

MOREMEDIA



Springer Spektrum

BestMasters

Mit „**BestMasters**“ zeichnet Springer die besten Masterarbeiten aus, die an renommierten Hochschulen in Deutschland, Österreich und der Schweiz entstanden sind. Die mit Höchstnote ausgezeichneten Arbeiten wurden durch Gutachter zur Veröffentlichung empfohlen und behandeln aktuelle Themen aus unterschiedlichen Fachgebieten der Naturwissenschaften, Psychologie, Technik und Wirtschaftswissenschaften. Die Reihe wendet sich an Praktiker und Wissenschaftler gleichermaßen und soll insbesondere auch Nachwuchswissenschaftlern Orientierung geben.

Springer awards “**BestMasters**” to the best master’s theses which have been completed at renowned Universities in Germany, Austria, and Switzerland. The studies received highest marks and were recommended for publication by supervisors. They address current issues from various fields of research in natural sciences, psychology, technology, and economics. The series addresses practitioners as well as scientists and, in particular, offers guidance for early stage researchers.

Nina Geiger

Charakterisierung des Wirkmechanismus von Selektiven Serotonin- Wiederaufnahme- Inhibitoren (SSRI) bei Infektion mit SARS-CoV-2



Springer Spektrum

Nina Geiger
Würzburg, Deutschland

Beim vorliegenden Text handelt es sich um einen Abdruck einer an der Julius-Maximilians-Universität im Jahr 2022 eingereichten Master-Thesis mit dem Titel „Charakterisierung des Wirkmechanismus von Selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI) bei Infektion mit SARS-CoV-2“. Die Master-Thesis wurde an der Fakultät für Chemie und Pharmazie (Studiengang: Biochemie) eingereicht und am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg erstellt.

ISSN 2625-3577

ISSN 2625-3615 (electronic)

BestMasters

ISBN 978-3-658-43070-2

ISBN 978-3-658-43071-9 (eBook)

<https://doi.org/10.1007/978-3-658-43071-9>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© Der/die Herausgeber bzw. der/die Autor(en), exklusiv lizenziert an Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, ein Teil von Springer Nature 2023

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geographische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Planung/Lektorat: Marija Kojic

Springer Spektrum ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH und ist ein Teil von Springer Nature.

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Abraham-Lincoln-Str. 46, 65189 Wiesbaden, Germany

Das Papier dieses Produkts ist recyclebar.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit stellt zugleich die überarbeitete Version der 2022 an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Deutschland) angenommenen Mastertesis mit dem Titel „Charakterisierung des Wirkmechanismus von Selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI) bei Infektion mit SARS-CoV-2“ im Fach Biochemie dar. Die Arbeit wurde in der von Prof. Dr. Jochen Bodem vom Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg geleiteten Arbeitsgruppe im Zeitraum von Juni bis Dezember 2022 angefertigt.

Wie jedes wissenschaftliche Projekt verdankt auch die vorliegende Arbeit ihre Form einer Vielzahl an Anregungen und Gesprächen mit der Scientific Community. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Masterarbeit auf unterschiedlichste Weise unterstützt und so zu ihrem Gelingen beigetragen haben. Meinen größten Dank verdient Prof. Dr. Jochen Bodem. Er hat mich während meiner Forschungsarbeiten in den letzten 2 ½ Jahren in seinem Labor nicht nur hervorragend betreut, sondern auch meine Leidenschaft an der wissenschaftlichen Forschung geweckt. All meine Ideen und Vorschläge fanden stets ein offenes Ohr. Das außerordentlich hohe Vertrauen, das Du mir bereits als Bachelorstudentin entgegengebracht hast, verdienen den allerhöchsten Respekt und sind keineswegs selbstverständlich. Ein besonderer Dank gilt zudem Prof. Dr. Markus Sauer (Zweitgutachter der Masterthesis) mit dessen Arbeitsgruppe ich an verschiedenen Projekten zusammenarbeiten durfte. Danken möchte ich hier explizit Linda Stelz, Dr. Jan Schlegel (beide Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sauer) und Louise Kersting (Prof. Dr. Jürgen Seibel). Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Seibel und Prof. Dr. Christian Stigloher für das angenehme Arbeiten am AKS-466-Projekt bedanken. Ich bedanke mich bei Novartis Germany GmbH und Bayer Vital GmbH für die finanzielle Unterstützung meiner Forschung.

Dieses Buch wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen auch im Privaten nicht möglich gewesen. Ganz besonderes Danken möchte ich meinem Freund Leon Richter für seine Unterstützung sowie seinen emotionalen Rückhalt, seine Geduld und seine Liebe. Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Wendelin und Sabine Geiger und meiner Schwester Maren Geiger bedanken. Ohne eure Unterstützung, euren Zuspruch und eure Liebe wäre diese Arbeit und mein Studium nicht möglich gewesen.

