

Aus dem Lehrstuhl
für Medizinische Zellbiologie
Prof. Dr. Richard Warth
der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Interaktionen von CLN7/MFSD8 mit SARS-CoV-2 und dem Lipid Raft-Marker GM1

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katja Maurer

2025

Aus dem Lehrstuhl
für Medizinische Zellbiologie
Prof. Dr. Richard Warth
der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Interaktionen von CLN7/MFSD8 mit SARS-CoV-2 und dem Lipid Raft-Marker GM1

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katja Maurer

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Markus Reichold
2. Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. Barbara Schmidt
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2025

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Neuronale Ceroidlipofuszinosen, die CLN7-Erkrankung und CLN7/MFSD8	7
1.1.1 Definition und Nomenklatur	7
1.1.2 Epidemiologie	7
1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie	8
1.1.3.1 Das CLN7/MFSD8-Gen und -Protein	10
1.1.4 Pathologie	12
1.1.5 Symptomatik und Klassifikation.....	12
1.1.6 Diagnostik, Therapie und Prognose.....	16
1.2 Lysosomen und lysosomale Speichererkrankungen	17
1.3 Lipid Rafts und GM1	19
1.4 COVID-19 und SARS-CoV-2	21
1.4.1 COVID-19	21
1.4.2 SARS-CoV-2	22
1.4.2.1 Aufbau.....	22
1.4.2.2 Replikationszyklus.....	23
1.5 Vorarbeiten und Zielsetzung.....	27
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte	29
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen.....	30
2.1.4 Kits.....	32
2.1.5 Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen.....	32
2.1.6 Zelllinien und Virusstamm	34
2.1.6.1 Zelllinien	34
2.1.6.2 Virusstamm	35
2.1.7 Plasmide.....	35
2.1.8 Oligonukleotide.....	35

2.1.8.1 siRNA.....	35
2.1.8.2 Primer.....	36
2.1.9 Software.....	37
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	38
2.2.1.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen	38
2.2.1.2 Kultivierung von Vero-Zellen	39
2.2.1.3 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit verschiedenen Plasmiden	40
2.2.1.4 Färbung von GM1 in HEK293T-Zellen	42
2.2.1.5 Downregulation von CLN7 durch siRNA in Vero-Zellen	43
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	45
2.2.2.1 Quantitative reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion	45
2.2.2.1.1 Isolierung der Gesamt-RNA	46
2.2.2.1.2 Reverse Transkription	47
2.2.2.1.3 Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	48
2.2.2.1.4 Auswertung mittels relativer Quantifizierung	49
2.2.2.1.5 Schmelzkurvenanalyse.....	50
2.2.2.1.6 Qualitätsbeurteilung der RNA/DNA durch Agarosegelelektrophorese.....	50
2.2.3 Virologische Methoden	52
2.2.3.1 Herstellung und Quantifizierung der SARS-CoV-2 Virusstocks.....	52
2.2.3.2 Infektion von HEK293T-Zellen mit SARS-CoV-2.....	53
2.2.3.3 Infektion von Vero-Zellen mit SARS-CoV-2.....	55
2.2.3.4 Bestimmung der Viruslast	55
2.2.3.5 Bestimmung der Zellviabilität	56
2.2.4 Elektronenmikroskopie	57
2.2.5 Durchflusszytometrie	58
2.2.6 Statistik.....	60
3 Ergebnisse	61
3.1 Infektion verschiedener CLN7-defizienter Zelllinien mit SARS-CoV-2 ..	61
3.1.1 Analyse der Infektion von HEK293T Wildtyp- und CLN7-Knockout- Zellen mit SARS-CoV-2.....	61

3.1.1.1	Viruslast im Zellkulturüberstand	61
3.1.1.2	Viruslast im Zellkulturüberstand unter Behandlung mit Remdesivir ..	62
3.1.1.3	Zellviabilität	64
3.1.1.4	Intrazelluläre Viruslast.....	67
3.1.2	<i>Elektronenmikroskopische Untersuchung.....</i>	68
3.1.3	<i>Analyse der Infektion von Vero Wildtyp- und CLN7-Knockdown-Zellen mit SARS-CoV-2.....</i>	71
3.1.3.1	Quantifizierung des CLN7-Knockdowns durch siRNA.....	71
3.1.3.2	Viruslast	72
3.2	GM1-Konzentration in HEK293T Wildtyp- und CLN7-Knockout-Zellen bei Transfektion von CLN7-Plasmiden	75
3.2.1	<i>GM1-Konzentration im Gruppenvergleich</i>	75
3.2.2	<i>Direkter Zusammenhang von CLN7- und GM1-Konzentration.....</i>	79
4	Diskussion	81
4.1	Infektion verschiedener CLN7-defizienter Zelllinien mit SARS-CoV-2 ..	81
4.1.1	<i>SARS-CoV-2 Viruslast in HEK293T-Zellen.....</i>	81
4.1.1.1	Viruslast im Zellkulturüberstand	81
4.1.1.2	Behandlung mit Remdesivir	81
4.1.1.3	Zellviabilität	82
4.1.1.4	Intrazelluläre Viruslast.....	83
4.1.1.5	Schlussfolgerungen der Infektionsversuche in HEK293T-Zellen.....	83
4.1.1.6	Mögliche Interaktion von CLN7/MFSD8 mit dem Replikationszyklus von SARS-CoV-2	84
4.1.1.7	SARS-CoV-2 und weitere lysosomale Speichererkrankungen.....	87
4.1.2	<i>Elektronenmikroskopische Untersuchung.....</i>	89
4.1.2.1	Ultrastrukturelle Charakteristika von SARS-CoV-2 und morphologische Verwechslungen in der Transmissionselektronenmikroskopie	90
4.1.2.2	Validierung von SARS-CoV-2-ähnlichen Strukturen	92
4.1.3	<i>SARS-CoV-2 Viruslast in Vero-Zellen.....</i>	93
4.2	GM1-Konzentration in HEK293T Wildtyp- und CLN7-Knockout-Zellen bei Transfektion von CLN7-Plasmiden	96
4.2.1	<i>Ursachenanalyse der unspezifischen Fluoreszenzsignalanhebung</i>	97

4.2.2 Perspektiven für nachfolgende experimentelle Untersuchungen	99
4.3 Abschließende Beurteilung.....	100
5 Zusammenfassung.....	102
6 Abkürzungsverzeichnis	103
7 Literaturverzeichnis	107

1 Einleitung

1.1 Neuronale Ceroidlipofuszinosen, die CLN7-Erkrankung und CLN7/MFSD8

1.1.1 Definition und Nomenklatur

Die CLN7-Erkrankung (Ceroid Lipofuscinosis, neuronal Typ 7) gehört zu den neuronalen Ceroidlipofuszinosen (NCLs) und wird deshalb auch als neuronale Ceroidlipofuszinose Typ 7 (NCL7) bezeichnet. Sie ist eine seltene hereditäre neurodegenerative Erkrankung. Es gibt mindestens 13 NCLs mit spezifischen zugrundeliegenden Gendefekten, die in die Gruppe der lysosomalen Speichererkrankungen (Lysosomal Storage Diseases, LSDs) eingeordnet werden (vgl. 1.2). Die NCLs werden in der Regel – wie auch die CLN7-Erkrankung – nach dem betroffenen Gen benannt. Weiterhin sind diejenigen NCLs, die sich in ihren pathologischen Befunden und ihrem klinischen Bild ähneln und in der Kindheit beginnen, auch unter dem Namen Morbus Batten bekannt. Umgangssprachlich wird häufig der Begriff „Kinderdemenz“ verwendet, auch wenn dieser nicht spezifisch für die NCLs ist. Treten typische Symptome hingegen erst im Erwachsenenalter auf, wird vom Kufs- oder Parry-Syndrom gesprochen (1-4).

Klinisch äußern sich NCLs vor allem durch therapieresistente Epilepsie, Sehkraftverlust bis zur Erblindung sowie motorischen und kognitiven Abbau. Die Symptomatik beginnt meist in der Kindheit, verläuft progredient und führt zu einem frühzeitigen Tod. Gemeinsam sind den verschiedenen NCLs außerdem eine fortschreitende Neurodegeneration und histopathologische Charakteristika. Mikroskopisch sind abnorme Ansammlungen autofluoreszierenden Speichermaterials in verschiedenen Geweben nachweisbar, das als Ceroid-Lipofusfuzin bezeichnet wird und der Erkrankung ihren Namen gab. Der Nachweis dieser Ceroid-Lipofuszin-Granula definiert die NCLs und grenzt sie von phänotypisch ähnlichen Erkrankungen ab. Inzwischen sind auch weniger schwere Formen beschrieben, die erst im Erwachsenenalter beginnen (5-7). Die Pathomechanismen hinter den NCLs sind unzureichend verstanden. Effektive Therapien existieren nur in Ausnahmefällen, eine Heilung ist bisher nicht möglich (8).

1.1.2 Epidemiologie

NCLs sind die häufigsten vererbbaaren neurodegenerativen Erkrankungen des Kindesalters (9). Sie treten weltweit auf, kommen jedoch in bestimmten Regionen

durch genetische Flaschenhalseffekte vermehrt vor (8). Ihre Inzidenz wird mit 1–3 : 100.000 angegeben (4). Je nach Unterform ist ihr Auftreten unterschiedlich häufig (10). Vermutlich sind NCL1, NCL2 und NCL3 am weitesten verbreitet (5, 11). Aufgrund ihrer Seltenheit und der aufwändigen Diagnostik sind die NCLs hauptsächlich im Globalen Norden bekannt (12). Es gibt jedoch Fallberichte aus vielen Ländern der Welt, beispielsweise aus dem Iran (13), Brasilien (14) und Mexiko (15). Über die Inzidenz der CLN7-Erkrankung kann aufgrund fehlender Studien keine Aussage getroffen werden.

1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie

Bisher wurden 13 Gene als Auslöser von NCLs identifiziert. Diese werden als CLN1–14 bezeichnet, einige sind zusätzlich auch nach ihrem Genprodukt benannt (vgl. Tabelle 1). Die Existenz der CLN9 hat sich im Nachhinein nicht bestätigt, sie wurde als Variante anderer NCLs reklassifiziert (5). Zuletzt wurde zudem die Existenz eines CLN15-Gens vermutet; weiterführende Forschungsarbeiten hierzu sind notwendig (5, 16). Dass darüber hinaus noch weitere NCL-Gene identifiziert werden, scheint zum aktuellen Zeitpunkt eher unwahrscheinlich, außer die Erkrankungen kommen hauptsächlich in Ländern vor, in denen bisher wenige genetische Analysen durchgeführt wurden (8). Die Vererbung der NCLs erfolgt im Regelfall autosomal-rezessiv, die Eltern von Erkrankten sind somit beide asymptomatische heterozygote Träger. Eine Ausnahme bildet NCL4, die autosomal-dominant vererbt wird (8, 17). Die Loci der CLN-Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen (4) und sie codieren für unterschiedliche Proteine, die im Endomembransystem eine Rolle spielen. Diese CLN-Proteine sind in viele zelluläre Prozesse wie Autophagie, intrazellulären Transport, Ionenhomöostase und Lipidmetabolismus involviert (3, 18). CLN1/PPT1, CLN2/TPP1, CLN10/CTSD und CLN13/CTSF codieren für lysosomale Enzyme. CLN5 codiert für ein lösliches lysosomales Protein, während CLN11/GRN ein Protein des sekretorischen Pathways codiert. CLN4/DNAJC5 und CLN14/KCTD7 codieren für zytoplasmatische Proteine, die peripher mit Membranen assoziiert sind. CLN3, CLN6, CLN7/MFSD8, CLN8 und CLN12/ATP13A2 codieren für Transmembranproteine mit verschiedenen Lokalisationen in der Zelle (5, 6). Davon befinden sich die Proteine CLN6 und CLN8 im endoplasmatischen Retikulum (ER), CLN3, CLN7/MFSD8 und CLN12 dagegen in Lysosomen (10).

NCL-Erkrankung	Genlocus	Mutiertes Gen	Genprodukt	Zellkompartiment	Funktion
CLN1	1p34.2	CLN1/ PPT1	PPT1 (lösliches Protein)	Lysosomale Matrix; extralysosomale Vesikel	Enzym (S-acylierte Protein- Thioesterase)
CLN2	11p15.5	CLN2/ TPP1	TPP1 (lösliches Protein)	Lysosomale Matrix	Enzym (Serinprotease)
CLN3	16p11.2	CLN3	CLN3 (Membranprotein)	Transmembran- domäne (späte Endosomen, Lysosomen, präsynaptische Vesikel, Axone)	Viele Funktion in diversen Zellprozessen
CLN4	20q13.33	CLN4/ DNAJC5	CSP α (lösliches Protein)	Zytosol	Co-Chaperon (Endo-/Exozytose)
CLN5	13q22.3	CLN5	CLN5 (lösliches Protein)	Lysosomale Membran und Matrix, ER, Axone	Endozellulärer Transport zwischen allen Zellkomparti- menten
CLN6	15q21-23	CLN6	CLN6 (Membranprotein)	Transmembran- domäne (ER)	Am Austritt neuer lysosomaler Enzyme aus dem ER beteiligt (?)
CLN7	4q28.2	CLN7/ MFSD8	MFSD8 (Membranprotein)	Transmembran- domäne (Lysosomen, späte Endosomen, Vesikel in Photorezeptor- zellen)	Transporter?, Chloridkanal? (19)
CLN8	8p23.3	CLN8	CLN8 (Membranprotein)	Transmembran- domäne (ER/ERGIC)	Regulator der Lysosomen- Biogenese

CLN10	11p15.4	CLN10/ CTSD	Cathepsin D (lösliches Protein)	Lysosomale Matrix	Enzym (Aspartyl- Endopeptidase)
CLN11	17q21.31	CLN11/ GRN	Progranulin (lösliches Protein)	Extrazelluläre Matrix	unbekannt
CLN12	1p36.13	CLN12/ ATP13A2	CLN12 (Membran- protein)	Transmembran- domäne (Lysosomen)	Enzym (P-Typ- ATPase)
CLN13	11q13.2	CLN13/ CTSF	Cathepsin F (lösliches Protein)	Lysosomale Matrix	Enzym (Cysteinprotease)
CLN14	7q11.21	CLN14/ KCTD7	Potassium Channel Tetrameriza- tion Domain- containing Protein 7 (lösliches Protein)	Transmembran- domäne (Plasmamembran)	Spannungs- gesteuerter Kaliumkanal- Komplex

Tabelle 1. Genetische, biochemische und funktionelle Eigenschaften der NCLs.

Verändert nach Simonati und Williams (2022) (4).

Ein Zusammenwirken von CLN-Mutationen mit anderen Genen, die den Phänotyp der NCL-Erkrankung verstärken oder abschwächen oder in andere Erkrankungen involviert sind, scheint wahrscheinlich (6, 17, 20). Beispielsweise können CLN-Gene (heterozygot) auch bei weitverbreiteten neurodegenerativen Erkrankungen des Erwachsenenalters mutiert sein, z.B. bei der Alzheimer-Krankheit, frontotemporaler Demenz oder der Parkinson-Krankheit (4, 21-23). Zudem gibt es Hinweise dafür, dass CLN-Gene auch bei Krebserkrankungen eine Rolle spielen könnten (24).

1.1.3.1 Das CLN7/MFSD8-Gen und -Protein

Das im Jahr 2007 entdeckte CLN7/MFSD8-Gen sowie das entsprechende Protein (25) werden im Folgenden als CLN7 abgekürzt. Bei der CLN7-Erkrankung liegt der betroffene Genlocus auf Chromosom 4q28.1-q28.2 (25). Das CLN7-Gen ist hoch konserviert. Homologe kommen in den Genomen vieler einfacher Organismen wie Nematoden, der Fruchtfliege und Zebrafischen, aber auch in Säugetieren, vor (19, 26). Das betont die große Bedeutung des Proteins im Stoffwechsel verschiedenster Lebewesen (8). Bis zum aktuellen Zeitpunkt sind etwa 80 unterschiedliche Mutationen

im CLN7-Gen bekannt und ihre Zahl wächst weiter. Das University College London führt eine frei zugängliche Datenbank mit den bisher entdeckten Mutationen (27). Während ein kompletter Funktionsverlust von CLN7 zur typischen Symptomatik der NCL führt, gibt es auch leichtere Verläufe bei „milden“ Mutationen (6).

Das CLN7-Protein besteht aus 518 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 58 kDa. Es ist ein lysosomales Transmembranprotein mit vermutlich 12 Transmembrandomänen (25, 28). Im Anschluss an die Synthese im Golgi-Apparat wird es über ein Dileucin-Motiv am N-Terminus in die Lysosomen geleitet (29-31). Nach seiner Ankunft dort wird CLN7 zwei Mal durch die lysosomale Cysteinprotease gespalten und die N- und C-terminalen Fragmente freigesetzt (32). Sowohl der N- als auch der C-Terminus ragen ins Zytosol. Aufgrund von Sequenzhomologien wird CLN7 in die Gruppe der Major Facilitator Superfamily (MFS)-Proteine eingeordnet und auch als MFSD8 (Major Facilitator Superfamily Domain Containing Protein 8) bezeichnet (25). Bei den MFS-Proteinen handelt es sich um eine sehr große Gruppe von Proteinen, die ubiquitär in verschiedenen Organismusklassen vorkommen. Sie transportieren verschiedene Moleküle durch sekundär aktiven Transport über Membranen. Zu den von MFS-Proteinen transportierten Molekülen gehören anorganische und organische Kationen, Zucker und Zuckerphosphate, Medikamente, Neurotransmitter und Aminosäuren (28, 33). Es gibt Hinweise, dass es sich bei CLN7 um einen lysosomalen Chloridkanal handeln könnte, der über die Beeinflussung des lysosomalen pH-Werts und Calciumgehalts die lysosomale Funktion reguliert (19). Als solcher steht CLN7 vermutlich mit Transport und Funktion lysosomaler Enzyme in Zusammenhang. Das wird auch daran deutlich, dass eine CLN7-Defizienz Auswirkungen auf andere lysosomale CLN-Proteine (CLN1/PPT1, CLN2/TPP1, CLN5, CLN10/CTSD) hat, die als lysosomale Enzyme fungieren (34).

Das CLN7-Protein wird in einem geringen Ausmaß ubiquitär in allen Geweben exprimiert. Eine erhöhte Expression findet sich neben neuronalen Zellen auch in Herz, Leber und Pankreas (25, 28). Ist das Protein defizient, sind vor allem Neuronen betroffen (29). Betrachtet man die Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS), sind in Neuronen deutlich höhere Mengen von CLN7 zu finden als in Astrozyten und Mikroglia. Die höchste Expression befindet sich im Hippocampus, weniger in Großhirnkortex und Mittelhirn (28, 30).

1.1.4 Pathologie

In der Pathologie der NCLs lässt sich ein ausgeprägter progressiver Verlust von Neuronen beobachten, die das ZNS, die Retina und auch das enterische Nervensystem betreffen (4). Es kommt zur Atrophie der grauen Substanz des Groß- und Kleinhirns sowie zur sekundären Ventrikelvergrößerung (8). Mikroskopisch sind charakteristische Ansammlungen von autofluoreszierendem Material in den Lysosomen der Neuronen, Makrophagen und des somatischen Gewebes zu erkennen (8, 35). Dieses wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Alterspigment als Ceroid-Lipofuszin bezeichnet (4, 8). Anders als bei anderen LSDs bestehen diese Ablagerungen nicht aus dem Substrat des defekten Enzyms (8), sondern aus einer Mischung verschiedener Bestandteile, die bisher nur unzureichend charakterisiert worden sind (4). Bei vielen NCLs lassen sich unter anderem die C-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase (Subunit C of mitochondrial ATP-Synthase, SCMAS) oder die Shingolipid-Aktivator-Proteine A und D (Saposin A und D) nachweisen (4, 8). Auch in einem CLN7-Mausmodell wurden vor allem SCMAS und Saposin D nachgewiesen (36).

Je nach NCL-Subtyp lassen sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen betroffener Gewebe charakteristische Ultrastrukturen ausmachen. Diese wurden in der Vergangenheit in der Diagnostik der NCLs verwendet. Bei der CLN7-Erkrankung handelt es sich dabei um kondensierte Fingerprint-Profile in Lymphozyten und Fibroblasten (37, 38). Heute ist die Elektronenmikroskopie in der Diagnostik größtenteils durch Sequenzanalysen ersetzt und wird nur noch in Ausnahmefällen eingesetzt.

1.1.5 Symptomatik und Klassifikation

Klinisch zeigen sich NCL-Erkrankungen durch charakteristische neurologische Symptome. Zu den vier Hauptmerkmalen zählen epileptische Anfälle, der fortschreitende Verlust kognitiver und motorischer Fähigkeiten (bis hin zu Demenz und Bettlägerigkeit) sowie eine Verschlechterung des Sehvermögens bis zur vollständigen Erblindung. Außerdem sind auch Symptome außerhalb des ZNS möglich, wie beispielsweise eine Herzbeteiligung bei CLN3 zeigt. Außer im Fall der kongenitalen CLN10 findet zunächst eine normale psychomotorische Entwicklung statt, bevor die ersten NCL-Symptome auftreten (8). Das Alter bei Erstmanifestation, das zwischen der Geburt und dem späten Erwachsenenalter liegen kann, die Reihenfolge der

Symptome und das Fortschreiten der Erkrankung variieren und sind sowohl vom NCL-Subtyp als auch von der spezifischen Mutation und von individuellen Faktoren abhängig (vgl. Tabelle 2) (8, 9). Es zeigt sich eine hohe phänotypische Variabilität und genetische Varianz (4). Phänotypische Variabilität bedeutet, dass sich die gleiche Mutation klinisch unterschiedlich äußern kann, beispielsweise in Form eines früheren oder späteren Erkrankungsbeginns oder schnellerem bzw. langsameren Verlauf (39). Die genetische Heterogenität hingegen beschreibt das Phänomen, dass derselbe klinische Verlauf auf unterschiedliche Mutationen zurückzuführen sein kann (40).

Die klinische Symptomatik wurde in der Vergangenheit auch zur Klassifikation der NCLs benutzt. Ursprünglich wurden die NCLs nach dem Alter bei Erstmanifestation eingeteilt. So wurde zwischen der infantilen, spät-infantilen, juvenilen und adulten NCL unterschieden, für die jeweils ein Gen (CLN 1–4) als krankheitsverursachend angekommen wurde (6). Mit der Identifikation der dahinterstehenden Gendefekte und der Entdeckung der genetischen Variabilität erfolgte eine Umbenennung nach dem betroffenen Gen in CLN1–14 (8). In der Klinik wurde die Klassifikation nach Erkrankungsalter in die kongenitale, infantile (INCL), spät-infantile (late infantil, LINCL), juvenile (JNCL) und adulte (ANCL) Form verfeinert, die weiterhin angewendet wird (4).

Klinische Form	Alter bei Symptombeginn	Erkrankung	Hauptsymptome bei Beginn
Kongenital	vor oder in ersten Wochen nach Geburt	CLN10	Mikrozephalie, dysmorphe Züge, Epilepsie, hyperkinetische Bewegungen
Infantil (INCL)	6–18 Monate	CLN1	Reduziertes Kopfwachstum, neurologische Entwicklungsregression, Epilepsie
		CLN10	Reduziertes Kopfwachstum, neurologische Entwicklungsregression

		CLN14	Reduziertes Kopfwachstum, Epilepsie (Myoklonus)
Spätinfantil (LINCL)			
Klassisch	2–4 Jahre	CLN2	Epilepsie, Ataxie, Erblindung, verzögerte Sprachentwicklung
Variante (vLINCL)	2–5 Jahre	CLN1	Epilepsie, neurologische Entwicklungsregression, Verhaltensauffälligkeiten
		CLN5	Beeinträchtigtetes Lernen und Kognition
		CLN6	Epilepsie, Ataxie, verzögerte Sprachentwicklung
		CLN7	Epilepsie, Erblindung, motorische und kognitive Regression
		CLN8	Epilepsie, Erblindung, motorische und kognitive Regression
Juvenil (JNCL)			
Klassisch	3–5 Jahre	CLN3	Erblindung, Verhaltensauffälligkeiten, kognitive Regression
	5–7 Jahre	CLN5	Motorische und kognitive Regression Verhaltensauffälligkeiten
		CLN1	Erblindung, kognitive Regression

Spät	8–12 Jahre	CLN6 CLN10	Myoklonien, kognitive Regression, Ataxie, Erblindung
	3–16 Jahre	CLN12	Rigidität, Hypokinesie
Adult (ANCL)	10–40 Jahre	CLN6 (Morbus Kufs Typ A)	Epilepsie, Aktionsmyoklonus, Ataxie, kognitive Regression
	10–60 Jahre	CLN13 (Morbus Kufs Typ B)	Epilepsie, Myoklonus, cerebellärer Tremor, kognitive Regression, Depression, Angststörung
	20–40 Jahre	CLN4 (Morbus Parry)	Epileptische Anfälle, Aktionsmyoklonus, Erblindung
	20–30 Jahre	CLN11	Epileptische Anfälle, Erblindung
	20–40 Jahre	CLN1	Kognitive Regression, psychiatrische Symptome
	50–60 Jahre	CLN5	Unruhiger Gang

Tabelle 2. Klinische Klassifikation der NCLs mit Symptomen bei Erkrankungsbeginn.

Verändert nach Simonati und Williams (2022) (4).

Auch die Symptomatik der CLN7-Erkrankung ist heterogen. Bei typischen Verläufen mit komplettem Verlust der Proteinfunktion manifestieren sich die ersten Symptome zwischen dem 2. und 7. Lebensjahr, zunächst meist in Form von epileptischen Anfällen und Entwicklungsrückschritten. Im rasch progredienten Verlauf kommt es bald zur mentalen und motorischen Regression sowie zur Erblindung. Patient*innen versterben in der Regel vor dem 20. Lebensjahr (5, 25, 38). Dieser Erkrankungsverlauf wird als variant late-infantile NCL (vLINCL) bezeichnet. Ursprünglich wurde die CLN7-Erkrankung als „türkische vLINCL“ bezeichnet, da sie erstmals bei türkischen Patient*innen beschrieben wurde (5). Es bestand die Vermutung, dass es sich um eine eigenständige klinische und genetische Form handele. Im Verlauf stellte sich jedoch heraus, dass die sogenannte türkische NCL genetisch heterogen war und CLN7-

assoziierte Defekte geographisch weiträumiger verteilt sind, als ursprünglich angenommen wurde (6, 38). Da sich die CLN7-Erkrankung klinisch nicht klar von anderen genetischen NCL-Entitäten unterscheiden lässt, ist zur Differenzierung eine genetische Testung notwendig (38, 41). In den letzten Jahren sind leichtere Erkrankungsverläufe mit späterem Beginn und nicht-syndromische Präsentationen wie Retinadystrophie oder isolierte Ataxie durch „milde“ Mutationen im CLN7-Gen beschrieben worden (20, 42). Zudem wurden seltene heterozygote Mutationen im CLN7-Gen als Risikofaktoren für frontotemporale Demenz identifiziert (22).

1.1.6 Diagnostik, Therapie und Prognose

Bei Verdacht auf eine NCL erfolgt die Diagnostik zunächst je nach Subtyp über enzymatische oder genetische Tests. Die Bestätigung erfolgt immer über eine DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse (8). Pathologische Untersuchung und Elektronenmikroskopie werden nicht mehr routinemäßig eingesetzt, können aber in Ausnahmefällen hilfreich sein (4). Für die Zukunft ist die Einführung von Screeningprogrammen denkbar, da die Behandlung einiger NCLs möglich geworden ist und ein möglichst früher Therapiebeginn von Vorteil zu sein scheint (5, 8). Dennoch kann ein Großteil der NCLs nur palliativ behandelt werden. Die Prognose der NCLs ist in der Regel infaust. Abhängig vom Subtyp versterben die Patient*innen innerhalb weniger Jahre. Jedoch gibt es auch Formen, bei denen ein Überleben bis ins höhere Alter möglich ist. Es gilt die Faustregel, dass der Verlauf umso schwerer ist, je früher die ersten Krankheitssymptome auftreten (4, 8).

Zum aktuellen Zeitpunkt sind nur für NCL2 verlaufsverbessernde Therapeutika kommerziell erhältlich. Für einige andere NCLs befinden sich experimentelle Therapien in der Entwicklung (8). In den letzten Jahren wurden einige vielversprechende Ansätze verfolgt. Zu nennen sind neben der Enzym-Ersatz-Therapie, die bei der NCL2 bereits in Anwendung ist, pharmakologische Ansätze in Form von klassischen Medikamenten sowie die Gen- und die Stammzelltherapie (5, 8, 43).

Zur Therapie der CLN7-Erkrankung wurde in einem Fall bereits eine individualisierte Gentherapie mit einem Antisense-Oligonukleotids durchgeführt. Es konnte klinisch ein verlangsamtes Fortschreiten der Erkrankung erreicht werden (44). Zudem befindet sich aktuell eine Gentherapie mit einem modifizierten Adenovirus (AAV9/CLN7-Vektor) in einer klinischen Phase-I-Studie (45).

Für eine ausführliche Betrachtung der NCLs inklusive eines historischen Abrisses über die Entdeckung und Klassifizierung sowie aktuelle Therapieansätze sei auf die Reviews von Mole und Cotman (6), Simonati et al. (4) und Zhang et al. (5) verwiesen.

1.2 Lysosomen und lysosomale Speichererkrankungen

Lysosomen sind membranumhüllte Zellkompartimente, die in eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie sind hauptsächlich für den Abbau von Makromolekülen wie Proteinen, Polysacchariden und komplexen Lipiden in ihre Einzelbausteine zuständig. Inzwischen wurde zusätzlich ihre Involvierung in weitere wichtige zelluläre Prozesse wie Signaltransduktion, Zelltod, Zellteilung, -polarität und -migration sowie in der Immunabwehr herausgearbeitet (46-49). Das Innere der Lysosomen weist einen sauren pH-Wert zwischen 4 und 5 auf und beinhaltet mehr als 60 verschiedene Hydrolasen für den enzymatischen Abbau der Makromoleküle. Anzahl, Größe und Lokalisation der Lysosomen sind von den Nährstoffbedingungen in der Zelle abhängig. Im Normalzustand besitzen Zellen mehrere hundert Lysosomen mit einem Durchmesser von 100–500 nm. Sie sind in der Zellperipherie verteilt. Bei Hungerzuständen fusionieren die Lysosomen miteinander, sodass ihre Anzahl ab- und ihre Größe auf bis zu 1.500 nm zunimmt. Außerdem ordnen sie sich clusterartig um den Zellkern an (50-52).

Die Lysosomen erhalten ihre abzubauenende Ladung entweder über den Prozess der Endozytose oder der Autophagie. Über Endozytose werden Bestandteile aus dem Extrazellulärraum aufgenommen. Hier gibt es verschiedene mögliche Aufnahmemechanismen, die grob in die Clathrin-abhängige und die Clathrin-unabhängige Endozytose unterteilt werden. Die Clathrin-abhängige Endozytose ist der häufigste und am besten erforschte Aufnahmeweg. In die Kategorie der Clathrin-unabhängigen Endozytose lassen sich viele unterschiedliche Mechanismen wie die Caveolae-vermittelte Endozytose, die Makropinozytose und Phagozytose sowie der CLIC/GEEC-Weg einordnen (47, 53, 54). All diesen Wegen ist gemeinsam, dass sich aus der Plasmamembran endozytotische Vesikel bilden, die zuerst zu frühen, dann zu späten Endosomen und schließlich zu multivesikulären Körperchen (Multivesicular Bodies, MVBs) reifen. Diese MVBs fusionieren im Anschluss mit Lysosomen, die ab diesem Zeitpunkt als Endolysosomen bezeichnet werden, in denen der Substratabbau stattfindet.

Per Autophagie werden den Lysosomen intrazelluläre Organellen und Proteinaggregate zugeführt. Die Autophagosomen fusionieren entweder direkt mit Lysosomen oder über Zwischenschritte mit frühen oder späten Endosomen und bilden im Anschluss die sogenannten Autolysosomen.

Nach dem Zersetzen in ihre Einzelbestandteile durch die spezifischen Hydrolasen (Proteasen, Glykosidasen und Lipasen) werden die Katabolite über verschiedene Mechanismen aus den Lysosomen ausgeschleust. Eine Möglichkeit ist die lysosomale Exozytose, bei der die Lysosomen zur Plasmamembran transportiert werden, mit dieser fusionieren und ihre Ladung freisetzen. Außerdem können Katabolite über vesikulären Transport oder spezifische Transporter aus den Lysosomen transportiert werden.

In der Membran von Lysosomen befinden sich mehr als 50 verschiedene Proteine, die an zahlreichen Funktionen dieser Organellen mitwirken. Unter diesen Membranproteinen befinden sich unter anderem Ionenkanäle und Transporter, die eine essenzielle Rolle in der Regulation der lysosomalen Homöostase spielen. Die lysosomalen Funktionen sind auf eine Homöostase von Ionen und Membranpotential im Lumen angewiesen. So brauchen beispielsweise die lysosomalen Hydrolasen einen sauren pH-Wert, um zu funktionieren und viele der Katabolittransporter reagieren sensibel auf Änderungen des lysosomalen Membranpotentials (50).

Ist die Funktion der Lysosomen gestört, treten LSDs (vgl. 1.1.1) auf. Unter diesem Oberbegriff werden etwa 70 Erkrankungen zusammengefasst, die durch die Ansammlung von nicht oder nur unzureichend abgebauten Makromolekülen in den Lysosomen charakterisiert sind. An der zellulären Pathogenese sind verschiedene lysosomale Proteine beteiligt. Die Krankheitsmechanismen sind komplex und bislang nur unzureichend verstanden (49). In den meisten Fällen werden LSDs durch Mutationen in Genen lysosomaler Enzyme verursacht, wodurch das Material in den Lysosomen nicht vollständig abgebaut werden kann und akkumuliert. Defekte in Katabolitexportern oder beim Transport von Kataboliten aus den Lysosomen können ebenfalls dazu führen, dass sich Material staut. Mutationen in lysosomalen Ionenkanälen und Transportern können über eine gestörte Ionenhomöostase die Lysosomenfunktion beeinflussen, sodass sich Speichermaterial sekundär ansammelt (50). Ein Großteil der LSDs wird autosomal-rezessiv vererbt und betrifft ca. 1 : 5000 Lebendgeborenen. Die Krankheitssymptomatik beginnt zumeist in der Kindheit und

äußert sich in Form eines progressiven neurodegenerativen Verlaufs, doch auch in anderen Organsystemen treten häufig Symptome auf (49). Die NCLs und auch die CLN7-Erkrankung sind folglich in vielen Punkten typische LSDs (4).

1.3 Lipid Rafts und GM1

Ursprünglich wurde angenommen, dass zelluläre Membranen aus einer homogenen Phospholipid-Doppelschicht bestehen, in die Proteine gleichmäßig eingelagert sind. Im Laufe der Zeit stellte sich jedoch heraus, dass die Plasmamembran aus über 100.000 unterschiedlichen Lipiden besteht und Bereiche mit verschiedenen Lipid- und Proteipopulationen existieren. Hieraus entwickelte sich die Lipid Raft-Hypothese, die zwar immer noch nicht abschließend bestätigt, inzwischen in der Forschung aber allgemein anerkannt ist (55-57).

Lipid Rafts sind heterogene, hochdynamische, cholesterin- und sphingolipidreiche Bereiche der zellulären Membranen mit einem Durchmesser zwischen 10 und 200 nm. Sie sind vor allem aus Cholesterin und Sphingolipiden, aber auch Glycosphingolipiden wie Gangliosiden, zusammengesetzt. Lipid Rafts bilden Kompartimente für die verschiedensten zellulären Prozesse. Sie fungieren als Plattformen für Proteine und Lipide, wie beispielsweise Rezeptoren und regulatorische Signalmoleküle (56, 58, 59). Ihre Bildung erfolgt durch physiochemische Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Interaktionen und sie können sich zu mikroskopischen Domänen (> 300 nm) zusammenschließen (58-60). Die Lipide in ihrem Inneren sind dicht gepackt und hochgradig geordnet (57, 61). Die Lebensspanne der Lipid Rafts kann zwischen wenigen Nanosekunden und – wenn sie stabilisiert werden – deutlich längeren Zeiträumen variieren (60). Die Prozesse, die zur Assoziation von Proteinen mit Lipid Rafts führen, sind bisher nur unzureichend verstanden. Häufig werden sie mit gesättigten Fettsäuren wie Glycosylphosphatidylinositol-(GPI-)Ankern oder Palmitoyl-Gruppen versehen, die sich vorwiegend in den Rafts ansammeln. Jedoch besitzen nicht alle in Lipid Rafts lokalisierten Proteine diese Markierungen (60).

Es wird angenommen, dass verschiedene Typen von Lipid Rafts existieren, darunter planare Lipid Rafts und Caveolae-Lipid Rafts. Obwohl sie sich in Aufbau und Funktion unterscheiden, wirken sie alle auf zelluläre Signalkaskaden ein (56, 62). Lipid Rafts sind in vielfältige zelluläre Prozesse wie Lipid- und Proteintransport und -sortierung,

Signaltransduktion, synaptische Signalübertragung und Apoptose involviert (59, 63-65). Außerdem haben sie Anteil an der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen wie der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit (66, 67) oder fungieren als Eintrittsstellen für Toxine und Viren (59, 68, 69).

Einen integralen Bestandteil von Lipid Rafts bildet das Gangliosid Monosialotetrahexosylgangliosid (GM1), das ein saures Glycosphingolipid ist. Es besteht aus einem hydrophilen Oligosaccharid mit einer oder mehreren Sialinsäuren und einem Ceramid, die miteinander verknüpft sind. Ceramide sind Sphingosine, die über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbunden sind und damit den hydrophoben Teil des Gangliosid-Moleküls bilden (70). GM1 ist meistens auf der äußeren Zelloberfläche verankert, wobei seine Lipidkette in die Plasmamembran ragt, während das Glykan nach außen zeigt. Dabei interagiert es lateral mit Phospholipiden, Cholesterol und Membranproteinen. Zahlreiche neurologische Pathologien wie die Alzheimer- und Parkinson-Krankheit oder die GM1-Gangliosidose weisen funktionale Störungen von GM1 auf (71, 72).

