



Der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin inhibiert die SARS-CoV-2-Replikation

The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2 replication

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von

Melissa Maria Zimniak

aus Flörsheim am Main

Würzburg, 2023



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ralf Bargou

1. Betreuer: Prof. Dr. Jochen Bodem

2. Betreuer: Prof. Dr. August Stich

3. Betreuer: Prof. Dr. Max Topp

4. Betreuer: Prof. Dr. Lars Dölken

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Gewidmet meiner Familie.

Zusammenfassung

Die COVID-19 Pandemie ist die bisher verheerendste Pandemie des 21. Jahrhunderts. Durch die Einführung neuer mRNA-basierter Impfstoffe sowie der hohen Rate natürlicher Infektionen konnte die weltweite SARS-CoV-2-Immunität gesteigert werden. Trotz aller Erfolge zur Eindämmung der Pandemie kann eine Infektion auch heute noch zu schweren Verläufen und Tod führen. Eine adäquate COVID-19-Therapie ist folglich auf potente Virostatika angewiesen. Eine durch Umgehung zeitaufwändiger klinischer Studien schnell verfügbare Alternative zu neu entwickelten Arzneimitteln ist die Anwendung etablierter Medikamente. Wir isolierten und charakterisierten ein von einem Patienten stammendes SARS-CoV-2-Virus. Dieses Virusisolat wurde bisher in elf Publikationen verwendet. Mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion untersuchten wir eine Substanzbibliothek mit mehr als 300 neuen und bereits zugelassenen Wirkstoffen auf ihre Wirksamkeit gegen SARS-CoV-2. Dabei konnten wir zeigen, dass der selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin die SARS-CoV-2-Replikation ab einer Dosis von 0,8 µg/ml signifikant inhibiert, einer bei der Behandlung von Depressionen häufig angewandten Dosierung. Der EC₅₀-Wert lag bei 387 ng/ml. Die Behandlung mit Fluoxetin resultierte in einer reduzierten Zahl an Virusprotein-produzierenden Zellen, was darauf hindeutet, dass es die virale Reinfektion und/oder Proteinexpression inhibiert. Fluoxetin ist ein racemisches Gemisch, wobei das (S)-Enantiomer der potentere Serotonin-Wiederaufnahmehemmer ist. Wir konnten zeigen, dass beide Enantiomere einen vergleichbaren antiviralen Effekt gegen SARS-CoV-2 aufweisen, wodurch das (R)-Enantiomer bei virologischer Indikation gegebenenfalls präferiert werden sollte. Fluoxetin hat keinen Einfluss auf die Replikation des Tollwut-Virus und des Humanen Respiratorischen Synzytial-Virus, was auf eine Virusspezifität hindeutet. Weitere aus der Bibliothek stammende signifikante Inhibitoren der SARS-CoV-2-Replikation sind die am Institut für Organische Chemie Würzburg entwickelten Substanzen AKS 232 und AKS 128. Neben der medikamentösen Therapie ist die akkurate Bestimmung neutralisierender Antikörper gegen SARS-CoV-2 zur Quantifizierung des bestehenden (Re-) Infektionsschutzes sowie zur Planung zukünftiger Impfstrategien von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit entwickelten wir unter Verwendung der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion erfolgreich ein zuverlässiges Testverfahren zur Detektion neutralisierender anti-SARS-CoV-2 Antikörper.

Summary

The COVID-19 pandemic is the most fatal pandemic of the 21st century. The introduction of new mRNA-based vaccines and the high rate of natural infections have increased global SARS-CoV-2 immunity. Despite the successes in containing the pandemic, infection can still lead to severe courses and death. COVID-19 treatment is therefore dependent on potent antivirals. The development of new antivirals is a prolonged process. By bypassing time-consuming clinical trials, repurposing established medication offers a quickly available alternative to newly developed drugs. We isolated and characterized a patient-derived SARS-CoV-2 virus. This virus isolate has been used in 11 publications so far. Using quantitative real-time polymerase chain reaction, we investigated a compound library with more than 300 new and already approved substances against SARS-CoV-2. We showed that the selective serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine significantly inhibits SARS-CoV-2 replication at a concentration of 0.8 µg/ml, a dosage frequently used in the treatment of depression. The EC₅₀ was determined with 387 ng/ml. Treatment with Fluoxetine resulted in a decrease in viral protein-expressing cells, indicating that it inhibits viral reinfection and/or protein expression. Fluoxetine is a racemate with the (S)-enantiomer being the dominant serotonin reuptake inhibitor. We have shown that both stereoisomers have a comparable antiviral effect against SARS-CoV-2, suggesting the (R)-enantiomer might be the preferred option for virological indications. Fluoxetine suppressed neither Rabies virus nor human Respiratory Syncytial Virus replication, indicating it is virus specific. Other significant inhibitors of SARS-CoV-2 replication originating in the compound library are AKS 232 and AKS 128, developed with the Institute of Organic Chemistry Würzburg. In addition to drug therapy, the accurate determination of neutralising antibodies against SARS-CoV-2 is of great importance for quantifying the existing (re)infection protection and for planning future vaccination strategies. In this work, we successfully developed a reliable test procedure for the detection of neutralising anti-SARS-CoV-2 antibodies using the quantitative real-time polymerase chain reaction.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die COVID-19-Pandemie	1
1.2	Das Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2	2
1.2.1	Genomstruktur und Replikation	2
1.2.2	Pathogenese.....	4
1.2.3	Klinik	4
1.3	Diagnostik des Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2.....	5
1.4	Therapie der COVID-19-Erkrankung.....	6
1.4.1	Allgemeines	6
1.4.2	Antivirale Therapieansätze.....	7
1.4.3	Off-Label-Therapie bei COVID-19.....	9
1.4.4	Neutralisierende Antikörpertherapie	10
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	10
2	Material	11
2.1	Chemikalien.....	11
2.2	Verwendete Kits	11
2.3	Antikörper	11
2.4	Oligonukleotide.....	11
2.5	Eukaryotische Zelllinien	11
2.6	Viren.....	12
2.7	Kulturmedien, Lösungen, Puffer	12
2.8	Inhibitorische Substanzen.....	13
3	Methoden	14
3.1	Zellbiologische Methoden	14
3.1.1	Kultivierung von Vero-, BHK-21- sowie HepG2-Zellen	14
3.1.2	Zellquantifizierung.....	14

3.1.3	Zellviabilität	14
3.2	Virologische Methoden	15
3.2.1	Viruskultivierung.....	15
3.2.2	Die Bestimmung der Viruslast erfolgt in einem zweistufigen Prozess	15
3.2.3	Überprüfung antiviraler Wirkstoffe mittels RTqPCR.....	17
3.3	Immunologische Methoden.....	17
3.3.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	17
4	Ergebnis	19
4.1	Sequenzierung des SARS-CoV-2- Isolats.....	19
4.2	Untersuchung bereits zugelassener Medikamente gegen SARS-CoV-2.....	20
4.2.1	Der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin inhibiert die SARS-CoV-2-Replikation	20
4.2.2	Fluoxetin, Paroxetin und Escitalopram haben keine zytotoxische Wirkung auf Vero-Zellen.	22
4.2.3	Fluoxetin vermindert die Zahl Virusprotein-produzierender Zellen.....	23
4.2.4	Fluoxetin hat keinen Einfluss auf die Replikation des Tollwut- und RS-Virus	24
4.3	Die neu entwickelten Substanzen AKS 128 und AKS 232 inhibieren die SARS-CoV-2-Replikation.....	25
4.4	Anti-SARS-CoV-2-Antikörpernachweis durch indirekte Immunfluoreszenz	34
4.5	Etablierung eines RTqPCR-Serumneutralisationstests gegen SARS-CoV-2	36
4.5.1	Detektion SARS-CoV-2-neutralisierender Antikörper mit RTqPCR.....	37
4.5.2	Quantifizierung SARS-CoV-2-neutralisierender Antikörper mittels RTqPCR	38
5	Diskussion	39
5.1	Fluoxetin inhibiert die SARS-CoV-2 Replikation.....	39
5.1.1	Klinische Bedeutung von Fluoxetin bei COVID-19	39
5.1.2	Entschlüsselung der antiviralen Wirkmechanismen.....	40

5.1.3	Spezifität der viralen Hemmung	42
5.2	AKS 128 und AKS 232 inhibieren die SARS-CoV-2-Replikation	42
5.3	Anti-SARS-CoV-2-Antikörpernachweis durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung	43
5.3.1	Anwendungsmöglichkeiten der indirekten Immunfluoreszenzfärbung und Optimierungsmöglichkeiten	43
5.4	Etablierung eines RTqPCR-Serumneutralisationstests gegen SARS-CoV-2	44
5.4.1	Unterschiedliche NAb-Konzentrationen nach Impfung und/oder Infektion	44
5.4.2	Vergleich des RTqPCR-SNTs mit dem Goldstandard	46
5.4.3	Optimierungsmöglichkeiten des RTqPCR-SNTs	46
5.5	Ausblick	48
6	Literaturverzeichnis.....	49
7	Appendix	59
7.1	AKS-Toxizitätstests	59
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	62
7.3	Abbildungsverzeichnis	64
7.4	Tabellenverzeichnis	64
7.5	Eigene Publikationen und Konferenzteilnahmen.....	65
7.6	Affidavit.....	66
7.7	Curriculum Vitae Melissa Maria Zimniak	67

1 Einleitung

1.1 Die COVID-19-Pandemie

Die COVID-19-Pandemie hat das Leben aller Menschen weltweit gezeichnet. Humanpathogene Vertreter der Familie der Coronaviridae (CoV) verursachen in Menschen überwiegend leichte respiratorische Infekte (Mcintosh et al., 1970; Tyrrell et al., 1965). In den vergangenen zwei Jahrzehnten sind neuartige Coronaviren als Auslöser schwerer akuter Atemwegserkrankungen identifiziert worden: Das Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) sowie das Middle East Respiratory Syndrome-Related Coronavirus (MERS-CoV) waren ursächlich für die SARS-Pandemie 2002/2003 und MERS-Epidemie 2012 (Drosten et al., 2003; Zaki et al., 2012). Im Dezember 2019 mehrte sich das Auftreten viraler Pneumonien in Wuhan, China (Huang et al., 2020). Das neuartige Virus wurde als Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) und die verursachte Erkrankung als Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) bezeichnet (Gorbalenya et al., 2020; World Health Organization, 2020c). Seit Januar 2020 kam es zu einer globalen Ausbreitung des Virus in über 114 Ländern, sodass die Weltgesundheitsorganisation (WHO) am 11. März 2020 den COVID-19-Ausbruch in den Status einer Pandemie erhob (World Health Organization, 2020b). Bis Juli 2023 gab es weltweit annähernd 770.000.000 bestätigte COVID-19 Fälle (Abbildung 1) und etwa 7.000.000 Todesfälle (OurWorldinData, 2023). Am 05. Mai 2023 konnte aufgrund stetig fallender COVID-19-assoziiertes Todesfälle und Hospitalisierungen sowie der weltweit steigenden SARS-CoV-2-Immunität die internationale Gesundheitsnotlage aufgehoben werden (World Health Organization, 2023).

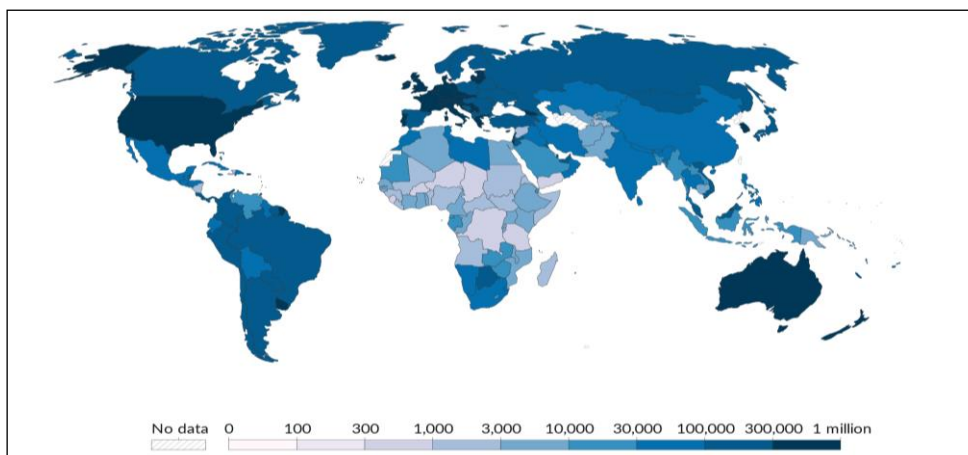


Abbildung 1: Darstellung aller bestätigten COVID-19 Fälle pro Millionen Menschen. Aufgrund eingeschränkter Testmöglichkeiten ist die Zahl aller Infizierten höher anzunehmen als die Zahl bestätigter COVID-19 Fälle. Stand: 04.01.2020-28.06.2023 (OurWorldinData, 2023).

1.2 Das Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2

1.2.1 Genomstruktur und Replikation

Das behüllte Virus SARS-CoV-2 gehört der Familie der Coronaviridae an. Bisher sind vier Gattungen (α , β , γ , δ) beschrieben (F. Li, 2016), das neue Coronavirus SARS-CoV-2 wurde den β -Coronaviridae zugeordnet (Wu et al., 2020).

SARS-CoV-2 verfügt über ein einzelsträngiges Plusstrang-Ribonukleinsäure-Genom (engl. Ribonucleic Acid, RNA) mit einer Größe von etwa 30 Kilobasen (Lu et al., 2020). Das Genom setzt sich aus Replikase- und Strukturgenen sowie Genen für akzessorische Proteine zusammen (Abbildung 2A). Die zwei offenen Leserahmen des Replikase-Gens kodieren für die Polyproteine pp1a und pp1ab, die proteolytisch in 15 Nicht-Strukturproteine gespalten werden und den Replikationskomplex des Virus bilden (Wu et al., 2020). Drei der vier Strukturproteine (Oberflächenprotein (S), Hüllprotein (E), Matrixprotein (M)) sind in die Virusmembran eingelagert, das Nukleokapsidprotein (N) bildet zusammen mit der viralen RNA das Nukleokapsid (Abbildung 2A). Die S-Proteine (engl. Spike-Protein) umgeben das Virus dornenkrantzartig und definieren durch Binden an Wirtszellrezeptoren den Tropismus des Virus (F. Li, 2016).

Für die Replikation bindet SARS-CoV-2 über den amino-terminalen Teil des Spike-Proteins S1 (Rezeptorbindende Domäne, RBD) an das Angiotensin-Converting-Enzyme 2 (ACE2) der Zelle (Ou et al., 2020; Walls et al., 2020). Die rezeptorassoziierte Serinprotease TMPRSS2 (Transmembrane Serinprotease 2) spaltet das S-Protein an der S1/S2-Schnittstelle und legt dadurch die fusogen-wirkende S2-Untereinheit des Proteins frei (Hoffmann et al., 2020). Nach Fusion der Membranen wird das virale Genom aus dem Kapsid ins Zytoplasma freigesetzt und das Replikase-Gen durch zelluläre Enzyme translatiert. Das entstehende Polypeptid wird proteolytisch gespalten, wobei unter anderem die RNA-abhängige RNA-Polymerase entsteht. Diese repliziert die Plusstrang-RNA in Minusstrang-RNA. Durch diskontinuierliche Transkription entstehen daraus einerseits genomische Plusstrang-RNA, andererseits subgenomische messenger RNAs, die am rauen endoplasmatischen Retikulum u.a. zu Strukturproteinen translatiert werden. Am Golgi-Apparat erfolgt die Virusassemblierung, die fertigen Viren werden mittels Exozytose freigesetzt (Abbildung 2B) (Alanagreh et al., 2020; Fehr et al., 2015; Kumar et al., 2020).

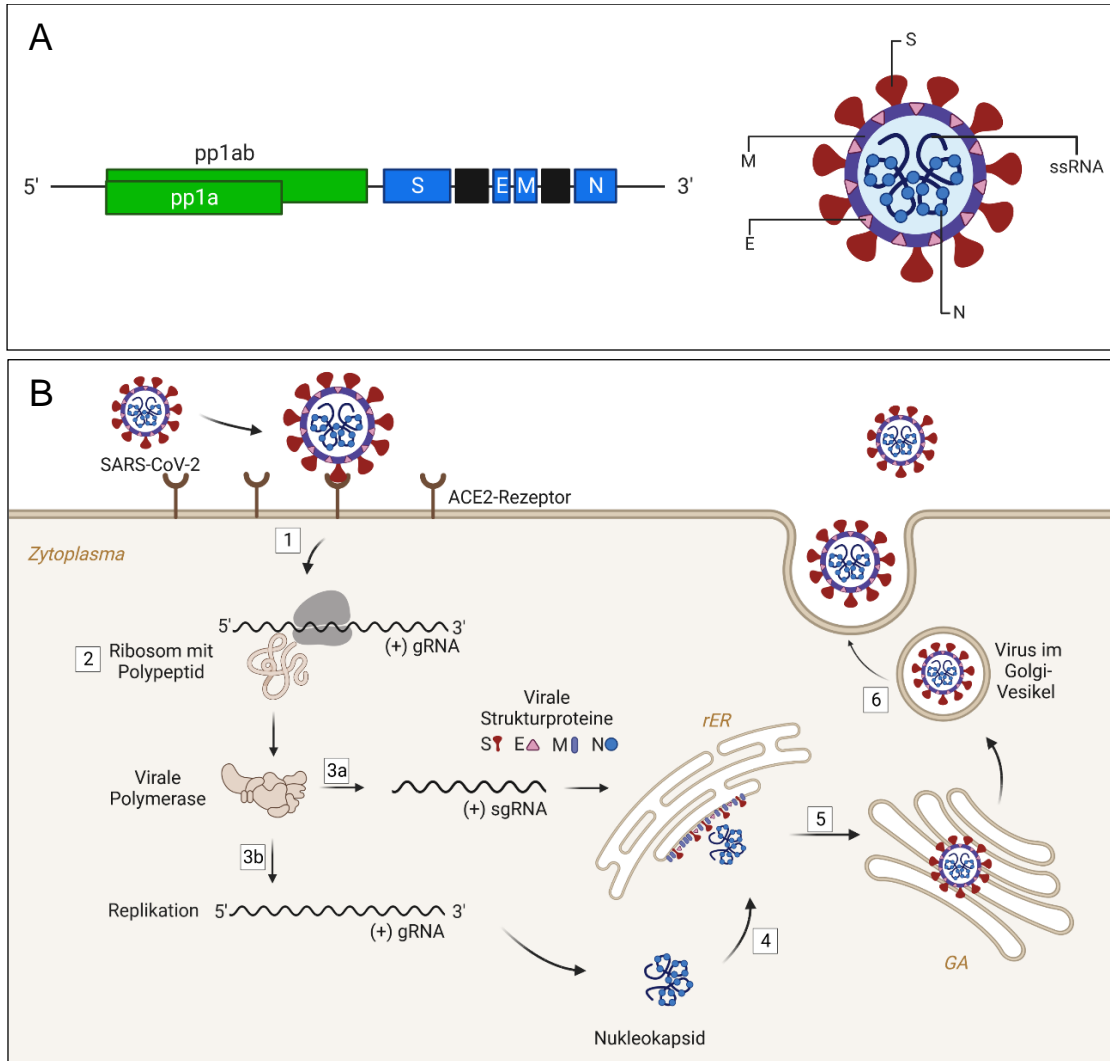


Abbildung 2: Schematische Darstellung des SARS-CoV-2-Genoms und der -Replikation.
(A) SARS-CoV-2-Genom und -Partikel. Das Replikase-Gen mit zwei offenen Leserahmen kodiert für die Polyproteine pp1a/b (grün). Die Gene der Strukturproteine, zu denen das Oberflächen- (S), das Hüll- (E), das Matrix- (M) sowie das Nucleosidprotein (N) zählen, sind blau dargestellt. Die Gene der akzessorischen Nicht-Strukturproteine sind schwarz dargestellt; ssRNA: single-stranded RNA
(B) Schematische Darstellung der SARS-CoV-2-Replikation. (1) Das Virus bindet an den ACE2-Rezeptor, wird aufgenommen und setzt seine genomische RNA (gRNA) ins Zytoplasma frei. (2) Die gRNA wird von zelleigenen Ribosomen translatiert. Das entstandene Polypeptid wird proteolytisch gespalten (nicht dargestellt). Die daraus entstehende RNA-abhängige-RNA-Polymerase synthetisiert einerseits subgenomische RNA (sgRNA), die am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) in Strukturproteine translatiert wird (3a). Andererseits entsteht (+) gRNA (3b), die mit dem N-Protein das Nucleokapsid bildet und mit den Strukturproteinen am rER assembliert (4). Das Virion wird am Golgi-Apparat modifiziert (5), in Vesikel verpackt und mittels Exozytose freigesetzt (6). Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com.

1.2.2 Pathogenese

Sowohl die oberen Atemwege als auch weitere Organe exprimieren den ACE2-Rezeptor in hoher Dichte. Die Virusreplikation ist somit nicht auf das respiratorische Epithel begrenzt, sondern findet ebenfalls in Enterozyten, Nierenepithelzellen, Gefäßendothelzellen, Myokardzellen oder Zellen des zentralen Nervensystems statt (Hikmet et al., 2020; W. H. Li et al., 2003). Direkte zytopathische Effekte infolge der Virusreplikation führen ebenso wie eine überschießende Immunantwort zu Schäden an den betroffenen Organen (X. W. Li et al., 2020). Die dysregulierte Immunantwort ist Folge eines Zytokinsturms, bei der es zur massiven Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere Interleukin 6, kommt (Blanco-Melo et al., 2020).

1.2.3 Klinik

Die Inkubationszeit beläuft sich im Median auf drei bis sechs Tage (McAloon et al., 2020). In der überwiegenden Anzahl der Fälle verläuft die COVID-19-Erkrankung mit milden respiratorischen Symptomen und gegebenenfalls Fieber. Bei einigen Patient:innen werden zudem gastrointestinale Begleitsymptome wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö oder eine Anosmie und/oder Dysgeusie verzeichnet (Huang et al., 2020; Mao et al., 2020; D. W. Wang et al., 2020). Bei etwa 15 % der Patient:innen entwickelt sich sieben Tage nach Symptombeginn das Vollbild einer interstitiellen Pneumonie mit zunehmender Dyspnoe, Tachypnoe sowie steigendem Fieber (NCPERET 2020; World Health Organization, 2020a). Haupttodesursache der COVID-19-Erkrankung ist das mit dem Zytokinsturm assoziierte akute Atemnotsyndrom (engl. Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) (Mehta et al., 2020; von Stillfried et al., 2022). Weitere Komplikationen sind unter anderem venöse thromboembolische Ereignisse, Myokarditiden, akute Nierenschädigungen oder das Auftreten von Multiorganversagen (Hirsch et al., 2020; B. Long et al., 2020; Middeldorp et al., 2020).

Personen, die

- A) ≥ 50 Jahre; männlich; adipös und/oder schwanger sind und/oder
- B) unter bestimmten Vorerkrankungen (u.a. Immunsuppression, chronischer Lungenerkrankung, Herz-Kreislauf-Erkrankung) leiden und/oder
- C) einen reduzierten Impfschutz vorweisen

zählen zu der Risikogruppe für schwere Krankheitsverläufe (X. Li et al., 2020; Treskova-Schwarzbach et al., 2021).