Würzburg
August 2023

Nina Geiger

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist in drei Teile untergliedert, die sich mit der Charakterisierung der sauren Ceramidase als neuem Wirtsfaktor, dem Eintritt von SARS-CoV-2 in das Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke, sowie mit der Rolle von ACE2 beim Viruseintritt und der antiviralen Therapie befassen. Darüber hinaus werden Daten zur direkten Membranmarkierung von SARS-CoV-2, Gelbfiebervirus, Influenza A-Virus, HIV-1 und murinem CMV dargestellt.

Die neu auftretenden Delta- oder Omikron-Varianten von SARS-CoV-2 beschleunigen durch ihre höheren Übertragungsraten immer noch die globale COVID-19-Pandemie. Daher werden dringend neue therapeutische Strategien benötigt. Durch Fluoxetin wird wie bereits berichtet wurde, die sauren Sphingomyelinase (ASM) gehemmt, welche den Viruseintritt supprimiert. Hier beschreiben wir die saure Ceramidase als weiteres Wirkungsziel von Fluoxetin. Um diese Effekte zu untersuchen, wurde ein ASM-unabhängiges Fluoxetin-Derivat, AKS-466, synthetisiert. Hochauflösende SARS CoV-2 RNA-FISH und RT-qPCR Analysen zeigten, dass AKS-466 die virale Genexpression um mehr als eine Größenordnung herunterreguliert. Es wurde gezeigt, dass SARS-CoV-2 den lysosomalen pH-Wert durch das virale Protein ORF3a deazidifiziert. Eine Behandlung mit AKS-466 oder Fluoxetin senkt jedoch den lysosomalen pH-Wert. Die durchgeführten biochemischen Analysen deuten darauf hin, dass AKS-466 in den endolysosomalen Replikationskompartimenten infizierter Zellen lokalisiert ist, und eine Anreicherung viraler genomischer RNAs in diesen Kompartimenten erfolgt.

Sowohl Fluoxetin, als auch AKS-466 hemmen die saure Ceramidase-Aktivität, verursachen einen Anstieg der endolysosomalen Ceramide und supprimieren dadurch die virale Replikation. Darüber hinaus reduziert Ceranib-2, ein spezifischer saurer Ceramidase Inhibitor, die Replikation von SARS-CoV-2, und durch

die exogene Zufuhr von C6-Ceramid wird die virale Replikation ebenfalls inhibiert. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die saure Ceramidase ein SARS-CoV-2 Wirtsfaktor ist.

Veröffentlichte Studien deuten darauf hin, dass hohe Konzentrationen von Aspirin (Acetylsalicylsäure – ASA) eine antivirale Wirkung gegen Rhinoviren und Influenzaviren zeigen. Aus diesem Anlass wurde untersucht, ob ASA und sein Metabolit Salicylsäure (SA), von denen bekannt ist, dass sie NF- κ B unterdrücken, SARS-CoV-2 hemmen, weil SARS-CoV-2 möglicherweise ähnliche Signalwege wie Influenzaviren nutzt. Es wurde nachgewiesen, dass beide Verbindungen die Replikation von SARS-CoV-2 in Zellkulturzellen und in einem patienten-nahen, präzisions-geschnittenen Lungenschnitt-Infektionssystem um zwei Größenordnungen unterdrücken. Während die Verbindungen den viralen Eintritt nicht beeinflussten, führten sie nach 24 h zu einer geringeren viralen RNA-Expression, was darauf hindeutet, dass die Verbindungen Replikationsschritte nach dem viralen Eintritt hemmen. Sowohl meine Ergebnisse zu den NF- κ B Inhibitoren als auch zur Hemmung der sauren Ceramidase deuten darauf hin, dass die Akt-Kinase eine wesentliche Rolle bei der Replikation von SARS-CoV-2 spielen könnte.

Um die Pathologie von SARS-CoV-2 zu verstehen, wurde der Eintrittsweg des Virus in das Gehirn analysiert, da in einer Vielzahl von COVID-19-Todesfällen, Infektionen der cerebralen Strukturen nachgewiesen wurden. Wir zeigen, dass SARS-CoV-2 die Blut-Hirn-Schranke durch transzellulären Transport übertritt. Im Gegensatz zu anderen Viren, wie HIV-1, überwindet SARS-CoV-2 die Blut-Hirn-Schranke ohne Beteiligung von T-Zellen oder Makrophagen. Diese direkte Aufnahme könnte zu neuen Behandlungsmöglichkeiten führen.

