

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Zahnert

**Vom olfaktorischen Epithel zum Bulbus olfactorius:
Eine histopathologische Analyse des Einflusses von SARS-CoV-2**

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Martin Bierkämper

aus Torgau

Dresden 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Hintergrund und klinische Relevanz von COVID-19	1
1.2 Anatomie und Funktion des olfaktorischen Systems	2
1.3 Pathomechanismen von SARS-CoV-2	3
1.3.1 Zellulärer Eintritt des Virus	3
1.3.2 Immunologische Reaktion und Gewebeschädigung	5
1.3.3 Bedeutung der Anosmie und möglicher Langzeitfolgen	5
1.4 Angeborene und adaptive Immunantwort bei SARS-CoV-2-Infektionen	5
1.4.1 Die Rolle der Neutrophilen Granulozyten bei SARS-CoV-2-Infektionen	6
1.4.2 Die Rolle von T-Zellen (CD3+ und CD8+) bei SARS-CoV-2-Infektionen	7
1.5 Hämatogene Neuroinvasion und alternative Pathomechanismen	7
1.6 Entwicklung bedeutender SARS-CoV-2-Varianten im Pandemie-Verlauf	8
2 FRAGESTELLUNGEN	10
3 MATERIAL UND METHODEN	11
3.1 Patientenproben	11
3.1.1 Probenentnahme	11
3.1.2 Gewebeaufbereitung	12
3.1.3 Herstellung von humanen Gewebeschnitten	12
3.2 Histologische und immunhistochemische Verfahren	13
3.2.1 Färbungen	13
3.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung	14
3.2.3 Immunhistochemische Verfahren	14
3.2.3.1 Anti-Olfactory Marker Protein (OMP)-Antikörper	18
3.2.3.2 Purified anti-Tubulin β 3 (TUBB3)-Antikörper	19
3.2.3.3 Anti-CD3 [CD3-12]-Antikörper	19

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.3.4	Anti-CD8 alpha [C8/144B]-Antikörper	20
3.2.3.5	Recombinant Anti-CD68 [KP1]-Antikörper	20
3.2.3.6	Anti-ACE2-Antikörper	21
3.2.3.7	Anti-SARS spike glycoprotein [3A2]-Antikörper.....	22
3.2.4	Visualisierung der histologischen Färbungen.....	22
3.2.5	Grafische Auswertung der Färbungen	23
3.2.6	Statistische Auswertung der Färbungen	23
4	ERGEBNISSE	24
4.1	Olfaktorische Mukosa und Nervengewebe.....	24
4.2	Riechkolben und SARS-Spike-Protein	31
5	DISKUSSION	35
5.1	Immunantwort in der Nasenschleimhaut	35
5.2	Immunantwort in Nervenfasern und Zentralnervensystem	38
5.3	Einschränkungen.....	39
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	41
7	SUMMARY	41
Literaturverzeichnis		Fehler! Textmarke nicht definiert.
Anhang		62
Danksagung.....		74
Anlage 1		74
Anlage 2		74

Abkürzungsverzeichnis

AB	Avidin-Biotin-Komplex
ACE2	Angiotensin-Converting Enzyme 2
ADAM17	A Disintegrin And Metalloprotease 17
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	Akutes respiratorisches Distress-Syndrom
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BV	Blutgefäß
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDx	Cluster of Differentiation
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CRP	C-reaktives Protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Dil.	Verdünnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPI	Epineurium
Fc	Fragment crystallizable
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
ICC	Immunzytochemie
IHC	Immunhistochemie
LAMPs	Lysosomal-Associated Membrane Proteins
LMF CMCB	Light Microscopy Facility am Center for Molecular and Cellular Bioengineering Dresden
M	Mittelwert
MAK	Monoklonaler Antikörper
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
MHC	Major Histocompatibility Complex

mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N	Trigeminale Nerven
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NGS	Normal Goat Serum
NRP1	Neuropilin-1
OB	Bulbus olfactorius
OE	Olfaktorisches Epithel
OMP	Olfactory Marker Protein
ON	Olfaktorische Nerven
PAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBD	Rezeptor-Bindungs-Domäne
RE	Respiratorisches Epithel
RNA	Ribonukleinsäure
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SD	Standardabweichung
TEMRA	Terminal Effector Memory-T-Cells re-expressing CD45RA
TMPRSS2	Transmembrane Protease Serine Subtype 2
TRIS-EDTA	Tris(hydroxymethyl)aminomethan - Ethylendiamintetraessigsäure
TUBB3	β -III-Tubulin
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immunhistochemische Färbungen	16
Tabelle 2: Puffer für die Immunhistochemischen Färbungen	17
Tabelle 3: Deskriptive Statistik der Studiengruppen	24
Tabelle 4: Patientendaten der final eingeschlossenen Proben.....	62
Tabelle 5: Einbettungsprotokoll der histologischen Proben in Paraffin	63
Tabelle 6: Deparaffinisierung der Paraffinblöcke.....	63
Tabelle 7: HE- Färbeprotokoll.....	64
Tabelle 8: Chemikalien und Flüssigkeiten.....	65
Tabelle 9: Zusammenfassung der häufigsten Befunde, die bei Autopsien festgestellt wurden	66
Tabelle 10 : Gebrauchsmaterialien und Geräte	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Potenzielle Wege, über die SARS-CoV-2 die Nasenschleimhaut und den Riechkolben infizieren kann (Xydakis et al., 2021).....	1
Abbildung 2: Olfaktorisches Epithel in Olfactory Marker Protein (OMP)-Färbung.....	3
Abbildung 3: Mechanismus des Zelleintritts von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle (Lippi et al., 2020).....	4
Abbildung 4: Sicht auf die Schädelbasis von innen (Basis cranii interna) mit Probenentnahme aus der oberen Nasenmuschel (Concha nasalis superior).....	12
Abbildung 5: Färbeprotokoll der zu untersuchenden Gewebeproben.....	13
Abbildung 6: Avidin-Biotin-Komplex (Hantschke & Palmedo, 2016).....	15
Abbildung 7: Immunhistochemische Reaktionen im olfaktorischen Epithel und respiratorischen Epithel für SARS-CoV-2-Proben.....	26
Abbildung 8: Immunhistochemische Reaktionen im olfaktorischen Epithel und respiratorischen Epithel bei SARS-CoV-2 ⁺ -Proben und statistische Auswertung der Zellzahlen	27
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbungen von Nervengewebe bei SARS-CoV-2 ⁺ -Proben	29
Abbildung 10: Immunhistochemische Färbungen von Nervengewebe bei SARS-CoV-Proben und statistische Auswertung der Zellzahlen.....	30
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbungen im Riechkolben bei SARS-CoV-2 ⁺ -Proben	32
Abbildung 12: Immunhistochemische Reaktionen in Arterien und Venen bei SARS-CoV-2 ⁺ -Proben.	32
Abbildung 13: Immunhistochemische Reaktionen im olfaktorischen Epithel, respiratorischen Epithel, in Nervengewebe und im Riechkolben bei SARS-CoV-2 ⁺ -Proben	33
Abbildung 14: Immunhistochemische Reaktionen im olfaktorischen Epithel und respiratorischen Epithel in einer SARS-CoV-2 ⁺ -Probe.....	34
Abbildung 15: Negative Kontrollen für Abbildung 7, SARS-CoV-2 ⁻	67
Abbildung 16: Negative Kontrollen für Abbildung 8, SARS-CoV-2 ⁺	68
Abbildung 17: Negative Kontrollen für Abbildung 9, SARS-CoV-2 ⁺	69
Abbildung 18: Negative Kontrollen für Abbildung 10, SARS-CoV-2 ⁻	70

Abbildung 19: Negative Kontrollen für Abbildung 11, SARS-CoV-2 ⁺	70
Abbildung 20: SARS-CoV-2 ⁺ , immunhistochemische Reaktionen im olfaktorischen Epithel und in den olfaktorischen Nerven	71
Abbildung 21: Negative Kontrollen für Abbildung 13, SARS-CoV-2 ⁺	72

1 EINLEITUNG

1.1 Hintergrund und klinische Relevanz von COVID-19

Im Dezember 2019 wurde in der Stadt Wuhan in China ein neuartiges Coronavirus identifiziert, das für eine Häufung atypischer Pneumonien verantwortlich war (C. Huang et al., 2020). Dieses Virus wurde später als Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) klassifiziert und ist der Erreger der Erkrankung COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020). Die rasche Ausbreitung führte im März 2020 zur Ausrufung einer Pandemie durch die Weltgesundheitsorganisation.

Während einer akuten Infektion mit SARS-CoV-2 zeigten zu Beginn der Pandemie etwa 80 % der Betroffenen milde Symptome des oberen Respirationstraktes. Fieber konnte als zusätzliches Symptom auftreten. Es entwickelten sich darüber hinaus auch schwere Verläufe, die in einer Pneumonie oder in einem akuten respiratorischen Distress-Syndrom (ARDS) endeten und teilweise zum Tod führten (M. Chen et al., 2024; Guan et al., 2020; Z.-X. Huang et al., 2020).

Die Nasenhöhle gilt als Haupteintrittspunkt des Virus. Die in der Nasenschleimhaut detektierte erhöhte Viruslast mit nachfolgend initiiertem Immunantwort weist sie als initiale Infektionsstelle aus (Gallo et al., 2021; W. Wang et al., 2020; Zou et al., 2020).

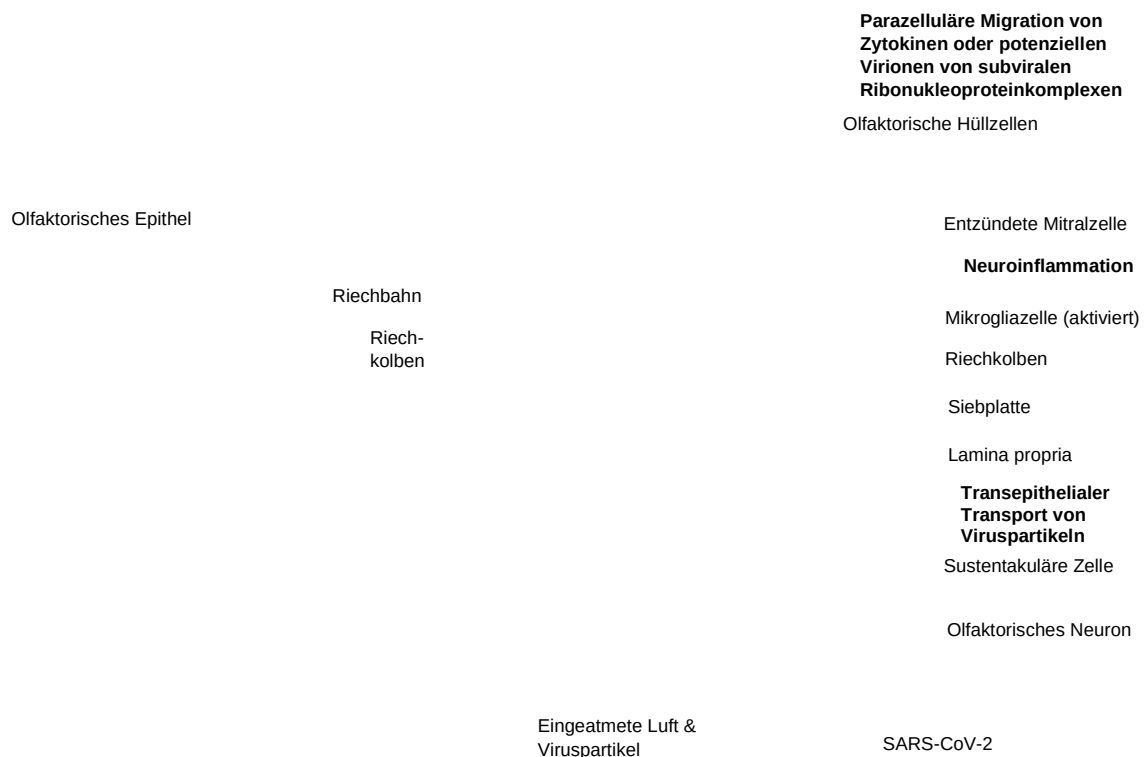


Abbildung 1: *Potenzielle Wege, über die SARS-CoV-2 die Nasenschleimhaut und den Riechkolben infizieren kann (Xydakis et al., 2021): (A) Parazelluläre Migration:* Moleküle oder Virionen können über kleine Zwischenräume zwischen den olfaktorischen Hüllzellen oder entlang von freien Nervenfaszikeln durch die Siebbeinplatte ins Gehirn gelangen. **(B) Sterile Neuroinflammation (nicht-infektiöse Entzündung):** Eine immunologische Reaktion, die durch Entzündungsbotenstoffe (z. B. Zytokine und Chemokine) gekennzeichnet ist. Das Virus spielt hier nur eine indirekte Rolle, indem es diese Reaktion zwar anstößt, aber nicht unmittelbar selbst auslöst. **(C) Transzellulärer (transsynaptischer) Transport:** Virionen könnten durch direkten Transport von Nervenzelle zu Nervenzelle entlang bestehender Nervenverbindungen (in anterograder Richtung, also zum Gehirn hin) über die Siebbeinplatte gelangen.

Ein besonders häufiges Symptom, das in den frühen Varianten von COVID-19 beobachtet wurde, ist der Geruchsverlust (Anosmie). Lechien et al. beschrieben in ihrer Studie, dass etwa 86 % der COVID-19-Patienten unter einer Anosmie litten, wobei viele dieser Patienten weder Rhinorrhoe noch nasale Obstruktion aufwiesen (Lechien et al., 2020). Besonders klinisch relevant war dieses Symptom, da es oft eines der frühesten und manchmal sogar das einzige Anzeichen der Erkrankung war. Dies spielte für die frühzeitige Erkennung und Diagnostik von COVID-19 eine wichtige Rolle. Dabei ist der Geruchsverlust nicht nur ein diagnostisches Merkmal, sondern auch ein Hinweis auf eine Infektion des Riechepithels und der damit verbundenen neuronalen Strukturen.

Da bislang jedoch nur wenige *post mortem* Studien die zelluläre Immunantwort im olfaktorischen Bereich intensiv untersucht haben, verfolgt die vorliegende Studie das Ziel, diesen Prozess mithilfe immunhistochemischer Analysen von Gewebeproben aus der oberen Nasenmuschel verstorbener COVID-19-Patienten zu beleuchten.

1.2 Anatomie und Funktion des olfaktorischen Systems

Die Nasenschleimhaut bildet die innere Auskleidung der Nasenhöhle und erfüllt zentrale Funktionen für das respiratorische System, einschließlich der Befeuchtung, Erwärmung und Reinigung der eingeatmeten Luft (Harkema et al., 2006). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen respiratorischem und olfaktorischem Epithel, die sich in Aufbau und Funktion deutlich voneinander unterscheiden.

Das respiratorische Epithel bedeckt den größten Teil der Nasenhöhle und ist durch Kinozilien tragende Flimmerzellen charakterisiert. Diese Zellen gewährleisten die Entfernung von inhalierten Partikeln, Pathogenen und Schleim aus den Atemwegen (Wanner et al., 1996).

Im Gegensatz dazu befindet sich das olfaktorische Epithel in der *Regio olfactoria* im Nasendach. Dieses spezialisierte Epithel enthält olfaktorische Neurone, die Geruchsstoffe detektieren und Signale über die olfaktorischen Nerven zum *Bulbus olfactorius* (OB) ins Gehirn weiterleiten (Doty, 2009). Die olfaktorischen Nerven bestehen aus mehreren Bündeln, welche in ihrer Gesamtheit den ersten Hirnnerv (*Nervus olfactorius*) bilden (Mori & Sakano, 2011).

Neben diesen Rezeptorneuronen gibt es sustentakuläre Zellen (Stützzellen), die sowohl strukturelle Unterstützung bieten als auch metabolische Funktionen erfüllen. Zusätzlich sind sie an der Entgiftung von potenziell schädlichen Substanzen und am lokalen immunologischen Schutz beteiligt (Morrison & Costanzo, 1992).

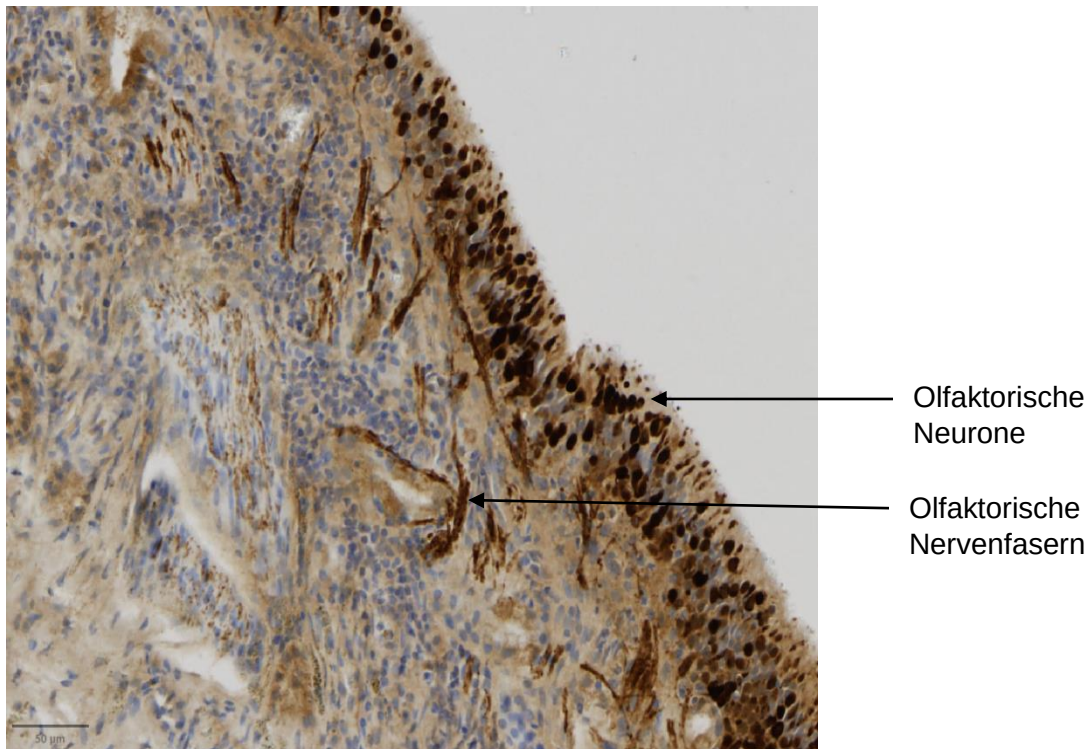


Abbildung 4: Olfaktorisches Epithel in Olfactory Marker Protein (OMP)-Färbung

Neben dem *Nervus olfactorius* trägt der *Nervus trigeminus* zur Wahrnehmung von mechanischen und chemischen Reizen bei, ausgelöst durch irritierende Substanzen, Temperaturveränderungen oder Schmerzempfinden. Diese duale Innervation führt zur kombinierten sensorischen Wahrnehmung im Nasenbereich (Doty, 2009).

1.3 Pathomechanismen von SARS-CoV-2

1.3.1 Zellulärer Eintritt des Virus

SARS-CoV-2 ist ein behülltes Ribonukleinsäure (RNA) -Virus mit zahlreichen Spike-(S)-Proteinen auf seiner Oberfläche, die den Eintritt in menschliche Zellen ermöglichen (Fehr & Perlman, 2015; Laue et al., 2021). Das Spike-Protein besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten. Die S1-Domäne ist für die Bindung an den zellulären Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) -Rezeptor verantwortlich, während die S2-Domäne die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran vermittelt. Der Eintritt in die Wirtszelle erfolgt, indem die S1-Domäne des Spike-Proteins zunächst an den ACE2-Rezeptor bindet. Anschließend erfolgt eine proteolytische Aktivierung des Spike-Proteins durch die transmembrane Serinprotease 2

(TMPRSS2) sowie die Protease Furin (Hoffmann et al., 2020). Furin führt dabei zu einer initialen Spaltung an der S1/S2-Schnittstelle des Spike-Proteins, wodurch die beiden Untereinheiten voneinander getrennt werden und das Spike-Protein bereits in einen aktivierungsbereiten Zustand versetzt wird. Im nächsten Schritt katalysiert die Protease TMPRSS2 eine weitere Spaltung innerhalb der S2-Untereinheit und die Membranfusion zwischen Virus und Zellmembran wird ermöglicht. Die virale RNA gelangt in die Wirtszelle und startet so die Infektion (Hoffmann et al., 2020).

Abbildung 7: Mechanismus des Zelleintritts von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle. Das Spike-Protein von SARS-CoV-2 bindet zunächst an den ACE2-Rezeptor der Wirtszelle. Die nachfolgende Aktivierung und Spaltung des Spike-Proteins durch die zellulären Proteasen TMPRSS2 und Furin ermöglicht es, dass die virale RNA in die Wirtszelle gelangt und so die Infektion startet (Lippi et al., 2020).

Die bisherige Forschung deutete darauf hin, dass die Virusinfektion zunächst im Bereich der sustentakulären Zellen des olfaktorischen Epithels beginnt, da sustentakuläre Zellen besonders hohe Mengen des Eintrittsrezeptors ACE2 exprimieren (S. Chen & Wang, 2023; Khan et al., 2021). Die Infektion der sustentakulären Zellen führt zu einer Störung der epithelialen Struktur und verändert die lokale Mikroumgebung. Diese Schädigung kann die Funktion der olfaktorischen Neurone indirekt beeinträchtigen und zur Ausbildung einer temporären oder persistierenden Anosmie führen (Brann et al., 2020).

Darüber hinaus ist eine Ausbreitung des Virus über olfaktorische oder trigeminale Nerven denkbar. Autopsiestudien haben SARS-CoV-2-RNA in olfaktorischen und trigeminalen Nerven

nachgewiesen, was auf eine mögliche neuronale Verbreitung hindeutet (Ho et al., 2022; Meinhardt et al., 2021).

1.3.2 Immunologische Reaktion und Gewebeschädigung

Nach erfolgter Infektion beeinträchtigt das Virus die Immunantwort der Nasenschleimhaut und führt zu einer verminderten lokalen antiviralen Abwehr und einer erhöhten Inflammation (Hatton et al., 2021; Minkoff & tenOever, 2023; Ziegler et al., 2021).

SARS-CoV-2 beeinträchtigt die antivirale Abwehr, indem es die Typ-I- und Typ-III-Interferonantwort unterdrückt (Hatton et al., 2021; Ziegler et al., 2021). Diese Verzögerung in der Immunantwort begünstigt eine unkontrollierte Virusreplikation und fördert eine überschießende Entzündungsreaktion.

Durch die Aktivierung des Immunsystems kommt es zur Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen, begleitet von einer Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine (Bourgon et al., 2022). Diese Prozesse können das olfaktorische Epithel zusätzlich schädigen. Eine Reduktion zytotoxischer T-Zellen wurde ebenfalls in schweren COVID-19-Fällen beobachtet (Minkoff & tenOever, 2023).

1.3.3 Bedeutung der Anosmie und möglicher Langzeitfolgen

Die Kombination aus direkter viraler Schädigung, immunvermittelter Gewebszerstörung und möglicher neuronaler Invasion bildet die Grundlage für COVID-19-assoziierte Geruchsstörungen. Eine persistierende Anosmie könnte auf eine verzögerte Regeneration oder dauerhafte Schädigung des olfaktorischen Systems zurückzuführen sein (Wellford & Moseman, 2024).

Langfristige neurologische Komplikationen wie kognitive Einschränkungen („Brain Fog“) werden in der aktuellen Forschung zunehmend diskutiert (Song et al., 2021). Es bleibt jedoch unklar, in welchem Ausmaß diese mit der direkten Neuroinvasion oder sekundären Entzündungsprozessen im zentralen Nervensystem zusammenhängen (Ho et al., 2022).