Bei einem Teil der Patient:innen persistieren gesundheitliche Beschwerden über Wochen bis Monate, ab einer Dauer von ≥ 12 Wochen nach SARS-CoV-2-Infektion spricht man definitionsgemäß von einem Post-COVID-Syndrom (World Health Organization, 2021).

1.3 Diagnostik des Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2

Der Goldstandard zum Nachweis einer akuten SARS-CoV-2-Infektion ist die Durchführung einer quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RTqPCR). Dazu wird Patient:innen ein tiefer Oro-/Nasopharyngeal-Abstrich entnommen und auf virusspezifische Gensequenzen untersucht (Corman et al., 2020; Feldt et al., 2023). Etwa eine Woche nach Symptombeginn sollte das Material aus dem unteren Respirationstrakt gewonnen werden, da das Virus in den oberen Atemwegen zu diesem Zeitpunkt bereits nicht mehr nachweisbar sein kann (Feldt et al., 2023).

Der Großteil der mit SARS-CoV-2-infizierten Menschen entwickelt 7-14 Tagen post-Infektion Antikörper gegen Virusproteine. Somit ist ein indirekter Erregernachweis durch Antikörperbestimmung möglich (Guo et al., 2020; Q. X. Long, B. Z. Liu, et al., 2020; Wolfel et al., 2020). Die zu untersuchenden Antikörper werden aus dem Serum der Patient:innen gewonnen. Die eingesetzten Antikörper-Assays unterscheiden sich hinsichtlich der detektierten Antikörperklasse (IgG, IgM, IgA), dem untersuchten Antigen (S-Protein, N-Protein) und dem angewendeten Test-Verfahren. Das Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist dabei das am häufigsten angewandte Testverfahren, die Immunfluoreszenztestung (IFT) stellt ein weiteres Antikörpernachweisverfahren dar (W. Liu et al., 2020; Meschi et al., 2020; Okba et al., 2020). Die Antikörperdiagnostik dient primär infektionsepidemiologischen Fragestellungen, wie der Bestimmung der SARS-CoV-2-Seroprävalenz in der Bevölkerung oder der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen (Havers et al., 2020; Krammer et al., 2021).

In der Diagnostik ist die Unterscheidung zwischen neutralisierenden und nicht-neutralisierenden Antikörpern von immenser Bedeutung. Neutralisierende Antikörper (engl. neutralizing antibody, NAb) sind in der Lage, durch Bindung an die Virusoberfläche den Eintritt des Virus in die Wirtszelle und somit dessen Replikation zu verhindern. Lediglich ein Teil der nach einer Infektion und/oder Impfung produzierten Antikörper weisen diesen neutralisierenden Effekt auf. Die Höhe des NAb-Titers ist dabei ausschlaggebend für den Schutz vor einer SARS-CoV-2-(Neu-) Infektion (Dimeglio et al., 2022; Khoury et al., 2021).

Das Plaque-Reduktions-Assay zur NAb-Detektion ist bis dato das spezifischste Nachweisverfahren. Die Inkubation von NAb mit dem Virus und anschließende Infektion einer Zellkultur mit dem NAb-Virus-Gemisch führt bei ausreichender Menge neutralisierender Antikörper zu einer verminderten Virusaufnahme in die Wirtszelle. Dies führt zu einem messbar verminderten zytopathischen Effekt des Virus (Gattinger et al., 2023; Muruato et al., 2020).

1.4 Therapie der COVID-19-Erkrankung

1.4.1 Allgemeines

Die COVID-19 Pandemie führte wie kein anderes Ereignis zu der intensivsten Impf- und Wirkstoffforschung des 21. Jahrhunderts.

Im Dezember 2020 gelang mit der Erstzulassung des mRNA-Impfstoffs BNT162b2 ein wegweisender Durchbruch zur Eindämmung der Pandemie. Weitere Impfstoffzulassungen und internationale Impfkampagnen folgten (Fiolet et al., 2022; Krammer, 2020). Die weltweite SARS-CoV-2-Immunität stieg aufgrund von natürlichen Infektionen und/oder Impfungen derart an, dass im Mai 2023 der Gesundheitsnotstand beendet werden konnte. Trotz aller Erfolge bleibt das Virus weiterhin eine nicht zu unterschätzende Gesundheitsbedrohung: Selbst nach Einführung der Impfungen wurden viele schwere Verläufe und Todesfälle aufgrund einer SARS-CoV-2-Infektion verzeichnet (World Health Organization, 2023). Ursächlich dafür kann neben einer eingeschränkten Verfügbarkeit der Impfstoffe auch eine herabgesetzte Impfwirksamkeit sein. Der Wirkverlust lässt sich zum Beispiel auf die mutationsbedingte Immunevasion des Virus zurückführen: Die verwendeten Impfstoffe weisen einen reduzierten Effekt gegen die neu entstandenen Virusvarianten auf (Andrews et al., 2022).

Für schwer erkrankte Menschen rückt die Wirksamkeit einer medikamentösen Therapie in den Vordergrund. Therapeutische Angriffspunkte sind dabei die virale Replikation sowie die Eindämmung der dysregulierten Immunantwort. Die das Robert Koch-Institut beratende Fachgruppe „Intensivmedizin, Infektiologie und Notfallmedizin (COVRIIN)“ hat eine auf der aktuellen Evidenz basierende COVID-19-Therapieempfehlung für Ärzt:innen erarbeitet (Abbildung 3) (COVRIIN, 2023b). Darin ist beschrieben, dass die Wirksamkeit antiviral wirkender Medikamente abhängig vom Einnahmezeitpunkt ist: Sie sollten in der frühen Krankheitsphase (Symptombeginn < 5-7 d) eingenommen werden, um die Virusinvasion und -replikation effektiv zu unterbinden (COVRIIN, 2023a; Niknam et al., 2022).

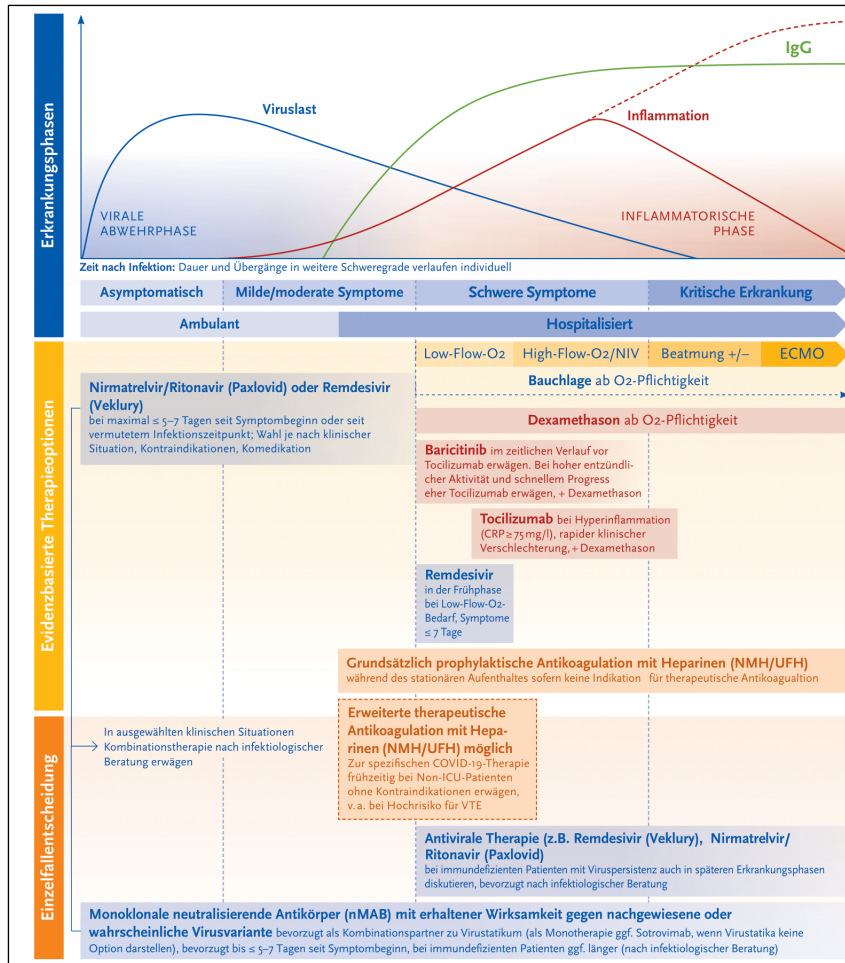


Abbildung 3: Medikamentöse und nicht-medikamentöse Therapieempfehlung nach Erkrankungsphase bei COVID-19.
Zusammenfassende Darstellung der aktuellen therapeutischen Maßnahmen bei COVID-19. Die Auswahl der aufgeführten Substanzen erfolgte Evidenz-basiert (Stand 18.04.2023). Entnommen aus (COVRIIN, 2023b).

1.4.2 Antivirale Therapieansätze

Remdesivir und Nirmatrelvir/Ritonavir sind die einzigen durch die Europäische Arzneimittel-Agentur (engl. European Medicines Agency, EMA) zugelassenen Virostatika bei COVID-19 (EMA, 2023). Die Entwicklung neuer antiviraler Substanzen ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Unterschiedliche Strukturen und Wirkweisen wurden als Ziel der antiviralen Therapie ausgewählt (Abbildung 4).

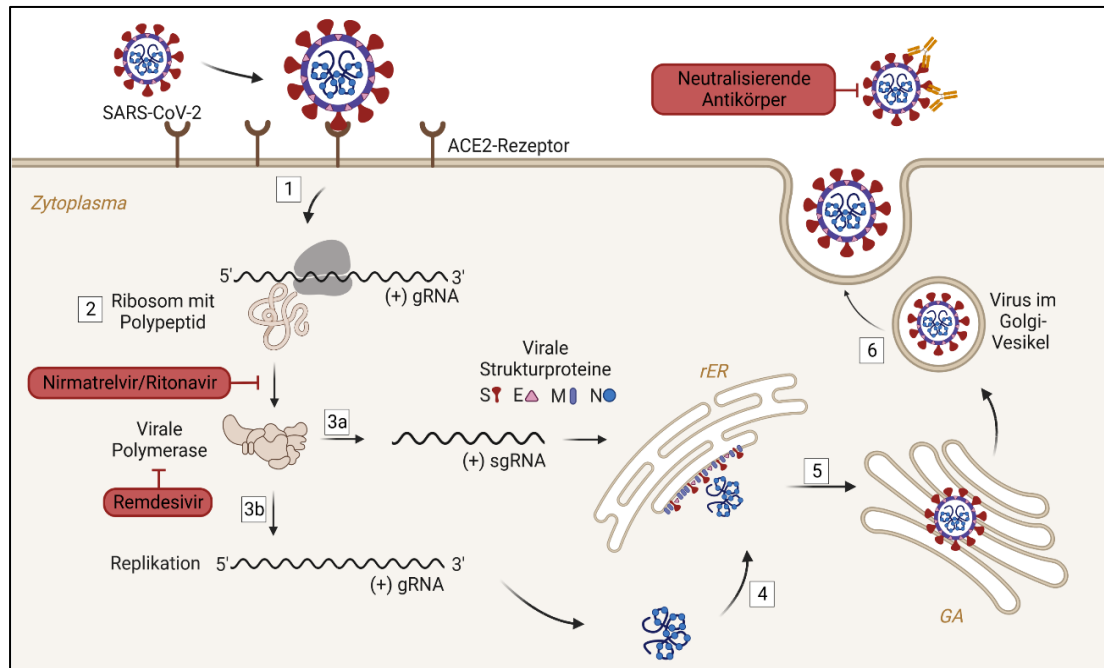


Abbildung 4: Schematische Darstellung der SARS-CoV-2 Replikation mit Zielstrukturen ausgewählter Medikamente.

Das Kombinationspräparat Nirmatrelvir/Ritonavir inhibiert die für die Replikation essenzielle 3C-ähnliche Protease (nicht dargestellt). Remdesivir inhibiert die Replikation durch Hemmung der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Neutralisierende Antikörper binden an Viren und verhindern die Aufnahme in die Wirtszelle. gRNA: genomische RNA; sgRNA: subgenomische RNA; rER: raues Endoplasmatisches Retikulum; GA: Golgi-Apparat. Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com.

Das erste von der EMA zugelassene Medikament zur Behandlung von COVID-19 war Remdesivir (EMA, 2020). Das Adenosin-Nukleotid-Analogon wirkt, indem es mit dem natürlichen Adenosin-Triphosphat um den Einbau in die neu-entstehende virale RNA durch die SARS-CoV-2-RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRPM) konkurriert. Es inhibiert die RdRPM, führt zu einer verzögerten Kettenterminierung und somit zu einer verringerten Virusreplikation (Tchesnokov et al., 2019). Die Wirksamkeit gegen SARS-CoV-2 konnte *in vitro* und in klinischen Studien bestätigt werden (Beigel et al., 2020; Grein et al., 2020; M. L. Wang et al., 2020; Yin et al., 2020).

Das Kombinationspräparat Nirmatrelvir/Ritonavir wurde im Januar 2022 für den europäischen Markt zugelassen (EMA, 2022). Nirmatrelvir inhibiert die 3C-ähnliche Protease (engl. 3C-like Protease, 3CL^{pro}). Diese spaltet unter anderem die für die SARS-CoV-2-Replikation essenziellen Polyproteine pp1a und pp1ab (Owen et al., 2021). Der Kombinationspartner Ritonavir, ebenfalls ein Proteaseinhibitor, erhöht die Wirkstärke von Nirmatrelvir, indem es durch Hemmung des Cytochrom-P450-Systems den Abbau von Nirmatrelvir verzögert (Eagling et al., 1997; EMA, 2022). Bei Gabe der Medikamente ist auf die Risikogruppen-beschränkte Zulassung sowie die begrenzte zeitliche

Anwendbarkeit (max. 5-7 d nach Symptombeginn) zu achten (Definition Risikogruppe siehe Klinik 1.2.3) (COVRIIN, 2023a).

1.4.3 Off-Label-Therapie bei COVID-19

Die Verordnung eines Arzneimittels für eine Anwendung außerhalb dessen Zulassungsbereich bezeichnet man als Off-Label-Therapie. Die Behandlung neuartiger Erkrankungen erfolgt anfänglich häufig Off-Label, da die bereits zugelassenen Medikamente aufgrund der Umgehung aufwändiger klinischer Studien schnell zur Verfügung stehen. Durch die langjährige Anwendung der Medikamente sind unerwünschte Arzneimittelwirkungen und anwendbare Dosierbereiche oft bereits bekannt. Auch die gegen COVID-19 zugelassenen Virostatika Remdesivir und Nirmatrelvir/Ritonavir entstammen ursprünglich einem anderen Zulassungsbereich: Remdesivir wurde gegen das Ebolavirus entwickelt und Ritonavir entstammt der HIV-Therapie (Human Immunodeficiency Virus, HIV) (Markowitz et al., 1995; Warren et al., 2016).

Neben den oben beschriebenen Wirkstoffen präsentiert sich Fluoxetin als potenzieller SARS-CoV-2-Inhibitor (Abbildung 5). Fluoxetin ist ein Antidepressivum der Klasse der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, SSRI)(Lemberger et al., 1978). Es wirkt anxiolytisch und stimmungsaufhellend und ist u.a. zur Behandlung von Depressionen und Zwangsstörungen indiziert (Cohn et al., 1985; Tollefson et al., 1994). Fluoxetin ist ein racemisches Gemisch, wobei das (S)-Enantiomer der potentere Serotonin-Wiederaufnahmehemmer ist (Wong, Bymaster, et al., 1985). Die in vorherigen Publikationen beschriebenen antiviralen Effekte des SSRIs gegen Humane Enteroviren sowie gegen das Dengue- und Hepatitis-C-Virus machen Fluoxetin zu einem potenziellen Kandidaten der SARS-CoV-2-Inhibition (Bauer et al., 2019; Medigeshi et al., 2016; Ulferts et al., 2013; Young et al., 2014; Zuo et al., 2012).

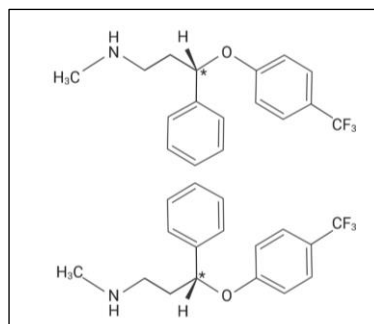


Abbildung 5: Fluoxetin als potenzieller SARS-CoV-2-Inhibitor.

Der selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin ist ein 1:1 Gemisch aus dem (R)- (oben) und dem (S)-Enantiomer (unten). Die Chiralitätszentren sind mit einem * gekennzeichnet. Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com.

1.4.4 Neutralisierende Antikörpertherapie

Seit Beginn der COVID-19-Pandemie wurde bei schwer erkrankten Patient:innen die Transfusion von Rekonvaleszenzplasma als Therapieoption diskutiert (L. Chen et al., 2020). Virusneutralisierende Antikörper werden aus dem Plasma Genesener isoliert und Patient:innen als passive Immunisierung verabreicht. Dieser therapeutische Ansatz verringerte u.a. die Mortalität und Länge des Krankenhausaufenthaltes während der SARS-Epidemie signifikant (Cheng et al., 2005; Soo et al., 2004). In ersten klinischen Versuchen mit COVID-19-Erkrankten zeigten die Transfundierten eine signifikant reduzierte Virämie und Mortalität (Duan et al., 2020; Shen et al., 2020). Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2023 bestätigte eine Mortalitätsreduktion bei infizierten und immunsupprimierten Menschen unter Rekonvaleszenz-Therapie (Senefeld et al., 2023).

Auf Grundlage des Erfolgs der Rekonvaleszenz-Therapie wurden neutralisierende monoklonale Antikörper synthetisiert, die sich gegen das Spike-Protein des Virus richten (Abbildung 4). Die Europäische Arzneimittel-Agentur erteilte vier Antikörperpräparaten die Zulassung zur COVID-19 Therapie (EMA, 2023).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die COVID-19-Pandemie ist die bisher größte Pandemie des 21. Jahrhunderts. Trotz internationaler Impfkampagnen und Zulassung medikamentöser Therapien versterben Menschen weiterhin an SARS-CoV-2-Infektionen.

Die Entwicklung potenter Wirkstoffe gegen SARS-CoV-2 mit einer weltweiten Verfügbarkeit und Zugänglichkeit ist von immenser Bedeutung. Ein Ziel der Arbeit ist deshalb die *in vitro*-Testung neuer potenzieller Wirkstoffe gegen SARS-CoV-2 ebenso wie die Untersuchung bereits zugelassener Medikamente, insbesondere die des selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmers Fluoxetin, auf antivirale Eigenschaften gegen SARS-CoV-2.

Aufbauend auf den klinischen Erfolgen der Rekonvaleszenz-Therapie sowie dem vom neutralisierenden Antikörper (NAb) -Titer ableitbaren individuellen Schutz vor (Re-) Infektion ist die NAb-Detektion von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein sensitiver RTqPCR-basierter Serumneutralisationstest gegen SARS-CoV entwickelt werden. Als anti-SARS-CoV-2-Antikörper-Screeningverfahren wird dabei die indirekte Immunfluoreszenzfärbung genutzt.

2 Material

Teile der folgenden Arbeit sind bereits in einem Preprint und Fachartikel veröffentlicht (Zimniak et al., 2021a; Zimniak et al., 2020). Die Artikel stehen unter der Lizenz CC BY-NC-ND 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) sowie CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von Carl Roth, Roche Diagnostik, Sigma-Aldrich, ThermoFisher und TIB Molbiol bezogen.

2.2 Verwendete Kits

LightMix Kit (TIB Molbiol), MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit (Roche), RNA Process Control Kit (Roche)

2.3 Antikörper

Polyklonale IgG Esel anti-Human-Alexa Fluor 594-Antikörper (Dianova), Polyklonale IgG Ziege anti-Human-Alexa Fluor 488-Antikörper

2.4 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
Rabies-LN34	[6FAM]AA[+C][+A]CCY[+C][+T][+A]CA[+A][+T]GGA[BHQ1]
Rabies-Sense	ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA
Rabies-Antisense	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC

2.5 Eukaryotische Zelllinien

Vero-Zellen	Afrikanische grüne Meereskatze Nierenepithelzelle
BHK-21-Zellen	Hamster Nierenfibroblasten
HepG2-Zellen	Humane Lebertumor-Zelllinie (Hepatoblastom)

2.6 Viren

Virus	Typ
SARS-CoV-2	Patientenisolat (Institut für Virologie, Würzburg)
Tollwut-Virus	Impfvirus
Respiratorisches Synzytial-Virus	Patientenisolat (Institut für Virologie, Würzburg)

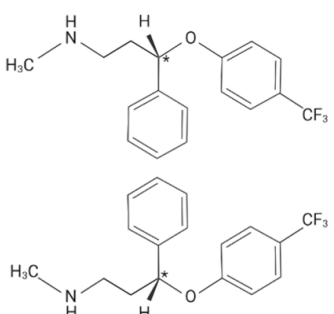
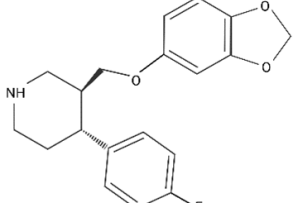
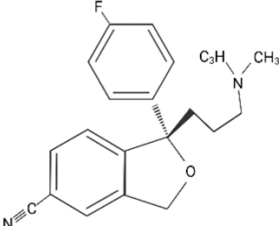
2.7 Kulturmedien, Lösungen, Puffer

ATV-Lösung (Trypsin 0,05 %)	Institut für Virologie, Würzburg
Bovines Serumalbumin (BSA) 3 %	Institut für Virologie, Würzburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1X (Gibco) Komplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (Sigma-Aldrich), 5 % L-Glutamin (Sigma-Aldrich) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)
Fixierlösung	5 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7.4
Fluoromount-G® mit DAPI	ThermoScientific
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Institut für Virologie, Würzburg
Triton-X-100 (0,3 %)	Institut für Virologie, Würzburg

2.8 Inhibitorische Substanzen

Alle AKS-Substanzen entstammen dem Labor der Organischen Chemie Würzburg.

Tabelle 1: *Namen und Strukturformeln der verwendeten selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer.*

Substanz	Strukturformel
Fluoxetin (oben: (R)-Enantiomer unten: (S)-Enantiomer)	
Paroxetin	
Escitalopram	

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Vero-, BHK-21- sowie HepG2-Zellen

Die adhärenenten Zellen wurden bei 37 °C und 5 %-CO₂-Begasung kultiviert. Alle 48 h wurden sie im Verhältnis 1:10 passagiert. Nach Abnahme des DMEM Nährmediums, Zugabe von ATV sowie kurzer Inkubationszeit bei 37 °C wurden die gelösten Zellen in frischem Medium aufgenommen und entsprechend verdünnt in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

3.1.2 Zellquantifizierung

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer kann die Zellzahl pro Mikroliter bestimmt werden. Dazu wurden 10 µl der homogenisierten Zellsuspensionslösung zwischen Kammer und aufgelegtem Deckglas pipettiert und unter einem Lichtmikroskop ausgezählt.

