

# Präliminäre Resultate der Kontrollversuche

Die Reaktion primärer humaner Epithelzellen auf stringente Virusamplifikations-Bedingungen widerlegen die Existenzbehauptungen aller Viren und von SARS-CoV-2

Dr. Stefan Lanka und Kollegen

## Zusammenfassung

Exosomen sind kleine extrazelluläre Vesikel, die cargo-RNA, DNA und zelluläre Proteine enthalten. Sie werden von allen Zelltypen produziert, dienen der Zell-Zell Kommunikation und bieten vielversprechende therapeutische Möglichkeiten. Um die RNA-Spezies und extrazellulären Vesikel unter harschen, in der Virologie routinemäßig angewandten Protokollen zu untersuchen, wurden gesunde primäre menschliche Epithelzellen über drei Passagen mit Stressprotokollen für die Virus (Virion) Amplifikation kultiviert. Trotz fehlender Virusinokulation entwickelten die Zellen schwere zytopathische Effekte (CPE), die zu sichtbarer subtotaler Zerstörung und Plaquebildung im Zellrasen führten. Eine Blindinspektion von Zellen unter Kontroll- und Virusamplifikationsbedingungen ermöglichte die Identifizierung der unterschiedlichen Morphologien mit einer Trefferquote von 100 %. Die totale RNA aus Zellen und Zellkulturüberständen von drei biologischen und zwei technischen Replikaten pro Stressgruppe wurde zusammen mit der gesamt-RNA aus den gleichen, optimal kultivierten Zellen per next-generation sequencing aufgeschlüsselt. Sequenz- und extrazelluläre Vesikelanalysen sind im Gange.

## Einführung

Viren aus Isolaten, z.B. von Fledermäusen, werden in Zellkulturen unter harschen Kulturbedingungen vermehrt, indem ihnen durch Reduktion des fötalen Kälberserums (FCS) von 10 % auf 2 % oder 1 % in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ein Grossteil der Nahrung entzogen wird, was den

ATCC Empfehlungen entspricht. Der Nahrungsentzug wird außerdem routinemäßig mit hohen Konzentrationen von Dreifach-Antibiotika von Gibco (Penicillin/Streptomycin-Antibiotika mit Amphotericin B-Antimykotikum) und aufeinanderfolgendem „blind passaging“ von Zellkulturüberständen auf die nächste Zellkultur kombiniert.<sup>1</sup> Morphologisch führt die Virionenamplifikation zu zytopathischen Effekten (CPE), die im Abrunden der Zellen, Ballonierung derselben und zellulärer Degeneration endet, was schließlich durch Plaquebildung in einer konfluenten Zellkultur sichtbar wird. Entsprechend können virale Partikel, die aus diesen Zellkulturüberständen angereichert werden, elektronenmikroskopisch abgebildet werden. Um die Hypothese auszuschließen, dass harsche Stressbedingungen ohne Virusinokulation möglicherweise zur Bildung von Exosomen<sup>2</sup> führen, die Virionen-ähnlich sind, haben wir gesunde primäre humane Epithelzellen routinemäßigen Virusamplifikationsprotokollen unterzogen. Anschließend isolierten wir Gesamt-RNA aus ausgehungerten oder Kontrollzellen und Überständen mit viralen RNA-Isolierungskits oder routinemäßiger TRIzol-Extraktion und unterzogen die RNA next-generation sequencing.

## Resultate

Gesunde, primäre humane Epithelzellen wurden über vier Passagen (P<sub>3</sub>-P<sub>6</sub>) unter optimalen Kulturbedingungen in definiertem Epithel-Kontrollmedium mit 1x Triple-Antibiotika (CM) gezüchtet. Nach der ersten Passage wurde der Zellpool in vier Gruppen aufgeteilt. Nach 3 Tagen in CM wurden die Kulturen entweder in frisches CM (CM,

Control 1), DMEM/GlutaMAX mit 10% FCS, 1x Triple-Antibiotika (Control 2) oder in ein Stress-Medium (Starvation 1 & 2) überführt. Während der ersten Stressbehandlung enthielt das Stress-Medium DMEM, 1% FCS und 3x Triple-Antibiotika. Die zweite und dritte Passage waren „blinde“ Passagen in denen 50% des Kulturüberstandes von der letzten Passage auf die nächste Passage in DMEM, 1% FCS und 3x Triple-Antibiotika übertragen wurde. Die zweite Stress-Gruppe wurde zusätzlich bei jeder Passage mit totaler Hefe-RNA (yRNA) für eine Stunde vor der Zugabe des Stress-Mediums behandelt (Starvation 2).

