

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuropathologische Veränderungen bei schwerem COVID-19
Neuropathological changes in severe COVID-19

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jenny Meinhardt

aus Magdeburg

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Zusammenfassung	8
Abstract	10
1. Einführung	11
1.1. Humanpathogene Coronaviren	11
1.2. Neurologische Manifestationen einer SARS-CoV-2-Infektion.....	12
1.3. Die Riechschleimhaut - Schnittstelle zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Respirationstrakt.....	13
1.3.1. Der Aufbau der Riechschleimhaut	13
1.3.2. Die Riechschleimhaut als mögliche Eintrittspforte in das ZNS	16
1.3.3. Die Riechbahn.....	16
1.4. Molekulare Mechanismen des Zelleintritts von SARS-CoV-2	16
1.5. Bisherige neuropathologische Autopsiestudien an COVID-19 Verstorbenen.....	17
1.6. Zielsetzung	17
2. Materialien und Methodik	19
2.1. Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software	19
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	19
2.1.2. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3. Primär-, Sekundärantikörper und Färbekits	20
2.1.4. Geräte und Kits	21
2.1.5. Software	21
2.2. Studienpopulation und Datenerhebung.....	22
2.2.1. Ethikerklärung	22
2.3. Probengewinnung.....	22
2.3.1. Entnahme der ZNS-Gewebeproben	23
2.3.2. Entnahme der Riechschleimhaut.....	24
2.3.3. Entnahme von Liquor cerebrospinalis.....	25
2.3.4. Weitere asservierte Gewebeproben	25
2.4. Probenasservierung und -aufarbeitung	26
2.4.1. Asservierung für den PCR-Nachweis von SARS-CoV-2.....	26
2.4.2. Asservierung für histopathologische und immunhistochemische Analysen.....	26

2.4.3. Methoden der Kryokonservierung.....	27
2.4.4. Asservierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	28
2.5. Nachweis von SARS-CoV-2-RNA einschließlich subgenomischer (sg)RNA.....	28
2.6. Human Cytokine Array.....	29
2.7. Histopathologie und Immunmarkierung.....	30
2.7.1. Histopathologische Färbungen.....	30
2.7.2. Immunmarkierung.....	30
2.7.3. SARS-CoV S IHC.....	30
2.7.4. Immunfluoreszenz (IF).....	31
2.8. In-situ-Hybridisierung (ISH).....	32
2.9. Elektronenmikroskopische Verfahren.....	32
2.9.1. Ultrastrukturanalyse an FFPE-Material.....	33
2.10. Statistik.....	33
2.11. Bildbearbeitung.....	33
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Charakterisierung der Studienkohorte.....	35
3.1.1. Demografische Daten.....	35
3.1.2. Erkrankungsdauer.....	35
3.1.3. Neurologische Veränderungen während COVID-19-Infektion.....	36
3.1.4. Weitere klinische Daten.....	37
3.2. SARS-CoV-2 Viruslast in ausgewählten Gewebeproben.....	38
3.3. Histopathologische & immunhistochemische Charakterisierung der Riechschleimhaut..	41
3.4. SARS-CoV-2 Tropismus innerhalb der Riechschleimhaut.....	44
3.4.1. Ultrastrukturanalyse von SARS-CoV-2.....	44
3.4.2. Koloalisation von SARS-CoV Spike-Protein mit neuronalen/neuronalen Zellen.....	45
3.5. Neuropathologische Befunde bei Verstorbenen mit einer SARS-CoV-2-Infektion.....	46
3.5.1. SARS-CoV-2-Immunhistochemie in ZNS-Gewebeproben.....	48
3.5.2. COVID-19-assoziierte Immunantwort im ZNS-Gewebe.....	49
3.6. Entzündungsmediatoren im Liquor cerebrospinalis.....	49
4. Diskussion.....	51
Literaturverzeichnis.....	56
Eidesstattliche Versicherung.....	67
Anteilerklärung an der erfolgten Publikation.....	68
Publikation.....	69
Auszug aus der Journal Summary List.....	69
Druckexemplar der ausgewählten Publikation.....	70

Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. Nat Neurosci 24, 168–175 (2021). https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5	70
Lebenslauf	81
Komplette Publikationsliste.....	82
Danksagung.....	86

Abkürzungsverzeichnis

µM	Mikromolar
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BD	Bowman-Drüsen
BMI	Body-Mass-Index
BZ	Basalzellen
CAA	Zerebrale Amyloidangiopathie
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019
CoVs	Coronaviren
CSF	Cerebrospinal fluid
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DRG	Dorsale respiratorische Gruppe
EM	Elektronenmikroskopie
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin eingebettet
GFAP	Saures Gliafaserprotein
h	Stunde
HCoV	Humanes Coronavirus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen (DR-Region)
i.e.S.	im engeren Sinne
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ISH	In-situ-Hybridisierung
IQA	Interquartilsabstand
KHK	Koronare Herzkrankheit
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus
MVZ	Mikrovilli-Zelle
NCAM-1	Neurales Zelladhäsionsmolekül 1
NICE	National Institute for Health and Care Excellence
NF	Neurofilament

NRP	Neuropilin
OEG	Olfactory ensheathing glia
OLIG2	Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2
OMP	Olfaktorisches Markerprotein
ORN	Olfaktorisches Rezeptorneuron
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PART	Primary age-related tauopathy
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEM	Post-Exertional Malaise
PMI	Postmortem-Intervall
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
SAB	Subarachnoidalblutung
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SARS-CoV S	SARS-CoV Spike-Protein
sgRNA	subgenomische Ribonukleinsäure
sICAM-1	Lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TMPRSS2	Transmembrane Serinprotease 2
TuJ1	Neuronspezifisches Klasse-III β -Tubulin
u.a.	unter anderem
VRG	Ventrale respiratorische Gruppe
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Aufbau der Riechschleimhaut.	15
Abbildung 2. Entnahme der Riechschleimhaut.	24
Abbildung 3 Evaluation der Gewebequalität kryokonservierter Gewebeproben.	28
Abbildung 4. COVID-19-Todesfälle nach Altersgruppe und Geschlecht.	36
Abbildung 5. Nachweis von SARS-CoV-2-RNA mittels RT-qPCR.	40
Abbildung 6. Inverse Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und Viruslast.	41
Abbildung 7. Histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung der Riechschleimhaut	43
Abbildung 8. Nachweis von SARS-CoV via Immunhistochemie, In-situ-Hybridisierung und Elektronenmikroskopie.	45
Abbildung 9. Überblick der SARS CoV S IHC-Ergebnisse in ZNS-Proben.	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien.	19
Tabelle 2. Verwendete Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien.	20
Tabelle 3. Verwendete Antikörper.	20
Tabelle 4. Verwendete Geräte und Kits.	21
Tabelle 5. Verwendete Software.	21
Tabelle 6. Charakteristika der Studienkohorte.	37-38
Tabelle 7. Neuropathologische Befunde.	47

Zusammenfassung

Einleitung Eine Infektion mit dem neuartigen Erreger SARS-CoV-2 verursacht COVID-19 und geht in mehr als einem Drittel der Fälle mit einem breiten Spektrum neurologischer Symptome einher, deren Ätiopathogenesen bisher nicht vollumfänglich geklärt sind. Riech- und Geschmacksstörungen, insbesondere die Anosmie und Ageusie, sind für einen Teil der Patienten*innen sogar die führenden Symptome einer SARS-CoV-2-Infektion. Die Rezeptionszone des olfaktorischen Systems wird als Riechschleimhaut bezeichnet und bedeckt die obere Nasenmuschel direkt unterhalb der Siebplatte. In Anbetracht des direkten Kontaktes von neuronalen/neuronalen Zellen mit der Umwelt stellt die Riechschleimhaut eine Schnittstelle und somit eine potentielle Eintrittspforte von SARS-CoV-2 in das ZNS dar.

Methodik In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine systematische postmortem Untersuchung des ZNS sowie peripherer Gewebeproben aus dem Respirationstrakt von Personen, die infolge einer SARS-CoV-2-Infektion verstorben sind. Mittels der Korrelation klinischer Daten und (neuro-)pathologischer Untersuchungen wurden SARS-CoV-2-spezifische Veränderungen des ZNS ermittelt. Zur Quantifizierung pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Liquor der Verstorbenen wurde ein humaner Zytokin Array (Bio-techne) durchgeführt. Der Nachweis von SARS-CoV-2-RNA sowie subgenomischer (sg)RNA, als Surrogat aktiver Virusreplikation, erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Zur Charakterisierung des Tropismus von SARS-CoV-2 wurde die RNAscope® in situ Hybridisierung (ISH), Immunhistochemie (IHC) und Elektronenmikroskopie genutzt.

Ergebnisse Akute thromboembolische ischämische Infarkte (n=13/86; 15%) und frische Blutungen (n=13/86; 15%) sowie eine starke angeborene Immunantwort, vermittelt durch HLA-DR+ Mikroglia mit korrelierender Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6, IL-18, CCL2 und sICAM-1 im Liquor, sind die führenden Veränderungen im ZNS. Die höchste Viruslast ließ sich mittels qPCR in der Riechschleimhaut detektieren. SgRNA fand sich am häufigsten in der Riechschleimhaut (n=18/57) und Uvula (n=8/45); es ergab sich kein Nachweis von sgRNA im ZNS. Die Viruslast korreliert invers mit der Erkrankungsdauer der Patienten*innen ($r=-0,5$; $P=0,006$). Im Riechepithel - hier in Kolokalisation mit neuronalen/neuronalen Zellen - sowie in den cerebralen Gefäßendothelzellen fand sich eine distinkte Immunreaktivität für SARS-CoV Spike-Protein. Mittels RNAscope® ISH gelang es SARS-CoV-2 RNA innerhalb des Riechepithels darzustellen. Ultrastrukturell konnten wir elektronenmikroskopische Aufnahmen intakter Coronaviruspartikel in der Riechschleimhaut anfertigen.

Schlussfolgerung Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass SARS-CoV-2 die Nervenzellen der Riechschleimhaut als Eintrittspforte in das Gehirn benutzen kann. Eine SARS-CoV-2-

Infektion führt im ZNS zu einer Immunantwort mit Aktivierung von HLA-DR+ Mikroglia und erhöhten Spiegeln von Entzündungsmediatoren.

Abstract

Introduction The newly identified severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causes Coronavirus disease 2019 (COVID-19) which is accompanied by a broad spectrum of neurological manifestations in more than one-third of COVID-19 cases. ---For the latter, olfactory and gustatory disturbances such as anosmia and ageusia, are often leading symptoms of SARS-CoV-2 infection. The reception area of the human olfactory system is known as the olfactory mucosa and covers the upper turbinate directly underneath the cribriform plate. Given the close proximity of neural/neuronal cells and the environment the olfactory mucosa as a neural-mucosal interface may represent a potential port of CNS entry for SARS-CoV-2.

Methods Here, we systematically investigated postmortem tissue of the CNS and respiratory tract from individuals with COVID-19. Based on the correlation of clinical data and (neuro-)pathological examinations, SARS-CoV-2-specific morphological changes were determined. To quantify pro- and anti-inflammatory cytokines in the cerebrospinal fluid (CSF) of the deceased, a human cytokine array (Bio-technique) was performed. Detection of SARS-CoV-2 RNA, including subgenomic (sg)RNA as a surrogate of active virus replication, was performed using quantitative real-time PCR (qPCR). By various means, such as RNAscope® in situ hybridization (ISH), immunohistochemistry and electron microscopy, we further characterized the CNS tropism of SARS-CoV-2 and the consequences thereof.

Results Acute thromboembolic ischemic infarcts (n=13/86; 15%) and a strong innate immune response, mediated by HLA-DR+ microglia with a linked increase in proinflammatory mediators such as IL-6, IL-18, CCL2 and sICAM-1 in the CSF, are leading alterations in the CNS. The highest levels of viral RNA for SARS-CoV-2 were found within the olfactory mucosa. SgRNA was most frequently found in the olfactory mucosa (n=18/57) and uvula (n=8/45), although there was no evidence of sgRNA in the CNS. An inverse correlation between the duration of illness and viral load could be determined ($r=-0,5$; $P=0,006$). Besides, a distinct immunoreactivity for SARS-CoV Spike (S) protein was found in the olfactory epithelium – here co-localizing with neural/neuronal cells - and within cerebral endothelial cells. Using RNAscope® ISH, SARS-CoV-2 RNA was successfully detected within the olfactory epithelium. We were also able to illustrate intact coronavirus particles in the olfactory mucosa ultrastructurally.

Conclusion The results indicate that SARS-CoV-2 can enter the nervous system by crossing the neural-mucosal interface in the olfactory mucosa. SARS-CoV-2 infection results in an innate immune response with activation of HLA-DR+ microglia and increased levels of inflammatory mediators in the CNS.

Manteltext

Die folgenden Ausführungen stellen eine vertiefte Darstellung der Publikation, Jenny Meinhardt*, Josefine Radke*, Carsten Dittmayer*, Jonas Franz, Carolina Thomas, Ronja Mothes, Michael Laue, Julia Schneider, Sebastian Brünink, Selina Greuel, Malte Lehmann, Olga Hassan, Tom Aschman, Elisa Schumann, Robert Lorenz Chua, Christian Conrad, Roland Eils, Werner Stenzel, Marc Windgassen, Larissa Rößler, Hans-Hilmar Goebel, Hans R. Gelderblom, Hubert Martin, Andreas Nitsche, Walter J. Schulz-Schaeffer, Samy Hakrrouch, Martin S. Winkler, Björn Tampe, Franziska Scheibe, Péter Körtvélyessy, Dirk Reinhold, Britta Siegmund, Anja A. Köhl, Sefer Elezkurtaj, David Horst, Lars Oesterhelweg, Michael Tsokos, Barbara Ingold-Heppner, Christine Stadelmann, Christian Drost, Victor Max Corman, Helena Radbruch und Frank L. Heppner „*Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19*. Nat Neurosci 24, 168–175 (2021)“, dar.

*In dieser Publikation teile ich mir die Erstautorenschaft mit PD Dr. Josefine Radke und Dr. Carsten Dittmayer.

1. Einführung

1.1. Humanpathogene Coronaviren

Severe acute respiratory coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) ist ein neuartiges Beta-Coronavirus, das erstmals im Dezember 2019 in Wuhan, China als Auslöser der Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) beschrieben wurde und sich seither weltweit pandemisch ausbreitet. Zum aktuellen Zeitpunkt sind die sieben humanpathogenen Coronaviren (CoVs) Humanes Coronavirus-OC43 (HCoV-OC43), HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-HKU1, Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) und SARS-CoV-2 bekannt¹⁻³.

Endemisch zirkulierende, humane CoVs (HCOV-NL63, -229E, -OC43 und -HKU1) haben weltweit eine hohe Inzidenz und gelten als Ursache von etwa 15 - 30% der mild verlaufenden respiratorischen Infektionen⁴.

Die drei zoonotischen Coronaviren MERS-CoV, SARS-CoV und SARS-CoV-2 sind hochpathogene Erreger, die beim Menschen schwere (fatale) Atemwegssyndrome und Pneumonien auslösen können. MERS-CoV und SARS-CoV führten bereits in der Vergangenheit zur Entwicklung von Epidemien - MERS-CoV im Jahr 2012, SARS-CoV im Zeitraum von 2002 bis

2003. MERS-CoV ist in Afrika und der Arabischen Halbinsel weit verbreitet. SARS-CoV zirkulierte hauptsächlich in den ostasiatischen Ländern, seit 17 Jahren wurde es nicht mehr im Menschen detektiert¹.

1.2. Neurologische Manifestationen einer SARS-CoV-2-Infektion

Eine SARS-CoV-2-Infektion löst vornehmlich akute respiratorische Erkrankungen aus, geht jedoch in mehr als einem Drittel der Fälle auch mit einem breiten Spektrum neurologischer Manifestationen einher⁵⁻⁷.

Beeinträchtigungen des zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystems (PNS) wurden in der Vergangenheit bereits im Zusammenhang mit allen humanpathogenen Coronaviren⁸ sowie auch anderen respiratorischen Viren, zum Beispiel dem Respiratory syncytial virus (RSV) oder dem Influenzavirus beschrieben⁴.

Von den sieben bekannten humanpathogenen Coronaviren werden drei in der Literatur als neurotrop beschrieben: HCoV-229E, HCoV-OC43 und SARS-CoV^{2,9}. In einer Autopsiestudie wurde zudem gezeigt, dass HCoV-OC43 und/oder HCoV-229E im ZNS persistieren können und in 48% der in dieser Studie untersuchten Gehirne RNA der humanen Coronaviren detektiert werden konnte¹⁰.

Die mit einer COVID-19-Erkrankung assoziierten klinischen neurologischen Manifestationen können in den unterschiedlichen Krankheitsstadien (akut, chronisch, parainfektios) auftreten und umfassen ein weites Spektrum. Zu den am häufigsten beschriebenen neurologischen Symptomen zählen Riech- und Geschmacksstörungen, deren Prävalenz in einem systematischen Review und einer Metaanalyse¹¹ auf 47,4% geschätzt wird. Analysiert wurden die Daten von 38.198 SARS-CoV-2-infizierten Personen aus 104 Studien. Riech- und Geschmacksstörungen gelten als typisches Frühsymptom und stellen für einen Teil der Patient*innen sogar die führenden Symptome einer SARS-CoV-2-Infektion dar¹².

Weiterhin beschrieben werden milde Symptome wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwindel und Muskelschmerzen bis hin zu schweren neurologischen Komplikationen wie Krampfanfällen, intrazerebralen Blutungen, entzündlichen Veränderungen des ZNS sowie zerebrovaskulären Ereignissen^{5,7,13-16}. Eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie aus New York legte dar, dass eine SARS-CoV-2-Infektion als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten akuter ischämischer Schlaganfälle anzusehen ist¹⁷.