Es gibt verschiedene Strategien zur Markierung und Untersuchung der Lipid Rafts. Da GPI-Anker die Lokalisation von Proteinen in den Rafts festlegen, können sie zur Untersuchung raftassoziiierter Proteine genutzt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Markierung von Lipiden in den Rafts. Da Lipid Rafts hauptsächlich aus Cholesterin, Sphingolipiden und Glycosphingolipiden bestehen, können sie durch Nachweis ebendieser Bestandteile markiert werden. Während Cholesterin sich (unspezifisch) durch Filipin III anfärben lässt, kann Sphingomyelin beispielsweise durch Ostreolysin A nachgewiesen werden. Für die Markierung von Glycosphingolipiden eignet sich hingegen die B-Untereinheit des Choleratoxins, die an GM1 bindet. Außerdem gibt es die Möglichkeit, membraneigenschaftssensitive Agenzien wie solvatochromische oder viskositätssensitive Sonden einzusetzen, die ihre fluoreszierenden Eigenschaften in Abhängigkeit ihrer Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel ändern. Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile und markiert nicht immer die gleiche Art von Lipid Rafts (59, 73).

1.4 COVID-19 und SARS-CoV-2

Ende 2019 kam es in der chinesischen Stadt Wuhan zum Ausbruch einer Pneumoniewelle, verursacht durch einen bis dahin unbekannten Erreger. Als Auslöser wurde ein neuartiges Coronavirus identifiziert: das Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Typ 2 (SARS-CoV-2) (74, 75). Die durch das Virus verursachte Erkrankung wird als Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) bezeichnet (76). Innerhalb weniger Wochen verbreitete sich das SARS-CoV-2-Virus weltweit mit teils dramatischen Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit und wurde im März 2020 von der World Health Organization (WHO) zur Pandemie erklärt (77). In vielen Staaten folgten daraufhin zum Teil drastische Maßnahmen wie Ausgangsbeschränkungen, Maskenpflichten und Kontaktbeschränkungen (78). Dank umfangreicher internationaler Forschungsbemühungen standen ab Dezember 2020 die ersten Impfstoffe zur Verfügung, und auch die Therapie von COVID-19 wurde fortlaufend weiterentwickelt. Dennoch endete die Pandemie offiziell erst im Mai 2023, als der globale Gesundheitsnotstand durch die WHO aufgehoben wurde. Es entwickelten sich unterschiedliche Virusvarianten, die sich in ihrer Übertragbarkeit und Virulenz unterscheiden (76). Aktuell, im Sommer 2025, dominieren in Deutschland rekombinante Varianten sowie Subvarianten der Omikron-Variante (79, 80). Zwischen dem Ausbruch der Pandemie und Juli 2025 zählte die WHO weltweit fast 780 Millionen bestätigte COVID-19-Fälle und etwa 7 Millionen zugeordnete Todesfälle (81).

1.4.1 COVID-19

COVID-19 betrifft hauptsächlich die oberen Atemwege und ruft Schnupfen, Husten, Halsschmerzen und Luftnot sowie Fieber hervor (82). Es können sich schwere Ausprägungen mit Pneumonie und Atemnot bis hin zum Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), respiratorische Insuffizienz mit septischem Schock oder Multiorganversagen entwickeln. Dennoch sind auch asymptomatische Verläufe möglich (78). Auch persistierende Beschwerden, die unter dem Begriff Long-COVID zusammengefasst werden, können auftreten. Typische Symptome sind Kurzatmigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen, kognitive Einschränkungen und chronische Erschöpfung. Im Verlauf der Pandemie nahm das Risiko von schweren Verläufen und Long-COVID aufgrund von gesteigerter Immunität durch Antigenexposition und

Impfungen ab. Die Therapie ist abhängig von der Erkrankungsschwere und umfasst neben symptomatischer Behandlung auch den Einsatz von Virostatika oder intensivmedizinische Maßnahmen wie invasive Beatmung (76).

1.4.2 SARS-CoV-2

Viren sind obligate intrazelluläre Parasiten mit einer Größe zwischen 16 und > 300 nm. Sie sind nicht als Lebewesen definierbar, sondern vielmehr infektiöse Einheiten, da sie im Gegensatz zu pro- oder eukaryotischen Zellen keinen eigenen Stoffwechsel besitzen. Für ihre Replikation sind sie darauf angewiesen, Wirtszellen zu infizieren und deren zellulären Stoffwechsel auszunutzen. Dabei können sie diese Wirtszellen so beeinflussen, dass wirtseigene Prozesse für die Produktion von Virusbestandteilen umgelenkt werden.

1.4.2.1 Aufbau

Zu den Bestandteilen von Viren gehören verschiedene Grundelemente. Den Kern bildet eine Nukleinsäure, die je nach Virusspezies entweder aus RNA oder DNA besteht. Die Nukleinsäure ist abhängig vom Virustyp einzel- oder doppelsträngig und liegt linear, ringförmig oder segmentiert vor. Einzelsträngige Virusgenome weisen entweder eine positive oder negative Polarität auf. Können sie direkt von der Translationsmaschinerie abgelesen werden (5'–3'-Richtung), werden sie als Positivstränge bezeichnet. Negativstränge besitzen dagegen eine 3'–5'-Richtung. Die Nukleinsäuren bilden gemeinsam mit an sie gebundenen zellulären oder viralen Proteinen das Nukleokapsid. Dieses kann zusätzlich von einem Kapsid umgeben sein. Manche Virusspezies weisen zudem eine Lipidhülle auf, die den Membranen der Wirtszelle entstammt. Diese Art von Viren wird folglich als behüllt bezeichnet. Sie besitzen in der Regel kein Kapsid (83).

Gemeinsam mit SARS-CoV-1 und MERS-CoV wird SARS-CoV-2 in die Gattung der Betacoronaviren eingeordnet. SARS-CoV-2-Virionen besitzen einen Durchmesser von etwa 100 nm (84). Ihr helikales Nukleokapsid besteht aus einzelsträngiger linearer RNA, die als Positivstrang vorliegt und mit dem viralen Nukleokapsid-(N)-Protein komplexiert ist. Mit etwa 30.000 Basen ist das Genom der Coronaviren eines der längsten bekannten viralen RNA-Genome (83). Bei Coronaviren handelt es sich um behüllte Viren, ein Kapsid besitzen sie nicht. In ihre Membranhülle sind charakteristische Proteine (Spike-(S-)Proteine) eingelagert, die einem Strahlenkranz (lat.: corona) ähneln, was der Virusfamilie zu ihrem Namen verhalf. Auch das

Membran-(M)- und das Envelope-(E)-Protein von SARS-CoV-2 befinden sich in der Hülle. Das S-Protein initiiert die Virusbindung und den Eintritt in die Wirtszelle, während die anderen Membranproteine in das Zusammensetzen und die Knospung neuer Virionen involviert sind (85, 86).

Das Virusgenom von SARS-CoV-2 besteht zu zwei Dritteln aus den Open Reading Frames (ORF) ORF1a und ORF1b. Diese werden bei Freisetzung der gRNA (genomic RNA) ins Zytoplasma der Wirtszelle direkt in die Proteine pp1a und pp1ab translatiert und in 16 Nicht-Strukturproteine (NSPs) gespalten. Die NSPs sind hauptsächlich für die virale RNA-Synthese verantwortlich. Das letzte Drittel der viralen RNA codiert die vier Strukturproteine S, M, E und N und die akzessorischen Proteine ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 und ORF9b (87). Ob auch die ORFs ORF9a und ORF10 in Proteine übersetzt werden, ist umstritten (88, 89). Auf diese akzessorischen Proteine ist das Virus nicht zwingend angewiesen, um sich replizieren zu können. Dieses Drittel der gRNA wird nicht direkt translatiert, sondern zunächst in subgenomische Messenger-RNAs (sg-mRNAs) übertragen. Erst nach erneuter Übertragung in einen (+)-Strang erfolgt die Translation. Insgesamt codiert das SARS-CoV-2-Genom für 29 Proteine (85, 90).

1.4.2.2 Replikationszyklus

Viren nutzen bestimmte Rezeptormoleküle auf der Oberfläche ihrer Wirtszellen, um sich an ihnen anzuheften. Dieser Prozess wird als Adsorption bezeichnet. Behüllte Viren nutzen dafür Proteine, die in ihre Membranhülle eingelagert sind. Bei unbehüllten Viren befinden sich diese Proteine im Kapsid. Im Anschluss an die Adsorption kommt es zur Penetration: dem Eintritt des Virions in das Zellinnere. Unbehüllte Viren nutzen dabei obligat die Endozytose und sukzessive Freisetzung ihres Inhalts aus den Endosomen. Bei behüllten Viren können dagegen unterschiedliche Mechanismen genutzt werden. Auch hier spielt die Endozytose eine Rolle, wobei auch eine direkte Membranfusion vorkommen kann. Je nach Virustyp kann die Entlassung der Erbinformation aus den Endosomen pH-abhängig oder -unabhängig stattfinden. DNA-Viren replizieren in der Regel im Zellkern, sodass die freigesetzte virale DNA zunächst in dieses Zellkompartiment gelangen muss. Die Replikation von RNA-Viren findet dagegen meistens im Zytoplasma statt (91).

Der Replikationszyklus von SARS-CoV-2 beginnt mit der Bindung des viralen S-Proteins an den Wirtszellrezeptor Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) (75). Die

Expression dieses Rezeptors ist dabei zu großen Teilen dafür verantwortlich, ob das Virus einen Zelltyp infizieren kann oder nicht. Doch auch Zellen, die kein ACE2 exprimieren, können durch SARS-CoV-2 infiziert werden. Hier kommen Co-Rezeptoren wie Neuropilin-1 oder CD147 als Bindungsrezeptoren in Frage (92-94). Das S-Protein des SARS-CoV-2-Virions ist in die zwei Hauptdomänen S1 und S2 aufgeteilt. Die S1-Domäne enthält unter anderem die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) mit dem rezeptorbindenden Motiv (RBM), welches an das ACE2 bindet. Die S2-Domäne besitzt hingegen die Fusionsdomäne mit der S2'-Spaltstelle und verankert das Spike-Protein in der Virushülle (95). Zusätzlich zur Bindung an ACE2 benötigt das S-Protein eine proteolytische Spaltung von S2' zur Fusionsaktivierung. Durch die Bindung der RBD an ACE2 kommt es zu einer Konformationsänderung im S-Protein, die auch als Priming bezeichnet wird (85). Das Priming bewirkt, dass die Fusionsdomäne für eine Spaltung zugänglich ist (96). Für diese gibt es zwei mögliche Wege. Beim sogenannten frühen Eintrittsweg geschieht die Spaltung der Fusionsdomäne durch eine wirtszelleigene Serinprotease, wie beispielsweise die transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2). Anschließend kommt es zur Fusion der Membranen von Virus und Zielzelle und dem Eindringen des SARS-CoV-2-Erbguts in das Zytoplasma (97). Dagegen erfolgt beim späten Eintrittsweg noch vor der Membranfusion zunächst eine Endozytose des gebundenen Virions und im Verlauf der Endosomenreifung und -ansäuerung eine Spaltung von S2' durch die endosomalen Proteasen Cathepsin L oder B (CTSL, CTSB). Die Virusmembran verschmilzt mit der Membran des Endolysosoms (98). Im Anschluss an die Membranfusion wird das SARS-CoV-2-Genom in das Zytoplasma freigesetzt, wo der Replikationsprozess in Gang gesetzt wird (85). Welcher Eintrittsweg genutzt wird, ist vom Zelltyp und der Expression der Proteasen abhängig (95, 99).

Die virale Replikation umfasst die Expression viraler Proteine und die Vermehrung des Genoms. Je nach Virustyp verläuft sie unterschiedlich. Einen Teil der für die Genexpression und -replikation benötigten Proteine bringen die Viren selbst mit, während sie für andere Komponenten auf Bestandteile der Wirtszelle angewiesen sind. Abhängig von Art und Aufbau des viralen Genoms sind unterschiedliche Schritte notwendig (91). Da es sich bei SARS-CoV-2 um ein positivsträngiges RNA-Virus handelt, wird im Folgenden nur der Replikationsablauf bei dieser Art von Viren erläutert. Die RNA der positivsträngigen RNA-Viren hat die Polarität von zellulärer

mRNA und kann mithilfe der Zellmaschinerie der Wirtszelle direkt translatiert werden. Die gRNA bindet dafür an die zellulären Ribosomen, an denen daraufhin am rauen ER die Translation beginnt. Die entstehenden Proteine werden im Anschluss in die Struktur- und Nicht-Strukturproteine gespalten. Strukturproteine geben dem Virion sein charakteristisches Aussehen und seine Struktur und erfüllen vielfältige Aufgaben im viralen Lebenszyklus. Beim SARS-CoV-2-Virus sind die Strukturproteine das S-, das M-, das E- und das N-Protein. Nicht-Strukturproteinen sind dagegen beispielsweise Enzyme. Eins der wichtigsten viralen Enzyme ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase, die in eukaryotischen Zellen nicht vorkommt. Durch Aktivität dieser Polymerase wird abhängig von der gRNA ein komplementärer (-)-RNA-Strang synthetisiert, der wiederum als Matrize für neue (+)-RNA-Stränge dient. Diese werden im Verlauf des weiteren Replikationszyklus entweder in neue Virionen gepackt oder in Proteine translatiert (91).

Bei SARS-CoV-2 werden zunächst ORF1a und ORF1b in die beiden langen Polyproteine pp1a und pp1ab translatiert. Diese werden im Anschluss in 16 Nicht-Strukturproteine (NSPs) gespalten. Bei den NSPs handelt es sich um verschiedene Enzyme, die größtenteils für die virale RNA-Replikation von Bedeutung sind. NSP1 wird nach seiner Bildung schnell in das Zytoplasma freigesetzt und blockiert dort unter anderem die Translationsprozesse der Wirtszelle (100-102). NSP2–NSP16 bilden die viralen Replikations-Transkriptions-Komplexe (RTCs). NSP12–NSP16 besitzen dabei die enzymatischen Funktionen für virale RNA-Replikation, Transkription, Proofreading und Modifikation (103), während andere NSPs beispielsweise zur Stabilisation der entstehenden RNA oder als Kofaktoren dienen (104). Die RTCs befinden sich dabei innerhalb von Replikationsorganellen. Die Replikationsorganellen werden von Coronaviren unter dem Einfluss der NSPs aus intrazellulären Membranen ihrer Wirtszelle aufgebaut. Aus dem ER wird ein Netzwerk von Doppelmembranvesikeln (DMVs) erzeugt, das in seiner Gesamtheit als Replikationsorganell bezeichnet wird. Die DMVs dienen zur Konzentration von Metaboliten, Kofaktoren und viralen Enzymen und bieten einen Schutz der viralen RNA vor dem angeborenen Immunsystem der Wirtszelle. Diese DMVs sind das Zentrum der viralen RNA-Synthese (105-108). Molekulare Poren verbinden die DMVs mit dem Zytoplasma. Durch sie gelangt die gRNA nach ihrer Synthese aus den Replikationsorganellen hinaus (85, 109).

Sind die RTCs fertiggestellt, beginnt die virale RNA-Synthese. Wie oben beschrieben, wird die gRNA als Vorlage für die Replikation und Transkription genutzt. Für die Synthese von neuen gRNA-Strängen werden in den RTCs negativsträngige Kopien der gesamten gRNA angefertigt, die im Anschluss wiederum als Vorlage für komplementäre Positivstränge dienen. Diese (+)-gRNA wird entweder translatiert oder in Vorläufer-Virionen gepackt. Für die Herstellung der sg-mRNA, die für die Strukturproteine und akzessorischen Proteine codiert, ist hingegen ein diskontinuierlicher Transkriptionsprozess erforderlich (110). Auch die (-)-sg-RNAs werden anschließend wieder in einen Positivstrang übertragen, welcher dann in die jeweiligen Proteine translatiert werden kann. Die neusynthetisierten viralen RNAs werden mit einer Cap-Struktur versehen, die den Caps der mRNAs eukaryotischer Zellen ähnelt, um sie vor dem angeborenen Immunsystem zu schützen (111). Die Caps werden außerdem von der Translationsmaschinerie der Zelle erkannt und führen so zu einer effizienteren Übertragung in Proteine (85, 112, 113).

Nach Synthese der einzelnen Virusbestandteile (Genom, Strukturproteine, ggf. akzessorische Proteine) kommt es zur Viruszusammensetzung, der sogenannten Morphogenese. Diese läuft größtenteils ohne die Nutzung zellulärer Mechanismen ab und wird deshalb auch als Self-Assembly bezeichnet. Die Membranhülle behüllter Viren stammt dabei von den Membranen der Zelle ab. Abhängig vom spezifischen Virustyp kann z.B. die Zytoplasmamembran, aber auch Membranen des Nukleus, des ER oder des Golgi-Apparats genutzt werden. In die entsprechende Membran lagern sich virale Membranproteine ein. Nach Zusammenlagerung mit dem viralen (Nukleo-)Kapsid kommt es zur Abschnürung der neuen Viruspartikel. Dieser Prozess wird als Knospung oder Budding bezeichnet. Auch der Mechanismus, über den die Virionen aus der Zelle ausgeschleust werden, ist abhängig vom Virustyp. Besitzen behüllte Viren ihre Hülle aus der Zytoplasmamembran, werden sie in der Regel direkt von dieser abgeschnürt. Entstammen die Hüllmembranen anderen Zellorganellen, werden meist Transportvorgänge der Zelle, z.B. des Golgi-Netzwerks, genutzt und die Freisetzung der Virionen geschieht über Exozytose. Bei unbehüllten Viren werden die neuen Viruspartikel meist über Zelllyse oder die Einleitung von Apoptose der Zelle freigesetzt (91).

Für SARS-CoV-2 beginnt die Virusmorphogenese mit dem Austritt der gRNA aus den Poren der DMVs. Im Zytoplasma lagert sie sich mit den aus sg-mRNA synthetisierten

viralen N-Proteinen zu Ribonukleinkomplexen zusammen (85). Anschließend tritt das komplexierte N-Protein in Wechselwirkung mit dem M-Protein, das sich gemeinsam mit dem E- und dem S-Protein in der Membran des ER-Golgi-Zwischenkompartments (ER-to-Golgi intermediate Compartment, ERGIC) befindet (114, 115). Es kommt zur Knospung der neuen Virionen. Anschließend werden die Viruspartikel über den Golgi-Apparat zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert, wo Reifungsprozesse stattfinden. Um die Zelle zu verlassen, nutzt SARS-CoV-2 im Gegensatz zu anderen behüllten Viren statt des sekretorischen Transportweges den lysosomalen Transport und die lysosomale Exozytose (85, 116).

Für genauere Einsichten in das Genom und den Replikationszyklus von SARS-CoV-2 sei an dieser Stelle auf das Review von Steiner et al. (85) verwiesen.

1.5 Vorarbeiten und Zielsetzung

CLN7 ist ein lysosomales Membranprotein, dessen biallelischer Defekt pathologische Ablagerungen von Ceroid-Lipofuszin in den Lysosomen verursacht. Klinisch manifestiert sich dies in einem schweren neurodegenerativen Phänotyp, der als NCL7 oder CLN7-Erkrankung bezeichnet wird. Aufgrund dessen wird NCL7 sowohl den neuronalen Ceroidlipofuszinosen (NCLs) als auch, im weiteren Sinne, den lysosomalen Speichererkrankungen (Lysosomal Storage Diseases, LSDs) zugeordnet.

In der Arbeitsgruppe von Dr. Reichold wurden bereits vielzählige Vorarbeiten geleistet, um die Lokalisation und Funktion des CLN7-Proteins zu evaluieren.

In Lokalisationsanalysen wurde transfiziertes EGFP-CLN7 vor allem in der Plasmamembran und in der Membran von (vergrößerten) Lysosomen nachgewiesen. Es trat in Form von punktförmigen Proteinansammlungen auf, die von ihrer Morphologie her an Lipid Rafts erinnerten. Aus diesem Grund wurde eine Kolokalisationsstudie mit EGFP-CLN7 und dem Gangliosid Monosialotetrahexosylgangliosid (GM1), einem Lipid Raft-Marker, durchgeführt. Diese ergab zwar keine Kolokalisation der beiden Marker. In HEK293T CLN7 ko-Zellen fiel jedoch mikroskopisch und durchflusszytometrisch eine im Vergleich zu Kontroll-wt-Zellen signifikant niedrigere Konzentration von GM1 auf. Auch transient mit EGFP-CLN7 transfizierte HEK293T wt-Zellen zeigten visuell einen stark verringerten GM1-Gehalt.

Zudem fielen in silico mögliche Interaktionen des CLN7-Proteins mit SARS-CoV-2 auf. Hochdurchsatz-Screenings identifizierten die viralen Strukturproteine S und E (117) und die Nicht-Strukturproteine NSP4 (117, 118), NSP6 (117), ORF7A (117), ORF7B (117, 119) und ORF14 (117) als mögliche Interaktionspartner des CLN7/MSFD8-Proteins (120).

Diese Dissertation sollte weiteren Funktionsanalysen des CLN7-Proteins dienen, um dem Ziel, die Funktion des CLN7-Proteins und den Pathomechanismus der CLN7-Erkrankung zu verstehen, näherzukommen. Langfristig soll eine Heilung von NCL7 möglich gemacht werden. Zudem sollten – bedingt durch den Aufbau der durchgeführten Versuche – auch neue Erkenntnisse über den Replikationszyklus des SARS-CoV-2-Virus gewonnen werden. Aufgrund der ständigen Virusevolution sind neue epidemische COVID-19-Wellen beispielsweise mit gesteigerter Übertragbarkeit oder Virulenz möglich. Durch einen Immunescape und Resistenzentwicklung könnten bisher zur Verfügung stehende Medikamente und Impfstoffe unwirksam werden (76, 78). Deshalb sind Erkenntnisse über den SARS-CoV-2-Replikationszyklus für die Neu- und Weiterentwicklung antiviraler Substanzen weiterhin höchst relevant.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Frage, ob eine Defizienz von CLN7 in vitro die Virusreplikation beeinflusst. Dafür wurde analysiert, ob CLN7-defiziente HEK293T-Zellen nach Infektion mit SARS-CoV-2 im Überstand des Zellkulturmediums eine andere Viruslast besitzen als wt-Zellen. Um einordnen zu können, wie stark die Viruslastreduktion bei CLN7-Defizienz ist, wurde zudem ein Vergleich mit dem antiviralen Medikament Remdesivir durchgeführt. Außerdem wurde die intrazelluläre Viruslast untersucht und die Viruspartikel transmissionselektronenmikroskopisch zur Lokalisation und Quantifizierung aufgesucht. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde die Viruslastbestimmung in Vero-Zellen wiederholt.

Teil zwei der Arbeit baute auf den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zum reduzierten GM1-Gehalt von CLN7-defizienten Zellen auf. Da bei CLN7-Defizienz ein verringerter GM1-Gehalt gezeigt worden war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Menge des Gangliosids direkt mit der CLN7-Menge zusammenhängen könnte. Es wurde getestet, ob im HEK293T-Zellmodell durch die Zugabe von CLN7-Protein in Form von verschiedenen Plasmiden eine Steigerung der GM1-Konzentration zu erreichen ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
2k CCD	TRS Tröndle (DE)
BD Accuri™ C6	Becton, Dickinson and Company (US)
CT15RE	VWR International GmbH (DE)
EBA 20	Andreas Hettich GmbH & Co. K (DE)
EM902	Carl Zeiss AG (DE)
FastGene® FAS V – Geldokumentationssystem	Nippon Genetics Europe GmbH (DE)
Inkubationsschrank C170	BINDER GmbH (DE)
LightCycler® 480 Instrument II (96-well)	F. Hoffmann-La Roche AG (CH)
Milli-Q-Anlage (Biocel A10)	Millipore (DE)
MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
NanoDrop2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG (DE)
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG (DE)
Primovert	Carl Zeiss AG (DE)
StepOnePlus™ Real Time-PCR-System	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
T-Personal 48 Thermocycler	Biometra GmbH (DE)
Transferpette® S (1 µl / 10 µl / 100 µl / 1000 µl)	BRAND GMBH + CO KG (DE)
Unipack 250	Biotech SL (ES)
Wasserbad WNE 29	Memmert GmbH + Co. KG (DE)
Xplorer®	Eppendorf (DE)
Z300	HERMLE Labortechnik GmbH (DE)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Rotilab-Spritzenfilter (0.22 µm)	Carl Roth (DE)
6-well Multidish BioLite	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
96-well-Platte	Sarstedt (DE)
Adhäsive Verschlussfolie für Real Time-PCR	Nerbe plus GmbH (DE)
BD Microlance 3 Kanülen (27 G)	BD Biosciences (DE)
Cell scraper (25 cm)	SARSTEDT AG & Co. KG (DE)
Centrifuge tubes PP (15 ml / 50 ml)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (DE)
Einwegspritzen (1ml)	BD Biosciences (DE)
Filter tips (10 µl / 100 µl / 1250 µl)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (DE)
PCR microcentrifuge tubes (0,2 ml / 0,5 / ml)	Nerbe plus GmbH (DE)
PCR-Platte PP (96 x 0,2ml)	Nerbe plus GmbH (DE)
Pipettenspitzen (10 µl / 200 µl / 1000 µl)	SARSTEDT AG & Co. KG (DE)
Reagiergefäß (1,5 ml/ 2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG (DE)
Serologische Pipette PS (10ml / 25ml / 50 ml)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (DE)
Zellkulturflaschen BioLite (25 cm ² / 75 cm ²)	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen

Produkt	Hersteller
1 kb Plus DNA Ladder (0,5 µg/µl)	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
50 bp DNA Ladder (0.5 µg/µl)	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Accutase Cell Detachment Solution (1x)	Capricorn Scientific GmbH (DE)
Agarose, universal (peqGold)	VWR International (US)
Bacteriostatic concentrate solution für BD Accuri™ C6	BD Biosciences (DE)
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (DE)

Cholera Toxin Subunit B (Recombinant), Alexa Fluor™ 647 Conjugate	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Cleaning concentrate solution für BD Accuri™ C6	BD Biosciences (DE)
DMEM	Gibco (MA)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine	Capricorn Scientific GmbH (DE)
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
dNTP Mix 10mM	Promega GmbH (US)
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Salin)	Capricorn Scientific GmbH (DE)
Epoxy-Einbettungsmittel	Sigma-Aldrich (DE)
Epoxy-Einbettungsmittel, Härter DDSA	Sigma-Aldrich (DE)
Epoxy-Einbettungsmittel, Härter MNA	Sigma-Aldrich (DE)
Ethanol (>96 %), vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG (DE)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA (DE)
FCS (Fetales Kälberserum)	Capricorn Scientific GmbH (DE)
Gibco™ 0,5 % Trypsin-EDTA in DPBS (1x)	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Gibco™ Leibovitz's L-15 -Medium, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Glutaraldehyd 25 % in H2O	SERVA Electrophoresis GmbH (DE)
Glycidether-Beschleuniger DMP-30	Carl Roth GmbH & Co. KG (DE)
Lipofectamine™ 3000	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Lipofectamine™ RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
MEM (Minimales essenzielles Medium) mit EarleSalzen und L-Glutamin	Capricorn Scientific GmbH (DE)
MidoriGreen Xtra	Nippon Genetics Europe GmbH (DE)
Minimum Essential Medium (MEM) with Earle salts and L-glutamine	Capricorn Scientific GmbH (DE)
M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase) [H-]	Promega GmbH (US)

MTT	Biomol (DE)
Nuclease-free Water	Promega GmbH (US)
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Osmiumtetroxid 4 % in H ₂ O	Electron Microscopy Science (US)
Paraformaldehyd 3 %	Merck KGaA (DE)
PBS	Capricorn Scientific GmbH (DE)
Penicillin Streptomycin (100x)	Capricorn Scientific GmbH (DE)
Random Primers	Promega GmbH (US)
Remdesivir	Gilead Sciences (US)
RNAse-Inhibitor	Applied Biosystems (DE)
Rnase-Inhibitor (Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor)	Promega GmbH (US)
RT-Puffer (Reverse Transkription Puffer)	Promega GmbH (US)
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA (DE)
Streptomycin/Penicillin	Pan Biotech (DE)
TAE (TRIS-Acetat-EDTA)–Puffer (50x)	AppliChem GmbH (DE)
Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix blue dTTP	Eurogentec (BE)
Taq-Path-Mix	Metabion international (DE)
Uranylacetatdihydrat	Merck KGaA (DE)
β-Glucuronidase	Merck KGaA (DE)

2.1.4 Kits

Produkt	Hersteller
NucleoSpin® RNA Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (DE)
Rneasy Mini Kit	Qiagen (DE)

2.1.5 Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen

Lösung	Inhaltstoffe	Menge
Accutase-Lösung	Accutase Cell Detachment Solution (1x)	10 ml
	DPBS 1x	40 ml

Decontamination Solution für BD Accuri™ C6	Natriumhydrochlorit (10-15 %) Millipore Wasser	21 ml 479 ml
DLR-Puffer (pH 7.4)	Natriumchlorid Tris IGEPAL CA-630 in DEPC H2O	0.1 M 0.01 M 0.5 %
Glutaraldehyd-Lösung (pH 7,4)	Glutaraldehyd Natriumcacodylat	2 % 0,1M
MTT-Detergenz	SDS HCl	10 % 10 mM
Osmiumtetroxid- Lösung	Osmiumtetroxid Natriumcacodylat	1 % 0,1M
PBS (hergestellt durch Universitätsklinikum Regensburg, Institut für klinische Mikrobiologie und Hygiene)	PBS 10x: Natriumchlorid Kaliumchlorid di-Natriumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Aqua VE 1 : 10 verdünnen: Stammlösung PBS Aqua VE	80 g 2 g 14,24 g 2 g 1000 ml 1000 ml 9000 ml
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA (TAE) – Puffer (50x) Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Ad 1 l mit Aqua dest.	10 mM 1 mM
Zellkulturmedium für HEK293T-Zellen	MEM mit Earle-Salzen und L-Glutamin Fetales Kälberserum (FCS) Penicillin Streptomycin (10.000 U/ml)	500 ml 50 ml 5 ml
Zellkulturmedium für Vero-Zellen	DMEM Fetales Kälberserum (FCS) Penicillin Streptomycin (10.000 U/ml)	500 ml 50 ml 5 ml

2.1.6 Zelllinien und Virusstamm

2.1.6.1 Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Gewebe	Bezugsquelle
Human Embryonic Kidney (HEK)-293T-Zellen	Mensch	embryonale Niere / Nebenniere	David Sabatini (David Sabatini Lab)
CLN7 -/- 99-4 Human Embryonic Kidney (HEK)-293T-Zellen	Mensch	embryonale Niere / Nebenniere	Monther Abu-Remaileh (Stanford University, Assistant Professor for Chemical Engineering and Genetics)
CLN7 -/- 94-5 Human Embryonic Kidney (HEK)-293T-Zellen	Mensch	embryonale Niere / Nebenniere	Monther Abu-Remaileh (Stanford University, Assistant Professor for Chemical Engineering and Genetics)
Vero-Zellen	westliche Grünmeerkatze (Chlorocebus sabaeus)	Niere	Max-von-Pettenkofer-Institut München

2.1.6.2 Virusstamm

Virusstamm	GenBank-Nummer	Bezugsquelle
SARS-CoV- 2/human/DEU/REGS- 200701-CA/2020	MZ675816	Institut für klinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg

2.1.7 Plasmide

Plasmid	Funktion	Bezugsquelle
pEGFP-C1-CLN7	Überexpression des Fusionsproteins EGFP- CLN7	Dr. Stephan Storch (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin)
pIRES2-AcGFP1	Überexpression von AcGFP, Insertionsstelle für Expressionsprotein	Clontech Laboratories, Inc. (US)
pIRES AcGFP/CLN7	Überexpression von AcGFP und CLN7	Katharina Tschakert (Intern)

2.1.8 Oligonukleotide**2.1.8.1 siRNA**

siRNA	Target-Gen	Eigenschaften	Bezugsquelle
siMFSD8	CLN7/MFSD8	Pool aus 30 spezifischen siRNAs	siTOOLS Biotech (DE)
siNegativkontrolle	Kein Target-Gen in Mensch, Ratte, Maus	Pool aus 30 nicht- spezifischen siRNAs	siTOOLS Biotech (DE)

2.1.8.2 Primer

Primer	Spezies	Primersequenz
CLN7 sense XM_007999765.2	Chlorocebus sabaeus (Isoform 1)	5' AAAGACGCCTTGTAGGG ACT 3'
CLN7 antisense XM_007999765.2	Chlorocebus sabaeus (Isoform 1)	5' ATGTCCCATTCTCTGCTT CC 3'
GAPDH sense	Cricetulus griseus, Chlorocebus sabaeus, Homo sapiens (Isoform 1)	5' CTGCACCACCAACTGCT TAG 3'
GAPDH antisense	Cricetulus griseus, Chlorocebus sabaeus, Homo sapiens (Isoform 1)	5' TCTTCTGGGTGGCAGTG ATG 3'
GUS-F	Homo sapiens	5'-CGCCGACTTCTCTGACA AC-3'
GUS-R	Homo sapiens	5'-CACACCCAGCCGACAAA ATG-3'
GUS TaqMan- Sonde	Homo sapiens	6-FAM-TGCTCCTCGAAGCC CCGGCG-TAMRA-3'
SARS-CoV-2 E gene E_Sarbeco_F1	SARS-CoV-2	5'-ACAGGTACGTTAATAGT TAATAGCGT-3'
SARS-CoV-2 E gene E_Sarbeco_R2	SARS-CoV-2	5'-ATATTGCAGCAGTACGC ACACA-3'
SARS-CoV-2 E gene E_Sarbeco_P1	SARS-CoV-2	FAM-ACACTAGCCATCCTT ACTGCGCTTCG-BBQ

2.1.9 Software

Name	Hersteller
BD Accuri C6 Software	BD Biosciences (US)
EndNote X7	Clarivate Analytics (UK)
GIMP GNU Image Manipulation Program	The GIMP Team
GraphPad Prism 9	Graphpad Software, Inc. (US)
LightCycler® 480 Software	F. Hoffmann-La Roche AG (CH)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Bei Human Embryonic Kidney (HEK-)293-Zellen handelt es sich um eine der wichtigsten Zelllinien in der zellbiologischen und biotechnologischen Forschung (121). Sie wurde aus weiblichem menschlichen Abortmaterial durch Transformation mit Fragmenten des Adenovirus 5 geschaffen (122). Lange Zeit ging man davon aus, dass es sich bei HEK-Zellen um primäre embryonale Nierenzellen handelt. Inzwischen häufen sich aber die Hinweise, dass die Zelllinie der embryonalen Nebennierenanlage entstammen könnte (121). Durch das Einfügen des Simian Vacuolating Virus 40 (SV40) T-Antigens wurde die HEK293T-Zelllinie geschaffen (123). Diese Modifikation ermöglicht die episomale Replikation von transfizierten Plasmiden, die den SV40 Origin of Replication enthalten und bewirkte damit eine Steigerung des Expressionslevels bei transienter Transfektion. Hierdurch ist diese Zelllinie besonders für die Produktion von rekombinanten Proteinen und Retroviren geeignet (124, 125). HEK293T-Zellen sind leicht zu transfizieren und zeigen ein hohes Expressionslevel von externen Vektoren (121). Zudem sind sie mit SARS-CoV-2 infizierbar, zeigen gute Virusreplikationsraten und sind leicht zu kultivieren (97, 126, 127).

Zur Untersuchung von CLN7 wurden eine HEK293T Wildtyp(wt)-Zelllinie und zwei HEK293T CLN7^{-/-}-Sublinien benutzt. CLN7^{-/-} bedeutet, dass eine Deletion in beiden Allelen des CLN7-Gens vorliegt. Dies führt zu einem vollständigen Verlust der Funktion des CLN7-Proteins. Da es sich bei der CLN7-Erkrankung um eine autosomal-rezessive Erkrankung handelt, müssen beide Allele des CLN7-Gens defizient sein, um als Krankheitsmodell dienen zu können. Die CLN7^{-/-}-Sublinien wurden von Monther Abu-Remaih (Stanford University, Assistant Professor for Chemical Engineering and Genetics) durch die CRISPR/Cas9-Methode erzeugt und zur Verfügung gestellt. Dabei wurde das pLentiCRISPRv1-System und unterschiedliche guide-RNAs verwendet. Die CLN7^{-/-}-Sublinien werden folgend als Knockout (ko) 94-5 und 99-4 bezeichnet. In der Sequenzierung zeigte die Sublinie 94-5 eine Deletion von vier Basen in Exon 11, die eine Frameshift-Mutation und ein vorzeitiges Stop-Codon an Aminosäure-Position 423 verursacht. In einer quantitativen reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR, vgl. 2.2.2.1) wiesen CLN7-ko 94-5-Zellen im Vergleich zur wt-Sublinie noch 30 % CLN7-Messenger-RNA (CLN7-mRNA) auf.

Jedoch ist unklar, ob aus dieser mRNA funktionales Protein gebildet wird. Sublinie 99-4 hingegen zeigte in der Sequenzierung eine Deletion von sechs Basen am Übergang von Exon 2 zum folgenden Intron. Diese Deletion verursacht vermutlich ebenfalls eine Frameshift-Mutation und ein Stopcodon. In der qRT-PCR war in Sublinie 99-4 keine CLN7-mRNA detektierbar (127).

Die Kultivierung der adhärenenten HEK293T-Sublinien erfolgte in 25 cm² Zellkulturflaschen in MEM-Medium, das mit 10 % fetalem Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) versetzt wurde. Die Anzucht fand im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Drei Mal wöchentlich wurde das Zellkulturmedium ersetzt. Bei 80–100 % Konfluenz wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA unter fünfminütiger Inkubation im Brutschrank abgelöst, 3 min bei 1000 revolutions per minute (rpm) zentrifugiert und anschließend passagiert.