Nach dem Transfer in DMEM mit 10 % FCS nahmen die Epithelzellen eine flachere Morphologie als im CM an und bildeten einen kontinuierlichen Zellrasen, was auf die hohen Kalziumkonzentrationen in DMEM zurückzuführen ist. Ansonsten teilten sich die Zellen weiterhin normal (Abbildung 1A). Im Gegensatz dazu schrumpften die Zellrasen in den Stress-Medien zu kleinen Inseln mit reduziertem Wachstum und beginnender Zelldegeneration. Während der nächsten zwei Passagen zeigten die Zellen, die mit dem Überstand der gestressten Zellen der vorherigen Passage inkubiert wurden, zunehmende CPE mit zellfreien Bereichen, die an Virion-bedingte Plaques im Zellrasen erinnerten, und mehr tote Zellen schwammen im Überstand (Abbildung 1B). Konfluente Kulturen unter Stress (Abbildung 1C), die mit Kristallviolett gefärbt wurden (Abbildung 1D), bestätigen den ausgeprägten CPE. Pyknotische Zellen mit kondensierten Kernen oder ballonierende Zellen waren überwiegend in der Starvation 1 Gruppe vorhanden und Bereiche mit totaler Zellzerstörung oder Plaques waren auch in der Starvation 1, aber vorwiegend in der Starvation 2 Gruppe zu beobachten.

Die Experimente wurden in drei biologischen Replikaten und zwei technischen Duplikaten durchgeführt. Alle Kulturen wurden blind inspiziert wobei die gestressten Kulturen leicht an drastischen Veränderungen der Morphologie zu erkennen waren. Nach drei Passagen wurde die RNA aus der Kontrolle 1 und den beiden gestressten Zellgruppen und Überständen mit viralen RNA-Kits oder TRIzol isoliert und next-ge-

neration sequencing unterzogen. Die isolierte Gesamt-RNA-Menge war in der Kontrollgruppe 1 am ergiebigsten (Tabelle 1) und hatte in allen Gruppen eine einwandfreie Qualität (Daten nicht gezeigt). Weitere Überstände wurden zur Analyse extrazellulärer Partikel weiterverwendet. Die Experimente sind in Bearbeitung.

## Material und Methoden Zellkultur

Kommerzielle humane primäre Epithelzellen der Passage 3 wurden aufgetaut und mit 4'000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 75cm<sup>2</sup>-Flaschen zur Expansion bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> in definiertem Epithelalem Niedercalcium Medium (ohne FCS) und 1x Triple-Antibiotika (Gibco) (Kontrollmedium, CM) ausgesät. Bei >80% Konfluenz wurden die Expansionszellen mit 5mL Accutase-Enzym bei 37°C für 10 Minuten abgelöst. Die Accutase wurde mit 10mL CM neutralisiert, die Zellen 5 Minuten bei 400G zentrifugiert, in 1mL CM resuspendiert, die lebenden Zellen mittels Trypanblau-Färbung im Countess II-Gerät (ThermoFisher) gezählt. Die Zellen wurden für das Experiment oder parallele Expansionsrunden für nachfolgende Experimente ausgesät.