Um die neurologischen Begleit- und Folgeerscheinungen zusammenzufassen wurde die Bezeichnung „Neuro-COVID“¹⁸ eingeführt und in einer US-amerikanischen Studie zusätzlich eine Einteilung in 3 Schweregrade - Neuro-COVID Grad I - III vorgeschlagen¹⁹.

Bei einem Teil der Patient*innen treten auch noch Wochen nach einer akuten SARS-CoV-2-Infektion Spätfolgen auf, welche als „Long COVID“ bzw. „Post-COVID-Syndrom“ beschrieben werden^{20,21}. Durch das National Institute for Health and Care Excellence (NICE) wurden Symptome, die länger als 4 Wochen nach Infektionsbeginn anhalten als „Long COVID“ definiert. Unter dem „Post-COVID-Syndrom“ werden Symptome subsumiert, die ≥ 12 Wochen nach Infektionsbeginn auftreten und nicht durch andere Diagnosen erklärt werden können²².

Die in Studien beschriebenen Langzeitsymptome sind sehr heterogen. Häufig beschriebene neurologische Phänomene sind die „Post-COVID-Fatigue“^{23,24}, eine allgemeine Leistungsminderung sowie eine Symptomverschlechterung nach geringer körperlicher und geistiger Aktivität im Sinne einer „Post-Exertional Malaise“ (PEM). Überdies beschrieben werden eine anhaltende Dyspnoe, Palpitationen, Kopfschmerzen, Gelenkschmerzen, Muskelschmerzen, Geruchs- und Geschmacksstörungen^{25,26} sowie infolgedessen eine Abnahme der subjektiv wahrgenommenen Lebensqualität. Die weiterführende Charakterisierung dieser Langzeitfolgen im Hinblick auf die Epidemiologie, mögliche Risikofaktoren und die pathophysiologischen Mechanismen ist Forschungsschwerpunkt aktueller Studien^{25,27} und bisher nicht abschließend geklärt.

1.3. Die Riechschleimhaut - Schnittstelle zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Respirationstrakt

Der von zahlreichen SARS-CoV-2-Infizierten beschriebene plötzliche Geruchsverlust rückte die Untersuchungen der Rezeptionszone des menschlichen Geruchssinns, die sogenannte Riechschleimhaut, in den Fokus meiner Untersuchungen. Interessanterweise gelangt unsere Atemluft bei Durchströmen des Naseninnenraumes in direkten Kontakt mit den neuronal/neuronalen Zellen des Riechepithels, wodurch diese eine Schnittstelle zwischen der Umwelt und dem Nervensystem bilden und somit eine potentielle Eintrittspforte von SARS-CoV-2 in das ZNS darstellen.

1.3.1. Der Aufbau der Riechschleimhaut

Die Riechschleimhaut bedeckt die Unterseite der Siebplatte sowie einen Teil der oberen Nasenmuschel^{28,29}. Millionen von Riechsinneszellen³⁰ - die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs) - sind inmitten von Stützzellen, Mikrovilli-Zellen, Basalzellen und Bowman-Drüsen

eingebettet, und vereinigen sich gesamthaft zu einem pseudostratifizierten olfaktorischen Epithel - dem Riechepithel.

Hauptbestandteil des Epithels bilden die Stützzellen, die als hochprismatische Zellen durch alle Epithelschichten ziehen und Rezeptorneurone, Mikrovilli-Zellen sowie Bowman-Drüsen umgeben. Sie dienen der Gewebestatik³¹. Apikal weisen die Stützzellen einen dichten Bürstensaum aus Mikrovilli auf. Ihre Zellkerne arrangieren sich in den oberen Epithelschichten, oberhalb der Zellkerne der ORNs³². Studien beschreiben darüber hinaus mögliche Funktionen im Hinblick auf den Metabolismus des Epithels, der Sekretion, Resorption und Phagozytose von Zellbestandteilen³³.

ORNs sind bipolare Nervenzellen. Mittels ihrer dendritischen Fortsätze ragen sie aus der mittleren Epithelschicht bis an die Epitheloberfläche und formen dort Auftreibungen, sogenannte "dendritic knobs", aus denen 10 bis 30 immotile Zilien hervorgehen³². Basal verjüngen sich die Somata zu Axonen und projizieren durch die Siebplatte zum Bulbus olfactorius (sog. "Fila olfactoria"). Spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sich in der Membran der Riechsinneszellen befinden, dienen der Detektion von Geruchsstoffen. ORNs können gemäß dem Stadium ihres Reifungsprozesses in die Subpopulationen "unreife" und "reife" ORNs eingeteilt werden. Unreife ORNs exprimieren neuronale Marker wie Neurofilament (NF), Neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM) sowie Neuronspezifische Klasse-III β -Tubulin (TuJ1)³⁴. Spezifisch für reife ORNs ist die zusätzliche Expression des olfaktorischen Marker-Proteins (OMP). Späte neuronale Vorläuferzellen und neu reifende ORNs zeigen zudem eine vorübergehende Expression des Transkriptionsfaktors Olig2^{35,36}. Der Nervenzellbesatz der Riechschleimhaut ist diskontinuierlich, neben nervenzellhaltigen Arealen finden sich eingestreut Epithelinseln ohne Nachweis olfaktorischer Rezeptorneurone³⁷.

Olfaktorische Gliazellen (olfactory ensheathing glia (OEG)) umhüllen die Axone der ORNs nach Durchtreten der Basalmembran. Einzelne Studien beschreiben einen möglichen Transport von Viruspartikeln entlang der auf diese Weise gebildeten kleinen Kanälchen³⁸. OEGs sind Schwann-Zell-ähnliche Gliazellen und exprimieren unter anderem S-100, Vimentin sowie Saures Gliafaserprotein (GFAP)³⁹. Dieser Zellpopulation werden Axon-regenerierende und wachstumsfördernde Potenziale zugesprochen^{40,41}. Interessanterweise werden OEGs aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zu Gliazellen als potentielle Zielstruktur von Viren angesehen⁴². In einer Studie wurde hierbei gezeigt, dass OEGs durch das Humane Herpesvirus 6 infiziert werden können⁴³.

Basalzellen bilden, apikal der Basalmembran aufsitzend, die tiefen Zellschichten des Epithels aus. Als Stammzellen verfügen sie über das Potenzial der Differenzierung und dienen der

Regeneration und Plastizität des Riechepithels. Erstaunlicherweise können auch olfaktorische Nervenzellen auf diese Weise fortdauernd aus Basalzellen ausdifferenzieren - ein seltenes Beispiel lebenslanger Neurogenese.

Als ein weiterer Zelltyp werden in einigen Studien die Mikrovilli-Zellen beschrieben, deren genaue Funktion noch unbekannt ist. Hierbei handelt es sich um kolbenförmige Zellen, deren Zellkerne sich am weitesten apikal im Epithel anordnen. Auch ihr apikaler Zellpol wird von einem Saum aus Mikrovilli überzogen, basal bilden sie einen dünnen, Axon-ähnlichen Fortsatz aus⁴⁴.

Unterhalb der Basalmembran, in der Lamina propria gelegen, finden sich tubuloalveoläre Drüsen, die sogenannten Bowman-Drüsen. Sie produzieren den Mukus, der das Epithel überzieht sowie Enzyme und Transportproteine enthält, die dem Transport der Odorantien zu den Geruchsrezeptoren der ORNs dienen⁴⁵.

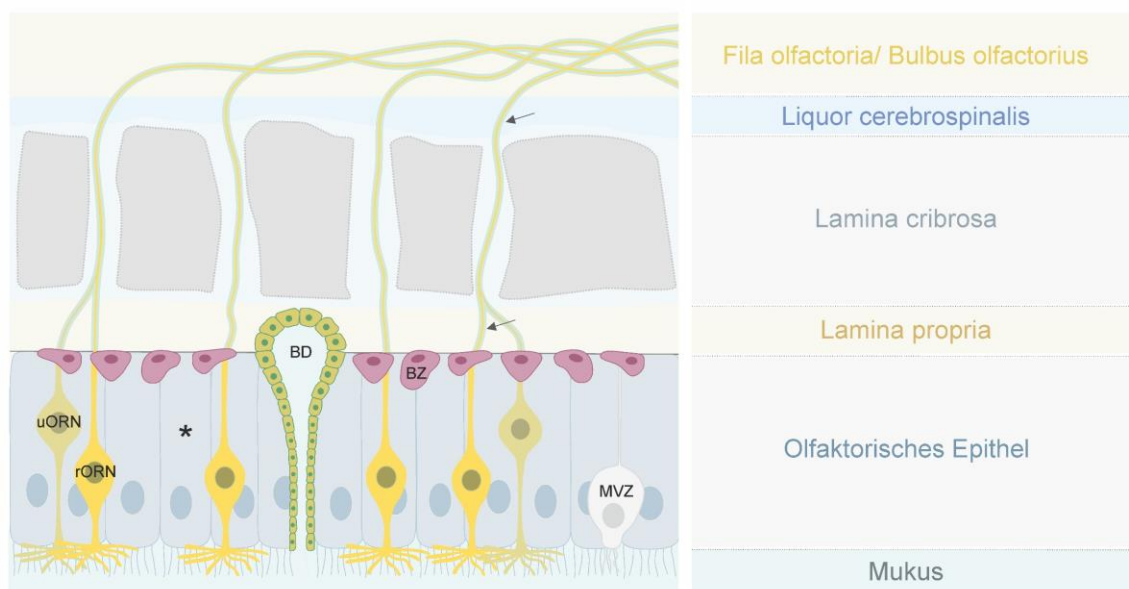


Abbildung 1. Aufbau der Riechschleimhaut.

Unreife olfaktorische Rezeptorneurone (uORN) und reife olfaktorische Rezeptorneurone (rORN) werden von Stützzellen (*) und Mikrovilli-Zellen (MVZ) umgeben. Olfaktorische Gliazellen (←) umhüllen die Axone der bipolaren Rezeptorneurone nach Durchtritt durch die Basalmembran auf ihrem Weg durch die Lamina propria und Lamina cribrosa zum Bulbus olfactorius. Basalzellen (BZ) bilden, direkt der Basalmembran aufsitzend, die tiefen Epithelschichten aus. Sie verfügen über das Potential der Differenzierung und dienen der Regeneration und Plastizität des Epithels. Tubuloalveoläre Bowman-Drüsen (BD), deren Drüsenkörper in der Lamina propria liegen, produzieren Mukus, der das Epithel apikal überzieht und Enzyme sowie Odorantien-bindende Proteine enthält.

Darstellung modifiziert aus „Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021)“.

1.3.2. Die Riechschleimhaut als mögliche Eintrittspforte in das ZNS

Der Viruseintritt über das Riechepithel und den Bulbus olfactorius in das ZNS wurde in Tierstudien bereits für verschiedene Viren, u.a. dem Influenzavirus A, Parainfluenzavirus, Herpesvirus und West-Nil-Virus beschrieben^{46,47}. Nach intranasaler Inokulation mit dem Influenza-A-Virus H5N1 konnte in Mäusen Virusantigen in ORNs⁴⁸ sowie dem Bulbus olfactorius⁴⁹ nachgewiesen werden. Als mögliche Mechanismen des Virustransports werden (1) der anterograde axonale Transport nach Infektion olfaktorischer Rezeptorneurone sowie (2) die Ausbreitung entlang der durch die olfaktorischen Gliazellen gebildeten Kanälchen diskutiert⁴⁶. Diesbezügliche Untersuchungen der humanen Riechschleimhaut beschränken sich auf nur singuläre Fallberichte⁵⁰.

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass auch nach intranasaler Inhalation von HCoV-OC43 virale RNA im ZNS detektiert werden kann. Ein zugrunde liegender Mechanismus oder spezifischer Eintrittsweg wurde nicht gezeigt⁵¹.

1.3.3. Die Riechbahn

Die in der Riechschleimhaut gelegenen Rezeptorneurone stellen - als primäre Sinneszellen - den Beginn der Riechbahn dar. Ihre Axone bündeln sich, verlaufen als sog. Fila olfactoria durch die Lamina cribrosa und projizieren zu dem paarig angelegten Bulbus olfactorius. Im Bulbus olfactorius enden die Axone der ORNs. Über synaptische Kontakte mit den sog. Büschelzellen und Mitralzellen erfolgt die Umschaltung auf das 2. Neuron, deren Axone im Tractus olfactorius an der Unterseite der Frontobasis entlang des Gyrus rectus verlaufen und sich im Trigonum olfactorium in einen medialen (Stria olfactoria medialis) sowie einen lateralen (Stria olfactoria lateralis) Anteil aufspalten. Projektionsziele der Stria olfactoria lateralis sind der präpiriforme Kortex (primäre Riechrinde), der entorhinale Kortex sowie die Amygdala. Die Stria olfactoria medialis projiziert zur Area septalis und dem Tuberculum olfactorium.

Einzelne bildgebungsbasierte Fallberichte beschreiben eine MR-morphologisch detektierbare Atrophie und/oder Asymmetrie der Bulbi olfactorii⁵²⁻⁵⁴ bzw. Signal-Veränderungen im Gyrus rectus⁵⁵ bei Patienten*innen mit einer SARS-CoV-2-Infektion.

1.4. Molekulare Mechanismen des Zelleintritts von SARS-CoV-2

Der Zelleintritt von SARS-CoV-2 ist ein zweistufiger Mechanismus: (1) Studien haben gezeigt, dass SARS-CoV-2 durch Bindung des sich auf der Oberfläche befindlichen Spike (S)-Proteins an das transmembranäre Enzym Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (ACE2) in humane Wirtszellen eindringen kann⁵⁶. Unterstützt wird die Zellbindung zusätzlich durch die Interaktion mit Heparansulfat⁵⁷, (2) Die Spaltung des S-Proteins, das sog. S-Protein-Priming, sowie der Zelleintritt werden durch die Endoprotease Furin sowie die transmembranären Serinproteasen TMPRSS2 und TMPRSS4 aber auch Cathepsin B und L (CTSB/CTSL) ermöglicht^{56,58}. Studien

weisen daraufhin, dass im ZNS und der Riechschleimhaut das Rezeptorprotein Neuropilin-1 (NRP-1) als weitere Bindungsstelle für SARS-CoV-2 dienen könnte, sodass weitere Rezeptoren als mögliche Eintrittspforten in Betracht zu ziehen sind^{59,60}.

Einzelzellanalysen geben Aufschluss über die Expression dieser Eintrittsfaktoren auf zellulärer Ebene und somit Hinweise auf die Anfälligkeit unterschiedlicher Zellpopulationen im Hinblick auf eine SARS-CoV-2-Infektion^{61,62}.

Die stärkste Koexpression von ACE2 und TMPRSS2 im Bereich des Respirationstraktes wurde erstaunlicherweise in den Epithelzellen der Nasenschleimhaut nachgewiesen⁶³, sodass anzunehmen ist, dass die Nasenhöhle eine Schlüsselrolle bei der Infektion, Replikation und Verbreitung von SARS-CoV-2 einnimmt. Frühere Tierstudien legen zudem nahe, dass SARS-CoV bei intranasaler Infektion von Mäusen, die menschliches ACE2 exprimieren, in das Gehirn gelangen kann⁶⁴. Für SARS-CoV-2 wurde eine ACE2-abhängige Neuroinvasion im SARS-CoV-2-Mausmodell sowie in menschlichen Gehirn-Organoiden gezeigt⁶⁵.

Olfaktorische Rezeptorneurone zeigen keine oder eine nur geringe Expression von ACE2^{66,67}, jedoch konnte im Mausmodell eine Expression von NRP1 in den neuronalen Zellen der Riechschleimhaut nachgewiesen werden⁵⁹.

1.5. Bisherige neuropathologische Autopsiestudien an COVID-19 Verstorbenen

Als führende Veränderungen im ZNS von Verstorbenen mit einer SARS-CoV-2-Infektion fanden sich in den bisherigen neuropathologischen Autopsiestudien: (1) eine ausgeprägte Mikrogliaaktivierung⁶⁸⁻⁷³, (2) akute ischämische Schädigungen in Form von akut hypoxisch-ischämischen Enzephalopathien sowie akuten fokalen Hirninfarkten^{70,72,74-79}. Weiterhin beschrieben werden (3) thrombosierte Blutgefäße^{72,77,79} und (4) frische (Mikro-)Blutungen perivaskulär sowie innerhalb des Parenchyms^{75,77-79}.

In Einzelfällen wird das Auftreten (5) entzündlicher Veränderungen des ZNS wie einer akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM)⁷⁵, einer hirnstammbetonten Enzephalitis⁷⁴ oder einer Meningoenzephalitis¹³ beschrieben.

*Matschke et al.*⁷⁰ fanden zudem vermehrt zytotoxische T-Zellen in Hirnstamm, Kleinhirn sowie leptomeningeal und konnten SARS-CoV-2-RNA oder -Protein in 53% der obduzierten Gehirne, insbesondere in den Hirnnerven, die aus dem unteren Hirnstamm entspringen, nachweisen.

1.6. Zielsetzung

Grundgedanken meiner Arbeit sind die Exploration (1) des SARS-CoV-2-Neotropismus unter Zuhilfenahme humaner postmortem Gewebeproben, (2) möglicher Wege des ZNS-Eintritts sowie

(3) der begleitenden Veränderungen im ZNS von Verstorbenen mit einer COVID-19 Erkrankung; als Schlüssel für ein besseres Verständnis der Diagnose, Prognose und möglicher therapeutischer Maßnahmen.