3.1.3 Zellviabilität

Durch Messung einer optischen 96-Napf-Platte im EnSight® Mikroplatten-Reader kann mittels Digital Phase Imaging die Zellzahl/ Napf bestimmt werden. Eine zweifache Messung an verschiedenen Tagen ermöglicht die Bestimmung der Zell-Wachstumsrate. Je 4×10^3 Zellen/ Napf wurden am Vorabend ausgesät. Die erste Messung erfolgte vor Zugabe des Wirkstoffs, die zweite nach Zugabe entsprechender Wirkstoffkonzentrationen und einer Inkubationszeit von 48 h bzw. 72 h bei 37 °C und 5 %-CO₂-Begasung. Die Ergebnisse wurden mit der Kaleido Software (PerkinElmer) analysiert. Berechnet wurde der Quotient aus Zellzahl nach 48 oder 72 h / Zellzahl nach 0 h. Die Wachstumsrate der Kontrolle (unbehandelte Zellen / Lösungsmittel in entsprechender Menge) wurde auf 100 % normiert. Die Messwerte wurden entsprechend in Prozent umgerechnet und in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Alle Versuche wurden in Triplets oder sechs Replikaten durchgeführt. Die Signifikanz des Wachstumsratenunterschieds im Sinne einer Zelltoxizität wurde mittels Student's T-Test bestimmt.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Viruskultivierung

Zur Viruskultivierung wurden Zellen infiziert und nach Ablauf mehrerer viraler Replikationszyklen passagiert. In der Kulturflasche verblieben 1 ml der infektiösen Zellsuspension, der Überstand wurde 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Zu den infizierten Zellen wurden 1 ml nicht-infizierte Zellen, 2 ml des zentrifugierten Überstands sowie 6 ml Nährmedium hinzugegeben. Zum Anlegen eines Virusstocks wurde der zelluläre Überstand nach viruspezifischer Inkubationszeit abgenommen, 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Multiplizität der Infektion (engl. multiplicity of infection, MOI) wurde mit Immunfluoreszenz bestimmt.

3.2.2 Die Bestimmung der Viruslast erfolgt in einem zweistufigen Prozess

Die Isolation viraler Nukleinsäuren aus dem Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe des MagNA Pure 24 Systems (Roche Diagnostik) unter Anwendung der Magnetpartikel-Technologie nach den Angaben des Herstellers.

Die extrahierte Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid, RNA) wurde durch eine Reverse Transkriptase in eine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben und anschließend mit RTqPCR exponentiell quantifiziert. Bei diesem Verfahren binden nach Denaturierung der Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic Acid, DNA) bei 95 °C reaktionsspezifische Primer bei 65 °C an die DNA (Annealing) und eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert bei 72 °C den komplementären DNA-Strang (Elongation). Das dabei von den FRET-Sonden (Förster-Resonanzenergietransfer, FRET) emittierte Licht wird in Echtzeit detektiert und korreliert mit der Menge an PCR-Produkten (Abbildung 6).

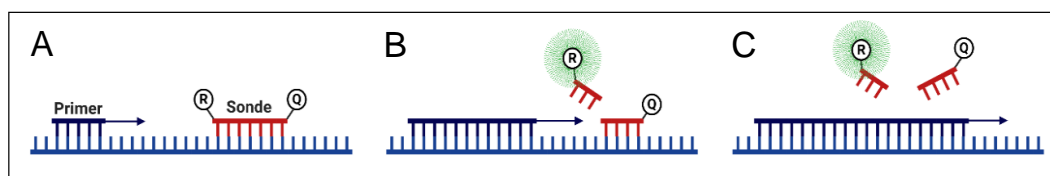


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Echtzeit-qPCR mit FRET-Sonden.

(A) Der Reporter-Farbstoff (R) der Hybridisierungssonde ist über 5-7 Nukleotide mit dem Quencher-Farbstoff (Q) verbunden. Die Nukleotide binden komplementär an die zu amplifizierende DNA. (B) Die Polymerase spaltet den Reporterfarbstoff ab, der durch die Distanz zum Quencher-Farbstoff nun Licht emittiert. (C) Die fortschreitende Polymerisation löst den Quencher-Farbstoff von der DNA. Das detektierte Licht korreliert mit der Menge an PCR-Produkten. Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com.

Der PCR-Mastermix wurde nach Herstellerangaben auf Eis pipettiert und setzte sich aus den in Tabelle 2 beschriebenen Reagenzien zusammen. Dem Ansatz wurden 5 µl Nukleinsäure-Eluat sowie Nuklease- und DNA-freies Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 µl hinzugefügt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des PCR-Mastermix.

Reagenz	Konzentration Reagenzien	Eingesetzte Menge/ Reaktion
RT-Enzym-Lösung	200 X	0.1 µl
Primer	Verschieden	0.5 µM
Hybridisierungssonde	Verschieden	0.25 µM
RTqPCR Reaktions-Mix	5 X	4.0 µl
RNA Process Control Detektions-Mix	20 X	1.0 µl

Die verwendeten Primer, Hybridisierungssonden und Positivkontrollen entstammen den virusspezifischen LightMix® Kits von Tib Molbiol oder wurden mit Hilfe der web-basierten Software ProbeFinder (Roche) entworfen. Der PCR-Ansatz sowie Positiv- und Negativkontrolle wurden zur Fehlerminimierung mithilfe des Pipettierroboters Liquid Handling Station und der zugehörigen Software in die LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 auf einem Kühlblock pipettiert. Anschließend wurde die 96-Napf-Platte mit der LightCycler® 480 Sealing Foil versiegelt und 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert.

Die RTqPCR wurde in den PCR Systemen LightCycler® 480 II bzw. LightCycler® 96 nach Anweisung des Herstellers durchgeführt und mit der zugehörigen Software analysiert. Mit Verdünnungsreihen wurde die Effizienz der Amplifikationsreaktion für das jeweilige Virus bestimmt. Als Qualitätskontrolle der MagNa Pure 24 Nukleinsäure-Aufreinigung sowie der RTqPCR wurde die RNA Process Control Lösung eingesetzt, die der Probe zu Beginn des Aufreinigungsprozesses hinzugefügt wurde. Die Daten der RTqPCR wurden mit Excel 2013 ausgewertet und in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mithilfe eines T-Tests ermittelt (Signifikanzniveau 5 %).

3.2.3 Überprüfung antiviraler Wirkstoffe mittels RTqPCR

Aus den zu untersuchenden Wirkstoffen wurden Stammlösungen definierter Konzentrationen angesetzt. Entsprechend ihres Löslichkeitsverhaltens wurden die Substanzen dafür in PBS/DMSO aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für den Inhibitionsversuch wurden je 1×10^4 Zellen / Napf in einer 48-Napf-Platte ausgesät und bei 37 °C und 5 %-CO₂-Begasung über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden den Zellen verschiedene Wirkstoffkonzentrationen zugegeben, nach einstündiger Inkubation erfolgte die Infektion mit dem jeweiligen Virus. Nach entsprechender Inkubationsdauer wurde aus dem zellulären Überstand die Menge viraler RNA bestimmt. Dazu wurde der Überstand bei 2000 rpm zentrifugiert und 250 µl des Zentrifugats mit dem MagNA Pure 24 System aufgereinigt. Viren der Risikogruppe 3 wurden vor der Aufreinigung zunächst durch Zugabe von MagNA Pure Lysis/Binding Buffer inaktiviert. Die RNA-Quantifizierung und Auswertung erfolgte durch eine RTqPCR wie unter Kapitel 3.2.2 beschrieben.

Alle Versuche wurden in Triplets durchgeführt und zweimal wiederholt. Jeder Versuch beinhaltete eine Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen / Lösungsmittel in entsprechender Menge). Der EC₅₀-Wert wurde mit dem „Dose-response Inhibition“-Model der Software Prism 8 (GraphPad) ermittelt.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung werden substratgebundene primäre Antikörper durch Fluoreszenzfarbstoff-tragende sekundäre Antikörper nachgewiesen. Zur Durchführung wurden 3×10^4 Zellen auf mit Ethanol desinfizierten Deckgläsern ausgesät (12-Napf-Platte). Versuchsspezifisch wurden die Zellen mit Wirkstoff und/oder Virus behandelt und 48 bis 72 h bei 37 °C und 5 %-CO₂-Begasung inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 5 % Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert. Nach Entfernung des Fixans durch dreimaliges Waschen mit PBS wurden die Zellen 5 Minuten mit 0.3 %-Triton-X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und mit 3 % BSA für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. BSA wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der primäre Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung (Tabelle 3) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der erste Antikörper abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde den Zellen

verdünnt hinzugegeben (Tabelle 3) und lichtgeschützt auf einem Schüttler für 2-3 h inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden im Anschluss mit einem Tropfen Fluoromount-G® auf Objektträgern fixiert. Das Eindeckmedium enthält den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der die DNA anfärbt. Die fertigen Immunfluoreszenzfärbungen wurden dunkel bei 4 °C gelagert.

Jede Immunfluoreszenzfärbung wurde als Duplet angesetzt und wiederholt durchgeführt. Die Zellfärbungen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica DMi8 und dessen entsprechender Software Leica LAS X analysiert und ausgewertet.

Tabelle 3: Charakterisierung der eingesetzten Antikörper.
Angabe der Verdünnung sowie Emissionswerte der verwendeten Antikörper.

Antikörper		Verdünnung	Emission [nm]
Alle primären Antikörper		1:100	-
Sekundäre Antikörper	Alexa Fluor 488 konjugierter Ziege anti-Human IgG -Antikörper	1:500	488
	Alexa Fluor 594 konjugierter Esel anti-Human IgG - Antikörper		594

4 Ergebnis

4.1 Sequenzierung des SARS-CoV-2- Isolats

Das in dieser Arbeit verwendete SARS-CoV-2 wurde aus einem Patienten isoliert. Dazu wurden 200 µl eines frischen Rachenabstrichs auf Vero-Zellen in einer 48-Napf-Platte gegeben und dreimal passagiert. Virusproben wurde anschließend bei -80 °C archiviert und das Virus weiter kultiviert. Zur Identifikation sowie taxonomischen Einordnung des verwendeten SARS-CoV-2-Isolats wurde an 100 µl aufgereinigter Virus-RNA eine vollständige Next Generation Sequenzierung (Firma SysMed) durchgeführt. Das in den Versuchen verwendete SARS-CoV-2 kann den β -Coronaviridae zugeordnet werden (Abbildung 7). Das sequenzierte SARS-CoV-2 zeigte im S-Protein einen Aminosäureaustausch von Asparaginsäure 614 zu Glycin, der mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist (Eaaswarkhanth et al., 2020). Das Virus wurde inzwischen in den folgenden Publikationen weiter charakterisiert (Breidenbach et al., 2021; Brenner et al., 2023; Friedrich et al., 2022; Geiger et al., 2023; Geiger, Kersting, et al., 2022; Geiger, König, et al., 2022; Krasemann et al., 2022; F. Liu et al., 2021; Sayed et al., 2023; Schmidt et al., 2021; Zimniak et al., 2021b).

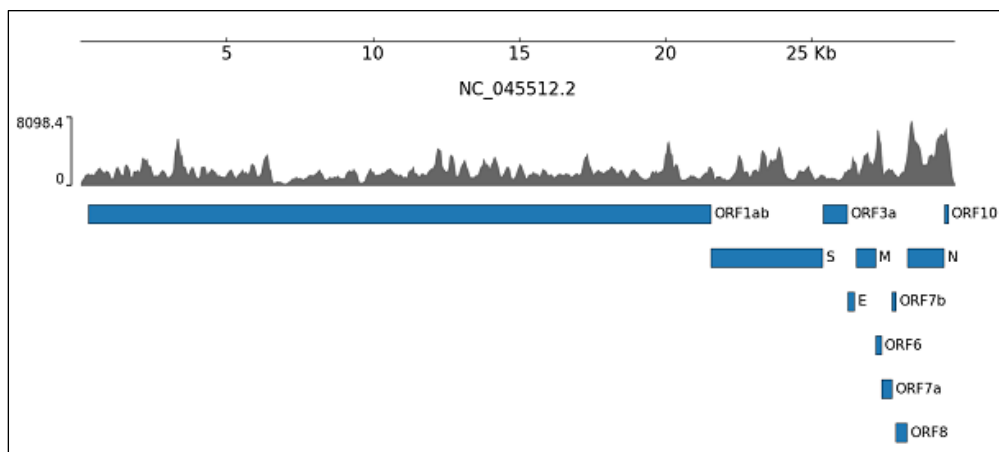


Abbildung 7: Charakterisierung des SARS-CoV-2 Isolats.

Sequenz-Abdeckungsblot: Es wurden alle Bereiche des Referenzgenoms („Accession number“: NC-045512.2) bei der Sequenzierung abgedeckt (Grafik: M. Srivastava).

4.2 Untersuchung bereits zugelassener Medikamente gegen SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 ist Verursacher der COVID-19-Pandemie. Weiterhin wird weltweit an der Entwicklung antiviraler Substanzen geforscht. Seit März 2020 arbeitet die AG Bodem an potenziellen Inhibitoren des SARS-CoV-2.

4.2.1 Der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin inhibiert die SARS-CoV-2-Replikation

Fluoxetin ist ein Antidepressivum der Klasse der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI). Durch seine stimmungsaufhellende und anxiolytische Wirkung ist es überwiegend bei Depressionen und/oder Zwangsstörungen indiziert. Ein beschriebener antiviraler Effekt Fluoxetins gegen das Dengue- und Hepatitis-C-Virus sowie gegen Humane Enteroviren veranlasste die Untersuchung der Wirkung Fluoxetins gegen SARS-CoV-2. Paroxetin und Escitalopram wurden als weitere SSRI-Vertreter auf ihre antiviralen Eigenschaften untersucht.

Am Vortag ausgesäte Vero-Zellen wurden mit steigenden Wirkstoff-Konzentrationen für eine Stunde präinkubiert und anschließend mit SARS-CoV-2 (MOI: 0,5) infiziert. Alle Infektionen wurden in Triplikaten durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden 125 µl des zellulären Überstandes in 250 µl des MagNA Pure Lysis/Binding Buffer zur viralen Inaktivierung überführt. Die virale RNA wurde durch das MagnaPure24 System aufgereinigt und mit RTqPCR quantifiziert. Fluoxetin inhibierte die virale Replikation ab einer Konzentration von 0,8 µg/ml signifikant (Abbildung 8). Der Einsatz von 1,6 µg/ml Fluoxetin resultierte in einer Verringerung der Viruslast um 3 log-Stufen. Der EC₅₀-Wert lag bei 387 ng/ml, also deutlich unter der zur Behandlung von Depressionen eingesetzten Dosierung.

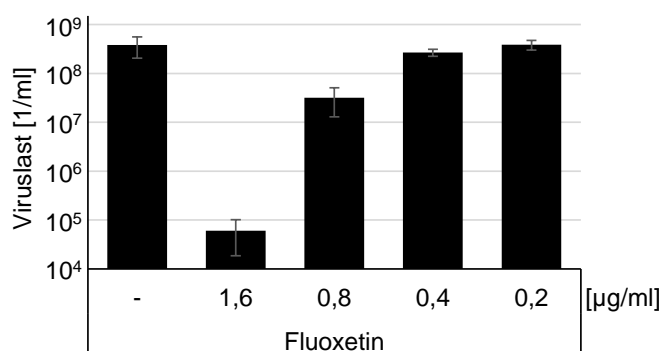


Abbildung 8: Fluoxetin inhibiert die SARS-CoV-2-Replikation.

Vero-Zellen wurden für 1 h mit steigenden Fluoxetin-Konzentrationen präinkubiert und anschließend mit SARS-CoV-2 infiziert. Die virale RNA wurde nach 72 hpi aus zellulärem Überstand isoliert und durch RTqPCR quantifiziert. Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung (entnommen aus Zimniak et al, 2021).

Fluoxetin ist ein racemisches Gemisch, als Psychopharmakon wird häufig das (S)-Stereoisomer angewendet. Beide Enantiomere weisen einen vergleichbaren antiviralen Effekt gegen SARS-CoV-2 auf (Abbildung 9A). Im Gegensatz zu Fluoxetin konnte bei den andern untersuchten SSRI-Vertretern Paroxetin und Escitalopram keine Inhibierung der viralen Replikation festgestellt werden (Abbildung 9B).

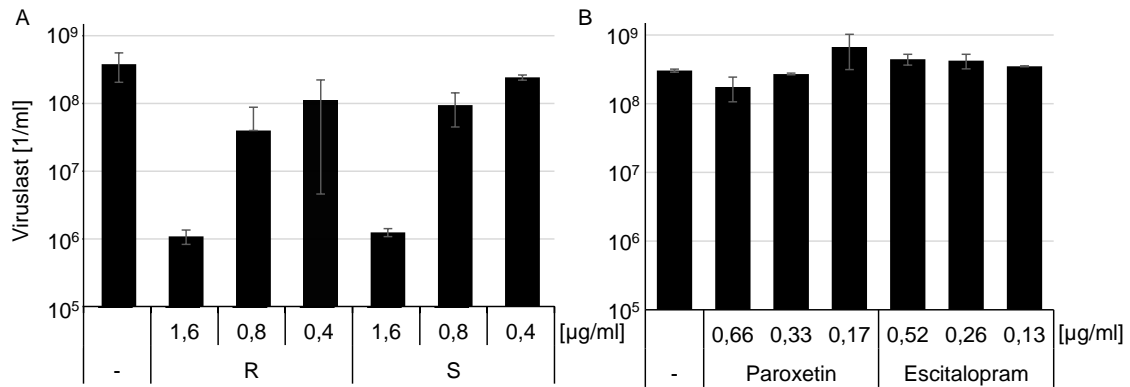


Abbildung 9: Fluoxetins Enantiomere inhibieren die SARS-CoV-2-Replikation. Paroxetin und Escitalopram haben keinen Einfluss auf die SARS-CoV-2-Replikation.

Vero-Zellen wurden für 1 h mit steigenden Wirkstoffkonzentrationen präinkubiert und anschließend mit SARS-CoV-2 infiziert (R: (R)-Enantiomer; S: (S)-Enantiomer). Die virale RNA wurde nach 72 hpi aus zellulärem Überstand isoliert und durch RTqPCR quantifiziert. **(A)** Die Enantiomere inhibieren die SARS-CoV-2-Replikation gleichermaßen. **(B)** Die SSRI Paroxetin und Escitalopram haben keinen Einfluss auf die SARS-CoV-2-Replikation. Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung (entnommen aus Zimniak et al., 2021).

4.2.2 Fluoxetin, Paroxetin und Escitalopram haben keine zytotoxische Wirkung auf Vero-Zellen

Um eine zytotoxische Wirkung der Substanzen auszuschließen, wurden Vero-Zellen für 72 h mit aufsteigenden SSRI-Konzentrationen inkubiert. Die verwendeten Mengen orientierten sich dabei an der zur Behandlung von Depressionen eingesetzten Tagesdosis (Fluoxetin: 0,8 µg/ml; Paroxetin 0,33 µg/ml; Escitalopram 0,26 µg/ml). Die Wachstumsrate der Zellen wurde durch Messungen im PerkinElmer EnSight ermittelt. Keine der eingesetzten Konzentrationen hatte eine wachstumsinhibierende Wirkung auf Vero-Zellen (Abbildung 10).

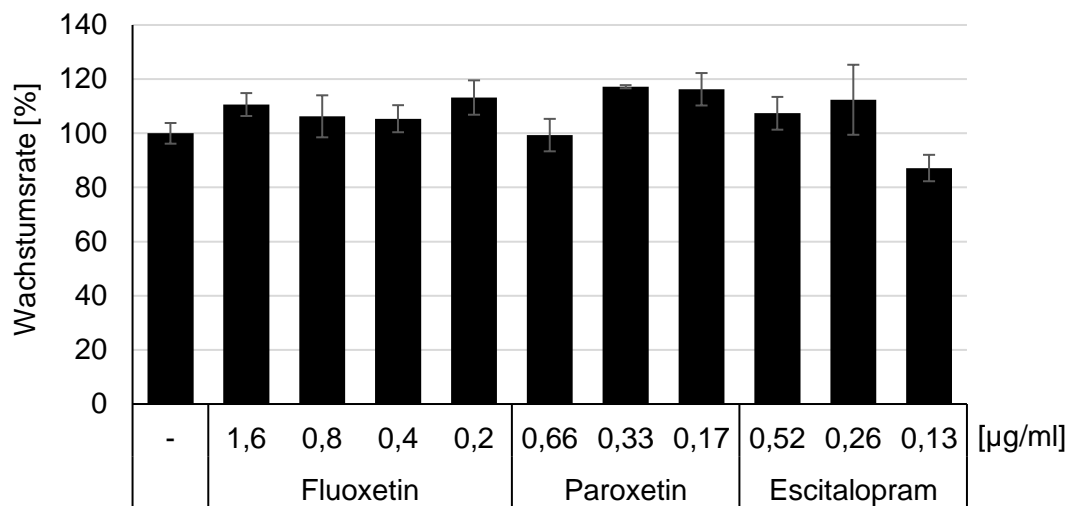


Abbildung 10: Fluoxetin, Paroxetin und Escitalopram haben keine zytotoxische Wirkung auf Vero-Zellen.

Die Zellen wurden für 72 h mit den SSRI in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Wachstumsrate wurde durch Messungen im PerkinElmer EnSight ermittelt. Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung (entnommen aus Zimniak et al., 2021).

4.2.3 Fluoxetin vermindert die Zahl Virusprotein-produzierender Zellen

Zur weiteren Aufklärung des Inhibitionsmechanismus wurde die virale Proteinexpression mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Vero-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät, mit 1,6 und 0,8 µg/ml Fluoxetin inkubiert und nach einer Stunde mit SARS-CoV-2 infiziert. Nach drei Tagen wurden die viralen Proteine mit primären Antikörpern aus dem Serum eines mit SARS-CoV-2-infizierten Patienten detektiert (siehe Kapitel 4.4). Die Zugabe von Fluoxetin resultierte dosisabhängig in einer verminderten Zahl Virusprotein-produzierender Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 11).