Für jedes Experiment wurden vier Gruppen gesunder primärer Epithelzellen aus demselben expandierten Pool in CM mit 4000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 25cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät und bis zu >50% Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde dann durch vier experimentelle Bedingungen ersetzt; für Kontrollzellen durch frisches CM (Control 1) oder kommerzielles DMEM, ergänzt mit GlutaMAX, 10% hitze-inaktiviertes FCS und 1x Triple-Antibiotikum (Control 2). Nahrung wurde entzogen, indem CM durch DMEM, mit 1% FCS und 3x Triple-Antibiotika ersetzt wurde, was im Wesentlichen den Protokollen der Virionenamplifikation<sup>1</sup> entspricht (Starvation 1 & 2). Die gestresste Starvation Gruppe 2 wurde zusätzlich mit 10 µg Gesamt-Hefe-RNA (yRNA) pro Kulturflasche für 1h behandelt und vor dem Mediumwechsel Gruppe 1 & 2 gründlich mit phosphatgepufferter Koch- ▶

salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden zwei «blind passages» durchgeführt, bei denen 50 % des Überstandes der Starvation Gruppen 1 und 2 in die nächste Zellkultur überführt wurde. Die Überstände wurden durch Zentrifugation bei 400G für 5 Minuten von toten Zellen gesäubert. Die Kontrollgruppen erhielten 100 % frisches Medium.

Die Experimente wurden dreimal in Duplikaten wiederholt. Die im ersten biologischen Replikat definierte Länge der Kultur unter Stress, wurden für alle Experimente konstant gehalten. Während der Stressperiode wurde kein Mediumwechsel durchgeführt.

P4: Medienwechsel bei Kontroll- und gestressten Zellen bei circa 50 Konfluenz; Kontrollzellen kultiviert bis >80% Konfluenz, gestresste Zellen kultiviert für 5 Tage nach Medienwechsel.

P5: Medienwechsel bei Kontroll- und gestressten Zellen >50 Konfluenz, Kontrollzellen kultiviert bis >80% Konfluenz, gestresste Zellen kultiviert für 8 Tage nach Medienwechsel.

P6/RNA Isolation: Medienwechsel bei Kontroll- und gestressten Zellen bei circa 50 Konfluenz; Kontrollzellen kultiviert bis >80% Konfluenz, gestresste Zellen kultiviert für 5 Tage nach Medienwechsel.

P6/Crystal violet: Medienwechsel bei Kontroll- und gestressten Zellen bei 100% Konfluenz; Stress Induktion für 3 Tage.

Von allen Zellkulturen wurde täglich eine repräsentative Aufnahme bei Raumtemperatur mit einem Hellfeldmikroskop Nikon Eclipse TS100 mit einer Nikon 1J5 Kamera, einem Nikon FT1 Adapter und einem 4x Objektiv gemacht.

## RNA-Extraktion aus Epithelzellkulturen und Überständen

Am Ende von Passage 6 wurde die Hälfte der gesamten zellulären RNA mit dem Promega miRNA-Kit (Promega, Z6211), das für kleine und lange RNA-Proben empfohlen wird, gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert. Die andere Hälfte der zellulären Gesamt-RNA wurde mit dem Standard-TRIzol-Protokoll isoliert. Die Gesamt-RNA aus dem Zellkulturüberstand wurde mit dem routinemäßig

verwendeten Qiagen-Kit für virale RNA (Qiagen, 52904) gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert. Alle RNA-Proben wurden mit DNase behandelt. Die Gesamt-RNA-Konzentration sowie die Verhältnisse 260/280 und 260/230 wurden mit einem NanoDrop 2000 (ThermoFisher) bestimmt. Die RNA-Mengen waren am höchsten in den in CM kultivierten Proben und am niedrigsten in den gestressten Gruppen 1 und 2, während die Überstände sehr niedrige, aber ähnliche RNA-Mengen aufwiesen (Tabelle 1). 8,3 mg Gesamt-RNA von hoher Qualität, bewertet mit dem Bioanalyzer, aus der Kontrollgruppe 1 und den gestressten Gruppen 1 & 2 wurden mit «next generation RNA sequencing» sequenziert.