2. Materialien und Methodik

2.1. Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Substanz [Ergänzende Bezeichnung/Informationen]	Bezugsquelle
3,3'-Diaminobenzidin [DAB]	Agilent Dako, Santa Clara, USA
3-Amino-9-ethylcarbazol [AEC]	Agilent Dako, Santa Clara, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol [DAPI]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Antikörper-Verdünnungslösung [ProTaq®]	Quartett GmbH, Berlin, DEU
Aqua destillata	B. Braun SE, Melsungen, DEU
Azophloxin-Lösung	Merck, Darmstadt, DEU
Bleicitrat-Ultrastain	Leica Microsystems, Wetzlar, DEU
Citratpuffer [pH 6,0]	DCS, Hamburg, DEU
Einbetttharz [LR White Resin]	London Resin Company, Berkshire, UK
Einbettmedium Fparaplast Plus	McCormick Scientific, St. Louis, USA
Einbettmedium für Kryogewebe [Tissue-Tek® O.C.T.™]	Sakura Finetek, Staufen im Breisgau, DEU
Eindeckmedium [CytoSeal™ XYL, permanent]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eindeckmedium [wässrig]	
Eisen-Hämatoxylin Weigert A/B	Waldeck GmbH, Münster, DEU
Entkalker soft, SOLVAGREEN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Eosin	Waldeck GmbH, Münster, DEU
Ethanol [196%, 80%, 70%]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
Formaldehydlösung [4%, gepuffert, pH 6,9]	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach, DEU
Glutaraldehyd [2,5%]	
Hämatoxylinlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEU
HEPES-Puffer [0,05 µM, pH 7,2]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isopentan [2-Methylbutan]	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lichtgrün SF-Löung	Merck, Darmstadt, DEU
Meerrettichperoxidase [HRP]	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Natriumcacodylatpuffer	
Orange G Farbstoff	Merck, Darmstadt, DEU
Osmiumtetroxid	
Periodsäure	VWR International, Radnor, USA
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung [Gibco® PBS]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Schiffs Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Toluidinblau	
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trockeneis	
Uranylacetat	Serva, Heidelberg, DEU
Wasserstoffperoxid [30%]	Merck, Darmstadt, DEU
Wolframatophosphorsäure	Merck, Darmstadt, DEU
Xylol	Avantor, Radnor, USA
Ziegen Serum [10%]	Agilent Dako, Santa Clara, USA

Eigene Abbildung

2.1.2. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2. Verwendete Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien.

Name [Ergänzende Bezeichnung/Informationen]	Hersteller
3M™ Aura™ Atemschutzmaske 1863+ FFP3	3M United Kingdom PLC, Berkshire, UK
AlphaTec® 2500 Standard Microgard Anzug	Ansell, Richmond, AUS
Biopsiestanze für FFPE-Gewebe [3,0 mm]	pfm medical, Köln, DEU
Cryomaster® Kryo-Aufbewahrungsboxen aus Karton	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Deckgläser	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DEU
Diamantmesser [Histo Jumbo]	Diatome, Nidau, CHE
Diamantmesser [Ultra 35°]	Diatome, Nidau, CHE
Einbettkassetten	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DEU
Einmal-Spritze [5ml, 10ml, 20ml]	B. Braun SE, Melsungen, DEU
Einweg-Pinzetten	VWR International, Radnor, USA
Einweg-Skalpell	B. Braun SE, Melsungen, DEU
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen [10 ml]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Korkplättchen	SLEE Medical GmbH, Mainz, DEU
Kryo-Tubes [1,5 ml]	Sarstedt AG % Co. KG, Nümbrecht, DEU
Matrix™ Lagerungsröhrchen [1,4 ml]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DEU
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Sterican® Kanüle [G19]	B. Braun SE, Melsungen, DEU

Eigene Abbildung

2.1.3. Primär-, Sekundärantikörper und Färbekits

Tabelle 3. Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Merkmale	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper			
Anti-S100-A1	Kaninchen, polyklonal	1:3000	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Anti-SARS Spike Glykoprotein	murin, monoklonal	1:100	Abcam, Cambridge, GBR
Anti-AE1/AE3	murin, monoklonal	1:200	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Anti-S100-A9	murin, monoklonal	1:200	OriGene Technologies, Rockville, USA
Anti-CD56	murin, monoklonal	1:200	Bio-Rad AbD Serotec Limited, Oxford, GBR
Anti-OMP	Ziege, polyklonal	1:1000	Fujifilm Wako Chemical Industries, Osaka, JPN
Anti-βIII-Tubulin	Kaninchen, monoklonal	1:2000	Abcam, Cambridge, GBR
Anti-NF200	Kaninchen, polyklonal	1:100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-ACE2	Kaninchen, polyklonal	1:3000	Proteintech, Great Lakes, USA
Anti-OLIG2	Kaninchen, polyklonal	1:150	IBL International GmbH, Hamburg, DEU
Sekundärantikörper und Kits			
Alex Flour™ 488 AffiniPure	Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	1:100	Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, USA
Alex Flour™ 555	Ziege-Anti-Maus-IgG	1:100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Alexa Fluor™ 555 Tyramide SuperBoost™ Kit			Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
iVIEW™ DAB Detection kit			Ventata Medical Systems, Oro Valley, USA
ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit			Ventata Medical Systems, Oro Valley, USA
EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB	Kaninchen, Maus		Agilent Dako, Santa Clara, USA

Eigene Abbildung

2.1.4. Geräte und Kits

Tabelle 4. Verwendete Geräte und Kits.

Name [Ergänzende Bezeichnung/Informationen]	Hersteller
Benchmark XT Autostainer	Ventata Medical Systems, Oro Valley, USA
CCD-Kamera für TEM [MEGAVIEW G3]	EMSIS, Münster, DEU
FEI TEM Tecnai™ Spirit	FEI, Eindhoven, NLD
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX63	Olympus, Tokio, JPN
Kühlschrank [4°C]	Liebherr, Bulle, CHE
Kühlzentrifuge Megafuge® 1.0R	Heraeus®, Hanau, DEU
Laser-Scanning-Mikroskop Olympus FluoView FV1000	Olympus, Tokio, JPN
MagNAPure 96-Systems	Hoffmann-La Roche, Basel, CHE
Microm Glas-Eindeckautomat CTM6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Microm Rotationsmikrotom 355S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroskop-Digitalkamera DP80	Olympus, Tokio, JPN
Olympus BX50 Durchlichtmikroskop	Olympus, Tokio, JPN
Oszillosäuge mit Staubabsaugung [HB8888-01V]	HEBU medical GmbH, Tuttlingen, DEU
Ultramikrotom für Kunstharzschnitte [Ultracut E]	Reichert-Jung, Wetzlar, DEU
Ultraschallentkalker [USE 33]	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, DEU
Ultratiefkühlschrank [-80°C]	Panasonic, Osaka, JPN
Wärmeplatte für Semidünnschnitte	Medax, Neumünster, DEU
Wärmeschrank [40,3°C]	Heraeus®, Hanau, DEU
Wasserbad für Paraffinschnitte [Typ 1052, 42°C]	GFL, Leverkusen, DEU
Zeiss Axiolab 5 Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
Zeiss Gemini 300 REM	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
Zeiss TEM 906 [Leo]	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
Kits	
Human Cytokine Array Kit	Bio-Techne, Minneapolis, USA
MagNAPure 96 DNA und Viral NA Large Volume Kit	Hoffmann-La Roche, Basel, CHE
RNAScope 2.5 HD Reagent Kit-BROWN	ACD, Newark, USA
Qubit dsDNA HS Assay-Kits	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Eigene Abbildung

2.1.5. Software

Tabelle 5. Verwendete Software.

Name [Ergänzende Bezeichnung/Informationen]	Entwickler
Adobe Photoshop CS4	Adobe, Mountain View, USA
ATLAS 5	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
CorelDRAW 2019	Corel Corporation, Ottawa, CAN
Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Fiji	Open source Software (https://imagej.net)
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc. , USA
SAP GUI	SAP, Walldorf, DEU

Eigene Abbildung

2.2. Studienpopulation und Datenerhebung

Im Rahmen dieser prospektiven Autopsiestudie erfolgte die systematische Untersuchung von postmortalen Gewebeproben der oberen Atemwege sowie des ZNS von Verstorbenen mit einer SARS-CoV-2-Infektion. Die in der Publikation *Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. Nat Neurosci 24, 168–175 (2021)* eingeschlossenen Patient*innen wurden im Zeitraum von März 2020 bis Juli 2020 obduziert (n=33) und wiesen entweder einen positiven Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Test auf SARS-CoV-2 (n=31 von 33) oder klinische Merkmale, die hochgradig verdächtig auf das Vorliegen einer SARS-CoV-2-Infektion sind (n=2 von 33), auf. Die Durchführung der Obduktionen erfolgte am Institut für Neuropathologie und Pathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin (n = 26, darunter eine Zuweisung aus dem Institut für Pathologie der DRK Kliniken Berlin (n=1)) und dem Institut für Rechtsmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin (n=1 von 33). Die neuropathologische Obduktion dieser Patient*innen wurde durch mich ausgeführt. Im Rahmen einer Kooperation wurden sechs Patient*innen, die an einer COVID-19-Infektion verstorben sind und im Institut für Neuropathologie und Pathologie des Universitätsklinikums Göttingen obduziert wurden, in unsere Studie eingeschlossen (n=6 von 33). Im Zeitraum von August 2020 bis Mai 2021 erfolgte am Institut für Neuropathologie und Pathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin die Obduktion von weiteren 58 Patienten*innen mit Nachweis eines positiven PCR-Test auf SARS-CoV-2 vor dem Versterben (n_{gesamt}=91); die Obduktionen wurden von mir durchgeführt bzw. begleitet. Die Obduktionen erfolgten auf der Rechtsgrundlage des §1 SRegG BE des Obduktionsgesetzes von Berlin und des §25 Abs. 4 des Infektionsschutzgesetzes. Die Einverständniserklärungen der Angehörigen wurden erteilt. Sicherheitsvorkehrungen wie das Tragen von FFP2-Masken, Schutzanzügen, Schutzbrillen/Visieren und schnittfesten Handschuhen wurden getroffen.

Klinische Patient*innendaten erhob ich mittels der jeweiligen Leichenschauheine sowie der (elektronischen) Patient*innenakten.

2.2.1. Ethikerklärung

Diese Studie wurde von den lokalen Ethikkommissionen (Berlin: EA1/144/13, EA2/066/20 und EA1/075/19; Göttingen: 42/8/20) sowie von dem Charité-Berlin Institute of Health (BIH)-COVID-19-Forschungsausschuss genehmigt und stand im Einklang mit der Deklaration von Helsinki.

2.3. Probengewinnung

An allen Patienten*innen wurde eine Ganzkörperobduktion einschließlich histopathologischer Begutachtung durchgeführt. Aufgrund der Pandemiesituation und damit einhergehender Belastungen konnte die Obduktion lediglich in 11 Fällen innerhalb von 24 h nach Todeseintritt

durchgeführt (PMI < 24h), in allen anderen Fällen lag das Postmortal-Intervall zwischen einem bis acht Tagen. Um die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten erfolgte die Probenentnahme systematisch und standardisiert. Detaillierte Abläufe werden nachfolgend beschrieben.

2.3.1. Entnahme der ZNS-Gewebeproben

Nach Eröffnung der Schädelkalotte und Dura mater cranialis erfolgte die Entnahme des Gehirns, sowie die unmittelbare Asservierung von Nativmaterial des Bulbus olfactorius (n=57), der Medulla oblongata (n=58) sowie des Kleinhirns (n=51) für den Nachweis von SARS-CoV-2-RNA im Gewebe via PCR. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen zwischen unterschiedlichen Gewebeproben wurden die Präparationsinstrumente nach jeder Probenentnahme gewechselt bzw. gereinigt und die Proben unter möglichst geringer Manipulation des Gewebes entnommen. Folgend wurde das Gehirn entweder nativ (d.h. unfixiert) oder bei fortgeschrittener Autolyse bzw. einem Postmortalintervall (PMI) >24 Stunden nach 14-tägiger Gewebefixierung in 4%iger PBS-gepufferter Formaldehydlösung aufgearbeitet. Die Dura mater cranialis wurde abgelöst, inspiziert und der Sinus sagittalis superior mittels Koronarschere eröffnet. Nach Begutachtung des Gehirns von außen wurde der Circulus arteriosus Willisii von der Hirnbasis abpräpariert. Nachfolgend der Hirnstamm und das Kleinhirn vom Großhirn abgetrennt und die Großhirnhemisphären mit dem Hirnmesser nach Virchow anhand koronarer Schnittführungen in ca. 10 - 15 mm dicke Scheiben zerlegt. Die Lamellierung des Hirnstamms erfolgte mittels transversaler Schnittführungen im Abstand von 5 mm. Das Kleinhirn wurde anhand sagittaler Schnittführungen aufgearbeitet. Für histopathologische und immunhistochemische Analysen wurden standardisiert Gewebeproben aus den nachfolgend gelisteten Hirnregionen entnommen: Frontallappen rechts, Basalganglien links, Hippocampusformation rechts einschließlich Plexus choroideus, Mesencephalon mit Substantia nigra, Pons auf Höhe Locus coeruleus, Medulla oblongata mit Nuclei olivares inferiores, Hypophyse, Kleinhirnkortex und -marklager mit Nucleus dentatus rechts, Thalamus, Amygdala, Bulbus olfactorius. Bei Nachweis pathologischer Gewebeveränderungen erfolgte eine zusätzliche Gewebeentnahme aus den individuellen Läsionsorten.

2.3.1.1. Entnahme des Ganglion trigeminale

Kranial der Felsenbeinpyramide im Cavum trigeminale gelegen findet sich das Ganglion trigeminale, ein sensibles Ganglion des fünften Hirnnervens, des Nervus trigeminus. Dieses liegt eingebettet zwischen zwei Blättern der Dura mater und wurde beidseits sorgfältig aus dieser Duraduplikatur präpariert und asserviert (n=46).

2.3.2. Entnahme der Riechschleimhaut

Nach Entnahme des Gehirns gelangt die vordere Schädelgrube zur Darstellung, die das Dach der Orbita und Nasenhöhle bildet. Die Asservierung der Riechschleimhaut erfolgte standardisiert über die Entnahme eines quaderförmigen Gewebeblocks, der mittels Flachmeißel und Hammer aus der vorderen Schädelgrube präpariert wurde (Abbildung 2). Die Schleimhaut direkt unterhalb der Siebbeinplatte wurde vorsichtig von dem darunterliegenden Knochen abgelöst und asserviert (n=57).

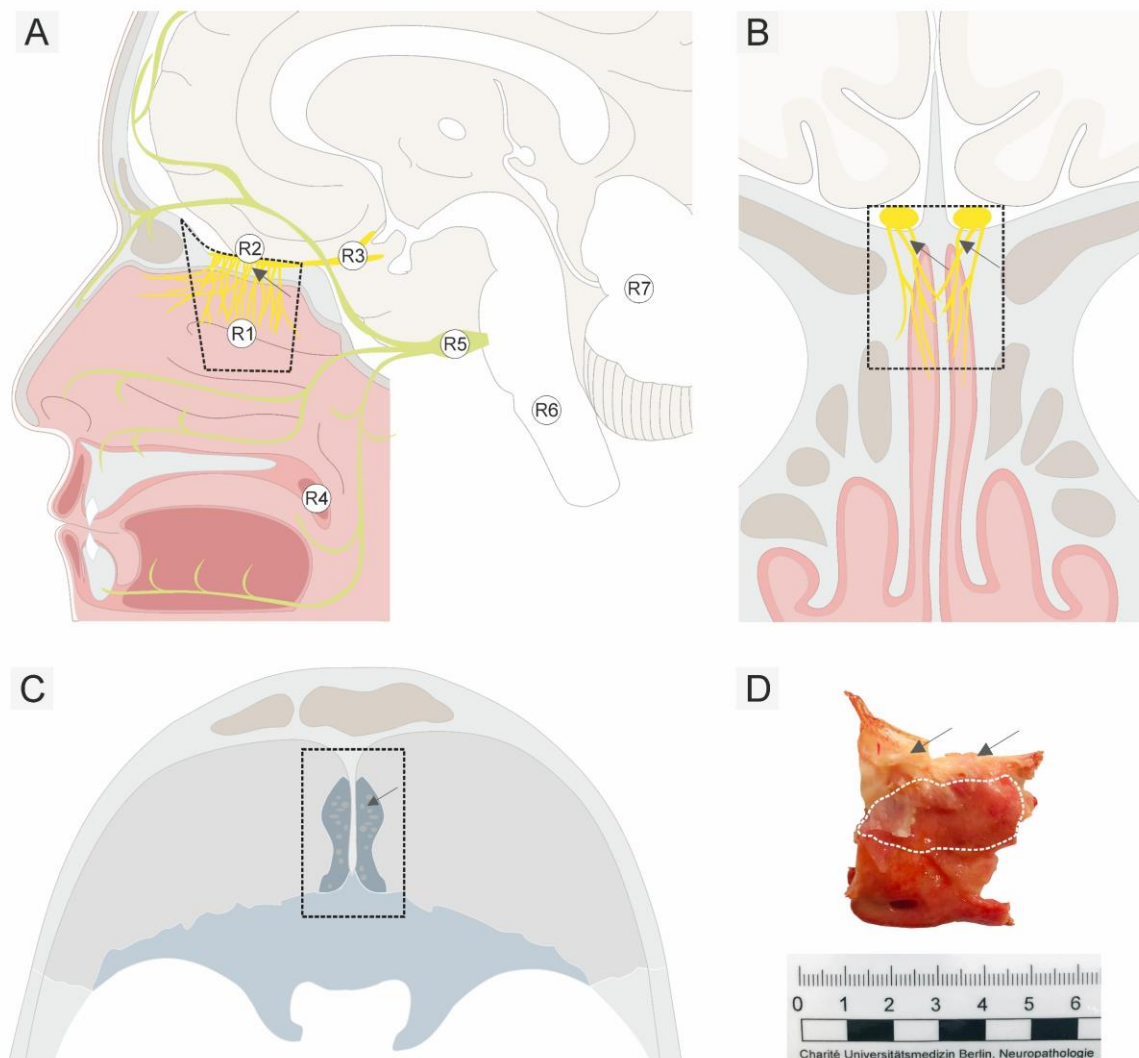


Abbildung 2. Entnahme der Riechschleimhaut.