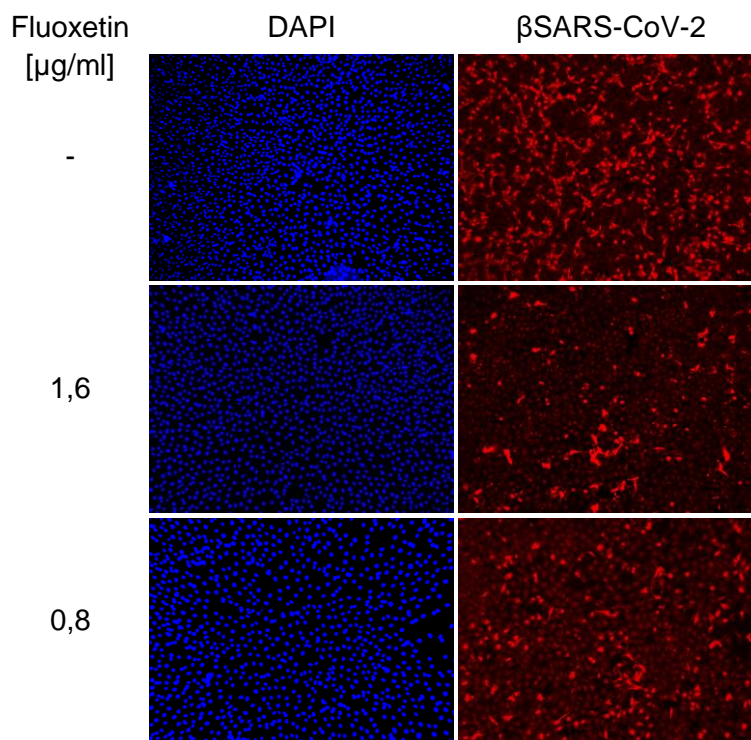


Abbildung 11: Fluoxetin vermindert die Zahl Virusprotein-produzierender Zellen.

Vero-Zellen wurden mit 1,6 und 0,8 µg/ml Fluoxetin präinkubiert und anschließend mit SARS-CoV-2 infiziert. Die Detektion viraler Proteine erfolgte nach 72 h mit einem SARS-CoV-2-spezifischen Antiserum (Verdünnung 1:100) und einem Alexa Fluor 594-konjugierten Esel anti-Human Antikörper (Verdünnung 1:500). Die Nuclei wurden mit DAPI angefärbt (entnommen aus Zimniak et al., 2021).

4.2.4 Fluoxetin hat keinen Einfluss auf die Replikation des Tollwut- und RS-Virus

Zur Untersuchung der Spezifität des Fluoxetins gegenüber SARS-CoV-2 wurden weitere einzelsträngige RNA-Viren untersucht. Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse wurde zunächst die toxische Wirkung der Substanz auf BHK-21- und HepG2-Zellen untersucht, indem die Zellen für 72 h mit dem Wirkstoff inkubiert wurden. Die Wachstumsrate der Zellen wurde durch Messungen im PerkinElmer EnSight ermittelt. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 100 % normiert. Keine der eingesetzten Konzentrationen hatte eine wachstumsinhibierende Wirkung auf die Zellen (Abbildung 12 A/B). Anschließend wurden BHK-21- sowie HepG2-Zellen ausgesät, am Folgetag mit Fluoxetin präinkubiert und mit dem Tollwut- bzw. dem Humanen Respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) infiziert. Nach 48 hpi wurde die virale RNA durch das MagnaPure24 System aufgereinigt und mittels RTqPCR quantifiziert. Alle Infektionen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Replikation der untersuchten Viren wurde durch Fluoxetin nicht beeinflusst (Abbildung 12 C/D).

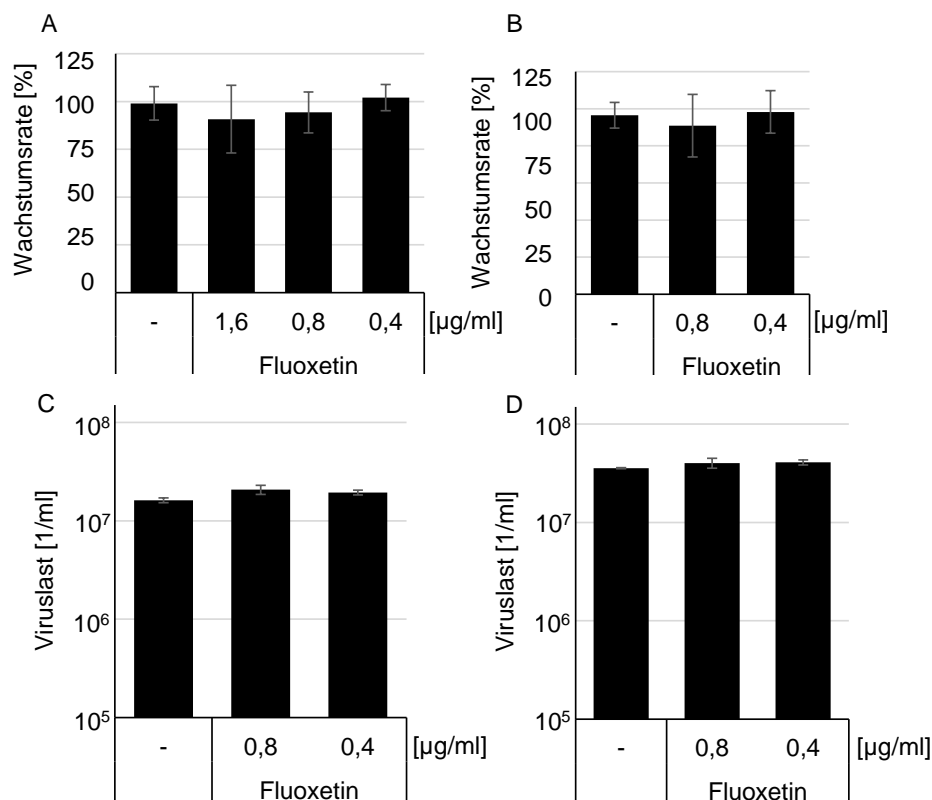


Abbildung 12: Fluoxetin hat keine zytotoxische Wirkung auf BHK-21- und HepG2-Zellen. Fluoxetin hat keinen Einfluss auf die Replikation des Tollwut- und RS-Virus.

(A) und (B): BHK-21- (A) und HepG2- Zellen (B) wurden für 72 h mit Fluoxetin in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Wachstumsrate wurde durch Messungen im PerkinElmer EnSight ermittelt. (C) und (D): BHK-21- und HepG2-Zellen wurden für 1 h mit Wirkstoffkonzentrationen präinkubiert und anschließend mit Tollwut- bzw. RS-Virus infiziert. Die virale RNA wurde nach 48 hpi aus zellulärem Überstand isoliert und durch RTqPCR quantifiziert. Fluoxetin hat keinen Einfluss auf die Replikation des Tollwut- (C) und des RS-Virus (D). Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung (entnommen aus Zimniak et al., 2021).

4.3 Die neu entwickelten Substanzen AKS 128 und AKS 232 inhibieren die SARS-CoV-2-Replikation

In Kooperation mit der Organischen Chemie Würzburg wurden Substanzen auf ihre antiviralen Eigenschaften *in vitro* gegen SARS-CoV-2 getestet. Die Substanzen wurden fortführend nummeriert und mit der Abbreviation „AKS“ bezeichnet.

Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse wurde die toxische Wirkung der Substanzen auf Vero-Zellen untersucht, indem die Zellen für 72 h mit den Wirkstoffen inkubiert wurden. Die Wachstumsrate der Zellen wurde durch Messung im PerkinElmer EnSight nach 0 und 72 h ermittelt. Berechnet wurde der Quotient aus der Zellzahl nach 72 h / Zellzahl nach 0 h. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 100 % normiert. Die Signifikanz des Wachstumsratenunterschieds im Sinne einer Zelltoxizität wurde mittels Student's T-Test bestimmt (Tabelle 4 und Appendix 7.1).

Zur Überprüfung der antiviralen Aktivität wurden Vero-Zellen mit 30 µM der jeweiligen Substanz für eine Stunde präinkubiert und anschließend mit SARS-CoV-2 (MOI: 0,5) infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden 125 µl des zellulären Überstandes in 250 µl des MagNA Pure Lysis/Binding Buffer zur viralen Inaktivierung überführt. Die virale RNA wurde durch das MagnaPure24 System aufgereinigt und mittels RTqPCR quantifiziert. Bei einer Senkung der Viruslast um ≥ 1 log-Stufe und negativem Zytotoxizitätstest wurde die entsprechende Substanz in abnehmenden Wirkstoffkonzentrationen (15 µM und 7,5 µM) gegen das Virus getestet, um die geringste Wirkungs-dosis zu ermitteln. Bei einer Senkung der Viruslast um ≥ 1 log-Stufe und positivem Zytotoxizitätstest wurde der Zytotoxizitätstest in abnehmenden Konzentrationen wiederholt. Die erste nicht toxische Wirkstoffkonzentration wurde erneut gegen SARS-CoV-2 getestet.

AKS 128 und AKS 232 inhibierten die SARS-CoV-2-Replikation signifikant (Abbildung 13). Der Einfluss aller getesteten AKS-Substanzen auf die Virusvermehrung ist tabellarisch dargestellt (Tabelle 4). Die AKS-Substanzen 51-64, 66, 68-76, 78-81, 84-100 sowie AKS 128 in einer Dosierung von 3,75 μM wurden ausschließlich gegen SARS-CoV-2 getestet.

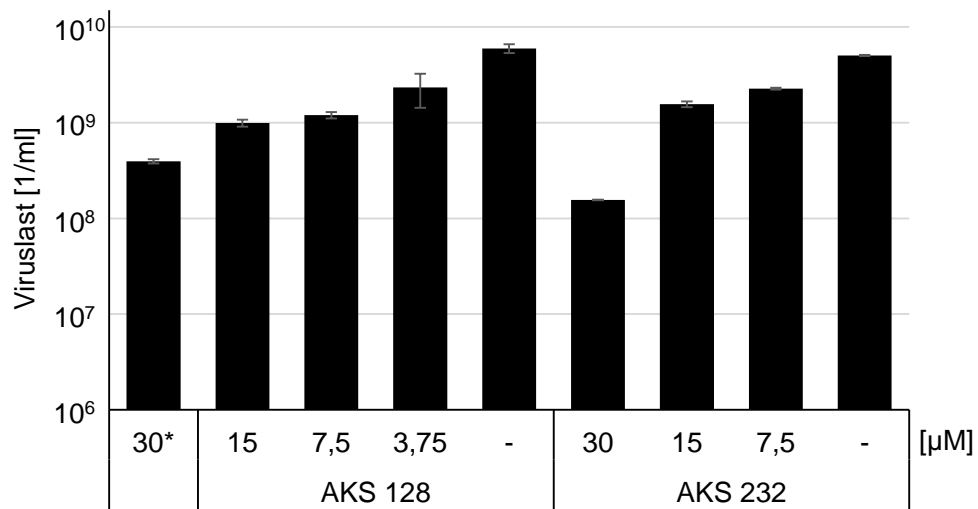


Abbildung 13: AKS 128 und AKS 232 inhibieren die SARS-CoV-2-Replikation.

Vero-Zellen wurden für 1 h mit den Substanzen präinkubiert und anschließend mit SARS-CoV-2 infiziert. Die virale RNA wurde nach 72 hpi aus zellulärem Überstand isoliert und durch RTqPCR quantifiziert. *30 μM der AKS-Substanz 128 sind auf Vero-Zellen zytotoxisch. Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung.

Tabelle 4: Einfluss der AKS-Substanzen auf die SARS-CoV-2-Replikation.

Vero-Zellen wurden für 1 h mit den Substanzen präinkubiert und anschließend mit SARS-CoV-2 infiziert. Die virale RNA wurde nach 72 hpi aus zellulärem Überstand isoliert und durch RTqPCR quantifiziert. Die Viruslastreduktion wird als Log10 des Kontrolle-/Wirkstoff-Quotienten dargestellt. Alle nicht-toxischen AKS-Substanzen mit einer Viruslastreduktion $\geq 0,5$ log sind grau hinterlegt.

Substanzname	Konzentration [μM]	Viruslast-Reduktion [log-Stufen]	Ergebnis Toxizitätstest
AKS 1	30	0,13	nicht toxisch
AKS 3	30	0,12	nicht toxisch
AKS 4	30	-0,02	nicht toxisch
AKS 5	30	0,06	nicht toxisch
AKS 6	30	-0,10	nicht toxisch
AKS 7	30	-0,10	nicht toxisch
AKS 10	30	0,00	nicht toxisch
AKS 11	30	-0,08	nicht toxisch
AKS 12	30	0,02	nicht toxisch
AKS 13	30	0,10	nicht toxisch
AKS 14	30	-0,19	nicht toxisch
AKS 16	30	-0,22	nicht toxisch
AKS 17	30	0,11	nicht toxisch
AKS 18	30	0,01	nicht toxisch
AKS 19	30	0,68	nicht toxisch
AKS 20	30	0,55	nicht toxisch
AKS 21	30	0,20	nicht toxisch
AKS 22	30	0,08	nicht toxisch
AKS 23	30	0,03	nicht toxisch
AKS 24	30	-0,29	nicht toxisch
AKS 26	30	-0,21	nicht toxisch
AKS 27	30	***	toxisch
AKS 28	30	0,17	nicht toxisch
AKS 29	30	***	toxisch
AKS 30	30	***	toxisch
AKS 31	30	***	toxisch
	6	0,08	nicht toxisch
AKS 32	30	***	toxisch
	6	0,10	toxisch
AKS 33	30	***	toxisch
	6	-0,02	nicht toxisch
AKS 34	30	***	toxisch
	6	-0,08	nicht toxisch
AKS 35	30	-0,14	nicht toxisch

Substanzname	Konzentration [μM]	Viruslast-Reduktion [log-Stufen]	Ergebnis Toxizitätstest
AKS 36	30	-0,12	nicht toxisch
AKS 37	30	0,04	nicht toxisch
AKS 38	30	***	toxisch
	6	0,09	toxisch
AKS 41	30	0,41	nicht toxisch
AKS 42	30	***	toxisch
	6	0,47	toxisch
AKS 43	30	0,37	nicht toxisch
AKS 44	30	0,11	nicht toxisch
AKS 45	30	***	toxisch
	6	-0,18	toxisch
AKS 46	30	***	toxisch
	6	-0,04	nicht toxisch
AKS 47	30	-0,04	nicht toxisch
AKS 48	30	-0,26	nicht toxisch
AKS 49	30	***	toxisch
	6	0,05	nicht toxisch
AKS 50	30	0,02	nicht toxisch
AKS 51	30	-0,13	***
AKS 52	30	0,01	***
AKS 53	30	0,13	***
AKS 54	30	0,11	***
AKS 55	30	0,01	***
AKS 56	30	-0,08	***
AKS 57	30	0,04	***
AKS 60	30	0,16	***
AKS 61	30	0,00	***
AKS 62	30	0,08	***
AKS 63	30	0,06	***
AKS 64	30	0,03	***
AKS 65	30	1,26	toxisch
	15	1,26	toxisch
	7,5	1,00	toxisch
AKS 66	30	0,00	***
AKS 67	30	0,29	nicht toxisch
AKS 68	30	0,16	***
AKS 69	30	0,01	***
AKS 70	30	0,1	***

Substanzname	Konzentration [μM]	Viruslast-Reduktion [log-Stufen]	Ergebnis Toxizitätstest
AKS 72	30	0	***
AKS 73	30	-0,2	***
AKS 74	30	-0,04	***
AKS 75	30	0,03	***
AKS 76	30	-0,05	***
AKS 77	30	0,21	nicht toxisch
AKS 78	30	0,12	***
AKS 79	30	0,01	***
AKS 80	30	0,10	***
AKS 81	30	0,09	***
AKS 83	30	0,30	toxisch
AKS 84	30	0,05	***
AKS 85	30	0,07	***
AKS 86	30	0,10	***
AKS 87	30	0,01	***
AKS 88	30	0,02	***
AKS 89	30	-0,07	***
AKS 90	30	-0,3	***
AKS 91	30	-0,02	***
AKS 92	30	0,05	***
AKS 93	30	-0,05	***
AKS 94	30	-0,08	***
AKS 95	30	0,01	***
AKS 96	30	0,06	***
AKS 97	30	0,04	***
AKS 98a	30	0,08	***
AKS 98b	30	-0,24	***
AKS 99	30	0,01	***
AKS 100	30	0,00	***
AKS 101	30	-0,25	nicht toxisch
AKS 103	30	0,55	toxisch
	15	0,02	nicht toxisch
AKS 104	30	-0,05	toxisch
AKS 105	30	-0,06	toxisch
AKS 106	30	-0,09	toxisch
AKS 109	30	-0,11	toxisch
AKS 110	30	-0,04	toxisch
AKS 111	30	-0,23	toxisch

Substanzname	Konzentration [μM]	Viruslast-Reduktion [log-Stufen]	Ergebnis Toxizitätstest
AKS 113	30	0,03	toxisch
AKS 114	30	-0,01	toxisch
AKS 115	30	0,00	nicht toxisch
AKS 116	30	-0,07	toxisch
AKS 117	30	-0,16	toxisch
AKS 118	30	-0,24	toxisch
AKS 119	30	-0,29	toxisch
AKS 120	30	-0,10	toxisch
AKS 121	30	-0,17	nicht toxisch
AKS 122	30	-0,11	nicht toxisch
AKS 124	30	-0,09	toxisch
AKS 125	30	-0,11	nicht toxisch
AKS 126	30	-0,09	nicht toxisch
AKS 127	30	-0,26	nicht toxisch
AKS 128	30	1,19	toxisch
	15	0,79	nicht toxisch
	7,5	0,69	nicht toxisch
	3,75	0,40	***
AKS 129	30	0,20	nicht toxisch
AKS 130	30	-0,07	nicht toxisch
AKS 131	30	-0,08	nicht toxisch
AKS 133	30	-0,17	nicht toxisch
AKS 134	30	-0,01	nicht toxisch
AKS 135	30	0,04	nicht toxisch
AKS 137	30	-0,11	toxisch
AKS 138	30	-0,09	nicht toxisch
AKS 139	30	-0,22	nicht toxisch
AKS 140	30	0,03	nicht toxisch
AKS 141	30	0,04	nicht toxisch
AKS 142	30	0,14	toxisch
AKS 143	30	0,18	nicht toxisch
AKS 144	30	0,00	nicht toxisch
AKS 145	30	0,03	nicht toxisch
AKS 146	30	0,43	nicht toxisch
AKS 147	30	0,14	toxisch
AKS 148	30	0,08	nicht toxisch
AKS 151	30	0,25	nicht toxisch
AKS 152	30	-0,06	nicht toxisch

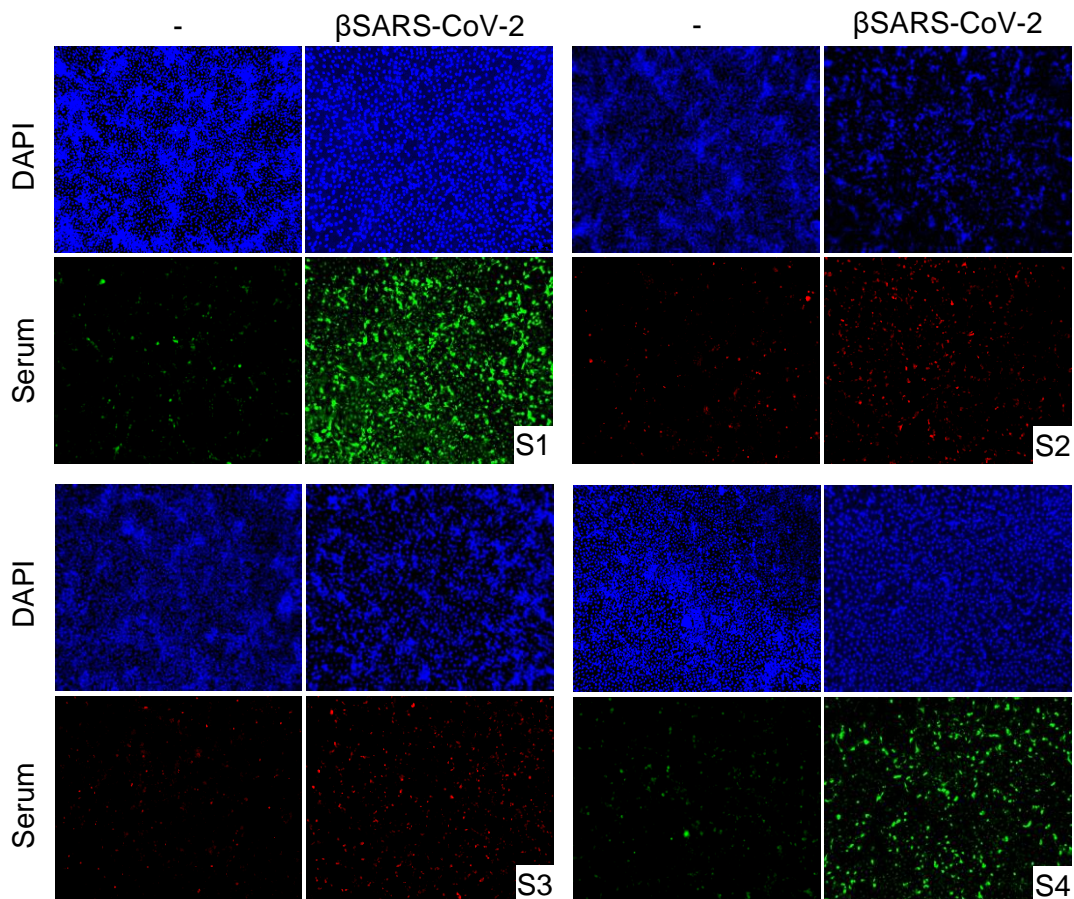
Substanzname	Konzentration [µM]	Viruslast-Reduktion [log-Stufen]	Ergebnis Toxizitätstest
AKS 154	30	0,09	nicht toxisch
AKS 156	30	-0,12	nicht toxisch
AKS 157	30	-0,12	nicht toxisch
AKS 158	30	0,04	nicht toxisch
AKS 159	30	-0,18	nicht toxisch
AKS 160	30	-0,12	nicht toxisch
AKS 161	30	-0,08	nicht toxisch
AKS 162	30	0,17	nicht toxisch
AKS 163	30	0,12	nicht toxisch
AKS 164	30	-0,08	nicht toxisch
AKS 165	30	-0,15	nicht toxisch
AKS 166	30	-0,07	nicht toxisch
AKS 167	30	0,08	nicht toxisch
AKS 168	30	0,00	nicht toxisch
AKS 169	30	-0,11	nicht toxisch
AKS 170	30	0,22	nicht toxisch
AKS 171	30	0,00	nicht toxisch
AKS 172	30	-0,17	nicht toxisch
AKS 173	30	-0,12	nicht toxisch
AKS 174	30	-0,04	nicht toxisch
AKS 175	30	-0,11	nicht toxisch
AKS 176	30	-0,04	nicht toxisch
AKS 177	30	-0,01	nicht toxisch
AKS 178	30	-0,06	nicht toxisch
AKS 179	30	0,02	nicht toxisch
AKS 180	30	-0,23	nicht toxisch
AKS 182	30	-0,18	nicht toxisch
AKS 183	30	-0,15	nicht toxisch
AKS 184	30	-0,17	nicht toxisch
AKS 185	30	-0,13	nicht toxisch
AKS 186	30	0,00	nicht toxisch
AKS 187	30	0,21	nicht toxisch
AKS 188	30	0,14	nicht toxisch
AKS 189	30	-0,08	nicht toxisch
AKS 190	30	0,26	nicht toxisch
AKS 191	30	0,08	nicht toxisch
AKS 192	30	-0,18	nicht toxisch
AKS 193	30	0,12	nicht toxisch