1.4 Angeborene und adaptive Immunantwort bei SARS-CoV-2-Infektion

Virusinfektionen aktivieren typischerweise zunächst die angeborene Immunantwort, gefolgt von der adaptiven Immunantwort. Das angeborene Immunsystem reagiert innerhalb von Minuten bis Stunden. Angeborene Immunzellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen erkennen konservierte virusassoziierte molekulare Muster über Pattern-Recognition-Rezeptoren (z. B. Toll-like-Rezeptoren) und andere Sensoren (Akira et al., 2006). Diese Erkennung führt zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie von Typ-I-Interferonen, welche antivirale

Mechanismen in den infizierten und benachbarten Zellen induzieren. Auf diese Weise verursacht die angeborene Immunantwort eine erste Eindämmung der Virusvermehrung, noch bevor spezifische Lymphozyten aktiviert werden (Chaplin, 2010). Im Verlauf einer Virusinfektion präsentieren antigenpräsentierende Zellen virale Antigene den naiven T-Lymphozyten und initiieren damit die adaptive Immunantwort. Das adaptive Immunsystem, welches innerhalb von Tagen reagiert, ist hochspezifisch gegen das Pathogen und entwickelt ein immunologisches Gedächtnis (Chaplin, 2010). T-Lymphozyten spielen dabei eine Schlüsselrolle. CD4⁺-T-Helferzellen (Cluster of Differentiation 4) beeinflussen die Immunantwort, indem sie Zytokine produzieren, Makrophagen aktivieren und B-Zellen zur Bildung hochaffiner Antikörper anregen. Im Gegensatz dazu erkennen CD8⁺-zytotoxische T-Zellen virusinfizierte Zellen an präsentierten viralen Peptiden (Major Histocompatibility Complex (MHC) -Klasse I) und töten diese gezielt durch Freisetzung zytotoxischer Granula (Perforin, Granzyme) (Akira et al., 2006; Chaplin, 2010). B-Lymphozyten differenzieren sich zu Plasmazellen, welche spezifische Antikörper wie neutralisierende Antikörper gegen das Spike-Protein von SARS-CoV-2 produzieren. Diese Antikörper binden das Virus und verhindern die Infektion weiterer Zellen, wodurch das adaptive Immunsystem wesentlich zur Eliminierung des Virus beiträgt. Nach Abklingen der akuten Infektion persistieren T- und B-Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Exposition eine schnellere Immunantwort ermöglichen.

1.4.1 Die Rolle der Neutrophilen Granulozyten bei SARS-CoV-2-Infektionen

Neutrophile Granulozyten sind wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und reagieren unmittelbar auf virale Infektionen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine ausgeprägte Neutrophilie mit schweren Verläufen von COVID-19 einhergeht (C. Huang et al., 2020; Qin et al., 2020). Frühzeitige klinische Analysen in Wuhan ergaben, dass schwer erkrankte COVID-19-Patienten deutlich höhere Neutrophile Granulozytenzahlen aufwiesen als milde Fälle (C. Huang et al., 2020; Qin et al., 2020). Aktivierte Neutrophile Granulozyten bekämpfen Viren und virusinfizierte Zellen durch Phagozytose, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und proteolytischer Enzyme sowie durch die Bildung neutrophiler extrazellulärer Fallen (Neutrophil Extracellular Traps, NETs). NETs bestehen aus freigesetzter Desoxyribonukleinsäure (DNA), in die antimikrobielle Proteine und Enzyme eingebettet sind. Bei schweren COVID-19-Verläufen wurde eine überschießende NET-Bildung beobachtet, die mit Endothelschädigung und Mikrothrombenbildung assoziiert war (Nicolai et al., 2020; Zuo et al., 2020). Dieses Phänomen trug zur Entwicklung von thromboembolischen Komplikationen und zum akuten Lungenversagen bei. Zudem verstärken Neutrophile durch die Sekretion weiterer Zytokine und Chemokine die Rekrutierung von Immunzellen, was zu einer sich selbst verstärkenden Entzündungsreaktion führt.

1.4.2 Die Rolle von T-Zellen (CD3⁺ und CD8⁺) bei SARS-CoV-2-Infektionen

T-Lymphozyten, gekennzeichnet durch das Oberflächenmolekül CD3 (Cluster of Differentiation 3), sind essenzielle Komponenten der adaptiven Immunantwort gegen SARS-CoV-2. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass eine robuste T-Zellantwort mit einem milderem Krankheitsverlauf und einer effektiven Viruseliminierung einhergeht (Rydzynski Moderbacher et al., 2020; Yang et al., 2024). Insbesondere die zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen (Cluster of Differentiation 8) eliminieren virusinfizierte Zellen direkt und senken somit die Viruslast frühzeitig. Sie können somit die Krankheitsprogression bremsen und sind mit kürzeren Krankenhausaufenthalten assoziiert (Yang et al., 2024). Im Gegensatz dazu sind bei schweren COVID-19 Verläufen verzögerte und funktionell eingeschränkte CD8⁺-T-Zellantworten charakteristisch (L. Gao et al., 2021; Yang et al., 2024). Studien zeigen, dass Patienten mit schwerer SARS-CoV-2-Infektion häufig eine ausgeprägte Lymphopenie aufwiesen (Qin et al., 2020). Zudem wurden in schweren Fällen Zeichen einer T-Zell-Dysfunktion beobachtet, die sich mit einer verzögerten und quantitativ schwachen CD8⁺-Antwort mit geringer Interferon- γ -, Granzyme-B- und Perforin-Produktion äußerte (L. Gao et al., 2021). Diese quantitative und qualitative Beeinträchtigung der T-Zellen trägt wahrscheinlich zur unzureichenden Viruskontrolle und zum schweren Krankheitsverlauf bei. Neben ihrer zytotoxischen Wirkung sind T-Zellen auch für die Regulation der Immunantwort bedeutsam. CD4⁺-T-Helferzellen koordinieren die antivirale Abwehr, indem sie B-Zellen zur Produktion hochaffiner Antikörper anregen und CD8⁺-T-Zellen sowie Makrophagen unterstützen. Eine effektive Zusammenarbeit von T-Zell- und Antikörperantwort ist ein Zeichen milder Krankheitsverläufe (Rydzynski Moderbacher et al., 2020). Interessanterweise korreliert eine starke virus-spezifische T-Zellantwort mit niedrigeren Viruslasten und milderem Symptomen, wohingegen eine Immunantwort, die vorwiegend auf Antikörper ohne adäquate T-Zellhilfe beruht, weniger effektiv in der Virusbekämpfung zu sein scheint (L. Gao et al., 2021; Rydzynski Moderbacher et al., 2020).

1.5 Hämatogene Neuroinvasion und alternative Pathomechanismen

Neben dem nasalen Infektionsweg über das Riechepithel werden weitere Mechanismen einer möglichen Neuroinvasion durch SARS-CoV-2 diskutiert. So könnte das Virus bei bestehender Virämie in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden. Erste pathologische Hinweise hierzu fanden sich bei Varga et al., die virale Partikel sowie eine endotheliale Entzündungsreaktion verschiedener Organe einschließlich zerebraler Blutgefäße nachweisen konnten (Varga et al., 2020). Die Befunde deuten darauf hin, dass SARS-CoV-2 Endothelzellen über den ACE2-Rezeptor infizieren kann und dadurch die integrale Barrierefunktion der BHS stört. Tatsächlich konnte in vitro gezeigt werden, dass SARS-CoV-2 in humane Endothelzellen der Hirnkapillaren eindringt und dieser Prozess durch Antikörper

gegen Spike-Protein, ACE2 oder Neuropilin-1 sowie durch einen TMPRSS2-Inhibitor gehemmt werden kann (Krasemann, Haferkamp et al., 2022). Eine Übersichtsarbeit von Meinhardt et al. kommt zu dem Schluss, dass SARS-CoV-2-bedingte BHS-Schädigungen wahrscheinlich sind und wesentlich zur Neuroinvasion beitragen (Meinhardt et al., 2024). So fanden sich in mehreren Studien erhöhte Konzentrationen von Fibrinogen und anderen Serumproteinen im Hirngewebe COVID-19-Verstorbener, was auf eine Barrierestörung hindeutet (M.-H. Lee et al., 2021). Gleichzeitig wurden aktivierte T-Zellen und Mikroglia nahe hirnversorgender Gefäße beobachtet, was ein Hinweis auf immunvermittelte zentrale Nervensystem (ZNS) -Schäden darstellen könnte (Krasemann, Haferkamp et al., 2022; Robles et al., 2022).

Ein weiterer diskutierter Mechanismus ist der „Trojanische Pferd“-Transport, bei dem infizierte Immunzellen (etwa Monozyten oder T-Lymphozyten) das Virus ins ZNS einschleusen könnten. Zwar repliziert SARS-CoV-2 nicht effizient in peripheren Immunzellen, jedoch wurden virale RNA oder Proteine vereinzelt in patrouillierenden Monozyten sowie im Liquor von Enzephalitis-Patienten gefunden (Moriguchi et al., 2020). Selbst in schweren COVID-19-Fällen gelingt der Nachweis infektiöser Viren im ZNS nur sporadisch. So detektierten Song et al. in Autopsien SARS-CoV-2-RNA in Neuronen, jedoch konnten andere Arbeitsgruppen keine überzeugenden Virusnachweise im Gehirn nachweisen (Meinhardt et al., 2024; Song et al., 2021). Vielmehr scheint SARS-CoV-2 indirekt neurotoxisch zu wirken durch systemische Hyperinflammation, endotheliale Dysfunktion und Mikrothrombosen, die sekundär neuronale Schäden verursachen. Insgesamt ergibt sich das Bild, dass SARS-CoV-2 über Gefäßwege ins ZNS gelangen und dort eine neuroinflammatorische Reaktion hervorrufen kann (Meinhardt et al., 2024; Song et al., 2021).

1.6 Entwicklung bedeutender SARS-CoV-2-Varianten im Pandemie-Verlauf

Seit seiner Identifikation 2019 in Wuhan hat SARS-CoV-2 durch zahlreiche Mutationen verschiedene Varianten entwickelt, die sich in Übertragbarkeit und Immunflucht unterscheiden (Korber et al., 2020). Die erste dominante Variante von SARS-CoV-2 war die D614G-Mutation, die die Infektiosität des Virus erhöhte. Im Herbst 2020 entstand im Vereinigten Königreich die Alpha-Variante (B.1.1.7), die durch die N501Y-Mutation etwa 50 % ansteckender war und eine höhere Mortalität aufwies (Davies et al., 2021). In Südafrika wurde im Mai 2020 die Beta-Variante (B.1.351) identifiziert, deren E484K-Mutation eine Immunflucht ermöglichte, aber keine globale Dominanz erreichte (Tegally et al., 2021). Die Delta-Variante (B.1.617.2), die im Oktober 2020 in Indien entdeckt wurde, führte 2021 durch hohe Viruslast zu schweren Verläufen (Mlcochova et al., 2021). Im November 2021 erschien in Südafrika die Omikron-Variante (B.1.1.529), die mit über 30 Spike-Mutationen Reinfektionen begünstigte, aber mildere Verläufe zeigte (Viana et al., 2022). Seit Herbst 2024 ist die Omikron-Rekombination

XEC in Europa vorherrschend, die allerdings keine gesteigerte Virulenz aufweist (Kaku et al., 2024). Die kontinuierliche Überwachung der Virusmodelle bleibt essenziell, um zukünftige Impfstoffe anzupassen.

2 FRAGESTELLUNGEN

- 1)** In welchen Strukturen und in welcher Intensität lässt sich das SARS-Spike-Protein in der Nasenschleimhaut nachweisen?
- 2)** Wie unterscheidet sich die Verteilung des SARS-Spike-Proteins im olfaktorischen gegenüber dem respiratorischen Epithel?
- 3)** Lässt sich das SARS-Spike-Protein direkt in olfaktorischen und trigeminalen Nerven nachweisen?
- 4)** Wie verhält sich die ACE2-Expression im olfaktorischen und respiratorischen Epithel?
- 5)** Wie verändert sich die Anzahl von CD3⁺-, CD8⁺- und CD68⁺ Zellen bei SARS-CoV-2-Infektion?
- 6)** Finden sich im *Bulbus olfactorius* Nachweise von CD3⁺-, CD8⁺- und CD68⁺ Zellen als Hinweis auf eine SARS-CoV-2-assoziierte Neuroinflammation?
- 7)** Werden Spike-Protein-Signale in Endothelzellen von Arterien und Venen der Nasenschleimhaut nachgewiesen?
- 8)** Welche Unterschiede zeigen die Blutbilder von SARS-CoV-2⁺ gegenüber SARS-CoV-2⁻ Fällen, und spiegeln sich diese Unterschiede auch immunhistochemisch im Gewebe wider?
- 9)** Besteht ein Zusammenhang zwischen der lokalen Immunzellverteilung (CD3⁺, CD8⁺, CD68⁺) und dem Nachweis von SARS-CoV-2-Spike-Protein innerhalb der verschiedenen Gewebestrukturen?
- 10)** Beeinflusst das Obduktionsintervall (Zeitspanne zwischen Tod und Gewebeentnahme) die Nachweisbarkeit von SARS-CoV-2-Spike-Protein sowie die Intensität der ACE2-Expression in den untersuchten Gewebeproben?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientenproben

Die verwendeten Nasenschleimhäute verstorbener Patienten stammen aus Obduktionen der Pathologie des Universitätsklinikums Dresden. Sie umfassen Patienten unterschiedlichen Alters und Geschlechts (s. Tab. 4). Für die, in der Immunhistochemie untersuchten Proben, wurden nur Patienten über 30 Jahre eingeschlossen. Die Obduktionen fanden unter Zustimmung der Ethikkommission der Technischen Universität Dresden (Aktenzeichen BO-EK-175052020) statt. In diesem Zeitraum waren in Deutschland folgende Virusvarianten vorherrschend: Alpha (B.1.1.7) von Januar bis September 2021, Beta (B.1.351) von Januar bis Juli 2021, Gamma (B.1.1.28) von Februar bis Juli 2021, Delta (B.1.617.2) von April 2021 bis März 2022 sowie Omikron (B.1.1.529) ab November 2021.

3.1.1 Probenentnahme

Die Probenentnahme wurde durch geschultes Personal in steriler Umgebung durchgeführt. Zunächst wurde mit einem Knorpelmesser die Haut zwischen Ohrmuschel, *Processus mastoideus* und *Protuberantia occipitalis externa* auf beiden Seiten durchtrennt. Anschließend konnte die Kopfschwarte über das Gesicht gezogen werden, um den Schädel mit einer Knochensäge zu eröffnen. Die Schädelkalotte, das Gehirn und der *Bulbus olfactorius* wurden entfernt und die *Lamina cribrosa ossis ethmoidalis* mit einem Osteotom und einem Hammer herausgemeißelt. Die Sicht auf die Nasenschleimhaut und insbesondere auf die obere Nasenmuschel war freigelegt (s. Abb. 4). Aus dem Bereich der oberen Nasenmuschel wurde eine Gewebeprobe entnommen.

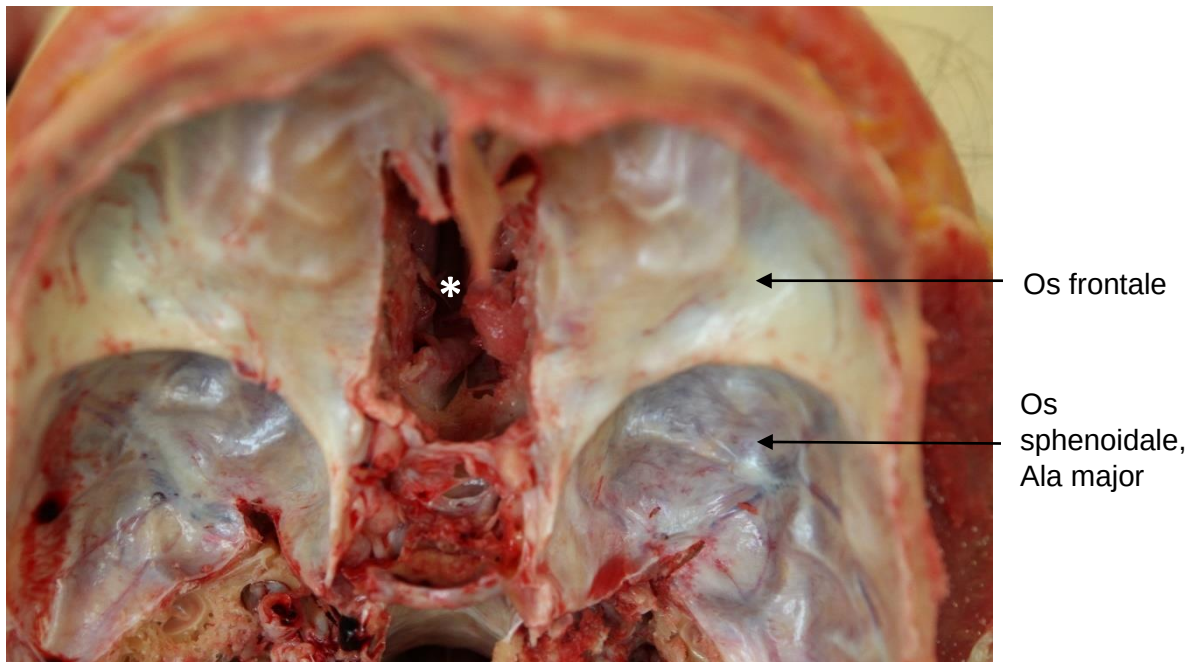


Abbildung 10: Sicht auf die Schädelbasis von innen (*Basis cranii interna*) mit Probenentnahme aus der oberen Nasenmuschel (*Concha nasalis superior*)

* herausgemeißelte *Lamina cribrosa* und Sicht auf die obere Nasenhöhle

3.1.2 Gewebeaufbereitung

Die entnommenen Gewebeproben wurden zunächst in 4 % Formalin bei Raumtemperatur über Nacht fixiert. Am nächsten Tag entkalkte man die Proben bei Raumtemperatur mit Osteosoft für mindestens 24 h bis maximal 72 h, je nach Entkalkungszustand. Anschließend wurde die Gewebereinbettung durchgeführt. Hierzu wässerte man die Gewebeprobe gründlich in einer Instrumentenschale und tauchte sie in 70 % Alkohol, um alle Säurereste zu entfernen. Anschließend wurden die Proben in einen Gewebereinbettungsautomaten überführt und das Knocheneinbettungsprogramm (s. Tab. 5) gestartet. Nach dem Aushärten des Paraffins lagen die Proben mit individueller Kennzeichnung als Paraffinblock vor.

3.1.3 Herstellung von humanen Gewebeschnitten

Am Rotationsmikrotom (Leica Jung RM 2065) wurde aus jedem Paraffinblock eine Schnittserie angefertigt. Diese umfasste immer 20 bis 30 Schnitte mit einer Gewebedicke von 5 µm. Die Schnitte wurden zunächst für 1 min in ein kaltes Wasserbad und anschließend, für eine vollständige Glättung, in ein warmes Wasserbad für 2 min übertragen. Pro Objektträger wurde, aufgrund der Größe der Präparate, ein Gewebeschnitt aufgezogen und anschließend bei einer Temperatur von 37,5 °C für 24 h in einer Trockenkammer getrocknet.

3.2 Histologische und immunhistochemische Verfahren

3.2.1 Färbungen

Alle Färbungen wurden nach einem festgelegten Färbeprotokoll bearbeitet (s. Abb. 5). Insgesamt wurden 65 Proben gewonnen: 42 von SARS-CoV-2-infizierten (SARS-CoV-2⁺) und 23 von Verstorbenen ohne SARS-CoV-2 Nachweis (SARS-CoV-2⁻). Der Infektionsstatus wurde zunächst klinisch per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt. Anschließend erfolgte ein Screening aller Proben auf vorhandenes Epithel mittels routinemäßiger Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) jedes 10. Schnitts. Die verbliebenen 34 Proben wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Olfactory Marker Protein (OMP) und β -Tubulin untersucht, um olfaktorisches Epithel (OE) nachzuweisen. Dadurch schieden 51 Proben aus. Zur Bestätigung einer akuten Infektion wurden schließlich alle Präparate auf das SARS-CoV-2-Spike-Protein getestet, was final zu 10 SARS-CoV-2⁺- und 4 SARS-CoV-2⁻-Proben führte. Alle 14 Endproben wurden außerdem auf die Immunmarker CD3, CD8, CD68 (Cluster of Differentiation 68) und den Eintrittsrezeptor ACE2 untersucht (s. Abb. 5). Bemerkenswert ist, dass bei 4 klinisch getesteten PCR-negativen Verstorbenen eine positive Spike-Protein-Reaktion nachgewiesen wurde. Daher erfolgte die endgültige Gruppeneinteilung auf Basis der immunhistochemischen Ergebnisse.

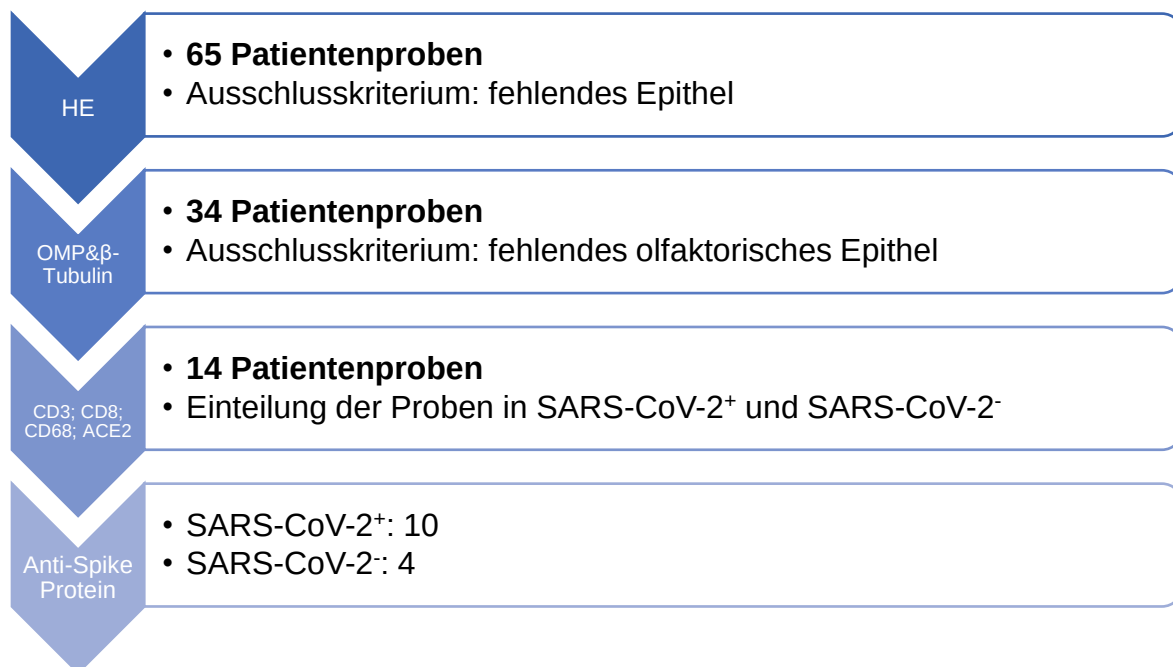


Abbildung 13: Färbeprotokoll der zu untersuchenden Gewebeproben

Es wurde bei jeder immunhistochemischen Reaktion sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt, sodass die einzelnen Färbungen jeweils einen Abstand von 10 µm aufweisen. Im Gegensatz zu den Positivkontrollen wurde bei den Negativkontrollen der primäre Antikörper weggelassen. Die Immunhistochemische Färbung erfolgte auf dem gesamten Objektträger.

3.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die H.E.-Färbung ist eine häufig verwendete Methode zur Färbung von mikroskopischen Gewebeproben, besonders tierischer Herkunft. Bei diesem Verfahren wird Hämatoxylin verwendet, um saure Zellstrukturen wie DNA und RNA in einem blau-violetten Farbton einzufärben. Hämatoxylin kann in wässriger Lösung mit Metallionen Chelate bilden, die tief blauviolett sind. Diese Chelate werden von sauren Zellstrukturen selektiv gebunden. Eosin dient als Gegenfärbung und färbt basische Elemente wie rote Blutkörperchen, Zellplasma, Muskeln und Kollagen in verschiedenen Schattierungen von Rosa, Orange und Rot ein. Die chemische Anziehung zwischen den Geweben und den Farbstoffen ermöglicht es, einen deutlichen Kontrast zwischen basophilen (kernhaltigen) und azidophilen (zellplasmareichen) Strukturen in den mikroskopischen Gewebebildern zu erzeugen (Giri, 2018; Sauermost & Freudig, 2018).

Die H.E.-Übersichtsfärbung wurde als erste Färbung auf sämtlichen Gewebeschnitten angewendet, um einen Überblick darüber zu erhalten, ob OE oder RE vorhanden ist. Gewebe, die kein Epithel aufwiesen, wurden in diesem Stadium nicht weiterverarbeitet. Die H.E.-Schnitte wurden innerhalb der Schnittserie in einem Abstand von jeweils 50 µm angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden zuerst gemäß einem festgelegten Verfahren (s. Tab. 6) von Paraffin befreit. Danach wurden sie gemäß dem H.E.-Färbeprotokoll (s. Tab. 7) weiterverarbeitet und schließlich mit DePeX versiegelt. Eventuell verbliebene Luftblasen wurden sorgfältig entfernt.