2.2.1.2 Kultivierung von Vero-Zellen

Vero-Zellen sind eine permanente Zelllinie mit adhärentem Wachstum. Sie stammen von Nierenzellen einer weiblichen westlichen Grünmeerkatze (*Chlorocebus sabaeus*), einer Affenart, ab (128, 129). Ihre Immortalisierung kam vermutlich durch eine Deletion von Zellzyklus-steuernden Genen auf Chromosom 12 zustande (130). Wie die HEK-Zelllinie, ist auch die Vero-Zelllinie weltweit eine der am meisten verbreiteten Zelllinien in der Forschung. Sie kann keine Interferone exprimieren und ist vermutlich unter anderem deswegen durch eine große Anzahl von verschiedenen Viren – darunter auch SARS-CoV-2 – infizierbar (131, 132). Aus diesem Grund werden Vero-Zellen häufig in der Virologie und der Impfstoffproduktion eingesetzt (125, 133). Es gibt eine große Anzahl an Sublinien, wie Vero E6, Vero/hSLAM oder Vero 81, die genetisch modifiziert und dadurch noch besser für die Forschung an spezifischen Viren geeignet sind (125). Diese Sublinien unterscheiden sich geno- sowie phänotypisch deutlich voneinander (130). Vero-Zellen zeigen eine hohe Expression von ACE2-Rezeptoren, aber kaum von TMPRSS2 (134). Durch die konstitutive Expression von TMPRSS2 kann die Infizierbarkeit von Vero-Zellen mit SARS-CoV-2 stark gesteigert werden (135). Vero-Zellen haben sich in vielen Aspekten der Erforschung von SARS-CoV-2 bewährt (126). Die Vero-Zellen wurden vom Max-von-Pettenkofer-Institut München zur Verfügung gestellt. Ihre Anzucht erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen mit DMEM-Medium, welchem 10 % FCS und 1 % P/S zugesetzt wurden. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zwei Mal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel.

Die Passagierung erfolgte bei 80–100 % Konfluenz. Hierfür wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin-EDTA unter zehnminütiger Inkubation im Brutschrank abgelöst und 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgten Resuspension und erneute Aussaat.

2.2.1.3 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit verschiedenen Plasmiden

Transiente Transfektion ist das zeitweise Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eine Zelle. In der Regel wird die eingebrachte Nukleinsäure im Anschluss nach wenigen Tagen abgebaut (136). Es existieren verschiedene Arten der transienten Transfektion. Darunter fallen chemische Transfektionsmethoden, wie die Polyethylenimin (PEI)-vermittelte Transfektion, physikalische Transfektionsmethoden, zu denen die Elektroporation zählt, und die biologischen Transfektionsmethoden, allen voran die Lipofektion (137).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lipofektion angewendet. Bei dieser bindet die zu transfizierende DNA oder RNA an die Oberfläche kationischer Liposomen und bildet mit diesen Komplexe. Diese Liposomen-Nukleinsäure-Komplexe interagieren mit der negativ geladenen Zellmembran und werden auf bisher ungeklärte Weise in die Zelle aufgenommen. Am wahrscheinlichsten erscheint derzeit eine Aufnahme über den Mechanismus der adsorptiven Endozytose. Die im Transfektionsreagenz enthaltenen Lipide destabilisieren im Anschluss vermutlich die Endosomenmembran, sodass die Nukleinsäure ins Zytoplasma freigesetzt wird. Wie sie von dort in den Zellkern gelangt, um in mRNA transkribiert zu werden, ist nicht genau geklärt. Eine Theorie ist, dass die Aufnahme in den Kern während der Mitose geschieht, in welcher sich die Kernmembran auflöst. Dies wird von der Beobachtung unterstützt, dass die Lipofektion nur bei teilungsfähigen Zellen anwendbar und ihre Effizienz von der Teilungsrate der Zellen abhängig ist. Es wird jedoch vermutet, dass sich der genaue Mechanismus je nach verwendetem Transfektionsreagenz unterscheidet. Im Anschluss an die Transkription im Zellkern kann die eingebrachte Nukleinsäure in das gewünschte Protein translatiert werden (137, 138).

HEK293T-Zellen wurden mit verschiedenen DNA-Plasmiden transfiziert. Bei Plasmiden handelt es sich um extrachromosomale, selbstreplizierende DNA-Moleküle, die innerhalb einer Zelle unabhängig von den Chromosomen vermehrt werden können. Sie sind meist zirkulär und doppelsträngig und können als Vektoren für die Expression beliebiger DNA-Fragmente eingesetzt werden. Dadurch ist es möglich, dass Zellen fremde Proteine exprimieren (139).

Bei den transfizierten Plasmiden handelte es sich zum einen um das pEGFP-C1-CLN7-Plasmid (im Folgenden als EGFP-CLN7-Plasmid bezeichnet), das von Dr. Stephan Storch (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin) zur Verfügung gestellt wurde. Es führt zur N-terminalen Kopplung des Markerproteins EGFP an CLN7 und zur Synthese eines EGFP-CLN7-Fusionsproteins, welches fluoresziert ($\lambda_{\text{Ex}} = 484 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 510 \text{ nm}$). Dadurch werden erfolgreich transfizierte Zellen markiert und die intrazelluläre Lokalisation des Proteins kann visualisiert werden. Es ist jedoch möglich, dass das fusionierte CLN7-Protein durch die Kopplung andere Eigenschaften als das Wildtyp-CLN7-Protein hat. In der Literatur finden sich zwar Hinweise, dass die Fusionierung weder Faltung noch Lokalisation des CLN7-Proteins beeinflusst (31), dennoch sollte eine veränderte Funktion überprüft werden. Deshalb wurde zusätzlich ein pIRES2-AcGFP1/CLN7-Plasmid (im Folgenden als AcGFP/CLN7-Plasmid bezeichnet) verwendet. Durch die enthaltene Internal Ribosome Entry Site (IRES)-Kassette werden AcGFP und CLN7 als voneinander unabhängige Proteine exprimiert. Der Marker AcGFP ($\lambda_{\text{Ex}} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 505 \text{ nm}$) markiert das gesamte Zytosol mittels Fluoreszenz. Als weitere Kontrollgruppe wurde zudem das pIRES2-AcGFP1-Plasmid (im folgenden AcGFP-Leerplasmid genannt) verwendet. Dieses Plasmid exprimiert nur den Marker AcGFP, sodass unspezifische Effekte durch die Plasmidtransfektion und das Markerprotein selbst identifiziert werden können. Das AcGFP/CLN7-Plasmid ist von Katharina Tschakert (Universität Regensburg, AG Reichold) durch Klonieren von CLN7 in das AcGFP-Leerplasmid erstellt worden. Dabei ist eine geringe Transfektionseffizienz des Konstrukts aufgefallen. Aus diesem Grund wurden für die Transfektionen der beiden AcGFP-Plasmide höhere Konzentrationen als für das EGFP-CLN7-Plasmid gewählt.

Für die Versuchsdurchführung wurden 500.000 Zellen der ko-Sublinie 99-4 in 6-Well-Platten ausgesät. Da die wt-Sublinie ein deutlich langsames Wachstum als die ko-Sublinie zeigte, wurden von ersterer $1,3 \times 10^6$ Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen verwendet, um vergleichbare Zellzahlen zu erlangen. Beide Sublinien wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Zellen hatten direkt vor der Transfektion eine Konfluenz von 70–90 %.

Für die Transfektion wurde das Lipofectamine™ 3000-Reagenz von Thermo Fischer Scientific Inc. genutzt. Es wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen. Dazu wurden am Tag nach der Zellaussaat $3,75 \mu\text{l}$ Lipofectamine™ 3000 Reagenz in $125 \mu\text{l}$ Opti-MEM™ verdünnt. In einem zweiten Ansatz wurde das jeweilige Plasmid in $125 \mu\text{l}$

Opti-MEM™ gelöst und anschließend 10 µl P3000™ Reagenz hinzugefügt. Im Anschluss wurde der zweite Ansatz mit dem ersten Ansatz vermischt und 10–15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Mock-Kontrolle wurde ein Ansatz scheintransfiziert, also auf die gleiche Weise, aber ohne entsprechendes Plasmid, hergestellt.

Nach einem Mediumwechsel wurden 250 µl des entsprechenden DNA-Lipid-Komplexes in jedes zu transfizierende Well auf die Zellen gegeben. Die Mock-Kontrollgruppen wurden mit dem Ansatz ohne Plasmid behandelt. Die Konzentrationen der verschiedenen Plasmide lassen sich der untenstehenden Tabelle 3 entnehmen. Bei den unbehandelten Kontrollgruppen wurde nur das Zellkulturmedium gewechselt. Im Anschluss wurden die Zellen für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Für die Transfektion der wt-Zellen in den Zellkulturflaschen wurde jeweils die 2,6-fache Menge benutzt, da die Reaktionsgefäße die 2,6-fache Fläche der Wells besaßen. Bei gleichzeitiger Transfektion mehrerer Zellkulturgefäße wurde ein Mastermix hergestellt.

Plasmid	Endkonzentration [µg/ml]
pIRES2-AcGFP1-Leervektor	1
pIRES-AcGFP/CLN7	1
pEGFP-C1-CLN7	0,5

Tabelle 3. Transfizierte Plasmide und ihre Endkonzentrationen.

2.2.1.4 Färbung von GM1 in HEK293T-Zellen

Das Gangliosid Monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) kann durch die B-Untereinheit von Cholera toxin (CTxB), welche spezifisch an das Gangliosid bindet, nachgewiesen werden (140). Zur Quantifizierung von GM1 wurde mit dem Farbstoff Alexa Fluor 647 (AF647) gekoppeltes, rekombinantes Cholera toxin Subunit B von Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet.

Es wurde eine Cholera toxin-Arbeitslösung mit Leibovitz's L-15-Medium ohne Phenolrot in der Konzentration 5 µg/ml hergestellt. Die zu färbenden Zellen waren – wie oben unter 2.2.1.3 beschrieben – vier Tage zuvor in 6-Well-Platten bzw. 25 cm²-Flaschen ausgesät und gegebenenfalls zwei Tage zuvor mit verschiedenen Plasmiden transfiziert worden. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurde 1 ml CTxB-Arbeitslösung auf die zu färbenden Wells gegeben und 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml eiskaltem Leibowitz's-Medium gewaschen. Nach Ablösen mit 1 ml Accutase wurden die Zellsuspensionen in

Eppendorf-Cups überführt und bei 4 °C für 3 min bei 20.000 rpm zentrifugiert. Für die Transfektion der wt-Zellen in den Zellkulturflaschen wurde jeweils die 2,6-fache Menge benutzt, da die Reaktionsgefäße die 2,6-fache Fläche der Wells besaßen. Je nach Pelletgröße wurden die Zellen in 400–800 µl kaltem Leibowitz's-Medium resuspendiert und bis zur Messung im Dunkeln und auf Eis gelagert. Die Färbelösung wurde abgenommen und bei -80 °C bis zur nächsten Färbung aufbewahrt.

2.2.1.5 Downregulation von CLN7 durch siRNA in Vero-Zellen

Um die Auswirkungen einer CLN7-Defizienz in Vero-Zellen zu untersuchen, wurde ein Gen-Knockdown erzeugt. Bei einem Knockdown ist das Zielgen nicht komplett ausgeschaltet, sondern wird z.B. durch den Einsatz von small interfering RNA (siRNA) transient herunterreguliert.

Durch das Einwirken von kleinen RNA-Abschnitten kann unter bestimmten Voraussetzungen die endogene Genexpression beeinflusst werden. Dieser Prozess wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet (141). Sie ist eine Form des Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS). Die RNAi kann genutzt werden, um Gene gezielt zu unterdrücken. Hierfür wird siRNA in die Zellen geschleust. Bei siRNA handelt es sich um kurze RNA-Sequenzen von etwa 22 Nukleotiden Länge (142), die doppelsträngig vorliegen (141). Sie müssen homolog zum auszuschaltenden Gen sein. In der Zelle wird der siRNA-Doppelstrang in den RNA-induced Silencing Complex (RISC) integriert. Der RISC ist ein Proteinkomplex mit Endonukleaseaktivität. Im RISC wird die doppelsträngige siRNA entwunden und der passenger (sense)-Strang entfernt. Der guide (antisense)-Strang findet die Ziel-Messenger-RNA (mRNA) des auszuschaltenden Gens durch komplementäre Basenpaarung. Anschließend wird die Ziel-mRNA durch die Endonuklease des RISC zerschnitten, wodurch sie nicht mehr translatiert werden kann und die Synthese des Proteins zum Erliegen kommt (143-145).

Für den Knockdown von CLN7 wurde ein zu diesem Zweck designter siRNA-Pool (siPool) der Firma siTools Biotech GmbH verwendet. Dieser siPool besteht aus etwa 30 auf das Zielgen optimierten siRNAs. Durch das geringe Vorkommen der einzelnen siRNAs werden Off-Target-Effekte verringert, während die Wirkung auf das Zielgen hoch ist (146). Diese Off-Target-Effekte treten im Rahmen von RNA-Interferenz auf, wenn nicht (nur) die gewünschten Target-mRNAs abgebaut, sondern auch die Translation anderer, teilweise komplementärer mRNAs beeinflusst wird (147). Es

wurde ein siPool gegen humanes CLN7 („siCLN7“) und eine Standard-Negativkontrolle („siNegativkontrolle“), welche nicht mit dem Genom von Mensch, Maus oder Ratte interagiert, verwendet. Als weitere Kontrollgruppe dienten unbehandelte Vero-Zellen („Kontrolle“), die analog zu den anderen beiden Versuchsgruppen gesplittet und neu ausgesät, aber nicht transfiziert wurden.

Für eine hohe Knockdowneffizienz wurden die Vero-Zellen insgesamt vier Mal (Tag 1, 3, 5, 8) in reverser Transfektion mit siRNA transfiziert. Bei der reversen Transfektion wird die Transfektion mit dem Aussäen der Zellen kombiniert. Durch die wiederholte Transfektion der Zellen mit siRNA sollte ein effizienter CLN7-Knockdown erzeugt werden. Die ersten drei Transfektionen fanden dabei in 6-Well-Platten statt. Pro Versuchsgruppe langen hierbei Triplikate vor. Bei der letzten Transfektion wurden die Zellen aufgeteilt. Zur Auswertung der Knockdowneffizienz wurden ebenfalls Triplikate auf 6-Well-Platten verwendet. Die Zellen, die für die Infektionsversuche mit SARS-CoV-2 bestimmt waren, wurden in je 24 Wells einer 96-Well-Platte ausgesät. Tabelle 4 zeigt die eingesetzten Zellzahlen bei den jeweiligen Transfektionen. Es wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ RNAiMAX von Thermo Fischer Scientific Inc. gemäß der Herstellerangaben benutzt. Pro zu transfizierendem Well wurde der CLN7-siPool bzw. der Negativkontroll-siPool in einer Konzentration von 50 nM in Opti-MEM aufgelöst. Weil die CLN7-siRNA und die Negativkontroll-siRNA in unterschiedlichen Verdünnungen vorlagen, waren dafür unterschiedlich Mengen notwendig. Nach Zugabe von RNAiMAX wurde das Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Vero-Zellen in Zellkulturmedium verdünnt. Tabelle 5 zeigt die verwendeten Mengen pro Well. Die Zellsuspensionen wurden in den Wells auf das Transfektionsgemisch gegeben und zwei bis drei Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde an Tag 10 eine quantitative reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) zur Überprüfung der Effizienz des CLN7-Knockdowns (vgl. 2.2.2.1) bzw. eine Infektion mit SARS-CoV-2 (vgl. 2.2.3.2) durchgeführt.

Transfektion	Tag	Zellzahl/6-Well	Zellzahl/96-Well
1	1	800.000	
2	3	1.000.000	
3	5	600.000	
4	8	800.000	20.000

Tabelle 4. Verwendete Zellzahlen pro Transfektion.

	Menge/6-Well [μ l]	Menge/96-Well [μ l]
Opti-MEM	500	20
siRNA CLN7	5	0,008
siRNA Negativkontrolle	17,5	0,03
RNAiMAX	7,5	0,3
Zellkulturmedium siRNA-Gruppen	750	80
Zellkulturmedium Kontrolle	1280	100

Tabelle 5. Mengen der Reagenzien für die reverse Transfektion.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Quantitative reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion

In einer quantitativen reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) kann eine beliebige RNA durch reverse Transkription in DNA umgeschrieben und im Anschluss in einer Real Time quantitativen PCR (rtq-PCR) in Echtzeit quantifiziert werden (148). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode unter anderem angewendet, um die Effektivität des CLN7-Knockdowns durch siRNA (vgl. 2.2.1.5) zu überprüfen. Auch für die Bestimmung der Viruslast nach Infektion mit SARS-CoV-2 wurde eine qRT-PCR in etwas abgewandelter Form im Labor von Profⁱⁿ Drⁱⁿ Barbara Schmidt (Universitätsklinikum Regensburg, Institut für Mikrobiologie und Hygiene) durchgeführt (vgl. 2.2.3.4).

Für die Quantifizierung des CLN7-Knockdowns wurden die Zellen im ersten Schritt lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Die Gesamt-RNA enthält neben mRNA auch ribosomale RNA (rRNA) und Transfer-RNA (tRNA). Anschließend wurde die RNA durch reverse Transkription in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben. Zuletzt erfolgte die Real Time quantitative PCR (rtq-PCR), bei der die cDNA des Zielgens spezifisch amplifiziert und quantifiziert wurde. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe des interkalierenden Farbstoffes SYBR Green I und einer Normalisierung auf das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Bei Housekeeping-Genen wird davon ausgegangen, dass sie in den Zellen unabhängig von den experimentellen Bedingungen immer in gleicher Menge exprimiert werden. Sie können als endogene Referenzen verwendet werden, um die cDNA-Menge

unabhängig von der eingesetzten Zellzahl zu machen. Die Housekeeping-Gene werden aus der gleichen Probe wie die Ziel-DNA amplifiziert und ihre Menge in Bezug zur zu untersuchenden Sequenz gesetzt (148, 149).

2.2.2.1.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Im ersten Schritt wurde die Gesamt-RNA aus den Vero-Zellen gewonnen. Hierfür wurde das NucleoSpin® RNA Kit der Macherey-Nagel GmbH & Co. KG verwendet, das die Silica-Membrantechnologie nutzt. Es wurde nach Herstellerprotokoll mit leichten Modifikationen gearbeitet.

Die Zellen wurden an Tag 10 des Versuches, zwei Tage nach der letzten Transfektion, untersucht. Es wurde an einem sauberen Arbeitsplatz und mit RNA-Pipetten sowie Filter-Pipettenspitzen gearbeitet, um den Abbau der RNA durch ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (RNasen) zu verhindern. Die Ausführung aller Arbeiten erfolgte auf Eis. Bei mehreren Proben wurde zunächst ein Mastermix hergestellt.

Zu Beginn wurden die Zellen einmalig mit 1 ml warmen PBS gewaschen. Anschließend wurde auf jedes Well ein Gemisch aus 350 µl Lysis-Puffer RA1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol pipettiert. Nachdem die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst waren, wurde das Lysat mit einer Spritze in ein Eppendorfcup überführt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 27 G Kanüle wurden die Zellen homogenisiert. Dabei musste eine Schaumbildung der Flüssigkeit verhindert werden. Anschließend wurde das Lysat durch den NucleoSpin®-Filter durch Zentrifugation bei 11.000 g für 1 min filtriert. Der Filter wurde im nächsten Schritt verworfen und dem filtrierten Lysat wurden 350 µl Ethanol (70 %) zugefügt. Nach Mischen durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat in die NucleoSpin® RNA-Säule geladen und 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues Eppendorfcup gesetzt. 350 µl Membrane-Desalting-Puffer wurden hinzugefügt und die Membran für 1 min bei 11.000 g getrocknet. In einem weiteren Eppendorfcup wurde durch Mischen von 10 µl rDNase mit 90 µl Reaktionspuffer für rDNase die DNase-Reaktionsmischung hergestellt. 95 µl dieser Mischung wurden mittig auf die Säule aus dem vorherigen Arbeitsschritt appliziert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgten drei Waschschrte. Im ersten Schritt wurden der Säule 200 µl RAW2-Puffer hinzugefügt und für 30 s zentrifugiert. Nach Platzierung der Säule in einem neuen Eppendorfcup wurde mit 600 µl RA3-Puffer gewaschen und erneut 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Dieses Mal wurde der

Durchfluss verworfen und die Säule im gleichen Eppendorfcup platziert. Der letzte Waschschrift erfolgte mit 250 µl des RA3-Puffers und Zentrifugation bei 11.000 g für 2 min. Anschließend wurde die Säule in ein neues Eppendorfcup gesetzt. Um die RNA aus der Säule zu eluieren, wurde sie mit 40 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Die Lagerung der RNA bis zur Weiterverarbeitung erfolgte umgehend bei -80 °C.

2.2.2.1.2 Reverse Transkription

War die isolierte RNA in der Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.6) intakt, wurde aus ihr im zweiten Schritt mittels reverser Transkription cDNA synthetisiert. Hierfür mussten aufgrund der Instabilität der RNA alle Arbeiten auf Eis ausgeführt werden. Mithilfe des NanoDrop2000 Spektralphotometer von Thermo Fisher Scientific Inc. wurden die Massenkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt. Daraus ergab sich, wie viel Volumen der Ausgangslösung für 1 µg RNA benötigt wurde und die errechnete Menge wurde in ein 0,2 ml Eppendorfcup pipettiert. Anschließend wurde 1 µl Random Primers von Promega GmbH hinzugefügt und die Flüssigkeit mit PCR-Wasser auf ein Volumen von 14 µl aufgefüllt. Während der fünfminütigen Inkubation im Thermocycler bei 70 °C, um die Sekundärstruktur des Templates aufzuschmelzen, wurde ein Mastermix angefertigt: Pro Probe wurden 5 µl Reverse Transkriptase-Puffer (Promega GmbH), 1,25 µl Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTP-Mix) und 1 µl RNase-Inhibitor in einem Eppendorfcup gemischt und mit PCR-Wasser auf ein Volumen von 11 µl pro Probe aufgefüllt. Anschließend wurden 11 µl des Mastermix auf jede Probe gegeben. Zudem wurde eine Negativkontrolle in Form eines (-)-RT-Ansatzes angelegt. Diese diente zum Nachweis möglicher DNA-Verunreinigungen in der Probe, da ihr keine Reverse Transkriptase hinzugefügt wurde und somit auch keine cDNA synthetisiert werden konnte. Würde es in der anschließenden PCR dennoch zu Signalen kommen, würde es sich folglich um Kontamination der Ausgangsprobe handeln. Für den (-)-RT-Ansatz wurden jeweils 5 µl entnommen. Auf den verbleibenden Reaktionsansatz, in Folge (+)-RT-Ansatz genannt, wurde 1 µl Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLVRT, Promega GmbH) pipettiert. Anschließend wurde die cDNA-Synthese im Thermocycler durchgeführt. Diese bestand aus 10 min Aktivierung bei 20 °C, anschließend 50 min Synthese bei 50 °C und einer abschließenden Inaktivierung für 15 min bei 70 °C.

2.2.2.1.3 Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Anschließend wurde zur Quantifizierung des Zielgens eine Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (rtq-PCR) durchgeführt. In dieser wird das Zielgen durch den Einsatz spezifischer Primerpaare und DNA-Polymerase spezifisch amplifiziert. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet an doppelsträngige DNA. Dadurch steigt die Fluoreszenz proportional zur Menge des DNA-Produkts und kann am Ende jedes Zyklus in Echtzeit quantifiziert werden. Aus der Anzahl der Zyklen, die notwendig sind, bis die Fluoreszenz einer Probe einen spezifischen Schwellenwert übersteigt (Cycle Threshold, c_t -Wert), lässt sich auf die Ausgangsmenge der DNA rückschließen. Als interne Referenz wurde das Housekeeping-Gen GAPDH verwendet, um die Expression des Zielgens durch Vergleich der c_t -Werte zu normalisieren. Die Normalisierung ist notwendig, um technische Variationen und Störfaktoren wie beispielsweise variierende Zellzahlen zwischen den Proben und den PCR-Läufen auszugleichen. Diese Variationen können durch Unterschiede in der Menge und Qualität der RNA, Effizienz der reversen Transkription und PCR-Amplifikation sowie durch Pipettierfehler entstehen (150).

Alle Vorarbeiten wurden auf Eis ausgeführt. Als erstes wurde ein Standard zur Erstellung einer Standardkurve für die Auswertung hergestellt. Für den Standard wurden aus jeder (+)-RT-cDNA-Probe 2 μ l entnommen und miteinander gemischt. Anschließend wurde mit PCR-Wasser eine Verdünnungsreihe hergestellt (vgl. Tabelle 6).

Verdünnungsfaktor	Menge (Ausgangslösung) [μ l]	PCR-H ₂ O [μ l]
1:1	1 (unverdünnter Standard)	0
1:5	2 (unverdünnter Standard)	8
1:25	2 (1:5 verdünnter Standard)	8
1:50	1 (1:5 verdünnter Standard)	9
1:125	2 (1:25 verdünnter Standard)	8

Tabelle 6. Verdünnungsreihe der rtq-PCR.

Im nächsten Schritt wurden alle Ansätze ((+)-RT-Proben, (-)-RT-Proben und die Standardverdünnungsreihe) für das Ziel- und das Housekeeping-Gen in eine 96-Well PCR-Platte pipettiert und die PCR-Reagenzien nach untenstehendem Schema (vgl. Tabelle 7) hinzugegeben. Es wurde das Takyon™ No Rox SYBR® 2X MasterMix blue dTTP (Takyon Sybr-Green Mix) der Firma Eurogentec verwendet, welches die Takyon™ DNA-Polymerase, MgCl₂, dNTPs, den Farbstoff SYBR Green I und Stabilisatoren enthält. Bei den Primern handelte es sich um spezifische Primer für CLN7 und GAPDH.

Lösung	Menge [µl]
cDNA-Template	1
Takyon Sybr-Green Mix	5
Sense-Primer	0,25
Antisense-Primer	0,25
PCR-H ₂ O	3,5

Tabelle 7. Reagenzien für quantitativen Real Time Polymerase-Kettenreaktion.

Die PCR-Platte wurde für 2 min bei 2500 rpm zentrifugiert und anschließend die rtq-PCR im LightCycler® 480 Instrument II (96-Well) der Firma F. Hoffmann-La Roche AG durchgeführt. Hierbei wurden die Proben zu Beginn 3 min bei 95 °C aktiviert. Anschließend wurden 40 PCR-Zyklen nach dem in Tabelle 8 genannten Schema durchlaufen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Ende der Elongation jedes Zyklus.

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturierung	95	15
Annealing	57	20
Elongation	72	20

Tabelle 8. Zyklus der quantitativen Real Time Polymerase-Kettenreaktion.

2.2.2.1.4 Auswertung mittels relativer Quantifizierung

Die Auswertung der rtq-PCR erfolgte mittels relativer Quantifizierung durch die Normalisierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH als Referenzgen. Da die Effizienz E der PCR selten den idealen Wert von 2 erreicht, muss die tatsächliche Effizienz der Reaktion anhand der Verdünnungsreihe berechnet werden.

Aus den c_t -Werten der Verdünnungsreihe und dem dekadischen Logarithmus der Konzentrationen wird eine Regressionsgerade erstellt und deren Steigung m ermittelt. Mithilfe folgender Formel lässt sich anschließend die Effizienz berechnen:

$$E = 10^{(-1/m)}$$

Im Anschluss konnte die auf das Referenzgen normalisierte relative Expression bestimmt werden, indem die c_t -Werte von Referenz- und Zielgen und die errechneten Effizienzwerte in folgende Formel eingesetzt wurden:

$$\text{Normalisierte relative Expression} = \frac{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_{t\text{Referenzgen}}}}{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{t\text{Zielgen}}}}$$

Die relativen Expressionen eines rtq-PCR-Durchgangs wurden im Anschluss miteinander verglichen und graphisch dargestellt. Der Vergleich mit den Ergebnissen anderer rtq-PCR-Läufe ist nur eingeschränkt möglich, denn die Variabilität der c_t -Werte zwischen den Läufen ist beispielsweise aufgrund unterschiedlicher Effizienzen der rtq-PCR, Unterschiede in der cDNA-Qualität und -Menge und technischen Schwankungen erheblich.

2.2.2.1.5 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse dient der Kontrolle der rtq-PCR. Sie wurde am Ende der PCR automatisiert durchgeführt. Während der langsamen Erwärmung der Probe von 56°C auf 95 °C erfolgte eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung. Hierbei wurde die zunächst doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Der Farbstoff SYBR Green I interkaliert nur in doppelsträngige DNA, somit kommt es zu einer Änderung der Fluoreszenz. Diese Fluoreszenzänderung erzeugt bei graphischer Auftragung gegen die Temperatur einen charakteristischen Peak, der von der Länge des PCR-Produktes abhängig ist. Ist nur ein Peak vorhanden, ist eine Verunreinigung der Probe unwahrscheinlich.

2.2.2.1.6 Qualitätsbeurteilung der RNA/DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zuletzt wurde die Qualität der RNA- und DNA-Produkte überprüft. Dies geschah über analytische Gelelektrophoresen auf einem Agarosegel. Die Agarose bildet nach Aufkochen in einem Elektrophoresepuffer eine Siebstruktur mit kleinen Poren aus. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes bringt man die Nukleinsäurefragmente dazu, durch dieses Agarosenetz in Richtung Kathode zu wandern. Dies beruht auf der negativen Ladung der DNA- und RNA-Fragmente. Weil kleine Nukleinsäurefragmente

schneller als große durch die Poren des Agarosegels wandern, werden die Nukleinsäuren der Größe nach aufgetrennt. Durch Färbung mit einem spezifischen Farbstoff können die Fragmente in Form von Banden sichtbar gemacht werden. Anhand eines Größenstandards mit Banden bekannter Größe kann die Fragmentgröße abgeschätzt werden.

Sowohl die Gesamt-RNA aus der Isolierung (vgl. 2.2.2.1.1) als auch das amplifizierte DNA-Produkt aus der rtq-PCR (vgl. 2.2.2.1.3) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und überprüft. Zunächst wurden Gele mit 1 % bzw. 3 % Agarose gegossen. Weil doppelsträngige DNA in die sogenannte supercoiled-Form übergeht und dadurch schneller durch das Gel wandern kann, musste für das DNA-Gel ein größerer Anteil an Agarose benutzt werden, was die Porengröße verkleinert. Es wurden 1,5 g Agarose für das 3 %-DNA-Gel bzw. 0,5 g für das 1 %-RNA-Gel in 50 ml TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) aufgekocht. Anschließend wurden 3 µl des DNA/RNA-Farbstoffes MidoriGreen Xtra hinzugegeben. Die Flüssigkeit wurde in einen Gelträger gegossen und polymerisierte innerhalb von 20 min.

Für den Gelelektrophorese-Lauf wurde je 1 µl der DNA- bzw. RNA-Proben mit 2 µl DNA Loading Dye (6x) von Thermo Fisher Scientific Inc. in die Geltaschen transferiert. Außerdem wurden 6 µl des entsprechenden Größenstandards als Marker verwendet. Für das RNA-Gel wurde die 1 kb Plus DNA Ladder (0,5 µg/µl) und für das DNA-Gel die 50 bp DNA Ladder (0,5 µg/µl), beide von Thermo Fisher Scientific Inc. (US) verwendet. Anschließend wurde über 20 min eine Spannung von 100 V appliziert. Die Auswertung erfolgte mithilfe des FastGene® FAS V-Geldokumentationssystems von Nippon Genetics Europe GmbH. Bei intakter RNA konnte eine 18S- und eine 28S-Bande identifiziert werden. Diese Banden repräsentieren die Untereinheiten der ribosomalen RNA (rRNA). Die 18S rRNA ist Teil der kleinen ribosomalen Untereinheit (40S), während die 28S rRNA Teil der großen ribosomalen Untereinheit (60S) ist. Da die 28S rRNA eine höhere Molekülmasse besitzt und in größerer Menge vorhanden ist, stellt sich die 28S-Bande in etwa doppelt so intensiv wie die 18S-Bande dar. Bei der Qualitätskontrolle der DNA konnten Verunreinigungen der Probe als unwahrscheinlich angesehen werden, wenn nur eine Bande charakteristischer Länge vorlag.

2.2.3 Virologische Methoden

Sämtliche folgende virologische Methoden und Arbeiten mit SARS-CoV-2 wurden von Profⁱⁿ Drⁱⁿ Barbara Schmidt am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg in einem Labor der erforderlichen Schutzstufe 3 durchgeführt.

2.2.3.1 Herstellung und Quantifizierung der SARS-CoV-2 Virusstocks

Für die Infektion wurde der europäische Wildtyp-Stamm SARS-CoV-2/human/DEU/REGS-200701-CA/2020 (GenBank-Zugangsnummer MZ675816) eingesetzt, der am Universitätsklinikum Regensburg aus einer Patientenprobe isoliert worden war (151). Der Virusstamm wurde auf Vero-Zellen angezüchtet. Diese wurden in DMEM kultiviert, das mit 10 % FCS und 1 % P/S angereichert war. Nach Expansion wurde der Virusstock durch einen 0.22 µm Rotilab-Spritzenfilter steril filtriert und bei - 80°C aliquotiert weggefroren. Die Bestimmung der 50 % Tissue Culture Infective Dose (TCID₅₀) erfolgte nach der Methode von Reed und Muench (152). Mit dieser Methode wird die Konzentration infektiöser Viruspartikel quantifiziert, die für die Infektion von 50 % der inokulierten Zellen benötigt wird. Dafür wurden Vero-Zellen à 15.000 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausplattiert und im Hexaplikat mit einer seriellen Vierfachverdünnung des Virusstocks infiziert. Nach Übernacht-Inkubation wurde das virushaltige Inokulum ausgewaschen. Nach drei Tagen wurde der zytopathische Effekt optisch beurteilt, die Viruslast mittels qRT-PCR ausgelesen (vgl. 2.2.3.4) und daraus die TCID₅₀ errechnet. Neben der TCID₅₀ wurden in der vorliegenden Arbeit noch weitere Maßzahlen für die Konzentration von Viruspartikeln verwendet. In einem Plaque-Assay wurden die Plaque Forming Units pro Milliliter (PFU/ml) ermittelt. Die PFU/ml beschreibt die Anzahl an Plaques, die durch den zytopathischen Effekt von 1 ml Virusstock in Versuchszellen entstanden sind. Die Multiplicity of Infection (MOI) ist hingegen ein Maß für das Verhältnis der Viruspartikel zu den Zielzellen (153). Zwischen den einzelnen Messgrößen bestehen folgende mathematische Zusammenhänge:

$$\text{PFU/ml} = 0,7 \times \text{TCID}_{50}$$

$$\text{MOI} = \frac{\text{PFU/ml}}{\text{Zellzahl}}$$

2.2.3.2 Infektion von HEK293T-Zellen mit SARS-CoV-2

An HEK293T-Zellen wurden verschiedene aufeinanderfolgende Infektionsversuche mit SARS-CoV-2 mit anschließender Viruslastbestimmung durchgeführt. In einem ersten Versuch (hier als „Infektionsversuch 1“ bezeichnet) wurden HEK-Zellen mit dem Virus inkubiert und anschließend die Viruslast im Zellkulturüberstand bestimmt. In der zweiten Versuchsdurchführung („Infektionsversuch 2“) wurden zusätzliche Versuchsgruppen mit dem antiviralen Medikament Remdesivir eingeführt. Der dritte Infektionsversuch („Infektionsversuch 3“) untersuchte die intrazelluläre Viruslast in HEK-Zellen nach Infektion mit SARS-CoV-2.

Für den Infektionsversuch 1 wurden HEK293T wt- und CLN7 ko 99-4-Zellen mit einer Zelldichte von 15.000/Well in je 18 Wells einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach 48 h und einem Mediumwechsel erfolgte die SARS-CoV-2 Infektion der Zellen in Triplikaten mit Infektionsdosen zwischen 0 und 4000 PFU/ml. Die genauen Infektionsdosen lassen sich der Tabelle 9 entnehmen. Nach Übernacht-Inkubation wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h die Viruslast im Zellkulturmedium bestimmt (vgl. 2.2.3.4).

Im Infektionsversuch 2 wurden HEK293T wt- und CLN7 ko 94-5-Zellen eingesetzt. Die Zelldichte in den jeweils 30 Wells auf 96-Well-Platten betrug 15.000/Well. Die Hälfte der wt- und ko-Zellen wurde zusätzlich mit dem antiviralen Medikament Remdesivir behandelt. Hierfür wurden die Zellen nach Aussaat mit 5 µM Remdesivir (gelöst in DMSO; zur Verfügung gestellt von Dr. Eckhard Wiegrebe, Apotheke des Universitätsklinikums Regensburg) für eine Stunde vorinkubiert. Auch hier wurden die Zellen nach 48 h im Triplikate mit SARS-CoV-2-Dosen zwischen 16,5 und 4000 PFU/ml inkubiert (vgl. Tabelle 9). Dementsprechend lagen für jede Infektionsdosis sowohl in der wt- als auch in der ko-Sublinie jeweils zwei Remdesivir-positive und zwei Remdesivir-negative Triplikate vor. Nach Übernacht-Inkubation mit dem Virus wurde das Zellkulturmedium gewechselt und in den Remdesivir-Gruppen das Medikament in der gleichen Konzentration ergänzt. Insgesamt 48h nach Infektion wurden die Viruslast im Zellkulturmedium (vgl. 2.2.3.4) und die Zellviabilität (vgl. 2.2.3.5) bestimmt.

Infektionsversuch 1: HEK293T wt und CLN7 ko 99-4		Infektionsversuch 2: HEK293T wt und CLN7 ko 94-5 (± Remdesivir)	
PFU/ml	MOI	PFU/ml	MOI
0	0		
20	0,001	15,6	0,01
80	0,005	62,5	0,04
250	0,017	250	0,017
1000	0,067	1000	0,067
4000	0,267	4000	0,267

Tabelle 9. SARS-CoV-2 Infektionsdosen.