Schnittbildanatomie des Kopfes. A, Sagittalebene. B, Frontalebene. C, Transversalebene. Präparationslinie zur Entnahme eines Gewebeblocks aus der vorderen Schädelgrube (schwarz gestrichelt; A - C). A, wichtige anatomische Regionen (R), R1 = Riechschleimhaut, R2 = Bulbus olfactorius, R3 = Tuberculum olfactorium, R4 = Uvula, R5 = Ganglion trigeminale, R6 = Medulla oblongata, R7 = Kleinhirn. D, Makroskopische Abbildung des entnommenen Gewebeblocks. Region der direkt unterhalb der Lamina cribrosa (Pfeile; A - D) asservierten Riechschleimhaut (weiß gestrichelt). A, B, modifiziert aus „Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021)“. C, D, eigene Abbildung.

2.3.3. Entnahme von Liquor cerebrospinalis

Die postmortale Entnahme von Liquor cerebrospinalis erfolgte bei Patient*innen, die im Zeitraum von März 2020 bis Juli 2020 verstorben sind und ein PMI von maximal 24 Stunden aufwiesen (n=4). Hierfür wurde nach Eröffnung der Schädelkalotte und Entnahme der Dura mater cranialis das Ventrikelsystem punktiert. Liquorproben wurden unmittelbar nach Entnahme von mir in der Kühlzentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0R für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und bei -80°C kryoasserviert.

2.3.4. Weitere asservierte Gewebeproben

Asserviert wurden von mir weiterhin Anteile der Kornea, Konjunktiva, Arteria carotis pars cerebralis, Uvula sowie zahlreicher weiterer peripherer Organe (u.a. Lunge, Hilus-Lymphknoten, Tonsille, Zunge, Zahnfleisch, Herz, Magen, Duodenum, Jejunum, Kolon, Leber, Gallenblase, Pankreas, Milz, Knochenmark, Niere, M. deltoideus, M. quadriceps, N. suralis).

Die von mir kryoasservierten Gewebeproben dienten als Ausgangspunkt für weitere Studien - so erfolgte die Aufarbeitung eines Falles in „*Ihlow J, Seelhoff A, Corman VM, Gruber AD, Dökel S, Meinhardt J, Radbruch H, Späth-Schwalbe E, Elezkurtaj S, Horst D, Herbst H. COVID-19: a fatal case of acute liver failure associated with SARS-CoV-2 infection in pre-existing liver cirrhosis. BMC Infect Dis. 2021 Sep 3;21(1):901. doi: 10.1186/s12879-021-06605-7. PMID: 34479499; PMCID: PMC8414454.*“.

Die Analyse der asservierten Muskelproben wird in “*Aschman T, Schneider J, Greuel S, Meinhardt J, Streit S, Goebel HH, Büttnerova I, Elezkurtaj S, Scheibe F, Radke J, Meisel C, Drosten C, Radbruch H, Heppner FL, Corman VM, Stenzel W. Association Between SARS-CoV-2 Infection and Immune-Mediated Myopathy in Patients Who Have Died. JAMA Neurol. 2021 Aug 1;78(8):948-960. doi: 10.1001/jamaneurol.2021.2004. PMID: 34115106.*” dargestellt.

Von mir (kryo-)asservierte Lungenproben bildeten weiterhin die Grundlage von “*Dittmayer C, Meinhardt J, Radbruch H, Radke J, Heppner BI, Heppner FL, Stenzel W, Holland G, Laue M. Why misinterpretation of electron micrographs in SARS-CoV-2-infected tissue goes viral. Lancet. 2020 Oct 31;396(10260):e64-e65. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32079-1. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33031763; PMCID: PMC7535802.*” und “*Dittmayer C, Meinhardt J, Radbruch H, Radke J, Heppner BI, Heppner FL, Stenzel W, Holland G, Laue M. Using EM data to understand COVID-19 pathophysiology - Authors' reply. Lancet. 2021 Jan 16;397(10270):197-198. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00032-5. PMID: 33453781; PMCID: PMC7831897.*”.

2.4. Probenasservierung und -aufarbeitung

Entnommene Gewebeproben wurden in Sinne einer "Biobank" asserviert und unterschiedlichen nachgelagerten Prozessen zugeführt. Die Prozesse des Biobankings (Präparation, Probenasservierung, Kryokonservierung) wurden von mir im Verlauf kontinuierlich optimiert.

2.4.1. Asservierung für den PCR-Nachweis von SARS-CoV-2

Um den Nachweis von SARS-CoV-2-RNA im Gewebe via PCR durchzuführen wurden kleine Gewebeanteile der nachfolgenden Regionen an das Institut für Virologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin übergeben: Bulbus olfactorius (n=57), Medulla oblongata (n=58), Kleinhirn (n=51), Ganglion trigeminale (n=46), Riechschleimhaut (n=57), Uvula (n=45), Cornea (n=15), Konjunktiva (n=17) sowie Arteria carotis pars cerebralis (n=37). Zu Studienbeginn wurde hierfür natives Material (gekühlt auf zerkleinertem Eis) nach der Sektion analysiert. Im Verlauf wurden die Gewebeproben zunächst im Ultratiefkühlschrank (-80°C) kryoasserviert, zwischengelagert und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert.

2.4.2. Asservierung für histopathologische und immunhistochemische Analysen

Für die neuropathologische Begutachtung von Gewebeproben wird üblicherweise Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE)-Gewebe genutzt, wodurch (1) das Gewebe konserviert wird, (2) die Gewebemorphologie sehr gut erhalten bleibt und (3) dünne, gleichmäßige Schnittpräparate erstellt werden können. Auch im Rahmen dieser Studie wurde für histopathologische und immunhistochemische Analysen (IHC) sowie die In-situ-Hybridisierung (ISH) FFPE-Gewebe genutzt. Die Konservierung und Stabilisierung der Gewebeproben erfolgte gemäß unserer im Institut für Neuropathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin genutzten standardisierten pathologischen Asservierungstechniken. Hierfür wurden native bzw. 14-tägig fixierte Gewebeproben präpariert, in Einbettkassetten eingebracht, in 4%iger PBS-gepufferter Formaldehydlösung über Nacht bei Raumtemperatur (nach-)fixiert, anschließend in Alkohol und Xylol dehydriert sowie in Paraffin eingebettet (sog. FFPE-Gewebe).

Die Formalinfixierung von Gewebe führt jedoch auch zu einer Modifizierung und Vernetzung von Proteinen (sog. Crosslinking), wodurch die Immunreaktivität des Gewebes sinkt, sodass im Rahmen immunhistochemischer Analysen Verfahren angewendet werden müssen um die verlorene Immunreaktivität (teilweise) wiederherzustellen (sog. Antigen-Retrieval). Da einige Antikörper nicht in FFPE-Material genutzt werden können existiert für spezielle Analysen ein Bedarf an kryokonserviertem Gewebe.

2.4.3. Methoden der Kryokonservierung

Je nach Verwendungszweck der Gewebeprobe erwiesen sich unterschiedliche Methoden der Kryokonservierung als optimal.

Folgende Methoden der Kryokonservierung wurden evaluiert: (1) Proben wurden in nativem Zustand in einen Ultratiefkühlschrank (-80°C) eingebracht und "langsam" gefroren, (2) Proben wurden in flüssigen Stickstoff eingebracht, schockgefroren (-196,15°C) und anschließend in Kryo-Tubes [1,5 ml] bei -80°C im Ultratiefkühlschrank aufbewahrt, (3) native Gewebeprobe wurden präpariert und auf Korkplättchen in Tissue-Tek® O.C.T. Compound eingebettet. Ein mit Isopentan (2-Methylbutan) gefüllter Metallbecher wurde in einen Stickstofftank gehängt, der flüssigen Stickstoff enthält. Das Isopentan wird hierdurch heruntergekühlt. Mittels Pinzette wurde das auf dem Korkplättchen eingebettete Gewebe für ca. 1 Minute in die flüssige Phase des Isopentans gehalten, eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Evaluation der Gewebequalität wurden Kryostatschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) sowie immunhistochemisch gefärbt. Eine qualitativ hochwertige Probe für histopathologische und immunhistochemische Analysen ist charakterisiert durch eine möglichst gute Orientierbarkeit der Gewebeprobe, eine hohe Gewebeintaktheit sowie geringe Ausbildung von Gefrierartefakten und/oder Eiskristallen. Diesbezüglich erwies sich die Kryokonservierung in Methylbutan gegenüber den anderen beiden Verfahren als überlegene Methode (Abbildung 3).

Diese Art der Kryokonservierung gewährt optimale Qualität und ermöglicht die Anwendung komplexer Analysemethoden wie "Spatial Transcriptomics", "Proteomics" oder "Single-cell-/Single-nucleus RNA-Sequencing", sodass die asservierten Gewebeprobe in Folgestudien weiter aufgearbeitet werden können.

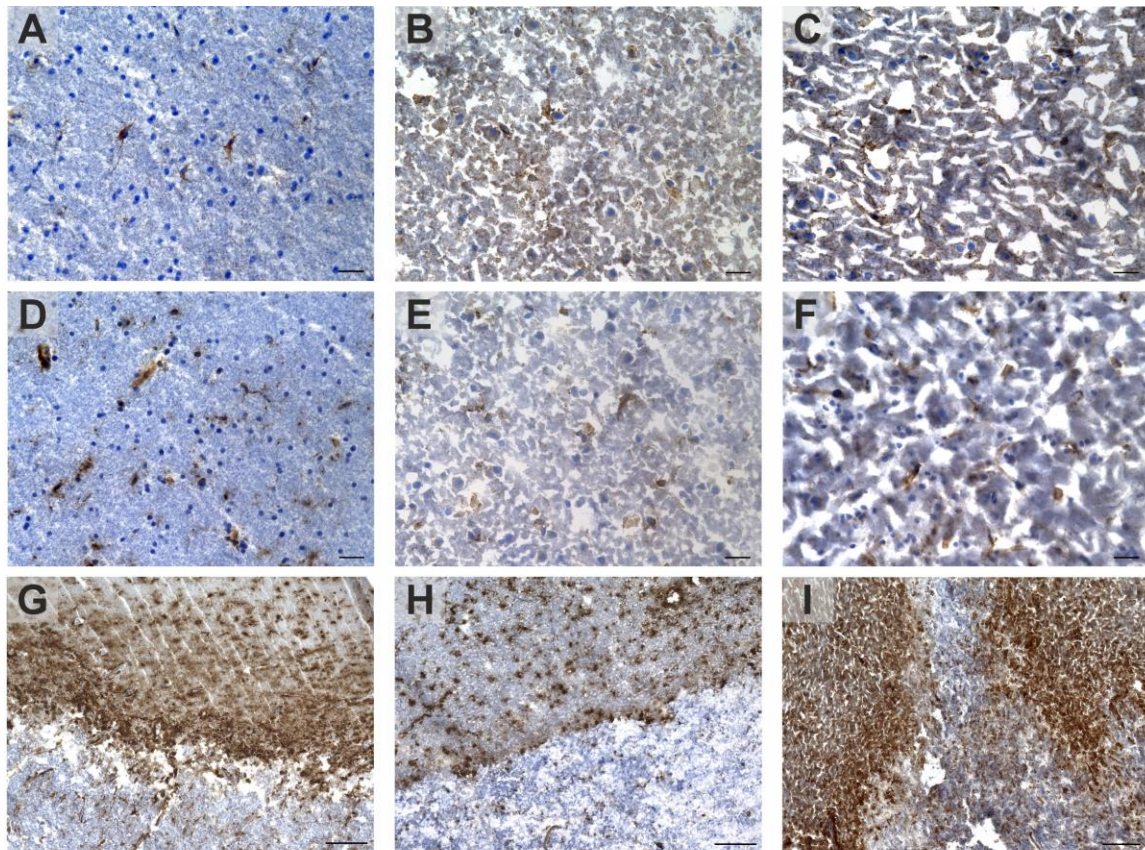


Abbildung 3. Evaluation der Gewebequalität kryokonservierter Gewebeproben.

Immunhistochemische Färbungen von Kryostatschnitten (A-C, GFAP; D-I, HLA-DR). Gewebeproben des regelhaften zerebralen Kortex (A-F) und eines Infarktareals (G-I) wurden mittels unterschiedlicher Arten der Kryokonservierung asserviert und im Hinblick auf die Gewebequalität evaluiert. A, D, G, Kryokonservierung in Isopentan. B, E, H, Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff. C, F, I, „langsameres“ Einfrieren im Ultratiefkühlschrank bei -80°C. Die höchste Gewebequalität ermöglicht die Kryokonservierung in Isopentan (linke Spalte). Gewebeproben, die in flüssigem Stickstoff kryoasserviert wurden zeigen eine mäßiggradige Ausbildung von Gefrierartefakten/Eiskristallen (mittlere Spalte). Die stärksten artifiziellen Veränderungen zeigen die im Ultratiefkühlschrank bei -80°C eingefrorenen Gewebeproben. Hier lassen sich zahlreiche Gefrierartefakte und damit einhergehend eine deutliche Abnahme der Gewebeintegrität erkennen - wodurch die Beurteilbarkeit der Präparate eingeschränkt ist. Maßstab: A-F: 50 µm, G-I: 150 µm. Eigene Abbildung.

2.4.4. Asservierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um Proben für elektronenmikroskopische Untersuchungen zugänglich zu machen, fixierte ich Gewebeproben direkt nach der Entnahme im Sektionssaal mit 2,5%igem Glutaraldehyd in 0,1 µM Natriumcacodylatpuffer.

Es erfolgte dann eine Nachfixierung mit 1%igem Osmiumtetroxid in 0,05 µM Natriumcacodylat, die Dehydratisierung unter Verwendung einer absteigenden Acetonreihe und die Einbettung in Einbettharz (LR White Resin).

2.5. Nachweis von SARS-CoV-2-RNA einschließlich subgenomischer (sg)RNA

Methode der Wahl für den Nachweis von SARS-CoV-2-RNA im Gewebe ist die PCR⁸⁰. Der Nachweis von SARS-CoV-2-RNA im Autopsiegewebe erfolgte im Institut für Virologie der Charité

- Universitätsmedizin Berlin. Für die PCR-Analyse wurden native und kryokonservierte Gewebeproben verwendet. Die RNA-Reinigung erfolgte aus ~50 mg homogenisiertem Gewebe unter Verwendung des MagNAPure 96-Systems (Hoffman-La Roche, Basel, CHE) und des MagNAPure 96 DNA und Viral NA Large Volume Kit (Hoffman-La Roche, Basel, CHE) gemäß den Anweisungen des Herstellers. An den RNA-Extrakten wurde eine quantitative Echtzeit-PCR für SARS-CoV-2 durchgeführt⁸¹, die das SARS-CoV-2 E-Gen als Zielsequenz nutzt. Die Quantifizierung der viralen RNA wurde unter Verwendung photometrisch quantifizierter in vitro RNA-Transkripte durchgeführt. Die Gesamt-DNA wurde in allen Extrakten unter Verwendung des Qubit dsDNA HS Assay-Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Die qPCR-Analyse wurde für jede Probe mindestens einmal wiederholt.

Der Nachweis von subgenomischer (sg)RNA als Korrelat der aktiven Virusreplikation im getesteten Gewebe wurde unter Verwendung von Oligonukleotiden durchgeführt, die auf die transkriptionale regulatorische Leadersequenz und eine Region innerhalb der sgRNA abzielen, die das SARS-CoV-2 E-Gen kodiert. Diese Methodik wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben⁸².

2.6. Human Cytokine Array

Zur Quantifizierung pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Liquor cerebrospinalis von Verstorbenen mit COVID-19 (n=4) und Kontrollpatient*innen ohne SARS-CoV-2-Infektion (n=4) wurde an den asservierten Liquorproben ein humaner Zytokin Array gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt (Bio-technie, Minneapolis, MN). Hierfür wurden die von mir asservierten Liquorproben an das Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Universitätsmedizin Magdeburg übergeben. Analysiert wurden somit alle Liquorproben von Verstorbenen mit COVID-19, die zum Zeitpunkt der Analyse zugänglich waren (n=4). Liquorproben von vier Patient*innen ohne COVID-19 dienten als Kontrollgruppe (n=4). Bei den Kontrollproben handelte es sich um Liquorproben von Patient*innen mit Amyotropher Lateralsklerose, die im Rahmen einer Einwilligung zur Spende an die BrainBank des Instituts für Neuropathologie asserviert wurden. Mittels des humanen Zytokin Array erfolgte eine semiquantitative Messung von 36 Zytokinen und verwandten Proteinen (CCL1, CCL2, MIP-1 α , CCL5, CD40L, C5/C5a, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, G-CSF, GM-CSF, ICAM-1, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-16, IL-17A, IL-17E, IL-18, IL-21, IL-27, IL-32a, MIF, Serpin E1, TNF- α , TREM-1). Zwölf dieser 36 Zytokine lagen in unseren Proben über der Nachweisgrenze. Die verwendeten Membranen wurden unter Verwendung der Ergebnisse für die Positivkontrollen aufeinander normalisiert. Eine statistische Analyse konnten wir aufgrund des nur eingeschränkten Zugangs zu adäquaten Liquorproben (PMI < 24h) und der dadurch bedingten geringen Probengröße (n=4) nicht durchführen.

2.7. Histopathologie und Immunmarkierung

Zur Untersuchung der mit einer SARS-CoV-2-Infektion einhergehenden ZNS-Veränderungen sowie des Tropismus von SARS-CoV-2 wurden histopathologische Präparate unter Verwendung von Spezialfärbungen sowie immunhistochemischer Markierungen angefertigt. Hierfür wurden 1 µm oder 4 µm dicke Paraffinschnitte verwendet. Die Präparate wurden von mir sowie mindestens einem/einer weiteren Neuropathologen/in an einem Lichtmikroskop im Hellfeldmodus gesichtet und bewertet.