3.2.3 Immunhistochemische Verfahren

Die Immunhistochemie nutzt die spezifische Bindung von Antikörpern an Epitope in Antigen-Antikörper-Reaktionen. Die Anwendung beginnt mit einem mono- oder polyklonalen Primärantikörper auf den Proben. Ein darauffolgender artfremder Sekundärantikörper zielt auf die Fc-Fragmente (Fragment crystallizable) des Primärantikörpers ab, um die Nachweisempfindlichkeit zu steigern. Durch Markierung des Sekundärantikörpers mit Biotin (Vitamin H) und dessen Affinität zu Avidin, einem Glykoprotein aus Hühnereiweiß, erhöht sich die Sensitivität durch die hohe Anzahl an bindenden Markern (s. Abb. 6). Die Hinzugabe einer Peroxidase ermöglicht die Umwandlung des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in ein sichtbares braunes Präzipitat. Zur Vermeidung von Hintergrundfärbungen kamen

verschiedene Techniken zum Einsatz, darunter die Verwendung von Normalserum zur Reduzierung hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkungen. Die Verwendung von Mikrowellenhitze zur Demaskierung der Präparate ist ein wichtiger Schritt, um die Antigene für die Antikörper zugänglich zu machen. Diese Behandlung erhöht die Permeabilität des Gewebes, was die Bindung der Antikörper erleichtert, und die Sensitivität des Tests steigert. Darüber hinaus spielt die gezielte Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität eine zentrale Rolle, um unerwünschte Hintergrundfärbungen zu minimieren und die Spezifität des Nachweises zu verbessern. Diese Schritte ermöglichen die präzise Detektion von spezifischen Antigenen in Gewebeproben (Hantschke & Palmedo, 2016; Lang, 2006).

Abbildung 14: Avidin-Biotin-Komplex. Der primäre Antikörper (blau) bindet an ein Antigen (schwarz). An den primären Antikörper bindet wiederum ein Sekundärantikörper (gelb), an welchen viele Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe binden (Hantschke & Palmedo, 2016).

Alle durchgeführten immunhistochemischen Färbungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die für die Reaktionen benötigten Puffer wie die Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), der Zitratpuffer und der TRIS-EDTA (Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Ethylendiamintetraessigsäure) Puffer sind in Tabelle 2 beschrieben.

3 MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2: Immunhistochemische Färbungen

MAK- Monoklonaler Antikörper; PAK- Polyklonaler Antikörper

min- Minuten; W- Watt

1. Antikörper (hergestellt in)	MAK / PAK	Hersteller (Bestell- nummer)	Ver- dünnung	2. Antikörper (hergestellt in)	Puffer	Vorbe- handlung mittels Mikrowelle
OMP (rabbit)	PAK	Sigma-Aldrich (O7889) Source:000008 9736 Batch: 0000099179	1:6000	Goat Anti- Rabbit IgG VEC-BA-1000 Dil.: 1:200	TRIS- EDTA	5 min 600W 5 min 80W
β-Tubulin (mouse)	MAK	BioLegend (MMS-435P) Lot: B272898	1:1000	Goat Anti- Mouse IgG VEC-BA-9200 Dil.: 1:200	TRIS- EDTA	5 min 600W 5 min 80W
CD3 (rat)	MAK	ABCAM (ab11089) Lot: GR3386371-2	1:250	Goat Anti-Rat IgG VEC-BA-9400 Dil.: 1:200	TRIS- EDTA	5 min 600W 5 min 80W
CD8 (mouse)	MAK	ABCAM (ab17147) Lot: GR3419008-1	1:100	Goat Anti- Mouse IgG VEC-BA-9200 Dil.: 1:200	TRIS- EDTA	5 min 600W 5 min 80W
CD68 (mouse)	MAK	ABCAM (ab955) Lot: GR3380470-15	1:500	Goat Anti- Mouse IgG VEC-BA-9200 Dil.: 1:200	TRIS- EDTA	5 min 600W 5 min 80W
ACE2 (rabbit)	PAK	ABCAM (ab15248) Lot: GR3351609-1	1:4000	Goat Anti- Rabbit IgG VEC-BA-1000 Dil.: 1:200	Zitrat	5 min 600W 5 min 80W
Anti-SARS spike glycoprotein antibody (mouse)	MAK	ABCAM (ab272420) Lot: GR3337086-8	1:100	Goat Anti- Mouse IgG VEC-BA-9200 Dil.: 1:200	Zitrat	5 min 600W 5 min 80W

Tabelle 5: Puffer für die Immunhistochemischen Färbungen

PBS- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Puffer	Chemikalien	Zusatzinformationen/ Hersteller
Zitratpuffer pH= 6,0	Stammlösung A: Zitronensäure- Monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 10,505g + 500ml Aqua Dest. (Aqua destillata) Stammlösung B: Natriumzitrat- Dihydrat ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) 14,705g + 500ml Aqua Dest.	Merck CAS: 5949-29-1 VWR Chemicals BDH CAS: 0132-04-3
Herstellung:	Stammlösung A 15ml + Stammlösung B 85ml 1:10 mit Aqua Dest. verdünnen pH- Wert auf 6,0 einstellen	
TRIS- EDTA Puffer pH= 9,0	1) EDTA- Dinatriumsalzdihydrat ($Na_2C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot 2H_2O$) 2) TRIS- Hydrochlorid ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$)	Carl Roth CAS: 6381-92-6 Carl Roth CAS: 1185-53-1
Herstellung:	6,05g TRIS + 1,85g EDTA-Salz + 5000ml Aqua Dest. pH- Wert auf 9,0 einstellen	
PBS-Puffer pH= 7,4	1 PBS-Tablette + 500ml Aqua Dest. pH- Wert auf 7,4 einstellen	Gibco 10010056

Im Folgenden werden nun die einzelnen immunhistochemischen Reaktionen beschrieben. Jeder immunhistochemische Durchgang beinhaltet einen Zeitraum von 2 Tagen. Es wurde darauf geachtet, dass Positiv- und Negativkontrollen stets separat in unterschiedlichen Küvetten behandelt wurden.

Am ersten Tag wurden die Paraffinschnitte gemäß dem festgelegten Verfahren, das in Tabelle 6 beschrieben ist, von Paraffin befreit, wie zuvor bei der H.E.-Färbung. Danach wurden sie in eine Plastikkuvette überführt, welche entweder mit Zitratpuffer oder TRIS-EDTA Puffer

gefüllt war. Die Proben wurden für 5 min bei 600 W und dann für weitere 5 min bei 80 W erhitzt, um sie zu denaturieren. Nach der Denaturierung wurden die Proben passiv für 15 min mit fließendem Wasser abgekühlt.

Anschließend wurden die Objektträger dreimal jeweils 5 min lang mit PBS gewaschen. Der nächste Schritt umfasste den Peroxidase Block: Eine Mischung aus 1 ml H₂O₂ und 99 ml PBS wurde in die Küvette mit den Proben gegeben. Die Proben wurden dann abgedeckt, um UV-Schutz zu gewährleisten, und für 30 min langsam auf dem Laborschüttler rotiert. Nach dem Peroxidase Block wurden die Proben erneut dreimal jeweils 5 min lang mit PBS gewaschen.

Daraufhin wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch die Verwendung von 5 % Normal Goat Serum (NGS) blockiert. Die Proben wurden für 60 min in einer Feuchtkammer gelagert. Als letzter Schritt wurde der Primärantikörper gemäß der spezifischen Verdünnung aus Tabelle 1 aufgetragen. Bei den Negativkontrollen wurde das NGS auf den Proben belassen. Schließlich wurden die Proben über Nacht im Kühlschrank (4 °C) innerhalb der Feuchtkammer gelagert. Die restlichen Schritte fanden bei Raumtemperatur statt.

Am zweiten Tag wurden die Proben zunächst drei Mal á 5 min mit PBS gewaschen und anschließend der sekundäre Antikörper passend zum primären Antikörper (s. Tab. 1) aufgetragen. Es folgte eine 60 min Inkubation in der Feuchtkammer. Anschließend wurde wieder dreifach mit PBS gewaschen und daraufhin der Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex) in einer Verdünnung von 1:50 mit PBS aufgetragen. Es folgte wieder eine 60 min Inkubation in der Feuchtkammer gefolgt von 3-maligen Waschen mittels PBS. Als letzter Schritt wurde unter dem Abzug DAB (1:50) gelöst in DAB-Substratpuffer auf die Schnitte aufgetragen und für 7 min auf den Proben belassen. Anschließend wurden die Proben noch kurz in Leitungswasser getaucht und 5 min in einer Küvette mit Aqua Dest. (Aqua destillata) belassen, um das restliche DAB abzulösen. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurden die Proben noch 10 s mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und 10 min unter laufendem Wasser belassen. Analog zum H.E.-Färbeprotokoll (s. Tab. 7) erfolgte die Dehydratation schrittweise über die aufsteigende Alkoholreihe bis hin zum Xylol. Die Proben wurden schließlich mit DePeX versiegelt. Eventuell verbliebene Luftblasen wurden sorgfältig entfernt.

3.2.3.1 Anti-Olfactory Marker Protein (OMP)-Antikörper

OMP ist ein spezifischer molekularer Marker für reife olfaktorische Neurone. Mit einem Molekulargewicht von 19 kDa zeigt das Protein eine gewebespezifische Verteilung in verschiedenen Wirbeltierregionen (Farbman et al., 1998; Farbman & Margolis, 1980; Keller & Margolis, 1975; Monti-Graziadei et al., 1977). OMP spielt somit eine entscheidende Rolle in der histologischen Unterscheidung zwischen olfaktorischem (OMP⁺) und respiratorischem (OMP⁻) Epithel, sowie der Unterscheidung zwischen olfaktorischen (OMP⁺/ β -Tubulin⁺) und

trigeminalen ((OMP⁺/ β -Tubulin⁺) Nerven (Holbrook et al., 2016). Die Regulationsfunktion von OMP in olfaktorischen Neuronen ist komplex und vielschichtig (Dibattista et al., 2021; Hartman & Margolis, 1975; Menco, 1989; Weiler et al., 1999). Im Jahr 2021 wurde die Signalübertragung in Riechzellen genauer untersucht. Dabei zeigten Forscher, wie OMP die cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) -Dynamik moduliert und so die Präzision der Geruchswahrnehmung beeinflusst (Boccaccio et al., 2021). Interessanterweise wurde seine Expression nicht nur in klassischen olfaktorischen Systemen, sondern auch in vomeronasalen Rezeptorneuronen von Säugetieren, im vorderen Septumbereich des menschlichen Gewebes und im Zellkern nachgewiesen (Farbman & Margolis, 1980; Gebhart et al., 2019; Koo et al., 2004). Die Funktionsmechanismen von OMP übersteigen die ursprüngliche Annahme eines reinen Reifemarkers. Studien demonstrierten die Präsenz von OMP-positiven Zellen in diversen Geweben, darunter das zentrale Nervensystem, der Hypothalamus sowie nicht-olfaktorische Bereiche wie Herz, Blase und Schilddrüse von Mäusen (Baker et al., 1989; Kang et al., 2015; Koo et al., 2005). Diese Beobachtungen deuten auf potenzielle Verbindungen zwischen neuralem und endokrinem System hin.

3.2.3.2 Purified anti-Tubulin β 3 (TUBB3)-Antikörper

β -Tubulin ist ein Protein, das als molekularer Marker für die neuronale Differenzierung und Reifung dient. Es ist mit einer ungefähren Größe von 50 kDa ein Bestandteil der Mikrotubuli, welche wichtig für den Aufbau des Zytoskeletts von Zellen sind und zusätzlich den axonalen Transport unterstützen. β -Tubulin und seine Isoform (TUBB3) sind dabei spezifisch in postmitotischen Neuronen nachweisbar und werden insbesondere zur Unterscheidung zwischen neuronalen und nicht neuronalen Gewebe eingesetzt (Joshi & Cleveland, 1989; Katsetos et al., 2003; M. K. Lee et al., 1990; Sullivan & Cleveland, 1986). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass β -Tubulin eine wichtige Rolle bei der Regeneration nach neuronalen Schädigungen spielt (Tischfield et al., 2010).

3.2.3.3 Anti-CD3 [CD3-12]-Antikörper

CD3 ist ein Oberflächenprotein aller T-Lymphozyten und spielt eine zentrale Rolle in der menschlichen Immunantwort. Das CD3-Protein ist Teil des T-Zell-Rezeptor Komplexes und besteht aus den Untereinheiten CD3 γ , CD3 δ , und CD3 ϵ . Somit ist es für die Signaltransduktion bei der Aktivierung von T-Zellen essenziell (Clevers et al., 1988; van Dongen et al., 1987). Weiterhin dient es als zuverlässiger Marker in der Immunhistochemie zur Identifikation und Isolierung von T-Zellen (Mason et al., 1989). Studien zur CD3-Expression zeigten, dass Mutationen oder Dysregulationen mit immunologischen Defekten oder Fehlfunktionen des Immunsystems assoziiert sein können (Saint Basile et al., 2004; Soudais et al., 1993). Forschungsergebnisse zeigten, dass die nasale Verabreichung von Foralumab, einem anti-

CD3 monoklonalen Antikörper, die entzündliche T-Zell-Antwort bei COVID-19-Patienten abschwächte und die Lungenentzündung reduzierte (Moreira et al., 2021).

3.2.3.4 Anti-CD8 alpha [C8/144B]-Antikörper

CD8 ist ein wichtiges Oberflächenprotein, das vor allem auf zytotoxischen T-Lymphozyten vorkommt. Diese Zellen erkennen und zerstören gezielt infizierte oder entartete Zellen. CD8 besteht aus den Untereinheiten CD8 α und CD8 β , die zusammen den T-Zell-Rezeptorstabilisieren. Dies ermöglicht es den T-Zellen, Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu erkennen und somit eine zentrale Rolle in der menschlichen Immunantwort zu spielen (Li et al., 2013; Mason et al., 1992; R. Wang et al., 2009). Weiterhin dient CD8 als zuverlässiger Marker in der Immunhistochemie zur Identifikation und Isolierung von zytotoxischen T-Zellen (Mason et al., 1992; Whiteland et al., 1995). CD8⁺-T-Zellen spielen auch eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen SARS-CoV-2. Schwere COVID-19-Verläufe zeigten oft reduzierte CD8⁺-T-Zell-Zahlen und eine proinflammatorische TEMRA-Population (Terminal Effector Memory T-cells re-expressing CD45RA), die Gewebeschäden fördern kann (Paniskaki et al., 2023; Yan et al., 2021). Gleichzeitig ermöglichen CD8⁺-T-Zellen durch ihre Gedächtnisfunktionen die Erkennung bereits bekannter Epitope bei Virusvarianten. CD8⁺-T-Zellen sind somit ein wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunität (Minervina et al., 2021; Redd et al., 2021). Diese Eigenschaften machen CD8⁺-T-Zellen zu einem zentralen Ziel für therapeutische Ansätze bei COVID-19 (Y. Chen et al., 2024).

3.2.3.5 Recombinant Anti-CD68 [KP1]-Antikörper

CD68 ist ein stark glykosyliertes Zelladhäsionsmolekül, das primär in Makrophagen und anderen mononukleären Phagozyten exprimiert wird. Es zählt zur Familie der lysosomalen assoziierten Membranproteine (LAMPs) und spielt eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Antigenen sowie der Entfernung apoptotischer Zellen (Chistiakov et al., 2017). Die Expression von CD68 wird durch eine komplexe Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren, regulatorischen Elementen und epigenetischen Mechanismen gesteuert (O'Reilly et al., 2003). In der Immunhistochemie ist CD68 ein verlässlicher Marker zur Identifikation von Makrophagen/Monozyten und deren gewebsspezifischen Subtypen wie Kupffer-Zellen, Osteoklasten und Mikroglia (McCluggage & Maxwell, 1999). Darüber hinaus kann CD68 helfen infektiöse, entzündliche oder neoplastische Prozesse zu erkennen, die mit einer abnormen Proliferation oder Aktivität von Makrophagen verbunden sind (Manduch et al., 2009). CD68 wird allerdings nicht ausschließlich in Makrophagen exprimiert, sondern wurde auch in anderen Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen beobachtet (Beranek, 2005; Gottfried et al., 2008; Kunisch et al., 2004). Im Zusammenhang mit COVID-19 spielt CD68 eine bedeutende Rolle. Studien zeigten, dass CD68⁺-Makrophagen in verschiedenen Geweben

von COVID-19-Patienten vermehrt vorkamen und mit der Schwere der Erkrankung korrelierten. Zum Beispiel wurden erhöhte CD68⁺-Makrophagen im gastrointestinalen Gewebe von Patienten mit gastrointestinalen Symptomen nach COVID-19 festgestellt (Xian et al., 2024). Die Studie von Suades et al. (2024) untersuchte die Rolle zirkulierender extrazellulärer Vesikel, einschließlich solcher, die von CD68⁺-Makrophagen stammten, bei COVID-19. Es zeigte sich, dass die Konzentration und die Zusammensetzung dieser Vesikel während einer akuten Infektion erhöht waren und nach der Genesung wieder auf normale Werte zurückkehrte (Suades et al., 2024).

3.2.3.6 Anti-ACE2-Antikörper

ACE2 ist ein Transmembranprotein, das eine zentrale Rolle in der Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt. Es handelt sich um eine Zink-Metalloprotease, die Angiotensin II in Angiotensin-(1–7) umwandelt. Dieses Produkt wirkt antagonistisch zu Angiotensin II, indem es Gefäßrelaxation fördert, Entzündungen hemmt und antifibrotisch wirkt (Turner, 2015). Die Expression von ACE2 wird sowohl transkriptionell als auch posttranslational reguliert, etwa durch Metalloproteasen wie ADAM17, die ACE2 durch Ektodomain-Shedding freisetzen können (Lambert et al., 2005). Weiterhin ist es für die Entwicklung therapeutischer Ansätze relevant, da ACE2-Agonisten und lösliche Formen des Proteins zur Behandlung von Herz-Kreislauf- und fibrotischen Erkrankungen untersucht werden (South et al., 2020). Die Forschung zeigt außerdem, dass ACE2 eng mit anderen Proteinen wie TMPRSS2 interagiert, das eine Rolle bei der posttranslationalen Verarbeitung spielt (Hoffmann et al., 2020). Im Kontext von COVID-19 hat es besondere Bedeutung erlangt, da es als Eintrittsrezeptor für SARS-CoV-2 dient. Das Spike-Protein des Virus bindet an ACE2 und ermöglicht so das Eindringen in Wirtszellen, vor allem in den Atemwegen, aber auch in anderen Geweben mit hoher ACE2-Expression, wie im Magen-Darm-Trakt, in den Nieren und im Gefäßendothel (Hamming et al., 2004; Hikmet et al., 2020). Diese Bindung führt nicht nur zur Infektion, sondern beeinflusst auch die physiologischen Funktionen von ACE2. Durch die Bindung des Virus wird ACE2 herunterreguliert, was die schützende Umwandlung von Angiotensin II in Angiotensin-(1–7) reduziert. Dies begünstigt Entzündungen, Fibrose und Gefäßverengung, was die Pathogenität von COVID-19 verschärft (South et al., 2020). Therapeutische Ansätze wie die Verwendung löslicher ACE2-Formen oder Inhibitoren, die die Interaktion von ACE2 mit TMPRSS2 blockieren, bieten vielversprechende Möglichkeiten, die Virusaufnahme zu verhindern und schwere Krankheitsverläufe zu mildern (Abd El-Aziz et al., 2020; Hoffmann et al., 2020; Hofmann et al., 2005).

3.2.3.7 Anti-SARS spike glycoprotein [3A2]-Antikörper

SARS-CoV-2 gehört zur Familie der Coronaviren und ist ein behülltes Einzelstrang-RNA-Virus. Sein Genom kodiert für mehrere strukturelle Proteine, darunter das Spike-Protein, das Nukleokapsid-Protein, das Membran-Protein und das Hüll-Protein. Das Spike-Protein fungiert dabei als Eintrittspunkt des Virus in die Wirtszellen und wird in zwei funktionelle Untereinheiten, S1 und S2, unterteilt. Die S1-Domäne bindet über ihre Rezeptorbindungsdomäne (RBD) an den ACE2-Rezeptor der Wirtszellen und initiiert so die Infektion. Die S2-Domäne vermittelt dagegen mithilfe der Wirtsproteasen TMPRSS2 und Furin die Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran, wodurch die virale RNA in die Zelle freigesetzt wird (Bestle et al., 2020; Hoffmann et al., 2020; Ou et al., 2020; Takeda, 2022). Zusätzlich kann das Virus über alternative Rezeptoren wie Neuropilin-1 (NRP1) oder Integrine in Zellen eindringen, wodurch der Tropismus, also die Fähigkeit von SARS-CoV-2 in verschiedene Gewebe einzudringen, erweitert wird (Daly et al., 2020; J. Liu et al., 2022). Diese zusätzlichen Mechanismen werden besonders in Geweben relevant, in denen ACE2 niedrig exprimiert ist, wie beispielsweise im olfaktorischen Epithel (Daly et al., 2020). Darüber hinaus tragen Mutationen, wie die P681R-Mutation in der Delta-Variante, zu einer erhöhten Spaltungsfähigkeit des Proteins bei und beeinflussen die Infektiosität sowie die Pathogenität des Virus (Takeda, 2022). In der Immunhistochemie wird das Spike-Protein als Ziel für die Detektion von SARS-CoV-2 in Gewebeproben verwendet. Studien haben gezeigt, dass immunhistochemische und in situ Hybridisierungsansätze das Spike-Protein zuverlässig in Autopsieproben, wie Lunge, Niere und Plazenta, nachweisen konnten, was eine präzise Analyse der Virusverteilung und der betroffenen Gewebe ermöglichte (Best Rocha et al., 2020; Stillfried & Boor, 2021). Der verwendete monoklonale Antikörper 3A2 von Abcam wurde speziell gegen das Spike-Glykoprotein von SARS-CoV entwickelt. Obwohl er laut Herstellerangaben nicht für den spezifischen Nachweis von SARS-CoV-2 oder MERS-CoV empfohlen wird, zeigte er in den durchgeführten immunhistochemischen Analysen plausible und spezifische Signale (Meinhardt et al., 2021). Für andere Anwendungen wie der Immunzytochemie (ICC) und dem Western Blot (WB) wird der Antikörper hingegen nicht empfohlen.

3.2.4 Visualisierung der histologischen Färbungen

Für die Dokumentation von durchlichtmikroskopischen Bildern kam am LMF CMCB Dresden (Light Microscopy Facility am Center for Molecular and Cellular Bioengineering Dresden) ein AxioScanZ.1 Mikroskop von ZEISS (Version 3.5) mit einem 20-fachen Objektiv zum Einsatz. Negative Kontrollbilder wurden mit einem Zeiss Scope A1 Mikroskop aufgenommen, das mit einer AxioCam 503 Farbkamera ausgestattet war. Die Aufnahme und Dokumentation der Bilder erfolgte mithilfe der Zeiss ZEN 3.1 blue Software. Die Visualisierung und Bearbeitung der

Bilder wurden anschließend in GIMP (Version 2.10.36) durchgeführt, während die Färbung der Epithelien in Adobe Photoshop (Version 23.1.0) vorgenommen wurde.

3.2.5 Grafische Auswertung der Färbungen

Die IHC-Bilder wurden mittels der Software QuPath (Version 0.4.4, Copyright 2018–2022, QuPath developers, The University of Edinburgh) analysiert. Zunächst wurden die gesamten Slides gesichtet, um positiv gefärbte Bereiche im olfaktorischen Epithel zu identifizieren. Für jeden positiv gefärbten Bereich wurden entsprechende Bereiche im respiratorischen Epithel markiert. Die Länge der Epithelien wurde gemessen, und die Anzahl positiver Zellen pro 100 μm Epithel wurde berechnet. Für jede Probe wurden im Durchschnitt $4,86 \pm 2,49$ Bereiche für das OE und $4,00 \pm 1,13$ Bereiche für das RE analysiert. Die Ergebnisse wurden anschließend in Histogrammen dargestellt, um eine visuelle Auswertung der Zellverteilung zu ermöglichen.