Zudem wurde die Hintergrund-Viruslast bestimmt. Unter dieser versteht sich das Signal durch Viruspartikel, das nicht durch eine tatsächliche Infektion von Zellen entsteht. Für die Bestimmung des Hintergrund-Viruslast wurde ein Teil der ausplattierten Zellen parallel mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, fünfmal mit PBS gewaschen und anschließend infiziert. Wie bei den unfixierten Zellen wurde das Medium nach Übernacht-Inkubation gewechselt und die Viruslast 48 h nach Infektion bestimmt. Die unter diesen Bedingungen gemessene Viruskonzentration wurde als Hintergrund gewertet.

Für Infektionsversuch 3, in dem die intrazelluläre Viruslast bestimmt wurde, wurden von der HEK293T wt-Sublinie und den beiden CLN7 ko-Sublinien jeweils zwei Triplikate mit 15.000 Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Je eines der Triplikate wurde nach 48 h für 12 h mit SARS-CoV-2 in einer MOI von 0,05 infiziert, das andere Triplikat bildete die Kontrollgruppe. Die gegenüber den Vorversuchen verkürzte Inkubationszeit mit den Viruspartikeln von 12 h statt 48 h bewirkt, dass die Viren zwar in die Zellen eintreten, aber nicht signifikant replizieren können (154). Dadurch kann die Menge an eingetretenen Viren ohne Beeinflussung durch Virusreplikation bestimmt werden. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen. Durch zweimalige Behandlung mit Trypsin wurden überschüssige Viren, die nicht in die Zellen eingetreten waren, von der Zelloberfläche entfernt. Hierfür wurden pro Well 50 µl Trypsin hinzugefügt. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen abgelöst und die Trypsin-Aktivität durch Zugabe von

200 µl Zellkulturmedium gestoppt. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 1400 rpm über 10 min an. Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Zellpellet in PBS resuspendiert. Nach einer zweiten Durchführung der Trypsin-Behandlung wurde das Pellet bis zur RNA-Analyse auf -80 °C eingefroren. Die Hintergrund-Viruslast wurde analog zum oben beschriebenen Vorgehen bestimmt.

2.2.3.3 Infektion von Vero-Zellen mit SARS-CoV-2

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Vero-Zellen mit SARS-CoV-2 infiziert. Um einen CLN7-Knockdown zu erreichen, waren die Vero-Zellen davor mehrfach mit siRNA behandelt worden (vgl. 2.2.1.5). Es lagen drei verschiedene Versuchsgruppen vor: mit CLN7-siRNA transfiziert, mit Negativkontroll-siRNA transfiziert und unbehandelte Kontrollzellen. Die Vero-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Dabei wurden pro Versuchsgruppe zwei Triplikate ausplattiert. Nach Übernacht-Inkubation wurde das Medium gewechselt. Die SARS-CoV-2 Infektion der Zellen erfolgte 48 h nach Aussaat mit einer MOI von 0,05. Anschließend wurde an jeweils einem der Triplikate die Viruslast bestimmt (vgl. 2.2.3.4). Die Bestimmung der Hintergrund-Viruslast erfolgte am anderen Triplikat wie oben beschrieben (vgl. 2.2.3.2).

Zusätzlich wurde orientierend anhand einer Stichprobe je Versuchsgruppe die intrazelluläre Viruslast bestimmt. Hierfür wurden von allen drei Vero-Versuchsgruppen je 1×10^6 Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät und wie oben beschrieben nach 48 h mit SARS-CoV-2 (MOI 0,05) inkubiert. Nach 48 h erfolgte eine zweimalige Behandlung mit Trypsin und Zentrifugation zu einem Zellpellet, aus dem die Viruslast bestimmt wurde.

2.2.3.4 Bestimmung der Viruslast

Die Viruslast wurde je nach Fragestellung aus den Überständen von SARS-CoV-2 infizierten Zellkulturen oder den infizierten Zellen selbst bestimmt. Aus den Zellkultur-Überständen wurde die RNA mittels DLR-Puffer extrahiert, der mit RNase-Inhibitor gemischt wurde (155). Dafür wurden 50 µl des angesetzten DLR-Puffers mit 50 µl der Zellkultur-Überstände für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Aus den infizierten Zellen wurde die RNA mithilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits gewonnen. Dafür wurde das Pellet in dem im Kit enthaltenen Lysepuffer lysiert und nach Herstellerangaben weiter aufgereinigt.

Anschließend wurde die RNA per qRT-PCR (vgl. 2.2.2.1) nach dem Protokoll von Corman et al. auf das E-Gen von SARS-CoV-2 untersucht (156). Dafür wurde die SARS-CoV-2 RNA in einem Schritt revers transkribiert und mit Hilfe des Taq-Path™ 1-Step RT-qPCR Master Mixes unter Verwendung publizierter Primer und Sonden (156) im StepOnePlus Real Time PCR-System von ThermoFischer Scientific amplifiziert. Die Viruslasten im Überstand wurden unter Zuhilfenahme einer in vitro transkribierten RNA absolut quantifiziert (157). Als interne Kontrolle bei Bestimmung der intrazellulären Viruslast wurde das Housekeeping-Gen β -Glucuronidase (GUS) verwendet. Die Normalisierung auf Housekeeping-Gene wurde bereits unter 2.2.2.1.4 erläutert. Die GUS-mRNA wurde nach reverser Transkription mit Hilfe spezifischer Primer sowie einer GUS TaqMan-Sonde amplifiziert (158). Die reverse Transkription erfolgte bei 50 °C für 15 min. Für die rtqPCR wurden die Proben 2 min bei 95 °C aktiviert. Im Anschluss wurden 45 Zyklen bei 95 °C für 5 s und 60°C für 30 s durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand einer Standardkurve (vgl. 2.2.2.1.4). Die Viruslast wurde für die Zellkulturüberstände in Form von SARS-CoV-2 RNA-Kopien/Well berechnet und im Fall der intrazellulären Viruslast auf GUS normiert.

2.2.3.5 Bestimmung der Zellviabilität

Die Viabilität der Zellen wurde durch einen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)-Assay überprüft. In diesem wird der Farbstoff MTT zu einer Probe hinzugegeben. Lebende Zellen reduzieren MTT mithilfe ihrer mitochondrialen Dehydrogenasen. Es entsteht das blau-violette, wasserunlösliche Formazan, das durch Zugabe von Detergens in einen gelben, wasserlöslichen Farbstoff umgewandelt wird. In toten Zellen tritt dagegen kein Farbumschlag auf. Die Menge des Formazans ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in der Zellkultur. Durch Messung der Absorption des Formazans bei 595 nm kann der Stoffwechsel der lebenden Zellen spektralphotometrisch analysiert werden. Zur Messung unspezifischer Reaktionen wurde eine Referenzwellenlänge von 690 nm gewählt. Die erhaltenen Messwerte wurden von den Messwerten bei 595 nm subtrahiert (137, 159-161).

Die Bestimmung der Zellviabilität wurde mit der HEK293T wt- und ko 94-5-Sublinie durchgeführt. Auch hier wurde der Effekt verschiedener Infektionsdosen untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von Remdesivir auf das Überleben der Zellen gemessen. Dafür wurde pro Well 10 μ l MTT-Lösung (gelöst in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS) zugegeben und 1,5–2 h bis zur Bildung blau-violetter Kristalle inkubiert.

Anschließend wurden pro Well 100 µl Detergenz zupipettiert und im Brutschrank über Nacht inkubiert. Um einen Referenzwert (100 %) zu erlangen, wurden außerdem sowohl von den wt- als auch den ko-Sublinien Negativkontrollen pipettiert, die weder mit dem Virus infiziert noch der Remdesivir-Behandlung unterzogen wurden (Inkubation in Medium). Von jeder Versuchsbedingung lagen Triplikate vor. Um die Zellviabilität zu berechnen, wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Viabilität [\%]} = 100 \times \frac{\text{OD}_{595\text{p}}}{\text{OD}_{595\text{k}}} \text{ mit}$$

OD_{595p}: Mittelwert der optischen Dichte der Probe

OD_{595k}: Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrolle

2.2.4 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskope besitzen eine im Vergleich zu Lichtmikroskopen mehr als 1000-fach höhere Auflösung. Es können auch Objekte, die kleiner als 200 nm sind, dargestellt werden. So auch das Coronavirus SARS-CoV-2, das etwa 100 nm im Durchmesser misst (84). In der vorliegenden Arbeit sollten Virusbestandteile in infizierten Zellen zur Lokalisation und Quantifizierung untersucht werden.

Es wurden mit SARS-CoV-2 infizierte HEK-Zellen unter dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Dabei wurde mit der wt-Sublinie sowie der CLN7 ko-Sublinie 99-4 gearbeitet. Die Vorbereitung der Präparate sowie die technische Ausführung wurde dabei von Helga Othmen (Universität Regensburg, Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie) durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben mussten für die Elektronenmikroskopie spezifisch vorbereitet werden. Hierzu wurden die Zellen nach dem unter 2.2.3.2 beschriebenen Protokoll über 48 h mit SARS-CoV-2 inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen für 24 h in Paraformaldehyd (3 %, in PBS) fixiert. Danach wurden sie für ca. 12 h mit einer Glutaraldehydlösung behandelt. Es folgte die Einbettung der Zellpellets in 1,5 % Agarose, dreimaliges Waschen mit 0,1 M Natriumcacodylat über 20 min, Kontrastierung durch zweistündige Inkubation in 1 % Osmiumtetroxid-Lösung und Wiederholung des Waschschriffs. Im Anschluss wurden die Zellpellets für je 15 min mit Ethanollösungen aufsteigender Konzentration (50 %, 70 %, 90 %, 95 %) dehydriert. Die abschließende Inkubation in 100 % Ethanol erfolgte über 20 min, an welche sich eine dreimalige Inkubation von 15 min in Aceton anschlossen. Die Einbettung erfolgte nach Standardprotokoll in Epon bei 60 °C über 48 h. Mithilfe eines

Ultramikrotoms wurden Schnitte angefertigt. Um den Kontrast zu erhöhen, wurden die Präparate für 30 min mit 1 % Uranylacetat und 1 min mit Bleicitrat behandelt. Die Betrachtung der Schnitte erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop EM902 der Carl Zeiss AG, Bilder wurden mit einer 2k CCD-Kamera angefertigt. Die Identifikation der Viren erfolgte anhand publizierter Empfehlungen, die Hinweise zu viraler Ultrastruktur, intrazellulärer Lokalisation und Replikation der Viren geben (162-164). Die mikroskopischen Aufnahmen von Zellen der wt- und ko- Sublinie wurden miteinander verglichen. Eine systematische quantitative Auswertung erfolgte nicht.

2.2.5 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie können Zellen vermessen, quantifiziert und auf intra- und extrazelluläre Merkmale hin untersucht werden. Die Zellen werden in Suspension einzeln an Lasern vorbeigeleitet, die Licht einer spezifischen Wellenlänge aussenden. Zum einen werden der Forwardscatter (FSC) und Sidescatter (SSC) gemessen. Der FSC beschreibt das Licht, das vorwärts gestreut wird und wird als Maß für die Größe der Zelle herangezogen. Der SSC beschreibt die Menge an orthogonal reflektiertem Licht und repräsentiert die Granularität bzw. Komplexität der Zelle. Zusätzlich können die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Diese sind in der Regel an Antikörper gekoppelt, welche an spezifische Strukturen der Zellen binden. Außerdem können fluoreszierende Proteine in die Zellen eingebracht werden, um diese intrazellulär zu markieren. Die Laser regen das enthaltene Fluorophor an, welches daraufhin selbst Licht emittiert. Dieses emittierte Licht wird von spezifischen Detektoren wahrgenommen und quantifiziert. So können die Zellen gleichzeitig auf mehrere Fluoreszenzmarker hin untersucht werden.

Für die Messungen wurde das BD Accuri™ C6 Durchflusszytometer der Firma BD Biosciences verwendet. In diesem sind ein blauer ($\lambda=488$ nm) und ein roter ($\lambda=640$ nm) Laser verbaut. Für die Detektion des durch die Fluoreszenzfarbstoffe emittierten Lichts besitzt das Gerät die optischen Filter FL1 (533/30 nm), FL2 (585/40 nm), FL3 (> 670 nm) und FL4 (675/25 nm).

Die Proben der HEK293T wt-Sublinie und der CLN7-ko-Sublinie 99-4 wurden wie unter 2.2.1.3 beschrieben zunächst mit verschiedenen Plasmiden transfiziert. Anschließend wurde das GM1 mit CTxB, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff AF647, angefärbt (vgl. 2.2.1.4). AF647 hat ein Exzitationsmaximum von $\lambda=650$ nm und wird durch den roten Laser angeregt. Das Emissionsmaximum liegt bei $\lambda=668$ nm; somit wurde das

Signal durch den 675/25 nm-Filter auf dem FL4-Detektor gemessen. Die plasmidtransfizierten Versuchsgruppen exprimierten zudem die fluoreszierenden Proteine AcGFP bzw. EGFP. Das Exzitationsmaximum von AcGFP liegt bei $\lambda=475$ nm, von EGFP bei $\lambda=484$ nm, sodass sie vom blauen Laser angeregt werden. Ihre Emissionsmaxima sind bei $\lambda=505$ nm bzw. 510 nm. Die Signaldetektion erfolgte durch den 533/30 nm-Filter auf dem FL1-Detektor. Die Auswertung erfolgte mit der BD Accuri C6 Software desselben Herstellers. Jede Probe wurde dreifach vermessen und mindestens 20.000 Events detektiert.

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen wurden die relevanten Zellen mithilfe von Gating-Strategien aus den gemessenen Events ausgewählt (vgl. Abbildung 1). Durch Gating der Forwardscatter-Area (FCS-A) und des Forwardscatter-Height (FCS-H) wurden Doubletten aus der Messung ausgeschlossen. Lebende Zellen wurden durch Auftragen des FCS-A und der Sidescatter-Area (SSC-A) eingeschlossen.

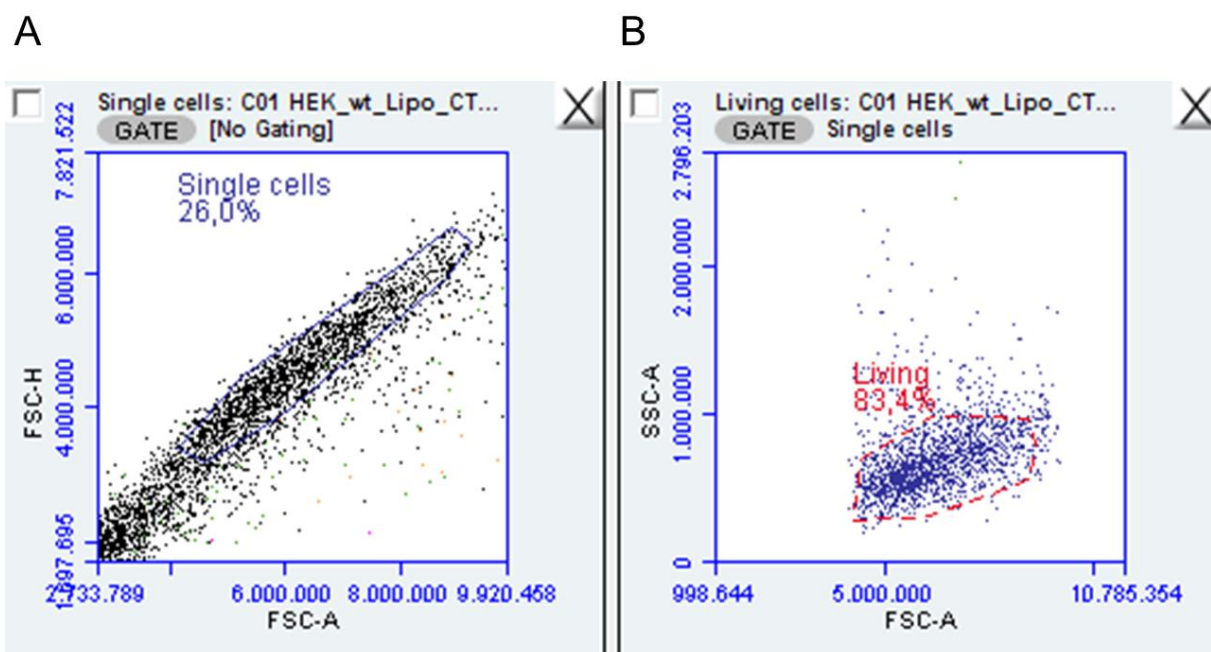


Abbildung 1. Gating-Strategien in der Durchflusszytometrie.

In der Abbildung sind die in der Durchflusszytometrie verwendeten Gating-Strategien dargestellt. (A) zeigt den Ausschluss von Doubletten durch Auftragen eines FSC-H/FSC-A-Plots. (B) stellt den Ausschluss nichtvitaler Zellen im SSC-A/FSC-A-Plot dar.

FSC-H: Forwardscatter-Height, FSC-A: Forwardscatter-Area, SSC-A: Sidescatter-Area, SSC-H: Sidescatter-Height.

In den mit Plasmiden transfizierten Zellpopulationen wurden außerdem nur diejenigen Zellen in die Auswertung aufgenommen, deren AcGFP-/EGFP-Signal die Hintergrundfluoreszenz überstieg. Zur Quantifizierung von GM1 wurden die

arithmetischen Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) des mit CTxB-gekoppelten AF647 herangezogen. In vorausgegangenen Versuchen dieser Arbeitsgruppe war aufgefallen, dass die Fluoreszenzintensität von AF647 aufgrund von Photobleaching im Zeitverlauf abnahm (165). Um die Ergebnisse der einzelnen Versuchsdurchführungen miteinander vergleichen zu können, erfolgte innerhalb jedes Messtages eine Normierung nach folgender Formel:

$$\text{normierte mittlere Fluoreszenzintensität nMFI} = \frac{\text{MFI}(\text{Versuchsgruppe})}{\text{MFI}_{\text{wt}}(\text{Mock})}$$

2.2.6 Statistik

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden die Werte der Proben mit denselben experimentellen Bedingungen mithilfe des arithmetischen Mittels (MW) oder des Medians zusammengefasst. Zudem erfolgte die Angabe des Standardfehlers (SEM). Die schließende statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte mit GraphPad Prism 9. Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung und Varianzgleichheit überprüft. Je nach Ausgangsdaten wurden dafür der Shapiro-Wilk-Test und der Spearman-Test auf Heteroskedastizität oder der Brown-Forsythe-Test verwendet. Abhängig von den Ergebnissen dieser Tests und dem Design der Versuchsgruppen wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Mehrvergleichstest, ein Welch-Test mit Mehrvergleichstest nach Dunnett oder eine ein-, zwei- oder dreifaktorielle Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA) mit Tukey-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag dabei stets bei $\alpha = 0,05$. Gegebenenfalls wurden Korrelations- und Regressionsanalysen durchgeführt. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet, nicht signifikante Ergebnisse mit ns.

3 Ergebnisse

3.1 Infektion verschiedener CLN7-defizienter Zelllinien mit SARS-CoV-2

3.1.1 Analyse der Infektion von HEK293T Wildtyp- und CLN7-Knockout-Zellen mit SARS-CoV-2

3.1.1.1 Viruslast im Zellkulturüberstand

Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben Interaktionen zwischen CLN7 und Proteinen von SARS-CoV-2, die in silico durch Hochdurchsatz-Screening-Verfahren ermittelt und über die Website BioGRID veröffentlicht wurden (166). Unter den identifizierten Proteinen befanden sich sowohl Strukturproteine des Virus wie das E- und das S-Protein, aber auch die Nicht-Strukturproteine NSP4, NSP6, ORF7A, ORF7B und ORF14 (117, 120, 166). Diese Interaktionen könnten im Replikationszyklus des Virus eine Rolle spielen und somit zu einer Beeinflussung der Virusvermehrung führen. Zur Untersuchung, ob sich die Interaktionen zwischen CLN7 mit den viralen Proteinen in vitro auf die SARS-CoV-2-Infektion von Zellen auswirken, wurden Wildtyp (wt)- und CLN7-Knockout (ko)-Zellen mit dem Virus inkubiert. Anschließend wurde die Viruslast gemessen. Dabei lag der Fokus auf der Frage, ob eine CLN7-Defizienz einen Einfluss auf die Virusmenge hat.

Es wurden die bereits in Vorversuchen etablierten HEK293T CLN7-ko-Zellen (Sublinie 99-4) sowie die entsprechende wt-Sublinie verwendet. HEK293T Zellen sind laut Literatur mit SARS-CoV-2 infizierbar, weisen gute Virusreplikationsraten auf und sind einfach zu kultivieren (167). Die Sublinien wurden über 48 h mit SARS-CoV-2 in verschiedenen Infektionsdosen zwischen 0 und 4000 PFU/ml inkubiert. Anschließend wurde die Viruslast im Zellkulturüberstand per quantitativer reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) in Form von SARS-CoV-2-RNA-Kopien pro Well bestimmt. Alle Arbeiten mit SARS-CoV-2 wurden von Profⁱⁿ Drⁱⁿ Barbara Schmidt (Universitätsklinikum Regensburg, Institut für Mikrobiologie und Hygiene) durchgeführt.

In der ko-Sublinie war die Viruslast bei gleicher Infektionsdosis im Durchschnitt 88 % niedriger als bei der wt-Sublinie (vgl. Abbildung 2). Diese Beobachtung zeigte sich bei allen eingesetzten Infektionsdosen.

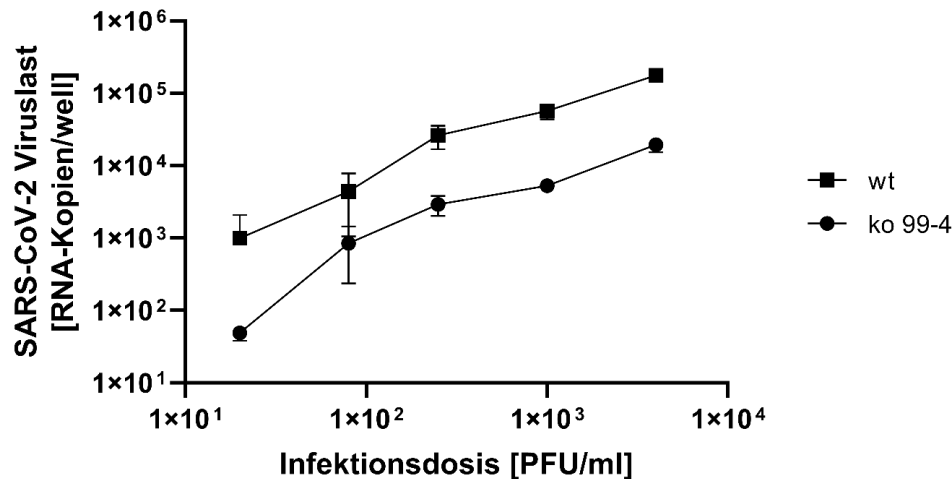


Abbildung 2. Viruslast im Zellkulturüberstand von HEK293T wt- und CLN7-ko-99-4-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen SARS-CoV-2-Infektionsdosen.

HEK293T wt- und CLN7-ko-99-4-Zellen wurden über 48 h mit unterschiedlichen SARS-CoV-2-Infektionsdosen inkubiert. Es folgte eine Bestimmung der Viruslast im Zellkulturüberstand. In den ko-Zellen zeigte sich gegenüber den wt-Zellen eine um durchschnittlich 88 % niedrigere Viruslast. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler. Bei fehlenden Fehlerbalken können diese nicht dargestellt werden, da sie kleiner als die verwendeten Symbole sind. PFU = Plaque Forming Units, Stichprobengröße je Messpunkt n = 3.

Dieser Versuch zeigte, dass die resultierende Viruslast in der ko-Sublinie 99-4 deutlich geringer war. Die Reduktion der Viruslast in den ko-Zellen um fast eine Zehnerpotenz ist ein Indiz für eine biologische Relevanz der Interaktion von CLN7 mit SARS-CoV-2. CLN7 könnte somit in den Infektionszyklus von SARS-CoV-2 involviert sein.

3.1.1.2 Viruslast im Zellkulturüberstand unter Behandlung mit Remdesivir

Im folgenden Experiment sollte die verringerte Viruslast von SARS-CoV-2 in HEK293T CLN7 ko-Zellen an einer zweiten ko-Sublinie überprüft werden. Außerdem wurde untersucht, wie stark ein CLN7-ko die Viruslast beeinflusst. Dafür wurde ein Vergleich mit dem Medikament Remdesivir angestellt. Remdesivir ist eine bekannte, in vitro sehr stark gegen SARS-CoV-2 wirksame, antivirale Substanz (168). Sie diente als Referenz, um einzuschätzen, ob das CLN7-ko die Viruslast stärker oder schwächer senkt als Remdesivir. Es wurde des Weiteren untersucht, ob der CLN7-Knockout und Remdesivir eine synergistische Wirkung in Form einer weiter erniedrigten Viruslast zeigen. Dies könnte Rückschlüsse auf den Mechanismus erlauben, mit dem der virale Replikationszyklus durch den CLN7-ko beeinflusst wird.

Der oben beschriebene Versuchsaufbau wurde mit den HEK293T wt-Zellen sowie der zweiten CLN7 ko-Sublinie (94-5) wiederholt. Diese stammt von derselben wt-Zelllinie wie die ko-Sublinie 99-4 ab. Es wurde in der CRISPR/Cas9-Methode aber eine andere

guide-RNA verwendet und das CLN7-Gen dadurch an einer anderen Position zerschnitten. Dadurch können Off-Target-Effekte identifiziert werden. Diese Off-Target-Effekte treten auf, wenn das zur Herstellung der ko-Sublinie verwendete CRISPR/Cas9-System nicht (nur) die gewünschten Target-Sequenz entfernt, sondern (auch) andere Abschnitte aus dem Genom verändert werden. Zusätzlich wurde von wt- und ko-Sublinie bei jeder Infektionsdosis je eine Versuchsgruppe vor Infektion mit SARS-CoV-2 mit Remdesivir (5 μ M) vorinkubiert. Nach Übernacht-Inkubation mit Virusdosen zwischen 15,6 und 4000 PFU/ml wurde das Zellkulturmedium gewechselt und erneut mit Remdesivir (5 μ M) versetzt. 48 h nach Infektion wurde die Viruslast analog zum ersten Versuch bestimmt. Auch diese Versuchsdurchführung wurde von Profⁱⁿ Drⁱⁿ Barbara Schmidt (UKR) übernommen.

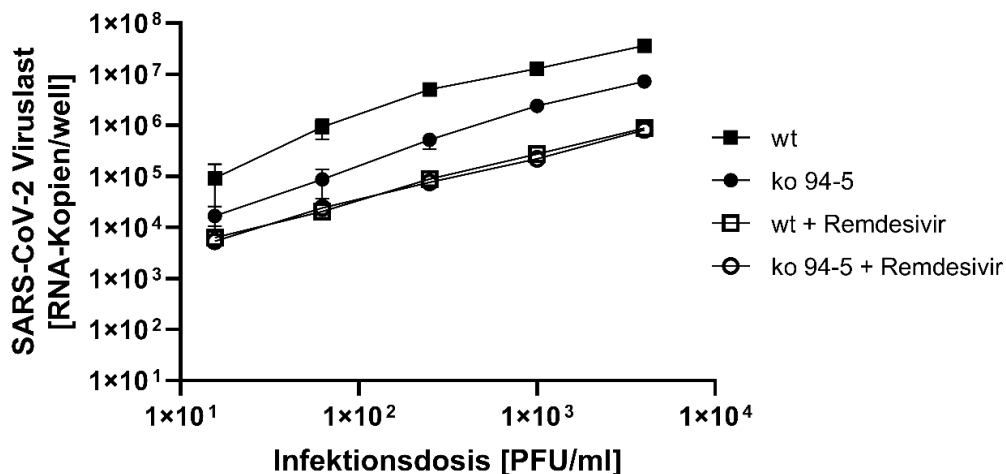


Abbildung 3. Viruslast im Zellkulturüberstand von HEK293T wt- und CLN7 ko-Zellen (94-5) nach Inkubation mit verschiedenen SARS-CoV-2-Infektionsdosen mit und ohne Behandlung mit Remdesivir.

HEK293T wt- und CLN7 ko-Zellen (94-5) wurden 48 h mit verschiedenen SARS-CoV-2-Infektionsdosen inkubiert. Zusätzlich wurden Gruppen beider Sublinien mit dem antiviralen Medikament Remdesivir behandelt. Es folgte die Bestimmung der Viruslast im Zellkulturmedium. Die Viruslast der unbehandelten ko-Sublinie war um 85 % niedriger als die der vergleichbaren wt-Sublinie. Remdesivir senkte die Viruslast bei der wt-Zelllinie um 97 % und bei der ko-Sublinie um 81 %. Die Viruslast der mit Remdesivir behandelten wt- und ko-Zellen unterschied sich kaum. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardfehler (SEM). PFU = Plaque Forming Unit, Stichprobengröße je Messpunkt n = 3.

Wie im ersten Experiment zeigte sich in diesem Versuch in den CLN7 ko-Zellen eine gegenüber den wt-Zellen geringere SARS-CoV-2 Viruslast (vgl. Abbildung 3). Die Viruslast der ko-Sublinie war gegenüber der wt-Sublinie um durchschnittlich 85 % reduziert.

Währenddessen senkte Remdesivir die Viruslast deutlich mehr. Die Viruslast der mit Remdesivir behandelten wt-Gruppe war im Durchschnitt um 97 % geringer als die der unbehandelten wt-Gruppe. In den ko-Zellen senkte Remdesivir die Viruslast um circa

81 %. Des Weiteren zeigte sich zwischen mit Remdesivir behandelten wt- und ko-Sublinie kein Unterschied in der Viruslast. Auch hier waren die Beobachtungen unabhängig von der eingesetzten Infektionsdosis.

Die Reproduktion der Ergebnisse in der zweiten ko-Sublinie war eine Bestätigung, dass ein CLN7-ko in HEK293T-Zellen zu einer geringeren SARS-CoV-2-Viruslast führt. Das antivirale Remdesivir wirkte sowohl auf wt- als auch auf ko-Zellen in Form einer Reduktion der Viruslast. Die Viruslastsenkung durch das Medikament war dabei stärker als die Viruslastsenkung durch den CLN7-Knockout. Es ließ sich weiterhin kein synergistischer Effekt von CLN7-Knockout und Remdesivir feststellen. Um die Ergebnisse abschließend beurteilen zu können, muss allerdings die Zellviabilität mitbeurteilt werden, was im nächsten Schritt geschah.

3.1.1.3 Zellviabilität

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte, um auszuschließen, dass die verminderte Viruslast in den ko-Zellen Ergebnis eines vermehrten Zelltods und damit reduzierter Replikationsmöglichkeiten für die Viren war. Zudem wurde die Wirkung des Medikaments Remdesivir und der Infektionsdosis auf das Überleben der Zellen untersucht.

Die Zellviabilität wurde durch einen MTT-Assay ermittelt. Dieser wurde von Profⁱⁿ Drⁱⁿ Barbara Schmidt (UKR) durchgeführt. Bei einem MTT-Assay wird der Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in lebenden Zellen reduziert, nicht jedoch in toten Zellen. Es erfolgt ein Farbumschlag, der photometrisch bestimmt werden kann (159). Als Referenzgröße wurde eine unbehandelte Negativkontrolle herangezogen. Das Ergebnis wurde in [%] angegeben, wobei 100 % der Viabilität der Kontrolle entsprach. Analog zum soeben beschriebenen Versuch wurden HEK293T wt- und CLN7 ko-Zellen (94-5) verwendet. Auch die Remdesivirbehandlung und die eingesetzten Infektionsdosen entsprachen denen aus der oben geschilderten Versuchsdurchführung (vgl. 3.1.1.2). Im Anschluss wurde die Viabilität der jeweiligen Versuchsgruppe (wt, ko, wt + Remdesivir, ko + Remdesivir) in die Ergebnisse des Infektionsversuches (vgl. 3.1.1.2) eingerechnet. Es wurde überprüft, ob Unterschiede in der Viruslast im vorausgegangenen Versuch durch unterschiedliche Viabilitäten erklärbar sind. Der Zelltyp per se (wt bzw. ko) oder die Behandlung mit Remdesivir könnte dabei einen Einfluss auf das Zellüberleben haben.

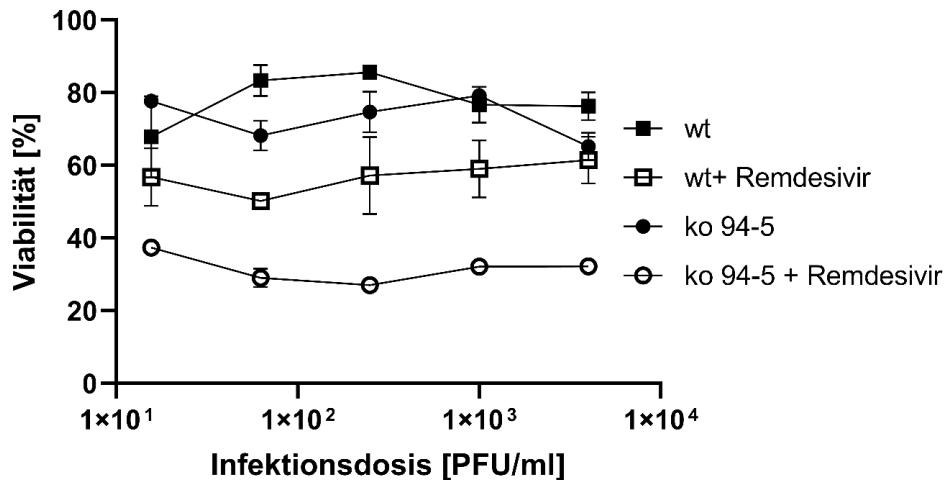


Abbildung 4. Viabilität von HEK293T wt- und CLN7 ko-Zellen (94-5) nach Inkubation mit SARS-CoV-2 mit und ohne Behandlung mit Remdesivir.

Es wurde die Viabilität von wt- und ko-Zellen nach Infektion mit verschiedenen SARS-CoV-2-Infektionsdosen mit und ohne Behandlung mit dem antiviralen Medikament Remdesivir ermittelt. Hierfür wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Als Referenzgröße wurden Remdesivir-unbehandelte und nicht-infizierte Kontrollzellen verwendet, die die Viabilität von 100 % darstellen. Die Remdesivir-unbehandelten wt- und ko-Zellen wiesen eine ähnlich hohe Viabilität von 75–85 % auf. Durch Versetzen mit Remdesivir nahm die Zellviabilität deutlich ab. Bei den ko-Zellen war dies deutlicher zu beobachten, hier sank der Wert auf durchschnittlich 32 %. Bei den wt-Zellen reduzierte sich die Viabilität durch Remdesivir im Durchschnitt auf 57 %. Die Höhe der Infektionsdosis hatte keine Auswirkung auf die Viabilität. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Sind die Fehlerbalken nicht dargestellt, sind diese kleiner als die verwendeten Symbole. PFU = Plaque Forming Unit, Stichprobengröße je Messpunkt $n = 3$.

Die Viabilität der Zellen lag bei den unbehandelten Versuchsgruppen sowohl bei der wt- als auch bei der ko-Sublinie bei 75–85 % (vgl. Abbildung 4). Unter Remdesivirbehandlung sank die Viabilität jedoch deutlich: bei den wt-Zellen auf durchschnittlich 57 % und bei den ko-Zellen auf 32 %. Innerhalb einer Gruppe mit der gleichen Behandlung war die Viabilität bei allen Infektionsdosen ungefähr konstant. Im untersuchten Bereich hatte die Höhe der SARS-CoV-2-Infektionsdosis folglich keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen.

Wurde die Viabilität der einzelnen Versuchsgruppen in die Viruslast des Infektionsversuches aus 3.1.1.2 eingerechnet, zeigte sich beim Vergleich von unbehandelten wt- mit ko-Zellen keine deutliche Veränderung der Verhältnisse der Gruppen zueinander (vgl. Abbildung 5). Die Reduktion der Viruslast durch das ko betrug im Mittel ebenfalls etwa 85 %. Bei Remdesivirbehandlung war die resultierende Viruslast auch geringer, wenn nur die überlebenden Zellen betrachtet wurden. In den wt-Zellen ergab sich ebenfalls eine Senkung der Viruslast um über 96 % (vgl. 3.1.1.2: 97 %), während sie in der ko-Sublinie nur zu einer Reduktion um 57 %

(vgl. 3.1.1.2: 81 %) führte. Auffällig ist außerdem, dass die Viruslast in den überlebenden wt-Zellen bei Remdesivir-Behandlung niedriger war als in den Remdesivir-behandelten ko-Zellen.