Substanzname	Konzentration [μM]	Viruslast-Reduktion [log-Stufen]	Ergebnis Toxizitätstest
AKS 194	30	0,17	nicht toxisch
AKS 195	30	-0,12	nicht toxisch
AKS 196	30	0,10	nicht toxisch
AKS 197a	30	-0,01	nicht toxisch
AKS 197b	30	0,11	nicht toxisch
AKS 198a	30	0,08	nicht toxisch
AKS 198b	30	0,09	nicht toxisch
AKS 199	30	-0,02	nicht toxisch
AKS 200	30	0,01	nicht toxisch
AKS 203	30	0,18	nicht toxisch
AKS 204	30	0,04	nicht toxisch
AKS 205	30	-0,29	nicht toxisch
AKS 206	30	-0,43	toxisch
AKS 207	30	0,68	nicht toxisch
AKS 208	30	0,00	nicht toxisch
AKS 210	30	0,52	nicht toxisch
AKS 211	30	-0,12	nicht toxisch
AKS 212	30	0,08	nicht toxisch
AKS 214	30	-0,10	nicht toxisch
AKS 215	30	0,20	nicht toxisch
AKS 217	30	-0,09	nicht toxisch
AKS 218	30	0,03	nicht toxisch
AKS 219	30	0,10	nicht toxisch
AKS 221	30	0,08	nicht toxisch
AKS 222	30	-0,06	nicht toxisch
AKS 223	30	0,24	nicht toxisch
AKS 225	30	1,10	toxisch
	15	0,61	nicht toxisch
	7,5	0,2	nicht toxisch
AKS 226	30	1,19	toxisch
	15	***	toxisch
	7,5	***	toxisch
AKS 227a	30	0,39	toxisch
AKS 227b	30	0,60	toxisch
AKS 228	30	0,42	nicht toxisch
AKS 230	30	1,16	toxisch
	15	***	toxisch
	7,5	***	toxisch

Substanzname	Konzentration [μM]	Viruslast-Reduktion [log-Stufen]	Ergebnis Toxizitätstest
AKS 231	30	0,70	nicht toxisch
AKS 232	30	1,51	nicht toxisch
	15	0,51	nicht toxisch
	7,5	0,35	nicht toxisch
AKS 233	30	0,03	nicht toxisch
AKS 234	30	0,82	nicht toxisch
AKS 235	30	0,39	nicht toxisch
AKS 236	30	0,64	nicht toxisch
AKS 239	30	0,02	nicht toxisch
AKS 241	30	1,32	toxisch
	15	***	toxisch
	7,5	***	toxisch
AKS 242	30	0,13	nicht toxisch
AKS 243	30	-0,14	nicht toxisch
AKS 244	30	0,23	toxisch
AKS 245	30	0,14	nicht toxisch
AKS 246	30	1,25	toxisch
	15	***	toxisch
	7,5	***	toxisch
AKS 248	30	0,16	nicht toxisch
AKS 249	30	0,05	nicht toxisch
AKS 250	30	0,44	nicht toxisch
AKS 252	30	0,31	nicht toxisch
AKS 254	30	0,36	nicht toxisch
AKS 255	30	0,39	nicht toxisch
AKS 256	30	0,22	nicht toxisch
AKS 258	30	0,61	nicht toxisch
AKS 261	30	0,11	nicht toxisch
AKS 263	30	0,36	nicht toxisch
AKS 264	30	-0,05	nicht toxisch
AKS 265	30	-0,03	nicht toxisch
AKS 266	30	-0,12	nicht toxisch
AKS 268	30	0,21	nicht toxisch

4.4 Anti-SARS-CoV-2-Antikörpernachweis durch indirekte Immunfluoreszenz

Bei Beginn dieser Arbeit mussten die diagnostischen Verfahren zum SARS-CoV-2 Nachweis und zum Nachweis von anti-SARS-CoV-2 Antikörpern in Patient:innen-Seren etabliert werden. Dazu wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung (IIF) entwickelt. Vero-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät, mit SARS-CoV-2 (MOI: 0,5) infiziert, nach drei Tagen fixiert und mit 0.3 %-Triton-X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit den anonymisierten Patient:innen-Seren S1-S9 in einer Verdünnung von 1:100 über Nacht inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Vero-Zellen. Gebundene anti-SARS-CoV-2-Antikörper wurden durch Alexa Fluor 488-konjugierte Ziege bzw. Alexa Fluor 594-konjugierte Esel anti-Human Antikörper (Verdünnung 1:500) detektiert (Abbildung 14). Es wurden anti-SARS-CoV-2-Antikörper in den Seren S1, S4, S5, S6 sowie S7 nachgewiesen. Serum S4 zeigte den schwächsten positiven Effekt. In den Seren S2, S3, S8 und S9 wurden keine anti-SARS-CoV-2-Antikörper in der IIF nachgewiesen (Abbildung 14).



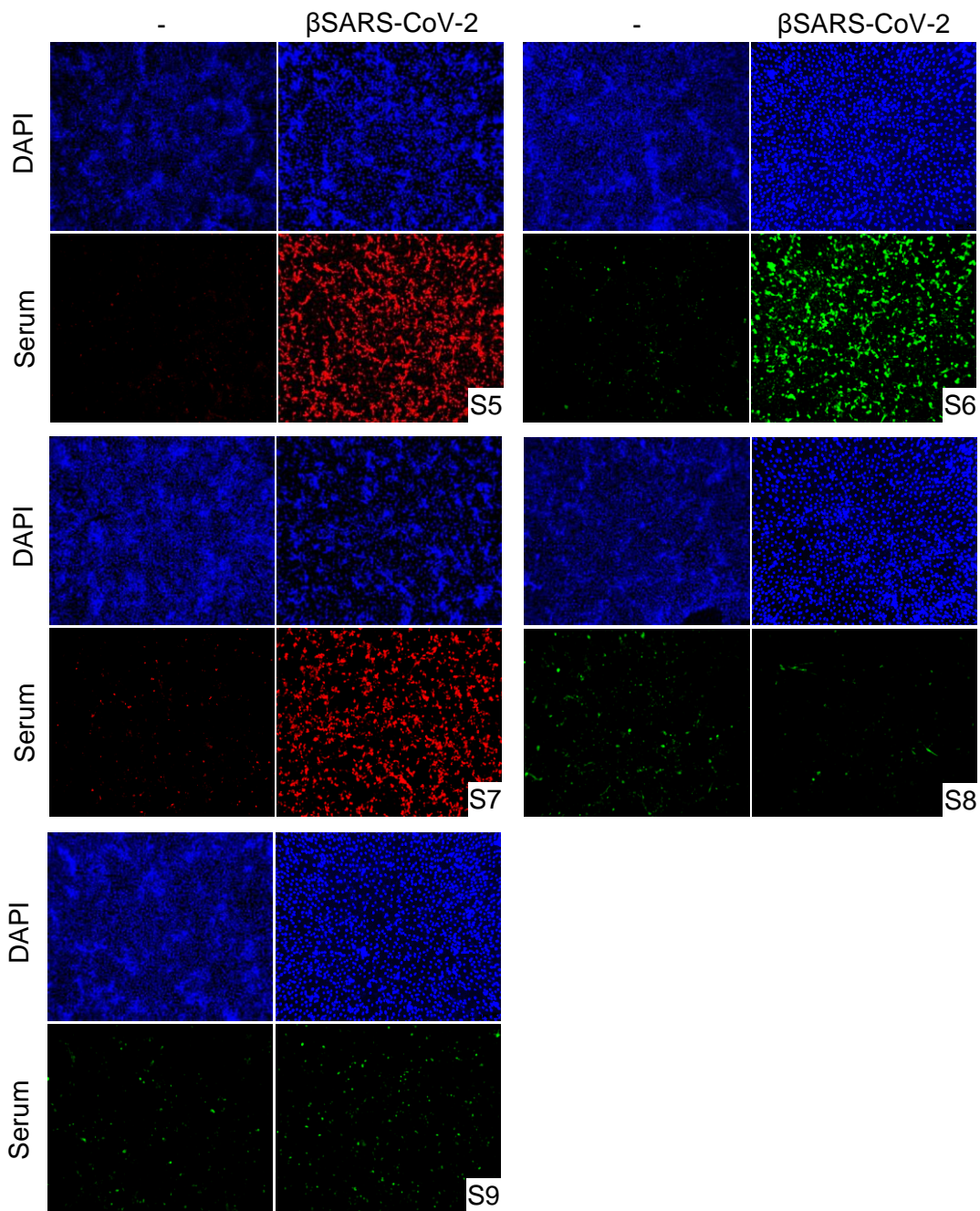


Abbildung 14: Anti-SARS-CoV-2-Antikörpernachweis in Patient:innen-Seren durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung.

Vero-Zellen wurden mit SARS-CoV-2 infiziert. Die Seren S1-S9 wurden den Zellen nach 72 h hinzugefügt. Mit einem Alexa Fluor 488-konjugierten Ziege bzw. einem Alexa Fluor 594-konjugierten Esel anti-Human Antikörper wurden die anti-SARS-CoV-2-Antikörper detektiert (Verdünnung 1:500). Die Nuclei wurden mit DAPI angefärbt.

4.5 Etablierung eines RTqPCR-Serumneutralisationstests gegen SARS-CoV-2

Aufbauend auf den klinischen Erfolgen der Rekonvaleszenz-Therapie bei COVID-19 wurde versucht, aus anonymen Blutbankseren ein Testverfahren zum Nachweis neutralisierender anti-SARS-CoV-2-Antikörper zu etablieren. Dazu wurden anonymisierte Blutseren von mit SARS-CoV-2-Infizierten (Serum 1, 4, 5, 6,7) sowie nicht-Infizierten (Serum 2, 3, 8, 9) verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Serum-Verzeichnis.

Die Seren wurden anonymisiert und nach Eingangsdatum nummeriert. Die Ergebnisse der in der Virusdiagnostik durchgeführten ELISA-Untersuchung sind aufgeführt.

Name Serum	Ergebnis ELISA-Untersuchung
Serum 1	Positiv
Serum 2	Negativ
Serum 3	Negativ
Serum 4	Positiv
Serum 5	Positiv
Serum 6	Positiv
Serum 7	Positiv
Serum 8	Negativ
Serum 9	Negativ

4.5.1 Detektion SARS-CoV-2-neutralisierender Antikörper mit RTqPCR

Zur Detektion SARS-CoV-2-neutralisierender Antikörper wurden anonymisierte Blutseren von mit SARS-CoV-2-Infizierten (Serum 1, 4, 5, 6,7) sowie nicht-Infizierten (Serum 2, 3, 8, 9) bei 56 °C für 30 Minuten hitzeinaktiviert. Je 10 µl und 1 µl der untersuchten Seren wurden eine Stunde bei 37 °C mit SARS-CoV-2 (MOI: 0,5) inkubiert. Das Antikörper-Virus-Gemisch wurde auf am Vortag ausgesäte Vero-Zellen überführt und für 72 h inkubiert. Anschließend wurden 125 µl des zellulären Überstandes in 250 µl des MagNA Pure Lysis/Binding Buffer zur viralen Inaktivierung überführt und bei 2000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die virale RNA wurde durch das MagnaPure24 System aufgereinigt und mittels RTqPCR quantifiziert (Abbildung 15). Je 10 µl der Seren S1, S5, S6 und S7 reduzierten die Viruslast signifikant, 1 µl der entsprechenden Seren führte zu keiner Reduktion der Viruslast. Die Seren S2, S3, S4, S8 und S9 senkten die Viruslast nicht. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte infizierte Zellen.

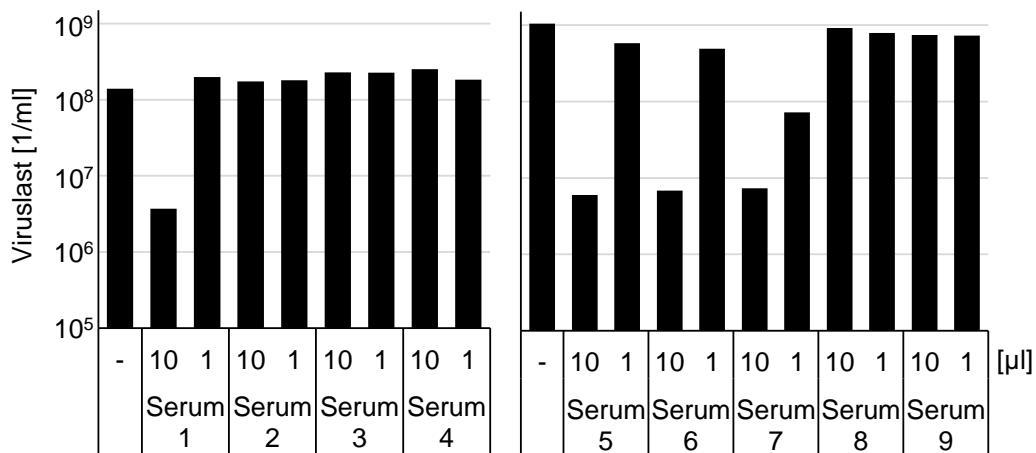


Abbildung 15: Serum S1, S5, S6 und S7 neutralisieren SARS-CoV-2.

10 µl und 1 µl des jeweiligen Serums wurden mit dem Virus inkubiert und nach 1 h auf Vero-Zellen überführt. Die virale RNA wurde nach 72 h aus zellulärem Überstand isoliert und durch RTqPCR quantifiziert (S: Serum). Balken: Mittelwert.

4.5.2 Quantifizierung SARS-CoV-2-neutralisierender Antikörper mittels RTqPCR

Zur Quantifizierung der neutralisierenden anti-SARS-CoV-2-Antikörper wurde eine Verdünnungsreihe ELISA-positiver (S1, S4, S6) sowie ELISA-negativer Seren (S8, S9) mit SARS-CoV-2 (MOI: 0,5) inkubiert. Das Antikörper-Virus-Gemisch wurde auf am Vortag ausgesäte Vero-Zellen überführt und für 72 h inkubiert. Anschließend wurden 125 µl des zellulären Überstandes in 250 µl des MagNA Pure Lysis/Binding Buffer zur viralen Inaktivierung überführt und bei 2000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die virale RNA wurde durch das MagnaPure24 System aufgereinigt und mittels RTqPCR quantifiziert. Alle Infektionen wurden in Triplikaten durchgeführt. Für Serum S1 und S6 bestätigte sich der neutralisierende Effekt ab einer Verdünnung von 1:400. In den Seren S4, S8 und S9 konnten keine virusneutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 16).

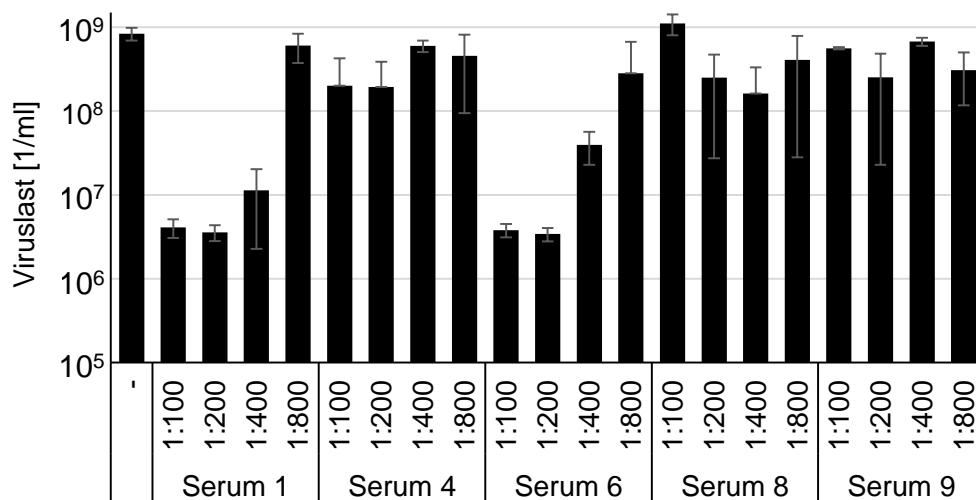


Abbildung 16: Seren S1 und S6 neutralisieren SARS-CoV-2 ab einer Verdünnung von 1:400. Die Seren wurden verdünnt, mit SARS-CoV-2 inkubiert und nach 1 h auf Vero-Zellen überführt. Die virale RNA wurde nach 72 h aus zellulärem Überstand isoliert und mittels RTqPCR quantifiziert. Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung.

5 Diskussion

5.1 Fluoxetin inhibiert die SARS-CoV-2 Replikation

Die Untersuchung der Wirkung bereits zugelassener Arzneimittel gegen SARS-CoV-2 führte unter anderem zur Entdeckung von Remdesivir (M. L. Wang et al., 2020). Zum Zeitpunkt der Forschungsarbeiten im April 2020 war Remdesivir das einzige von der EMA zugelassene Medikament zur Behandlung von COVID-19 (EMA, 2020). Die antivirale Wirkung von Fluoxetin gegen SARS-CoV-2 wurde erstmals von mir im Preprint im Juni 2020 beschrieben (Zimniak et al., 2020). Dieser Preprint gehört zu den höchsten 5 % aller von Altmetric bewerteten Forschungsergebnisse. Meine Ergebnisse stehen im Einklang mit später publizierten Daten anderer Forschungsgruppen (Carpinteiro et al., 2020; Schloer et al., 2020).

5.1.1 Klinische Bedeutung von Fluoxetin bei COVID-19

Fluoxetin ist ein gut erforschter Wirkstoff, der sich seit mehr als vier Dekaden im klinischen Einsatz befindet (Lemberger et al., 1978). Seit Ablauf des Patents sind generische Produkte weltweit günstig verfügbar.

Hauptziele der COVID-19-Therapie sind die Minimierung zytopathischer Schäden infolge der Virusreplikation sowie die Eindämmung des dysregulierten Immunsystems. Wie beschrieben inhibiert Fluoxetin die Replikation des SARS-CoV-2 und reduziert dadurch die Entstehung von Organschäden. Weiterhin werden selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern antiinflammatorische Wirkweisen zugeschrieben: *In vitro* inhibieren sie u.a. die Entwicklung von Lymphozyten, besonders sensitiv reagieren die Zellen dabei auf die Gabe von Fluoxetin (Martensson et al., 1993; Xia et al., 1996). Weiterhin führte Fluoxetin *in vitro* als auch *in vivo* zu einer reduzierten Sekretion proinflammatorischer Zytokine, insbesondere des bei einer SARS-CoV-2-Infektion relevanten Interleukin-6 (Creeden et al., 2021; Hiles et al., 2012; Wang et al., 2019).

Die Relevanz der in Kapitel 4.2.1 aufgeführten Ergebnisse konnte mittlerweile in mehreren klinischen Studien belegt werden. Fluoxetin überzeugt dabei durch die kombinierte Wirkweise aus antiviralen und immunmodulatorischen Mechanismen. Die Gabe von Fluoxetin führte u.a. zu einer signifikanten Reduktion des Intubations- als auch des Sterberisikos bei COVID-19-Erkrankten (Deng et al., 2023; Hoertel et al., 2020; Oskotsky et al., 2021), ebenso wie zu einem schnelleren Abklingen der Entzündungsreaktion (Sedighi et al., 2023). Clelland et al. konnten einen protektiven Effekt von Fluoxetin vor einer SARS-CoV-2-Infektion feststellen (Clelland et al., 2021).

Zu den in der Literatur beschriebenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) des Fluoxetins zählen Kopfschmerzen, Schlafstörungen oder gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit und Diarrhoe (Perez-Caballero et al., 2014; Riediger et al., 2017). Bei psychiatrischer Indikation zeigt das (S)-Enantiomer einen stärkeren Effekt, bei antiviraler Anwendung *in vitro* unterscheidet sich die Wirkstärke der Enantiomere nicht voneinander (vgl. 4.2.1). Ob die Anwendung des (R)-Enantiomers mit verringerten UAWs einhergeht und deshalb bei virologischer Indikation präferiert werden sollte, ist eine interessante Fragestellung für zukünftige Forschung.

Zusammenfassend ist der selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer aufgrund seiner langjährigen Anwendung und seiner mehrfach bewiesenen antiviralen Effektivität ein geeignetes Off-Label-Medikament bei COVID-19. Die klinische Datenlage sollte durch größere Studienteilnehmerzahlen ergänzt werden. Der Frage, inwieweit Fluoxetin bei Post-COVID-Patient:innen Anwendung finden kann, sollte in weiteren Experimenten nachgegangen werden.

5.1.2 Entschlüsselung der antiviralen Wirkmechanismen

Die antidepressive Wirkung Fluoxetins geht auf die Blockade des Serotonintransporters und einem damit verbundenen Anstieg des Neurotransmitters Serotonin zurück (Fuller et al., 1991). Um zu überprüfen, ob sich Fluoxetins antivirale Eigenschaften ebenfalls auf die Rezeptorblockade zurückführen lassen, untersuchten wir weitere SSRI. Weder Paroxetin noch Escitalopram hatten dabei einen Einfluss auf die SARS-CoV-Replikation (vgl. Kapitel 4.2.1). Weiterhin verglichen wir die antiviralen Effekte der (R)- und (S)-Enantiomere Fluoxetins. Dabei ist das (S)-Enantiomer dominant in seiner Wirkung als SSRI (Wong, Reid, et al., 1985). Die gleichstarke Wirksamkeit der Stereoisomere gegen SARS-CoV-2 bekräftigt, dass die Blockade des Serotonintransporters nicht der entscheidende antivirale Wirkmechanismus ist.

Die durchgeführte indirekte Immunfluoreszenzfärbung (IIF) gibt erste Hinweise auf den antiviralen Wirkmechanismus des SSRIs. Die Wirkstoffzugabe resultierte in einer verminderten Zahl Virusprotein-produzierender Zellen. Dies deutet darauf hin, dass Fluoxetin die virale Reinfektion verhindert und/oder Proteinexpression inhibiert.

Im Jahr 2020 beschrieb die Arbeitsgruppe um Carpinteiro, dass eine durch Fluoxetin verursachte Inhibierung der in den Lysosomen lokalisierten sauren Sphingomyelinase (engl. Acid Sphingomyelinase, ASM) zu einer reduzierten zellulären Infektion mit SARS-CoV-2 führt. Die ASM katalysiert die Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid. Laut

Carpinteiro et al. benötigt SARS-CoV-2 für dessen Zelleintritt Ceramide. Eine Inhibierung der ASM führt folglich zu einer reduzierten Infektion durch SARS-CoV-2 (Carpinteiro et al., 2020). In Ergänzung dazu beschrieben Geiger et al. eine weitere antivirale Zielstruktur des Fluoxetins: die saure Ceramidase (engl. Acid Ceramidase, AC), ebenfalls in Lysosomen lokalisiert. Die AC wandelt die von der ASM hergestellten Ceramide in Sphingosin um. In bereits infizierten Zellen inhibieren akkumulierende Ceramide die SARS-CoV-2-Replikation. Weiterhin führt die Hemmung der AC durch Fluoxetin zu einer reduzierten viralen Genexpression sowie viralen Freisetzung aus den Golgi-Vesikeln (Geiger, Kersting, et al., 2022). Die Hypothese der inhibierten Proteinexpression wird durch weitere Publikationen unterstützt, die zeigen, dass Fluoxetin u.a. in Hepatitis-C-Viren sowie in den Humanen Enteroviren B und D die virale Proteinsynthese reduziert (Young et al., 2014; Zuo et al., 2012).