3.2.6 Statistische Auswertung der Färbungen

Die statistische Analyse wurde mithilfe von IBM SPSS Statistics (Version 28.0.1.0) durchgeführt. Zunächst wurde die Homogenität der Gruppen hinsichtlich Alter und Länge des OE überprüft. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße der SARS-CoV-2-Gruppe konnte jedoch der Shapiro-Wilk-Test für den Vergleich der Normalverteilung nicht angewendet werden. Um die Effekte der positiv gefärbten Zellen pro 100 μm Epithel oder pro mm^2 zu vergleichen, wurde ein allgemeines lineares Modell eingesetzt. Ergänzend dazu wurden mehrere ungepaarte t-Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf $\alpha < 0,05$ gesetzt. Die Datenvisualisierung erfolgte in GraphPad Prism (Version 10.1.2 (324)), und alle Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Olfaktorische Mukosa und Nervengewebe

Um die Immunantwort auf SARS-CoV-2 zu analysieren, wurden die systemischen Immunreaktionen der Patienten vor ihrem Tod untersucht. Hierzu wurden retrospektiv die Ergebnisse der Blutanalysen während der Krankenhausaufenthalte gesammelt und analysiert (s. Tab. 3). Da nicht alle Daten verfügbar waren, konnte nur ein Patient in die SARS-CoV-2-Gruppe aufgenommen werden. Aufgrund dessen konnte hierfür keine statistische Analyse durchgeführt werden.

Im Vergleich zu den Blutreferenzwerten (bereitgestellt durch die Universitätsklinik Carl Gustav Carus der TU Dresden) zeigte die SARS-CoV-2⁺-Gruppe erhöhte mittlere Werte an neutrophilen Granulozyten (24,14 GPt/L) und C-reaktivem Protein (57,81 mg/L). Die erhöhten CRP-Werte waren durch die letalen Komplikationen erklärbar, einschließlich eines septischen Multiorganversagens, einer COVID-19-Pneumonie, einer Hypoxie, eines septischen kardiovaskulären Versagens und intrazerebraler Blutungen (s. Tab. 9). Auffällig war zudem eine verringerte mittlere Konzentration der Lymphozyten (relative Lymphopenie) im Blutbild, mit einem Wert von 10,57 %.

Tabelle 7: Deskriptive Statistik der Studiengruppen

	SARS-CoV-2 ⁺ (3♀, 7♂)					SARS-CoV-2 ⁻ (3♀, 1♂)				
	<i>n</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>SD</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>	<i>n</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>SD</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>
Alter [Jahre]	10	78.5	12.55	94	58	4	73.5	12.66	85	56
Gewicht [kg]	10	63.1	12.94	83	47	4	77.5	16.86	92	54
Tage zwischen Tod und Autopsie	10	4.8	5.33	19	1	4	4.25	2.5	7	1

Blut Parameter

<i>Leukozyten [GPt/L]</i>	8	8.19	5.22	17.69	1.05	2	8.61	3.87	11.35	5.87
<i>Neutrophile Granulozyten [%]</i>	5	77.76	11.99	91.4	66.8	1	48.7	-	-	-
<i>Neutrophile Granulozyten [GPt/L]</i>	5	24.12↑	37.96	91.4	2.82	1	5.53	-	-	-
<i>Lymphozyten [%]</i>	6	10.57↓	4.24	15.4	5.3	1	43.7	-	-	-

4 ERGEBNISSE

<i>Lymphozyten [Gpt/L]</i>	6	3.14	6.25	15.89	0.16	1	4.96↑	-	-	-
<i>Monozyten [%]</i>	6	8.83	8.09	21.8	1	1	6.3	-	-	-
<i>Monozyten [Gpt/L]</i>	6	0.82	0.76	2.1	0.01	1	0.71	-	-	-
<i>C-reaktives Protein [mg/L]</i>	8	57.81↑↑	74.76	211	1.6	3	3.33↑	1.72	5.3	2.1

Fettgedruckte Zahlen kennzeichnen Werte außerhalb der Referenzbereiche

Abkürzungen:

n: Anzahl der Patienten

SARS-CoV-2⁺: bestätigte Infektion mit COVID-19

SARS-CoV-2⁻: Kontrollgruppe

Die Proben der Nasenschleimhaut wurden immunhistochemisch untersucht, um lokale immunologische Veränderungen zu analysieren. Repräsentative Bilder des OE und des RE mit Nachweisen für OMP, CD3, CD8 und CD68 sind in Abbildung 7A–H für die SARS-CoV-2⁻-Gruppe und in Abbildung 8A–D für die SARS-CoV-2⁺-Gruppe dargestellt. Abbildung 8A zeigt dabei den Übergang zwischen den beiden Epitheltypen. Anschließend wurden die Längen des respiratorischen und des olfaktorischen Epithels für jede Probe an mehreren Stellen gemessen (Abb. 8E). Daraufhin wurden CD3⁺-, CD8⁺- und CD68⁺-Zellen im OE und RE identifiziert und als Anzahl positiver Zellen pro 100 µm Epithellänge berechnet (Abb. 8F–H). Insgesamt konnte festgestellt werden, dass zytotoxische T-Zellen (CD8⁺-Zellen) am seltensten vertreten waren, gefolgt von T-Zellen (CD3⁺-Zellen), während Makrophagen (CD68⁺-Zellen) am häufigsten nachgewiesen wurden.

Auffällig war, dass T-Zellen (CD3⁺-Zellen) häufiger in der Lamina propria als im Epithel vorkamen. Ein allgemeines lineares Modell ergab einen signifikanten Effekt der epithelialen Lokalisation auf die Verteilung der T-Zellen ($F_{6.20,1} = 0,048$; Abbildung 8F) und der Makrophagen (CD68⁺; $F_{4.83,1} = 0,048$; Abb. 8H). Post-hoc-Tests zeigten, dass in der SARS-CoV-2⁻-Gruppe die T-Zellen im OE häufiger vorkamen als im RE ($p = 0,035$). Dieser Befund eines erhöhten T-Zell-Vorkommens im OE fehlte jedoch bei der SARS-CoV-2⁺-Gruppe. Die Anzahl zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺-Zellen) unterschied sich hingegen nicht zwischen OE und RE (Abbildung 8G).

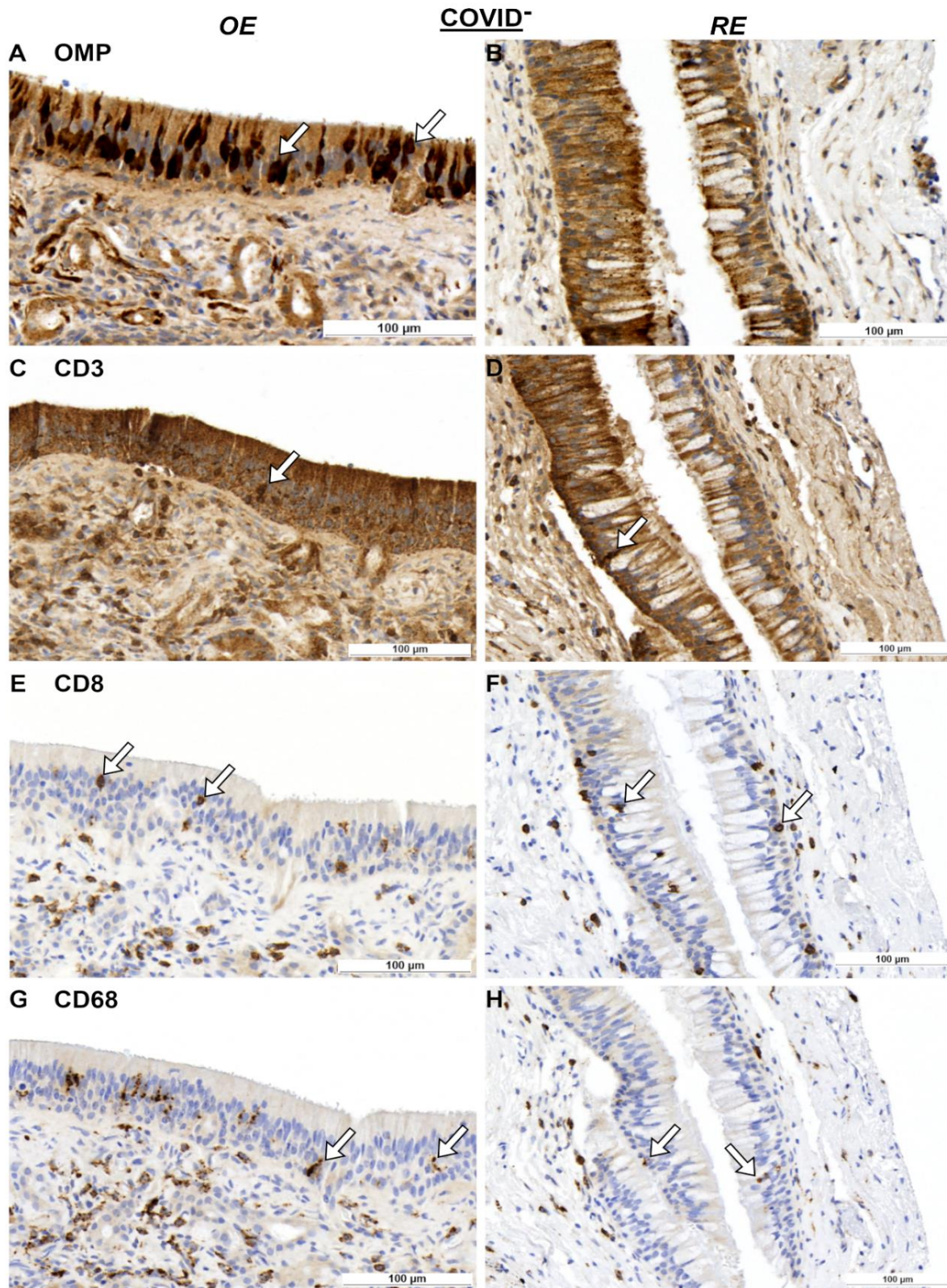


Abbildung 17: Immunhistochemische Reaktionen im OE und RE für SARS-CoV-2-Proben.

OMP-Reaktionen im OE (A) und RE (B); CD3-Reaktionen im OE (C) und RE (D); CD8-Reaktionen im OE (E) und RE (F); sowie CD68-Reaktionen im OE (G) und RE (H). Pfeile markieren die positiven Zellen. Die statistische Auswertung der Zellzählung ist in Abbildung 8 dargestellt. Maßstabsbalken: 100 µm. Negative Kontrollen sind in Abbildung 15 angegeben.

Abkürzungen: COVID-/SARS-CoV-2, Kontrollgruppe

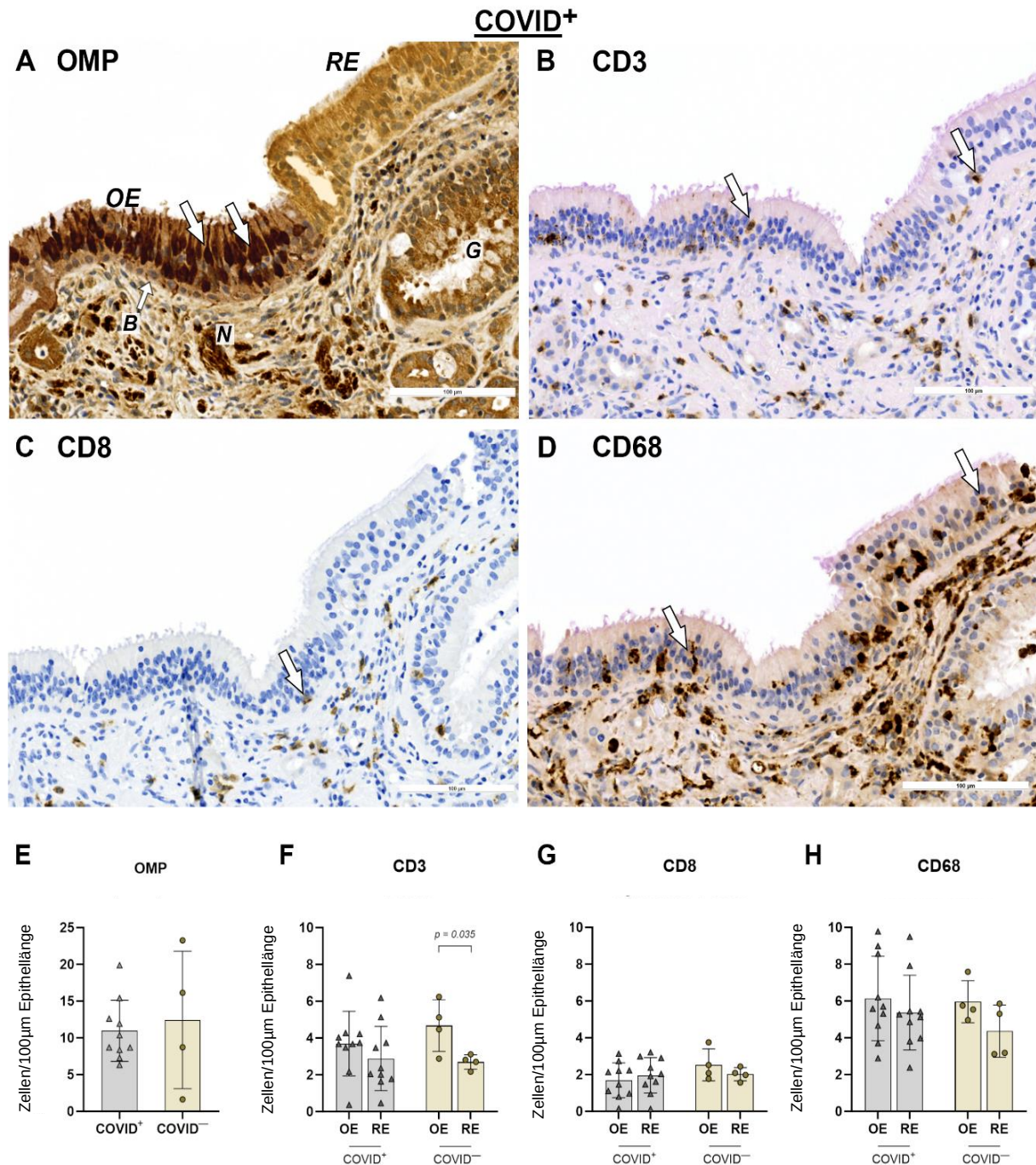


Abbildung 20: Immunhistochemische Reaktionen im OE und RE bei SARS-CoV-2⁺-Proben (A–D) und statistische Auswertung der Zellzahlen (E–H).

(A) OMP-Reaktion. Olfaktorische Rezeptorneuronen werden durch Pfeile angezeigt und bilden das olfaktorische Epithel (OE, Epithel ist leicht rot gefärbt (Doty, 2015)). Das respiratorische Epithel (RE) ist leicht orange gefärbt und zeigt keine olfaktorischen Neuronen. (B) CD3-Reaktion, Pfeile weisen auf CD3⁺ intraepitheliale Zellen hin. (C) CD8-Reaktion (Pfeil). (D) CD68-Reaktion (Pfeile innerhalb des Epithels). Für die statistische Analyse wurden Zellzahlen von SARS-CoV-2⁺- und SARS-CoV-2⁻-Proben mithilfe eines allgemeinen linearen Modells verglichen, gefolgt von mehreren t-Tests. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha < 0,05$ festgelegt. SARS-CoV-2⁺: $n = 10$. SARS-CoV-2⁻: $n = 4$. Maßstabsbalken beträgt 100 µm. Negative Kontrollen sind in Abbildung 16 dargestellt.

Abkürzungen: COVID⁺/SARS-CoV-2⁺, Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion; COVID⁻/ SARS-CoV-2⁻ Kontrollgruppe; B, Basalzellen des olfaktorischen Epithels; N, olfaktorischer Nerv; G, Drüsen

Um die immunologischen Reaktionen nach einer COVID-19-Infektion in weiteren Strukturen genauer zu untersuchen, wurden Nerven detailliert analysiert (Abb. 9A–H und Abb. 10A–D). Die Nerven wurden dabei in zwei Gruppen unterteilt: olfaktorische Nerven (ON), die in Abbildung 9A dargestellt sind, und trigeminale Nerven (N), die in Abbildung 9B zu sehen sind. In Abbildung 10A sind beide Nerventypen zu erkennen. Bei der Begutachtung der histologischen Schnittbilder wurden CD3⁺- und CD68⁺-Zellen gleichmäßig im Endoneurium verteilt gefunden (Abb. 9C, G), während CD8⁺-Zellen stärker auf das Perineurium (das Endoneurium umgebend), beschränkt waren (Abb. 9E). Ein allgemeines lineares Modell zeigte einen Effekt basierend auf den Nervenstrukturen mit $F_{9,44,1} = 0.037$ für T-Zellen (Abb. 10E). T-Zellen waren in den olfaktorischen Nerven tendenziell häufiger vorhanden als in den trigeminalen Nerven ($p = 0.055$). Dieser Trend zeigte sich jedoch nicht bei zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen (Abb. 10F, G). Zu berücksichtigen ist, dass nur zwei Proben trigeminale Fasern aufwiesen, was eine weiterführende statistische Analyse einschränkte. Zudem war die Anzahl der Immunzellen in den Nervenfasern im Vergleich zum Epithel gering. Die mittleren Werte der CD3⁺-Zellen lagen bei 0.22 ± 0.25 Zellen/mm² für ON und 0.08 ± 0.09 Zellen/mm² für trigeminale Nerven. Dies deutet darauf hin, dass eine Immunantwort in den Nervenfasern stattfand, diese aber nicht ausgeprägt war.

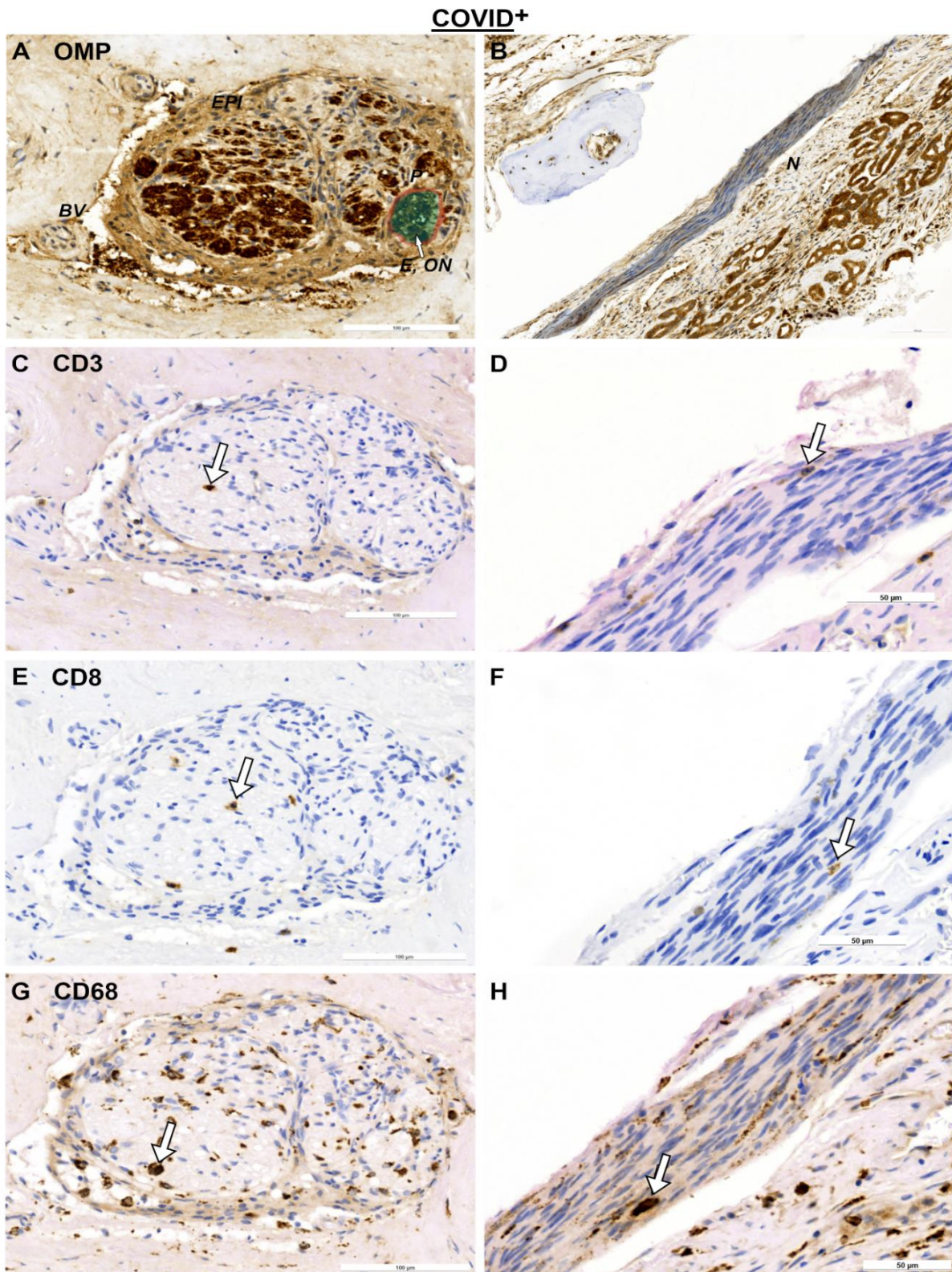


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbungen von Nervengewebe bei SARS-CoV-2⁺-Proben.

OMP-Färbung für ON (A) und N (B); CD3⁺-Zellen für ON (C) und N (D); CD8⁺-Zellen für ON (E) und N (F); sowie CD68⁺-Zellen für ON (G) und N (H). Pfeile markieren die Position positiver Zellen.

Statistische Auswertungen der Zellzahlen sind in Abbildung 10 dargestellt. Maßstabsbalken: 100 µm und 50 µm. Negative Kontrollen sind in Abbildung 17 enthalten.

Abkürzungen: E, Endoneurium; EPI, Epineurium; BV, Blutgefäß; COVID⁺/SARS-CoV-2⁺, Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion; ON, olfaktorischer Nerv; N, Trigeminusnerv

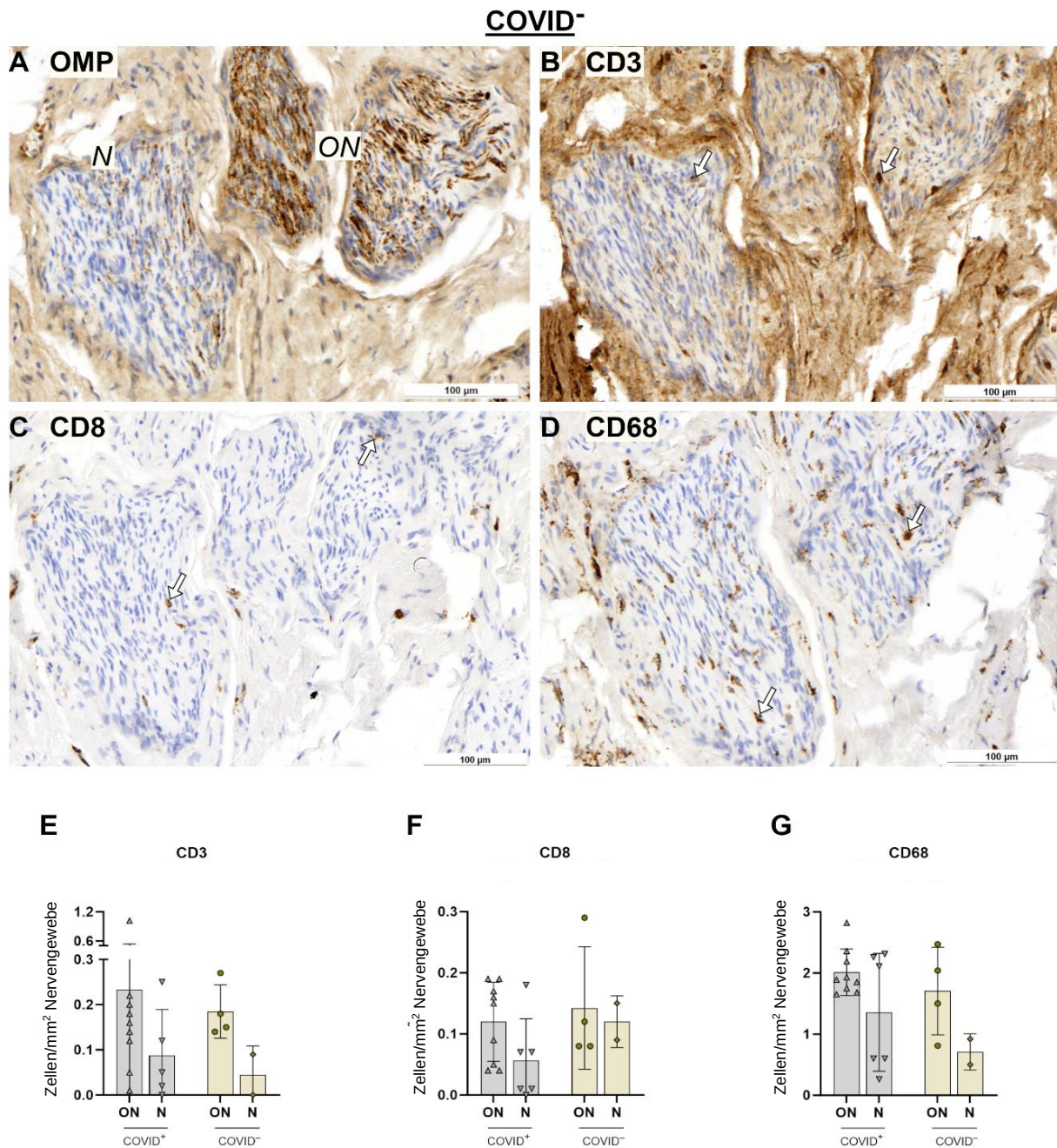


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbungen von Nervengewebe bei SARS-CoV-Proben (A–D) und statistische Auswertung der Zellzahlen (E–G).