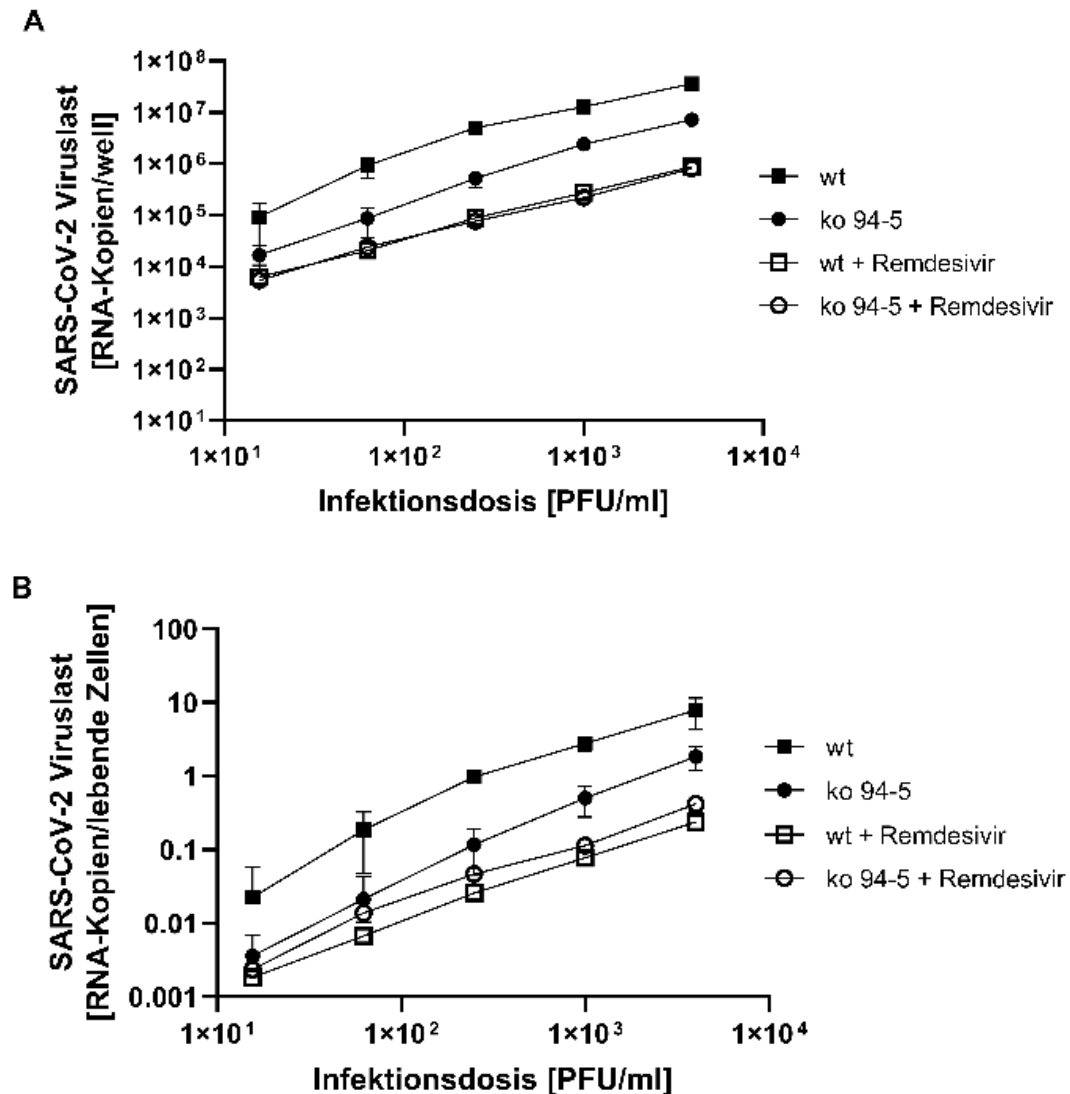


Abbildung 5. Vergleich der Graphen zur Viruslast im Zellkulturüberstand mit und ohne Einbezug der Viabilität.

Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Viruslast mit und ohne Einberechnung der Viabilität. (A) zeigt den bereits in Abbildung 3 dargestellten Graphen. In (B) ist die Viabilität einbezogen. Die Viruslast wird als RNA-Kopien/lebende Zellen angegeben. Der Unterschied zwischen den Graphen ist gering und die Gruppen stehen jeweils in einem ähnlichen Verhältnis zueinander. Die geringere SARS-CoV-2-Viruslast in den unbehandelten ko-Zellen kommt nicht durch eine reduzierte Viabilität der ko-Zellen zustande. Jedoch ist die Viruslast in mit Remdesivir behandelten wt-Zellen etwas niedriger als in ko-Zellen, die ebenfalls mit dem Medikament behandelt wurden. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardfehler (SEM). PFU = Plaque Forming Unit, Stichprobengröße je Messpunkt $n = 3$.

Es wurde gezeigt, dass niedrigere Viruslasten in den CLN7-ko-Zellen gegenüber den wt-Zellen nicht durch einen verstärkten Zelltod zustande kamen. Wurden Zellen mit Remdesivir versetzt, war ihr Überleben reduziert. Dabei war Remdesivir für die CLN7-

ko-Zellen deutlich toxischer als für wt-Zellen. Wurde die Viabilität in die Auswertung einbezogen, zeigte sich im Unterschied zum vorangegangenen Versuch bei den Remdesivir-behandelten wt-Zellen eine leicht reduzierte Viruslast gegenüber den Remdesivir-behandelten ko-Zellen. Remdesivir schien folglich auf die wt-Sublinie stärker zu wirken als auf die ko-Sublinie. Ein synergistischer Effekt von CLN7-ko und Remdesivir war hingegen auch in diesem Versuch nicht erkennbar. Im untersuchten Bereich war das Zellsterben in keiner der Gruppen von der Infektionsdosis abhängig.

3.1.1.4 Intrazelluläre Viruslast

Aufbauend auf den vorangegangenen Versuchen sollte bestimmt werden, welcher Schritt des viralen Replikationszyklus durch die CLN7-Defizienz beeinträchtigt wird. Zu diesen Schritten zählen die Virusbindung an die Zelloberfläche, der Viruseintritt und die Membranfusion, die RNA-Replikation, die Translation der viralen Proteine sowie die Zusammensetzung und der Austritt neuer Virionen (169). Durch eine verkürzte Inkubationszeit mit dem Virus und der Messung der intrazellulären Viruslast kann spezifisch untersucht werden, ob die ersten Schritte des Replikationszyklus – vor der RNA-Replikation – durch den CLN7-Knockout beeinflusst werden.

Es wurde eine Inkubationszeit der Zellen mit SARS-CoV-2 von 12 h gewählt. In dieser Zeit können die Viren zwar in die Zelle eintreten, aber nicht signifikant replizieren (154). Anschließend wurde die intrazelluläre Viruslast gemessen. Es wurden HEK293T wt- und die beiden CLN7 ko-Sublinien 99-4 und 94-5 verwendet. Nach Inkubation mit SARS-CoV-2 bei einer Multiplicity of Infection (MOI) von 0,05 wurden die Zellen trypsiniert, um extrazellulär gebundene Viren zu entfernen. Anschließend wurden sie lysiert, die Menge der viralen RNA per qRT-PCR bestimmt und auf das Housekeeping-Gen β -Glucuronidase (GUS) normiert. Als Negativkontrollen dienten nicht-infizierte Zellen jeder Sublinie. Der Versuch wurde ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Profⁱⁿ Drⁱⁿ Barbara Schmidt (UKR) durchgeführt.

Die Viruslast war in beiden ko-Sublinien gegenüber den wt-Zellen um etwa 80 % erniedrigt ($MW_{wt} = 6,05$, $SEM_{wt} = 0,84$, $n_{wt} = 3$; $MW_{94-5} = 1,23$, $SEM_{94-5} = 0,18$, $n_{94-5} = 3$; $MW_{99-4} = 1,50$, $SEM_{99-4} = 0,12$, $n_{99-4} = 3$). Der Tukey-Mehrvergleichstest ergab einen signifikanten Unterschied zwischen wt- und den ko-Gruppen (wt vs. ko 94-5: $p < 0,0005$ und wt vs. ko 99-4: $p < 0,0006$). Außerdem lag die Viruslast in beiden ko-Sublinien etwa auf dem gleichen Niveau, wodurch die Versuchsergebnisse in sich schlüssig sind (vgl. Abbildung 6).

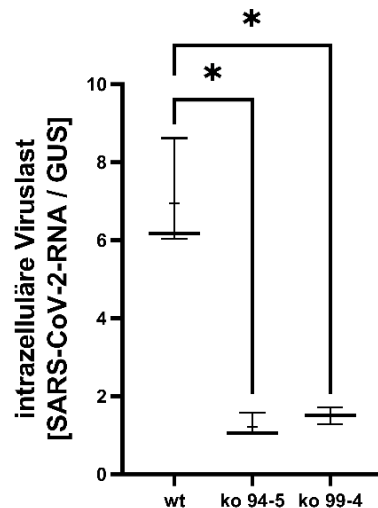


Abbildung 6. Intrazelluläre Viruslast in HEK293T wt- und CLN7 ko-Zellen (99-4 und 94-5) nach Inkubation mit SARS-CoV-2.

HEK293T wt- und CLN7 ko-Zellen wurden für eine Zeitspanne von 12 h mit SARS-CoV-2 (MOI 0,05) inkubiert. In dieser Zeit können die Viren in die Zellen eindringen, aber nicht nennenswert replizieren. Anschließend wurden adhären te Viruspartikel durch Trypsinierung entfernt und die intrazelluläre Viruslast durch eine qRT-PCR bestimmt. Die Werte wurden auf das Housekeeping-Gen β -Glucuronidase (GUS) normiert. Es zeigte sich, dass die intrazelluläre Viruslast der ko-Sublinie 94-5 82 % und der ko-Sublinie 99-4 78 % niedriger als die der wt-Sublinie war (wt vs. ko 94-5: $p = 0,0005$ und wt vs. ko 99-4: $p = 0,0006$). Die Whisker des Boxplots zeigen die Maximal- bzw. Minimalwerte an. Die Mittelwerte, die für die Signifikanztestung verwendet wurden, sind mit einem schmalen Querstrich markiert. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch * gekennzeichnet. Stichprobengröße je Messpunkt $n = 3$.

Dieses Experiment zeigte, dass durch CLN7-Defizienz die ersten Schritte des SARS-CoV-2-Vermehrungszyklus beeinträchtigt werden. Durch verkürzte Inkubation mit dem Virus und Bestimmung der intrazellulären SARS-CoV-2-Viruslast wurden speziell die Abschnitte des viralen Lebenszyklus untersucht, die vor der Vermehrung viraler RNA liegen. Schon zu diesem Zeitpunkt war der Virus-RNA-Gehalt in den ko-Zellen signifikant niedriger als in den wt-Zellen. CLN7 scheint also die virale Adsorption, den Zelleintritt oder die Virusfusion zu beeinflussen.

3.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Das Ziel dieses Versuches war, SARS-CoV-2-Viruspartikel in den Zellen sichtbar zu machen. Dadurch sollte ein visueller Eindruck der infizierten Zellen erreicht sowie der Unterschied zwischen wt- und CLN7-ko-Zellen in Menge der Viruspartikel verifiziert werden.

HEK293T wt- und CLN7 ko-99-4-Zellen wurden über 48 h mit SARS-CoV-2 inkubiert. Anschließend wurden sie zu einem Zellpellet zentrifugiert und dieses nach Standardprotokoll eingebettet. Es wurden transmissionselektronenmikroskopische

Bilder angefertigt. Die Identifikation der Viren erfolgte anhand publizierter Empfehlungen, die Hinweise zu viraler Ultrastruktur, intrazellulärer Lokalisation und Replikation der Viren geben (162-164).

Sowohl in den wt- als auch in den ko-Zellen ließen sich behüllte, 60–120 nm große, virusähnliche Partikel darstellen (vgl. Abbildung 7 a–f). Die sogenannten Spikes – kleine Fortsätze auf der Oberfläche, die charakteristisch für Coronaviren sind – zeigten sich auf den intrazellulären Partikeln nicht (c, f). Dies war zu erwarten, da die Spikes in der Zelle in der Regel nur durch eine spezielle Färbung mit Tanninsäure dargestellt werden können (170). Auf extrazellulär vorkommenden Virionen zeigten sie sich teilweise als unscharfer Saum (b). Die virusähnlichen Partikel kamen nicht als einzelne freie Virionen im Zytoplasma vor, sondern befanden sich in Gruppen innerhalb größerer vakuolärer Strukturen, die Membranen der Wirtszelle entstammen (c–f). Diese begrenzenden Membranen waren bei der vorliegenden Bildqualität nicht eindeutig erkennbar. Der Querschnitt des helikalen Nukleokapsids, das aufgrund seiner Charakteristik eine gute Abgrenzung der Viren von physiologischen Zellorganellen ermöglicht, konnte auf einigen Aufnahmen erahnt werden. Es zeigte sich im Inneren der Viruspartikel als ~6–12 nm große, elektronendichte Punkte (b). Aufgrund der vorliegenden Bildqualität und des Kontrasts war dieses Merkmal allerdings nicht abschließend beurteilbar. Ansonsten zeigte sich das Innere der virusähnlichen Partikel häufig elektronendurchlässig.

Strukturen mit den genannten Charakteristika waren in den ko-Zellen deutlich schwieriger aufzufinden. Eine systematische Auszählung der Bilder wurde jedoch nicht vorgenommen.

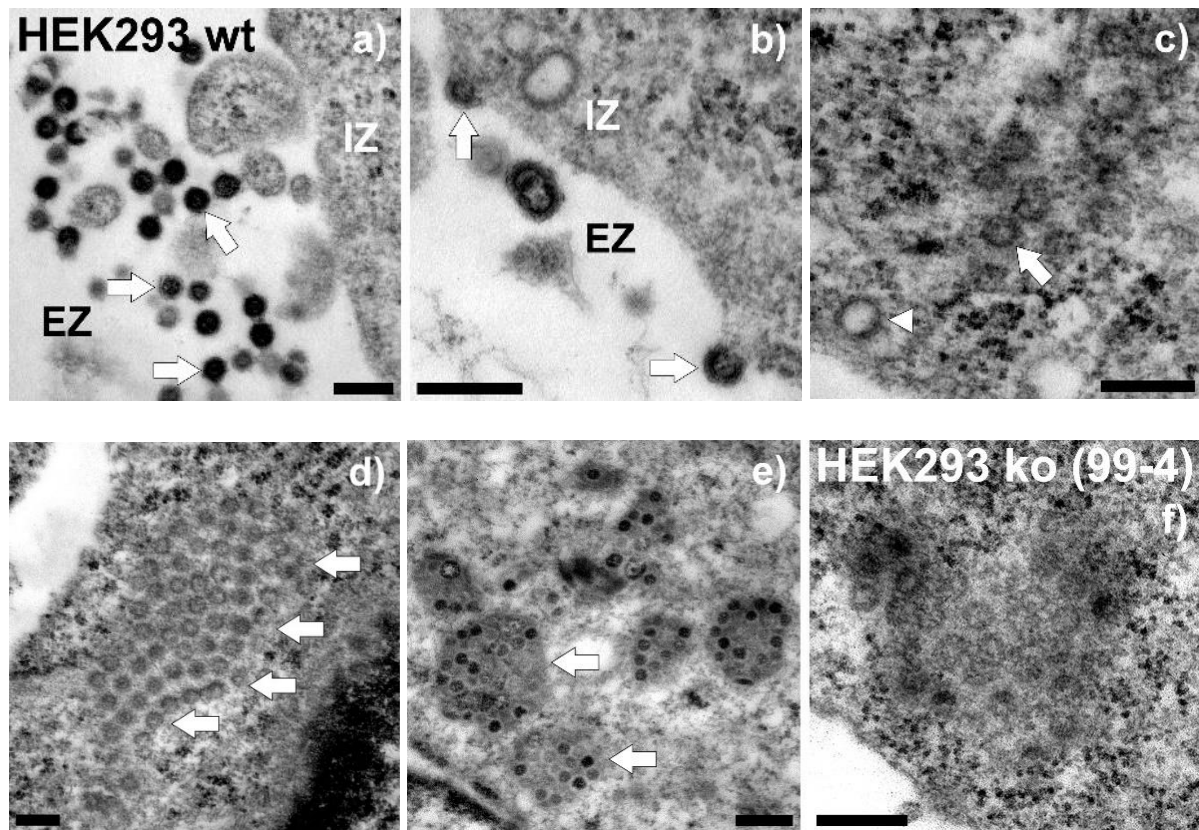


Abbildung 7. Elektronenmikroskopische Untersuchung von HEK293T CLN7 wt- und ko-Zellen (99-4) nach Inkubation mit SARS-CoV-2.

HEK293T CLN7 wt- und ko-Zellen (Sublinie 99-4) wurden nach 48 h Inkubation mit SARS-CoV-2 eingebettet und unter dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. a) bis e) zeigen Aufnahmen aus wt-Zellen, während f) ein Bild aus einer ko-Zelle ist. a) SARS-CoV-2-ähnliche Partikel neben einer Zelle. Drei mutmaßliche Viren, die im Extrazellulärraum (EZ) liegen, sind exemplarisch mit Pfeilen markiert. Die Zelle (IZ) ist am rechten Bildrand dargestellt. b) Viren-ähnliche Strukturen beim Eintritt in die Zelle. Auf der Partikeloberfläche sind die Spikes als unscharfer Saum zu erahnen. Im Inneren des Partikels deuten sich die 6–12 nm durchmessenden Nukleokapsidanschnitte als elektronendichte Punkte an. c) Intrazellulär kommen SARS-CoV-2-Viren immer in Gruppen vor. Eine Struktur, die ein SARS-CoV-2-Virus darstellen könnte, wurde mit einem Pfeil markiert. Die Viren sind einfach mit Clathrin-coated Vesicles (Pfeilspitze) zu verwechseln, die eine ähnliche Größe und einen stacheligen Saum besitzen, der der Virus-Corona ähnlich sieht. d) Eine Gruppe von SARS-CoV-2-ähnlichen Partikeln im Zytosol (exemplarisch: Pfeile). Die Vakuolenmembran, von welcher die Viren intrazellulär in Gruppen umgeben sind, ist bei der vorliegenden Kontrastierung nicht erkennbar. e) In manchen Bildern erschien der Inhalt der Vakuolen sowie die virusähnlichen Strukturen deutlich elektronendichter als in anderen (exemplarisch: Pfeile). f) Von Vakuolenmembran umgebene virusähnliche Partikel fanden sich auch in CLN7 ko-Zellen. Dort waren sie allerdings seltener anzutreffen. Skalenbalken: 250 nm.

Diese elektronenmikroskopischen Bilder gaben einen weiteren Hinweis darauf, dass sowohl die wt- als auch die ko-Subline mit SARS-CoV-2 infiziert werden kann. Das erschwerte Auffinden virusähnlicher Partikel in ko-Zellen deutet ebenfalls darauf hin, dass durch den CLN7-Knockout die initialen Schritte des viralen Replikationszyklus eingeschränkt werden. Dadurch würden in ko-Zellen weniger Viruspartikel entstehen und diese damit auch schwieriger aufzufinden sein.

3.1.3 Analyse der Infektion von Vero Wildtyp- und CLN7-Knockdown-Zellen mit SARS-CoV-2

3.1.3.1 Quantifizierung des CLN7-Knockdowns durch siRNA

Um in einer zweiten Zelllinie zu zeigen, dass CLN7-defiziente Zellen bei Infektion mit SARS-CoV-2 eine geringere Viruslast als wt-Zellen aufweisen, wurde eine Vero-Zelllinie mit CLN7-Defizienz geschaffen. Die CLN7-Defizienz wurde durch einen Knockdown mittels siRNA erreicht. Vor der Durchführung weiterer Versuche erfolgte eine Quantifizierung der Effizienz des CLN7-Knockdowns auf mRNA-Ebene.

Die Vero-Zellen wurden über einen Zeitraum von einer Woche vier Mal (Tag 1, 3, 5, 8) mittels reverser Transfektion mit siRNA gegen CLN7 (50 nM) transfiziert. Bei der reversen Transfektion wird die Transfektion mit dem Aussähen der Zellen kombiniert. Durch die wiederholte Transfektion der siRNA sollte ein starker CLN7-Knockdown erzeugt werden. Als Kontrollgruppen dienten Vero-Zellen, die nach dem gleichen Schema mit Kontroll-siRNA (50 nM) behandelt wurden („siNegativkontrolle“). Die Kontroll-siRNA wurde aus einem Pool an siRNAs gebildet, die laut Herstellerangaben an keine Sequenzen des Genoms von Mensch, Maus oder Ratte spezifisch binden und so unspezifische Effekte der siRNA aufzeigen. Als weitere Kontrollgruppe dienten nicht-transfizierte Vero-Zellen („Kontrolle“), die nach dem gleichen Schema wie die anderen beiden Versuchsgruppen gesplittet, aber nicht mit Transfektionsreagenz versetzt wurden. An Tag 10 wurden die Zellen mit SARS-CoV-2 (MOI 0,05) infiziert. 48 h später wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, cDNA synthetisiert und mittels einer qRT-PCR auf die CLN7-mRNA-Expression untersucht. Als Referenzgen wurde das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die RNA-Isolierung wurde in der Arbeitsgruppe von Profⁱⁿ Drⁱⁿ Barbara Schmidt (UKR) durchgeführt.

Die mit CLN7-siRNA behandelten Zellen wiesen gegenüber der mit Kontroll-siRNA behandelten Gruppe einen um 57 % erniedrigten Gehalt an CLN7-mRNA auf. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle war der CLN7-mRNA-Gehalt sogar 63 % geringer ($\Delta Ct_{\text{siCLN7}} = 4,7 \times 10^{-4}$; $\Delta Ct_{\text{siNegativkontrolle}} = 1,1 \times 10^{-3}$; $\Delta Ct_{\text{Kontrolle}} = 1,3 \times 10^{-3}$). Die Stichprobengröße betrug jeweils $n = 1$. Die Daten sind in Abbildung 8 dargestellt.

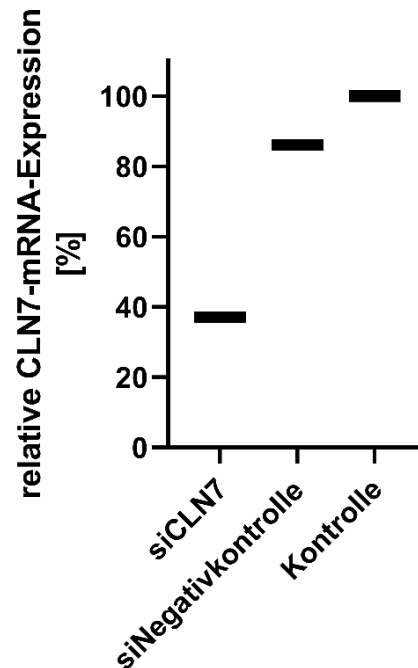


Abbildung 8. Quantifizierung des CLN7-mRNA-Knockdowns durch siRNA in Vero-Zellen.

Vero-Zellen wurden innerhalb einer Woche vier Mal mit CLN7-siRNA transfiziert und anschließend über 48 h mit SARS-CoV-2 inkubiert. Im Anschluss wurde zur Quantifizierung der CLN7-mRNA die GesamtrNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR durchgeführt. Als Referenzgen diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH); als Kontrollgruppen wurden mit Kontroll-siRNA („siNegativkontrolle“) transfizierte und unbehandelte Vero-Zellen („Kontrolle“) verwendet. Die mRNA-Menge der mit CLN7-siRNA behandelten Vero-Zellen („siCLN7“) war um 63 % geringer als in der unbehandelten Kontrollgruppe und 57% geringer als in der Negativkontrolle. Stichprobengröße je Messpunkt n =1.

Durch viermalige Transfektion mit siRNA ließ sich nach zwölf Tagen auf mRNA-Ebene ein CLN7-Knockdown auf etwa 40 % erreichen. Die statistische Aussagekraft war bei n = 1 eingeschränkt.

3.1.3.2 Viruslast

Wie bereits unter 3.1.3.1 beschrieben, sollte die geringere SARS-CoV-2-Viruslast in CLN7-ko-Zellen, die in HEK-Zellen beobachtet wurde, anhand der Vero-Zelllinie bestätigt werden. Dazu wurde gemessen, ob die Viruslast im Zellkulturüberstand der CLN7-Knockdown Vero-Zellen ebenfalls niedriger als die der wt-Zellen bzw. der Kontroll-siRNA-Gruppe war. Zusätzlich wurde orientierend die intrazelluläre Viruslast bestimmt.

Die Vero-Zellen wurden ausgewählt, weil sie bei Infektion mit SARS-CoV-2 hohe Virusreplikationskapazitäten aufweisen und dadurch hohe Level an Virus intrazellulär und im Überstand produzieren (167). Wie unter 3.1.3.1 beschrieben, wurden die Zellen

über einen Zeitraum von einer Woche vier Mal mit siRNA gegen CLN7 (50 nM) transfiziert. Hierdurch sollte ein effizienter Knockdown von CLN7 auf mRNA- und Proteinebene erzeugt werden. Nicht-transfizierte Vero-Zellen („Kontrolle“) und mit Kontroll-siRNA (50 nM) transfizierte Vero-Zellen („siNegativkontrolle“), bildeten die Kontrollgruppen. An Tag 10 – 48 h nach der letzten Aussaat und Transfektion – erfolgte eine Infektion mit SARS-CoV-2 (MOI 0,05). Weitere 48 h später (Tag 12) wurde die Viruslast im Zellkulturmedium wie unter 3.1.1.1 per qRT-PCR bestimmt. Zur Bestimmung der intrazellulären Viruslast wurden an Tag 12 aus jeder Versuchsgruppe Zellen aus je einem Zellkulturschälchen analog zu 3.1.1.4 untersucht. Die Menge der viralen RNA wurde in SARS-CoV-2-RNA-Kopien pro Well angegeben.

Im Zellkulturüberstand lag der Mittelwert der Viruslast der Zellen, die mit CLN7-siRNA behandelt worden waren, 21 % unter dem der Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren (vgl. Abbildung 9A, schmale Querstriche stehen für den MW). Gleichzeitig lag er aber nur 5 % unter dem Mittelwert der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Viruslast in den beiden Kontrollgruppen unterschied sich deutlich: Der Mittelwert der Kontroll-siRNA-Gruppe lag 21 % über der unbehandelten Kontrolle. Zusätzlich war die Streuung sehr groß, sodass sich beim Heranziehen der Mediane ein anderes Bild zeigte. Der Median der Viruslast der mit CLN7-siRNA transfizierten Zellen lag sogar über dem der nicht-transfizierten Kontrollgruppe (dicke Linie im Boxplot). Gegenüber der Negativkontrolle war der Median der siCLN7-Zellen leicht erniedrigt. Der Median der Negativkontrolle lag 27 % über dem der nicht-transfizierten Kontrolle. In der einfaktoriellen ANOVA zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Bei der Untersuchung der intrazellulären Viruslast lag der Wert der siCLN7-Gruppe um 16 % unter dem der Negativkontrolle und 6 % unter dem der unbehandelten Kontrollgruppe. Der Wert der Negativkontrolle lag um 11 % über dem der nicht-transfizierten Kontrolle (vgl. Abbildung 9B). Die Stichprobengröße betrug $n = 1$.

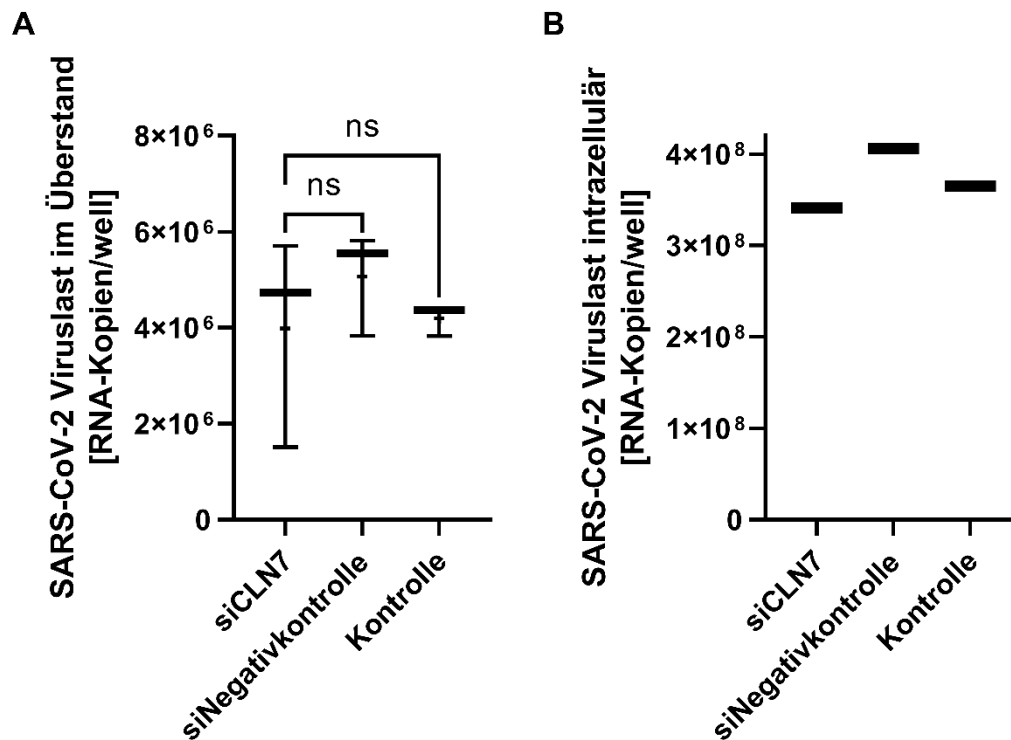


Abbildung 9. Viruslast von CLN7-Knockdown Vero-Zellen und Kontrollen nach Inkubation mit SARS-CoV-2.

Vero-Zellen wurden über zehn Tage wiederholt mit CLN7-siRNA oder Negativkontroll-siRNA transfiziert und anschließend für 48 h mit SARS-CoV-2 (MOI 0,05) inkubiert. Eine weitere Kontrollgruppe bildeten nicht-transfizierte Vero-Zellen. (A) Die Viruslast im Zellkulturüberstand wurde bestimmt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler. Die Whisker des Boxplots zeigen die Maximal- bzw. Minimalwerte an. Die Mittelwerte, die für die Signifikanztestung verwendet wurden, sind mit einem schmalen Querstrich markiert. Die Mediane sind in Form von dicken Querstrichen dargestellt. Stichprobengröße je Messpunkt $n = 3$. ns: nicht signifikant. (B) Es wurde die intrazelluläre Viruslast bestimmt. Stichprobengröße je Messpunkt $n = 1$.

Zusammenfassend ergab dieser Versuch kein klares Ergebnis. Weder die Viruslasten im Zellkulturüberstand noch die intrazellulären Viruslasten unterschieden sich zwischen den Versuchsgruppen deutlich. Zudem lieferte der Vergleich mit den Kontrollgruppen ein inkonsistentes Bild, weil sich die Kontrollgruppen teilweise untereinander mehr unterschieden als von der siCLN7-Gruppe. Die Streuung der Werte war sehr groß und keiner der Unterschiede signifikant. Abschließend konnte in diesem Versuch keine eindeutige Aussage über Unterschiede in der Interaktion mit SARS-CoV-2 zwischen CLN7-Knockdown-Zellen und Kontroll-Zellen der Vero-Zelllinie getroffen werden.

3.2 GM1-Konzentration in HEK293T Wildtyp- und CLN7-Knockout-Zellen bei Transfektion von CLN7-Plasmiden

3.2.1 GM1-Konzentration im Gruppenvergleich

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Dr. Reichold wurde gezeigt, dass in HEK293T CLN7 ko-Zellen (99-4) die Konzentration des Gangliosids Monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) signifikant niedriger als in HEK293T-wt-Zellen war. Auch die Fibroblasten von drei CLN7-Patient*innen zeigten einen geringeren GM1-Gehalt als Kontroll-Fibroblasten (127). In Anknüpfung an diese Erkenntnisse wurde untersucht, wie sich eine transiente Überexpression von CLN7 in HEK293T wt- und CLN7-ko-Zellen auf die Konzentration von GM1 auswirkt. Es wurde überprüft, ob die GM1-Expression durch das Einbringen von CLN7-Protein in die Zelle gesteigert werden kann und GM1 somit als funktioneller Marker in Frage kommen könnte. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob eine transiente CLN7-Überexpression auch in wt-Zellen zur Erhöhung von GM1 führt.

Es wurde die HEK293T CLN7 ko-Sublinie 99-4 sowie die entsprechende wt-Sublinie verwendet. Beide Sublinien wurden über zwei Tage mit zwei unterschiedlichen CLN7-exprimierenden Plasmiden transfiziert. Das erste, das pEGFP-C1-CLN7-Plasmid (im Folgenden als EGFP-CLN7-Plasmid bezeichnet), führt zur intrazellulären Synthese eines EGFP-CLN7-Fusionsproteins, welches selbst fluoresziert. Dadurch werden erfolgreich transfizierte Zellen markiert. Es ist vorstellbar, dass das mit EGFP fusionierte Protein durch die Kopplung andere Eigenschaften als das Wildtyp-CLN7-Protein haben könnte. In der Literatur finden sich zwar Hinweise, dass die Fusionierung weder Faltung noch Lokalisation des CLN7-Proteins beeinflusst (31). Dennoch sollte dieses mögliche Problem umgangen werden. Es wurde zusätzlich ein pIRES-AcGFP/CLN7-Plasmid (im Folgenden als AcGFP/CLN7-Plasmid bezeichnet) verwendet. Durch die enthaltene IRES-Kassette werden AcGFP und CLN7 als zwei unabhängige Proteine exprimiert. Der Marker AcGFP markiert das Zytosol mittels Fluoreszenz. Als Kontrollgruppen dienten unbehandelte wt- und ko-Zellen („Kontrolle“) und nur mit Transfektionsreagenz versetzte wt- und ko-Zellen („Mock“). Zusätzlich wurde jeweils eine Gruppe von wt- und ko-Zellen mit dem pIRES-AcGFP-Leerplasmid transfiziert. Dieses exprimiert ebenfalls den Marker AcGFP, aber kein CLN7. Es diente dadurch als weitere Kontrolle, um zu überprüfen, ob das zytosolische AcGFP-Protein unspezifische Auswirkungen auf die GM1-Expression hat. Mithilfe von Choleratoxin

Subunit B (CTxB-AF647), welches spezifisch an GM1 bindet (57, 171) und mit dem Fluoreszenzmarker Alexa-Fluor 647 ($\lambda_{Em} = 665 \text{ nm}$) gekoppelt war, wurden die Zellen durchflusszytometrisch am BD Accuri™ C6 untersucht. Um GM1 zu quantifizieren, wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten (MFI) von AF647 herangezogen. Die MFI wurde innerhalb eines Versuchstages auf den Wert der wt_{Mock}-Gruppe normiert (normierte mittlere Fluoreszenzintensität $nMFI = MFI / MFI_{wt(Mock)}$), um die im Zeitverlauf abnehmende Fluoreszenz des CTxB-AF647 auszugleichen. Von den plasmidtransfizierten Gruppen wurden durch Gating nur die Zellen in die Untersuchung einbezogen, die ein positives AcGFP- oder EGFP-Signal zeigten. Pro Gruppe lagen zwischen sechs und neun Replikate vor. Die nMFI-Werte wurden nach Feststellung von Normalverteilung durch den Shapiro-Wilk-Test und Varianzgleichheit durch den Spearman Test auf Heteroskedastizität mittels einer zweifaktoriellen ANOVA untersucht.

Abbildung 10 zeigt die Daten der Durchflusszytometrie in Form eines Boxplots. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Signifikanzen der relevantesten Gruppenunterschiede grafisch gekennzeichnet. Tabelle 10 zeigt die p-Werte ausgewählter Gruppenvergleiche.

Die nMFI der ko-Zellen war in allen Gruppen 50–60 % niedriger als die der wt-Zellen der jeweiligen Behandlungsgruppe. Von besonderem Interesse war dabei der Vergleich der wt_{Kontrolle} mit ko_{Kontrolle}. In der ko-Gruppe war das Fluoreszenzsignal um 51 % geringer. Im Mehrvergleichstest nach Tukey waren diese Unterschiede signifikant ($p < 0,05$; in Abbildung 10 beispielhaft mit * markiert, restliche Asterisken aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt).

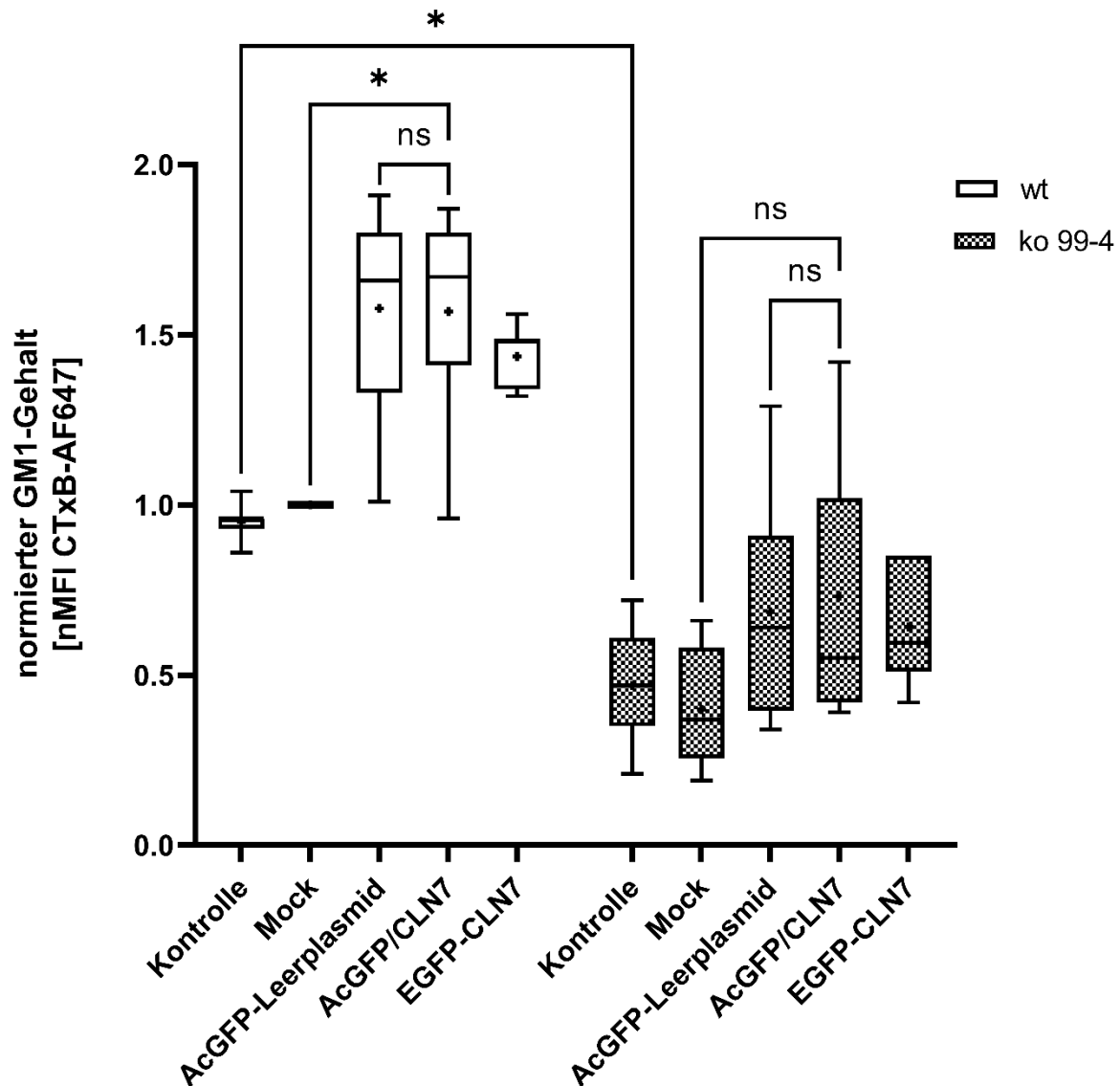


Abbildung 10. Normierter GM1-Gehalt in HEK293T wt- und CLN7-ko-99-4-Zellen nach Transfektion mit unterschiedlichen Plasmiden.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der GM1-Konzentration durch Bestimmung des Fluoreszenzsignals von CTxB-AF647 in HEK293T wt und CLN7 ko 99-4-Zellen bei Transfektion mit verschiedenen Plasmiden mit anschließender Normierung ($nMFI = MFI/MFI_{wt\ Mock}$). Alle Gruppen der CLN7-ko-Zellen hatten eine signifikant um 50–60 % niedrigere GM1-Konzentration als die wt-Zellen mit der gleichen Transfektion (beispielhaft bei $wt_{Kontrolle}$ und $ko_{Kontrolle}$ markiert). Innerhalb der ko-Zellen unterschied sich keine der Gruppen signifikant von den anderen (beispielhaft bei ko_{Mock} und $ko_{AcGFP/CLN7}$ markiert). Bei den wt-Zellen bestand zwischen wt_{Mock} und $wt_{AcGFP/CLN7}$ ($p < 0,0001$), wt_{Mock} und $wt_{AcGFP-Leerplasmid}$ ($p < 0,0001$) sowie wt_{Mock} und $wt_{EGFP-CLN7}$ ($p = 0,0121$) ein signifikanter Unterschied (beispielhaft bei wt_{Mock} und $wt_{AcGFP/CLN7}$ markiert). Jedoch waren sowohl bei der wt- als auch bei der ko-Sublinie die Unterschiede zwischen der AcGFP/CLN7- und AcGFP-Leerplasmid-Transfektion nicht signifikant. Andere Signifikanzen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingetragen. Die Whisker der Boxplots zeigen die Minimal- und Maximalwerte an. Die Mittelwerte, die für die Signifikanztestung verwendet wurden, sind mit einem +-Symbol gekennzeichnet. nMFI: normierte Fluoreszenzintensität, CTxB-AF647: Cholera toxin Untereinheit B gekoppelt mit Alexa Fluor 647. ns: nicht signifikant. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind durch * gekennzeichnet. Stichprobengröße je Messpunkt $n = 6-9$.