## Kristallviolett-Färbung

Bei der letzten Passage wurde ein zweiter Satz von 25cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 8000 Zellen/cm<sup>2</sup> (Satz 2) angesät, um zytopathische Effekte zu visualisieren. Bei 100 % Konfluenz wurden diese Zellen einer der vier Medienbedingungen ausgesetzt. Drei Tage nach der Exposition wurden die Zellen in 4% Paraformaldehyd für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit 1% Crystal Violet für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt, bevor sie gründlich mit Leitungswasser bei Raumtemperatur gewaschen wurden.

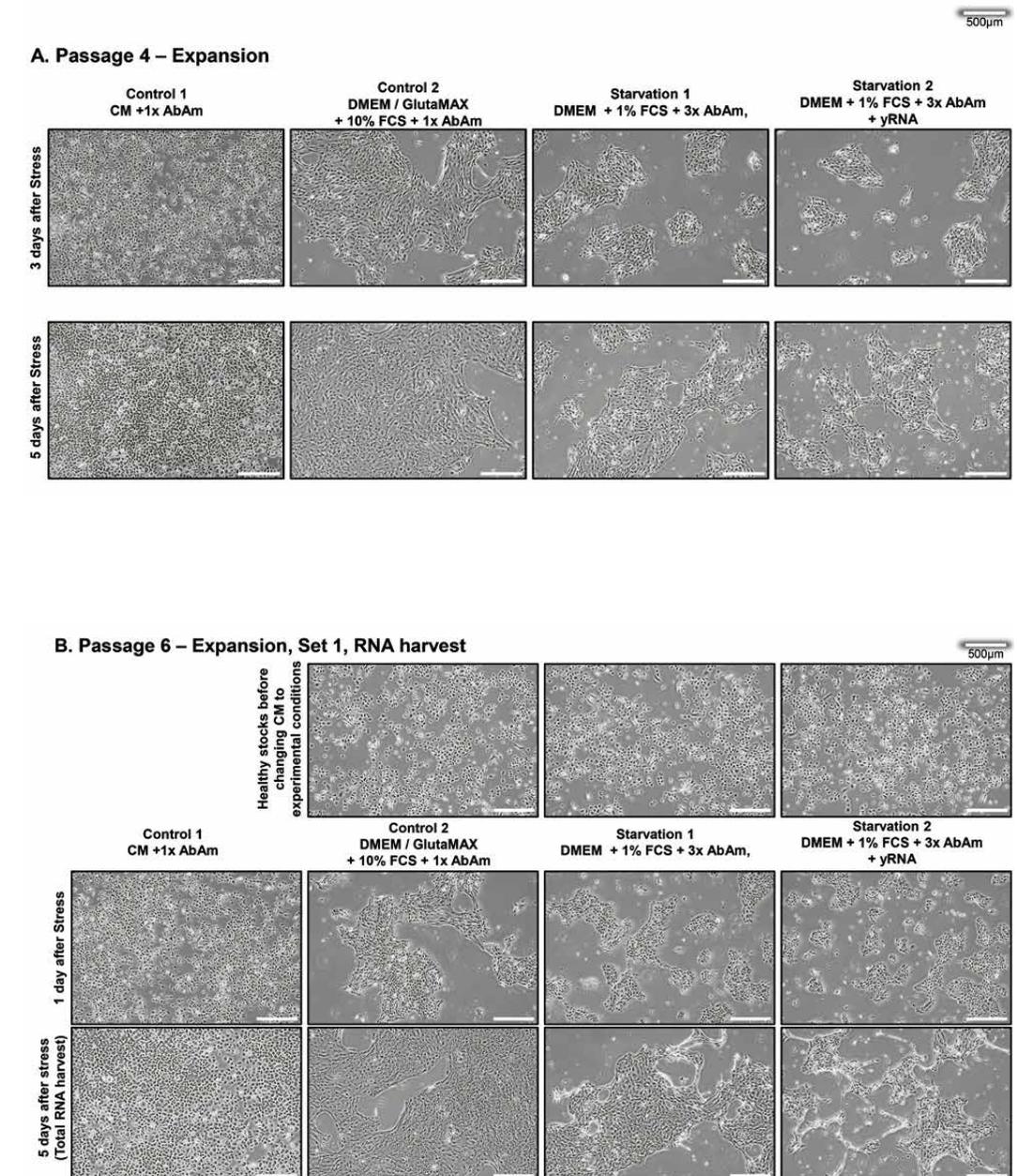
Zur Aufnahme der gefärbten Kulturen wurde das Hellfeldmikroskop Nikon Eclipse TS100 mit einer Nikon 1J5-Kamera, einem Nikon FT1-Adapter und einem 4- oder 20-fach-Objektiv verwendet.