2.7.1. Histopathologische Färbungen

Die histologischen Färbungen: Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung, Masson-Goldner-Färbung, Periodsäure-Schiff(PAS)-Reaktion, sowie die Toluidinblau-Färbung wurden in unserem Labor im Institut für Neuropathologie gemäß routinemäßiger Standardverfahren an 4 µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt.

2.7.2. Immunmarkierung

Immunhistochemische Färbungen wurden entweder maschinell bei uns im Institut für Neuropathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin auf einem Benchmark XT Autostainer (Ventana Medical Systems, Inc.) oder von Hand (von mir bzw. im Institut für Neuropathologie in Göttingen) durchgeführt. Maschinelle Färbungen erfolgten unter Anwendung von Standard-Vorbehandlungsmethoden (Antigen-Retrieval; Cell Conditioning(CC1)-Puffer; pH 8,0; Ventana Medical Systems, Inc.) sowie des iVIEW DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc.) oder ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc.). Die Durchführung der manuellen Färbungen wird nachfolgend anhand der immunhistochemischen Färbung mit dem Anti-SARS-Spike-Glykoprotein-Antikörper (Klon 3A2, ab272420, Abcam) beispielhaft ausführlich erläutert. Gefärbte Schnittpräparate wurden in einer absteigenden Alkohol- und Xylol-Reihe dehydratisiert und mit Cytoseal™ XYL permanent Eindeckmedium bzw. bei Verwendung von AEC im wässrigen Medium eingedeckelt. Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind separat unter Punkt 2.1.3. *Tabelle 3. Verwendete Antikörper*, aufgelistet.

2.7.3. SARS-CoV S IHC

Die immunhistochemische Färbung mit dem murinen, monoklonalen Anti-SARS-Spike-Glykoprotein-Antikörper (Klon 3A2, ab272420, Abcam) erfolgte manuell. Hierfür wurden 1 µm dicke FFPE-Gewebeschnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und über Nacht im Wärmeschrank bei 42°C getrocknet. Paraffinschnitte wurden in Xylol sowie der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in destilliertes Wasser gestellt. Es folgte eine Hitze-

/proteolytische Vorbehandlung des Gewebes (sog. Heat Induced Epitope Retrieval (HIER)), wobei die Schnitte für 20 Minuten in Citratpuffer gekocht (pH 6,0; 95-100 °C) wurden. Als zweiter Vorbehandlungsschritt wurde ein endogener Peroxidase-Block (3%) sowie ein leichter Gewebeandau (1%) durchgeführt. Hierfür wurde in einem Objektträgerkasten nach Hellendahl (für 8 Objektträger bzw. 16 Objektträger Rücken an Rücken) eine Lösung bestehend aus 40 ml 1 x PBS-Puffer, 5 ml 30%iges Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und 5 ml 10%iges Triton X-100 hergestellt. In dieser Lösung wurden die Schnitte für 15 Minuten belassen und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde das Gewebe für 10 Minuten mit 10%igem Ziegenserum (Normal Goat) geblockt, bevor der Primärantikörper (Anti-SARS-Spike-Glykoprotein-Antikörper, Klon 3A2, ab272420, Abcam) 1:100 verdünnt in Antikörper-Verdünnungsmittel aufgetragen wurde und die Proben über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C inkubierten. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zunächst gründlich in 1x PBS-Puffer gespült und anschließend das Sekundärsystem (EnVision Detection System Peroxidase/DAB, Agilent Dako, #K5007) auf das Gewebe gegeben und für 60 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgte eine erneute gründliche Spülung des Gewebes mit 1x PBS-Puffer. DAB- oder AEC-Substrat-Chromogen (Agilent Dako, Santa Clara, USA) wurde aufgetragen und unter Sicht am Mikroskop entwickelt. Die Objektträger wurden erneut mit destilliertem Wasser gespült, mit Hämatoxylin gegengefärbt, entwässert und montiert. Diese manuelle Färbung wurde von mir und im Institut für Neuropathologie in Göttingen durchgeführt. Im Rahmen der Etablierungsarbeit färbte ich Paraffinschnitte unterschiedlicher Organe (u.a. Lunge, Riechschleimhaut, Cornea, ZNS-Gewebe, Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur, Duodenum, Colon, Plazenta) von an COVID-19 Verstorbenen und Negativkontrollen.

2.7.4. Immunfluoreszenz (IF)

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurde das unter 2.7.3. beschriebene Protokoll in den folgend aufgelisteten Schritten angepasst. Nach Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C wurden Alexa Fluor™ 488- und Alexa Fluor™ 555-konjugierte Sekundärantikörper (Alexa Fluor™ 488-konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, 1:100 in 10%igem Ziegenserum, Jackson, 111515003; Alex Fluor® 555-konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper, 1:100 in 10%igem Ziegenserum, Invitrogen) für 60 Minuten auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte mit einem Tyramid verstärkendem Kit gemäß Angaben des Herstellers (Alexa Fluor™ 555 Tyramide SuperBoost™ Kit, Invitrogen) unter Sicht am Mikroskop. Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol(DAPI)-Eindeckmedium (Invitrogen, D3571) gefärbt. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem automatischen Fluoreszenzmikroskop Olympus BX63 mit DP80-Kamera sowie dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Olympus FluoView FV1000 unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektives mit 60-facher Vergrößerung. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden im

Institut für Neuropathologie in Göttingen und bei uns im Institut für Neuropathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt; die Auswertung der Färbungen erfolgte durch mich sowie mindestens einem/einer weiteren Neuropathologen/in.

2.8. In-situ-Hybridisierung (ISH)

Zum Nachweis von Virus-RNA im Gewebe wurde das RNAScope® 2.5 HD Reagent Kit-BROWN (ACD, Newark, USA) verwendet. Von ausgewählten FFPE-Gewebeblöcken wurden Paraffinschnitte angefertigt, 60 Minuten im Wärmeschrank bei 60°C getrocknet und entparaffiniert, bevor eine milde Antigendemaskierung mit Target Retrieval-Puffer und Protease durchgeführt wurde. Die vorbehandelten Schnitte wurden mit spezifischen PPIB-Sonden als Positivkontrolle und DAP β -Sonden als Negativkontrolle hybridisiert (ACD, Newark, USA). Zur Visualisierung von SARS-CoV-2-RNA wurde die virusspezifische Sonde V-ncov2019-S (ACD, Newark, USA) verwendet. FFPE-Lungengewebe einer an COVID-19 verstorbenen Person diente als weitere interne Positivkontrolle. Nach der Amplifikation des Hybridisierungssignals wurde die Bindung der Sonden mit DAB sichtbar gemacht. Kerne wurden mit Hämatoxylin gefärbt und die Objektträger mit Eindeckmedium unter Deckglas eingedeckt. Die Durchführung erfolgte durch die iPATH.Berlin; die Auswertung erfolgte durch mich sowie mindestens einem/einer weiteren Neuropathologen/in.

2.9. Elektronenmikroskopische Verfahren

Für die Ultrastrukturanalyse der Autopsiegewebeproben wurden zunächst fixierte, dehydratisierte und in Einbettharz (LR White Resin) eingebettete Gewebeproben (*siehe 2.4.4.*) mit einem Ultramikrotom für Kunstharzschnitte (Ultracut E, Reichert-Jung) und Diamantmesser (DiATOME, histo jumbo) in 500-nm-Semidünnschnitte geschnitten, auf Objektträger übertragen, bei 120 °C auf einer Heizplatte kurz gestreckt und mit Toluidinblau bei 80°C gefärbt. 70-nm-Ultradünnschnitte wurden mit dem gleichen Ultramikrotom und einem Ultra 35° Diamantmesser (DiATOME) geschnitten, mit Xyloldampf gestreckt, auf Pioloform-beschichteten Schlitzgittern gesammelt und dann mit Bleicitrat gefärbt.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde unter Verwendung eines Zeiss TEM 906-Mikroskops in Verbindung mit einer Charge-Coupled Device(CCD)-Kamera durchgeführt. Die Bildaufnahme und Digitalisierung erfolgte mit einem Zeiss Gemini 300 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (REM) und REM-Detektor unter Verwendung der Software ATLAS 5 bei einer Pixelgröße von 4–6 nm. Interessante Bereiche aus den angelegten Datensätzen wurden annotiert und dann mit einer Pixelgröße von 0,5–1 nm in sehr hoher Auflösung aufgezeichnet. Mittels dieses Verfahrens wurden die Gewebeproben morphologisch analysiert, um Erkenntnisse über die Pathophysiologie von COVID-19 zu erlangen - der direkte Virusnachweis im Gewebe

gelang jedoch zunächst nicht. Für den Virusnachweis im Gewebe auf ultrastruktureller Ebene optimierten wir daraufhin die Probenentnahme und verwendeten FFPE-Material.

2.9.1. Ultrastrukturanalyse an FFPE-Material

Um den Virusnachweis im Gewebe auf ultrastruktureller Ebene durchzuführen haben wir 3-mm-Stanzbiopsiezylinder aus FFPE-Gewebeblöcken der Riechschleimhaut einer an COVID-19 verstorbenen Person entnommen. Die jeweiligen gestanzten Areale wurden sorgfältig auf Grundlage der in der PCR-Untersuchung ermittelten Viruslast des Gewebes sowie des SARS-CoV ISH- oder IHC-Signals ausgewählt. Hierfür wurde vor der Entnahme der FFPE-Stanze an Paraffinschnitten der Riechschleimhaut eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Anti-SARS-Spike-Glykoprotein-Antikörper (Klon 3A2, ab272420, Abcam) sowie eine ISH durchgeführt, signalstarke Areale auf den histologischen Präparaten markiert und nach Abgleich mit dem FFPE-Gewebeblock gestanzt. Die FFPE-Stanzbiopsiezylinder wurden anschließend in Xylol entparaffiniert, rehydratisiert und in 1% Formaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in 0,05 µM HEPES-Puffer (pH 7,2) für mindestens 2–4 Stunden bei Raumtemperatur nachfixiert. Nachfixierung, Blockkontrastierung (Gerbsäure, Uranylacetat) und Einbettung in EPON™-Harz wurden nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Ultradünnschnitte wurden an einem TEM (Tecnai™ Spirit, 120 kV) analysiert und Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (MegaviewIII, EMSIS) aufgenommen.

2.10. Statistik

Es wurden keine statistischen Methoden verwendet um Stichprobengrößen im Voraus zu bestimmen. Ich habe alle Personen, die an einer COVID-19-Infektion verstorben sind und mir/uns zum gegebenen Zeitpunkt zugänglich waren in die Studie aufgenommen. Die Stichprobengrößen ähneln denen in früheren COVID-19-Autopsieberichten. Um die Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und Viruslast zu ermitteln, wendete ich die nichtparametrische Korrelation nach Spearman unter Verwendung des Programms Graphpad Prism 8 an. Hier wurde ein zweiseitiger P-Wert berechnet. Die Werte wurden bei $P < 0,05$ als signifikant angesehen. Aufgrund der Art der Untersuchungen konnten Datenerhebungen und Analysen nicht immer blind durchgeführt werden. Histologische und immunhistochemische Präparate, ISH- und EM-Ergebnisse wurden unabhängig von mir und mindestens einem/einer weiteren Neuropathologen/in analysiert.

2.11. Bildbearbeitung

Die in diesem Manteltext sowie der Publikation *Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. Nat Neurosci* **24**, 168–175 (2021). zur Darstellung kommenden

Grafiken/Comics wurden von mir mit CorelDRAW 19 sowie GraphPad Prism 8 erstellt. Fotografien und histologische Aufnahmen wurden mit Adobe Photoshop Elements 4.0 oder der Software Fiji in Helligkeit, Kontrast und Sättigung angepasst.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Studienkohorte

Klinische Patient*innendaten erhob ich mittels der jeweiligen Leichenschauscheine sowie der (elektronischen) Patient*innenakten. Erfasst wurden Basischarakteristika der Verstorbenen, darunter fielen Geschlecht, Geburts- und Sterbedatum, Körpergröße und -gewicht, Dauer der SARS-CoV-2-Infektion sowie weitere potentielle Confounder wie Vorerkrankungen, Behandlungen/Therapien, Komplikationen und mikrobiologische Daten. Die Dokumentation klinischer Daten ist aufgrund der Pandemie-Situation in einigen Fällen nicht vollständig.

3.1.1. Demografische Daten

Im Zeitraum zwischen März 2020 und Mai 2021 wurden 91 Personen mit einer mittels PCR nachgewiesenen SARS-CoV-2-Infektion (n=89 von 91) bzw. klinischen Merkmalen, die hochgradig verdächtig auf das Vorliegen einer SARS-CoV-2-Infektion sind (n=2 von 91), untersucht. Von diesen untersuchten Verstorbenen sind 23 (25%) weiblichen und 68 (75%) männlichen Geschlechts. Das mittlere Alter bei Versterben beträgt 69 Jahre (R = 26 bis 98 Jahre; IQA = 16 Jahre). Ein Vergleich mit der Geschlechts- und Altersverteilung der deutschlandweiten COVID-19-Todesfälle (Quelle: Robert-Koch-Institut Dashboard (Stand: 10/2021) verdeutlicht, dass sich unsere Kohorte – als spezielle Autopsiekohorte - durch ein niedrigeres Durchschnittsalter sowie einen höheren Anteil an Männern auszeichnet (Abbildung 4).

3.1.2. Erkrankungsdauer

Die Erkrankungsdauer, definiert als Zeitraum zwischen Auftreten der ersten Symptome bzw. erstem positiven SARS-CoV-2-PCR-Test und Versterben, liegt in unserer Kohorte zwischen einem Tag und 176 Tagen; die mittlere Erkrankungsdauer beträgt 34,6 Tage (IQA= 22Tage). Der Erkrankungsbeginn ist bei sechs Patient*innen unklar bzw. nicht dokumentiert (n= 6 von 90). Gemäß der Erkrankungsdauer haben wir die Kohorte in zwei Subgruppen gegliedert: als "akute" Fälle definierten wir Patient*innen mit einem Erkrankungsverlauf ≤ 14 Tage (n=19), als "chronische" Fälle Patient*innen mit einer Erkrankungsdauer >14 Tagen (n=65). Bei sieben Patient*innen konnten keine Rückschlüsse auf den Erkrankungsbeginn gezogen werden.

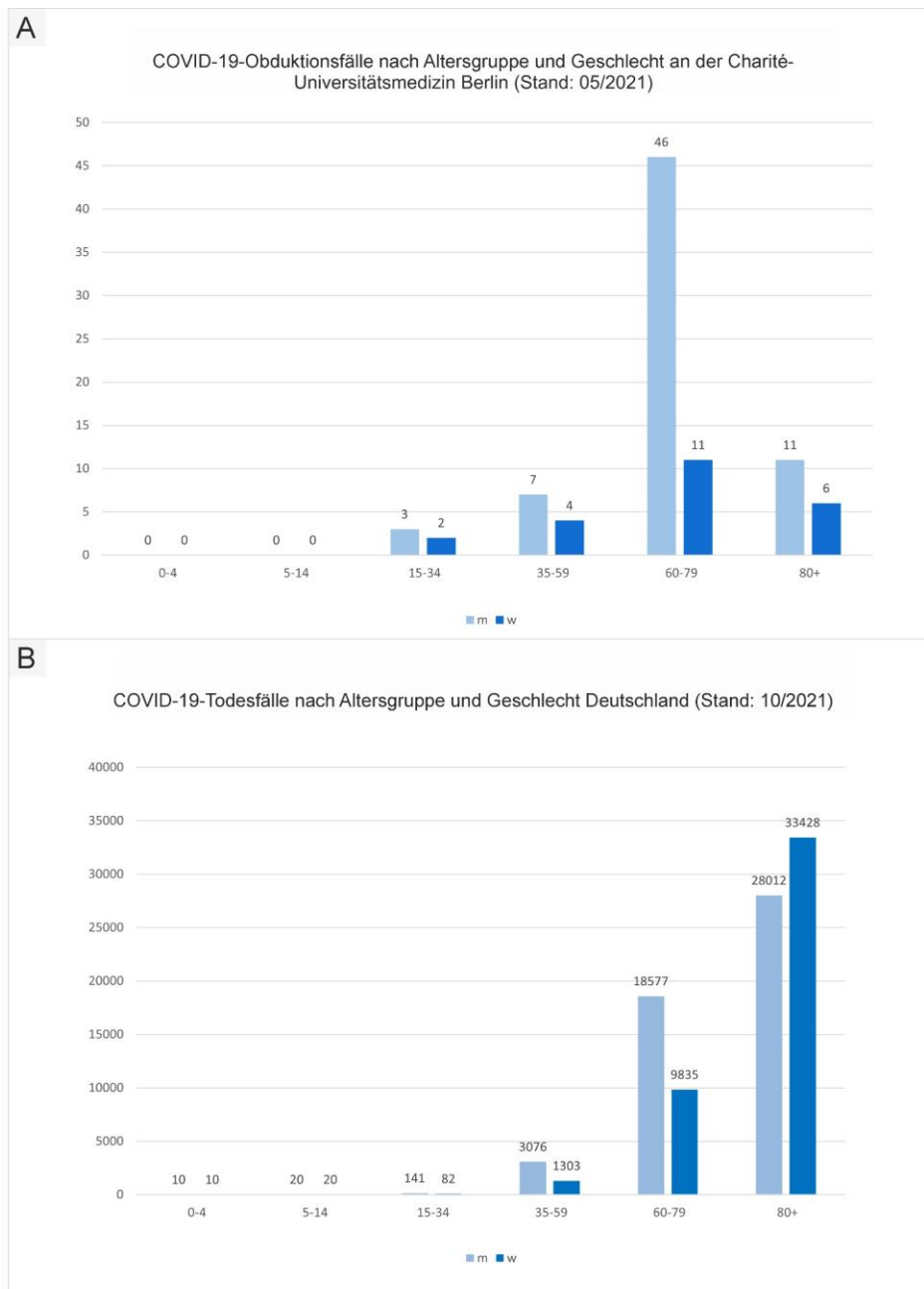


Abbildung 4. COVID-19-Todesfälle nach Altersgruppe und Geschlecht.