Alle Plasmidtransfektionen führten zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals, während die alleinige Zugabe von Transfektionsreagenz („Mock“) keine große Veränderung bewirkte. Diese Veränderungen der nMFI gegenüber der jeweiligen Mock-Gruppe waren aber nur bei den wt-Gruppen, nicht jedoch bei den ko-Gruppen signifikant (in Abbildung 10 beispielhaft für den Vergleich der Gruppen „Mock“ mit „AcGFP/CLN7“ dargestellt). Zudem spielte es dabei keine Rolle, ob das transfizierte Plasmid CLN7 enthielt oder nicht. In den ko-Zellen führte das AcGFP/CLN7-Plasmid zu einer Erhöhung der nMFI gegenüber der Mock-Gruppe um 84 %, während das AcGFP-Leerplasmid zu einer Erhöhung um 72 % führte. Der Unterschied zwischen CLN7-Plasmid und Leerplasmid war bei den wt-Zellen noch geringer: Hier erzeugte das AcGFP-Leerplasmid eine Steigung um 58 %, während das AcGFP-CLN7-Plasmid 57 % Steigerung bewirkte. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren in beiden Fällen nicht signifikant (in Abbildung 10 mit ns gekennzeichnet).

	Kontrolle	Mock	AcGFP- Leerplasmid	AcGFP/CLN7	EGFP- CLN7
	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
wt vs. ko					
Kontrolle	0,0077				
Mock	< 0,0001			ns	ns
AcGFP- Leerplasmid	< 0,0001				
AcGFP/CLN7	< 0,0001				
EGFP-CLN7	< 0,0001				
wt vs. wt					
Kontrolle		ns	< 0,0001	< 0,0001	0,0067
Mock			< 0,0001	< 0,0001	0,0121
AcGFP- Leerplasmid				ns	ns
AcGFP/CLN7					ns
EGFP-CLN7					
ko vs. ko					
Kontrolle		ns	ns	ns	ns
Mock			ns	ns	ns
AcGFP- Leerplasmid				ns	ns
AcGFP/CLN7					ns
EGFP-CLN7					

Tabelle 10. Ausgewählte p-Werte der Gruppenvergleiche von mit verschiedenen Plasmiden transfizierten HEK293T CLN7 wt- und ko 94-5- Zellen.
ns = nicht signifikant.

Die Beobachtung aus vorherigen Versuchen, dass HEK293T CLN7-ko 99-4-Zellen eine signifikant geringere GM1-Konzentration aufwiesen als die entsprechenden wt-Zellen, konnte somit auch in dieser Experimentalreihe bestätigt werden. Eine Steigerung der GM1-Menge durch das Einbringen von CLN7 in die Zelle war jedoch weder bei wt- noch bei ko-Zellen zu erreichen. Bei der wt-Sublinie führten alle Plasmidtransfektionen zu einer signifikanten Erhöhung der nMFI. Jedoch zeigte das AcGFP/CLN7-Plasmid denselben Effekt wie das gleiche Plasmid ohne CLN7. Veränderungen in der detektierten Fluoreszenzintensität ließen sich somit vermutlich auf unspezifische Effekte des transfizierten Plasmids zurückführen. Beim EGFP-CLN7-Plasmid war uneindeutig, ob die Signalsteigerung spezifisch oder unspezifisch war, da keine Kontrollgruppe in Form eines EGFP-Leerplasmids vorhanden war. In den Daten der ko-Sublinie war der gleiche Trend zu sehen, jedoch waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant.

3.2.2 Direkter Zusammenhang von CLN7- und GM1-Konzentration

Im Gruppenvergleich des eben beschriebenen Experiments war kein klarer Zusammenhang zwischen der Konzentration des exprimierten CLN7 und der Konzentration des gemessenen GM1 zu sehen. Deshalb wurde überprüft, ob dieser Zusammenhang innerhalb der einzelnen Gruppen nachzuweisen war. Dies war insbesondere für die EGFP-CLN7-Gruppe relevant, weil hier kein Leerplasmid als Kontrolle vorhanden war.

Die Daten aus dem vorherigen Versuch wurden statistisch genauer untersucht. Von der HEK293T wt- und ko-99-4-Subline wurden jeweils die mit dem AcGFP/CLN7- und mit dem EGFP-CLN7-Plasmid transfizierten Gruppen in die Auswertung einbezogen. Zur Quantifizierung des exprimierten CLN7 wurde das durchflusszytometrische Signal der Fluoreszenzmarker AcGFP bzw. EGFP herangezogen. Weil die Fluoreszenzmarker in beiden Plasmidkonstrukten in einem festen Verhältnis zu CLN7 exprimiert werden, konnten sie stellvertretend für die Konzentration von CLN7 herangezogen werden. Ein direkter Vergleich war jedoch nicht möglich, da beim EGFP-Plasmid EGFP und CLN7 als Fusionsprodukt im Verhältnis 1:1 vorlagen. Im AcGFP/CLN7-Plasmid dagegen werden AcGFP und CLN7 als einzelne Produkte in einem konstanten, aber ungleichen Verhältnis exprimiert. Die Zellen, die kein positives AcGFP- oder EGFP-Signal hatten, wurden durch das Gating ausgeschlossen. Es wurden eine Korrelationsanalyse nach Pearson sowie eine einfache lineare

Regressionsanalyse durchgeführt, um die Zusammenhänge zwischen den beiden Variablen statistisch zu prüfen. Die CLN7-Menge war dabei die unabhängige und die GM1-Menge die abhängige Variable.

In keiner der untersuchten Gruppen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem CLN7- und dem GM1-Signal. Korrelationsanalyse und Regressionsanalyse waren nicht signifikant. Der Scatterplot (vgl. Abbildung 11) zeigt die Verteilung der Daten sowie die zugehörigen Regressionsgeraden.

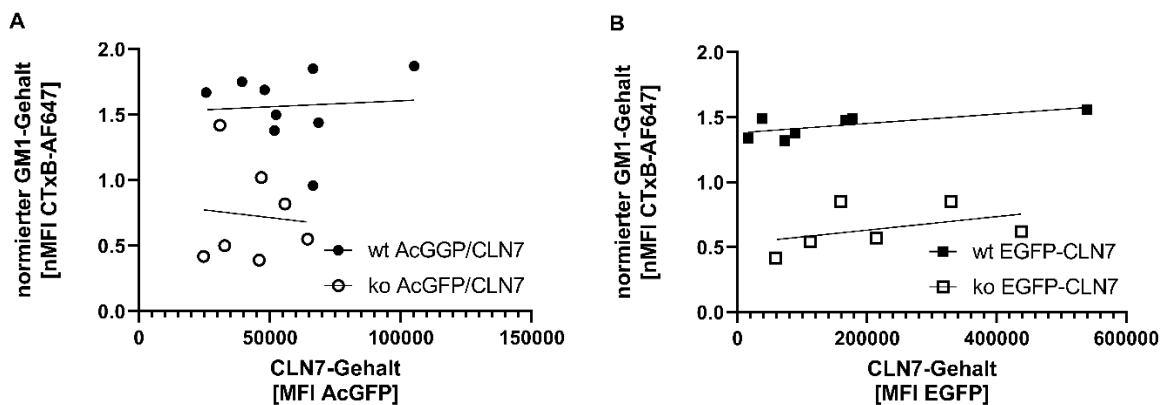


Abbildung 11. Zusammenhang zwischen CLN7 und GM1 in HEK293T wt- und CLN7-ko-Zellen (99-4) nach Transfektion mit unterschiedlichen CLN7-Plasmiden.

Durchflusszytometrische Quantifizierung des GM1-Signals in HEK293T wt- und CLN7 ko 99-4-Zellen in Relation zum CLN7-Signal nach Transfektion mit (A) AcGFP/CLN7- bzw. (B) EGFP-CLN7-Plasmid. Es wurde jeweils eine Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich kein Zusammenhang zwischen CLN7- und GM1-Menge. Die GM1-Signale von mit EGFP-CLN7 bzw. AcGFP/CLN7 transfizierten Zellen sind nicht direkt vergleichbar, da diese Plasmide CLN7 in unterschiedlichen Verhältnissen zu ihrem jeweiligen Fluoreszenzmarker exprimieren. Es sei zudem die unterschiedliche Achseneinteilung des CLN7-Gehalts erwähnt. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität, nMFI: normierte mittlere Fluoreszenzintensität, CTxB-AF647: Cholera toxin Untereinheit B gekoppelt mit Alexa Fluor 647.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass auch innerhalb der untersuchten Untergruppen kein Zusammenhang zwischen der transfizierten CLN7-Menge und der gemessenen GM1-Menge nachzuweisen war.

4 Diskussion

4.1 Infektion verschiedener CLN7-defizienter Zelllinien mit SARS-CoV-2

4.1.1 SARS-CoV-2 Viruslast in HEK293T-Zellen

Im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screeningverfahrens waren *in silico* Interaktionen zwischen CLN7 und Proteinen des SARS-CoV-2-Virus beschrieben worden. Diese möglichen Interaktionen betreffen die zentralen viralen Strukturproteine E und S, aber auch die Nicht-Strukturproteine NSP4, NSP6, ORF7A, ORF7B und ORF14 (117). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Interaktionen von CLN7 mit SARS-CoV-2-Proteinen *in vitro* einen Einfluss auf die Viruslast haben.

4.1.1.1 Viruslast im Zellkulturüberstand

Die erste Versuchsreihe wurde mit HEK293T wt- und den zwei CLN7 ko-Sublinien 94-5 und 99-4 durchgeführt. Die beiden ko-Sublinien basieren auf unterschiedlichen gRNAs des CRISPR/Cas9-Systems und wurden gewählt, um Off-Target-Effekte minimieren zu können. Diese Off-Target-Effekte treten auf, wenn durch das CRISPR/Cas9-System neben der Target-Sequenz auch andere Genomabschnitte verändert werden. Die Sublinien wurden mit SARS-CoV-2 infiziert, anschließend wurde die Viruslast im Zellkulturüberstand gemessen.

Beide CLN7-ko-Sublinien wiesen gegenüber der wt-Sublinie eine reduzierte Viruslast auf. Dies war insbesondere auch bei der CLN7-ko-Sublinie 94-5 der Fall, obwohl in den Zellen dieser Sublinie noch ca. 30 % CLN7-mRNA enthalten ist (vgl. 2.2.1.1). Jedoch ist nicht klar, ob aus dieser mRNA in der Zelle funktionsfähiges CLN7-Protein synthetisiert wird. Ein direkter Nachweis des CLN7-Proteins, beispielsweise per Antikörper, wurde nicht durchgeführt und ein Nachweis für die Funktion des CLN7-Proteins stand nicht zur Verfügung.

4.1.1.2 Behandlung mit Remdesivir

Parallel zur Bestimmung der Viruslast im Zellkulturüberstand wurde die Wirkung des antiviralen Medikaments Remdesivir überprüft. Als bekannter Inhibitor der SARS-CoV-2-Replikation diente dieses Medikament als Vergleichsgröße zur Bewertung der antiviralen Wirkung des CLN7-Knockouts.

Der Effekt des CLN7-Knockouts (Sublinie 94-5) auf die Viruslast war geringer als der von Remdesivir. Des Weiteren zeigte sich kein synergistischer Effekt von CLN7-Knockout und Remdesivir. Vielmehr wirkte Remdesivir auf wt-Zellen etwas stärker als

auf CLN7-ko-Zellen. Um diese Ergebnisse zu erklären, kann der Wirkmechanismus von Remdesivir herangezogen werden. Remdesivir ist ein Nukleotidanalogen, das die viruseigene RNA-abhängige RNA-Polymerase inhibiert und somit die Replikation des SARS-CoV-2-Genoms verhindert (172). Der Wirkmechanismus von Remdesivir setzt folglich im Replikationszyklus des Virus vermutlich nach dem des CLN7-Knockouts an, das den Untersuchungen in dieser Arbeit nach bereits die Virusadhäsion oder den Eintritt des Virus in die Zelle behindert (vgl. 4.1.1.4). Dass die beiden nicht synergistisch wirken, könnte dran liegen, dass der Effekt von Remdesivir deutlich stärker ist, sodass die Beeinflussung der Virusmenge durch den CLN7-Knockout im Vergleich nicht ins Gewicht fällt.

4.1.1.3 Zellviabilität

Zusätzlich wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. Hierdurch konnte abgeschätzt werden, ob sich das Überleben von infizierten wt- und ko-Zellen unterscheidet und welchen Einfluss die Infektionsdosis und das Medikament Remdesivir auf das Zellüberleben haben.

Das Viabilitätsassay ergab, dass das Überleben von wt- und ko-Zellen (Sublinie 94-5) nach Infektion mit SARS-CoV-2 gleich groß war (vgl. 3.1.1.3). Somit wurde die niedrigere Viruslast in der ko-Sublinie nicht durch einen vermehrten Zelltod und damit verbundenen verschlechterten Replikationsmöglichkeiten der Viren verursacht. Auch die verschiedenen Infektionsdosen bewirkten keine Unterschiede im Zellüberleben. Das Medikament Remdesivir führte hingegen zu einer deutlich verringerten Zellviabilität; in den infizierten ko-Zellen deutlicher als in den wt-Zellen. Remdesivir war für infizierte ko-Zellen folglich toxischer als für infizierte wt-Zellen.

Wurde die Viabilität in die Viruslast einbezogen, zeigte sich jedoch, dass Remdesivir die Viruslast in der wt-Sublinie stärker senkte als in der ko-Sublinie. Ein synergistischer Effekt von CLN7-ko und Remdesivir ließ sich somit weiterhin nicht nachweisen. Vielmehr war der Trend zu erahnen, dass Remdesivir auf die ko-Sublinie sogar weniger stark wirkt.

Warum das Medikament in CLN7-ko-Zellen eine höhere Toxizität zeigte, aber weniger wirksam war, bleibt zu ermitteln. In diesem Zusammenhang könnte untersucht werden, ob Remdesivir allgemein für CLN7-ko-Zellen toxischer ist oder dieser Effekt nur in Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2-Infektion auftritt.

4.1.1.4 Intrazelluläre Viruslast

Im anschließenden Versuch wurde überprüft, ob sich die intrazelluläre Viruslast zwischen infizierten HEK293T wt- und ko-Zellen unterscheidet. Für die Messung der intrazellulären Viruslast wurde eine kurze Inkubationszeit mit dem Virus gewählt, in der die Viren zwar in die Zellen eindringen, aber nicht nennenswert replizieren können (154). Aus diesem Grund konnte mit dem Experiment untersucht werden, ob der CLN7-Knockout die ersten Schritte des viralen Replikationszyklus beeinträchtigt.

Die intrazelluläre Viruslast war ebenfalls in beiden ko-Sublinien niedriger als in der wt-Linie. Das ließ die Schlussfolgerung zu, dass einer der Schritte des viralen Lebenszyklus, der vor der RNA-Replikation liegt, durch den CLN7-Knockout beeinflusst wurde. Dazu zählen die Adhäsion an die Zelle, gegebenenfalls die endozytotische Aufnahme der Partikel, die Spaltung des S-Proteins und die Fusion des Viruspartikels mit der Zellmembran. Wenn man davon ausgeht, dass durch die zweifache Behandlung mit Trypsin alle an der Zelloberfläche befindlichen Viren entfernt werden konnten, müssen Endozytose, Spaltung oder Fusion betroffen sein. Geht man hingegen davon aus, dass nicht alle Viren entfernt wurden, könnte die virale Adhäsion bei CLN7-Defizienz reduziert sein (127). Welcher dieser Schritte beeinflusst wird, muss durch weitere Experimente determiniert werden (vgl. 4.1.1.6).

4.1.1.5 Schlussfolgerungen der Infektionsversuche in HEK293T-Zellen

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse legen nahe, dass CLN7 tatsächlich auf biologisch relevante Weise mit SARS-CoV-2 interagiert und in dessen Infektionszyklus eingreift. Dabei scheinen die ersten Schritte des viralen Replikationszyklus durch CLN7 beeinflusst zu werden. Die Hemmung von SARS-CoV-2 durch einen CLN7-Knockout ist jedoch weniger stark als durch das etablierte antivirale Remdesivir. Gleichzeitig wirkt das Medikament auf CLN7-ko-Zellen weniger stark als auf die korrespondierenden wt-Zellen.

Als limitierende Faktoren der vorliegenden Arbeit muss erwähnt werden, dass die durchgeführten Versuche mit Stichprobengrößen von jeweils $n = 3$ nur limitierte Rückschlüsse zulassen. Eine Vergrößerung der Stichprobe für mehr statistische Power oder eine Überprüfung der Ergebnisse mithilfe anderer Nachweismethoden wäre vorstellbar.

Aufbauend auf den hier beschriebenen Versuchen wurde in weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe Reichold die Beobachtung gemacht, dass HEK293T wt-Zellen, die

CLN7 transient überexprimierten, eine 5,4 Mal höhere SARS-CoV-2-Viruslast als nicht-transfizierte Kontrollzellen aufwiesen (127). Dieses Erkenntnis unterstützt die These, dass CLN7 in den Replikationszyklus von SARS-CoV-2 eingreift und so die Infektion fördert.

4.1.1.6 Mögliche Interaktion von CLN7/MFSD8 mit dem Replikationszyklus von SARS-CoV-2

Die Beobachtungen lassen einige Erklärungsansätze zu, wie der SARS-CoV-2-Zelleintritt durch CLN7 beeinflusst werden könnte. Grundsätzlich gibt es zwei Hauptwege, wie SARS-CoV-2 in Zielzellen gelangt: der frühe Eintrittsweg mittels TMPRSS2 und der späte Eintrittsweg über Endozytose, der Cathepsin B/L beinhaltet (vgl. 1.4.2.2). Welcher dieser beiden Wege vorherrscht, ist davon abhängig, ob die Zielzelle TMPRSS2 exprimiert. In Zellen mit TMPRSS2-Expression können beide Mechanismen genutzt werden, während in Zellen ohne TMPRSS2 nur der Endozytoseweg in Frage kommt (173). Zweiterer ist dabei jedoch deutlich ineffektiver (174). Aktuell ist umstritten, ob und wie viel TMPRSS2 in HEK-Zellen exprimiert wird. Li et al. beschrieben, dass SARS-CoV-2 in HEK293T-Zellen aufgrund von geringen Mengen an TMPRSS2 über den Endozytoseweg aufgenommen wird (175), während andere Autor*innen in diesen Zellen durchaus TMPRSS2 nachwiesen (167, 176).

Es existieren zudem eine Reihe unterschiedlicher Endozytosewege wie die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Caveolae-vermittelte Endozytose, die Phagozytose, die Makropinozytose oder der CLIC/GEEC-Weg (vgl. 1.2). Es ist nicht abschließend geklärt, welche Art der Endozytose SARS-CoV-2 nutzt. Neben Studien, die für die Clathrin-vermittelte Endozytose sprechen (177), gibt es auch Hinweise darauf, dass SARS-CoV-2 in HEK293T-Zellen über Makropinozytose aufgenommen wird (178, 179). Andere Studien widersprechen dem wiederum (175).

Die Nutzung des Makropinozytoseweges könnte jedoch eine mögliche Erklärung für die geringere Viruslast in den in unseren Experimenten verwendeten CLN7-ko-Zellen liefern. In Versuchen der Arbeitsgruppe Reichold wurde in HEK293T CLN7 ko-Zellen (Sublinie 99-4) eine gegenüber der wt-Sublinie um 41 % reduzierte Makropinozytoserate nachgewiesen (127, 165). Ob auch andere Endozytosewege durch CLN7-Defizienz beeinflusst sein könnten, ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht bekannt.

Um den Mechanismus, über den CLN7 mit SARS-CoV-2 interagiert, genauer nachvollziehen zu können, wäre es wichtig herauszufinden, über welchen der

Aufnahmewege SARS-CoV-2 in die verwendeten HEK293T-Sublinien gelangt. In zukünftigen Experimenten könnten dafür beispielsweise HEK293T-Zellen genutzt werden, die ACE2 und TMPRSS2 stabil oder transient überexprimieren. Dadurch könnte der frühe Eintrittsweg favorisiert werden. Alternativ könnte die Makropinozytose bzw. Endozytose gehemmt werden.

Zusätzlich ist zu beachten, dass der Eintrittsweg auch von der SARS-CoV-2-Variante abhängig ist. Die ursprüngliche Virusvariante aus Wuhan verschaffte sich vor allem mittels TMPRSS2 Eintritt in ihre Wirtszellen, während beispielsweise die Omikron-Variante weniger auf TMPRSS2 angewiesen ist und eher den Endozytoseweg nutzt (180). Dies erschwert den Vergleich verschiedener Studien in der Literatur, wenn in den Experimenten verschiedene SARS-CoV-2-Varianten eingesetzt wurden, die unterschiedliche Eintrittswege nutzen.

Für die ersten Schritte der Infektion einer Zelle mit SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 scheint unabhängig vom Aufnahmemechanismus die Integrität von Lipid Rafts in der Zielzelle von zentraler Bedeutung zu sein (173, 175, 181, 182). Lipid Rafts sind kleine, dynamische, cholesterin- und sphingolipidreiche Bereiche der Plasmamembran, die eine zentrale Rolle bei der Organisation und Regulation zellulärer Signalwege spielen (vgl. 1.3) (56, 183, 184). Sie sind auch bei verschiedenen anderen Viren unter anderem in den Eintritt, die Virusassembly und das Budding involviert (185, 186). Durch die Lokalisierung von Virusrezeptoren, Co-Rezeptoren und Attachment-Faktoren scheinen Lipid Rafts beispielsweise den Eintritt verschiedener behüllter und unbehüllter Viren in ihre Zielzellen zu vermitteln (187). Auch SARS-CoV-2 ist zum Zelleintritt und für die Membranfusion vermutlich auf Lipid Rafts angewiesen (175). Bei Entzug von Cholesterin aus den Zellmembranen mittels Methyl- β -Cyclodextrin oder Statinen kam es in Zellexperimenten zu geringeren Infektionsraten sowohl mit SARS-CoV-1, als auch SARS-CoV-2 (175, 188). Das wird von einigen Autor*innen als Zeichen dafür angesehen, dass eine Störung der Lipid Rafts das Eindringen von SARS-CoV-2 behindert. Es ist jedoch umstritten, ob der Einsatz von Methyl- β -Cyclodextrin oder Statinen spezifisch die Funktion von Lipid Rafts stört, oder zusätzlich über allgemeine Veränderungen der Zellhomöostase Effekte erzeugt (73).

Die Funktion der Lipid Rafts könnte in CLN7-defizienten Zellen verändert sein. Versuche der Arbeitsgruppe Reichold geben Hinweise darauf, dass die Zusammensetzung der Lipid Rafts in CLN7-ko-Zellen gestört ist. HEK293T CLN7 ko-

Zellen (Sublinie 99-4) wiesen gegenüber den korrespondierenden wt-Zellen einen um 88 % verringerten Gehalt des Lipid Raft-Markers Monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) auf. Auch Fibroblasten von Patient*innen mit CLN7-Erkrankung zeigten einen reduzierten GM1-Gehalt (127, 165). In Experimenten in der vorliegenden Arbeit war der GM1-Gehalt der HEK293T-ko-Sublinie 99-4 gegenüber der wt-Sublinie ebenfalls um etwa 50 % verringert (vgl. 3.2.1). Auch Abschnitt 4.2 beschäftigt sich mit dem GM1-Gehalt der Versuchszellen. Ein weiteres Indiz für die Beeinflussung des SARS-CoV-2-Eintritts über Lipid Rafts ist, dass Hydroxychloroquin, eine Substanz, die in vitro stark gegen SARS-CoV-2 wirksam ist, zumindest in Teilen über eine Störung von GM1 in Lipid Rafts wirkt (127, 189). Jedoch werden Chloroquin und Hydroxychloroquin auch andere Wirkmechanismen zugeschrieben, wie die Neutralisierung des endolysosomalen pH-Werts (vgl. unten), die Inhibition von Lysosomen und Autophagosomen (190, 191), eine Verringerung der Bindungskapazität an ACE2 (192) oder die Störung von viralen Replikationsmechanismen (193, 194). Zudem könnte GM1 auch als Co-Rezeptor für das Binden von SARS-CoV-2 an seine Zielzellen eine Rolle spielen (127, 195). Der reduzierte GM1-Gehalt in CLN7-ko-Zellen könnte also direkt über verminderte Virusbindung oder eine Funktionsstörung der Lipid Rafts einen Einfluss auf die Viruslast nehmen. Einige Studien postulieren zudem, dass der zelluläre SARS-CoV-Rezeptor ACE2 vor allem in Lipid Rafts lokalisiert ist (175, 188), während andere dem widersprechen (196, 197). In Versuchen der Arbeitsgruppe Reichold exprimierten HEK293T CLN7 ko-Zellen weniger ACE2-Rezeptoren. In den beiden ko-Sublinien 94-5 und 99-4 war die Menge des ACE2-Rezeptors gegenüber der wt-Sublinie um etwa 40 % reduziert (127). Ob dies in direkter Korrelation mit der verringerten Viruslast in ko-Zellen steht, blieb jedoch offen und bedarf weiterer Untersuchungen (198). Und auch, ob die Lokalisation von ACE2 in Lipid Rafts für den Viruseintritt überhaupt relevant ist, wird diskutiert. Bolland et al. zeigten, dass ACE2 in den von ihnen untersuchten Zelllinien nicht in Lipid Rafts liegt und es keinen Unterschied zwischen der Virusaufnahme von SARS-CoV-2 in Zellen mit in Lipid Raft-lokalisiertem ACE2 und normal lokalisiertem ACE2 gab. Jedoch bestätigten auch diese Autor*innen die Cholesterin-Abhängigkeit des SARS-CoV-2-Eintritts in Zielzellen (73).

Einen anderen Erklärungsansatz für die geringere Viruslast in CLN7-defizienten Zellen liefert die gestörte Lysosomenfunktion. Der Zelleintritt von SARS-CoV-2 in HEK293T-Zellen zeigte sich abhängig von einem sauren pH-Wert in den Endolysosomen. Bei

einem erhöhten pH-Wert war der Viruseintritt weniger effektiv (175, 199). Dies scheint unter anderem an der verringerten Funktion der Cathepsine zu liegen, die auf einen sauren pH-Wert angewiesen sind (200, 201). Während TMPRSS2 unabhängig vom pH-Wert aktiv ist (96, 134), wurde gezeigt, dass Cathepsin L für die Membranfusion von SARS-CoV-1 einen pH-Wert von 6,0 oder niedriger benötigte (202). Auch die Wirkung von Chloroquin und Hydroxychloroquin wird unter anderem auf eine Neutralisierung des pH-Wertes der Lysosomen zurückgeführt (194). Bei vielen NCL-Erkrankungen ist der lysosomale pH-Wert erhöht, unter anderem auch bei der CLN7-Erkrankung (19, 203). Zumindest ein Teil der verringerten Viruslast in CLN7-ko-Zellen könnte folglich Resultat der gestörten Lysosomenfunktion sein. Auch eine veränderte Aktivität von Cathepsin B könnte in den Mechanismus involviert sein. Es gibt Verbindungen zwischen NCLs und verschiedenen Cathepsinen. Unter diesen befinden sich die Cathepsine D und F (CTSD, CTSF), die selbst durch die NCL-Gene CLN10 und CLN13 codiert werden. Doch auch die Cathepsine B und L (CTSB, CTSL), die im Replikationszyklus von SARS-CoV-2 im Rahmen des Endozytosewegs essenziell sind, interagieren mit verschiedenen CLNs. Die Aktivität von Cathepsin B ist in verschiedenen NCL-Formen verändert (34), so auch bei CLN7 (204). Da jedoch eine Überexpression von CLN7 in wt-Zellen zu einer erhöhten Viruslast führte, ist es unwahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf den erhöhten lysosomalen pH-Wert oder eine veränderte Aktivität von Cathepsinen zurückzuführen sind (127).

Bedeutsam wäre außerdem eine genauere Untersuchung des Virusaustrittes. SARS-CoV-2 nutzt dafür die lysosomale Exozytose, sodass auch hier eine Involvierung von CLN7 denkbar ist (85, 116). Der Mechanismus der lysosomalen Exozytose ist auch zur Behandlung von lysosomalen Speichererkrankungen (LSDs) relevant. In der Forschung gibt es Ansatzpunkte, diesen Mechanismus zu nutzen, weil eine Stimulation der lysosomalen Exozytose einen positiven Effekt auf das akkumulierte Speichermaterial haben könnte (205).

4.1.1.7 SARS-CoV-2 und weitere lysosomale Speichererkrankungen

Auch bei anderen LSDs gibt es Hinweise darauf, dass sie Auswirkungen auf den Infektionszyklus von SARS-CoV-2 haben. Ein Beispiel hierfür ist Morbus Niemann-Pick-Typ C. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine autosomal-rezessive LSD, die zu Ablagerungen von Cholesterin und Sphingolipiden in späten Endosomen und

Lysosomen führt. Das betroffene Protein Niemann-Pick C1 (NPC1) ist ein transmembranöser Cholesterol-Transporter in späten Endosomen und Lysosomen, der Cholesterol zu verschiedenen Zellkompartimenten transportiert. Bei in-vitro-Experimenten mit NPC1-Zellmodellen führte ein Knockdown des NPC1-Proteins ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der Infektiosität mit SARS-CoV-2. Auch hier war vor allem die Eintrittsphase des Virus in die Zelle beeinträchtigt. Dabei war der Gehalt vor allem des ACE2-Rezeptors, aber auch von TMPRSS2 an der Zelloberfläche, in NPC1-defizienten Zellen reduziert. Durch Entzug von Cholesterol an der Plasmamembran kam es zu einer Umverteilung von ACE2 in das autophagosomal-lysosomale Kompartiment. Zudem wurde eine direkte Interaktion von NPC1 mit der Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des S-Proteins von SARS-CoV-2 bei Aufnahme über den Endozytoseweg beschrieben (173, 206). Das Verhalten der Niemann-Pick-Typ-C-Zellmodelle weist eindeutige Parallelen zu den Ergebnissen in dieser Arbeit auf. Und auch in anderen Kontexten wurden bereits deutliche Gemeinsamkeiten der Niemann-Pick-Typ-C-Erkrankung mit der CLN7-Erkrankung festgestellt (165). Es bleibt zu ermitteln, ob die beiden LSDs über spezifische Mechanismen in den Replikationszyklus von SARS-CoV-2 eingreifen, oder die allgemeine Störung der Lysosomenfunktion zu einer Behinderung der Infektion führt. Die mit NPC1 durchgeführten Experimente könnten aber Anregungen für weitere Versuche mit CLN7 geben, um weitere mögliche Gemeinsamkeiten in den Pathomechanismen zwischen den beiden LSDs darzustellen.

Studien mit weiteren LSDs geben auch klinische Einblicke. Es gibt beispielsweise Hinweise darauf, dass Patient*innen mit Morbus Fabry seltener und schwächer an COVID-19 erkranken (207). Die Gründe dafür sind aktuell Gegenstand der Forschung. Als mögliche Erklärungen kommen Störungen in der Funktion der Endolysosomen oder eine geringere Aktivität von Cathepsin L in Frage (208, 209). Interessanterweise können auch Nebenwirkungen des COVID-19-Medikaments Hydroxychloroquin einem Morbus Fabry ähneln, was ein Hinweis auf einen ähnlichen Wirk-/Pathomechanismus sein könnte (210). Ähnliches zeigte sich bei Patient*innen mit Morbus Gaucher, einer weiteren häufigen LSD. Verschiedene Fallberichte aus der ganzen Welt schildern auch bei dieser Erkrankung vergleichsweise geringe Infektions- und Komplikationsraten. Neben Erklärungsansätzen, die veränderte Reaktionen des Immunsystems von Gaucher-Patient*innen berücksichtigen, gerät auch hier die Störung der Lysosomenfunktion in den Fokus (211).

Die Beobachtungen, dass auch bei anderen LSDs der SARS-CoV-2-Zelleintritt in vitro reduziert ist und COVID-19 klinisch weniger schwer verläuft, könnten wiederum ein Hinweis darauf sein, dass eine beeinträchtigte Lysosomenfunktion den Effekt zumindest teilweise erklärt. Über klinische Auswirkungen der Interaktion von CLN7 mit SARS-CoV-2 ist zum aktuellen Zeitpunkt nichts bekannt. Insbesondere liegen bisher keine Fallberichte oder Studien über COVID-19-Verläufe bei CLN(7)-Erkrankten vor.

Ob CLN7 direkt mit Strukturen des SARS-CoV-2-Virus interagiert oder den Zelleintritt indirekt - beispielsweise über Störungen der Endozytose/Makropinozytose, der Lipid Rafts, der ACE2-Menge, oder der Lysosomenfunktion - beeinflusst, bleibt zum aktuellen Zeitpunkt offen. In der Zukunft könnten mögliche direkte Bindungen von Virusbestandteilen mit CLN7 beispielsweise durch biochemische oder genomische Ansätze identifiziert werden (206), der Eintrittsmechanismus der SARS-CoV-2-Viren in das verwendete Zellmodell determiniert werden, die Menge und Aktivität von TMPRSS2 und Cathepsin B/L oder die intrazelluläre Menge und Lokalisation von ACE2 bestimmt werden. Auch mögliche Parallelen mit anderen LSDs und klinische Auswirkungen könnten erforscht werden.

4.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Nachdem die erfolgreiche SARS-CoV-2-Infektion von HEK293T wt- und CLN7-ko-Zellen durch qRT-PCR nachgewiesen und Unterschiede in der Viruslast detektiert worden waren, sollten die Viren in den Zellen visualisiert werden. Einige Virusbestandteile und Hinweise auf den viralen Replikationszyklus lassen sich elektronenmikroskopisch nachweisen (163). Deshalb wurden Schnitte von infizierten wt- und CLN7 ko-Zellen (Sublinie 99-4) der HEK293T-Zelllinie unter einem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet.

Es wurde erwartet, dass sich in HEK293T CLN7-ko-Zellen weniger Strukturen zeigen, die mit dem Virus und dessen Replikation in Verbindung stehen. In den vorherigen Versuchen hatten die CLN7-ko-Zellen eine geringere Viruslast als die korrespondierenden wt-Zellen aufgewiesen (vgl. 3.1.1). Außerdem stellte sich heraus, dass durch den CLN7-Knockout der virale Zelleintritt spezifisch erschwert wurde (vgl. 3.1.1.4). Somit ist durch die CLN7-Defizienz die virale Adsorption, eventuell die endozytotische Aufnahme in die Zelle, die Spaltung des S-Proteins oder die Fusion der viralen Membran mit der der Wirtszelle eingeschränkt. Dies könnte sich auch in den elektronenmikroskopischen Bildern zeigen. Beispielsweise stellt sich eine verringerte

Virusadhäsion durch eine geringere Anzahl von Viruspartikeln auf der Zelloberfläche dar. Der Replikationsprozess selbst lässt sich nur indirekt durch Veränderungen der zellulären Ultrastruktur nachweisen. Zelluläre Funktionen werden durch die Viren direkt beeinflusst und umgesteuert. Hier treten in manchen Fällen Doppelmembranvesikel (DMVs), komplex gefaltete Membranen und vermehrt kubische Membranstrukturen auf, wobei letztere jedoch nicht spezifisch für Infektionen mit Coronaviren sind (163). Das Fehlen dieser Strukturen schließt eine Infektion jedoch nicht aus (162). Weil der CLN7-Knockout die Infektion mit dem Virus nur vermindert, allerdings nicht komplett verhindert, war davon auszugehen, dass auch in den ko-Zellen virusassoziierte Strukturen nachzuweisen sind. Wäre hingegen alleinig ein späterer Schritt des viralen Replikationszyklus, beispielsweise der Virusaustritt aus der Zelle, betroffen, wären Zellen voller fertiger Virionen in ihren lysosomalen Vesikelmembranen zu erwarten.