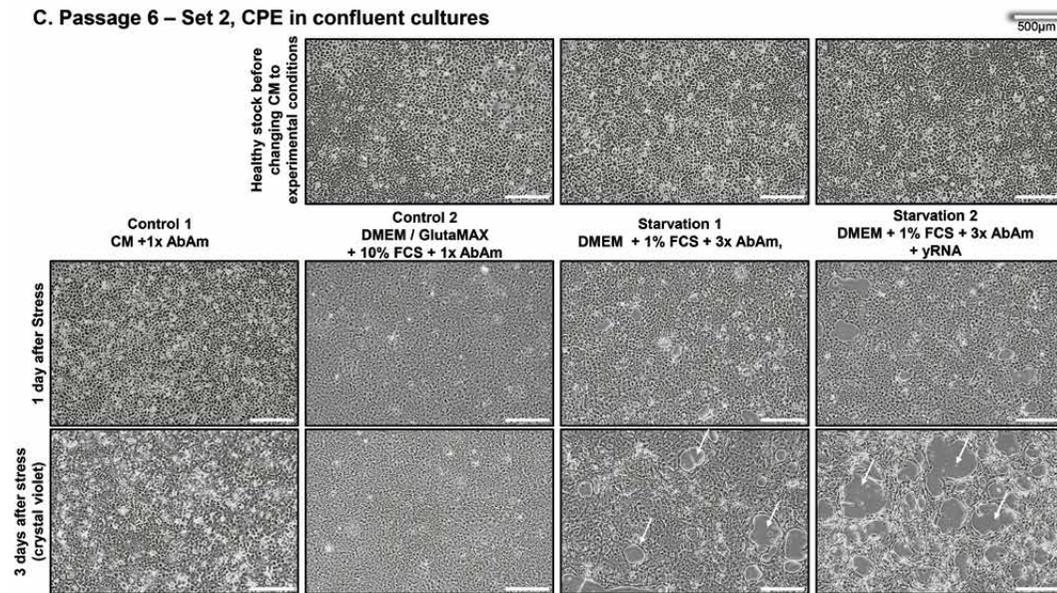
## Referenzen

<sup>1</sup> Ge, X. Y. et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 503, 535-538, doi:10.1038/nature12711 (2013).

<sup>2</sup> Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L. & Baruteau, J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal* 19, 47, doi:10.1186/s12964-021-00730-1 (2021).

## Abbildungen





**Abbildung 1. Stress von Epithelzellen. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der 4 experimentellen Gruppen von Epithelzellen bei Passage 4 und 6.**

Von links nach rechts: gesunde Kontrollzellen mit 1x Triple-Antibiotika in Kontrollmedium (CM) oder DMEM/GlutaMAX mit 10% FCS; gestresste Zellen mit 3x Triple-Antibiotika und 1% FCS in DMEM.