A, COVID-19-Obduktionsfälle unserer Studienkohorte nach Altersgruppe und Geschlecht. B, COVID-19-Todesfälle nach Altersgruppe und Geschlecht in Deutschland; Quelle: *Robert-Koch-Institut: COVID-19-Dashboard (Stand: 10/2021)*. A,B, Angabe in absoluten Zahlen. Eigene Abbildung.

3.1.3. Neurologische Veränderungen während COVID-19-Infektion

Eine unvollständige Dokumentation der Patient*innendaten zeigte sich insbesondere im Hinblick auf neurologische Veränderungen während der COVID-19-Infektion. Informationen bezüglich der Qualität des Geruchs- und Geschmackssinns wurden lediglich bei zwei Patient*innen dokumentiert, in diesen Fällen wurde ein Verlust der Geruchs- und Geschmackswahrnehmung

(Anosmie, Ageusie) beschrieben. In allen anderen Fällen fanden sich diesbezüglich keine Angaben in den elektronischen Patient*innenakten. Die dokumentierten neurologischen Manifestationen werden in Tabelle 6 näher dargestellt.

3.1.4. Weitere klinische Daten

Weitere Informationen zu bestehenden Vorerkrankungen, durchgeführten Therapien, den mit der COVID-19-Erkrankung einhergehenden Komplikationen sowie der laut anatomisch-pathologischer Sektion identifizierten Todesursache werden in Tabelle 6 abgebildet.

Tabelle 6. Charakteristika der Studienkohorte.¹

Charakteristika	Anzahl der Patient*innen mit COVID-19 (%)		
	Gesamt	Akut	Chronisch
Patient*innenanzahl	91	19 [84] (23%)	65 [84] (77%)
Alter [Mittelwert in Jahren]	69	75	67
<35	5 (6%)	0	5 (8%)
35-59	11 (12%)	0	11 (17%)
60-69	26 (29%)	5 (26%)	20 (31%)
70-79	31 (34%)	5 (26%)	23 (35%)
>80	17 (19%)	9 (48%)	8 (12%)
Geschlecht			
weiblich	23 (26%)	6 (32%)	17 (26%)
männlich	67 (74%)	13 (68%)	54 (83%)
BMI			
Anzahl der Pat. mit verfügbaren Daten	77	17	60
Mittelwert {IQA}	31 {8,3}	29 {7,9}	32 {8,8}
Erkrankungsdauer [Tage]			
Anzahl der Pat. mit verfügbaren Daten	84	19	65
Mittelwert {IQA}	35 {20}	9 {8}	41 {16}
Neurologische Veränderungen während COVID-19			
Anzahl der Patienten mit verfügbaren Daten	50	13	37
Keine neurologischen Symptome	17 (34%)	4 (31%)	13 (35%)
Kopfschmerzen	4 (8%)	0	4 (11%)
Desorientierung	3 (6%)	2 (15%)	1 (3%)
Bewusstseinsstörungen	20 (40%)	7 (54%)	13 (35%)
Synkopen	3 (6%)	1 (8%)	2 (5%)
Dysarthrie	3 (6%)	0	3 (8%)
Ataxie	2 (4%)	0	2 (5%)
Persönlichkeitsveränderungen	2 (4%)	0	2 (5%)
Ganzkörperschmerzen	3 (6%)	2 (15%)	1 (3%)
Komplikationen			
ARDS	62 [83] (75%)	9 [17] (53%)	53 [60] (88%)
Sepsis/Septischer Schock	48 [83] (58%)	3 [18] (17%)	44 [62] (71%)
Akute zerebrale ischämische Schädigung	17 [86] (20%)	3 [19] (16%)	14 [65] (22%)
Intrakranielle Blutung	14 [86] (16%)	3 [19] (16%)	11 [65] (17%)

Therapien²			
Invasive Beatmung	61 [81] (75%)	6 [18] (33%)	54 [61] (89%)
Nierenersatztherapie	43 [75] (56%)	4 [17] (24%)	38 [56] (68%)
Extrakorporeale Membranoxygenierung	31 [83] (49%)	2 [18] (11%)	29 [62] (47%)
Katecholamine	60 [79] (76%)	7 [17] (41%)	54 [60] (90%)
Kortikosteroide	46 [74] (62%)	6 [15] (40%)	40 [57] (70%)
Anti-IL-6/Anti-IL-1	10 [72] (14%)	0	10 [55] (18%)
Intravenöse Immunglobuline	8 [71] (11%)	0	8 [54] (15%)
Vorerkrankungen			
Bluthochdruck	48 [81] (59%)	11 [18] (61%)	35 [60] (58%)
KHK	21 [81] (26%)	7 [18] (39%)	12 [60] (20%)
Diabetes mellitus Typ II	13 [81] (16%)	4 [18] (22%)	9 [60] (15%)
BMI > 30 kg/m ²	37 [78] (47%)	6 [16] (38%)	31 [57] (54%)
COPD	8 [81] (10%)	1 [18] (6%)	7 [60] (12%)
Asthma bronchiale	7 [81] (9%)	1 [18] (6%)	6 [60] (10%)
Chronisches Nierenversagen	14 [81] (17%)	6 [18] (33%)	5 [60] (8%)
Tumorerkrankung in der Vorgeschichte	8 [81] (10%)	2 [18] (11%)	5 [60] (8%)
Neurodegenerative Erkrankung	13 [80] (16%)	6 [17] (35%)	6 [60] (10%)
Vorbekannte Hirninfarkte	12 [80] (15%)	5 [17] (29%)	7 [60] (12%)
COVID-19 Todesursache gemäß anatomisch-pathologischer Sektion			
Ja	75 [82] (91%)	14 [17] (82%)	58 [62] (94%)
Nein	7 [82] (9%)	3 [17] (18%)	4 [62] (6%)
Postmortales Intervall [Stunden]			
<24 Stunden	17	3	12
>24 Stunden	73	14	52
Mittelwert {IQA}	84 {66}	90 {71}	77 {87}

¹ Daten sind angegeben als absolute Häufigkeiten; eckige Klammern geben die Anzahl der Patient*innen mit verfügbaren Daten bzgl. der jeweiligen Fragestellung an; Angabe der prozentuellen Häufigkeit in runden Klammern.

² 20 Patienten*innen erhielten bei Berücksichtigung vorliegender Patientenverfügungen bzw. aufgrund einer hochpalliativen Vorerkrankung keine Maximaltherapie.

Eigene Abbildung

3.2. SARS-CoV-2 Viruslast in ausgewählten Gewebeproben

Der Nachweis von SARS-CoV-2-RNA via RT-PCR erfolgte in ausgewählten Gewebeproben (Abbildung 5). Aufgrund des häufigen Auftretens von Geruchs- und Geschmacksstörungen während einer SARS-CoV-2-Infektion bezogen wir Gewebeproben aus unterschiedlichen Verarbeitungsstufen des Geruchssinns, i.e.S. die Riechschleimhaut (n=57), den Bulbus olfactorius (n=57) und das Tuberculum olfactorium (n=6)), in unsere Analysen ein. Die sensible Innervation der Nasenhöhle erfolgt durch feine Nervenäste des V. Hirnnervens - dem N. trigeminus. Da auch die Kornea und Konjunktiva durch Nervenäste des N. trigeminus innerviert

werden und die Innervation der Mundhöhle sogar durch fünf Hirnnerven (N. vagus, N. facialis, N. trigeminus, N. glossopharyngeus, N. hypoglossus) erfolgt, untersuchten wir zusätzlich Gewebeproben entlang dieser potentiellen Eintrittswege in das ZNS. Hierfür ermittelten wir die SARS-CoV-2 Viruslast in den Proben der Uvula (n=45), Kornea (n=14), Konjunktiva (n=17) und dem Ganglion trigeminale (n=46). Projektionsziel sensibler Hirnnerven stellen u.a. die im Hirnstamm gelegenen Hirnnerven-Kerngebiete dar. Für unsere Fragestellungen relevante Kerngebiete wie der Nucleus tractus solitarii sowie Kerngebiete des N. vagus, N. hypoglossus und N. trigeminus sind in der Medulla oblongata (n=58) verortet. Hier finden sich darüber hinaus lebenswichtige Regulationszentren, die bei Schädigung zu einer zentralen Störung der Kreislauf- und Atemfunktion führen können.

Zur Untersuchung möglicher systemischer (vaskulärer) Eintrittswege testeten wir Gewebeproben der Arteria carotis interna pars cerebralis (n=37) sowie des Kleinhirns (n=51). Das Kleinhirn steht weder in direkter Verbindung mit dem zentralen Geruchssystem noch mit den Hirnnerven-Kerngebieten.

Abbildung 5 gibt einen Überblick der ermittelten Viruslast in den jeweiligen Gewebeproben. Die größte Anzahl an SARS-CoV-2-positiven Proben sowie die höchste Viruslast fanden sich in der Riechschleimhaut ($n_{\text{positiv}}=39$ von 57; 83%). Die zweithöchste Menge an SARS-CoV-2-RNA wurde in den Gewebeproben der Uvula ($n_{\text{positiv}}=20$ von 45; 44%) gemessen. Eine niedrigere Viruslast zeigte sich in der Kornea ($n_{\text{positiv}}=3$ von 14; 21%), der Medulla oblongata ($n_{\text{positiv}}=9$ von 58; 16%), der Arteria carotis interna pars cerebralis ($n_{\text{positiv}}=5$ von 37; 14%), dem Ganglion trigeminale ($n_{\text{positive}}=6$ von 46; 13%), dem Bulbus olfactorius ($n_{\text{positiv}}=7$ von 57; 12%) sowie der Konjunktiva ($n_{\text{positiv}}=2$ von 17; 12%). Die geringste Anzahl an SARS-CoV-2-RNA-positiven Proben fand sich im Kleinhirn ($n_{\text{positiv}}=5$ von 51; 10%).

1 Der Nucleus tractus solitarii (auch: Geschmackskern) dient der Geschmackswahrnehmung, in diesem Kerngebiet enden Fasern des N. facialis, N. glossopharyngeus und N. vagus. Weiterhin ist er an der Ausbildung des Atemreflexes beteiligt⁸³.

2 Das Atemzentrum steuert über ein Wechselspiel inspiratorischer und expiratorischer Neuronengruppen die menschliche Ein- und Ausatmung. Unterschieden wird eine dorsale respiratorische Gruppe (DRG) im Nucleus tractus solitarii mit hauptsächlich inspiratorischen Neuronen und eine ventrale respiratorische Gruppe (VRG) im Bereich des Nucleus ambiguus mit sowohl inspiratorischen als auch expiratorischen Neuronen⁸⁴.

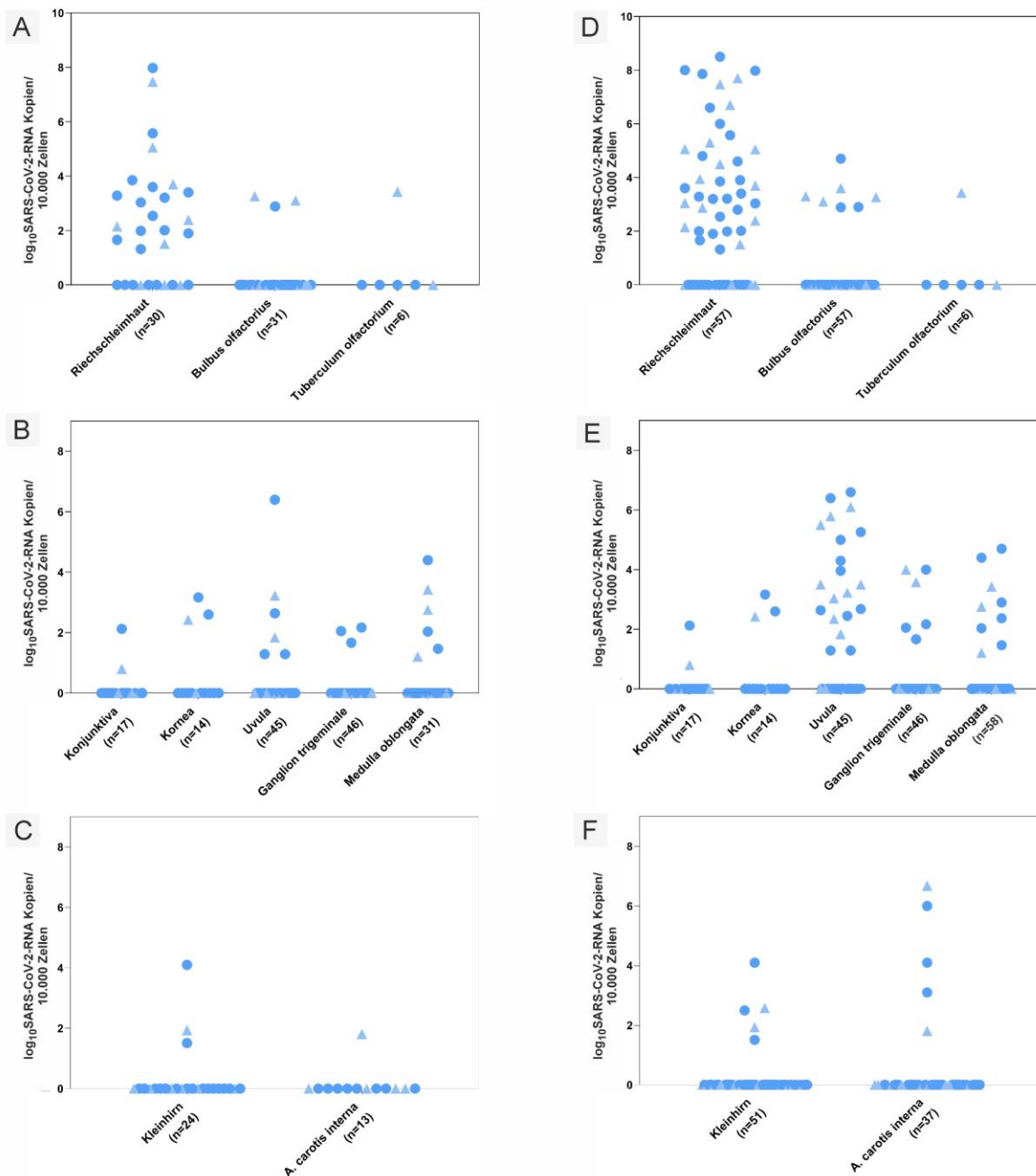


Abbildung 5. Nachweis von SARS-CoV-2-RNA mittels RT-qPCR.

Quantitative Daten für jedes Individuum, dargestellt auf einer logarithmischen Skala, normalisiert auf 10.000 diploide Zellen. A-C; Daten der Patient*innen, die im Zeitraum von März 2020 bis Juli 2020 obduziert und in „Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021).“ publiziert wurden (n=33). D-F; Aktuelle Daten aller Patient*innen, die bis Mai 2021 analysiert wurden (n=58). Frauen werden als Dreiecke, Männer als Kreise dargestellt.

A-C, modifiziert aus „Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021)“. D-F, eigene Darstellung.

Subgenomische (sg)RNA, als Surrogat aktiver Virusreplikation, konnte am häufigsten in den Proben der Riechschleimhaut (n=18 von 57) und der Uvula (n=8 von 45) nachgewiesen werden.

Weiterhin ergab sich der Nachweis von sgRNA in 2 Proben der Arteria carotis pars cerebialis (n=2 von 37) sowie in einer Probe des Bulbus olfactorius (n=1 von 57) und der Medulla oblongata (n=1 von 58) - bei jedoch eingeschränkter Aussagekraft, da in diesen beiden Fällen zahlreiche getestete Organ-/Gewebeproben (insb. auch der peripheren Organe) dieses/r Verstorbenen ein positives Ergebnis erzielten und eine Kreuzkontamination der (ZNS-)Gewebeproben (1) im Rahmen der Präparation und/oder (2) im Rahmen einer Virämie zu diskutieren ist. Es ergab sich kein Nachweis von sgRNA in den Gewebeproben des Ganglion trigeminale, des Kleinhirns, der Kornea sowie der Konjunktiva und somit kein Hinweis auf eine aktive Virusreplikation ebenda.

Korrelationsberechnungen ergaben eine inverse Korrelation zwischen der höchsten gemessenen Viruslast in den ZNS-Gewebeproben (Merkmal A) und der Erkrankungsdauer der jeweiligen Patient*innen (Merkmal B). D.h. es fanden sich höhere Mengen an SARS-CoV-2-RNA in den Gewebeproben von Patient*innen mit einer kurzen Krankheitsdauer und niedrigere Mengen an SARS-CoV-2-RNA in den Gewebeproben von Patient*innen mit einer längeren Krankheitsdauer (Abbildung 6; Korrelationskoeffizient nach Spearman $r = -0,5$, entspricht einem mittelstarken negativen linearen Zusammenhang; $p = 0,006$).