(A) OMP-Färbung. (B) CD3-Färbung. (C) CD8-Färbung. (D) CD68-Färbung. Die Pfeile markieren die Position positiver Zellen. Für die statistische Analyse wurden die Zellzahlen von SARS-CoV-2⁺- und SARS-CoV-2⁻-Proben mithilfe eines allgemeinen linearen Modells und anschließender multipler t-Tests verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha < 0,05$ festgelegt.

SARS-CoV-2⁺: ON, $n = 9$; N, $n = 5$. SARS-CoV-2⁻: ON, $n = 4$; N, $n = 2$. Der Maßstabsbalken beträgt 100 μm . Negative Kontrollen sind in Abbildung 18 enthalten.

Abkürzungen: COVID⁺/SARS-CoV-2⁺, Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion; COVID⁻/SARS-CoV-2⁻, Kontrollgruppe; ON, olfaktorischer Nerv; N, Trigeminalganglion

4.2 Riechkolben und SARS-Spike-Protein

In einer Probe wurde der Riechkolben mit typischer Schichtung dargestellt (Abb. 11A). Die Lokalisation der Immunzellantworten für CD3⁺-, CD8⁺- und CD68⁺-Zellen waren hauptsächlich in der glomerulären und der äußeren plexiformen Schicht nachweisbar. Makrophagen (CD68⁺) wiesen ein dichtes Verteilungsmuster in der glomerulären Schicht auf.

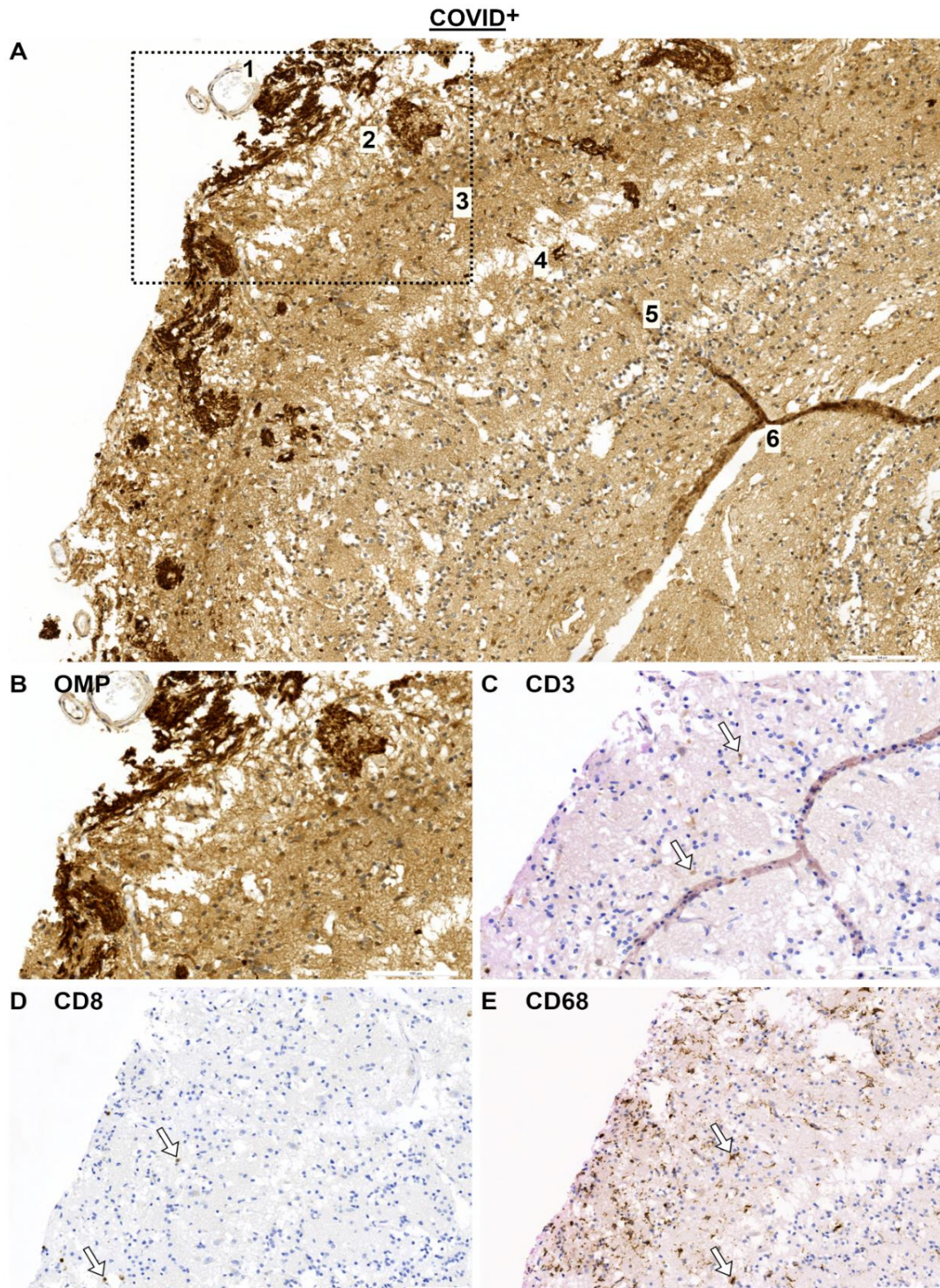


Abbildung 29: Immunhistochemische Färbungen im Riechkolben (OB) bei SARS-CoV-2⁺-Proben.

(A, B) OMP-Färbung. Die Zahlen kennzeichnen die OB-Schichten: 1, Nervenfaserschicht (nicht vollständig abgebildet); 2, glomeruläre Schicht; 3, äußere plexiforme Schicht; 4, Mitral-/Bündelzellschicht; 5, innere plexiforme Schicht; 6, Körnerzellschicht (Witt, 2020). (C) CD3-Färbung. (D) CD8-Färbung. (E) CD68-Färbung. Die Pfeile markieren die Position positiver Zellen. Maßstabsbalken: 100 µm. Negative Kontrollen sind in Abbildung 19 enthalten.

Abkürzungen: COVID⁺/ SARS-CoV-2⁺: Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion.

Das SARS-Spike-Protein und ACE2 wurden deskriptiv im OE, RE, ON, N und OB untersucht. Deskriptiv zeigte sich, dass sowohl das SARS-Spike-Protein als auch ACE2 im Vergleich zwischen dem OE und dem RE stärker im RE angefärbt werden konnten (s. Abb. 13). Repräsentative Ausschnitte sind in Abbildung 14 dargestellt. Obwohl in Abbildung 13A kein SARS-Spike-Protein im Epithel nachgewiesen wurde, zeigten andere Proben positive Reaktionen auf das SARS-Spike-Protein (s. Abb. 14 und Abb. 20). Im ON wurden Reaktionen auf das SARS-Spike-Protein festgestellt, die jedoch vorwiegend auf das Perineurium beschränkt waren (Abb. 13C, E). Insbesondere in den N war das SARS-Spike-Protein nachweisbar. Interessanterweise war das SARS-Spike-Protein nicht in der Lamina propria nachweisbar. Im OB zeigte die glomeruläre Schicht jedoch positive Signale für das SARS-Spike-Protein (Abbildung 13G). Darüber hinaus wurde das SARS-Spike-Protein vereinzelt in arteriellen und venösen Gefäßen nachgewiesen (Abb. 12).

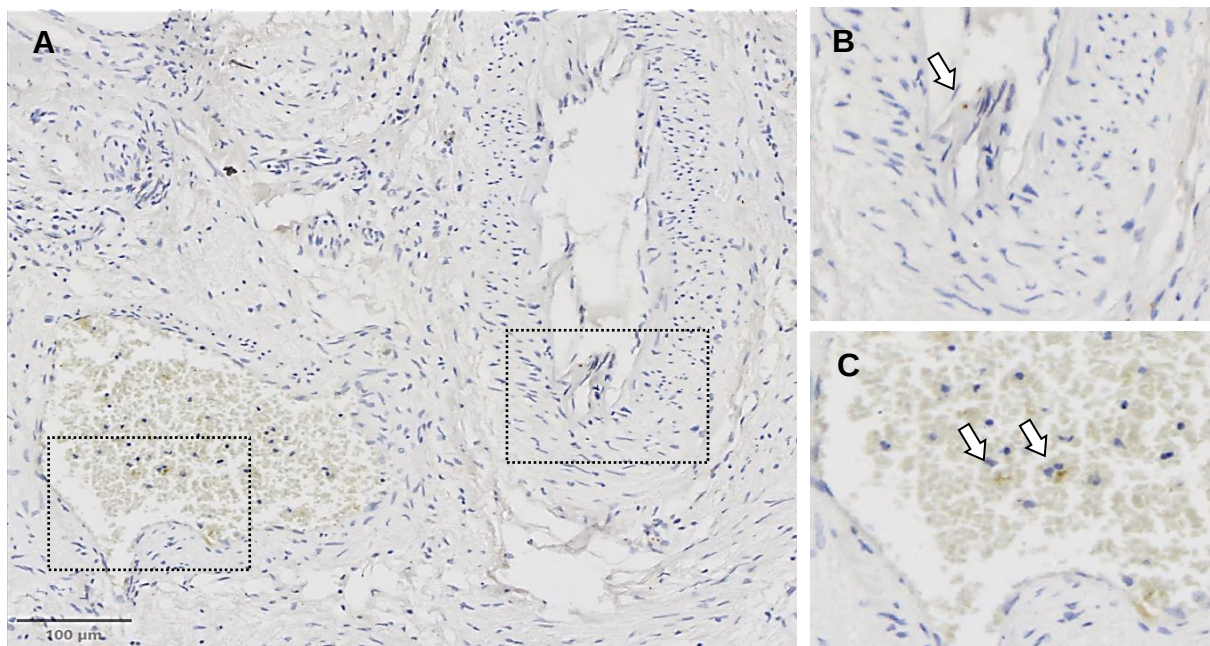


Abbildung 32: Immunhistochemische Reaktionen in Arterien und Venen bei SARS-CoV-2⁺-Proben (A).

SARS-Spike-Protein-Reaktionen sind in Arterien (B) und in Venen (C) sichtbar. Pfeile markieren positive Zellen. Maßstabsbalken: 100 µm.

Abkürzungen: SARS-CoV-2⁺, Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion.

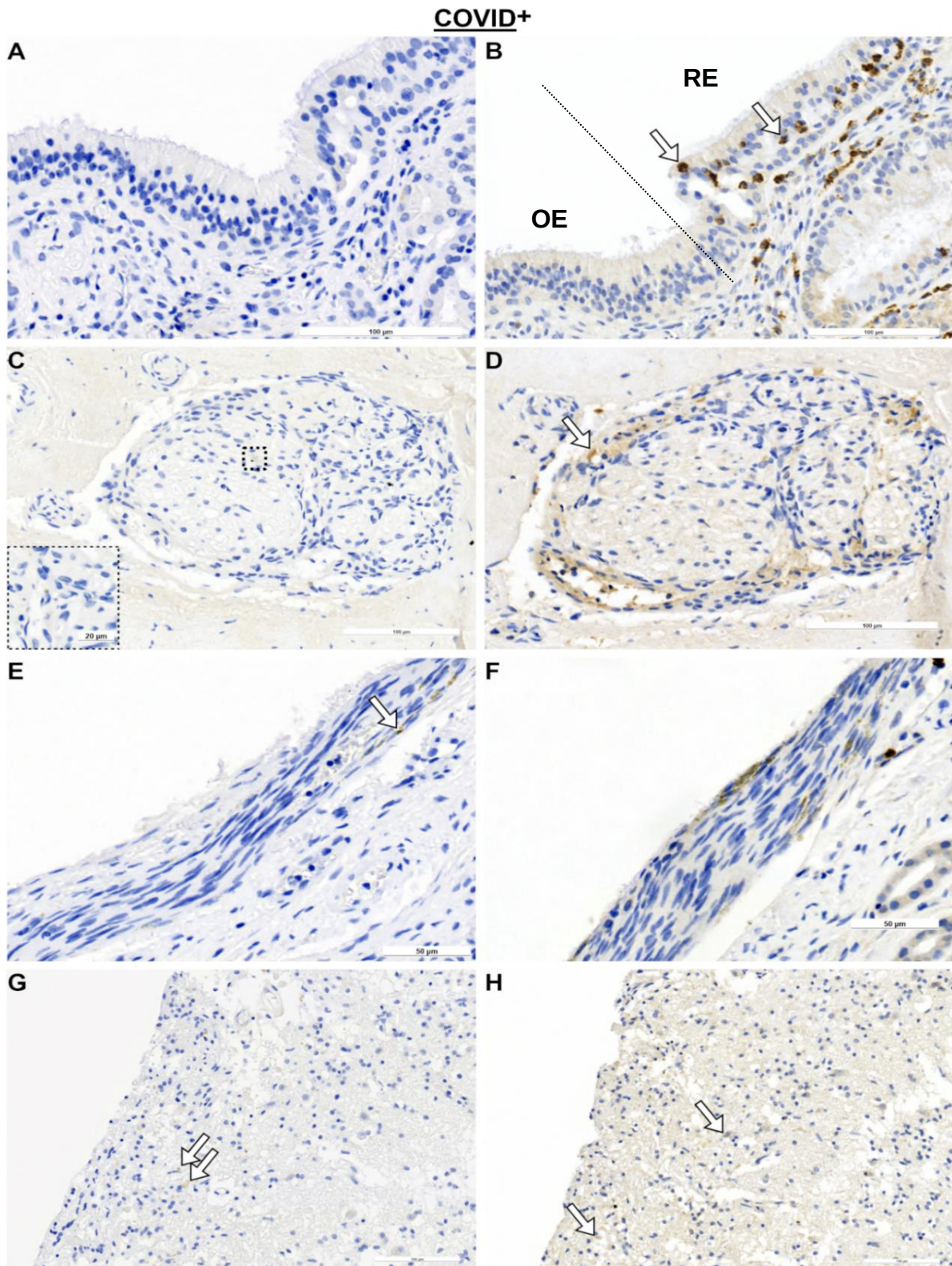


Abbildung 35: Immunhistochemische Reaktionen im OE, RE, in Nervengewebe und im OB bei SARS-CoV-2⁺-Proben.

SARS-Spike-Protein-Reaktionen sind im Epithel (A), in Nervenfaserbündeln (C, E) und im OB (G) sichtbar. ACE2-Reaktionen sind im Epithel (B), in Nerven (D, F) und im OB (H) nachweisbar. Pfeile markieren positive Zellen. Maßstabsbalken: 100 µm und 50 µm. Negative Kontrollen sind in Abbildung 21 dargestellt.

Abkürzungen: COVID⁺/ SARS-CoV-2⁺: Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion.

ACE2 wurde im RE und im Epineurium der ON-Zellen nachgewiesen (Abb. 13B, D). Zudem war ACE2 häufig in Blutgefäßen sichtbar. Im OB zeigte sich optisch ein stärker verteiltes Muster von ACE2-positiven Zellen, die höchstwahrscheinlich in der Nähe von Arteriolen lokalisiert waren (Doty, 2015).

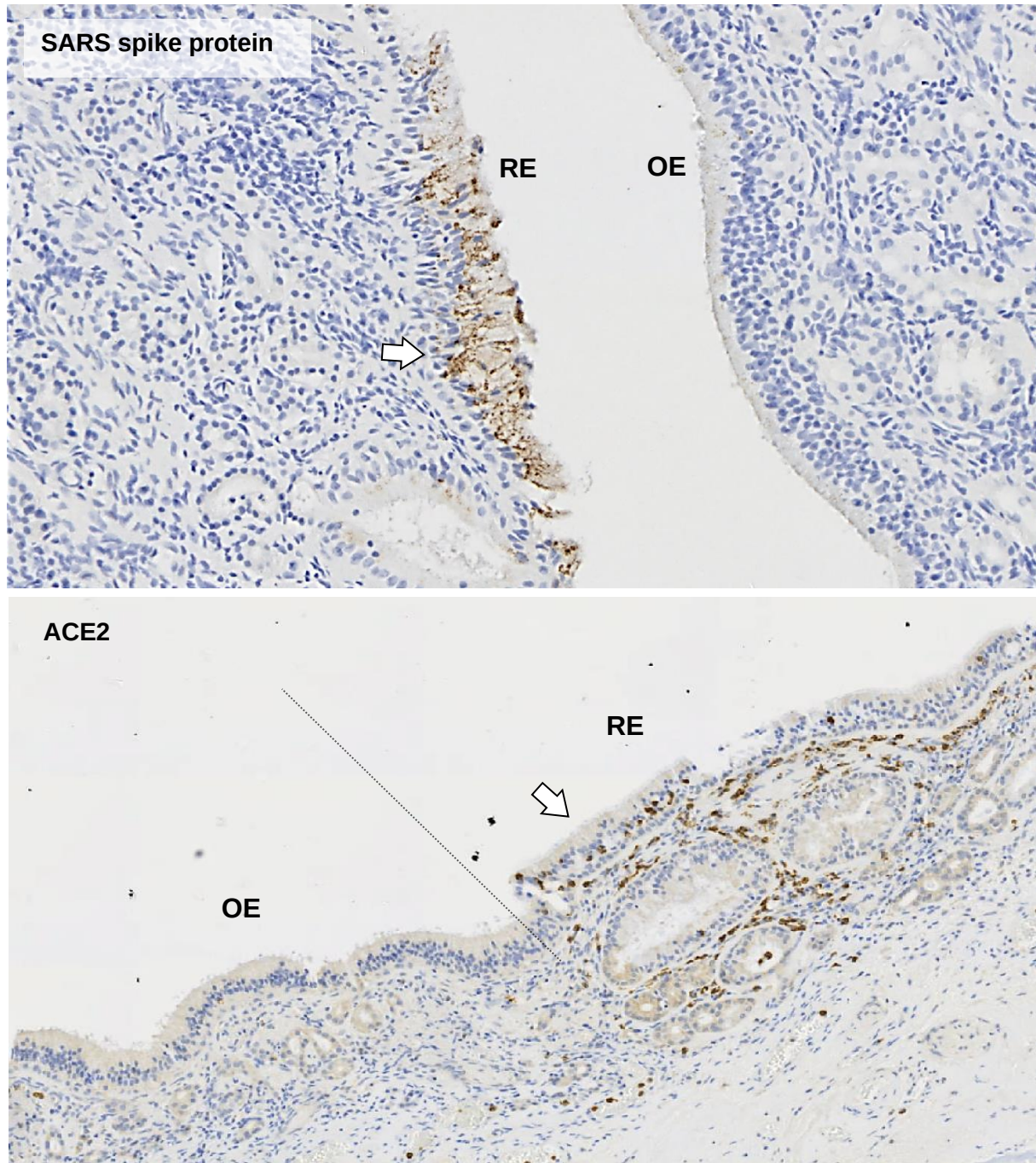


Abbildung 38: Immunhistochemische Reaktionen im OE und RE in einer SARS-CoV-2⁺-Probe.

SARS-Spike-Protein-Reaktionen und ACE2-Reaktionen sind beim direkten Vergleich im RE deutlich ausgeprägter als im OE. Pfeile markieren positive Zellen.

Abkürzungen: COVID⁺/ SARS-CoV-2⁺: Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion.

5 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie war es, die zelluläre Immunantwort in der Nasenschleimhaut und im OB von verstorbenen SARS-CoV-2⁺-Patienten mithilfe von Immunhistochemie zu untersuchen. Dabei ergaben sich mehrere wichtige Erkenntnisse. Erstens wurde festgestellt, dass bei schweren COVID-19-Verläufen eine periphere Lymphopenie vorliegt, begleitet von einer Reduktion der T-Zellen (CD3⁺-Zellen) im OE im Vergleich zu verstorbenen SARS-CoV-2⁺-Patienten. Zweitens zeigten sowohl die olfaktorischen als auch die trigeminalen Nervenfasern eine Immunantwort, die sich bis in die glomeruläre Schicht des OB erstreckte. Drittens wurden Spuren des Spike-Proteins in olfaktorischen und trigeminalen Nervenfasern sowie im OB nachgewiesen, während diese im Epithel nahezu vollständig fehlten. Im Gegensatz dazu konnten andere Studien keine Anzeichen von SARS-CoV-2 im OB finden (Butowt & Bartheld, 2022; Butowt et al., 2021; Khan et al., 2021).

Der untersuchte Zeitraum umfasst die Jahre 2020 bis 2022, was sowohl SARS-CoV-2 vor der Einstufung von Varianten durch die WHO als auch fünf besorgniserregende Virusvarianten einschließt (*Technical Advisory Group on SARS-CoV-2 Virus Evolution*, 2024). Zudem weisen Studien wie die von Whitaker et al. darauf hin, dass sich die Prävalenz und Symptomatik je nach Virusvariante unterscheidet, wie beispielsweise bei der Omikron- und der Alpha-Variante, die in der englischen Bevölkerung zwischen 2020 und 2022 untersucht wurden (Whitaker et al., 2022).

5.1 Immunantwort in der Nasenschleimhaut

Candia et al. und weitere Autoren berichteten, dass eine periphere Lymphopenie, insbesondere eine Abnahme der CD4- und CD8-Zellen im Blut, mit einem höheren Anteil schwerer COVID-19-Fälle assoziiert ist (Candia et al., 2021; Z. Liu et al., 2020; Qin et al., 2020). Eine ähnliche Abnahme der T-Lymphozyten wurde in einer 2023 veröffentlichten Studie festgestellt, in der mithilfe eines Cytometers die T-Zell-Antworten von mRNA-geimpften mit denen von COVID-19-Patienten verglichen wurden (F. Gao et al., 2023; Mallajosyula et al., 2021). Zusätzlich zeigen Studien, dass schwere COVID-19-Verläufe durch eine dysregulierte Immunantwort gekennzeichnet sind. Eine unzureichende frühe antivirale Abwehr (z.B. eine verminderte Typ-I/III-Interferonproduktion) führt häufig zu einer überschießenden Entzündungsreaktion. Dieses Ungleichgewicht zwischen reduzierter angeborener Immunität und Hyperinflammation könnte die reduzierte T-Zell-Zahl im OE zusätzlich erklären (Qin et al., 2020). Die Ergebnisse dieser Studien stehen im Einklang mit den vorliegenden Beobachtungen, die eine reduzierte Anzahl von T-Lymphozyten im olfaktorischen Epithel aufzeigen.

Mit Fortschreiten der Pandemie wiesen Studien aus den Jahren 2021 bis 2022 darauf hin, dass sowohl Infektion als auch Impfung einen signifikanten Schutz vor schweren Verläufen boten, jedoch keinen vollständigen Schutz vor Reinfektionen (Bergwerk et al., 2021; Eyre et al., 2022; Hall et al., 2022). Bemerkenswerterweise zeigte ein syrisches Hamstermodell, dass SARS-CoV-2 nach einer Reinfektion trotz Impfung in den oberen Nasenwegen nachweisbar war, was auf einen unzureichenden Schutz in diesem Bereich hinweist (Zhou et al., 2021). Dies führte zu der Annahme eines potenziell unvollständigen Schutzes in den oberen Nasenwegen (Wellford & Moseman, 2024).