Die beiden Enzyme werden auf gleiche Weise indirekt durch Fluoxetin inhibiert (Abbildung 17). Der SSRI wird in Lysosomen protoniert und kann infolgedessen die Lysosom-Membran nicht mehr passieren. Somit akkumuliert Fluoxetin in Lysosomen und führt dadurch zu einer Ablösung der ASM und/oder AC von der Lysosom-Membran. Im Lysosomen-Zytosol kommt es zu einer proteolytischen Enzym-Inaktivierung und folglich zu einem Funktionsverlust, der zu einer reduzierten viralen Aufnahme einerseits (ASM) sowie zu einer reduzierten viralen Freisetzung andererseits (AC) führt (Carpinteiro et al., 2020; Geiger, Kersting, et al., 2022; Kornhuber et al., 2010).

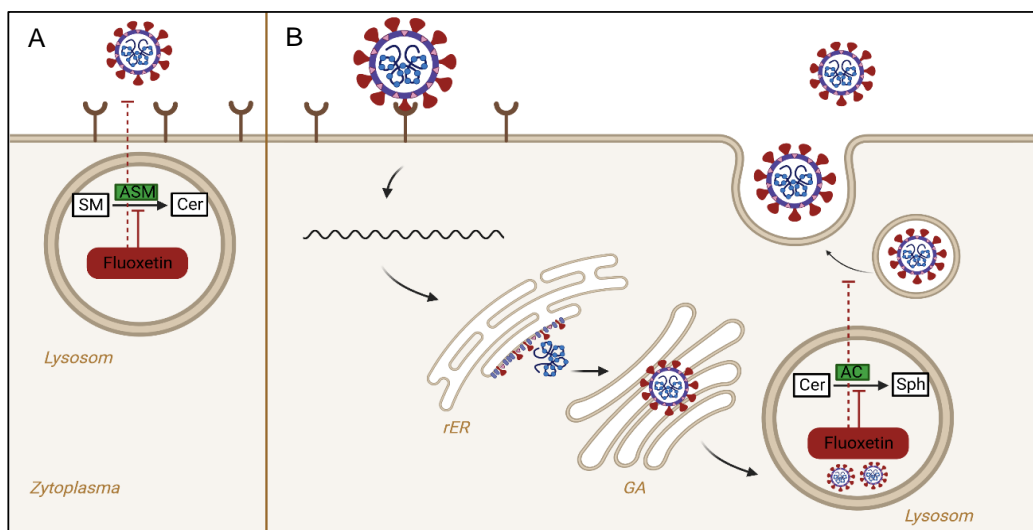


Abbildung 17: Potenzielle antivirale Wirkmechanismen von Fluoxetin.
(A) Fluoxetin inhibiert die saure Sphingomyelinase (ASM) im Lysosom. Dies führt zu einer geringeren Zellinfektion mit SARS-CoV-2. **(B) Fluoxetin inhibiert die saure Ceramidase (AC) im Lysosom.** Dies führt zu einer reduzierten SARS-CoV-2-Freisetzung aus den Lysosomen. GA: Golgi-Apparat, rER: raues Endoplasmatisches Retikulum, SM: Sphingomyelin, Cer: Ceramid, Sph: Sphingosin. Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com.

Zusammenfassend sind bisher zwei potenzielle Wirkmechanismen des Fluoxetins gegen SARS-CoV-2 beschrieben worden: Zum einen inhibiert es die lysosomale ASM und führt zu einem reduzierten viralen Eintritt. Zum anderen inhibiert es die AC, was u.a. zu einer verminderten Freisetzung der Viren aus Lysosomen führt. Die in der IIF festgestellte Reduktion Virusprotein-produzierender Zellen steht somit im Einklang mit beiden beschriebenen Wirkmechanismen.

5.1.3 Spezifität der viralen Hemmung

Fluoxetin konnte keinen Einfluss auf die Replikation des Tollwutvirus (-ssRNA), des Respiratorischen Synzytial-Virus (-ssRNA), des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (dsDNA) und des Humanen Herpesvirus 8 (dsDNA) nehmen (Zimniak et al., 2021a). Inhibierende Effekte auf die Replikation u.a. des Dengue-Virus, des Hepatitis-C-Virus, der Humanen Enteroviren B und D sowie Influenzaviren A sind beschrieben (Medigeshi et al., 2016; Schloer et al., 2020; Young et al., 2014; Zuo et al., 2012). Ob die Hemmung bzw. fehlende Hemmung der genannten Viren durch Fluoxetin auf die in 5.1.2 beschriebenen Mechanismen zurückzuführen ist und ob weitere Viren durch Fluoxetin inhibierbar sind (Avota et al., 2021), ist ein interessanter Ansatz für zukünftige Forschung.

5.2 AKS 128 und AKS 232 inhibieren die SARS-CoV-2-Replikation

Die am Institut für Organische Chemie Würzburg entwickelten Substanzen AKS 128 sowie AKS 232 inhibieren die Replikation des SARS-CoV-2 signifikant. Von den getesteten Substanzen erwiesen sich AKS 128 sowie AKS 232 als besonders vielversprechende Wirkstoffe gegen SARS-CoV-2. Weiterhin wurden sechs Wirkstoffe detektiert (AKS 19, 20, 207, 210, 225, 258), die die Viruslast *in vitro* um $\geq 0,5$ log-Stufen senken konnten.

AKS 232 ist ein Derivat des Myriocins (Abbildung 18) und erwies sich unter den getesteten AKS-Substanzen als potentester SARS-CoV-2-Wirkstoff. Myriocin ist ein Metabolit des Pilzes *Myriococcum albomyces* mit immunsuppressiven, antiviralen und antimykotischen Eigenschaften *in vitro* als auch *in vivo* (Amemiya et al., 2008; Fujita et al., 1994; Kluepfel et al., 1972; Tafesse et al., 2013; Umehara et al., 2006). Es inhibiert die Serin-C-Palmitoyltransferase, ein essenzielles Enzym der Sphingolipid-Synthese (J. K. Chen et al., 1999; Wadsworth et al., 2013). Größere Mengen von Sphingolipiden und Cholesterol bilden gemeinsam sogenannte Lipid Rafts, Mikrodomänen in zellulären Membranen (Simons et al., 1997). Diese ermöglichen einigen Viren u.a. den Zelleintritt, bei anderen Viren wie dem behüllten Hepatitis-C-Virus ist der Replikationskomplex an

Lipid Rafts gekoppelt (Avota et al., 2021; Gao et al., 2004; Shi et al., 2003). Die Wichtigkeit der Sphingolipide für die virale Replikation ist ein möglicher Erklärungsansatz für die oben beschriebenen antiviralen Eigenschaften des Myriocin-Derivats und steht in Einklang mit den in 5.1.2 beschriebenen Wirkmechanismen des Fluoxetins.

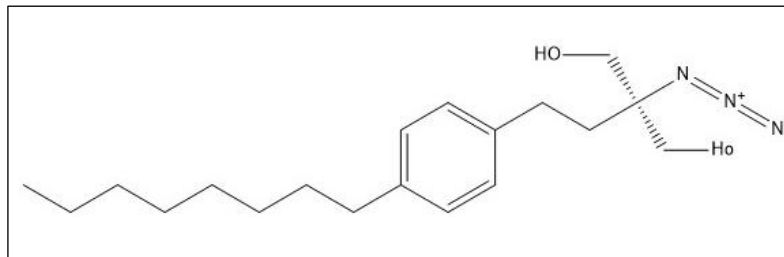


Abbildung 18: Das Myriocin-Derivat AKS 232 inhibiert die SARS-CoV-2 Replikation.
Strukturformel des Myriocin-Derivats. Eigene Darstellung erstellt mit ChemDraw.

5.3 Anti-SARS-CoV-2-Antikörpernachweis durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung (IIF) ist der Nachweis substratgebundener Antikörper möglich. In dem von uns durchgeführten Immunfluoreszenzversuch banden anti-SARS-CoV-2-Antikörper an von infizierten Zellen produzierte virale Proteine und konnten durch Alexa Fluor 488/594-markierte Sekundärantikörper dargestellt werden. Das Verfahren diente in den Folgeversuchen als Screening-Instrument zur Antikörperdetektion in Patient:innenserum sowie in der Wirkstoffuntersuchung als Mittel zur Aussage über die Beeinflussung der viralen Proteinproduktion durch die angewandten Substanzen.

5.3.1 Anwendungsmöglichkeiten der indirekten Immunfluoreszenzfärbung und Optimierungsmöglichkeiten

In der durchgeführten IIF wurde das SARS-CoV-2-Wildtypvirus zur Infizierung der Zellen genutzt. Das dadurch entstehende breite Antigenspektrum führt zu einer sehr hohen Testsensitivität, weshalb die IIF sich besonders als Screeningverfahren anbietet. Aufgrund des hohen Personal- und Zeitaufwands ist die IIF in der virologischen Diagnostik jedoch nicht als Standard zum Antikörper-Screening geeignet (Wolfel et al., 2020). Automatisierte Immunassays wie das ELISA-Verfahren haben sich hier durchgesetzt (Fox et al., 2022; Guo et al., 2020).

Eine anzustrebende Optimierung des Versuchs ist dessen Spezifizierung. Um die anti-SARS-CoV-2-Antikörper bindenden Antigene zu klassifizieren, könnten mittels Transfektion spezifische Proteine exprimiert und das Antikörperbindungsverhalten untersucht werden. Vergleichbare Experimente mit Expression rekombinanter SARS-CoV-(2)-Spike- und/oder Nukleokapsidproteine wurden bereits erfolgreich durchgeführt (Corman et al., 2012; Wolfel et al., 2020).

In Folgeversuchen der IIF sollte eine Kreuzreaktivität der verwendeten anti-SARS-CoV-2-Antikörper auf andere Viren getestet werden. Diese ist u.a. für SARS-CoV und MERS-CoV beschrieben (Hicks et al., 2021; Ou et al., 2020). Auch wenn dies zu einer geringeren Spezifität der IIF führen würde, könnte das kreuzreagierende Virus als Positivkontrolle der IIF verwendet werden. Eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen nicht-neutralisierenden und neutralisierenden Antikörpern (NAb) bietet die IIF nicht. Eine NAb-Detektion ist z.B. mittels Neutralisationstest möglich (Muruato et al., 2020; Wolfel et al., 2020).

5.4 Etablierung eines RTqPCR-Serumneutralisationstests gegen SARS-CoV-2

Die Quantifizierung neutralisierender Antikörper (NAb) ist zur Bestimmung der protektiven humoralen Immunität nach natürlicher Infektion und/oder Impfung ebenso wie zur Detektion potenzieller Spender:innen zur Rekonvaleszenztherapie unerlässlich. Mit dem RTqPCR-Serumneutralisationstest (RTqPCR-SNT) gegen SARS-CoV-2 gelang uns die Etablierung eines sensitiven NAb-Nachweisverfahrens durch Messung der Reduktion viraler RNA. Eine Quantifizierung der neutralisierenden Antikörper war mittels Verdünnungsreihe möglich.

5.4.1 Unterschiedliche NAb-Konzentrationen nach Impfung und/oder Infektion

Das Serum 4 wies im RTqPCR-SNT keinen neutralisierenden Effekt auf (vgl. 4.5.1 und 4.5.2), in den durchgeführten indirekten Immunfluoreszenzfärbungen konnten im Vergleich zu den anderen Antikörper-positiven Seren deutlich weniger anti-SARS-CoV-2-Antikörper dargestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur: Patient:innen mit asymptomatischer oder leichter COVID-19-Erkrankung weisen eine niedrige NAb-Konzentration vor, nach drei Monaten kann der Spiegel in einen nicht-messbaren Bereich sinken (Ibarrondo et al., 2020; Q. X. Long, X. J. Tang, et al., 2020).

Nach Einführung der Impfungen wiederholte die AG Bodem im September 2022 den RTqPCR-Serumneutralisationstest (Abbildung 19). Untersucht wurde das Serum von Probanden mit Z.n. Impfung und/oder natürlicher Infektion. Die Ergebnisse unterstützen

die Erkenntnisse des ersten RTqPCR-SNTs: Proband:in 2 (3x Impfung, 1x Infektion) wies die höchste NAb-Konzentration vor, Proband:in 3 (3x Impfung, 3x Infektion) die zweithöchste. Bei Proband:in 4 (1x Impfung, 2x Infektion) waren NAb in geringer Menge nachweisbar. Proband:in 1 hatte trotz 3-facher Impfung (keine Infektion) keine neutralisierenden Antikörper im Serum.

Der etablierte RTqPCR-Serumneutralisationstest wurde von Nina Geiger (AG Bodem) durch eine Positivkontrolle (inaktiviertes SARS-CoV-2 Virus) ergänzt. Die beiden SNT-Versuche wendeten unterschiedliche Verdünnungsreihen an, wobei die in Kapitel 4.5.2. verwendete Verdünnung eine genauere NAb-Konzentrationsbestimmung erlaubt.

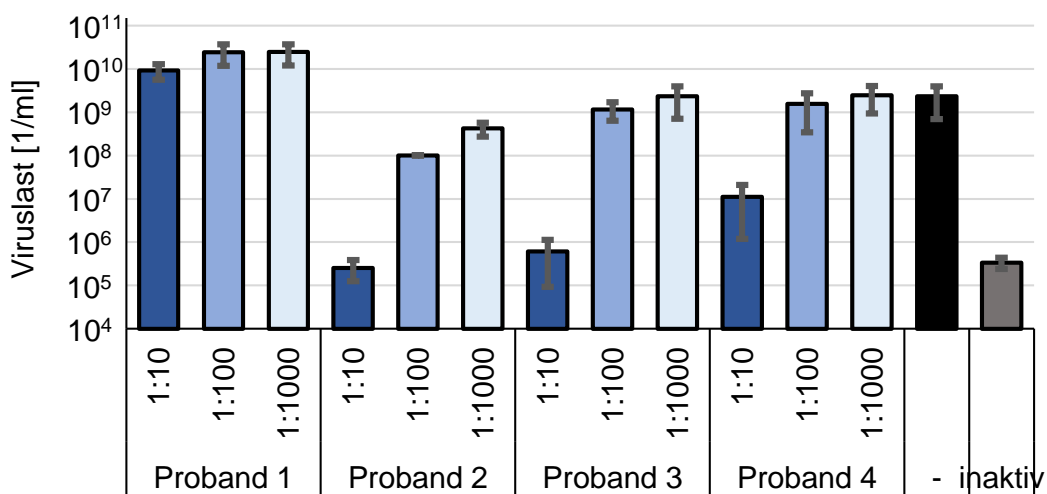


Abbildung 19: Individuelle Konzentration neutralisierender anti-SARS-CoV-2-Antikörper nach Impfung und/oder Infektion.

Die Seren wurden seriell verdünnt, mit SARS-CoV-2 inkubiert und nach 1 h auf Vero-Zellen überführt. Die virale RNA wurde nach 72 h aus dem zellulären Überstand isoliert und mittels RTqPCR quantifiziert. Proband:in 2, 3 und 4 weisen neutralisierende anti-SARS-CoV-2-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen auf, das Serum von Proband:in 2 enthält keine neutralisierenden Antikörper. Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung. Nutzung und Veröffentlichung der Daten erfolgt mit Genehmigung von Nina Geiger.

Der Versuch zeigt, dass die Ausbildung einer protektiven humoralen Immunität nicht nur nach natürlicher Infektion (vgl. Kapitel 4.5.2), sondern auch nach einer Impfung individuell abläuft. Dies steht im Einklang mit Versuchen von Collier et al., die eine altersabhängige-heterogene Immunantwort auf eine Impfung mit BNT162b2 feststellten (Collier et al., 2021). Auch Wall et. al stellten Unterschiede der NAb-Titer in Abhängigkeit von Alter und infizierendem Virus fest (Wall et al., 2021).

Die Daten des Versuchs geben keinen Aufschluss über den verwendeten Impfstoff, die Zeit zwischen Blutentnahme und letzter Impfung und/oder Infektion oder der infizierenden SARS-CoV-2-Variante. Somit ist kein Rückschluss auf die genaue Ursache der unterschiedlichen NAb-Konzentrationen möglich. Ungeachtet der Ursache rückt die Tatsache der NAb-Unterschiede die Bedeutung und Notwendigkeit einer medikamentösen Therapie bei COVID-19 in den Vordergrund.

5.4.2 Vergleich des RTqPCR-SNTs mit dem Goldstandard

Goldstandard der NAb-Bestimmung ist der sogenannte plaquereduzierende Neutralisationstest (PRNT). Dabei werden stufenweise verdünnte Seren mit Virus inkubiert, das Serum-Virus-Gemisch auf Zellen gegeben und die entstandenen Plaques 48-72 hpi gezählt (Muruato et al., 2020; Okba et al., 2020). Durch die lange Dauer und den hohen Personalaufwand eignet sich das Verfahren nur bedingt zum serologischen Hochdurchsatz-Screening großer Bevölkerungsgruppen (Roehrig et al., 2008).

Ebenso wie die PRNT ist auch der RTqPCR-SNT zeitlich aufwändig. Durch die Arbeit mit dem SARS-CoV-2-Wildtyp kann die Arbeit im Labor mit Sicherheitsstufe 3 nicht umgangen werden.

Zum Vergleich der Sensitivität und Spezifität des RTqPCR-SNT und des PRNTs sollten die Experimente unter gleichen Bedingungen wiederholt durchgeführt werden. Die RTqPCR-SNT wurde auch von Abidi et. al und Lichtenegger et al. zur Anwendung bei SARS-CoV-2 beschrieben, die Korrelationen zu anderen neutralisierenden Verfahren wie dem TCID₅₀-basierten Assay lagen bei 90 % (Abidi et al., 2021; Lichtenegger et al., 2022).

5.4.3 Optimierungsmöglichkeiten des RTqPCR-SNTs

Der RTqPCR-SNT ist ebenso wie der PRNT kostspielig und zeitaufwändig. Eine Möglichkeit der Zeit- und Kostenersparnis wäre die Reduktion der Serumuntersuchung von Triplets auf Singlets. Zur Fehlerminimierung sind in den Prozess der viralen Nukleinsäureaufreinigung sowie in den der PCR-Master-Mix-Herstellung zwei Robotersysteme integriert. Das Screening der Patient:innenseren auf neutralisierende Antikörper im RTqPCR-SNT erfolgte in Singlets (vgl. Kapitel 4.5.1). Die NAb-Quantifizierung der gleichen Seren wurde in Triplets durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Experimente fielen in entsprechender Verdünnung gleich aus (vgl. Kapitel 4.5.2). In einem weiteren Versuch sollte die Korrelation zwischen Singlets und Triplets bewertet werden. Bei einer wiederholt nicht-signifikanten Variation der Ergebnisse könnte der

SNT auf die Untersuchung von Singlets reduziert, und so zeit- und kosteneffizienter werden. Eine andere Möglichkeit der Zeitersparnis wäre in Anlehnung an Lichtenegger et al. eine virale RNA- Quantifizierung nach 24 h anstelle von 72 h (Lichtenegger et al., 2022).

Zusammenfassend konnte ein sensitives Verfahren etabliert werden, das die Detektion neutralisierender Antikörper gegen SARS-CoV-2 standardisiert ermöglicht. Durch Anwendung des Wildtyp-Virus ist das Verfahren leicht an die neu auftretenden Virusvarianten anpassbar. Aufgrund des hohen Zeit- und Personalaufwands sowie des zwingenden Vorhandenseins eines Labors der Sicherheitsstufe 3 ist die Anwendung des Verfahrens besonders zur Untersuchung einzelner Patient:innen-Seren, z.B. bei der Rekrutierung von Spender:innen zur Rekonvaleszenztherapie, geeignet.

5.5 Ausblick

In einer beispiellosen weltweiten Zusammenarbeit zur Eindämmung der COVID-19-Pandemie wurden so schnell wie noch nie potente Impfstoffe entwickelt und Virostatika zugelassen (EMA, 2023; Fiolet et al., 2022). In dieser Arbeit konnten wir mit dem langjährig angewandten selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin ein weiteres Medikament gegen COVID-19 identifizieren. Die klinische Wirksamkeit wurde in diversen Studien belegt (Deng et al., 2023; Hoertel et al., 2020; Oskotsky et al., 2021). Mit Entschlüsselung dessen antiviraler Wirkmechanismen wurde am Institut für Organische Chemie Würzburg das Fluoxetin-Derivat AKS 466 entwickelt. Es inhibiert die saure Ceramidase, eine vielversprechende neue Zielstruktur antiviraler Medikamente, spezifisch und greift damit einen der beschriebenen antiviralen Wirkmechanismen Fluoxetins auf. Weitere *in vitro* Versuche und klinische Studien mit AKS 466 bleiben abzuwarten. Mit den die SARS-CoV-2-Replikation inhibierenden Substanzen AKS 232 sowie AKS 128 wurden weitere potenzielle Therapieansätze erschlossen. Die durchgeführten Experimente bilden dabei die Basis für eine vertiefende Wirkstoffforschung, insbesondere zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus der Substanzen sowie zukünftiger Wirksamkeitsprüfung in klinischen Studien.