In den untersuchten Zellen ließen sich Strukturen nachweisen, die nach Bullock et al. Merkmale von Coronaviren trugen (162). In CLN7 ko-Zellen waren die beschriebenen Partikel deutlich seltener aufzufinden als in den wt-Zellen. Eine Quantifizierung fand nicht statt.

4.1.2.1 Ultrastrukturelle Charakteristika von SARS-CoV-2 und morphologische Verwechslungen in der Transmissionselektronenmikroskopie

Die Identifikation von Coronaviren per Elektronenmikroskopie ist nicht trivial und erfordert Kenntnisse der Virusmorphologie und -morphogenese. In der Zelle gibt es eine ganze Reihe physiologisch vorkommender Strukturen, die fälschlicherweise für SARS-CoV-2-Partikel gehalten werden können. Zahlreiche Artikel und Reviews befassen sich mit diesem Problem, weisen auf falsche Zuschreibungen hin und zeigen korrekte Charakteristika der Viren auf (162-164, 170, 212). Bullock et al. fassen vier Punkte zusammen, die verdächtige Strukturen erfüllen müssen, um zweifelsfrei als Coronaviren identifiziert werden zu können (162): Erstens handelt es sich bei Coronaviren um behüllte Viren, die eine Größe von 60–140 nm aufweisen (74). Zweitens zeigen sie auf der Oberfläche die sogenannten Spikes, die auf extrazellulären Viren sichtbar sein können. Auf intrazellulären Partikeln ist dies unwahrscheinlicher; es sei denn, es wurde eine Spezialfärbung mit Tanninsäure angewendet. Des Weiteren befinden sich intrazelluläre Viruspartikel niemals einzeln im Zytoplasma, sondern immer innerhalb zytoplasmatischer Vakuolen. Das liegt daran,

dass die Coronaviren nach Ausknospung im ER-to-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) in Gruppen über lysosomalen Transport an die Plasmamembran gelangen. Dort werden sie durch Verschmelzung der Lysosomenmembran mit der Plasmamembran der Zelle exozytiert (85). Ein charakteristisches Kennzeichen reifer extrazellulärer Coronaviren ist, dass sie der Plasmamembran von außen anhaften. Allerdings können sie auch in größerer Entfernung zur Wirtszelle vorkommen. Viertens besitzen Coronaviren das helikale Nukleokapsid, das im Querschnitt als kleine, elektronendichte Punkte von 6–12 nm Durchmesser im Inneren der Virionen sichtbar ist.

Es werden in der Literatur weiterhin verschiedene zelluläre Strukturen beschrieben, die häufig fälschlicherweise für SARS-CoV-2-Partikel gehalten werden. Zu diesen zählen Coated Vesicles (CVs) – wie beispielsweise Clathrin- oder Coatomer-coated Vesicles, späte Endosomen und kreisförmige Anschnitte des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) (162). Doch auch Anschnitte von Kernporen oder Mikrovilli können mit Viren verwechselt werden (164). Keine dieser Strukturen weist jedoch die elektronendichten Punkte im Inneren auf, die die Anschnitte des Nukleokapsids kennzeichnen. Sie können aber andere Charakteristika von Viruspartikeln erfüllen. CVs beispielsweise haben eine sphärische Form und ähnliche Größe wie SARS-CoV-2 und zeigen einen Saum von Spike-ähnlichem Clathrin oder Coatomer-Protein. Ihre Funktion ist die Endozytose. Sie kommen jedoch frei im Zytoplasma vor, anstatt in membranumgebenen Gruppen, und sind dadurch von Coronaviren zu unterscheiden. Das gleiche trifft auf Anschnitte des rERs zu, dessen Ribosomen auf der Oberfläche ebenfalls für Spikes gehalten werden können. Ihre Größe variiert aber deutlich. Am schwierigsten von SARS-CoV-2 zu unterscheiden sind die multivesikulären Körperchen (Multivesicular Bodies, MVBs), eine Unterform der späten Endosomen. Sie stellen sich ebenfalls als membranumhüllte Vakuolen dar, die eine Vielzahl kleiner, runder Strukturen (sog. intraluminale Vesikel (163)) in der Größe von Coronaviren enthalten. Ihnen fehlen aber die charakteristischen Anschnitte des Nukleokapsids. Sie sind für das Sortieren und Transportieren membranassoziierter Proteine für die lysosomale Degradierung zuständig oder geben ihre intraluminalen Vesikel als Exosomen aus der Zelle ab. Die Autor*innen betonen außerdem, dass verdächtige Strukturen bei fehlender Qualität der elektronenmikroskopischen Schnitte oft nicht eindeutig identifiziert werden können, da die Ultrastruktur gut erhalten sein muss (162).

4.1.2.2 Validierung von SARS-CoV-2-ähnlichen Strukturen

Es gibt einige mögliche Maßnahmen zur Verifikation coronavirusverdächtiger Strukturen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Eine Möglichkeit zur Abgrenzung mutmaßlicher Viren von physiologischen Strukturen ist der Vergleich mit einer nicht-infizierten Kontrollgruppe (164). Treten in dieser Negativkontrolle vergleichbare virusverdächtige Strukturen auf, lassen sie sich als nicht-viralen Ursprungs klassifizieren. Auch eine Optimierung der Einbettung und Kontrastierung der Schnitte, die eine bessere Abgrenzung von Viruspartikel, Vakuolenmembranen und Nukleokapsidanschnitten erlaubt, wäre denkbar. Eine weitere Möglichkeit, die Coronavirus-ähnlichen Strukturen als Viren zu verifizieren, ist die Kombination mit einer weiteren Nachweismethode. Zwar wurde durch die qRT-PCR bereits der Nachweis erbracht, dass die Zellen virale mRNA enthalten, jedoch könnten andere histopathologische Verfahren einen eindeutigen visuellen Eindruck verschaffen. Zu diesem Zweck können z.B. Immunhistochemie (IHC) oder In-situ-Hybridisierung (ISH) verwendet werden. Bei diesen Methoden werden SARS-CoV-2-Proteine bzw. -RNA mit spezifischen primären Antikörpern adressiert. An die primären Antikörper binden im zweiten Schritt sekundäre Antikörper, die an einen Farbstoff gekoppelt sind. Dadurch werden die Virusstrukturen angefärbt. Allerdings lassen sich mit Hilfe dieser Nachweismethoden keine intakten Viren, sondern nur einzelne Bestandteile derselben zeigen. Eine weitere, aber aufwändigere Möglichkeit wäre die Immuno-Elektronenmikroskopie. Diese nutzt ebenfalls Antikörper gegen virale Strukturen, die an Goldpartikel gekoppelt werden. Diese Partikel zeigen sich in der anschließenden Elektronenmikroskopie als elektronendichte schwarze Punkte und markieren dadurch den gesuchten Virusbestandteil (162). Neben den Virusbestandteilen könnten mithilfe dieser Methoden auch Veränderungen der zellulären Ultrastruktur wie DMVs und komplex gefaltete Membranen gezielt gesucht und ausgewertet werden.

Zusammenfassend konnten in den im Rahmen dieser Arbeit angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen virusähnliche Strukturen nachgewiesen werden. In CLN7-ko-Zellen gab es davon deutlich weniger. Eine absolute Quantifizierung fand jedoch nicht statt. Der elektronenmikroskopische Nachweis von SARS-CoV-2 ist anspruchsvoll, weil viele zelluläre Strukturen fälschlicherweise für Virusbestandteile gehalten werden können. Virusverdächtige Partikel könnten durch weitere Nachweismethoden weiter verifiziert werden.

4.1.3 SARS-CoV-2 Viruslast in Vero-Zellen

In der nächsten Versuchsreihe sollten die Beobachtungen aus den HEK293T-Zellen in einer zweiten Zelllinie bestätigt werden. Es wurden Vero-Zellen verwendet, die aufgrund ihrer hohen Virusreplikationskapazitäten und damit verbundenen hohen Viruslast häufig in der virologischen Forschung eingesetzt werden (167). Es wurde erwartet, dass sich durch die starke Virusreplikation in diesen Zellen Unterschiede zwischen wt- und ko-Sublinien noch deutlicher als in den HEK-Zellen zeigen. Die CLN7-Defizienz sollte für diesen Versuch durch einen Gen-Knockdown mittels siRNA erreicht werden. Die Zellen wurden über sieben Tage mehrfach mit CLN7-siRNA transfiziert. Anschließend wurden sie mit SARS-CoV-2 inkubiert und zwei Tage später die Viruslast im Zellkulturüberstand und orientierend auch intrazellulär gemessen.

An Tag elf konnte durch die siRNA eine Reduktion der CLN7-mRNA um ca. 60 % gegenüber der Negativkontrolle erreicht werden. Auf Proteinebene wurde keine Analyse der CLN7-Menge durchgeführt. In Vero-Zellen zeigte die CLN7-defiziente Gruppe keine geringere SARS-CoV-2 Viruslast im Überstand als die Kontrollzellen. Die Daten wiesen zudem eine große Streuung auf und es gab große Unterschiede zwischen arithmetischem Mittelwert und Median. Intrazellulär war die Viruslast der CLN7-Knockdown-Gruppe gegenüber den Kontrollgruppen marginal reduziert. Allerdings ist die Aussagekraft dieser Beobachtung bei $n = 1$ eingeschränkt.

Es gibt eine Reihe von Erklärungsansätzen, warum die Viruslast in den siRNA-behandelten Vero-Zellen nicht niedriger als die der Kontrollgruppen war. Im Gegensatz zum vollständigen Knockout in den HEK-Zellen wurde in den Vero-Zellen durch die siRNA nur ein Knockdown von ca. 60 % erzeugt. Es war also noch etwa 40 % der CLN7-mRNA und damit möglicherweise eine Restfunktion des CLN7-Proteins vorhanden, welche eine normal hohe Infektion durch SARS-CoV-2 bedingt haben könnte. Die CLN7-Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt. Betroffene haben immer einen biallelischen Defekt im CLN7-Gen und damit kein funktionelles CLN7-Protein in ihren Zellen. Heterozygote Träger zeigen in der Regel keine Symptome der Krankheit. Das bedeutet, dass eine CLN7-Expressionsstärke von 50 % ausreicht, um eine normale Zellfunktion zu garantieren. Auch ein CLN7-Knockdown auf 40 % CLN7-mRNA könnte für eine normale Zellfunktion ausreichen oder diese nur leicht einschränken. Des Weiteren wurde die Effizienz des CLN7-Knockdowns durch die siRNA nur in einer einzelnen Stichprobe überprüft. Für statistische Aussagekraft

müsste die Stichprobe vergrößert werden. Dies war aus zeitlichen Gründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Außerdem konnte die Höhe des Knockdowns nur auf mRNA-Ebene, nicht aber auf Proteinebene, überprüft werden. Da die Halbwertszeit des CLN7-Proteins nicht bekannt ist, kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass auch auf Proteinebene ein Knockdown vorlag.

Es erscheint somit sinnvoll, die Effizienz des CLN7-Knockdowns zu erhöhen. Dabei ist zu beachten, dass die verwendeten siPools gegen das humane CLN7 designt waren. Vero-Zellen stammen jedoch aus der Grünmeerkatze, einer Affenart (128). CLN7 ist zwar in verschiedenen Spezies hoch konserviert (25, 26), aber es war nicht nachvollziehbar, inwiefern der CLN7-siPool bei Zellen der Grünmeerkatze funktioniert, da die genauen Sequenzen der im siPool enthaltenen siRNAs nicht vorlagen. Ein Lösungsansatz wäre beispielsweise bei bekannten siRNA-Sequenzen ein Sequenzvergleich mit der Ziel-mRNA des CLN7-Gens der Grünmeerkatze oder das Design von Grünmeerkatze-spezifischen siPools. Alternativ könnte eine andere in der SARS-CoV-2-Forschung etablierte, humane Zelllinie wie CaCo-2-, Calu-3- oder Huh-7-Zellen für weitere Experimente gewählt werden (126). Außerdem sollte beachtet werden, dass SARS-CoV-2 bei Passage in Vero-Zellen schnell seine Furin-Spaltstelle verliert und sich dadurch der Mechanismus des Zelleintritts verändert (213). Dadurch könnten Versuche, die mit zeitlicher Distanz zueinander durchgeführt werden, schlechter miteinander vergleichbar sein. Expressieren die Zellen jedoch TMPRSS2, wird dieser Verlust verhindert, sodass inzwischen hauptsächlich die TMPRSS2-exprimierenden Zelllinien Vero-TMPRSS2-, Caco-2 und Calu-3 in der Forschung eingesetzt werden (85, 214).

Zudem induziert das Behandeln mit Transfektionsreagenzien zusätzliche Zytotoxizität. Durch die wiederholte Transfektion der Vero-Zellen mit siRNA könnte ein Selektionsdruck ausgeübt worden sein, der Zellen mit einem bestimmten Phänotyp bevorzugt haben könnte. Beispielsweise könnten sich Zellen mit einem nicht-repräsentativen, höheren CLN7-Gehalt durchgesetzt haben, da Zellen mit geringem CLN7-Gehalt durch den Verlust des Proteins vulnerabler sein könnten. Andere Transfektionsreagenzien oder Transfektionsmethoden wie die Elektroporation könnten daher erfolgreicher sein. Auf eine wiederholte Transfektion könnte dann verzichtet werden (215). Zur Optimierung der Transfektionseffizienz könnte zudem eine Positivkontroll-siRNA eingesetzt werden und die Effizienz des CLN7-Knockdowns dadurch erhöht werden. Alternativ könnte ein dauerhafter Knockout/-down von CLN7

in der Vero-Zelllinie erzeugt und der Versuch wiederholt werden. Ein konstitutiver Knockdown wäre beispielsweise durch siRNA möglich, die mittels eines Expressionsvektors oder Virus dauerhaft in die Zielzellen eingeschleust wird. Alternativ würde sich ein stabiler Knockout über die CRISPR/Cas9-Methode eignen. Zudem zeigte sich die Negativkontrolle der siRNA als nicht verlässlich. Teilweise war der Unterschied in der Viruslast zwischen ihr und der nicht-transfizierten Kontrollgruppe größer als der Unterschied zur Knockdown-Gruppe (vgl. 3.1.3.2). Auch hierfür könnte die Erklärung im Design des verwendeten siPools liegen. Der Hersteller garantiert, dass die verwendeten siRNAs keine spezifische Bindung an Sequenzen im Genom von Mensch, Maus oder Ratte eingehen und somit keinen Abbau dieser Sequenzen verursachen. Dadurch werden unspezifische Effekte der siRNA aufgezeigt. Jedoch ist der Negativkontroll-siPool nicht für das Genom der Grünmeerkatze validiert. Auch hier könnte eine optimierte Negativkontrolle eingesetzt werden.

Die Stichprobengröße der Versuchsgruppen war mit $n=3$ relativ gering. Durch eine Vergrößerung der Stichprobe wäre eine größere statistische Power und damit mehr Aussagekraft der Ergebnisse erreichbar.

Zusätzlich sollten Überlegungen angestellt werden, inwiefern sich das Ergebnis einer SARS-CoV-2-Infektion von Vero-Zellen mit dem von HEK-Zellen vergleichen lässt. Während der TMPRSS2-Gehalt von HEK-Zellen umstritten ist (vgl. 4.1.1.6) ist er bei Vero-Zellen nachweislich sehr niedrig (134, 135). In der Vero-Zelllinie überwiegt beim Eintritt von SARS-CoV-2 folglich der Endozytose-Weg (125, 177), während bei der HEK-Zelllinie nicht klar ist, welcher Eintrittsweg genutzt wird und auch der TMPRSS2-Weg möglich scheint. Sollten sich die Wege, über die SARS-CoV-2 in die jeweilige Zelllinie eintritt, unterscheiden, wäre die Vergleichbarkeit zwischen den beiden Zelllinien eingeschränkt. Es könnte sein, dass CLN7 nur einen dieser Wege beeinflusst. Wäre jedoch bekannt, über welchen Mechanismus SARS-CoV-2 in die beiden Zelllinien eintritt, könnte das Ergebnis in Vero-Zellen hingegen interessante Rückschlüsse liefern. Um die verschiedenen Pathways explizit zu untersuchen, könnte z.B. die Zelllinie Vero-76 eingesetzt werden, die humanes TMPRSS2 exprimiert (173).

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte nicht festgestellt werden, ob die SARS-CoV-2-Viruslast auch in einer anderen Zelllinie mit CLN7-Defizienz reduziert ist.

Es ergaben sich keine neuen Erkenntnisse zur Interaktion zwischen CLN7 und SARS-CoV-2. Die Fragestellung bleibt jedoch relevant und sollte unter optimierten experimentellen Bedingungen weiter untersucht werden.

4.2 GM1-Konzentration in HEK293T Wildtyp- und CLN7-Knockout-Zellen bei Transfektion von CLN7-Plasmiden

In Vorversuchen der Arbeitsgruppe von Dr. Reichold wiesen HEK293T CLN7 ko-Zellen (Sublinie 99-4) eine geringere GM1-Menge als wt-Zellen auf. Und auch in den Fibroblasten von CLN7-Patient*innen ließ sich ein reduzierter GM1-Gehalt nachweisen (127).

In Anknüpfung an diese Erkenntnisse wurde untersucht, wie sich eine transiente Überexpression von CLN7 in HEK293T wt- und CLN7-ko-Zellen auf die Konzentration von GM1 auswirkt. Es wurde überprüft, ob die GM1-Expression durch das Einbringen von funktionalem CLN7-Protein in die Zelle gesteigert werden kann. Hingegen die Menge von GM1 direkt mit CLN7 zusammen, käme GM1 möglicherweise als funktioneller Marker für CLN7 in Frage. Das ist relevant, weil für das CLN7-Protein bisher kein funktioneller Marker vorliegt.

Es wurden HEK293T wt- und CLN7 ko-99-4-Zellen mit verschiedenen CLN7-exprimierenden Plasmiden transfiziert, das GM1 dieser Zellen mittels CTxB-AF647 fluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch vermessen. Bei CTxB handelt es sich um die B-Untereinheit des Choleratoxins, das spezifisch an GM1 bindet (57, 140). Die GM1-Konzentrationen wurden untersucht und der genaue Zusammenhang zwischen CLN7- und GM1-Menge wurde mittels einer Regressionsanalyse statistisch analysiert. Auch in dieser Versuchsreihe war der GM1-Gehalt von HEK293T CLN7-ko 99-4-Zellen gegenüber den wt-Zellen vermindert (vgl. 3.2.1). Die Ergebnisse von Heintz et al. ließen sich reproduzieren (127). Allerdings war weder in wt- noch in ko-Zellen durch die CLN7-Überexpression eine Steigerung von GM1 zu erreichen. Vielmehr verursachte jede Art von Plasmidtransfektion, egal ob mit oder ohne CLN7, einen Anstieg des GM1-Signals. Während die Transfektionen bei den wt-Zellgruppen zu einer signifikanten Steigerung der nMFI führten, waren die Unterschiede innerhalb der untersuchten ko-Zellgruppen nicht signifikant. Die Signalsteigerung durch die Plasmidtransfektionen ließ sich bei den ko-Zellen somit nur als Trend erahnen. Mithilfe einer einfachen

linearen Regressionsanalyse konnte innerhalb der plasmidtransfizierten Gruppen kein Zusammenhang zwischen dem CLN7-Gehalt (gemessen am EGFP-Signal) und dem GM1-Gehalt (gemessen durch die nMFI) festgestellt werden (vgl. 3.2.2).

Um die statistische Power zu erhöhen, könnte das Experiment mit einer höheren Stichprobengröße wiederholt werden.

Als Kontrollgruppe für das AcGFP/CLN7-Plasmid wurde ein AcGFP-Leerplasmid verwendet. Dieses Leerplasmid führte zu einer vergleichbaren Steigerung des Fluoreszenzsignals wie das CLN7-enthaltende Plasmid. Somit war die Signalsteigerung auf unspezifische Effekte des Plasmids und nicht auf das exprimierte CLN7 zurückzuführen. Beim EGFP-CLN7-Plasmid gab es diese direkte Plasmidkontrolle nicht. Um sicher sagen zu können, ob der Anstieg des Fluoreszenzsignals auf das exprimierte EGFP-CLN7 selbst oder auf unspezifische Wirkungen des Plasmids zurückzuführen ist, sollte eine weitere Kontrollgruppe mit dem EGFP-Leerplasmid in das Experiment eingeführt werden.

4.2.1 Ursachenanalyse der unspezifischen Fluoreszenzsignalanhebung

Mögliche Erklärungsansätze des geringeren GM1-Gehaltes in CLN7-ko-Zellen wurden bereits ausführlich erläutert (165). Für die unspezifische Anhebung des Fluoreszenzsignals durch die Plasmidtransfektionen sind verschiedene Ursachen denkbar. Zum einen wäre möglich, dass die Fluoreszenzmarker AcGFP bzw. EGFP einen Einfluss auf das gemessene Fluoreszenzsignal von AF647 haben könnte, indem sie im selben Fluoreszenzbereich aktiv sind. Bei Betrachtung des Experimentaufbaus ist dies jedoch nicht der Fall. AcGFP und EGFP haben ihren Exzitations- und Emissionsbereich im grünen Wellenlängenbereich und werden durch den blauen Laser angeregt. AF647 hingegen wird nur durch den roten Laser angeregt und emittiert Licht im infraroten Spektrum. Zusätzlich wurden ein 533/30 nm- und ein 675/25 nm-Filter verwendet. Dadurch konnte es nicht zu einer Spektralüberlappung kommen. Abbildung 12 verdeutlicht dies anhand des Ergebnisses des NovoCyte Spectral Viewers mit den verwendeten Daten (216). Auch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen EGFP und AF647 schien aufgrund der großen Entfernung zwischen den Spektren unwahrscheinlich (217).

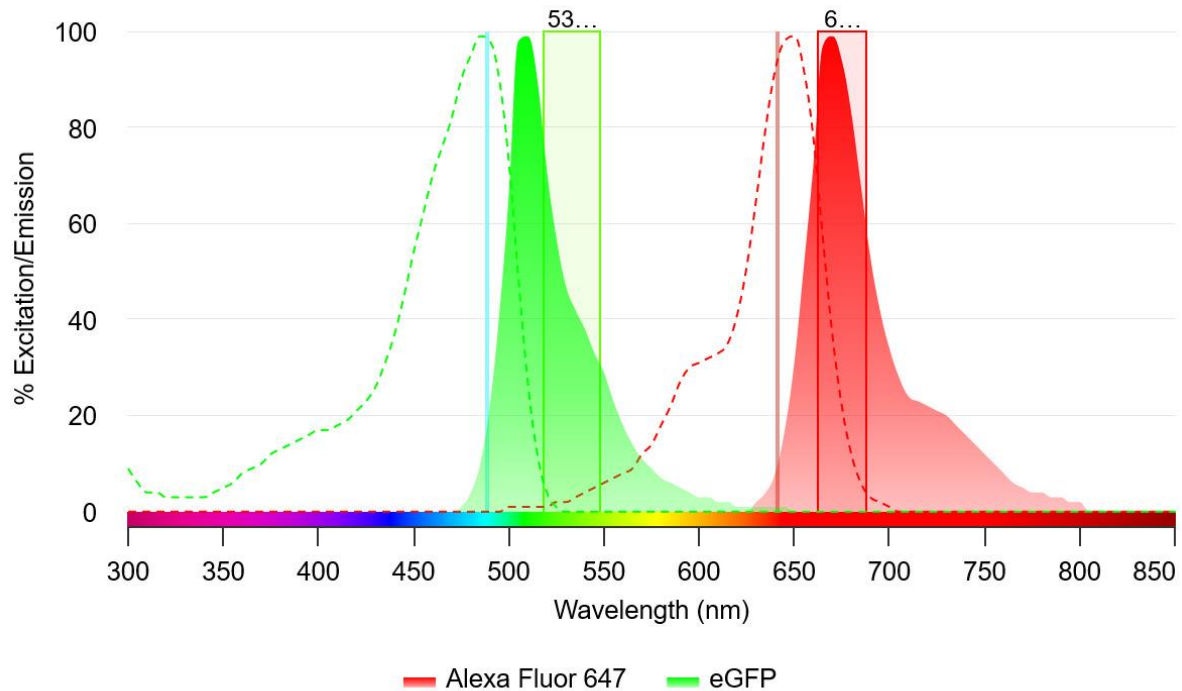


Abbildung 12. NovoCyt Spectral Viewer (216).

Die Abbildung zeigt das Ergebnis des NovoCyt Spectral Viewer mit den Daten des durchgeführten Experiments. Die gestrichelte Linie zeigt die Exzitationsspektra an, während der farblich gefüllte Bereich die Emissionsspektra kennzeichnet. Dabei steht die grüne Kennzeichnung für eGFP, während die rote Kennzeichnung Alexa Fluor 647 verdeutlicht. Zudem sind die Wellenlängen des blauen (488 nm) und des roten Lasers (640 nm) und die der verwendeten Filter (FL1: 533/30 nm, FL4: 675/25 nm) hervorgehoben. Es ließ sich keine Spektralüberlappung feststellen.

Eine andere mögliche Erklärung ist, dass die Anwendung der Transfektionsreagenzien die Bindung oder Fluoreszenzemission von CTxB-AF647 beeinflusst und so mit der GM1-Messung interferiert haben könnte. Durch die Einführung der nur mit Transfektionsreagenz versetzten „Mock“-Gruppe als Referenzgruppe wurde dies jedoch ausgeschlossen. Auch eine Beeinflussung der AF647-Fluoreszenz allein durch das transfizierte Plasmid erscheint unwahrscheinlich.

Als weiterer Erklärungsansatz wäre möglich, dass die transfizierten Plasmide mit der CTxB-Bindung oder der Menge an detektiertem GM1 interferiert haben. Zu dieser These ist nicht viel bestehende Forschungsliteratur zu finden. Lediglich Kovás et al. machten in ihren Versuchen die Beobachtung, dass die Lipofektion eines Plasmids die Bindung von CTxB nicht veränderte (217).

Dennoch war der Anstieg des CTxB-AF647-Signals durch die Plasmidtransfektionen in der vorliegenden Arbeit überraschend, denn er widerspricht sowohl vorherigen Untersuchungsergebnissen der Arbeitsgruppe Reichold als auch der Literatur. In der Arbeitsgruppe Reichold konnte an HEK293T wt-Zellen, die transient mit EGFP-CLN7 transfiziert worden waren, in der Fluoreszenzmikroskopie eine gegenüber

nicht-transfizierten Zellen geringere CTxB-Färbung beobachtet werden (165). Auch in Versuchen von Kovács et al. hatten Zellen mit einer hohen Produktion von Proteinen, die über Plasmide mittels Lipofektion in die Zellen geschleust worden waren, einen niedrigen GM1-Gehalt (217). Dieser Effekt ließ sich in verschiedenen Zelllinien, mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien und Plasmiden zeigen. Umgekehrt zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem GM1-Gehalt der Zellen und der Aufnahme von Plasmiden durch die Lipofektion. Die Autor*innen schlossen daraus, dass ein hoher Anteil GM1-haltiger Mikrodomänen in der Zellmembran Lipofektion inhibierte, sodass es zu einer niedrigeren Expression der Plasmidproteine kam (217). Somit könnte die oben genannte Beobachtung von Elena Heintz, dass EGFP-CLN7-transfizierte Zellen einen niedrigeren GM1-Gehalt aufweisen (165), dadurch erklärt werden, dass durch die erfolgreiche Transfektion Zellen mit geringem GM1-Gehalt selektioniert wurden.

Bei der Elektroporation hingegen ergaben sich in der Studie von Kovács et al. keine Unterschiede der GM1-Konzentration bei Plasmidaufnahme. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Lipofektion als Transfektionsmethode verwendet, wenn auch mit einem anderen Transfektionsreagenz als bei Kovács et al. Um auszuschließen, dass eine Interaktion von GM1 mit kationischen Liposom-DNA-Komplexen im Rahmen der Lipofektion einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse hatte und sie somit verfälschte, könnte der Versuch mit Elektroporation als Transfektionsmethode wiederholt werden. Im Gegensatz zu unseren Versuchen färbten Kovács et al. die Versuchsgruppen auf Eis, um eine Internalisierung des CTxB zu verhindern. Die Menge des oberflächlichen GM1 unterschied sich dabei zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen nicht. In den von der Arbeitsgruppe Reichold durchgeführten Experimenten wurde hingegen auch intrazelluläres GM1 angefärbt. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Versuchsergebnisse sein.

4.2.2 Perspektiven für nachfolgende experimentelle Untersuchungen

Weiterhin ist zu beachten, dass in der verwendeten ko-Sublinie das zur Generierung des CLN7-Knockouts genutzte CRISPR/Cas9-System dauerhaft aktiv ist. Somit wird auch transient in die Zelle eingebrachtes CLN7 durch das CRISPR/Cas9 zerschnitten. Eine Lösung für dieses Problem ist die Verwendung eines CLN7-Vektors mit einer veränderten PAM-(Protospacer Adjacent Motif)-Sequenz. Die PAM-Sequenz ist das Erkennungsmotiv für das CRISPR/Cas9, anhand derer die Ziel-DNA erkannt und

zerstört wird. Bei mutierter PAM-Sequenz wird eine Vektor-DNA folglich durch das CRISPR/Cas9 nicht erkannt und bleibt intakt, sodass das Zielprotein exprimiert werden kann. So konnte in folgenden Versuchen dieser Arbeitsgruppe bereits ein Rescue in einem anderen experimentellen Kontext erreicht werden (127). Dieser PAM-mutierte CLN7-Vektor könnte auch in dem hier beschriebenen Experiment eingesetzt werden. Um die durchflusszytometrisch gewonnenen Daten um einen visuellen Eindruck zu ergänzen, könnten die Zellen unter dem beschriebenen Versuchsaufbau per Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Die Hypothese, dass die GM1-Menge direkt mit der CLN7-Expressionsstärke zusammenhängt, könnte weiterhin anhand einer GM1-Analyse in der stabil CLN7-überexprimierenden HEK-Zelllinie überprüft werden, die in der Arbeitsgruppe Reichold im Rahmen der Masterarbeit von Elena Heintl generiert wurde (165). Auch die Untersuchung an einer Zelllinie, die lentiviral stabil mit einer nicht-EGFP-gekoppelten CLN7-Variante transfiziert ist, wäre denkbar. Hierbei könnten potenzielle Nebeneffekte der Kopplung an EGFP aufgedeckt werden. Unterschiede zwischen wt- und ko-Zellen könnten folglich direkt auf die CLN7-Überexpression und nicht auf mögliche Artefakte durch die EGFP-Kopplung zurückgeführt werden. Außerdem sollte in einer weiteren CLN7-ko-Sublinie überprüft werden, ob die GM1-Konzentration in ko-Zellen reduziert ist. Hierdurch könnte ausgeschlossen werden, dass Off-Target-Effekte des CRISPR/Cas9-Systems für den veränderten GM1-Gehalt verantwortlich sind. Es würden sich die HEK-ko-94-5-Zellen eignen. Es ist jedoch zu beachten, dass in diesem Knockout noch 30 % CLN7-mRNA vorliegen, auch wenn unklar ist, ob aus dieser funktionales CLN7-Protein synthetisiert wird (127). Zudem könnte die GM1-Konzentration auch in einer anderen CLN7-defizienten Zelllinie untersucht werden.

In diesem Experiment konnte kein GM1-Rescue durch transiente CLN7-Expression erzeugt werden. Es liegen viele Ansätze vor, mithilfe derer die Experimentalbedingungen optimiert werden können. Die Frage, in welchem Zusammenhang es mit dem CLN7-Protein steht und, ob GM1 als funktioneller Marker für die CLN7-Erkrankung verwendet werden kann, bleibt weiterhin offen.

4.3 Abschließende Beurteilung

Die vorliegende Arbeit untersuchte Interaktionen von CLN7 mit dem SARS-CoV-2-Virus und dem Lipid Raft-Maker GM1. Es wurde ein Unterschied im Infektionsverhalten mit SARS-CoV-2 zwischen HEK293T wt- und zwei CLN7-ko-Sublinien festgestellt. Die

SARS-CoV-2-Viruspartikel wurden zudem transmissionselektronenmikroskopisch aufgesucht. Auch mit dieser Methode ergaben sich Hinweise auf eine geringere SARS-CoV-2-Viruslast in HEK293T CLN7-ko-Zellen. Diese Versuchsergebnisse weisen auf relevante Wechselwirkungen zwischen CLN7 und Proteinen des SARS-CoV-2-Virus hin. Ein Nachweis in der Vero-Zelllinie gelang vorerst nicht, was auf methodische Schwierigkeiten in der CLN7-Knockdown-Erzeugung zurückzuführen sein könnte. Zeit- und kostentechnische Hürden verhinderten die Generierung einer weiteren CLN7-ko-Zelllinie.

Die Vermutung von Heinl et al., dass CLN7 einen Einfluss auf den Lipid Raft-Marker GM1 hat (127), bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Der GM1-Gehalt von CLN7-ko-Zellen war signifikant niedriger als in korrespondierenden wt-Zellen. Ein Rescue der GM1-Konzentration durch das transiente Einschleusen von CLN7 über Plasmide gelang jedoch nicht. Methodische Schwierigkeiten dürften eine Rolle gespielt haben. Hieraus ergaben sich etliche Optimierungsmöglichkeiten für nachfolgende Experimente.

Auch die Gegebenheiten während der COVID-19-Pandemie erschwerten die Durchführung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit. Trotz der Schwierigkeiten konnten neue Charakteristika und Interaktionen des lysosomalen Transmembranproteins CLN7 beschrieben werden. Hieraus ergeben sich relevante Ansatzpunkte für die weitere Erforschung der neurodegenerativen CLN7-Erkrankung, die langfristig eine kurative Behandlung möglich machen soll. Auch die neuen Einblicke in den Pathomechanismus von SARS-CoV-2 liefern Impulse für weiterführende Forschung.

5 Zusammenfassung

Mutationen im CLN7/MFSD8-Gen führen zur neuronalen Ceroidlipofuszinose Typ 7 (NCL7), einer seltenen hereditären lysosomalen Speichererkrankung mit Beginn in der frühen Kindheit. Die Erkrankung verläuft schwer neurodegenerativ mit Symptomen wie epileptischen Anfällen, Erblindung und kognitivem sowie motorischem Abbau. Patient*innen versterben meist im Jugendalter. Eine kausale Therapie fehlt bislang, ebenso sind Funktion und Pathomechanismus von CLN7/MFSD8 weitgehend ungeklärt.

In silico-Analysen identifizierten SARS-CoV-2-Proteine als mögliche Interaktionspartner von CLN7. Das Virus verursacht respiratorische Symptome mit erheblichem Komplikationspotential und löste eine globale Pandemie aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob CLN7-Defizienz die Viruslast von SARS-CoV-2 in HEK293T-Zellen beeinflusst. Tatsächlich zeigte sich bei CLN7-Knockout-Zellen eine reduzierte Viruslast, sowohl intra- als auch extrazellulär. Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten diesen Befund. Mögliche Mechanismen umfassen eine veränderte Expression von ACE2 oder TMPRSS2, Störungen der Endozytose, der Lipid Rafts oder der Lysosomenfunktion.

In Vero-Zellen, bei denen CLN7 mittels siRNA auf 40 % herunterreguliert wurde, zeigte sich dagegen kein Effekt auf die Viruslast. Ob dies an methodischen Problemen oder zelltypspezifischen Faktoren lag, blieb offen.

Ein weiterer Versuch untersuchte den GM1-Gehalt in HEK293T CLN7-Knockout-Zellen. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass der Lipid Raft-Marker GM1 bei CLN7-Defizienz reduziert war. Eine GM1-Steigerung durch transientes Einbringen von CLN7-Plasmiden gelang jedoch nicht. Jede Art von Plasmidtransfektion erhöhte unabhängig vom CLN7-Gehalt die gemessene GM1-Menge. Die Ursache hierfür konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Insgesamt liefert die Arbeit neue Hinweise zur Rolle von CLN7; sowohl im Zusammenhang mit der SARS-CoV-2-Virusaufnahme als auch im zellulären Lipidstoffwechsel. Dadurch bietet sie wichtige Ansatzpunkte für weiterführende Forschung zur Pathophysiologie von NCL7 und SARS-CoV-2.