Wellford et al. vermuten die Existenz einer dichten Endothelstruktur, die als Blut-Riech-Barriere fungiert und das olfaktorische von dem respiratorischen Epithel trennt. In ihrer Studie injizierten sie Mäusen intraperitoneal Antikörper, die gegen beide Epithelschichten gerichtet waren. Dabei zeigten sich immunhistochemische Reaktionen ausschließlich in den respiratorischen Epithelzellen (Wellford et al., 2022). Vor diesem Hintergrund wurde in COVID-19-Fällen eine Abnahme der gesamten T-Zellen (CD3⁺-Zellen) im olfaktorischen Epithel festgestellt im Vergleich zu verstorbenen Nicht-COVID-19-Kontrollfällen, während die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺-Zellen) unverändert blieb.

In den vorliegenden Beobachtungen zeigte das respiratorische Epithel eine signifikant höhere Konzentration an Viruspartikeln im Vergleich zum olfaktorischen Epithel. Dies könnte durch unterschiedliche Expressionsmuster des ACE2-Rezeptors erklärt werden. Ziegler et al. zeigten in Einzelzellanalysen, dass ACE2 im respiratorischen Epithel besonders stark exprimiert ist, was die höhere SARS-CoV-2-Präsenz in diesem Bereich erklären könnte (Ziegler et al., 2020).

Khan et al. vermuteten, dass der Geruchsverlust bei COVID-19 hauptsächlich durch den Tod der Stützzellen (sustentakuläre Zellen) im olfaktorischen Epithel verursacht wird (Khan et al., 2021). Diese Annahme wurde durch Brann et al. bestätigt, die in ihren detaillierten Expressionsanalysen eine besonders hohe ACE2-Expression in genau diesen Zellen nachwiesen (Brann et al., 2020). Bryche et al. konnten in einem Hamstermodell zeigen, dass die Infektion der sustentakulären Zellen zu einer massiven, jedoch transienten Schädigung des olfaktorischen Epithels führt (Bryche et al., 2020). Im Gegensatz dazu zeigen die vorliegenden Befunde, dass sich SARS-CoV-2 im gesamten Epithel verteilt und nicht nur auf bestimmte Zelltypen beschränkt bleibt, wobei die höchste Viruskonzentration im respiratorischen Epithel gefunden wurde. Darüber hinaus konnte SARS-CoV-2 in den olfaktorischen und trigeminalen Nerven sowie im Blutkreislauf nachgewiesen werden, was die Möglichkeit einer systemischen und neuroinvasiven Virusverbreitung unterstreicht. Boscolo-Rizzo et al. untersuchten die Erholung von olfaktorischen und gustatorischen Dysfunktionen zwei Jahre nach einer COVID-19-Infektion. Ihre Ergebnisse zeigten, dass sich zwar bei der

Mehrzahl der Patienten die Symptome verbesserten, jedoch etwa 3,2 % der Betroffenen auch nach zwei Jahren noch an persistierender Anosmie litten (Boscolo-Rizzo et al., 2023). Diese Langzeitfolgen könnten möglicherweise auf tiefgreifendere, strukturelle Schäden im olfaktorischen System hinweisen.

Die prä-mortem-Blutanalysen zeigten deutlich erhöhte Neutrophilen-Werte bei COVID-19-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Studien der Forschungsgruppen um Samantha Praktijn (Berlin Institute of Health, Charité), Markus Landthaler (Max Delbrück Center) und Jakob Trimpert (Freie Universität Berlin) haben gezeigt, dass nach einer SARS-CoV-2-Infektion neutrophile Granulozyten, die als erste Abwehrlinie des angeborenen Immunsystems fungieren, sowohl bei milden als auch bei schweren COVID-19-Verläufen rasch aktiviert werden. Bei milden Verläufen erfolgt eine kurzfristige Aktivierung der Neutrophilen, die dann durch andere Immunzellen wie natürliche Killerzellen abgelöst wird (Typ-1-Immunantwort). Im Gegensatz dazu bleiben bei schweren Verläufen die Neutrophilen dauerhaft aktiv, was zu einer Überproduktion proinflammatorischer Signale führt und in der Lunge zu erheblichen Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden resultiert (Peidli et al., 2024). Schulte-Schrepping et al. beschreiben weiterhin, dass bei schweren COVID-19-Verläufen nicht nur die Zahl der Neutrophilen erhöht ist, sondern diese Zellen auch funktionell dysreguliert sind und somit zu einer überschießenden systemischen Entzündung und Organschäden beitragen können (Schulte-Schrepping et al., 2020).

Bislang gibt es nur wenige Studien, die sich mit der durch COVID-19 induzierten postmortalen T-Zell-Antwort in der olfaktorischen Schleimhaut befassen (wie z.B. (Kirschenbaum et al., 2021), insbesondere im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne COVID-19. So berichteten Finlay et al. von einer Anreicherung residenter zytotoxischer T-Zellen in Biopsien von Langzeit-COVID-Patienten mit olfaktorischer Dysfunktion (Finlay et al., 2022). Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit der aktuellen Untersuchung gestaltet sich jedoch als schwierig, da Letztere ausschließlich tödliche Verläufe schwerer COVID-19-Fälle untersucht.

Ein weiterer einschränkender Faktor ist das Fehlen von qualitativen und quantitativen Daten zur olfaktorischen Funktion während der Hospitalisierung der Patienten in der vorliegenden Studie. Dies erschwert es, Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Studienkohorten zu ziehen. Roukens et al. analysierten in einer anderen Untersuchung Immunzellen aus Nasenmuschelabstrichen mithilfe einer Durchflusszytometrie. Sie fanden heraus, dass während akuter COVID-19-Infektionen die Anzahl der T-Effektorzellen und natürlichen Killerzellen zunahm, während zwei Monate nach der Infektion SARS-CoV-2-spezifische zytotoxische T-Zellen erhöht waren (Roukens et al., 2022). Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Studie, da während akuter Infektionen keine

Veränderungen bei zytotoxischen T-Zellen festgestellt wurden. Zusätzlich gibt es eine Studie, die über das Vorhandensein zytotoxischer T-Zellen berichtete, allerdings ausschließlich bei milderen Verläufen von COVID-19. Sie identifizierten, dass bei diesen Patienten eine robuste CD8⁺-T-Zellantwort gegen das Spike-Protein bestand (Mallajosyula et al., 2021).

5.2 Immunantwort in Nervenfasern und Zentralnervensystem

Untersuchungen zur Immunantwort in der Nasenschleimhaut und im zentralen Nervensystem ergaben, dass COVID-19 mit einer Zunahme früher Makrophagen im OE verbunden ist. Zudem wurde eine erhöhte Anzahl von CD4⁺-Zellen sowie zytotoxischen T-Zellen im Hirnstamm, Parenchym und in weiteren Hirnregionen festgestellt (Bertoletti et al., 2022; Matschke et al., 2020; Meinhardt et al., 2021; Schwabenland et al., 2021). Die vorliegende Arbeit zeigt eine Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in der glomerulären Schicht des OB sowie eine verstärkte T-Zell-Aktivität in den olfaktorischen Nerven im Vergleich zu den trigeminalen Nerven. Diese Ergebnisse stimmen mit den positiven Reaktionen auf das Spike-Protein in den Nervenfasern und im Riechkolben überein. Eine weitere Studie von Matschke et al. konnte eine verstärkte Mikroglia-Aktivierung in COVID-19-verstorbenen Patienten zeigen. Diese Mikroglia-Interaktionen mit T-Zellen könnten Teil einer generalisierten neuroinflammatorischen Reaktion des ZNS sein (Matschke et al., 2020).

Die Befunde werden durch Meinhardt et al. gestützt, die das Vorhandensein von SARS-CoV-2 in der olfaktorischen Schleimhaut, in den olfaktorischen und trigeminalen Nervenfasern sowie in einigen Proben des zentralen Nervensystems nachwiesen (Meinhardt et al., 2021). Song et al. lieferten ebenfalls Hinweise auf eine Neuroinvasion durch SARS-CoV-2, indem sie das Virus im menschlichen Hirngewebe und den angrenzenden Nervenfasern nachwiesen (Song et al., 2021). Diese Ergebnisse unterstützen den Verdacht des neuroinvasiven Potenzials von SARS-CoV-2 und weisen auf eine entzündliche Beteiligung des olfaktorischen Systems hin (Kirschenbaum et al., 2020). Dennoch wird die Wahrscheinlichkeit, dass SARS-CoV-2 durch die olfaktorischen Fasern in das ZNS gelangt, als gering eingeschätzt (Khan et al., 2021).

Khan et al. stellten fest, dass sustentakuläre Zellen durch SARS-CoV-2 infiziert und anschließend abgebaut werden. Eine direkte Infektion der olfaktorischen Neurone wurde jedoch nicht beobachtet (Butowt et al., 2021; Khan et al., 2021; Meinhardt et al., 2024). Zudem konnten, im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie, andere Untersuchungen keine Anzeichen von SARS-CoV-2 im OB feststellen (Khan et al., 2021). Laut einer Übersichtsarbeit von Meinhardt et al. (2024) ist eine durch SARS-CoV-2 verursachte Störung der Blut-Hirn-Schranke wahrscheinlich (Meinhardt et al., 2024). Bei Patienten, die an oder mit COVID-19 verstarben, fanden sich Anzeichen einer gestörten Blut-Hirn-Schranke sowie endothelialer

Entzündungen. Zusätzlich wurde eine Hochregulation von T-Zellen im perivaskulären Raum in der Nähe von Endothelzellen festgestellt (Ho et al., 2022; Krasemann, Dittmayer et al., 2022; M.-H. Lee et al., 2021; Robles et al., 2022; Varga et al., 2020).

Das neuroinvasive Potenzial von SARS-CoV-2 zeigt sich klinisch durch neurologische Symptome wie Kopfschmerzen, „Brain Fog“ (Gehirnnebel) und den Verlust oder die Veränderung des Geruchssinns (Graham et al., 2021; Whitaker et al., 2022). Im Falle einer Anosmie (Geruchsverlust) blieb der olfaktorische Nerv meist intakt, was auf andere Ursachen wie den Abbau sustentakulärer Zellen oder eine Verengung der Riechspalte hindeutet (Butowt et al., 2023). Auch im Hinblick auf die olfaktorische Dysfunktionen wird wenig über die trigeminale Sensibilität berichtet (Hernandez & Hummel, 2023). Eine Studie aus dem Jahr 2022 berichtete über einen Zusammenhang zwischen einer Beeinträchtigung des Geruchssinns und einer reduzierten nasalen Reizwahrnehmung (Otte et al., 2022). Diese reduzierte Chemästhesie, welche als nasale Obstruktion wahrgenommen wird, steht in Zusammenhang mit der Funktion des Trigemini-nervs (Frasnelli et al., 2011). Aufgrund der begrenzten Stichprobengröße dieser Untersuchung sind jedoch keine weiteren Schlussfolgerungen zu möglichen Beeinträchtigungen des trigeminalen Systems in der Nase möglich.

Zusammengefasst weist diese postmortale Analyse auf eine verminderte T-Zell-Antwort bei COVID-19-Patienten hin und zeigt Hinweise auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2 in olfaktorischen und trigeminalen Nervenfasern.

5.3 Einschränkungen

Krasemann et al. veröffentlichten Leitlinien für die Untersuchung des Vorhandenseins von SARS-CoV-2 in menschlichen Autopsiegewebe (Krasemann, Dittmayer et al., 2022). Als Goldstandard empfahlen sie ein Screening mittels quantitativer PCR, um Gewebe mit hoher Viruslast zu identifizieren. Anschließend sollte eine Immunhistochemie sowie in situ Hybridisierung durchgeführt werden. Zur abschließenden Verifizierung des Virus und nicht nur des Viruskapsids oder Spike-Proteins, empfahlen sie den Einsatz der Elektronenmikroskopie. Mit diesem Ansatz wurden 135 Fehldeutungen bei insgesamt 144 Fällen aufgedeckt (Krasemann, Dittmayer et al., 2022). Aufgrund der Konservierungsbedingungen war es in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht möglich, die vorgeschlagenen Methoden anzuwenden. Trotzdem stimmen die hier erzielten Ergebnisse mit zuvor veröffentlichten Befunden überein, die mithilfe der zugänglicheren IHC-Methode ermittelt wurden. Der in dieser Studie eingesetzte Antikörper gegen das Spike-Protein scheint ein schwaches, aber spezifisches Signal zu liefern. Ursprünglich wurde der Antikörper für die Detektion von SARS-CoV entwickelt. In der Arbeit von Krasemann et al. zeigte dieser Antikörper keine Reaktion im

5 DISKUSSION

Gewebe. Die Autoren berichteten jedoch, dass der Antikörper in anderen Studien Reaktionen hervorbrachte (Krasemann, Dittmayer et al., 2022).

Eine weitere Einschränkung dieser Studie ist die geringe Stichprobengröße. Obwohl ursprünglich 65 Proben untersucht wurden, enthielt der Großteil der Gewebeproben kein olfaktorisches Epithel. Dieser Befund lässt sich höchstwahrscheinlich durch die altersbedingte Metaplasie des Epithels und degenerative Prozesse bei älteren Personen erklären (Fitzek et al., 2022). Weiterhin wurde bei der Gewinnung der Proben ein Gewebestück mittels Meißel aus der oberen Riechspalte entfernt, was zur Folge hatte, dass einige Proben Knochenfragmente und abgelöste Epithelien enthielten und somit nicht verwendet werden konnten. Retrospektiv hätte ein endoskopisches Verfahren eine bessere Probenqualität ermöglicht.

6 ZUSAMMENFASSUNG

HINTERGRUND: Seit Beginn der COVID-19-Pandemie erwies sich der Geruchsverlust als eines der frühesten und häufigsten Symptome von COVID-19. Das damit verbundene olfaktorische Epithel rückte in den Vordergrund der Forschung, blieb aber in seiner Pathophysiologie lange Zeit unklar. Bis heute sind der Pathomechanismus und der Weg von SARS-CoV-2 ins Gehirn nicht vollständig verstanden.

FRAGESTELLUNGEN: Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung des Spike-Proteins sowie dessen Eintrittsrezeptors ACE2 in der menschlichen Nasenschleimhaut immunhistochemisch und deskriptiv zu untersuchen. Dabei sollte geprüft werden, in welchen Strukturen und in welcher Intensität, insbesondere im olfaktorischen und respiratorischen Epithel, virale Antigene nachzuweisen sind. Zusätzlich sollte analysiert werden, ob sich die lokale Immunantwort (CD3⁺-T-Zellen, CD8⁺-zytotoxische-T-Zellen und CD68⁺-Makrophagen) zwischen SARS-CoV-2⁺ und SARS-CoV-2⁻ Gewebeproben unterscheidet. Im besonderen Fokus standen der Bulbus olfactorius, die olfaktorischen und trigeminalen Nerven sowie die zugehörigen Arterien und Venen.

MATERIAL UND METHODEN: Zwischen 2020 und 2022 wurden am Universitätsklinikum Dresden 65 Gewebeproben verstorbener Patienten aus der oberen Nasenmuschel entnommen (laut PCR- Test 42 SARS-CoV-2⁺, 23 SARS-CoV-2⁻). Die Proben wurden in 4 % Formalin fixiert, entkalkt, paraffiniert und seriell geschnitten (5 µm). Zunächst erfolgte ein Hämatoxylin/Eosin-Screening auf das Vorliegen von Epithel. Anschließend wurden alle Proben immunhistochemisch mit Olfactory Marker Protein (OMP) und β -Tubulin (TUBB3) gefärbt, um olfaktorisches Epithel eindeutig zu identifizieren. Nur Proben mit intaktem olfaktorischem Epithel wurden für die weitere Analyse eingeschlossen. Insgesamt verblieben 14 Proben. Zur Bestätigung der SARS-CoV-2-Infektion wurden die Schnitte immunhistochemisch auf das Spike-Protein untersucht. Bei 4 ursprünglich PCR-negativen Fällen konnte das Spike-Protein überraschend nachgewiesen werden, womit diese der SARS-CoV-2⁺-Gruppe zugeordnet wurden. Somit ergaben sich 10 SARS-CoV-2⁺ und 4 SARS-CoV-2⁻ Fälle. Alle Proben wurden zusätzlich immunhistochemisch auf die Immunmarker CD3, CD8, CD68 und den Eintrittsrezeptor ACE2 untersucht. Die Auswertung erfolgte digital mit QuPath, Zellzahlen wurden im Epithel pro 100 µm Epithellänge und in den Nerven pro mm² Nervenfläche ermittelt. Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS. Systemische Entzündungsparameter (Leukozyten, Differenzialblutbild, CRP) der letzten 24 h vor Todeszeitpunkt wurden retrospektiv aus den Krankenakten erhoben.

ERGEBNISSE: Bei den SARS-CoV-2⁺ Patienten zeigte sich eine ausgeprägte Entzündungsreaktion mit relativer Lymphopenie ($\bar{x}$ 10,6 %), erhöhten Neutrophilenzahlen ($\bar{x}$ 24,14 GPt/L)

und erhöhten CRP-Werten ($\bar{x}$ 57,81 mg/L), die mit schweren Komplikationen wie Multiorganversagen, Pneumonie und kardiovaskulärem Versagen assoziiert waren. Im olfaktorischen Epithel (OE) wiesen die SARS-CoV-2⁺ Patienten eine reduzierte Dichte von CD3⁺-T-Zellen auf. Bei den SARS-CoV-2⁻ bestand eine höhere CD3⁺-T-Zell-Dichte im OE gegenüber dem respiratorischen Epithel (RE). CD8⁺-zytotoxische T-Zellen zeigten weder zwischen OE und RE noch zwischen SARS-CoV-2⁺- und SARS-CoV-2⁻-Proben signifikante Unterschiede. Makrophagen (CD68⁺) waren in allen Gewebeproben am häufigsten vertreten. CD3⁺- und CD68⁺-Immunzellen fanden sich in den Nerven (olfaktorisch und trigeminal) insgesamt in geringer Menge und vorwiegend im Endoneurium. CD8⁺-Zellen waren dagegen überwiegend im Perineurium lokalisiert. Olfaktorische Nerven wiesen eine höhere mittlere CD3⁺-Zelldichte als trigeminale Nerven auf, wobei der Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,055$). Für CD8⁺- und CD68⁺-Zellen ergaben sich keine Unterschiede zwischen beiden Nerventypen. Im Bulbus olfactorius fanden sich CD3⁺-, CD8⁺- und CD68⁺-Immunzellen, vorrangig in der glomerulären und äußeren plexiformen Schicht. ACE2 war deutlich stärker im respiratorischen Epithel, in Gefäßendothelien und im Epineurium der olfaktorischen Nerven nachweisbar. Das SARS-CoV-2-Spike-Protein zeigte sich in einzelnen Proben des OE nur fokal, hingegen häufiger im RE sowie im Perineurium olfaktorischer und trigeminaler Nerven. Im Bulbus olfactorius war das Spike-Protein vorwiegend in der glomerulären Schicht nachweisbar. Zusätzlich wurde das Spike-Protein vereinzelt in arteriellen und venösen Gefäßen nachgewiesen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN: Die vorliegende Arbeit zeigt, dass COVID-19-Verläufe mit einer ausgeprägten systemischen Lymphopenie einhergehen und zugleich eine selektive Reduktion von CD3⁺-T-Zellen im olfaktorischen Epithel aufweisen. Dieses lokale Defizit an T-Lymphozyten könnte mit dem Nachweis des Spike-Proteins in Gefäßen und entlang olfaktorischer und trigeminaler Fasern bis in die glomeruläre Schicht des Bulbus olfactorius zusammenhängen. Die Arbeit unterstützt damit Modelle, die bei schweren COVID-19-Verläufen von einer insuffizienten frühen antiviralen Antwort und einer nachfolgenden Hyperinflammation ausgehen. Letztere beeinträchtigt die Immunabwehr und eröffnet potenziell neuroinvasive Wege. Klinisch gewinnt damit die Frage an Bedeutung, ob Impf- oder Immunmodulationsstrategien die lokale T-Zell-Antwort stärken könnten, um dadurch das Risiko persistierender Geruchs- und möglicher ZNS-Symptome zu reduzieren. Die Aussagekraft der Befunde ist durch die geringe Probenanzahl eingeschränkt. Künftige Studien sollten daher größere, variantenspezifische Proben, multimodale Nachweisverfahren (qPCR, RNA-Scope, Elektronenmikroskopie) und prospektive Riech- und Chemästhesietests einbeziehen. So ließe sich der Einfluss der nasalen Immunantwort auf die Entstehung post-COVID-bedingter Riechstörungen besser nachvollziehen.

7 SUMMARY

BACKGROUND: Since the beginning of the COVID-19 pandemic, loss of smell has been identified as one of the earliest and most common symptoms. The associated olfactory epithelium came into the focus of research but remained poorly understood in terms of its pathophysiology. To this day, the pathomechanism and the route of SARS-CoV-2 into the brain are not fully understood.

QUESTIONS: The aim of this study was to investigate, through immunohistochemical and descriptive analysis, the distribution of the spike protein and its entry receptor ACE2 in the human nasal mucosa. The study aimed to identify the anatomical structures and intensity, particularly in the olfactory and respiratory epithelium, where viral antigens could be detected. In addition, it analyzed whether the local immune response (CD3⁺ T cells, CD8⁺ cytotoxic T cells, and CD68⁺ macrophages) differed between SARS-CoV-2⁺ and SARS-CoV-2⁻ tissue samples. Special attention was given to the olfactory bulb, the olfactory and trigeminal nerves, and the associated arteries and veins.

MATERIALS AND METHODS: Between 2020 and 2022, 65 tissue samples were collected from deceased patients at the University Hospital Dresden from the superior nasal turbinate (42 SARS-CoV-2⁺, 23 SARS-CoV-2⁻ according to PCR test). The samples were fixed in 4 % formalin, decalcified, paraffin-embedded, and serially sectioned (5 µm). Hematoxylin/eosin screening was first performed to confirm the presence of epithelial tissue. All samples were then immunohistochemically stained with olfactory marker protein (OMP) and β -tubulin (TUBB3) to clearly identify olfactory epithelium. Only samples with intact olfactory epithelium were included in the analysis. A total of 14 samples remained. To confirm SARS-CoV-2 infection, the sections were immunohistochemically stained for the spike protein. In 4 initially PCR-negative cases, spike protein was unexpectedly detected, leading to their reassignment to the SARS-CoV-2⁺ group. This resulted in 10 SARS-CoV-2⁺ and 4 SARS-CoV-2⁻ cases. All samples were additionally stained for the immune markers CD3, CD8, CD68, and the entry receptor ACE2. Evaluation was performed digitally using QuPath, with cell counts determined per 100 µm of epithelial length and per mm² of nerve area. Statistical analysis was conducted using SPSS. Systemic inflammatory parameters (leukocytes, differential blood count, CRP) from the last 24 hours prior to death were retrospectively extracted from the medical records.

RESULTS: SARS-CoV-2⁺ patients showed a pronounced inflammatory response with relative lymphopenia ($\emptyset$ 10.6%), elevated neutrophil counts ($\emptyset$ 24.14 GPt/L), and increased CRP levels ($\emptyset$ 57.81 mg/L), all associated with severe complications such as multiorgan failure, pneumonia, and cardiovascular collapse. In the olfactory epithelium (OE), SARS-CoV-2⁺ patients exhibited a reduced density of CD3⁺ T cells compared to SARS-CoV-2⁻ patients. In

SUMMARY

SARS-CoV-2⁻ samples, CD3⁺ T cell density was higher in OE than in the respiratory epithelium (RE). CD8⁺ cytotoxic T cells showed no significant differences between OE and RE or between SARS-CoV-2⁺ and SARS-CoV-2⁻ samples. Macrophages (CD68⁺) were the most frequently represented immune cells across all tissues. CD3⁺ and CD68⁺ immune cells were present in small numbers in the olfactory and trigeminal nerves, mainly within the endoneurium. In contrast, CD8⁺ cells were predominantly located in the perineurium. Olfactory nerves showed a higher average CD3⁺ cell density than trigeminal nerves, though the difference did not reach statistical significance ($p = 0.055$). No differences were observed between the nerve types for CD8⁺ and CD68⁺ cells. In the olfactory bulb, CD3⁺, CD8⁺, and CD68⁺ immune cells were primarily detected in the glomerular and outer plexiform layers. ACE2 expression was markedly higher in the respiratory epithelium, vascular endothelium, and the epineurium of the olfactory nerves. The SARS-CoV-2 spike protein was only focally detected in individual OE samples but appeared more frequently in the RE and in the perineurium of olfactory and trigeminal nerves. In the olfactory bulb, the spike protein was predominantly localized to the glomerular layer. It was also sporadically detected in arterial and venous vessels.