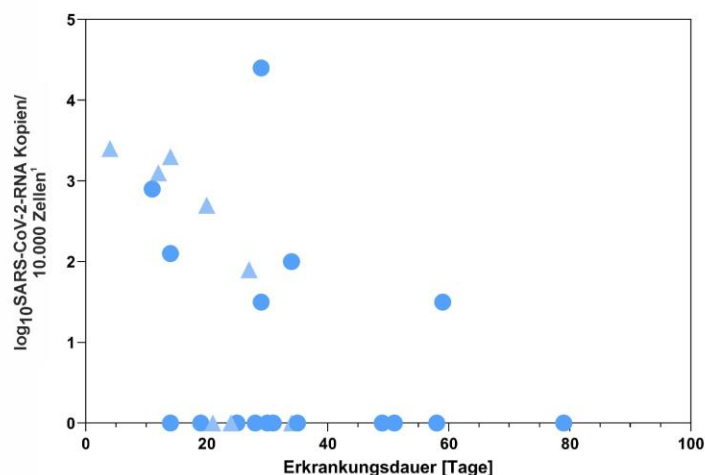


Abbildung 6. Inverse Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und Viruslast¹. Korrelationskoeffizient nach Spearman ($r = -0,5$; $p = 0,006$).¹ Höchster Wert in den ZNS-Proben. Modifiziert aus „Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021)“.

3.3. Histopathologische & immunhistochemische Charakterisierung der Riechschleimhaut

Zur Visualisierung des Aufbaus der Riechschleimhaut und Untersuchung der anatomischen Nähe zwischen neuronalen/neuronalen Zellen und Epithelgewebe wurden histologische und

immunhistochemische (Spezial-)Färbungen durchgeführt und mikroskopisch beurteilt (Abbildung 7).

Unter Zuhilfenahme von histopathologischen Übersichtsfärbungen wie der HE-Färbung, der PAS-Reaktion und der Masson-Goldner-Färbung gelingt es, einen Überblick über die verschiedenen Gewebestrukturen zu erlangen.

Die Epithelzellen zeigen eine kräftige Immunreaktivität mit Antikörpern gegen AE1/3 und erscheinen zahlreich. Inmitten der Epithelzellen werden unreife ORNs mittels neuronaler Marker wie Antikörpern gegen Neuronspezifische Klasse-III β -Tubulin (TuJ1) markiert. Für die Identifizierung und die spezifische Darstellung reifer ORNs wurden die Gewebeschnitte der Riechschleimhaut mit Antikörpern gegen das für diese Zellpopulation spezifische olfaktorische Markerprotein (OMP) gefärbt. In der TuJ1- und OMP-Immunhistochemie lassen sich deutlich die in der mittleren Epithelschicht gelegenen Somata und die an die Epitheloberfläche ziehenden dendritischen Fortsätze darstellen. Vereinzelt können an der Epitheloberfläche auch sog. "dendritic knobs" identifiziert werden. In der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen den Transkriptionsfaktor Olig2 werden die späten neuronalen Vorläuferzellen und neu reifende ORNs hervorgehoben - hierbei handelt es sich um eine nukleäre Färbung. Mit Antikörpern gegen das Neurale Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM-1, auch: CD56) sowie Antikörpern S-100 werden insbesondere in der Lamina propria gelegene Strukturen markiert. Größere und kleinere periphere Nervenfaszikel lassen sich eindeutig identifizieren. Es lässt sich jedoch nicht zweifelsfrei zwischen feinsten Nervenfasern (sensible trigeminale Afferenzen) und den ebenfalls S-100-positiven und in der Lamina propria gelegenen OEGs diskriminieren.

In der Zusammenschau gelingt die eindeutige immunhistochemische Anfärbung der ORNs und Visualisierung ihrer "ungeschützten" Lage im Riechepithel, wodurch (1) die anatomische Nähe der olfaktorischen Neurone mit Nervenfasern, Schleimhaut(-epithelzellen) und Umwelteinflüssen in der Nasenhöhle verdeutlicht wird und (2) die berichteten klinisch-neurologischen Veränderungen der Geruchs- und Geschmackswahrnehmung nahelegen, dass die Riechschleimhaut als mögliche Eintrittspforte in das ZNS genutzt werden kann.

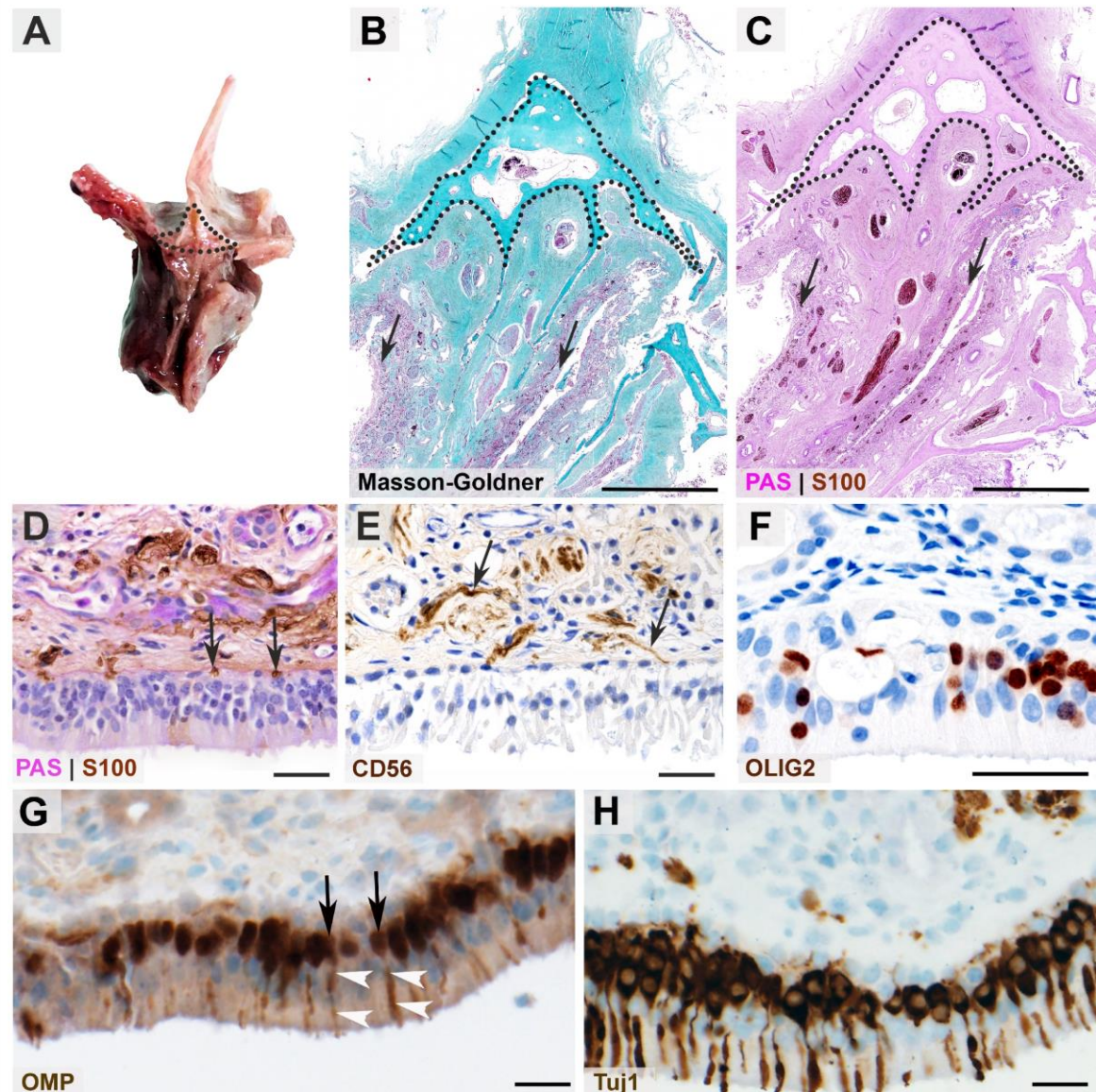


Abbildung 7. Histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung der Riechschleimhaut.

A, Makroskopische Abbildung eines entnommenen Gewebeknopfes aus der oberen Nasenhöhle zur Entnahme der Riechschleimhaut, Ansicht von frontal. B,C, Histopathologische Koronarschnitte durch die knöcherne Lamina cribrosa (gepunktete Linie in A-C) sowie der Nasennebenhöhlenregion und oberen Nasenhöhle zur Veranschaulichung der anatomischen Nähe zwischen Riechschleimhaut (Pfeile in B und C) und S100-positivem neuronalen Gewebe (braun in C). D, Vergrößerte Darstellung aus C. D, E, Mit Antikörpern gegen S100 und CD56 werden zahlreiche feine in der Lamina propria gelegene neurale/neuronale Strukturen markiert, welche bis zum Riechepithel ziehen (Pfeile in D und E). F, Nukleäre Anfärbung der späten neuronalen Vorläuferzellen und neu reifenden ORNs in der OLIG2-Immunhistochemie. G, Immunhistochemische Anfärbung der Zellkörper (schwarze Pfeile) und dendritischen Fortsätze (weiße Pfeilköpfe) reifer OMP-positiver ORNs. H, In der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen Tuj1 werden unreife und reife ORNs markiert. Maßstab: B,C: 0,5 cm; D,E,G,H: 30 µm; F: 50 µm.

Abbildung modifiziert aus „Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021)“.

3.4. SARS-CoV-2 Tropismus innerhalb der Riechschleimhaut

Um den Tropismus von SARS-CoV-2 in der Riechschleimhaut näher zu untersuchen, führten wir an PCR-positiven Gewebeproben (1) immunhistochemische Färbungen mit dem Anti-SARS-Spike-Glykoprotein-Antikörper (Klon 3A2, ab272420, Abcam) und (2) den Nukleinsäurenachweis mittels In-situ-Hybridisierung sowie (3) elektronenmikroskopische Untersuchungen durch.

Immunhistochemisch gefärbt und evaluiert wurden Paraffinschnitte der Riechschleimhaut von 10 Fällen, die ein positives Ergebnis in der PCR-Analyse zeigten. In 5 Fällen zeigte sich ein deutliches feingranuläres, zytoplasmatisches Färbemuster überwiegend in den Epithelzellen (Stützzellen) sowie vereinzelt in Zellen mit dendritenartigen Ausläufern und Auftreibungen an der Epitheloberfläche, die sich rein morphologisch als ORNs qualifizieren (ohne zusätzliche Anfärbungen im Sinne von Kollokalisationsstudien jedoch nicht sicher zuordnen lassen). In den anderen 5 Fällen konnte immunhistochemisch kein Färbesignal detektiert werden.

Unter Zuhilfenahme der In-situ-Hybridisierung wurden Paraffinschnitte der Riechschleimhaut von 7 Fällen, die ein positives Ergebnis in der PCR-Analyse zeigten, analysiert. Hierbei konnte in 5 Fällen kein Signal detektiert werden. In zwei Fällen zeigte sich ein intensives Signal in der das Epithel bedeckenden Schleimschicht sowie intrazytoplasmatisch in Zellen der Riechschleimhaut - eine Zuordnung zu einem spezifischen Zelltyp ist nicht sicher möglich (Abbildung 8 A und B).

Als Negativkontrolle dienten Gewebeproben der Riechschleimhaut einer/s nicht an SARS-CoV-2-Infizierten Patienten/in. Lungenproben von Verstorbenen mit einer COVID-19-Erkrankung wurden als Positivkontrolle verwendet.

3.4.1. Ultrastrukturanalyse von SARS-CoV-2

Die Elektronenmikroskopie ist der Goldstandard zur morphologischen Identifizierung eines Virus⁸⁵. Um den Virusnachweis im Gewebe auf ultrastruktureller Ebene durchzuführen, wurde ein 3-mm-Stanzbiopsiezylinder aus dem FFPE-Gewebeblock der Riechschleimhaut/respiratorischen Schleimhaut angefertigt. Hierfür wurde das in Abbildung 8 B mit zwei Pfeilen markierte Areal auf dem Schnittpräparat der ISH markiert, mit dem zugehörigen FFPE-Gewebeblock abgeglichen, dort markiert und gestanzt. Der Stanzzylinder wurde für die Ultrastrukturanalyse neu eingebettet. Elektronenmikroskopisch konnten in diesem Areal zahlreiche extra- und intrazellulär lokalisierte, intakte Coronaviruspartikel nachgewiesen werden. Der intrazelluläre Nachweis gelang in Zilien-tragenden Epithelzellen. ORNs konnten hingegen ultrastrukturell nicht sicher identifiziert und somit die Fragestellung einer möglichen Infektion der olfaktorischen Rezeptorneurone durch SARS-CoV-2 nicht beantwortet werden.

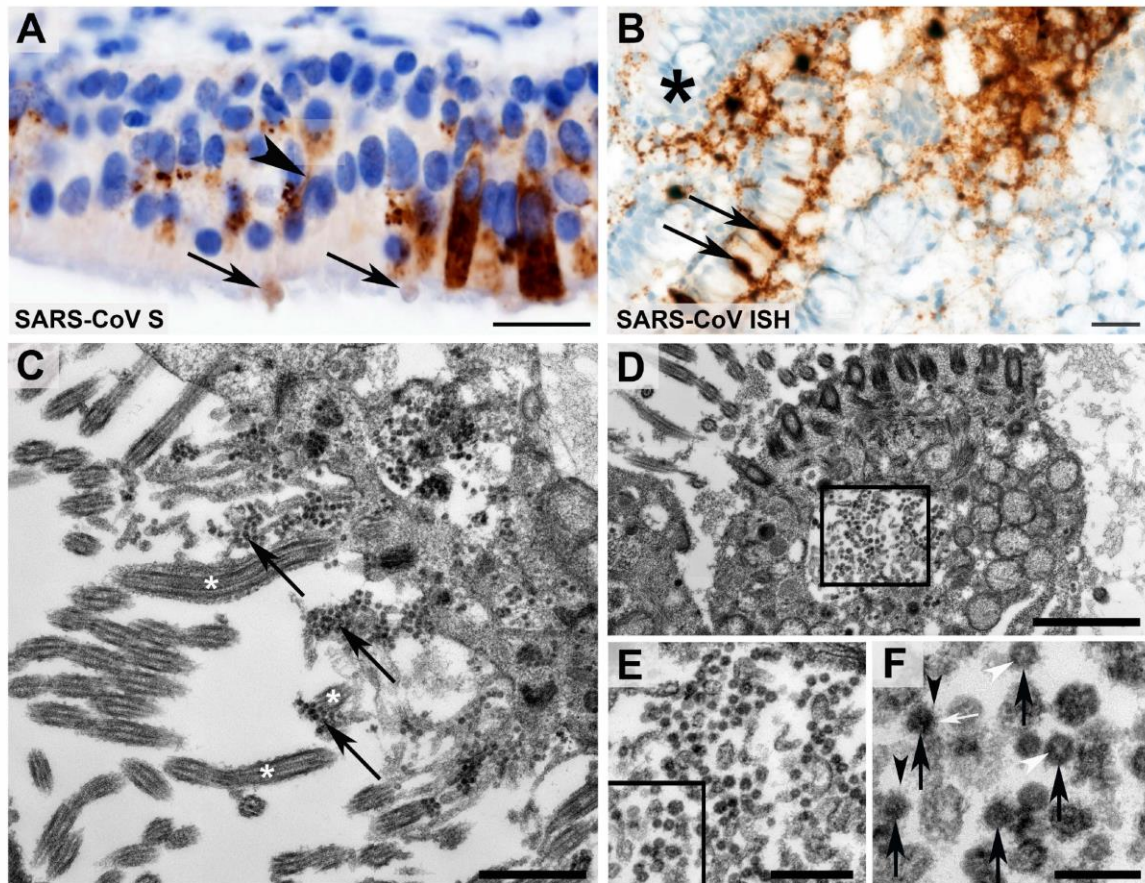


Abbildung 8. Nachweis von SARS-CoV via Immunhistochemie, In-situ-Hybridisierung und Elektronenmikroskopie.

A, In der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen SARS-CoV Spike-Protein zeigt sich ein deutliches (feingranuläres) zytoplasmatisches Färbemuster in den Epithelzellen (Stützzellen) sowie vereinzelt in Zellen mit dendritenartigen Ausläufern (Pfeilkopf) und Auftreibungen an der Epitheloberfläche (Pfeile), die sich rein morphologisch als ORNs qualifizieren. B, Mittels der SARS-CoV-2-RNA ISH zeigt sich ein kräftiges Signal in der Schleimschicht, die das Epithel überzieht. Weiterhin lässt sich ein kräftiges zytoplasmatisches Signal in einigen Zellen des Reichepithels (Pfeile) nachweisen. C-F, Elektronenmikroskopische Untersuchung eines FFPE-Stanzbiopsiezylinders. Der Entnahmeort der Stanze wurde mit dem ISH-Signal aus B abgeglichen (Stanze entspricht dem Areal in dem der Stern sowie die zwei Pfeile in B lokalisiert sind). C, Zur Darstellung gelangen zahlreiche extrazellulär gelegene Coronaviruspartikel (Pfeile). Diese befinden sich in der Nachbarschaft zu Kinozilien. D-F, Darstellung zahlreicher intrazellulär gelegener Coronaviruspartikel innerhalb einer Zilien-tragenden Zelle. E-F, Höhere Vergrößerung aus D. F, Coronaviruspartikel (schwarze Pfeile) mit der charakteristischen Substruktur mit Nachweis von (1) typischen Oberflächenstrukturen (schwarze Pfeilköpfe), (2) heterogener, z.T. granulärer, elektronendichter Innenstruktur, a.e. Ribonukleoprotein (RNP, weiße Pfeilköpfe) entsprechend, sowie einer (3) Virus-hülle (weiße Pfeile). Maßstab: A, 20 µm; B, 50 µm; C, 1 µm; D, 2 µm; E, 500 nm; F, 200 nm.

Abbildung entnommen aus „Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021)“.