6 Abkürzungsverzeichnis

- RT	ohne reverse Transkriptase
+ RT	mit reverser Transkriptase
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme 2
AcGFP	Aequorea Coerulescens Green Flourescent Protein
ANCL	adulte NCL
ANOVA	Analysis of Variance, Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CLN	Ceroide Lipofuscinosis, neuronal
CLN7	Ceroide Lipofuscinosis, neuronal Typ 7
COVID-19	Corona Virus Disease 2019
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR-associated Protein 9
ct	Cycle Threshold
CTSB	Cathepsin B
CTSD	Cathepsin D
CTSF	Cathepsin F
CTSL	Cathepsin L
DMV	Double Membrane Vesicle, Doppelmembranvesikel
dNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Flourescent Protein
E-Protein	Envelope-Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-to-Golgi intermediate Compartment, ER-Golgi-Zwischenkompartiment
FCS	Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer

FSC	Forwardscatter
FSC-A	Forwardscatter-Area
FSC-H	Forwardscatter-Height
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
gRNA	genomic RNA, genomische RNA
GUS	β -Glucuronidase
HEK	Human Embryonic Kidney
INCL	infantile NCL, infantile NCL
JNCL	juvenile NCL
kb	Kilobasen
ko	Knockout
LINCL	late infantile NCL, spätinfantile NCL
LSD	Lysosomal Storage Disease/Disorder, lysosomale Speichererkrankung
m	Steigung
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MFSD8	Major Facilitator Superfamily Domain-containing Protein 8
M-MLVRT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
MOI	Multiplicity of Infection
M-Protein	Membran-Protein
mRNA	Messenger-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MVB	Multivesicular Body, multivesikuläre Körperchen
MW	Mittelwert, arithmetisches Mittel
NCL	neuronale Ceroidlipofuszinose
nMFI	normierte mittlere Fluoreszenzintensität
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
NSP	Nicht-Strukturprotein
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame

P/S	Penicillin/Streptomycin
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PBS	Phosphate-buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PFU	Plaque Forming Units
PTGS	Post-transcriptional Gene Silencing
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
RBD	Rezeptor-Bindungs-Domäne
RBM	rezeptorbindendes Motiv
RdRP	RNA dependent RNA Polymerase, RNA abhängige RNA-Polymerase
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNAiMAX	Lipofectamine™ RNAiMAX
RNase	Ribonuklease
rpm	Revolutions/Ronds per Minute
rRNA	ribosomale RNA
RTC	Replication and Transcription Complex, Replikations- und Transkriptionskomplex
rtq-PCR	Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SARS-CoV-2	Serere Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Typ 2
SCMAS	Subunit C of Mitochondrial ATP-Synthase, C-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase
SEM	Standardfehler
sg-mRNA	subgenomische Messenger-RNA
siPool	siRNA Pool
siRNA	small interfering RNA, kleine interferierende RNA
S-Protein	Spike-Protein
SSC	Sidescatter
SSC-A	Sidescatter-Area
SSC-H	Sidescatter-Height
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure

Takyon Sybr-Green Mix	Takyon™ No Rox SYBR® 2X MasterMix blue dTTP
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose 50
TMPRSS2	transmembrane Serinprotease 2
tRNA	Transfer-RNA
vLINCL	variant late infantile NCL
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

1. Mole SE, Anderson G, Band HA, Berkovic SF, Cooper JD, Kleine Holthaus SM, et al. Clinical challenges and future therapeutic approaches for neuronal ceroid lipofuscinosis. *The Lancet Neurology*. 2019;18(1):107-16.
2. Haltia M, Goebel HH. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: A historical introduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(11):1795-800.
3. Nelvagal HR, Lange J, Takahashi K, Tarczyluk-Wells MA, Cooper JD. Pathomechanisms in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2020;1866(9):165570.
4. Simonati A, Williams RE. Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: The Multifaceted Approach to the Clinical Issues, an Overview. *Frontiers in neurology*. 2022;13:811686.
5. Zhang Y, Du B, Zou M, Peng B, Rao Y. Neuronal Ceroid Lipofuscinosis- Concepts, Classification, and Avenues for Therapy. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2025;31(2):e70261.
6. Mole SE, Cotman SL. Genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(10 Pt B):2237-41.
7. Cotman SL, Karaa A, Staropoli JF, Sims KB. Neuronal ceroid lipofuscinosis: impact of recent genetic advances and expansion of the clinicopathologic spectrum. *Current neurology and neuroscience reports*. 2013;13(8):366.
8. Mole SE. The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Vezzani A, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. New York: Oxford University Press; 2024. p. 1067-84.
9. Schulz A, Kohlschütter A, Mink J, Simonati A, Williams R. NCL diseases — clinical perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(11):1801-6.
10. Kaminiów K, Kozak S, Paprocka J. Recent Insight into the Genetic Basis, Clinical Features, and Diagnostic Methods for Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(10).
11. Sleat DE, Gedvilaite E, Zhang Y, Lobel P, Xing J. Analysis of large-scale whole exome sequencing data to determine the prevalence of genetically-distinct forms of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Gene*. 2016;593(2):284-91.
12. Zeineddin S, Matar G, Abosaif Y, Abunada M, Aldabbour B. A novel pathogenic variant in the KCTD7 gene in a patient with neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN14): a case report and review of the literature. *BMC neurology*. 2024;24(1):367.
13. Panjeshahi S, Karimzadeh P, Movafagh A, Ahmadabadi F, Rahimian E, Alijanpour S, et al. Clinical and genetic characterization of neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) in 29 Iranian patients: identification of 11 novel mutations. *Human genetics*. 2023;142(8):1001-16.
14. Lourenço CM, Sallum JMF, Pereira AM, Girotto PN, Kok F, Vilela DRF, et al. A needle in a haystack? The impact of a targeted epilepsy gene panel in the identification of a treatable but rapidly progressive metabolic epilepsy: CLN2 disease. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2024;82(5):1-8.
15. Kimball TN, García-Rueda AG, Rivero-García P, Pérez-Segovia AH, Mayoral-Carrasco LE. Recognizing Lipofuscinosis as a Guide in Antiepileptic Treatment: Clinical Description of the First Mexican Case With Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Type 7 (NCL7). *Cureus*. 2024;16(3):e56914.

16. Beck-Wödl S, Harzer K, Sturm M, Buchert R, Rieß O, Mennel HD, et al. Homozygous TBC1 domain-containing kinase (TBCK) mutation causes a novel lysosomal storage disease - a new type of neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN15)? *Acta neuropathologica communications*. 2018;6(1):145.
17. Cotman SL, Mole SE, Kohan R. Future perspectives: Moving towards NCL treatments. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(10 Pt B):2336-8.
18. Kim WD, Wilson-Smillie M, Thanabalasingam A, Lefrancois S, Cotman SL, Huber RJ. Autophagy in the Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten Disease). *Frontiers in cell and developmental biology*. 2022;10:812728.
19. Wang Y, Zeng W, Lin B, Yao Y, Li C, Hu W, et al. CLN7 is an organellar chloride channel regulating lysosomal function. *Science advances*. 2021;7(51):eabj9608.
20. Gardner E, Mole SE. The Genetic Basis of Phenotypic Heterogeneity in the Neuronal Ceroid Lipofuscinoses. *Frontiers in neurology*. 2021;12:754045.
21. Qureshi YH, Patel VM, Berman DE, Kothiya MJ, Neufeld JL, Vardarajan B, et al. An Alzheimer's Disease-Linked Loss-of-Function CLN5 Variant Impairs Cathepsin D Maturation, Consistent with a Retromer Trafficking Defect. *Mol Cell Biol*. 2018;38(20).
22. Geier EG, Bourdenx M, Storm NJ, Cochran JN, Sirkis DW, Hwang JH, et al. Rare variants in the neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 are candidate risk factors for frontotemporal dementia. *Acta neuropathologica*. 2019;137(1):71-88.
23. Bras J, Verloes A, Schneider SA, Mole SE, Guerreiro RJ. Mutation of the parkinsonism gene ATP13A2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(12):2646-50.
24. Yap SQ, Mathavarajah S, Huber RJ. The converging roles of Batten disease proteins in neurodegeneration and cancer. *iScience*. 2021;24(4):102337.
25. Siintola E, Topcu M, Aula N, Lohi H, Minassian BA, Paterson AD, et al. The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *American journal of human genetics*. 2007;81(1):136-46.
26. Huber RJ. Using the social amoeba *Dictyostelium* to study the functions of proteins linked to neuronal ceroid lipofuscinosis. *Journal of biomedical science*. 2016;23(1):83.
27. NCL Disease - Mutation and Patient Database London: University College London; [Available from: <https://www.ucl.ac.uk/ncl-disease/mutation-and-patient-database>].
28. Cárcel-Trullols J, Kovács AD, Pearce DA. Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(10 Pt B):2242-55.
29. Kousi M, Lehesjoki AE, Mole SE. Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Human mutation*. 2012;33(1):42-63.
30. Sharifi A, Kousi M, Sagne C, Bellenchi GC, Morel L, Darmon M, et al. Expression and lysosomal targeting of CLN7, a major facilitator superfamily transporter associated with variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mol Genet*. 2010;19(22):4497-514.
31. Steenhuis P, Herder S, Gelis S, Braulke T, Storch S. Lysosomal targeting of the CLN7 membrane glycoprotein and transport via the plasma membrane require a dileucine motif. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2010;11(7):987-1000.
32. Steenhuis P, Froemming J, Reinheckel T, Storch S. Proteolytic cleavage of the disease-related lysosomal membrane glycoprotein CLN7. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2012;1822(10):1617-28.

33. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 1998;62(1):1-34.
34. Huber RJ. Recent insights into the networking of CLN genes and proteins in mammalian cells. *Journal of neurochemistry*. 2023;165(5):643-59.
35. Anderson GW, Goebel HH, Simonati A. Human pathology in NCL. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(11):1807-26.
36. Jankowiak W, Brandenstein L, Dulz S, Hagel C, Storch S, Bartsch U. Retinal Degeneration in Mice Deficient in the Lysosomal Membrane Protein CLN7. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(11):4989-98.
37. Topçu M, Tan H, Yalnizoğlu D, Usubütün A, Saatçi I, Aynaci M, et al. Evaluation of 36 patients from Turkey with neuronal ceroid lipofuscinosis: clinical, neurophysiological, neuroradiological and histopathologic studies. *The Turkish journal of pediatrics*. 2004;46(1):1-10.
38. Kousi M, Siintola E, Dvorakova L, Vlaskova H, Turnbull J, Topcu M, et al. Mutations in CLN7/MFSD8 are a common cause of variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 3):810-9.
39. Burgunder JM. Mechanisms underlying phenotypic variation in neurogenetic disorders. *Nature reviews Neurology*. 2023;19(6):363-70.
40. Woodward AA, Urbanowicz RJ, Naj AC, Moore JH. Genetic heterogeneity: Challenges, impacts, and methods through an associative lens. *Genetic epidemiology*. 2022;46(8):555-71.
41. Wheeler RB, Sharp JD, Mitchell WA, Bate SL, Williams RE, Lake BD, et al. A new locus for variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis-CLN7. *Mol Genet Metab*. 1999;66(4):337-8.
42. Dobloug S, Kjellström U, Anderson G, Gardner E, Mole SE, Sheth J, et al. Maculopathy and adult-onset ataxia in patients with biallelic MFSD8 variants. *Molecular genetics & genomic medicine*. 2024;12(8):e2505.
43. Specchio N, Ferretti A, Trivisano M, Pietrafusa N, Pepi C, Calabrese C, et al. Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: Potential for Targeted Therapy. *Drugs*. 2021;81(1):101-23.
44. Kim J, Hu C, Moufawad El Achkar C, Black LE, Douville J, Larson A, et al. Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *The New England journal of medicine*. 2019;381(17):1644-52.
45. ClinicalTrials.gov. Study for the Treatment for CLN7 Disease (CLN7) 2021 [updated 13.12.2024. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04737460?cond=CLN7&term=Batten%20Disease&rank=1#study-overview>.
46. Yim WW, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy. *Cell discovery*. 2020;6:6.
47. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:857-902.
48. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *The EMBO journal*. 2011;30(17):3481-500.
49. Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tift CJ. Lysosomal storage diseases. *Nature reviews Disease primers*. 2018;4(1):27.
50. Xu H, Ren D. Lysosomal physiology. *Annual review of physiology*. 2015;77:57-80.
51. Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, Siddiqi FH, Roberts EA, Imarisio S, et al. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nature cell biology*. 2011;13(4):453-60.

52. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*. 2010;465(7300):942-6.
53. Renard HF, Boucrot E. Unconventional endocytic mechanisms. *Current opinion in cell biology*. 2021;71:120-9.
54. Mani I, Singh V. An overview of receptor endocytosis and signaling. *Progress in molecular biology and translational science*. 2023;194:1-18.
55. Levental I, Levental KR, Heberle FA. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends in cell biology*. 2020;30(5):341-53.
56. Isik OA, Cizmecioglu O. Rafting on the Plasma Membrane: Lipid Rafts in Signaling and Disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2023;1436:87-108.
57. Kenworthy AK, Schmieder SS, Raghunathan K, Tiwari A, Wang T, Kelly CV, et al. Cholera Toxin as a Probe for Membrane Biology. *Toxins*. 2021;13(8).
58. Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*. 2006;47(7):1597-8.
59. Nieto-Garai JA, Lorzate M, Contreras FX. Shedding light on membrane rafts structure and dynamics in living cells. *Biochimica et biophysica acta Biomembranes*. 2022;1864(1):183813.
60. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017;18(6):361-74.
61. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(10):a004697.
62. Ludwig A, Nichols BJ, Sandin S. Architecture of the caveolar coat complex. *J Cell Sci*. 2016;129(16):3077-83.
63. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology*. 1998;14:111-36.
64. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(1):31-9.
65. Harris TJ, Siu CH. Reciprocal raft-receptor interactions and the assembly of adhesion complexes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2002;24(11):996-1003.
66. Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*. 2003;160(1):113-23.
67. Michel V, Bakovic M. Lipid rafts in health and disease. *Biology of the cell*. 2007;99(3):129-40.
68. Verma DK, Gupta D, Lal SK. Host Lipid Rafts Play a Major Role in Binding and Endocytosis of Influenza A Virus. *Viruses*. 2018;10(11).
69. Mañes S, del Real G, Martínez AC. Pathogens: raft hijackers. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(7):557-68.
70. Alonso A, Goñi FM. The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annual review of biophysics*. 2018;47:633-54.
71. Guo Z. Ganglioside GM1 and the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*. 2023;24(11).
72. Groux-Degroote S, Guérardel Y, Delannoy P. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2017;18(13):1146-54.

-
73. Bolland W, Marechal I, Petiot C, Porrot F, Guivel-Benhassine F, Brelot A, et al. SARS-CoV-2 entry and fusion are independent of ACE2 localization to lipid rafts. *Journal of virology*. 2025;99(1):e0182324.
 74. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*. 2020;382(8):727-33.
 75. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3.
 76. Koch-Institut R. RKI-Ratgeber COVID-19. *Epidemiologisches Bulletin*. 2024;22/2024.
 77. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 2020;91(1):157-60.
 78. Maisson DP, Tasissa H, Deitchman A, Peluso MJ, Deng Y, Miller FD, et al. COVID-19 clinical presentation, management, and epidemiology: a concise compendium. *Frontiers in public health*. 2025;13:1498445.
 79. Koch-Institut R. ARE-Monatsbericht des RKI. 2025.
 80. Koch-Institut R. SARS-CoV-2 Varianten in Deutschland - Daten aus der integrierten genomischen Surveillance von SARS-CoV-2 2025 [Available from: https://public.data.rki.de/t/public/views/IGS_Dashboard/DashboardSublineages?%3Aembed=y&%3AisGuestRedirectFromVizportal=y].
 81. Coronavirus (COVID-19) Dashboard: WHO; [Available from: <https://covid19.who.int/>].
 82. Lehfeld AS, Buda S, Haas W, Hauer B, Schulze-Wundling K, Buchholz U. The Changing Symptom Profile of COVID-19 During the Pandemic-Results From the German Mandatory Notification System. *Deutsches Arzteblatt international*. 2023;120(24):420-1.
 83. Modrow S, Truyen U, Schätzl H. Viren: Definition, Aufbau, Einteilung. *Molekulare Virologie*. 4. Auflage ed. Heidelberg: Springer Spektrum Verlag; 2021. p. 13 - 28.
 84. Bar-On YM, Flamholz A, Phillips R, Milo R. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife*. 2020;9.
 85. Steiner S, Kratzel A, Barut GT, Lang RM, Aguiar Moreira E, Thomann L, et al. SARS-CoV-2 biology and host interactions. *Nature reviews Microbiology*. 2024;22(4):206-25.
 86. Modrow S, Truyen U, Schätzl H. Coronaviren. *Molekulare Virologie*. 4. Auflage ed. Heidelberg: Springer Spektrum Verlag; 2021. p. 287 - 322.
 87. Jungreis I, Sealfon R, Kellis M. SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 Sarbecovirus genomes. *Nat Commun*. 2021;12(1):2642.
 88. Al-Qaaneh AM, Alshammari T, Aldahhan R, Aldossary H, Alkhalifah ZA, Borgio JF. Genome composition and genetic characterization of SARS-CoV-2. *Saudi journal of biological sciences*. 2021;28(3):1978-89.
 89. Jungreis I, Nelson CW, Ardern Z, Finkel Y, Krogan NJ, Sato K, et al. Conflicting and ambiguous names of overlapping ORFs in the SARS-CoV-2 genome: A homology-based resolution. *Virology*. 2021;558:145-51.
 90. Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Science China Life sciences*. 2022;65(2):280-94.
 91. Modrow S, Truyen U, Schätzl H. Virusvermehrung und Replikation. *Molekulare Virologie*. 4. Auflage ed. Heidelberg: Springer Spektrum Verlag; 2021. p. 29 - 34.

92. Lim S, Zhang M, Chang TL. ACE2-Independent Alternative Receptors for SARS-CoV-2. *Viruses*. 2022;14(11).
93. Maleksabet H, Rezaee E, Tabatabai SA. Host-Cell Surface Binding Targets in SARS-CoV-2 for Drug Design. *Current pharmaceutical design*. 2022;28(45):3583-91.
94. Wang K, Chen W, Zhang Z, Deng Y, Lian J-Q, Du P, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal transduction and targeted therapy*. 2020;5(1):283.
95. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular cell*. 2020;78(4):779-84.e5.
96. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2022;23(1):3-20.
97. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-80.e8.
98. Zhao MM, Yang WL, Yang FY, Zhang L, Huang WJ, Hou W, et al. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. *Signal transduction and targeted therapy*. 2021;6(1):134.
99. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell*. 2020;181(5):1016-35.e19.
100. Thoms M, Buschauer R, Ameisemeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, et al. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science (New York, NY)*. 2020;369(6508):1249-55.
101. Schubert K, Karousis ED, Jomaa A, Scaiola A, Echeverria B, Gurzeler LA, et al. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nature structural & molecular biology*. 2020;27(10):959-66.
102. Fisher T, Gluck A, Narayanan K, Kuroda M, Nachshon A, Hsu JC, et al. Parsing the role of NSP1 in SARS-CoV-2 infection. *Cell reports*. 2022;39(11):110954.
103. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Advances in virus research*. 2016;96:59-126.
104. Wang Q, Wu J, Wang H, Gao Y, Liu Q, Mu A, et al. Structural Basis for RNA Replication by the SARS-CoV-2 Polymerase. *Cell*. 2020;182(2):417-28.e13.
105. Cortese M, Lee JY, Cerikan B, Neufeldt CJ, Oorschot VMJ, Köhrer S, et al. Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell host & microbe*. 2020;28(6):853-66.e5.
106. Snijder EJ, Limpens R, de Wilde AH, de Jong AWM, Zevenhoven-Dobbe JC, Maier HJ, et al. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS biology*. 2020;18(6):e3000715.
107. Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, Bárcena M. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends in microbiology*. 2020;28(12):1022-33.
108. Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun*. 2020;11(1):5885.
109. Wolff G, Limpens R, Zevenhoven-Dobbe JC, Laugks U, Zheng S, de Jong AWM, et al. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science (New York, NY)*. 2020;369(6509):1395-8.

110. Sawicki SG, Sawicki DL. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Advances in experimental medicine and biology*. 1995;380:499-506.
111. Pan R, Kindler E, Cao L, Zhou Y, Zhang Z, Liu Q, et al. N7-Methylation of the Coronavirus RNA Cap Is Required for Maximal Virulence by Preventing Innate Immune Recognition. *mBio*. 2022;13(1):e0366221.
112. Decroly E, Ferron F, Lescar J, Canard B. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nature reviews Microbiology*. 2011;10(1):51-65.
113. Kikkert M. Innate Immune Evasion by Human Respiratory RNA Viruses. *Journal of innate immunity*. 2020;12(1):4-20.
114. Lu S, Ye Q, Singh D, Cao Y, Diedrich JK, Yates JR, 3rd, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nat Commun*. 2021;12(1):502.
115. Yao H, Song Y, Chen Y, Wu N, Xu J, Sun C, et al. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell*. 2020;183(3):730-8.e13.
116. Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, Pak E, Qiu Q, Fisher M, et al. β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell*. 2020;183(6):1520-35.e14.
117. Laurent EMN, Sofianatos Y, Komarova A, Gimeno J-P, Tehrani PS, Kim D-K, et al. Global BioID-based SARS-CoV-2 proteins proximal interactome unveils novel ties between viral polypeptides and host factors involved in multiple COVID19-associated mechanisms. *bioRxiv*. 2020:2020.08.28.272955.
118. May DG, Martin-Sancho L, Anschau V, Liu S, Chrisopoulos RJ, Scott KL, et al. A BioID-Derived Proximity Interactome for SARS-CoV-2 Proteins. *Viruses*. 2022;14(3).
119. Stukalov A, Girault V, Grass V, Karayel O, Bergant V, Urban C, et al. Multilevel proteomics reveals host perturbations by SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Nature*. 2021;594(7862):246-52.
120. Oughtred R, Rust J, Chang C, Breitkreutz BJ, Stark C, Willems A, et al. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2021;30(1):187-200.
121. Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications*. 2014;5(1):4767.
122. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*. 1977;36(1):59-72.
123. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*. 1987;7(1):379-87.
124. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(18):8392-6.
125. Pires De Souza GA, Le Bideau M, Boschi C, Wurtz N, Colson P, Aherfi S, et al. Choosing a cellular model to study SARS-CoV-2. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2022;12:1003608.
126. Kumar S, Sarma P, Kaur H, Prajapat M, Bhattacharyya A, Avti P, et al. Clinically relevant cell culture models and their significance in isolation, pathogenesis, vaccine development, repurposing and screening of new drugs for SARS-CoV-2: a systematic review. *Tissue & cell*. 2021;70:101497.

127. Heini ES, Lorenz S, Schmidt B, Nasser MLN, Mazzulli JR, Francelle L, et al. CLN7/MFSD8 may be an important factor for SARS-CoV-2 cell entry. *iScience*. 2022;25(10):105082.
128. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol*. 2008;Appendix 4:Appendix-4E.
129. Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T, et al. The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 2014;21(6):673-83.
130. Konishi K, Yamaji T, Sakuma C, Kasai F, Endo T, Kohara A, et al. Whole-Genome Sequencing of Vero E6 (VERO C1008) and Comparative Analysis of Four Vero Cell Sublines. *Frontiers in genetics*. 2022;13:801382.
131. Kiesslich S, Kamen AA. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnology advances*. 2020;44:107608.
132. Emeny JM, Morgan MJ. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *The Journal of general virology*. 1979;43(1):247-52.
133. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert review of vaccines*. 2009;8(5):607-18.
134. Koch J, Uckelely ZM, Doldan P, Stanifer M, Boulant S, Lozach PY. TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. *The EMBO journal*. 2021;40(16):e107821.
135. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(13):7001-3.
136. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. 7. Auflage ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
137. Teifel M. Transfektion von Säugerzellen. In: Verlag SA, editor. *Gentechnische Methoden Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Auflage. Heidelberg: Monika Jansohn; Sophie Rothhämel; 2012. p. 351 - 84.
138. Elouahabi A, Ruyschaert JM. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2005;11(3):336-47.
139. Río Bártulos C, Tappe H, Rothhämel S. Isolierung von DNA. In: Rothhämel MJS, editor. *Gentechnische Methoden Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Ausgabe. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012. p. 96 - 134.
140. van Heyningen WE. Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin, cholera toxin and serotonin. *Nature*. 1974;249(5456):415-7.
141. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
142. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 2001;15(2):188-200.
143. Li C, Zamore PD. *RNA Interference and Small RNA Analysis*. Cold Spring Harbor protocols. 2019;2019(4).
144. Schmitz S. *Moderne Techniken in der angewandten Zellkultur*. Der Experimentator: Zellkultur. Berlin: Springer Spektrum; 2020. p. 311-51.

145. Bopp T, Klein M. RNA-interference. In: Rothhämel MJS, editor. *Gentechnische Methoden Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Ausgabe. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012. p. 261 - 75.
146. Hannus M, Beitzinger M, Engelmänn JC, Weickert MT, Spang R, Hannus S, et al. siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects. *Nucleic acids research*. 2014;42(12):8049-61.
147. Qiu S, Adema CM, Lane T. A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic acids research*. 2005;33(6):1834-47.
148. Mülhardt C. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 7. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2013. p. 81 - 114.
149. Schmidt H, Rothhämel S. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Rothhämel MJS, editor. *Gentechnische Methoden Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012. p. 135 - 72.
150. Klämbt C, Klapper R, Strasser T, Kubigsteltig I, Nowrousian M. PCR-Analytik. In: Kück U, editor. *Praktikum der Molekulargenetik*. Berlin Heidelberg: Springer-Lehrbuch; 2005. p. 221 - 41.
151. Peterhoff D, Glück V, Vogel M, Schuster P, Schütz A, Neubert P, et al. A highly specific and sensitive serological assay detects SARS-CoV-2 antibody levels in COVID-19 patients that correlate with neutralization. *Infection*. 2021;49(1):75-82.
152. REED LJ, MUENCH H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493-7.
153. Nang SC, Lin Y-W, Petrovic Fabijan A, Chang RYK, Rao GG, Iredell J, et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of phage therapy: a major hurdle to clinical translation. *Clinical Microbiology and Infection*. 2023;29(6):702-9.
154. Schmidt B. 2020.
155. Shatzkes K, Teferedegne B, Murata H. A simple, inexpensive method for preparing cell lysates suitable for downstream reverse transcription quantitative PCR. *Scientific reports*. 2014;4:4659.
156. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020;25(3).
157. Hitzenbichler F, Bauernfeind S, Salzberger B, Schmidt B, Wenzel JJ. Comparison of Throat Washings, Nasopharyngeal Swabs and Oropharyngeal Swabs for Detection of SARS-CoV-2. *Viruses*. 2021;13(4).
158. Löseke S, Grage-Griebenow E, Wagner A, Gehlhar K, Bufe A. Differential expression of IFN-alpha subtypes in human PBMC: evaluation of novel real-time PCR assays. *J Immunol Methods*. 2003;276(1-2):207-22.
159. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1):55-63.
160. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. 2018;120(3):159-67.
161. Schmitz S. Zellbiologische und Routinemethoden. *Der Experimentator: Zellkultur*. 4. Auflage ed. Berlin: Springer Spektrum; 2020. p. 291 - 310.

-
162. Bullock HA, Goldsmith CS, Miller SE. Detection and identification of coronaviruses in human tissues using electron microscopy. *Microscopy research and technique*. 2022;85(7):2740-7.
163. Hopfer H, Herzig MC, Gosert R, Menter T, Hench J, Tzankov A, et al. Hunting coronavirus by transmission electron microscopy - a guide to SARS-CoV-2-associated ultrastructural pathology in COVID-19 tissues. *Histopathology*. 2021;78(3):358-70.
164. Neil D, Moran L, Horsfield C, Curtis E, Swann O, Barclay W, et al. Ultrastructure of cell trafficking pathways and coronavirus: how to recognise the wolf amongst the sheep. *The Journal of Pathology*. 2020;252(4):346-57.
165. Heinel E-S. Untersuchung der physiologischen Funktion des lysosomalen CLN7-Proteins im vitalen Zellmodell. Regensburg: Universität Regensburg; 2020.
166. Boucher L BB, Chang Ch, Chatr-Aryamontri A, Dolinski K, Dolma S, Kolas N, Leung G, O'Donnell L, Oughtred R, Rust, J, Stark Ch, Tyers M, Willems A, Zhang F. The Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID): Result Summary: MFSD8 2023 [Available from: <https://thebiogrid.org/129168/summary/homo-sapiens/mfsd8.html>].
167. Bartolomeo CS, Lemes RMR, Morais RL, Pereria GC, Nunes TA, Costa AJ, et al. SARS-CoV-2 infection and replication kinetics in different human cell types: The role of autophagy, cellular metabolism and ACE2 expression. *Life Sciences*. 2022;308:120930.
168. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell research*. 2020;30(3):269-71.
169. Sergio MC, Ricciardi S, Guarino AM, Giaquinto L, De Matteis MA. Membrane remodeling and trafficking piloted by SARS-CoV-2. *Trends in cell biology*. 2024;34(9):785-800.
170. Bullock HA, Goldsmith CS, Miller SE. Best practices for correctly identifying coronavirus by transmission electron microscopy. *Kidney international*. 2021;99(4):824-7.
171. Heyningen SV. Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science (New York, NY)*. 1974;183(4125):656-7.
172. Nazir F, John Kombe Kombe A, Khalid Z, Bibi S, Zhang H, Wu S, et al. SARS-CoV-2 replication and drug discovery. *Molecular and cellular probes*. 2024;77:101973.
173. La Rosa P, Tiberi J, Palermo E, Stefanelli R, Tiano SML, Canterini S, et al. The inactivation of the Niemann Pick C1 cholesterol transporter restricts SARS-CoV-2 entry into host cells by decreasing ACE2 abundance at the plasma membrane. *Cell & bioscience*. 2024;14(1):148.
174. Zhu Y, Feng F, Hu G, Wang Y, Yu Y, Zhu Y, et al. A genome-wide CRISPR screen identifies host factors that regulate SARS-CoV-2 entry. *Nat Commun*. 2021;12(1):961.
175. Li X, Zhu W, Fan M, Zhang J, Peng Y, Huang F, et al. Dependence of SARS-CoV-2 infection on cholesterol-rich lipid raft and endosomal acidification. *Computational and structural biotechnology journal*. 2021;19:1933-43.
176. Zhang Y, Sun S, Du C, Hu K, Zhang C, Liu M, et al. Transmembrane serine protease TMPRSS2 implicated in SARS-CoV-2 infection is autoactivated intracellularly and requires N-glycosylation for regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2022;298(12):102643.
177. Bayati A, Kumar R, Francis V, McPherson PS. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 2021;296:100306.

178. Shema Mugisha C, Vuong HR, Puray-Chavez M, Bailey AL, Fox JM, Chen RE, et al. A Simplified Quantitative Real-Time PCR Assay for Monitoring SARS-CoV-2 Growth in Cell Culture. *mSphere*. 2020;5(5).
179. Zhang YY, Liang R, Wang SJ, Ye ZW, Wang TY, Chen M, et al. SARS-CoV-2 hijacks macropinocytosis to facilitate its entry and promote viral spike-mediated cell-to-cell fusion. *The Journal of biological chemistry*. 2022;298(11):102511.
180. Yu S, Hu H, Ai Q, Bai R, Ma K, Zhou M, et al. SARS-CoV-2 Spike-Mediated Entry and Its Regulation by Host Innate Immunity. *Viruses*. 2023;15(3).
181. Lu Y, Liu DX, Tam JP. Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;369(2):344-9.
182. Glende J, Schwegmann-Wessels C, Al-Falah M, Pfefferle S, Qu X, Deng H, et al. Importance of cholesterol-rich membrane microdomains in the interaction of the S protein of SARS-coronavirus with the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2. *Virology*. 2008;381(2):215-21.
183. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*. 2003;44(4):655-67.
184. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5961):46-50.
185. Suzuki T, Suzuki Y. Virus infection and lipid rafts. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(8):1538-41.
186. Gee YJ, Sea YL, Lal SK. Viral modulation of lipid rafts and their potential as putative antiviral targets. *Reviews in medical virology*. 2023;33(2):e2413.
187. Ripa I, Andreu S, López-Guerrero JA, Bello-Morales R. Membrane Rafts: Portals for Viral Entry. *Frontiers in microbiology*. 2021;12:631274.
188. El Khoury M, Naim HY. Lipid rafts disruption by statins negatively impacts the interaction between SARS-CoV-2 S1 subunit and ACE2 in intestinal epithelial cells. *Frontiers in microbiology*. 2023;14:1335458.
189. Yuan Z, Pavel MA, Wang H, Kwachukwu JC, Mediouni S, Jablonski JA, et al. Hydroxychloroquine blocks SARS-CoV-2 entry into the endocytic pathway in mammalian cell culture. *Communications biology*. 2022;5(1):958.
190. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2018;14(8):1435-55.
191. Satarker S, Ahuja T, Banerjee M, E VB, Dogra S, Agarwal T, et al. Hydroxychloroquine in COVID-19: Potential Mechanism of Action Against SARS-CoV-2. *Current pharmacology reports*. 2020;6(5):203-11.
192. Fantini J, Di Scala C, Chahinian H, Yahi N. Structural and molecular modelling studies reveal a new mechanism of action of chloroquine and hydroxychloroquine against SARS-CoV-2 infection. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;55(5):105960.
193. Bansal P, Goyal A, Cusick At, Lahan S, Dhaliwal HS, Bhyan P, et al. Hydroxychloroquine: a comprehensive review and its controversial role in coronavirus disease 2019. *Annals of medicine*. 2021;53(1):117-34.
194. Sansone NMS, Boschiero MN, Marson FAL. Efficacy of Ivermectin, Chloroquine/Hydroxychloroquine, and Azithromycin in Managing COVID-19: A Systematic Review of Phase III Clinical Trials. *Biomedicines*. 2024;12(10).
195. Fantini J, Chahinian H, Yahi N. Synergistic antiviral effect of hydroxychloroquine and azithromycin in combination against SARS-CoV-2: What molecular dynamics studies of virus-host interactions reveal. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;56(2):106020.

196. Li GM, Li YG, Yamate M, Li SM, Ikuta K. Lipid rafts play an important role in the early stage of severe acute respiratory syndrome-coronavirus life cycle. *Microbes and infection*. 2007;9(1):96-102.
197. Warner FJ, Lew RA, Smith AI, Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(47):39353-62.
198. Steinfurth M. Die Rolle von CLN7 bei immunologischen Vorgängen mit Perspektive auf SARS-CoV2 und den Cholesterinstoffwechsel. Regensburg: Universität Regensburg; 2025.
199. Khan N, Chen X, Geiger JD. Role of Endolysosomes in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Infection and Coronavirus Disease 2019 Pathogenesis: Implications for Potential Treatments. *Frontiers in pharmacology*. 2020;11:595888.
200. Pišlar A, Mitrović A, Sabotič J, Pečar Fonović U, Perišić Nanut M, Jakoš T, et al. The role of cysteine peptidases in coronavirus cell entry and replication: The therapeutic potential of cathepsin inhibitors. *PLoS pathogens*. 2020;16(11):e1009013.
201. Blaess M, Kaiser L, Sauer M, Csuk R, Digner HP. COVID-19/SARS-CoV-2 Infection: Lysosomes and Lysosomotropism Implicate New Treatment Strategies and Personal Risks. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(14).
202. Aganovic A. pH-dependent endocytosis mechanisms for influenza A and SARS-coronavirus. *Frontiers in microbiology*. 2023;14:1190463.
203. Holopainen JM, Saarikoski J, Kinnunen PK, Järvelä I. Elevated lysosomal pH in neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs). *European journal of biochemistry*. 2001;268(22):5851-6.
204. Brandenstein L, Schweizer M, Sedlacik J, Fiehler J, Storch S. Lysosomal dysfunction and impaired autophagy in a novel mouse model deficient for the lysosomal membrane protein Cln7. *Hum Mol Genet*. 2016;25(4):777-91.
205. Tancini B, Buratta S, Delo F, Sagini K, Chiaradia E, Pellegrino RM, et al. Lysosomal Exocytosis: The Extracellular Role of an Intracellular Organelle. *Membranes*. 2020;10(12).
206. Khan I, Li S, Tao L, Wang C, Ye B, Li H, et al. Tubeimosides are pan-coronavirus and filovirus inhibitors that can block their fusion protein binding to Niemann-Pick C1. *Nat Commun*. 2024;15(1):162.
207. Pieroni M, Pieruzzi F, Mignani R, Graziani F, Olivotto I, Riccio E, et al. Potential resistance to SARS-CoV-2 infection in lysosomal storage disorders. *Clinical kidney journal*. 2021;14(5):1488-90.
208. Cacciapuoti M, Caputo I, Stefanelli LF, Davis PA, Nalesso F, Calò LA. "Every Cloud Has a Silver Lining": How Three Rare Diseases Defend Themselves from COVID-19 and What We Have Learnt from It. *Clinics and practice*. 2024;14(2):614-8.
209. Caputo I, Bertoldi G, Driussi G, Sgarabotto L, Carraro G, Stefanelli LF, et al. Impaired ACE2 glycosylation and protease activity in Fabry disease protects from COVID-19. *Journal of internal medicine*. 2023;294(2):238-40.
210. Sen R, Borghoff K, Foster KW, Radio SJ, Erickson A, Hearth-Holmes M. Hydroxychloroquine and Fabry Disease: Three Case Reports Examining an Unexpected Pathologic Link and a Review of the Literature. *Case reports in rheumatology*. 2022;2022:2930103.

211. Fokra A, Feldman HB, Kurolap A, Kinaneh S, Abassi Z, HersHKovitz T. Patients with Gaucher disease display systemic elevation of ACE2, which is impacted by therapy status and genotype. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2024;143(1):108534.
212. Bullock HA, Goldsmith CS, Zaki SR, Martines RB, Miller SE. Difficulties in Differentiating Coronaviruses from Subcellular Structures in Human Tissues by Electron Microscopy. *Emerging infectious diseases*. 2021;27(4):1023-31.
213. Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, Limpens R, van der Meer Y, Caly L, et al. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *The Journal of general virology*. 2020;101(9):925-40.
214. Sasaki M, Uemura K, Sato A, Toba S, Sanaki T, Maenaka K, et al. SARS-CoV-2 variants with mutations at the S1/S2 cleavage site are generated in vitro during propagation in TMPRSS2-deficient cells. *PLoS pathogens*. 2021;17(1):e1009233.
215. Hashemi A, Roohvand F, Ghahremani MH, Aghasadeghi MR, Vahabpour R, Motevali F, et al. Optimization of transfection methods for Huh-7 and Vero cells: A comparative study. *Cytology and genetics*. 2012;46(6):347-53.
216. Biologicals N. Spectral Viewer - Flow Cytometry 2024 [Available from: <https://www.novusbio.com/spectraviewer?srsId=AfmBOor4Y2dA01DRvBovri6sori-urP-zsIT8BvCGIAnGjHU1-vykcg>].
217. Kovács T, Kárász A, Szöllosi J, Nagy P. The density of GM1-enriched lipid rafts correlates inversely with the efficiency of transfection mediated by cationic liposomes. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2009;75(8):650-7.