CONCLUSIONS: This study demonstrates that COVID-19 is associated with marked systemic lymphopenia and a concurrent selective reduction of CD3⁺ T cells in the olfactory epithelium. This local T cell deficit may be linked to the presence of spike protein in blood vessels and along olfactory and trigeminal fibers extending into the glomerular layer of the olfactory bulb. The findings support models proposing that severe COVID-19 cases involve an insufficient early antiviral response followed by hyperinflammation, which compromises immune defense and may facilitate neuroinvasive entry routes. Clinically, this raises the question of whether vaccination or immunomodulatory strategies could strengthen the local T cell response and thereby reduce the risk of persistent smell loss and potential CNS symptoms. The significance of the findings is limited by the small sample size. Future studies should therefore include larger, variant-specific cohorts, multimodal detection methods (qPCR, RNA-Scope, electron microscopy), and prospective testing of olfaction and chemesthesis to better understand the role of the nasal immune response in the development of post-COVID smell disorders.

Literaturverzeichnis

- Abd El-Aziz, T. M., Al-Sabi, A. & Stockand, J. D. (2020). Human recombinant soluble ACE2 (hrsACE2) shows promise for treating severe COVID-19. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 258. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00374-6>
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Baker, H., Grillo, M. & Margolis, F. L. [F. L.] (1989). Biochemical and immunocytochemical characterization of olfactory marker protein in the rodent central nervous system. *The Journal of comparative neurology*, 285(2), 246–261. <https://doi.org/10.1002/cne.902850207>
- Beranek, J. T. (2005). CD68 is not a macrophage-specific antigen. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(2), 342-3; author reply 343-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15647451/>
- Bergwerk, M., Gonen, T., Lustig, Y., Amit, S., Lipsitch, M., Cohen, C., Mandelboim, M., Levin, E. G., Rubin, C., Indenbaum, V., Tal, I., Zavitan, M., Zuckerman, N., Bar-Chaim, A., Kreiss, Y. & Regev-Yochay, G. (2021). Covid-19 Breakthrough Infections in Vaccinated Health Care Workers. *The New England journal of medicine*, 385(16), 1474–1484. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2109072>
- Bertoletti, A., Le Bert, N. & Tan, A. T. (2022). SARS-CoV-2-specific T cells in the changing landscape of the COVID-19 pandemic. *Immunity*, 55(10), 1764–1778. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.008>
- Best Rocha, A., Stroberg, E., Barton, L. M., Duval, E. J., Mukhopadhyay, S., Yarid, N., Caza, T., Wilson, J. D., Kenan, D. J., Kuperman, M., Sharma, S. G. & Larsen, C. P. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using commercially available reagents. *Laboratory Investigation*, 100(11), 1485–1489. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0464-x>
- Bestle, D., Heindl, M. R., Limburg, H., van Lam van, T., Pilgram, O., Moulton, H., Stein, D. A., Harges, K., Eickmann, M., Dolnik, O., Rohde, C., Klenk, H.-D., Garten, W., Steinmetzer, T. & Böttcher-Friebertshäuser, E. (2020). TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life science alliance*, 3(9). <https://doi.org/10.26508/lsa.202000786>
- Boccaccio, A., Menini, A. & Pifferi, S. (2021). The cyclic AMP signaling pathway in the rodent main olfactory system. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 429–443. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03391-7>
- Boscolo-Rizzo, P., Hummel, T., Invitto, S., Spinato, G., Tomasoni, M., Emanuelli, E., Tofanelli, M., Cavicchia, A., Grill, V., Vaira, L. A., Lechien, J. R., Borsetto, D., Polesel, J., Dibattista, M., Menini, A., Hopkins, C. & Tirelli, G. (2023). Psychophysical

- assessment of olfactory and gustatory function in post-mild COVID-19 patients: A matched case-control study with 2-year follow-up. *International forum of allergy & rhinology*, 13(10), 1864–1875. <https://doi.org/10.1002/alr.23148>
- Bourgon, C., Albin, A. S., Ando-Grard, O., Da Costa, B., Domain, R., Korkmaz, B., Klonjowski, B., Le Poder, S. & Meunier, N. (2022). Neutrophils play a major role in the destruction of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection in hamsters. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 79(12), 616. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04643-1>
- Brann, D. H., Tsukahara, T., Weinreb, C., Lipovsek, M., van den Berge, K., Gong, B., Chance, R., Macaulay, I. C., Chou, H.-J., Fletcher, R. B., Das, D., Street, K., Bezieux, H. R. de, Choi, Y.-G., Risso, D., Dudoit, S., Purdom, E., Mill, J., Hachem, R. A., . . . Datta, S. R. (2020). Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Science advances*, 6(31). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5801>
- Bryche, B., St Albin, A., Murri, S., Lacôte, S., Pulido, C., Ar Gouilh, M., Lesellier, S., Servat, A., Wasniewski, M., Picard-Meyer, E., Monchatre-Leroy, E., Volmer, R., Rampin, O., Le Goffic, R., Marianneau, P. & Meunier, N. (2020). Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain, behavior, and immunity*, 89, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.032>
- Butowt, R. & Bartheld, C. S. von (2022). The route of SARS-CoV-2 to brain infection: have we been barking up the wrong tree? *Molecular neurodegeneration*, 17(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00529-9>
- Butowt, R., Bilinska, K. & Bartheld, C. S. von (2023). Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. *Trends in neurosciences*, 46(1), 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.11.003>
- Butowt, R., Meunier, N., Bryche, B. & Bartheld, C. S. von (2021). The olfactory nerve is not a likely route to brain infection in COVID-19: a critical review of data from humans and animal models. *Acta neuropathologica*, 141(6), 809–822. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02314-2>
- Candia, P. de, Prattichizzo, F., Garavelli, S. & Matarese, G. (2021). T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. *Trends in immunology*, 42(1), 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.11.002>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S3-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chen, M., Pekosz, A., Villano, J. S., Shen, W., Zhou, R [Ruifeng], Kulaga, H., Li, Z [Zhexuan], Smith, A., Gurung, A., Beck, S. E., Witwer, K. W., Mankowski, J. L., Ramanathan, M.,

- Rowan, N. R. & Lane, A. P. (2024). Evolution of nasal and olfactory infection characteristics of SARS-CoV-2 variants. *The Journal of clinical investigation*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1172/JCI174439>
- Chen, S [Shunmei] & Wang, S [Shufen] (2023). The immune mechanism of the nasal epithelium in COVID-19-related olfactory dysfunction. *Frontiers in immunology*, 14, 1045009. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1045009>
- Chen, Y [Yanxia], Yu, D., Qian, H., Shi, Y. & Tao, Z. (2024). CD8+ T cell-based cancer immunotherapy. *Journal of Translational Medicine*, 22(1), 394. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05134-6>
- Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. (2017). CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 97(1), 4–13. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. & Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annual review of immunology*, 6, 629–662. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.06.040188.003213>
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Daly, J. L., Simonetti, B., Klein, K., Chen, K.-E., Williamson, M. K., Antón-Plágaro, C., Shoemark, D. K., Simón-Gracia, L., Bauer, M., Hollandi, R., Greber, U. F., Horvath, P., Sessions, R. B., Helenius, A., Hiscox, J. A., Teesalu, T., Matthews, D. A., Davidson, A. D., Collins, B. M., . . . Yamauchi, Y. (2020). Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6518), 861–865. <https://doi.org/10.1126/science.abd3072>
- Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C., Jarvis, C. I., Kucharski, A. J., Munday, J. D., Pearson, C. A. B., Russell, T. W., Tully, D. C., Washburne, A. D., Wenseleers, T., Gimma, A., Waites, W., Wong, K. L. M., van Zandvoort, K., Silverman, J. D., Diaz-Ordaz, K., Keogh, R., Eggo, R. M., . . . Edmunds, W. J. (2021). Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science (New York, N.Y.)*, 372(6538). <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
- Dibattista, M., Al Koborssy, D., Genovese, F. & Reisert, J. (2021). The functional relevance of olfactory marker protein in the vertebrate olfactory system: a never-ending story. *Cell and tissue research*, 383(1), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03349-9>
- Doty, R. L. (2009). The olfactory system and its disorders. *Seminars in neurology*, 29(1), 74–81. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1124025>

- Doty, R. L. (Hrsg.). (2015). *Handbook of olfaction and gustation* (Third edition). Wiley Blackwell. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118971758>
<https://doi.org/10.1002/9781118971758>
- Eyre, D. W., Taylor, D., Purver, M., Chapman, D., Fowler, T., Pouwels, K. B., Walker, A. S. & Peto, T. E. A. (2022). Effect of Covid-19 Vaccination on Transmission of Alpha and Delta Variants. *The New England journal of medicine*, 386(8), 744–756. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116597>
- Farbman, A. I., Buchholz, J. A., Walters, E. & Margolis, F. L [F. L.] (1998). Does olfactory marker protein participate in olfactory neurogenesis? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855, 248–251. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10576.x>
- Farbman, A. I. & Margolis, F. L [F. L.] (1980). Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Developmental biology*, 74(1), 205–215. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90062-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90062-7)
- Fehr, A. R. & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1282, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Finlay, J. B., Brann, D. H., Abi Hachem, R., Jang, D. W., Oliva, A. D., Ko, T., Gupta, R., Wellford, S. A., Moseman, E. A., Jang, S. S., Yan, C. H., Matsunami, H., Tsukahara, T., Datta, S. R. & Goldstein, B. J. (2022). Persistent post-COVID-19 smell loss is associated with immune cell infiltration and altered gene expression in olfactory epithelium. *Science translational medicine*, 14(676), eadd0484. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.add0484>
- Fitzek, M., Patel, P. K., Solomon, P. D., Lin, B., Hummel, T., Schwob, J. E. & Holbrook, E. H. (2022). Integrated age-related immunohistological changes occur in human olfactory epithelium and olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology*, 530(12), 2154–2175. <https://doi.org/10.1002/cne.25325>
- Frasnelli, J., Albrecht, J., Bryant, B. & Lundström, J. N. (2011). Perception of specific trigeminal chemosensory agonists. *Neuroscience*, 189, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.04.065>
- Gallo, O., Locatello, L. G., Mazzoni, A., Novelli, L. & Annunziato, F. (2021). The central role of the nasal microenvironment in the transmission, modulation, and clinical progression of SARS-CoV-2 infection. *Mucosal Immunology*, 14(2), 305–316. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00359-2>
- Gao, F., Mallajosyula, V., Arunachalam, P. S., van der Ploeg, K., Manohar, M., Röltgen, K., Yang, F., Wirz, O., Hoh, R., Haraguchi, E., Lee, J.-Y., Willis, R., Ramachandiran, V., Li, J., Kathuria, K. R., Li, C [Chunfeng], Lee, A. S., Shah, M. M., Sindher, S. B., . . . Davis, M. M. (2023). Spheromers reveal robust T cell responses to the Pfizer/BioNTech

- vaccine and attenuated peripheral CD8⁺ T cell responses post SARS-CoV-2 infection. *Immunity*, 56(4), 864-878.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.03.005>
- Gao, L., Zhou, J [Jing], Yang, S [Sen], Wang, L., Chen, X [Xiangyu], Yang, Y., Li, R., Pan, Z., Zhao, J [Jing], Li, Z [Zhirong], Huang, Q [Qizhao], Tang, J., Hu, L., Liu, P., Zhang, G., Chen, Y [Yaokai] & Ye, L. (2021). The dichotomous and incomplete adaptive immunity in COVID-19 patients with different disease severity. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 113. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00525-3>
- Gebhart, V. M., Rodewald, A., Wollbaum, E., Hertel, K., Bitter, T. & Jirikowski, G. F. (2019). Evidence for accessory chemosensory cells in the adult human nasal cavity. *Journal of chemical neuroanatomy*, 104, 101732. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101732>
- Giri, D. (2018). *Hematoxylin and Eosin (H&E) Staining : Principle, Procedure and Interpretation*. <https://laboratorytests.org/hematoxylin-and-eosin-staining/>
- Gottfried, E., Kunz-Schughart, L. A., Weber, A [A.], Rehli, M., Peuker, A., Müller, A., Kastenberger, M., Brockhoff, G., Andreesen, R. & Kreutz, M. (2008). Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scandinavian journal of immunology*, 67(5), 453–463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x>
- Graham, M. S., Sudre, C. H., May, A., Antonelli, M., Murray, B., Varsavsky, T., Kläser, K., Canas, L. S., Molteni, E., Modat, M., Drew, D. A., Nguyen, L. H., Polidori, L., Selvachandran, S., Hu, C., Capdevila, J., Hammers, A., Chan, A. T., Wolf, J., . . . Ourselin, S. (2021). Changes in symptomatology, reinfection, and transmissibility associated with the SARS-CoV-2 variant B.1.1.7: an ecological study. *The Lancet. Public health*, 6(5), e335-e345. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00055-4](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00055-4)
- Guan, W.-J., Ni, Z.-Y., Hu, Y [Yu], Liang, W.-H., Ou, C.-Q., He, J.-X., Liu, L [Lei], Shan, H., Lei, C.-L., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L.-J., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R.-C., Tang, C.-L., Wang, T., Chen, P.-Y., Xiang, J., . . . Zhong, N.-S. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *The New England journal of medicine*, 382(18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
- Hall, V., Foulkes, S., Insalata, F., Kirwan, P., Saei, A., Atti, A., Wellington, E., Khawam, J., Munro, K., Cole, M., Tranquillini, C., Taylor-Kerr, A., Hettiarachchi, N., Calbraith, D., Sajedi, N., Milligan, I., Themistocleous, Y., Corrigan, D., Cromey, L., . . . Hopkins, S. (2022). Protection against SARS-CoV-2 after Covid-19 Vaccination and Previous Infection. *The New England journal of medicine*, 386(13), 1207–1220. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2118691>
- Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L. C., Lely, A. T., Navis, G. J. & van Goor, H. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A

- first step in understanding SARS pathogenesis. *The Journal of pathology*, 203(2), 631–637. <https://doi.org/10.1002/path.1570>
- Hantschke, M. & Palmedo, G. (2016). Immunhistologische Techniken. In L. Cerroni, C. Garbe, D. Metze, H. Kutzner & H. Kerl (Hrsg.), *Springer Reference Medizin. Histopathologie der Haut: 84 Tabellen* (2. Auflage, S. 15–35). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45133-5_2
- Harkema, J. R., Carey, S. A. & Wagner, J. G. (2006). The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicologic pathology*, 34(3), 252–269. <https://doi.org/10.1080/01926230600713475>
- Hartman, B. K. & Margolis, F. L. [F. L.] (1975). Immunofluorescence localization of the olfactory marker protein. *Brain Research*, 96(1), 176–180. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90593-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90593-4)
- Hatton, C. F., Botting, R. A., Dueñas, M. E., Haq, I. J., Verdon, B., Thompson, B. J., Spegarova, J. S., Gothe, F., Stephenson, E., Gardner, A. I., Murphy, S., Scott, J., Garnett, J. P., Carrie, S., Powell, J., Khan, C. M. A., Huang, L., Hussain, R., Coxhead, J., . . . Duncan, C. J. A. (2021). Delayed induction of type I and III interferons mediates nasal epithelial cell permissiveness to SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 12(1), 7092. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27318-0>
- Hernandez, A. K. & Hummel, T. (2023). Intranasal trigeminal function in chronic rhinosinusitis: a review. *Expert review of clinical immunology*, 19(8), 921–938. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2023.2231149>
- Hikmet, F., Méar, L., Edvinsson, Å., Micke, P., Uhlén, M. & Lindskog, C. (2020). The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Molecular systems biology*, 16(7), e9610. <https://doi.org/10.15252/msb.20209610>
- Ho, C.-Y., Salimian, M., Hegert, J., O'Brien, J., Choi, S. G., Ames, H., Morris, M., Papadimitriou, J. C., Mininni, J., Niehaus, P., Burke, A., Canbeldek, L., Jacobs, J., LaRocque, A., Patel, K., Rice, K., Li, L., Johnson, R., LeFevre, A., . . . Drachenberg, C. (2022). Postmortem Assessment of Olfactory Tissue Degeneration and Microvasculopathy in Patients With COVID-19. *JAMA neurology*, 79(6), 544–553. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2022.0154>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C. & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B. & Pöhlmann, S. (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus

- receptor for cellular entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 7988–7993.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0409465102>
- Holbrook, E. H., Rebeiz, L. & Schwob, J. E. (2016). Office-based olfactory mucosa biopsies. *International forum of allergy & rhinology*, 6(6), 646–653.
<https://doi.org/10.1002/alr.21711>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J [Jianping], Hu, Y [Yi], Zhang, L [Li], Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J [Jiaan], Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., . . . Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497–506.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Huang, Z.-X., Li, W [Wenli], Lu, E., Yan, X., Lin, J. & Zhuo, L. (2020). Peripheral blood CD4+ cell counts but not CD3+ and CD8+ cell counts are reduced in SARS-CoV-2 infection. *Journal of affective disorders*, 277, 375–378. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.08.037>
- Joshi, H. C. & Cleveland, D. W. (1989). Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. *The Journal of cell biology*, 109(2), 663–673.
<https://doi.org/10.1083/jcb.109.2.663>
- Kaku, Y., Okumura, K., Kawakubo, S., Uriu, K., Chen, L., Kosugi, Y., Uwamino, Y., Begum, M. M., Leong, S., Ikeda, T., Sadamasu, K., Asakura, H., Nagashima, M., Yoshimura, K., Ito, J. & Sato, K. (2024). Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XEC variant. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(12), e736.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00731-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00731-X)
- Kang, N., Kim, H., Jae, Y., Lee, N., Ku, C. R., Margolis, F., Lee, E. J., Bahk, Y. Y., Kim, M.-S. & Koo, J. (2015). Olfactory marker protein expression is an indicator of olfactory receptor-associated events in non-olfactory tissues. *PloS one*, 10(1), e0116097.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116097>
- Katsetos, C. D., Herman, M. M. & Mörk, S. J. (2003). Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 55(2), 77–96.
<https://doi.org/10.1002/cm.10116>
- Keller, A. & Margolis, F. L [F. L.] (1975). Immunological studies of the rat olfactory marker protein. *Journal of neurochemistry*, 24(6), 1101–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1975.tb03883.x>
- Khan, M., Yoo, S.-J., Clijsters, M., Backaert, W., Vanstapel, A., Speleman, K., Lietaer, C., Choi, S., Hether, T. D., Marcelis, L., Nam, A., Pan, L., Reeves, J. W., van Bulck, P., Zhou, H., Bourgeois, M., Debaveye, Y., Munter, P. de, Gunst, J., . . . van Gerven, L. (2021). Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the

- respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell*, 184(24), 5932-5949.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.027>
- Kirschenbaum, D., Imbach, L. L., Rushing, E. J., Frauenknecht, K. B. M., Gascho, D., Ineichen, B. V., Keller, E., Kohler, S., Lichtblau, M., Reimann, R. R., Schreib, K., Ulrich, S., Steiger, P., Aguzzi, A. & Frontzek, K. (2021). Intracerebral endotheliitis and microbleeds are neuropathological features of COVID-19. *Neuropathology and applied neurobiology*, 47(3), 454–459. <https://doi.org/10.1111/nan.12677>
- Kirschenbaum, D., Imbach, L. L., Ulrich, S., Rushing, E. J., Keller, E., Reimann, R. R., Frauenknecht, K. B. M., Lichtblau, M., Witt, M., Hummel, T., Steiger, P., Aguzzi, A. & Frontzek, K. (2020). Inflammatory olfactory neuropathy in two patients with COVID-19. *Lancet (London, England)*, 396(10245), 166. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31525-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31525-7)
- Koo, J. H., Gill, S., Pannell, L. K., Menco, B. P. M., Margolis, J. W. & Margolis, F. L. (2004). The interaction of Bex and OMP reveals a dimer of OMP with a short half-life. *Journal of neurochemistry*, 90(1), 102–116. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02463.x>
- Koo, J. H., Saraswati, M. & Margolis, F. L. (2005). Immunolocalization of Bex protein in the mouse brain and olfactory system. *The Journal of comparative neurology*, 487(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/cne.20486>
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., Silva, T. I. de, McDanal, C., Perez, L. G., Tang, H., . . . Montefiori, D. C. (2020). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, 182(4), 812-827.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>
- Krasemann, S., Dittmayer, C., Stillfried, S. von, Meinhardt, J., Heinrich, F., Hartmann, K., Pfefferle, S., Thies, E., Manitius, R. von, Aschman, T. A. D., Radke, J., Osterloh, A., Schmid, S., Buhl, E. M., Ihlow, J., Dubois, F., Arnhold, V., Elezkurtaj, S., Horst, D., . . . Glatzel, M. (2022). Assessing and improving the validity of COVID-19 autopsy studies - A multicentre approach to establish essential standards for immunohistochemical and ultrastructural analyses. *EBioMedicine*, 83, 104193. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104193>
- Krasemann, S., Haferkamp, U., Pfefferle, S., Woo, M. S., Heinrich, F., Schweizer, M., Appelt-Menzel, A., Cubukova, A., Barenberg, J., Leu, J., Hartmann, K., Thies, E., Littau, J. L., Sepulveda-Falla, D., Zhang, L [Liang], Ton, K., Liang, Y., Matschke, J., Ricklefs, F., . . . 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. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.12.011>

- Kunisch, E., Fuhrmann, R., Roth, A., Winter, R., Lungershausen, W. & Kinne, R. W. (2004). Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Annals of the rheumatic diseases*, 63(7), 774–784. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.013029>
- Lambert, D. W., Yarski, M., Warner, F. J., Thornhill, P., Parkin, E. T., Smith, A. I., Hooper, N. M. & Turner, A. J. (2005). Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *The Journal of biological chemistry*, 280(34), 30113–30119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505111200>
- Lang, G. (2006). Immunhistochemie. In G. Lang (Hrsg.), *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik ; [für MTA und biomedizinische AnalytikerInnen* (S. 257–294). Springer. https://doi.org/10.1007/3-211-33142-5_12
- Laue, M., Kauter, A., Hoffmann, T., Möller, L., Michel, J. & Nitsche, A. (2021). Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Scientific Reports*, 11(1), 3515. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82852-7>
- Lechien, J. R., Chiesa-Estomba, C. M., Siati, D. R. de, Horoi, M., Le Bon, S. D., Rodriguez, A., Dequanter, D., Blečić, S., El Afia, F., Distinguin, L., Chekkoury-Idrissi, Y., Hans, S., Delgado, I. L., Calvo-Henriquez, C., Lavigne, P., Falanga, C., Barillari, M. R., Cammaroto, G., Khalife, M., . . . Saussez, S. (2020). Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 277(8), 2251–2261. <https://doi.org/10.1007/s00405-020-05965-1>
- Lee, M. K., Rebhun, L. I. & Frankfurter, A. (1990). Posttranslational modification of class III beta-tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(18), 7195–7199. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7195>
- Lee, M.-H., Perl, D. P., Nair, G., Li, W [Wenxue], Maric, D., Murray, H., Dodd, S. J., Koretsky, A. P., Watts, J. A., Cheung, V., Masliah, E., Horkayne-Szakaly, I., Jones, R., Stram, M. N., Moncur, J., Hefti, M., Folkerth, R. D. & Nath, A. (2021). Microvascular Injury in the Brains of Patients with Covid-19. *The New England journal of medicine*, 384(5), 481–483. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2033369>
- Li, Y [Yili], Yin, Y. & Mariuzza, R. A. (2013). Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation. *Frontiers in immunology*, 4, 206. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00206>