SARS-CoV-2 gelangt über zwei verschiedene Wege in die Zellen. In Zellen, die große Mengen an TMPRSS2-Protease exprimieren, wird das S-Protein vor dem Eintritt gespalten, was zur Fusion des Virus mit der Plasmamembran führt. Ferner gelangt das Virus durch rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Abhängigkeit der viralen Infektiosität in Korrelation mit der ACE2-Expression auf der zytoplasmatischen Membran ermittelt. Es wurde eine Korrelation zwischen der ACE2-Expression und der Infektiosität von SARS-CoV-2 deutlich, woraus resultiert, dass die ACE2-Konzentration eine kritische Determinante für den Eintritt des Virus ist. Ebenso wurde der Einbau eines lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs in die Virusmembran etabliert. Dadurch ist die direkte Markierung verschiedener Viren trotz ihrer unterschiedlicher Membranzusammensetzung möglich. Mit supraauflösender Mikroskopie (SIM) wurde der virale Eintritt von SARS-CoV-2, Gelbfieber,

Influenza A, HIV-1 und murinem CMV visualisiert und gezeigt, dass diese Färbung für verschiedene umhüllte Viren einsetzbar ist. Darüber hinaus wurden mit „Lattice Lightsheet“ Mikroskopie die ersten 3D-Daten über den Eintritt von murinem CMV aufgenommen. Diese Technologie könnte eine Analyse des viralen Eintrittsprozesses, einschließlich der Rezeptorbindung, ermöglichen, wodurch die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente beschleunigt und die Aufnahmekinetik beschrieben werden kann.

Abstract

This thesis is structured into three parts, which address the characterization of the acid ceramidase as a new host factor and the entry of SARS-CoV-2 into the brain by crossing the blood-brain barrier. Also, I investigate the role of ACE2 during viral entry and antiviral therapy. Furthermore, I present data on the direct membrane labelling of SARS-CoV-2, yellow fever virus, influenza A virus, HIV-1 and murine CMV.

With higher transmission rates, emerging delta or omicron SARS-CoV-2 variants still accelerate the global coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Therefore, novel therapeutic strategies are needed. The inhibition of acid sphingomyelinase, which interferes with viral entry, by fluoxetine has been reported previously. Here, we describe the acid ceramidase as an additional target of fluoxetine. To investigate these effects, we synthesized an ASM-independent fluoxetine derivative, AKS-466. High-resolution SARS-CoV-2 RNA-FISH and RT-qPCR analyses demonstrated that AKS-466 downregulates viral gene expression by more than one order of magnitude. It has been shown that SARS-CoV-2 deacidifies the lysosomal pH using the ORF3a protein. However, treatment with AKS-466 or fluoxetine reduces the lysosomal pH. My biochemical analyses indicate that AKS-466 localizes to the endolysosomal replication compartments of infected cells and demonstrates the enrichment of viral genomic RNAs in these compartments.

Both fluoxetine and AKS-466 inhibit the acid ceramidase activity, cause endolysosomal ceramide elevation, and interfere with viral replication. Furthermore, Ceranib-2, a specific acid ceramidase inhibitor, reduces SARS-CoV-2 replication and, most importantly, the exogenous supplementation of C6-ceramide interferes with viral replication. These results support the hypothesis that the acid ceramidase is a SARS-CoV-2 host factor.

Recent reports indicated that high concentrations of aspirin (acetylsalicylic acid – ASA) show antiviral activity against rhinoviruses and influenza viruses. We sought to investigate whether ASA and its metabolite salicylic acid (SA), which are known to suppress NF- κ B, inhibit SARS-CoV-2 because it might use pathways similar to those of influenza viruses. I show that both compounds suppressed SARS-CoV-2 replication in cell culture cells and a patient-near human precision-cut lung slices infection system by two orders of magnitude. While the compounds did not interfere with the entry of the virus, it led to lower viral RNA expression after 24 h, indicating that the compounds inhibited post-entry pathways. Both my results on NF- κ B inhibitors and on the inhibition of acid ceramidase indicate that the Akt-kinase might play an essential role in SARS-CoV-2 replication.

To understand the SARS-CoV-2 pathology, the viral entry pathway into the brain was analyzed, because in a high number of fatal cases, infections of the brain were found. We show that SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier via transcellular transport. In contrast to other viruses, such as HIV-1, SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier without the involvement of T cells or macrophages. This direct uptake might lead to new treatment opportunities. SARS-CoV-2 enters the cells via two distinct pathways. In cells expressing high amounts of TMPRSS2 protease, the S protein is activated before entry resulting in viral entry into the plasma membrane. Otherwise, the virus enters the cells by receptor-mediated endocytosis. Here, I analyze the dependence of viral infectivity on the amount of ACE2 expression on the cytoplasmic membrane. I show a correlation between ACE2 expression and infectibility by SARS-CoV-2, indicating that the ACE2 concentration is a critical determinant of viral entry. I show the incorporation of a lipophilic fluorescence dye useful for the direct labelling of different viruses despite their composition of the membranes. Using structured illumination microscopy (SIM), we visualized viral entry of SARS-CoV-2, yellow fever, influenza A, HIV-1, and murine CMV, showing that this staining can be used for distinct enveloped viruses. Furthermore, the first 3D data on the entry of murine CMV were obtained using Lattice Lightsheet microscopy. This technology might allow an analysis of the viral entry process, including receptor binding, developing new antivirals and uptake kinetics.

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