Neben der Virostatika-Zulassung erfolgte die Genehmigung neutralisierender monoklonaler Antikörper (mAb) zur COVID-19-Therapie (EMA, 2023). Durch die hohe SARS-CoV-2-Mutationsrate ist jedoch mit einem Wirkverlust aktuell zugelassener mAb-Therapien zu rechnen. Die Rekonvaleszenztherapie spielt daher wiederkehrend eine wichtige Rolle bei der Versorgung schwer an COVID-19-Erkrankter (Senefeld et al., 2023). Mithilfe des in der Arbeit entwickelten RTqPCR-SNT ist eine zuverlässige Quantifizierung neutralisierender Antikörper und somit Identifizierung möglicher Spender:innen möglich. Anhand des individuellen NAb-Titers kann auch die Notwendigkeit zukünftiger Auffrischungsimpfungen bestimmt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abidi, S. H., Imtiaz, K., Kanji, A., Qaiser, S., Khan, E., Iqbal, K., . . . Hasan, Z. (2021). A rapid real-time polymerase chain reaction-based live virus microneutralization assay for detection of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in blood/serum. *PLoS One*, *16*(12), e0259551. doi:10.1371/journal.pone.0259551
- Alanagreh, L., Alzoughool, F., & Atoum, M. (2020). The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens*, *9*(5). doi:10.3390/pathogens9050331
- Amemiya, F., Maekawa, S., Itakura, Y., Kanayama, A., Matsui, A., Takano, S., . . . Enomoto, N. (2008). Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, *197*(3), 361-370. doi:10.1086/525287
- Andrews, N., Stowe, J., Kirsebom, F., Toffa, S., Rickeard, T., Gallagher, E., . . . Lopez Bernal, J. (2022). Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant. *N Engl J Med*, *386*(16), 1532-1546. doi:10.1056/NEJMoa2119451
- Avota, E., Bodem, J., Chithelen, J., Mandasari, P., Beyersdorf, N., & Schneider-Schaulies, J. (2021). The Manifold Roles of Sphingolipids in Viral Infections. *Front Physiol*, *12*, 715527. doi:10.3389/fphys.2021.715527
- Bauer, L., Manganaro, R., Zonsics, B., Strating, J., El Kazzi, P., Lorenzo Lopez, M., . . . van Kuppeveld, F. J. M. (2019). Fluoxetine Inhibits Enterovirus Replication by Targeting the Viral 2C Protein in a Stereospecific Manner. *ACS Infect Dis*, *5*(9), 1609-1623. doi:10.1021/acsinfecdis.9b00179
- Beigel, J. H., Tomashek, K. M., Dodd, L. E., Mehta, A. K., Zingman, B. S., Kalil, A. C., . . . Members, A.-S. G. (2020). Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Preliminary Report. *N Engl J Med*. doi:10.1056/NEJMoa2007764
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W. C., Uhl, S., Hoagland, D., Moller, R., . . . tenOever, B. R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, *181*(5), 1036-1045 e1039. doi:10.1016/j.cell.2020.04.026
- Breidenbach, J., Lemke, C., Pillaiyar, T., Schakel, L., Al Hamwi, G., Dieltz, M., . . . Muller, C. E. (2021). Targeting the Main Protease of SARS-CoV-2: From the Establishment of High Throughput Screening to the Design of Tailored Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl*, *60*(18), 10423-10429. doi:10.1002/anie.202016961
- Brenner, D., Geiger, N., Schlegel, J., Diesendorf, V., Kersting, L., Fink, J., . . . Seibel, J. (2023). Azido-Ceramides, a Tool to Analyse SARS-CoV-2 Replication and Inhibition-SARS-CoV-2 Is Inhibited by Ceramides. *Int J Mol Sci*, *24*(8). doi:10.3390/ijms24087281
- Carpinteiro, A., Edwards, M. J., Hoffmann, M., Kochs, G., Gripp, B., Weigang, S., . . . Gulbins, E. (2020). Pharmacological Inhibition of Acid Sphingomyelinase Prevents Uptake of SARS-CoV-2 by Epithelial Cells. *Cell Rep Med*, *1*(8), 100142. doi:10.1016/j.xcrm.2020.100142
- Chen, J. K., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1999). The identification of myriocin-binding proteins. *Chemistry & Biology*, *6*(4), 221-235. doi:10.1016/S1074-5521(99)80038-6
- Chen, L., Xiong, J., Bao, L., & Shi, Y. (2020). Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *Lancet Infectious Diseases*, *20*(4), 398-400. doi:10.1016/S1473-3099(20)30141-9
- Cheng, Y., Wong, R., Soo, Y. O. Y., Wong, W. S., Lee, C. K., Ng, M. H. L., . . . Cheng, G. (2005). Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong.

- European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24(1), 44-46.
doi:10.1007/s10096-004-1271-9
- Clelland, C. L., Ramiah, K., Steinberg, L., & Clelland, J. D. (2021). Analysis of the impact of antidepressants and other medications on COVID-19 infection risk in a chronic psychiatric in-patient cohort. *BJPsych Open*, 8(1), e6.
doi:10.1192/bjo.2021.1053
- Cohn, J. B., & Wilcox, C. (1985). A comparison of fluoxetine, imipramine, and placebo in patients with major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*, 46(3 Pt 2), 26-31.
- Collier, D. A., Ferreira, I., Kotagiri, P., Datir, R. P., Lim, E. Y., Touizer, E., . . . Gupta, R. K. (2021). Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature*, 596(7872), 417-422. doi:10.1038/s41586-021-03739-1
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., . . . Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 25(3). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- Corman, V. M., Muller, M. A., Costabel, U., Timm, J., Binger, T., Meyer, B., . . . Drosten, C. (2012). Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill*, 17(49).
doi:10.2807/ese.17.49.20334-en
- COVRIIN. (2023a). Antivirale Therapie in der Frühphase einer SARS-CoV-2-Infektion. Accessed: 03.07.2023 Retrieved from https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/COVRIIN_Dok/Antivirale_Therapie_Fruehphase.pdf? blob=publicationFile
- COVRIIN. (2023b). COVID-19: Medikamentöse und nicht-medikamentöse Therapieempfehlungen nach Erkrankungsphase. Accessed: 03.07.2023 Retrieved from https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/COVRIIN_Dok/Infografik-Therapieempfehlungen.pdf? blob=publicationFile
- Creeden, J. F., Imami, A. S., Eby, H. M., Gillman, C., Becker, K. N., Reigle, J., . . . McCullumsmith, C. B. (2021). Fluoxetine as an anti-inflammatory therapy in SARS-CoV-2 infection. *Biomed Pharmacother*, 138, 111437.
doi:10.1016/j.biopha.2021.111437
- Deng, J., Rayner, D., Ramaraju, H. B., Abbas, U., Garcia, C., Heybati, K., . . . Moskalyk, M. (2023). Efficacy and safety of selective serotonin reuptake inhibitors in COVID-19 management: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*, 29(5), 578-586. doi:10.1016/j.cmi.2023.01.010
- Dimeglio, C., Herin, F., Martin-Blondel, G., Miedouge, M., & Izopet, J. (2022). Antibody titers and protection against a SARS-CoV-2 infection. *J Infect*, 84(2), 248-288.
doi:10.1016/j.jinf.2021.09.013
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., . . . Doerr, H. W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348(20), 1967-1976. doi:DOI 10.1056/NEJMoa030747
- Duan, K., Liu, B. D., Li, C. S., Zhang, H. J., Yu, T., Qu, J. M., . . . Yang, X. M. (2020). Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(17), 9490-9496. doi:10.1073/pnas.2004168117
- Eaaswarkhanth, M., Al Madhoun, A., & Al-Mulla, F. (2020). Could the D614G substitution in the SARS-CoV-2 spike (S) protein be associated with higher COVID-19 mortality? *International Journal of Infectious Diseases*, 96, 459-460.
doi:10.1016/j.ijid.2020.05.071

- Eagling, V. A., Back, D. J., & Barry, M. G. (1997). Differential inhibition of cytochrome P450 isoforms by the protease inhibitors, ritonavir, saquinavir and indinavir. *Br J Clin Pharmacol*, *44*(2), 190-194. doi:10.1046/j.1365-2125.1997.00644.x
- EMA, E. M. A. (2020). Gilead Sciences Ireland UC.
- EMA, E. M. A. (2022). Paxlovid, Nirmatrelvir/Ritonavir. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Accessed: 06.07.2023 Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/paxlovid-epar-product-information_de.pdf
- EMA, E. M. A. (2023). Authorised COVID-19 treatments. Accessed: 05.07.2023 Retrieved from <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-medicines#authorised-covid-19-treatments-section>
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*, *1282*, 1-23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Feldt, T., Jensen, B., Guggemos, W., Kellner, N., Kobbe, R., Koch, T., . . . Wolf, T. (2023). Hinweise zu Erkennung, Diagnostik und Therapie von Patienten mit COVID-19. In S. A. d. K.-u. B. f. K. d. h. Erreger (Ed.), (pp. 51): Robert Koch-Institut.
- Fiolet, T., Kherabi, Y., MacDonald, C. J., Ghosn, J., & Peiffer-Smadja, N. (2022). Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect*, *28*(2), 202-221. doi:10.1016/j.cmi.2021.10.005
- Fox, T., Geppert, J., Dinnes, J., Scandrett, K., Bigio, J., Sulis, G., . . . Cochrane, C.-D. T. A. G. (2022). Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev*, *11*(11), CD013652. doi:10.1002/14651858.CD013652.pub2
- Friedrich, M., Pfeifer, G., Binder, S., Aigner, A., Vollmer Barbosa, P., Makert, G. R., . . . Sewald, K. (2022). Selection and Validation of siRNAs Preventing Uptake and Replication of SARS-CoV-2. *Front Bioeng Biotechnol*, *10*, 801870. doi:10.3389/fbioe.2022.801870
- Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., . . . Okumoto, T. (1994). Fungal Metabolites .12. Potent Immunosuppressant, 14-Deoxomyriocin, (2s,3r,4r)-(E)-2-Amino-3,4-Dihydroxy-2-Hydroxymethyleicos-6-Enoic Acid and Structure-Activity-Relationships of Myriocin Derivatives. *Journal of Antibiotics*, *47*(2), 216-224. doi:DOI 10.7164/antibiotics.47.216
- Fuller, R. W., Wong, D. T., & Robertson, D. W. (1991). Fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin uptake. *Medicinal Research Reviews*, *11*(1), 17-34. doi:10.1002/med.2610110103
- Gao, L., Aizaki, H., He, J. W., & Lai, M. M. C. (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology*, *78*(7), 3480-3488. doi:10.1128/Jvi.78.7.3480-3488.2004
- Gattinger, P., Ohradanova-Repic, A., & Valenta, R. (2023). Importance, Applications and Features of Assays Measuring SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies. *Int J Mol Sci*, *24*(6). doi:10.3390/ijms24065352
- Geiger, N., Diesendorf, V., Roll, V., König, E. M., Obernolte, H., Sewald, K., . . . Bodem, J. (2023). Cell Type-Specific Anti-Viral Effects of Novel SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *Int J Mol Sci*, *24*(4). doi:10.3390/ijms24043972
- Geiger, N., Kersting, L., Schlegel, J., Stelz, L., Fahr, S., Diesendorf, V., . . . Bodem, J. (2022). The Acid Ceramidase Is a SARS-CoV-2 Host Factor. *Cells*, *11*(16). doi:10.3390/cells11162532
- Geiger, N., König, E. M., Oberwinkler, H., Roll, V., Diesendorf, V., Fahr, S., . . . Bodem, J. (2022). Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid Inhibit SARS-CoV-2 Replication

- in Precision-Cut Lung Slices. *Vaccines (Basel)*, 10(10). doi:10.3390/vaccines10101619
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., . . . Grp, C. S. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536-544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z
- Grein, J., Ohmagari, N., Shin, D., Diaz, G., Asperges, E., Castagna, A., . . . Flanigan, T. (2020). Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 382(24), 2327-2336. doi:10.1056/NEJMoa2007016
- Guo, L., Ren, L., Yang, S., Xiao, M., Chang, Yang, F., . . . Wang, J. (2020). Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*, 71(15), 778-785. doi:10.1093/cid/ciaa310
- Havers, F. P., Reed, C., Lim, T., Montgomery, J. M., Klena, J. D., Hall, A. J., . . . Thornburg, N. J. (2020). Seroprevalence of Antibodies to SARS-CoV-2 in 10 Sites in the United States, March 23-May 12, 2020. *JAMA Intern Med*. doi:10.1001/jamainternmed.2020.4130
- Hicks, J., Klumpp-Thomas, C., Kalish, H., Shunmugavel, A., Mehalko, J., Denson, J. P., . . . Sadtler, K. (2021). Serologic Cross-Reactivity of SARS-CoV-2 with Endemic and Seasonal Betacoronaviruses. *J Clin Immunol*, 41(5), 906-913. doi:10.1007/s10875-021-00997-6
- Hikmet, F., Mear, L., Edvinsson, A., Micke, P., Uhlen, M., & Lindskog, C. (2020). The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol Syst Biol*, 16(7), e9610. doi:10.15252/msb.20209610
- Hiles, S. A., Baker, A. L., de Malmanche, T., & Attia, J. (2012). Interleukin-6, C-reactive protein and interleukin-10 after antidepressant treatment in people with depression: a meta-analysis. *Psychological Medicine*, 42(10), 2015-2026. doi:10.1017/S0033291712000128
- Hirsch, J. S., Ng, J. H., Ross, D. W., Sharma, P., Shah, H. H., Barnett, R. L., . . . Northwell Nephrology, C.-R. C. (2020). Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int*, 98(1), 209-218. doi:10.1016/j.kint.2020.05.006
- Hoertel, N., Sanchez Rico, M., Vernet, R., Beeker, N., Jannot, A.-S., Neuraz, A., . . . Limosin, F. (2020). Association between SSRI Antidepressant Use and Reduced Risk of Intubation or Death in Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019: a Multicenter Retrospective Observational Study. In: medRxiv.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Kruger, N., Herrler, T., Erichsen, S., . . . Pohlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-+. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
- Huang, C., Wang, Y., & Li, X. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China (vol 395, pg 497, 2020). *Lancet*, 395(10223), 496-496. doi:10.1016/S0140-6736(20)30252-X
- Ibarrondo, F. J., Fulcher, J. A., Goodman-Meza, D., Elliott, J., Hofmann, C., Hausner, M. A., . . . Yang, O. O. (2020). Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 383(11), 1085-1087. doi:10.1056/NEJMc2025179
- Khoury, D. S., Cromer, D., Reynaldi, A., Schlub, T. E., Wheatley, A. K., Juno, J. A., . . . Davenport, M. P. (2021). Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature Medicine*, 27(7), 1205-1211. doi:10.1038/s41591-021-01377-8

- Kluepfel, D., Vezina, C., Sehgal, S. N., Kudelski, A., Charest, M. P., & Bagli, J. (1972). Myriocin, a New Antifungal Antibiotic from Myriococcum-Albomyces. *Journal of Antibiotics*, 25(2), 109-+. doi:DOI 10.7164/antibiotics.25.109
- Kornhuber, J., Tripal, P., Reichel, M., Muhle, C., Rhein, C., Muehlbacher, M., . . . Gulbins, E. (2010). Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem*, 26(1), 9-20. doi:10.1159/000315101
- Krammer, F. (2020). SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, 586(7830), 516-527. doi:10.1038/s41586-020-2798-3
- Krammer, F., Srivastava, K., Alshammary, H., Amoako, A. A., Awawda, M. H., Beach, K. F., . . . Simon, V. (2021). Antibody Responses in Seropositive Persons after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. *N Engl J Med*, 384(14), 1372-1374. doi:10.1056/NEJMc2101667
- Krasemann, S., Haferkamp, U., Pfefferle, S., Woo, M. S., Heinrich, F., Schweizer, M., . . . Pless, O. (2022). The blood-brain barrier is dysregulated in COVID-19 and serves as a CNS entry route for SARS-CoV-2. *Stem Cell Reports*, 17(2), 307-320. doi:10.1016/j.stemcr.2021.12.011
- Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In S. K. Saxena (Ed.), *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics* (pp. 23-31). Singapore: Springer Singapore.
- Lemberger, L., Rowe, H., Carmichael, R., Crabtree, R., Horng, J. S., Bymaster, F., & Wong, D. (1978). Fluoxetine, a Selective Serotonin Uptake Inhibitor. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 23(4), 421-429. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1978EV22000009
- Li, F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology, Vol 3*, 3, 237-261. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301
- Li, W. H., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J. H., Wong, S. K., Berne, M. A., . . . Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450-454. doi:10.1038/nature02145
- Li, X., Xu, S., Yu, M., Wang, K., Tao, Y., Zhou, Y., . . . Zhao, J. (2020). Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol*, 146(1), 110-118. doi:10.1016/j.jaci.2020.04.006
- Li, X. W., Geng, M. M., Peng, Y. Z., Meng, L. S., & Lu, S. M. (2020). Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(2), 102-108. doi:10.1016/j.jpha.2020.03.001
- Lichtenegger, S., Saiger, S., Hardt, M., Kulnik, S., Wagner, G. E., Kleinhapfl, B., . . . Steinmetz, I. (2022). Development of a Rapid Live SARS-CoV-2 Neutralization Assay Based on a qPCR Readout. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(7), e0037622. doi:10.1128/jcm.00376-22
- Liu, F., Han, K., Blair, R., Kenst, K., Qin, Z., Upcin, B., . . . Qin, X. (2021). SARS-CoV-2 Infects Endothelial Cells In Vivo and In Vitro. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 701278. doi:10.3389/fcimb.2021.701278
- Liu, W., Liu, L., Kou, G., Zheng, Y., Ding, Y., Ni, W., . . . Zheng, S. (2020). Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6), e00461-00420. doi:10.1128/JCM.00461-20
- Long, B., Brady, W. J., Koyfman, A., & Gottlieb, M. (2020). Cardiovascular complications in COVID-19. *Am J Emerg Med*, 38(7), 1504-1507. doi:10.1016/j.ajem.2020.04.048

- Long, Q. X., Liu, B. Z., Deng, H. J., Wu, G. C., Deng, K., Chen, Y. K., . . . Huang, A. L. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 26(6), 845-848. doi:10.1038/s41591-020-0897-1
- Long, Q. X., Tang, X. J., Shi, Q. L., Li, Q., Deng, H. J., Yuan, J., . . . Huang, A. L. (2020). Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine*. doi:10.1038/s41591-020-0965-6
- Lu, R. J., Zhao, X., Li, J., Niu, P. H., Yang, B., Wu, H. L., . . . Tan, W. J. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 395(10224), 565-574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- Mao, L., Jin, H. J., Wang, M. D., Hu, Y., Chen, S. C., He, Q. W., . . . Hu, B. (2020). Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *Jama Neurology*, 77(6), 683-690. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1127
- Markowitz, M., Saag, M., Powderly, W. G., Hurley, A. M., Hsu, A., Valdes, J. M., . . . et al. (1995). A preliminary study of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease, to treat HIV-1 infection. *N Engl J Med*, 333(23), 1534-1539. doi:10.1056/NEJM199512073332204
- Martensson, U., & Nassberger, L. (1993). Influence of Antidepressants on Mitogen Stimulation of Human-Lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, 7(3), 241-245. doi:10.1016/0887-2333(93)90007-R
- McAloon, C., Collins, A., Hunt, K., Barber, A., Byrne, A. W., Butler, F., . . . More, S. J. (2020). Incubation period of COVID-19: a rapid systematic review and meta-analysis of observational research. *BMJ Open*, 10(8), e039652. doi:10.1136/bmjopen-2020-039652
- Mcintosh, K., Apikian, A. Z., Turner, H. C., Haetley, J. W., Parrott, R. H., & Chanock, R. M. (1970). Seroepidemiologic Studies of Coronavirus Infection Inadults and Children. *American Journal of Epidemiology*, 91(6), 585-&. doi:DOI 10.1093/oxfordjournals.aje.a121171
- Medigeshi, G. R., Kumar, R., Dhamija, E., Agrawal, T., & Kar, M. (2016). N-Desmethylclozapine, Fluoxetine, and Salmeterol Inhibit Postentry Stages of the Dengue Virus Life Cycle. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(11), 6709-6718. doi:10.1128/AAC.01367-16
- Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., Manson, J. J., & Speciality, H. A. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*, 395(10229), 1033-1034. doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0
- Meschi, S., Colavita, F., Bordi, L., Matusali, G., Lapa, D., Amendola, A., . . . team, I. N.-I. (2020). Performance evaluation of Abbott ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG immunoassay in comparison with indirect immunofluorescence and virus microneutralization test. *J Clin Virol*, 129, 104539. doi:10.1016/j.jcv.2020.104539
- Middeldorp, S., Coppens, M., van Haaps, T. F., Foppen, M., Vlaar, A. P., Muller, M. C. A., . . . van Es, N. (2020). Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *J Thromb Haemost*, 18(8), 1995-2002. doi:10.1111/jth.14888
- Muruato, A. E., Fontes-Garfias, C. R., Ren, P., Garcia-Blanco, M. A., Menachery, V. D., Xie, X. P., & Shi, P. Y. (2020). A high-throughput neutralizing antibody assay for COVID-19 diagnosis and vaccine evaluation. *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-17892-0
- NCPERET , T. N. C. P. E. R. E. T. (2020). The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *China CDC Weekly*, 2(8), 113-122. doi:doi:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003

- Niknam, Z., Jafari, A., Golchin, A., Danesh Pouya, F., Nemati, M., Rezaei-Tavirani, M., & Rasmi, Y. (2022). Potential therapeutic options for COVID-19: an update on current evidence. *Eur J Med Res*, 27(1), 6. doi:10.1186/s40001-021-00626-3
- Okba, N. M. A., Muller, M. A., Li, W. T., Wang, C. Y., GeurtsvanKessel, C. H., Corman, V. M., . . . Haagmans, B. L. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerging Infectious Diseases*, 26(7), 1478-1488. doi:10.3201/eid2607.200841
- Oskotsky, T., Maric, I., Tang, A., Oskotsky, B., Wong, R. J., Aghaeepour, N., . . . Stevenson, D. K. (2021). Mortality Risk Among Patients With COVID-19 Prescribed Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressants. *JAMA Network Open*, 4(11), e2133090. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.33090
- Ou, X. Y., Liu, Y., Lei, X. B., Li, P., Mi, D., Ren, L. L., . . . Qian, Z. H. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-15562-9
- OurWorldinData. (2023). Cumulative confirmed COVID-19 cases per million people, Jun 28, 2023. Accessed: 02.07.2023 Retrieved from <https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer?tab=map&zoomToSelection=true&facet=none&pickerSort=asc&pickerMetric=location&Metric=Confirmed+cases&Interval=Cumulative&Relative+to+P opulation=true&Color+by+test+positivity=false>
- Owen, D. R., Allerton, C. M. N., Anderson, A. S., Aschenbrenner, L., Avery, M., Berritt, S., . . . Zhu, Y. (2021). An oral SARS-CoV-2 M(pro) inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*, 374(6575), 1586-1593. doi:10.1126/science.abl4784
- Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Bravo, L., Mico, J. A., & Berrocoso, E. (2014). Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin Drug Discov*, 9(5), 567-578. doi:10.1517/17460441.2014.907790
- Riediger, C., Schuster, T., Barlinn, K., Maier, S., Weitz, J., & Siepmann, T. (2017). Adverse Effects of Antidepressants for Chronic Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *Front Neurol*, 8, 307. doi:10.3389/fneur.2017.00307
- Roehrig, J. T., Hombach, J., & Barrett, A. D. T. (2008). Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral Immunology*, 21(2), 123-132. doi:10.1089/vim.2008.0007
- Sayed, A. M., Ibrahim, A. H., Tajuddeen, N., Seibel, J., Bodem, J., Geiger, N., . . . Abdelmohsen, U. R. (2023). Korupensamine A, but not its atropisomer, korupensamine B, inhibits SARS-CoV-2 in vitro by targeting its main protease (M(pro)). *Eur J Med Chem*, 251, 115226. doi:10.1016/j.ejmech.2023.115226
- Schloer, S., Brunotte, L., Goretzko, J., Mecate-Zambrano, A., Korhals, N., Gerke, V., . . . Rescher, U. (2020). Targeting the endolysosomal host-SARS-CoV-2 interface by clinically licensed functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMA) including the antidepressant fluoxetine. *Emerg Microbes Infect*, 9(1), 2245-2255. doi:10.1080/22221751.2020.1829082
- Schmidt, N., Lareau, C. A., Keshishian, H., Ganskih, S., Schneider, C., Hennig, T., . . . Munschauer, M. (2021). The SARS-CoV-2 RNA-protein interactome in infected human cells. *Nature Microbiology*, 6(3), 339-353. doi:10.1038/s41564-020-00846-z
- Sedighi, F., Zarghami, M., Alizadeh Arimi, F., Moosazadeh, M., Ala, S., Ghasemian, R., . . . Elyasi, F. (2023). Efficacy and safety of adding fluoxetine to the treatment regimen of hospitalized patients with non-critical COVID-19 pneumonia: A double-blind randomized, placebo-controlled clinical trial. *Neuropsychopharmacol Rep*, 43(2), 202-212. doi:10.1002/npr2.12327