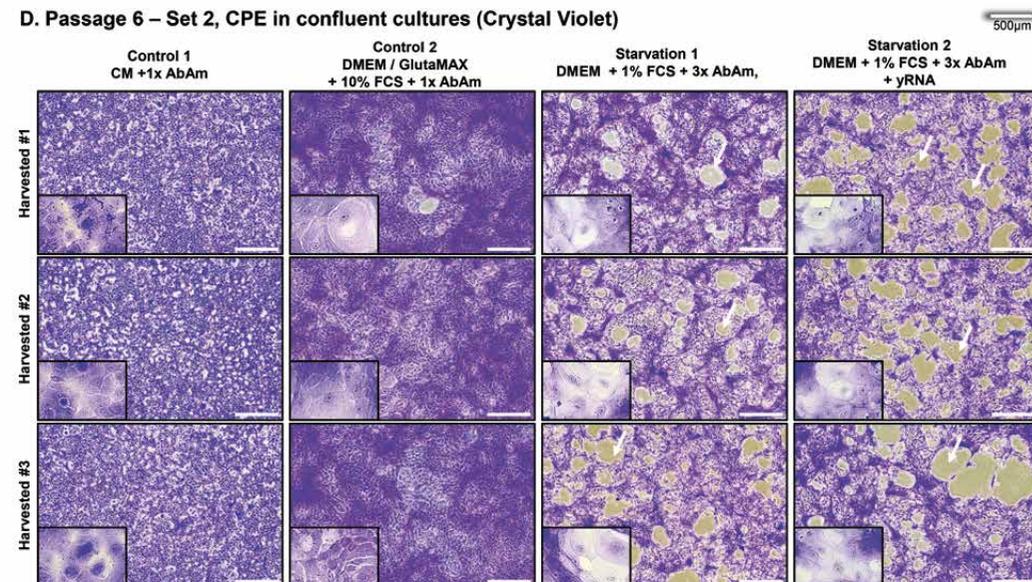
Die Zellen im rechten Panel wurden vor dem Medienwechsel für 1h mit totaler Hefe-RNA (yRNA) behandelt.

(A), (B) Zellen in Expansion zum Zweck der RNA-Isolation. Es ist zu beachten, dass die CPE über die drei Passagen prominenter wird. (B) Oberste Zeile: Zellen vor dem Mediumwechsel. (C), (D) Konfluente Zellen zur Visualisierung von CPE; (C) Oberste Zeile: konfluente Zellen vor dem Mediumwechsel. (D) Zellkulturen aus 3 biologi-

schen Replikaten, gefärbt mit Kristallviolett zum Zeitpunkt der Ernte.

Zu beachten ist, dass die Zellen in den beiden linken Tafeln einen kontinuierlichen Zellrasen bilden während die Zellen in den beiden rechten Tafeln eine hohe Anzahl von Plaques (Pfeile) aufweisen, die mit signifikanten zytopathischen Effekten kompatibel sind, die von Tag 1 bis Tag 5 zunehmen. Mit Hefe-RNA behandelte Kulturen zeigen eine signifikant höhere Anzahl von größere Plaques.

Ausschnitte: 20-fache Vergrößerung; einige seltene pyknotische und ballonierende Zellen wurden in Kontrollkulturen beobachtet; ballonierende Zellen mit leerem Zytoplasma sind am häufigsten unter Stressbedingungen 1. Die Kulturen wurden von 2 Experimentatoren täglich blind mit einer Trefferquote von 100% inspiziert. Balken; 500 µm. Alle Kulturen: n=3 in Duplikaten.



**Tabelle 1: RNA Isolation**

Groups #	Label	Sample Percentile	Harvesting Method	Total RNA in µg	RNA Vol. in µL
Control 1 CM + 1x AbAm	Control 1	100% Supernatant	Viral RNA Kit (Column)	0,27	30,00
		100% Cells	miRNA Kit+TRizol	21,53	15,00
Control 2 DMEM + GlutaMAX + 10% FCS + 1x AbAm	Control 2	100% Supernatant	Viral RNA Kit (Column)	0,26	30,00
		100% Cells	miRNA Kit+TRizol	14,78	15,00
Stress 1 DMEM + 1% FCS + 3x AbAm	Starvation 1	100% Supernatant	Viral RNA Kit (Column)	0,32	30,00
		100% Cells	mRNA Kit+TRizol	8,32	15,00
Stress 2 DMEM + 1% FCS + 3x AbAm + Yeast tRNA	Starvation 2	100% Supernatant	Viral RNA Kit (Column)	0,27	30,00
		100% Cells	miRNA Kit+TRizol	9,25	15,00