- Liu, J., Lu, F., Chen, Y [Yinghua], Plow, E. & Qin, J [Jun] (2022). Integrin mediates cell entry of the SARS-CoV-2 virus independent of cellular receptor ACE2. *The Journal of biological chemistry*, 298(3), 101710. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101710>
- Liu, Z., Long, W., Tu, M., Chen, S [Sichao], Huang, Y., Wang, S [Shipei], Zhou, W., Chen, D [Danyang], Zhou, L [Ling], Wang, M., Wu, M., Huang, Q [Qi], Xu, H [Haibo], Zeng, W. & Guo, L [Liang] (2020). Lymphocyte subset (CD4+, CD8+) counts reflect the severity of infection and predict the clinical outcomes in patients with COVID-19. *The Journal of infection*, 81(2), 318–356. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.054>
- Mallajosyula, V., Ganjavi, C., Chakraborty, S., McSween, A. M., Pavlovitch-Bedzyk, A. J., Wilhelmy, J., Nau, A., Manohar, M., Nadeau, K. C. & Davis, M. M. (7. Januar 2021). CD8+ T cells specific for conserved coronavirus epitopes correlate with milder disease in patients with COVID-19. *American Association for the Advancement of Science*. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abg5669>
- Manduch, M., Dexter, D. F., Jalink, D. W., Vanner, S. J. & Hurlbut, D. J. (2009). Undifferentiated pancreatic carcinoma with osteoclast-like giant cells: report of a case with osteochondroid differentiation. *Pathology, research and practice*, 205(5), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2008.11.006>
- Mason, D. Y., Cordell, J., Brown, M., Pallesen, G., Ralfkiaer, E., Rothbard, J., Crumpton, M. & Gatter, K. C. (1989). Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *Journal of clinical pathology*, 42(11), 1194–1200. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.11.1194>
- Mason, D. Y., Cordell, J. L., Gaulard, P., Tse, A. G. & Brown, M. H. (1992). Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence. *Journal of clinical pathology*, 45(12), 1084–1088. <https://doi.org/10.1136/jcp.45.12.1084>
- Matschke, J., Lütgehetmann, M., Hagel, C., Sperhake, J. P., Schröder, A. S., Edler, C., Mushumba, H., Fitzek, A., Allweiss, L., Dandri, M., Dottermusch, M., Heinemann, A., Pfefferle, S., Schwabenland, M., Sumner Magruder, D., Bonn, S., Prinz, M., Gerloff, C., Püschel, K., . . . Glatzel, M. (2020). Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *The Lancet. Neurology*, 19(11), 919–929. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30308-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30308-2)
- McCluggage, W. G. & Maxwell, P. (1999). Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. Anthony S.-Y. Leong, Kum Cooper and F. Joel W.-M. Leong. Greenwich Medical Media Ltd., London, 1999. Distributed worldwide by Oxford University Press. No. of pages: 385. ISBN: 1 900151 316. *The Journal of Pathology*, 188(3), 338–339. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199907\)188:3<338::AID-PATH383>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199907)188:3<338::AID-PATH383>3.0.CO;2-2)

- Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C., Franz, J., Thomas, C., Mothes, R., Laue, M., Schneider, J., Brünink, S., Greuel, S., Lehmann, M., Hassan, O., Aschman, T., Schumann, E., Chua, R. L., Conrad, C [Christian], Eils, R., Stenzel, W., Windgassen, M., . . . Heppner, F. L. (2021). Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nature Neuroscience*, 24(2), 168–175. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5>
- Meinhardt, J., Streit, S., Dittmayer, C., Manitus, R. V., Radbruch, H. & Heppner, F. L. (2024). The neurobiology of SARS-CoV-2 infection. *Nature reviews. Neuroscience*, 25(1), 30–42. <https://doi.org/10.1038/s41583-023-00769-8>
- Menco, B. P. (1989). Olfactory and nasal respiratory epithelia, and foliate taste buds visualized with rapid-freeze freeze-substitution and Lowicryl K11M embedding. Ultrastructural and initial cytochemical studies. *Scanning Microscopy*, 3(1), 257–272.
- Minervina, A. A., Komech, E. A., Titov, A., Bensouda Koraichi, M., Rosati, E., Mamedov, I. Z., Franke, A., Efimov, G. A., Chudakov, D. M., Mora, T., Walczak, A. M., Lebedev, Y. B. & Pogorelyy, M. V. (2021). Longitudinal high-throughput TCR repertoire profiling reveals the dynamics of T-cell memory formation after mild COVID-19 infection. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.63502>
- Minkoff, J. M. & tenOever, B. (2023). Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 21(3), 178–194. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00839-1>
- Mrcochova, P., Kemp, S. A., Dhar, M. S., Papa, G., Meng, B., Ferreira, I. A. T. M., Datir, R., Collier, D. A., Albecka, A., Singh, S., Pandey, R., Brown, J., Zhou, J [Jie], Goonawardane, N., Mishra, S., Whittaker, C., Mellan, T., Marwal, R., Datta, M., . . . Gupta, R. K. (2021). SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature*, 599(7883), 114–119. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03944-y>
- Monti-Graziadei, G. A., Margolis, F. L [F. L.], Harding, J. W. & Graziadei, P. P. (1977). Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 25(12), 1311–1316. <https://doi.org/10.1177/25.12.336785>
- Moreira, T. G., Matos, K. T. F., Paula, G. S. de, Santana, T. M. M., Da Mata, R. G., Panseira, F. C., Cortina, A. S., Spinola, M. G., Baecher-Allan, C. M., Keppeke, G. D., Jacob, J., Palejwala, V., Chen, K., Izzy, S., Healey, B. C., Rezende, R. M., Dedivitis, R. A., Shailubhai, K. & Weiner, H. L. (2021). Nasal Administration of Anti-CD3 Monoclonal Antibody (Foralumab) Reduces Lung Inflammation and Blood Inflammatory Biomarkers in Mild to Moderate COVID-19 Patients: A Pilot Study. *Frontiers in immunology*, 12, 709861. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.709861>

- Mori, K. & Sakano, H. (2011). How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain? *Annual review of neuroscience*, 34, 467–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-112210-112917>
- Moriguchi, T., Harii, N., Goto, J., Harada, D., Sugawara, H., Takamino, J., Ueno, M., Sakata, H., Kondo, K., Myose, N., Nakao, A., Takeda, M. [Masayuki], Haro, H., Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., Kubokawa, K., Ogihara, S., Sasaki, T., Kinouchi, H., . . . Shimada, S. (2020). A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 94, 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.062>
- Morrison, E. E. & Costanzo, R. M. (1992). Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microscopy research and technique*, 23(1), 49–61. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070230105>
- Nicolai, L., Leunig, A., Brambs, S., Kaiser, R., Weinberger, T., Weigand, M., Muenchhoff, M., Hellmuth, J. C., Ledderose, S., Schulz, H., Scherer, C., Rudelius, M., Zoller, M., Höchter, D., Keppler, O., Teupser, D., Zwißler, B., Bergwelt-Baildon, M. von, Kääb, S., . . . Stark, K. (2020). Immunothrombotic Dysregulation in COVID-19 Pneumonia Is Associated With Respiratory Failure and Coagulopathy. *Circulation*, 142(12), 1176–1189. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048488>
- O'Reilly, D., Quinn, C. M., El-Shanawany, T., Gordon, S. & Greaves, D. R. (2003). Multiple Ets factors and interferon regulatory factor-4 modulate CD68 expression in a cell type-specific manner. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), 21909–21919. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212150200>
- Otte, M. S., Bork, M.-L., Zimmermann, P. H., Klußmann, J. P. & Lüers, J.-C. (2022). Patients with COVID-19-associated olfactory impairment also show impaired trigeminal function. *Auris, nasus, larynx*, 49(1), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2021.07.012>
- Ou, X., Liu, Y [Yan], Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L [Li], Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X [Xing], Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J [Jianwei] & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*, 11(1), 1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>
- Paniskaki, K., Konik, M. J., Anft, M., Heidecke, H., Meister, T. L., Pfaender, S., Krawczyk, A., Zettler, M., Jäger, J., Gaeckler, A., Dolff, S., Westhoff, T. H., Rohn, H., Stervbo, U., Scheibenbogen, C., Witzke, O. & Babel, N. (2023). Low avidity circulating SARS-CoV-2 reactive CD8+ T cells with proinflammatory TEMRA phenotype are associated with

- post-acute sequelae of COVID-19. *Frontiers in microbiology*, 14, 1196721. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1196721>
- Peidli, S., Nouailles, G., Wyler, E., Adler, J. M., Kunder, S., Voß, A., Kazmierski, J., Pott, F., Pennitz, P., Postmus, D., Teixeira Alves, L. G., Goffinet, C., Gruber, A. D., Blüthgen, N., Witzernath, M., Trimpert, J., Landthaler, M. & Praktiknjo, S. D. (2024). Single-cell-resolved interspecies comparison shows a shared inflammatory axis and a dominant neutrophil-endothelial program in severe COVID-19. *Cell Reports*, 43(6), 114328. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114328>
- Qin, C., Zhou, L [Luoqi], Hu, Z., Zhang, S., Yang, S [Sheng], Tao, Y., Xie, C., Ma, K., Shang, K., Wang, W [Wei] & Tian, D.-S. (2020). Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 762–768. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
- Redd, A. D., Nardin, A., Kared, H., Bloch, E. M., Pekosz, A., Laeyendecker, O., Abel, B., Fehlings, M., Quinn, T. C. & Tobian, A. A. (2021). CD8+ T cell responses in COVID-19 convalescent individuals target conserved epitopes from multiple prominent SARS-CoV-2 circulating variants. *medRxiv : the preprint server for health sciences*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1101/2021.02.11.21251585>
- Robles, J. P., Zamora, M., Adan-Castro, E., Siqueiros-Marquez, L., La Martinez de Escalera, G. & Clapp, C. (2022). The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin $\alpha 5 \beta 1$ and NF- κ B signaling. *The Journal of biological chemistry*, 298(3), 101695. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101695>
- Roukens, A. H. E., Pothast, C. R., König, M., Huisman, W., Dalebout, T., Tak, T., Azimi, S., Kruize, Y., Hagedoorn, R. S., Zlei, M., Staal, F. J. T., Bie, F. J. de, van Dongen, J. J. M., Arbous, S. M., Zhang, J. L. H., Verheij, M., Prins, C., van der Does, A. M., Hiemstra, P. S., . . . Jochems, S. P. (2022). Prolonged activation of nasal immune cell populations and development of tissue-resident SARS-CoV-2-specific CD8+ T cell responses following COVID-19. *Nature immunology*, 23(1), 23–32. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01095-w>
- Rydyznski Moderbacher, C., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Grifoni, A., Hastie, K. M., Weiskopf, D., Belanger, S., Abbott, R. K., Kim, C [Christina], Choi, J., Kato, Y., Crotty, E. G., Kim, C [Cheryl], Rawlings, S. A., Mateus, J., Tse, L. P. V., Frazier, A., Baric, R., Peters, B., . . . Crotty, S. (2020). Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, 183(4), 996-1012.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>
- Saint Basile, G. de, Geissmann, F., Flori, E., Uring-Lambert, B., Soudais, C [Claire], Cavazzana-Calvo, M., Durandy, A., Jabado, N., Fischer, A [Alain] & Le Deist, F

- [Françoise] (2004). Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *Journal of Clinical Investigation*, 114(10), 1512–1517. <https://doi.org/10.1172/JCI22588>
- Sauermost, R. & Freudig, D. (2018). *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/haematoxylin-eosin-faerbung/30477>
- Schulte-Schrepping, J., Reusch, N., Paclik, D., Baßler, K., Schlickeiser, S., Zhang, B., Krämer, B., Krammer, T., Brumhard, S., Bonaguro, L., Domenico, E. de, Wendisch, D., Grasshoff, M., Kapellos, T. S., Beckstette, M., Pecht, T., Saglam, A., Dietrich, O., Mei, H. E., . . . Sander, L. E. (2020). Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell*, 182(6), 1419-1440.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.001>
- Schwabenland, M., Salié, H., Tanevski, J., Killmer, S., Lago, M. S., Schlaak, A. E., Mayer, L., Matschke, J., Püschel, K., Fitzek, A., Ondruschka, B., Mei, H. E., Boettler, T., Neumann-Haefelin, C., Hofmann, M., Breithaupt, A., Genc, N., Stadelmann, C., Saez-Rodriguez, J., . . . Bengsch, B. (2021). Deep spatial profiling of human COVID-19 brains reveals neuroinflammation with distinct microanatomical microglia-T-cell interactions. *Immunity*, 54(7), 1594-1610.e11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.002>
- Song, E., Zhang, C., Israelow, B., Lu-Culligan, A., Prado, A. V., Skriabine, S., Lu, P., Weizman, O.-E., Liu, F., Dai, Y., Szigeti-Buck, K., Yasumoto, Y., Wang, G [Guilin], Castaldi, C., Heltke, J., Ng, E., Wheeler, J., Alfajaro, M. M., Levavasseur, E., . . . Iwasaki, A. (2021). Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *The Journal of experimental medicine*, 218(3). <https://doi.org/10.1084/jem.20202135>
- Soudais, C [C.], Villartay, J. P. de, Le Deist, F [F.], Fischer, A [A.] & Lisowska-Groszpiere, B. (1993). Independent mutations of the human CD3-epsilon gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. *Nature Genetics*, 3(1), 77–81. <https://doi.org/10.1038/ng0193-77>
- South, A. M., Diz, D. I. & Chappell, M. C. (2020). COVID-19, ACE2, and the cardiovascular consequences. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 318(5), H1084-H1090. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2020>
- Stillfried, S. von & Boor, P. (2021). Nachweismethoden von SARS-CoV-2 in Gewebe [Methods of SARS-CoV-2 detection in tissue]. *Der Pathologe*, 42(2), 208–215. <https://doi.org/10.1007/s00292-021-00919-8>
- Suades, R., Greco, M. F., Prieto, P., Padró, T., Devaux, Y., Domingo, P. & Badimon, L. (2024). CD66b+/CD68+ circulating extracellular vesicles, lactate dehydrogenase and neutrophil-to-lymphocyte ratio can differentiate coronavirus disease 2019 severity

- during and after infection. *Journal of extracellular vesicles*, 13(7), e12456. <https://doi.org/10.1002/jev2.12456>
- Sullivan, K. F. & Cleveland, D. W. (1986). Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), 4327–4331. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4327>
- Takeda, M [Makoto] (2022). Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein. *Microbiology and immunology*, 66(1), 15–23. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12945>
- Technical Advisory Group on SARS-CoV-2 Virus Evolution. (2024, 17. März). <https://www.who.int/groups/technical-advisory-group-on-sars-cov-2-virus-evolution>
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E. J., Msomi, N., Mlisana, K., Gottberg, A. von, Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A. J., Engelbrecht, S., van Zyl, G., . . . Oliveira, T. de (2021). Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*, 592(7854), 438–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>
- Tischfield, M. A., Baris, H. N., Wu, C., Rudolph, G., van Maldergem, L., He, W., Chan, W.-M., Andrews, C., Demer, J. L., Robertson, R. L., Mackey, D. A., Ruddle, J. B., Bird, T. D., Gottlob, I., Pieh, C., Traboulsi, E. I., Pomeroy, S. L., Hunter, D. G., Soul, J. S., . . . Engle, E. C. (2010). Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell*, 140(1), 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.011>
- Turner, A. J. ACE2 Cell Biology, Regulation, and Physiological Functions. In (S. 185–189). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801364-9.00025-0> (Erstveröffentlichung 2015)
- van Dongen, J. J., Quertermous, T., Bartram, C. R., Gold, D. P., Wolvers-Tettero, I. L., Comans-Bitter, W. M., Hooijkaas, H., Adriaansen, H. J., Klein, A. de & Raghavachar, A. (1987). T cell receptor-CD3 complex during early T cell differentiation. Analysis of immature T cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALL) at DNA, RNA, and cell membrane level. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 138(4), 1260–1269. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3100631/>
- Varga, Z., Flammer, A. J., Steiger, P., Haberecker, M., Andermatt, R., Zinkernagel, A. S., Mehra, M. R., Schuepbach, R. A., Ruschitzka, F. & Moch, H. (2020). Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet (London, England)*, 395(10234), 1417–1418. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30937-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5)
- Viana, R., Moyo, S., Amoako, D. G., Tegally, H., Scheepers, C., Althaus, C. L., Anyaneji, U. J., Bester, P. A., Boni, M. F., Chand, M [Mohammed], Choga, W. T., Colquhoun, R., Davids, M., Deforche, K., Doolabh, D., Du Plessis, L., Engelbrecht, S.,

- Everatt, J., Giandhari, J., . . . Oliveira, T. de (2022). Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature*, 603(7902), 679–686. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04411-y>
- Wang, R., Natarajan, K. & Margulies, D. H. (2009). Structural basis of the CD8 alpha beta/MHC class I interaction: focused recognition orients CD8 beta to a T cell proximal position. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(4), 2554–2564. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901276>
- Wang, W [Wenling], Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G. & Tan, W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*, 323(18), 1843–1844. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>
- Wanner, A., Salathé, M. & O'Riordan, T. G. (1996). Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(6 Pt 1), 1868–1902. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.6.8970383>
- Weiler, E., Apfelbach, R. & Farbman, A. I. (1999). The vomeronasal organ of the male ferret. *Chemical senses*, 24(2), 127–136. <https://doi.org/10.1093/chemse/24.2.127>
- Wellford, S. A. & Moseman, E. A. (2024). Olfactory immune response to SARS-CoV-2. *Cellular & molecular immunology*, 21(2), 134–143. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01119-5>
- Wellford, S. A., Moseman, A. P., Dao, K., Wright, K. E., Chen, A., Plevin, J. E., Liao, T.-C., Mehta, N. & Moseman, E. A. (2022). Mucosal plasma cells are required to protect the upper airway and brain from infection. *Immunity*, 55(11), 2118-2134.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.017>
- Whitaker, M., Elliott, J., Bodinier, B., Barclay, W., Ward, H., Cooke, G., Donnelly, C. A., Chadeau-Hyam, M. & Elliott, P. (2022). Variant-specific symptoms of COVID-19 in a study of 1,542,510 adults in England. *Nature Communications*, 13(1), 6856. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34244-2>
- Whiteland, J. L., Nicholls, S. M., Shimeld, C., Easty, D. L., Williams, N. A. & Hill, T. J. (1995). Immunohistochemical detection of T-cell subsets and other leukocytes in paraffin-embedded rat and mouse tissues with monoclonal antibodies. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 43(3), 313–320. <https://doi.org/10.1177/43.3.7868861>
- Xian, S.-P., Li, Z.-Y., Li, W [Wei], Yang, P.-F., Huang, S.-H., Liu, Y [Ye], Tang, L., Lai, J., Zeng, F.-M., He, J.-Z. & Liu, Y [Yang] (2024). Spatial immune landscapes of SARS-CoV-2 gastrointestinal infection: macrophages contribute to local tissue inflammation and gastrointestinal symptoms. *Frontiers in cell and developmental biology*, 12, 1375354. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1375354>

- Yan, W., Chen, D [Danrong], Bigambo, F. M., Wei, H., Wang, X. & Xia, Y [Yankai] (2021). Differences of blood cells, lymphocyte subsets and cytokines in COVID-19 patients with different clinical stages: a network meta-analysis. *BMC infectious diseases*, 21(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05847-9>
- Yang, G., Cao, J [Jinpeng], Qin, J [Jian], Mei, X., Deng, S., Xia, Y [Yingjiao], Zhao, J [Jun], Wang, J [Junxiang], Luan, T., Chen, D [Daxiang], Huang, P., Chen, C., Sun, X., Luo, Q., Su, J., Zhang, Y., Zhong, N. & Wang, Z. (2024). Initial COVID-19 severity influenced by SARS-CoV-2-specific T cells imprints T-cell memory and inversely affects reinfection. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 141. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01867-4>
- Zhou, D., Chan, J. F.-W., Zhou, B., Zhou, R [Runhong], Li, S., Shan, S., Liu, L [Li], Zhang, A. J., Chen, S. J., Chan, C. C.-S., Xu, H [Haoran], Poon, V. K.-M., Yuan, S., Li, C [Cun], Chik, K. K.-H., Chan, C. C.-Y., Cao, J [Jianli], Chan, C.-Y., Kwan, K.-Y., . . . Chen, Z [Zhiwei] (2021). Robust SARS-CoV-2 infection in nasal turbinates after treatment with systemic neutralizing antibodies. *Cell host & microbe*, 29(4), 551-563.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.019>
- Ziegler, C. G. K., Allon, S. J., Nyquist, S. K., Mbanjo, I. M., Miao, V. N., Tzouanas, C. N., Cao, Y., Yousif, A. S., Bals, J., Hauser, B. M., Feldman, J., Muus, C., Wadsworth, M. H., Kazer, S. W., Hughes, T. K., Doran, B., Gatter, G. J., Vukovic, M., Taliaferro, F., . . . Ordoñas-Montanes, J. (2020). SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell*, 181(5), 1016-1035.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035>
- Ziegler, C. G. K., Miao, V. N., Owings, A. H., Navia, A. W., Tang, Y., Bromley, J. D., Lotfy, P., Sloan, M., Laird, H., Williams, H. B., George, M., Drake, R. S., Christian, T., Parker, A., Sindel, C. B., Burger, M. W., Pride, Y., Hasan, M., Abraham, G. E., . . . Ordoñas-Montanes, J. (2021). Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. *bioRxiv : the preprint server for biology*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1101/2021.02.20.431155>
- Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., Yu, J., Kang, M., Song, Y., Xia, J [Jinyu], Guo, Q., Song, T., He, J., Yen, H.-L., Peiris, M. & Wu, J. (2020). SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *The New England journal of medicine*, 382(12), 1177–1179. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001737>
- Zuo, Y., Yalavarthi, S., Shi, H., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., Blair, C., Weber, A [Andrew], Barnes, B. J., Egeblad, M., Woods, R. J., Kanthi, Y. & Knight, J. S. (2020). Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI insight*, 5(11). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>

Anhang

Tabelle 9: Patientendaten der final eingeschlossenen Proben

Patientennummer	Geschlecht	Alter in Jahren	Zeitabstand Tod/Obduktion in Tagen	Spike-Protein nachgewiesen j/n
20/S 108-13	m	87	5	j
20/S 110-13	m	94	4	j
20/2/118 -13	m	88	1	j
21/S 12 -13	m	85	5	n
21/S 16 -13	w	92	5	j
21/S 24 -13	m	74	4	j
21/S 43-13	m	58	1	j
21/S 61-13	m	66	2	j
S21/102-13	m	70	19	j
21/S 132-13	w	73	7	n
21/S 134-14	w	56	1	n
21/S 140-13	w	69	1	j
22/S 14-13	w	80	4	n
22/S 9-14	w	87	6	j

Tabelle 12: Einbettungsprotokoll der histologischen Proben in Paraffin

Lösung	Dauer in min
70% Alkohol	60
80% Alkohol	60
95% Alkohol	60
99% Alkohol	60
99% Alkohol	60
99% Alkohol	60
Xylol	60
Xylol	60
Paraffin	60
Paraffin	60
Paraffin	60

Tabelle 15: Deparaffinisierung der Paraffinblöcke

Lösung	Dauer in min
100% Xylol	10
100% Xylol	10
100% Xylol	10
100% Xylol 100% Ethanol Verhältnis 1:1	5
100% Ethanol	3
100% Ethanol	3
96% Ethanol	3
96% Ethanol	3
70% Ethanol	3
70% Ethanol	3
50% Ethanol	3
Destilliertes Wasser	3

Tabelle 18: H.E.-Färbeprotokoll

Lösung	Dauer in min
Mayers Hämalaun Lösung	10
HCL- Alkohol	eintauchen
Laufendes Leitungswasser	15
Destilliertes Wasser	2
Eosin Lösung	2
Destilliertes Wasser	0.5
70% Ethanol	10
80% Ethanol	2
90% Ethanol	2
96% Ethanol	2
100% Ethanol	2
100% Ethanol	2
100% Xylol	10
100% Xylol	10
100% Xylol	10

Tabelle 20: Chemikalien und Flüssigkeiten

Chemikalien und Flüssigkeiten	Zusatzinformationen
ABC-HRP Kit, Peroxidase DePeX	Vectastain Elite (PK-6100) Serva, Heidelberg; Cat. No. 18243.02; LOT: 141024
Destilliertes Wasser (Aqua Dest.)	Hauseigene Herstellung
DAB (3,3'-Diaminobenzidin - tetrahydrochlorid)	Sigma- Aldrich; SKU: D5905; LOT: SLBJ8285V
Ethanol 99,9%	Berkel AHK Berlin; Index: 603-002-00-5
Eosin Lösung 1%	Klinik Apotheke Carl Gustav Carus, Dresden; Zusammensetzung: Eosin 8g, Aqua Dest. 50ml; Ethanol 96% 940ml
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck (1.07209.0250); LOT: K54376509222
Hämalaun nach Mayer	Klinik Apotheke Carl Gustav Carus, Dresden; Zusammensetzung: Hämatoxylin 1,0g, Natriumjodat 0,2g, Kalialaun 50,0g, Chloralhydrat 50,0g, Zitronensäure 1,0g; Aqua Dest. 1000,0g
Normal Goat Serum (NGS)	Vector Laboratories S-1000; LOT: ZD0730
Xylol/Xylene	VWR Chemicals BDH; CAS: 1330-20-7; LOT: 23C074024
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth; CAS: 1310-73-2
Salzsäure (HCl) 37%	EMSURE; CAS: 7647-01-0

pH- Einstellung:

2N NaOH-Lösung 80 g NaOH/Liter Aqua Dest.

2N HCl-Lösung 73 ml HCL/Liter Aqua Dest.