- Senefeld, J. W., Franchini, M., Mengoli, C., Cruciani, M., Zani, M., Gorman, E. K., . . . Joyner, M. J. (2023). COVID-19 Convalescent Plasma for the Treatment of Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*, 6(1), e2250647. doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.50647
- Shen, C. G., Wang, Z. Q., Zhao, F., Yang, Y., Li, J. X., Yuan, J., . . . Liu, L. (2020). Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 323(16), 1582-1589. doi:10.1001/jama.2020.4783
- Shi, S. T., Lee, K. J., Aizaki, H., Hwang, S. B., & Lai, M. M. C. (2003). Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *Journal of Virology*, 77(7), 4160-4168. doi:10.1128/Jvi.77.7.4160-4168.2003
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569-572. doi:Doi 10.1038/42408
- Soo, Y. O. Y., Cheng, Y., Wong, R., Hui, D. S., Lee, C. K., Tsang, K. K. S., . . . Sung, J. J. Y. (2004). Retrospective comparison of convalescent plasma with continuing high-dose methylprednisolone treatment in SARS patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(7), 676-678. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00956.x
- Tafesse, F. G., Sanyal, S., Ashour, J., Guimaraes, C. P., Hermansson, M., Somerharju, P., & Ploegh, H. L. (2013). Intact sphingomyelin biosynthetic pathway is essential for intracellular transport of influenza virus glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16), 6406-6411. doi:10.1073/pnas.1219909110
- Tchesnokov, E. P., Feng, J. Y., Porter, D. P., & Gotte, M. (2019). Mechanism of Inhibition of Ebola Virus RNA-Dependent RNA Polymerase by Remdesivir. *Viruses*, 11(4). doi:10.3390/v11040326
- Tollefson, G. D., Rampey, A. H., Jr., Potvin, J. H., Jenike, M. A., Rush, A. J., kominguez, R. A., . . . Genduso, L. A. (1994). A multicenter investigation of fixed-dose fluoxetine in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 51(7), 559-567. doi:10.1001/archpsyc.1994.03950070051010
- Treskova-Schwarzbach, M., Haas, L., Reda, S., Pilic, A., Borodova, A., Karimi, K., . . . Harder, T. (2021). Pre-existing health conditions and severe COVID-19 outcomes: an umbrella review approach and meta-analysis of global evidence. *BMC Med*, 19(1), 212. doi:10.1186/s12916-021-02058-6
- Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L. (1965). Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. *Bmj-British Medical Journal*, 1(5448), 1467-+. doi:DOI 10.1136/bmj.1.5448.1467
- Ulferts, R., van der Linden, L., Thibaut, H. J., Lanke, K. H. W., Leyssen, P., Coutard, B., . . . van Kuppeveld, F. J. M. (2013). Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Fluoxetine Inhibits Replication of Human Enteroviruses B and D by Targeting Viral Protein 2C. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(4), 1952-1956. doi:10.1128/Aac.02084-12
- Umehara, T., Sudoh, M., Yasui, F., Matsuda, C., Hayashi, Y., Chayama, K., & Kohara, M. (2006). Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(1), 67-73. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.085
- von Stillfried, S., Bulow, R. D., Rohrig, R., Boor, P., & German Registry of Covid-19 Autopsies, D. C. (2022). First report from the German COVID-19 autopsy registry. *Lancet Reg Health Eur*, 15, 100330. doi:10.1016/j.lanpe.2022.100330
- Wadsworth, J. M., Clarke, D. J., McMahon, S. A., Lowther, J. P., Beattie, A. E., Langridge-Smith, P. R. R., . . . Campopiano, D. J. (2013). The Chemical Basis of Serine Palmitoyltransferase Inhibition by Myriocin. *Journal of the American Chemical Society*, 135(38), 14276-14285. doi:10.1021/ja4059876

- Wall, E. C., Wu, M., Harvey, R., Kelly, G., Warchal, S., Sawyer, C., . . . Bauer, D. L. (2021). Neutralising antibody activity against SARS-CoV-2 VOCs B.1.617.2 and B.1.351 by BNT162b2 vaccination. *Lancet*, 397(10292), 2331-2333. doi:10.1016/S0140-6736(21)01290-3
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-+. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
- Wang, D. W., Hu, B., Hu, C., Zhu, F. F., Liu, X., Zhang, J., . . . Peng, Z. Y. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 323(11), 1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585
- Wang, L., Wang, R., Liu, L., Qiao, D., Baldwin, D. S., & Hou, R. (2019). Effects of SSRIs on peripheral inflammatory markers in patients with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*, 79, 24-38. doi:10.1016/j.bbi.2019.02.021
- Wang, M. L., Cao, R. Y., Zhang, L. K., Yang, X. L., Liu, J., Xu, M. Y., . . . Xiao, G. F. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, 30(3), 269-271. doi:10.1038/s41422-020-0282-0
- Warren, T. K., Jordan, R., Lo, M. K., Ray, A. S., Mackman, R. L., Soloveva, V., . . . Bavari, S. (2016). Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature*, 531(7594), 381-385. doi:10.1038/nature17180
- Wolfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Muller, M. A., . . . Wendtner, C. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. doi:10.1038/s41586-020-2196-x
- Wong, D. T., Bymaster, F. P., Reid, L. R., Fuller, R. W., & Perry, K. W. (1985). Inhibition of Serotonin Uptake by Optical Isomers of Fluoxetine. *Drug Development Research*, 6(4), 397-403. doi:DOI 10.1002/ddr.430060412
- Wong, D. T., Reid, L. R., Bymaster, F. P., & Threlkeld, P. G. (1985). Chronic Effects of Fluoxetine, a Selective Inhibitor of Serotonin Uptake, on Neurotransmitter Receptors. *Journal of Neural Transmission*, 64(3-4), 251-269. doi:Doi 10.1007/Bf01256471
- World Health Organization, W. (2020a). Clinical management of COVID-19: interim guidance, 27 May 2020. Accessed: 21.08.2020 Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332196>
- World Health Organization, W. (2020b). Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Accessed: 15.08.2020 Retrieved from <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- World Health Organization, W. (2020c). Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. Accessed: 17.08.2020 Retrieved from <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>
- World Health Organization, W. (2021). A clinical case definition of post COVID-19 condition by a Delphi consensus, 6 October 2021. Accessed: 01.07.2023 Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345824>
- World Health Organization, W. (2023). Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. Accessed: 30.06.2023 Retrieved from <https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations->

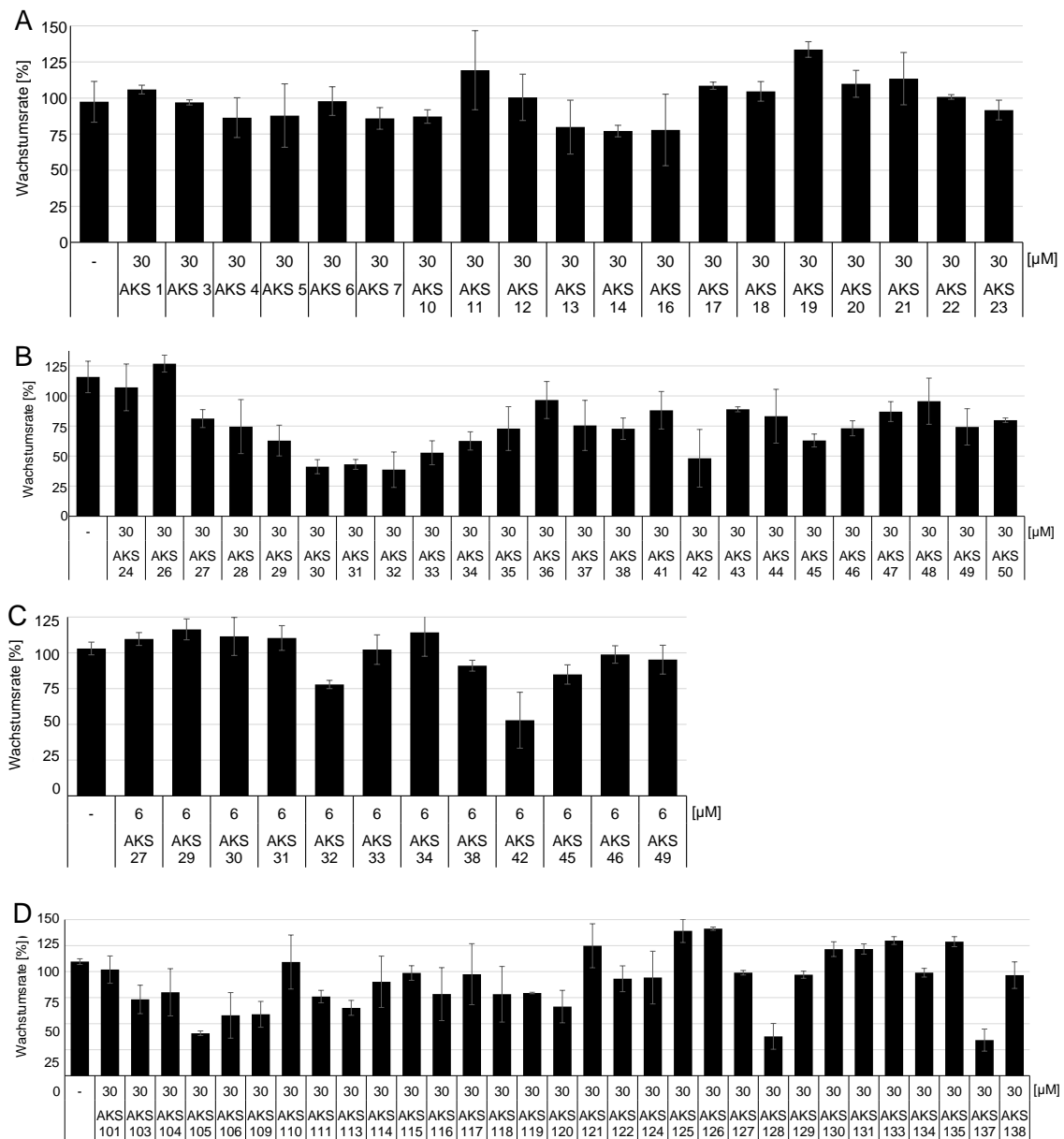
[\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](#)

- Wu, A. P., Peng, Y. S., Huang, B. Y., Ding, X., Wang, X. Y., Niu, P. H., . . . Jiang, T. J. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host & Microbe*, 27(3), 325-328. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001
- Xia, Z. L., DePierre, J. W., & Nassberger, L. (1996). Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology*, 34(1), 27-37. doi:10.1016/0162-3109(96)00111-7
- Yin, W., Mao, C., Luan, X., Shen, D. D., Shen, Q., Su, H., . . . Xu, H. E. (2020). Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*, 368(6498), 1499-1504. doi:10.1126/science.abc1560
- Young, K. C., Bai, C. H., Su, H. C., Tsai, P. J., Pu, C. Y., Liao, C. S., . . . Tsao, C. W. (2014). Fluoxetine a novel anti-hepatitis C virus agent via ROS-, JNK-, and PPARbeta/gamma-dependent pathways. *Antiviral Res*, 110, 158-167. doi:10.1016/j.antiviral.2014.08.002
- Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814-1820. doi:10.1056/NEJMoa1211721
- Zimniak, M., Kirschner, L., Hilpert, H., Geiger, N., Danov, O., Oberwinkler, H., . . . Bodem, J. (2021a). The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2 in human lung tissue. *Scientific Reports*, 11(1), 5890. doi:10.1038/s41598-021-85049-0
- Zimniak, M., Kirschner, L., Hilpert, H., Geiger, N., Danov, O., Oberwinkler, H., . . . Bodem, J. (2021b). The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2 in human lung tissue. *Sci Rep*, 11(1), 5890. doi:10.1038/s41598-021-85049-0
- Zimniak, M., Kirschner, L., Hilpert, H., Seibel, J., & Bodem, J. (2020). The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2020.2006.2014.150490. doi:10.1101/2020.06.14.150490
- Zuo, J., Quinn, K. K., Kye, S., Cooper, P., Damoiseaux, R., & Krogstad, P. (2012). Fluoxetine Is a Potent Inhibitor of Coxsackievirus Replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), 4838-4844. doi:10.1128/Aac.00983-12

7 Appendix

7.1 AKS-Toxizitätstests

Vero-Zellen wurden für 72 h mit den AKS-Substanzen inkubiert. Die Wachstumsrate der Zellen wurde durch Messung im PerkinElmer EnSight nach 0 und 72 h ermittelt. Berechnet wurde der Quotient aus der Zellzahl nach 72 h / Zellzahl nach 0 h. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 100 % normiert (Abbildung 20). Die Versuche wurden in sechs Replikaten durchgeführt. Die Signifikanz des Wachstumsratenunterschieds im Sinne einer Zelltoxizität wurde mittels Student's T-Test bestimmt.



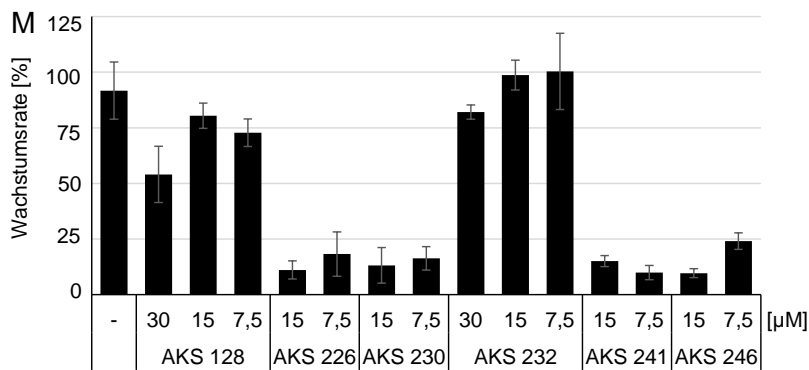
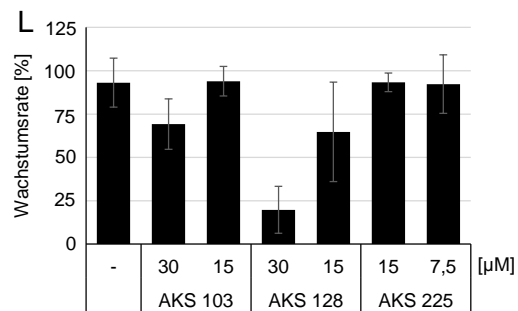
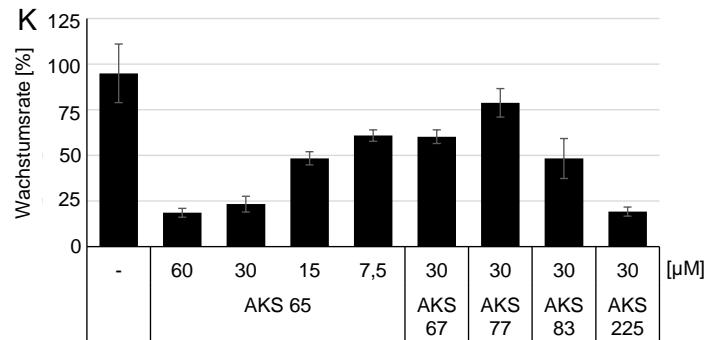
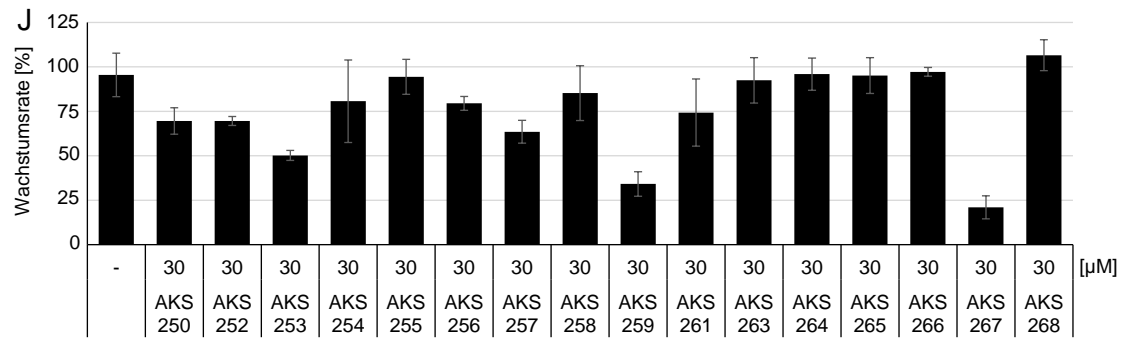


Abbildung 20: Zytotoxische Wirkung der AKS- Substanzen auf Vero-Zellen.

Vero-Zellen wurden für 72 h mit den jeweiligen AKS- Substanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert (A-M). Die Wachstumsrate wurde durch Messungen im PerkinElmer EnSight ermittelt. Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

3CL ^{pro}	3C-Like Protease
AC	Acid Ceramidase
ACE2	Angiotensin-Converting-Enzyme 2
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ASM	Acid Sphingomyelinase
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
CoV	Coronaviridae
COVID-19	Corona Virus Disease 2019
COVRIIN	Fachgruppe Intensivmedizin, Infektiologie und Notfallmedizin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dsDNA	Double-stranded Desoxyribonucleic Acid
EC ₅₀	Half Maximal Effective Concentration
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
Engl.	Englisch
E-Protein	Envelope-Protein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GA	Golgi-Apparat
gRNA	Genomische RNA
h	Hour
hpi	Hours Post Infection
IFT	Immunfluoreszenztestung
IIF	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung
IL6	Interleukin 6
Log	Logarithmus
mAB	Monoclonal Antibody
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome-Related Coronavirus
MGP	Magnetic Glass Particle
MOI	Multiplicity of Infection
M-Protein	Matrixprotein

NAb	Neutralizing Antibody
N-Protein	Nukleokapsidprotein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PRNT	Plaquereducierender Neutralisationstest
RBD	Rezeptorbindende Domäne
RdRPM	RNA-dependent RNA-Polymerase
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Revolutions per Minute
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Reverse Transkriptase
RTqPCR	Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
sgRNA	Subgenomische RNA
SNT	Serumneutralisationstest
S-Protein	Spike-Protein
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor
ssRNA	Single-stranded Ribonucleic Acid
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose (50%)
TMPRSS2	Transmembrane Serinprotease 2
u.a.	Unter anderem
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
Vgl.	Vergleiche
WHO	World Health Organization
z.B.	Zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung aller bestätigten COVID-19 Fälle pro Millionen Menschen...	1
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des SARS-CoV-2-Genoms und der - Replikation.	3
Abbildung 3:	Medikamentöse und nicht-medikamentöse Therapieempfehlung nach Erkrankungsphase bei COVID-19.	7
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der SARS-CoV-2 Replikation mit Zielstrukturen ausgewählter Medikamente.	8
Abbildung 5:	Fluoxetin als potenzieller SARS-CoV-2-Inhibitor.	9
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Echtzeit-qPCR mit FRET-Sonden.	15
Abbildung 7:	Charakterisierung des SARS-CoV-2 Isolats.	19
Abbildung 8:	Fluoxetin inhibiert die SARS-CoV-2-Replikation.	20
Abbildung 9:	Fluoxetins Enantiomere inhibieren die SARS-CoV-2-Replikation. Paroxetin und Escitalopram haben keinen Einfluss auf die SARS-CoV-2- Replikation.	21
Abbildung 10:	Fluoxetin, Paroxetin und Escitalopram haben keine zytotoxische Wirkung auf Vero-Zellen.....	22
Abbildung 11:	Fluoxetin vermindert die Zahl Virusprotein-produzierender Zellen.....	23
Abbildung 12:	Fluoxetin hat keine zytotoxische Wirkung auf BHK-21- und HepG2- Zellen. Fluoxetin hat keinen Einfluss auf die Replikation des Tollwut- und RS-Virus.	24
Abbildung 13:	AKS 128 und AKS 232 inhibieren die SARS-CoV-2-Replikation.....	26
Abbildung 14:	Anti-SARS-CoV-2-Antikörpernachweis in Patient:innen-Seren durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung.	35
Abbildung 15:	Serum S1, S5, S6 und S7 neutralisieren SARS-CoV-2.	37
Abbildung 16:	Seren S1 und S6 neutralisieren SARS-CoV-2 ab einer Verdünnung von 1:400.....	38
Abbildung 17:	Potenzielle antivirale Wirkmechanismen von Fluoxetin.	41
Abbildung 18:	Das Myriocin-Derivat AKS 232 inhibiert die SARS-CoV-2 Replikation..	43
Abbildung 19:	Individuelle Konzentration neutralisierender anti-SARS-CoV-2-Antikörper nach Impfung und/oder Infektion.	45
Abbildung 20:	Zytotoxische Wirkung der AKS- Substanzen auf Vero-Zellen.....	61

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Namen und Strukturformeln der verwendeten selektiven Serotonin- Wiederaufnahmehemmer.....	13
Tabelle 2:	Zusammensetzung des PCR-Mastermix.	16
Tabelle 3:	Charakterisierung der eingesetzten Antikörper.....	18
Tabelle 4:	Einfluss der AKS-Substanzen auf die SARS-CoV-2-Replikation.	27
Tabelle 5:	Serum-Verzeichnis.....	36

7.5 Eigene Publikationen und Konferenzteilnahmen

Publikation

Zimniak, M., Kirschner, L., Hilpert, H. *et al.* The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2 in human lung tissue. *Sci Rep* **11**, 5890 (2021).

Preprint

Zimniak, M., Kirschner, L., Hilpert, H., Seibel, J., & Bodem, J. (2020). The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2020.2006.2014.150490.

Posterpräsentation

“The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2”.

Eureka! 15th International GSLS Student Symposium, Oktober 2020, Würzburg

7.6 Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2 replication” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin inhibiert die SARS-CoV-2-Replikation“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

7.7 Curriculum Vitae Melissa Maria Zimniak

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Jochen Bodem für die stets hilfsbereite Betreuung während der Promotionsarbeit, für konstruktive Kritik, für alle bereichernden Ratschläge und die vielen Lacher, die die Arbeit sehr erheitert haben.

Herrn Prof. August Stich, Herrn Prof. Max Topp und Herrn Prof. Lars Dölken danke ich für die hilfreichen Anregungen und Kommentare sowie für die Begutachtung meiner Arbeit.

Für die Einweisung in die experimentellen Arbeitsweisen und Methoden sowie der tatkräftigen Unterstützung im Labor bedanke ich mich bei Luisa Kirschner, Heike Oberwinkler sowie Helen Hilpert. A special thanks goes to Farwa Batool for her insightful assistance and support during laboratory work as well as in life.

Ich danke der Graduate School of Life Sciences für die Aufnahme in das MD Excellence Program und die damit verbundenen Ausbildungsmöglichkeiten sowie finanzielle Unterstützung.

Meinen Liebsten M, P, D und P danke ich für die immerwährende Unterstützung und Begleitung. Ihr macht mein Leben so reich.