3.4.2. Kolokalisation von SARS-CoV Spike-Protein mit neuronalen/neuronalen Zellen

Um zu untersuchen, ob auch in neuronalen/neuronalen Zellen der Riechschleimhaut SARS-CoV nachgewiesen werden kann, wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt. Hierbei wurde der Anti-SARS-Spike-Glykoprotein-Antikörper (Klon 3A2, ab272420, Abcam) mit verschiedenen neuronalen/neuronalen Markern (Olfaktorisches Markerprotein (OMP), Neuronspezifische Klasse-IIIβ-Tubulin (TuJ1) und Neurofilament (NF200)) kombiniert. Hierbei

fand sich eine überwiegend perinukleäre Immunreaktivität für SARS-CoV Spike-Protein sowohl in OMP-positiven, TuJ1-positiven als auch NF200-positiven Zellen.

Diese Doppelfärbungen wurden an drei Verstorbenen mit einer COVID-19-Erkrankung durchgeführt. In allen drei Fällen zeigte sich eine Immunreaktivität für SARS-CoV Spike-Protein in neuralen/neuronalen Zellen der Riechschleimhaut (n=3). Drei Kontrollpatient*innen ohne SARS-CoV-2-Infektion zeigten keine Immunreaktivität für SARS-CoV Spike-Protein (n=3).

3.5. Neuropathologische Befunde bei Verstorbenen mit einer SARS-CoV-2-Infektion

Im Rahmen der neuropathologischen Evaluation des Gehirns von 86 im Rahmen einer COVID-19 Erkrankung verstorbenen Patient*innen fanden sich in 33 Fällen keine wesentlichen pathologischen Veränderungen (38%). Als unspezifische Zeichen des terminalen Herz-Kreislaufversagens zeigten sich in diesen Fällen lediglich Zeichen der geringgradigen, globalen Hirnschwellung ohne signifikant raumfordernden Effekt sowie vereinzelte akut hypoxisch-ischämisch geschädigte Nervenzellen im Großhirnkortex und Kleinhirn. Diese Veränderungen sind als sekundär, d.h. im Rahmen des Todeseintritts entstanden (agonale Veränderungen), einzuordnen.

Als führende akute pathologische Veränderungen fanden sich in Übereinstimmung mit den klinischen Daten¹⁷ sowie bisherigen Autopsiestudien^{70–72,74–79} (1) frische Blutungen in das Hirnparenchym (Mikro- und Makroblutungen) sowie den Subarachnoidalraum (SAB) - die in 15% der Fälle nachgewiesen werden konnten - sowie (2) akute thromboembolische ischämische Infarkte und Mikrothromben - ebenfalls in 15% der Fälle. Weiterhin konnten in 7% der Fälle Zeichen der globalen akut hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie nachgewiesen werden. Entzündliche Veränderungen, in Form einer Sepsis-assoziierten Enzephalitis, traten in Einzelfällen auf (3%).

Bei einem Teil der Patient*innen fanden sich zudem bereits vorbestehende (chronische) Veränderungen wie ältere Hirninfarkte (16%; Stadium III, d.h. mehrere Wochen bis Jahre alt), Zeichen der zerebralen Arteriosklerose und/oder Mikroangiopathie (16%), neurodegenerative Veränderungen (9%; M. Alzheimer, Vaskuläre Demenz) oder Zeichen der zerebralen Amyloidangiopathie (6%). Diese Erkrankungen bestanden bereits vor der COVID-19-Erkrankung der jeweiligen Patient*innen. In Einzelfällen zeigten sich schwerwiegende neuropathologische Befunde wie Zeichen der zerebralen Toxoplasmose, eine Septisch-metastatische Herdenzephalitis mit Nachweis von *Candida* spp., Meningeosis carcinomatosa und Multiple Sklerose. In diesen Fällen handelte es sich um schwer vorerkrankte, immunkompromittierte Patient*innen.

Eine Auflistung der erhobenen neuropathologischen Befunde stellt Tabelle 7 dar.

Tabelle 7. Neuropathologische Befunde.

Neuropathologischer Befund	Anzahl
Ohne wesentliche pathologische Veränderungen	34
Akute hypoxisch-ischämische Enzephalopathie	2
Akute hypoxisch-ischämische Enzephalopathie + Ältere Hirninfarkte (Stadium III, kortikal)	1
Akute hypoxisch-ischämische Enzephalopathie + Frische Einblutungen (Kleinhirn)	1
Akute hypoxisch-ischämische Enzephalopathie + Frische Mikroblutungen (Area prepiriformis, Pons)	1
Akute hypoxisch-ischämische Enzephalopathie + Frische Stammganglienblutung	1
Akuter Hirninfarkt (Stadium I, Basalganglien)	1
Akuter Hirninfarkt (Stadium I, Corpus Callosum) + Alter Hirninfarkt (Stadium III, Mediainfarkt) + Chronische Leptomeningitis + Intraventrikuläre Blutung	1
Akuter Hirninfarkt (Stadium I, Kleinhirn) + Subakuter Hirninfarkt (Stadium II, temporal) + Frische Mikroblutungen (Hirnstamm)	1
Akuter Hirninfarkt (Stadium I, Medulla oblongata) + Alter Hirninfarkt (Stadium III, striatokapsulär) + Zerebrale Mikroangiopath	1
Akuter Hirninfarkt (Stadium I, Pons)	1
Akuter Hirninfarkt (Stadium I, Temporallappen)	1
Akuter Hirninfarkt (Stadium I; Gyrus frontalis medius) + Frische Mikroblutungen (Pons)	1
Akuter Hirninfarkt (Stadium III, Thalamus)	1
Alter Hirninfarkt (Stadium III, Basalganglien)	1
Alter Hirninfarkt (Stadium III, Kleinhirn)	2
Alter Hirninfarkt (Stadium III, Mediainfarkt)	1
Ältere Hirninfarkte (Stadium III, kortikal und cerebellär)	1
Ältere Hirninfarkte (Stadium III, kortikal)	1
Frische Parenchymlutung; Zerebrale Amyloidangiopathie (CAA)	1
Frische Subarachnoidalblutung; Frische Parenchymlutung	2
Frische Subarachnoidalblutungen (Kleinhirn)	1
Meningeosis carcinomatosa + Metastase eines Adenokarzinoms im Frontallappen	1
Morbus Alzheimer	3
Morbus Alzheimer + Frische Parenchymlutung	1
Morbus Alzheimer + Zerebrale Amyloidangiopathie (CAA)	1
Multiple akute Hirninfarkte (Stadium I) + Multiple subakute Hirninfarkte (Stadium II, Kortex, Basalganglien, Thalamus) + Frische Parenchymlutungen + Zerebrale Arteriosklerose	1
Multiple akute Hirninfarkte (Stadium I, Mediainfarkt, Kleinhirn) + Alter Hirninfarkt (Stadium III, Basalganglien) + Zerebrale Art	1
Multiple ältere Hirninfarkte (Stadium III, kortikal und cerebellär)	1
Multiple Sklerose + Frische Parenchymlutungen + Multiple akute Hirninfarkte (Stadium I, kortikal, Basalganglien, Thalamus)	1
Sepsis-assoziierte Enzephalitis	2
Sepsis-assoziierte Enzephalitis + Zerebrale Arteriosklerose	1
Septisch-metastatische Herdenzephalitis (Candida)	1
Thrombosierte kleine Blutgefäße	1
Zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) + Akuter Hirninfarkt (Stadium I, Basalganglien) + Subakuter Hirninfarkt (Stadium II, Kle	1
Zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) + Vaskuläre Demenz + Multiple ältere Hirninfarkte (Stadium III)	1
Zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) + Zerebrale Arteriosklerose	1
Zerebrale Arteriosklerose	5
Zerebrale Arteriosklerose + Alter Mikroinfarkt (Stadium III, Mittelhirn)	1
Zerebrale Arteriosklerose + Multiple ältere Mikroinfarkte (Stadium III, Kleinhirn) + Vaskuläre Demenz	1
Zerebrale Arteriosklerose + PART	1
Zerebrale Arteriosklerose + Zerebrale Mikroangiopathie	1
Zerebrale Toxoplasmose + Frische Subarachnoidalblutungen	1
Gesamt	86

Eigene Abbildung

3.5.1. SARS-CoV-2-Immunhistochemie in ZNS-Gewebeproben

Um zu ermitteln, ob die oben beschriebenen morphologischen neuropathologischen Veränderungen auf eine direkte Schädigung durch Invasion von SARS-CoV-2 in das ZNS-Gewebe zurückzuführen sind, führte ich immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Anti-SARS-Spike-Glykoprotein (Klon 3A2, ab272420, Abcam) an ZNS-Gewebeproben durch. Immunhistochemisch gefärbt und evaluiert wurden Paraffinschnitte des Bulbus olfactorius (n=11), der Medulla oblongata (n=10) sowie des Kleinhirns (n=5). Aufgrund der Häufung von akuten thromboembolischen Ereignissen, Mikrozirkulationsstörungen und frischen Blutungen im ZNS - aber auch in peripheren Organen⁸⁶ - wurden zudem Areale mit histomorphologischem Nachweis akuter thromboembolischer Infarkte mit Antikörpern gegen Anti-SARS-Spike-Glykoprotein gefärbt.

Hierbei ergab sich kein Nachweis von SARS-CoV Spike-Protein innerhalb des Hirnparenchyms. Interessanterweise zeigte sich jedoch in einigen Präparaten eine gewisse Immunreaktivität für SARS-CoV Spike-Protein in den Endothelzellen kleinerer und größerer Blutgefäße; die Färbung stellt sich perinukleär betont und feingranulär dar. Die stärkste Immunreaktivität fand sich in den Gefäßendothelien innerhalb bzw. in der Umgebung von Infarktarealen. Abbildung 9 veranschaulicht die immunhistochemischen Färbeergebnisse in Gegenüberstellung zu den entsprechenden PCR-Daten.

Region	Methode	Ergebnis											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Bulbus olfactorius	IHC	grau	grau	dunkelblau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	dunkelblau
	PCR	grau	dunkelblau	dunkelblau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	dunkelblau
Medulla oblongata	IHC	grau	dunkelblau	dunkelblau	grau	dunkelblau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau
	PCR	grau	grau	dunkelblau	grau	dunkelblau	dunkelblau	grau	grau	grau	dunkelblau	grau	grau
Kleinhirn	IHC	dunkelblau	grau	grau	dunkelblau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau
	PCR	dunkelblau	grau	grau	dunkelblau	dunkelblau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau
Infarktareal	IHC	dunkelblau	dunkelblau	dunkelblau	dunkelblau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau
	PCR	dunkelblau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau

Abbildung 9. Überblick der SARS-CoV S IHC-Ergebnisse in ZNS-Proben.

Visuelle Darstellung der immunhistochemischen Färbeergebnisse unter Verwendung des Anti-SARS-Spike-Glykoprotein-Antikörpers in Gegenüberstellung zu den entsprechenden PCR-Daten. Positives Färbeergebnis bzw. Nachweis von SARS-CoV-RNA via PCR (dunkelblau); Keine Immunreaktivität bzw. kein Nachweis von SARS-CoV-2-RNA via PCR (grau). Schraffierte Flächen entsprechen nicht durchgeführten Analysen. Eigene Abbildung.

Auffällig ist, dass ein ähnliches Färbemuster in geringerer Intensität auch in 2 von 10 Negativkontrollen nachgewiesen werden konnte. Als Negativkontrollen dienten ZNS-Gewebeproben von Patient*innen, die an einer ALS-Erkrankung verstorben sind; wobei es sich auch um bereits länger zurückliegende Fälle aus dem Jahr 2018 und somit einer Zeit weit vor Erstbeschreibung von SARS-CoV-2 im Dezember 2019 handelte. Weiterhin konnte unter Zuhilfenahme der In-situ-Hybridisierung kein Signal im ZNS-Gewebe oder in den Endothelzellen detektiert werden (n=7). In der Zusammenschau ist die Spezifität der immunhistochemischen Färbeergebnisse in den Endothelien kritisch zu hinterfragen.

3.5.2. COVID-19-assoziierte Immunantwort im ZNS-Gewebe

Die Evidenz für eine direkte Schädigung des ZNS durch Virusinvasion erscheint auf Basis der histomorphologischen und immunhistochemischen Ergebnisse gering, wodurch neuroimmunologische Pathomechanismen in den Vordergrund rücken. In Konkordanz mit anderen Autopsie-Studien⁶⁸⁻⁷³ fanden wir eine starke Hochregulierung des humanen Leukozytenantigens (HLA)-DR auf Mikroglia/Makrophagen. Evaluiert wurde hierfür die immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten der Medulla oblongata von Verstorbenen mit einer SARS-CoV-2-Infektion (n=47). Als Kontrollen dienten zum einen Patient*innen, die im Rahmen des kardialen Versagens oder einer ALS-Erkrankung verstorben sind und keine Merkmale einer systemischen Entzündungsreaktion aufwiesen. Da ein Großteil der COVID-19-Patient*innen im septischen Schock/ an einer Sepsis versterben⁸⁷ - wobei es sich um eine systemische Entzündungsreaktion mit Einfluss auf das ZNS handelt - wurden die Färbeergebnisse zum anderen mit Patient*innen verglichen, die im Rahmen einer Sepsis verstorben sind, jedoch keine SARS-CoV-2-Infektion aufwiesen.

Insgesamt konnte in 37 Fällen (82%) eine diffuse Hochregulation von HLA-DR auf Mikroglia und Makrophagen im Vergleich zu den o.g. Kontrollpatient*innen nachgewiesen werden. Neben einer diffusen Hochregulation im Gewebe fand sich in 51% der Fälle zusätzlich eine Akzentuierung im Sinne sog. Mikrogliaknötchen (n=24 von 47).

3.6. Entzündungsmediatoren im Liquor cerebrospinalis

Als Korrelat dieser Mikrogliaaktivierung konnte im Liquor cerebrospinalis eine Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren wie Interleukin (IL)-6, IL-18, CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2) und lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (sICAM-1) detektiert werden. In seltenen Fällen kann eine COVID-19-Infektion mit einer besonders starken Ausschüttung von Zytokinen, einem sog. Zytokinsturm einhergehen kann. Aufgrund einer zunehmenden Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke während einer systemischen Entzündungsreaktion können hierbei Zytokine in den Liquor cerebrospinalis übertreten. In der Literatur wird beschrieben, dass der COVID-19-

assoziierte Zytokinsturm im Serum durch eine Erhöhung von u.a. IL-6, IL-18, IL-1 β , IP-10, TNF, Interferon- γ gekennzeichnet ist⁸⁸ – gut passend zu unseren Liquorbefunden.

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es eine Grundlage für das Verständnis der mit einer COVID-19-Erkrankung assoziierten neurologischen Symptome und der Neuropathogenese von SARS-CoV-2 zu schaffen. Mittels exakter neuroanatomischer Kartierung erfolgte die Exploration des SARS-CoV-2-Neotropismus unter Zuhilfenahme humaner Gewebeproben sowie begleitender Veränderungen im ZNS von Verstorbenen mit einer COVID-19-Erkrankung. Hierzu wurde auf Basis einer systemischen interdisziplinären Analyse eine große COVID-19-Autopsiekohorte aufgearbeitet. Mehrere Autopsiestudien haben innerhalb der letzten eineinhalb Jahre wertvolle Erkenntnisse im Hinblick auf die Pathophysiologie von COVID-19⁸⁹ und erste Einblicke in histopathologische Veränderungen des ZNS im Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2-Infektion gegeben^{68–72,74,75,79}. Zu bedenken ist, dass im Rahmen von Autopsiestudien spezielle Kohorten mit schweren (letalen) COVID-19-Krankheitsverläufen untersucht werden. Ein Großteil der obduzierten Patient*innen verstarben im septischen Schock/ an der Sepsis⁸⁷, erhielten eine umfangreiche intensivmedizinische Behandlung und/oder wiesen (multiple) Vorerkrankungen auf, wodurch der Abgleich histopathologischer Befunde mit geeigneten Kontrollgruppen von besonderer Wichtigkeit ist, um verzerrte Ergebnisse zu vermeiden. Bei den bisherigen neuropathologischen COVID-19-Autopsiestudien handelte es sich überwiegend um einzelne Fallberichte^{71,75} oder (kleine) Fallserien ohne Verwendung von geeigneten Kontrollgruppen^{68,70,72,74}. Nur einzelne Studien nutzen Kontrollgruppen, welche Patient*innen mit nicht-septischen und systemisch entzündlichen/septischen Krankheitsverläufen inkludierten⁶⁹.

Untersuchungen von SARS-CoV-2 in Gewebeproben von COVID-19-Patienten tragen wesentlich zum Verständnis der Pathomechanismen der Erkrankung bei. In der klinischen Routine stellt die PCR-Analyse mittels Nasen-Rachenabstrich die Methode der Wahl zur Diagnose einer SARS-CoV-2-Infektion dar⁸¹. Eine Methode, die innerhalb der letzten eineinhalb Jahres gut etabliert wurde und im Verlauf der COVID-19-Pandemie sogar Einzug in das alltägliche gesellschaftliche Leben der Bevölkerung Deutschlands fand.

Der Nachweis von SARS-CoV-2 im (Autopsie-)Gewebe unter Zuhilfenahme beispielsweise der Immunhistochemie, In-situ-Hybridisierung oder Elektronenmikroskopie ist hingegen wenig validiert⁸⁰. Als allgemeine Strategie zur Validierung einer Methode sollte der Nachweis einer oder mehrerer Viruszielstrukturen durch verschiedene Methoden bzw. der Nachweis mehrerer Zielstrukturen durch eine Methode durchgeführt werden. Weiterhin sollte die Spezifität und Empfindlichkeit mit geeigneten Positiv- und Negativkontrollen analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Standardmethoden der Histopathologie zur Beschreibung einer möglichen COVID-19-spezifischen Gewebeschädigung als auch hochspezialisierte

Techniken zum Proteinnachweis (IHC), RNA-Nachweis (ISH) sowie zur Untersuchung der Virusmorphologie (EM) angewendet. Die verschiedenen Methoden wurden untereinander sowie mit entsprechenden Negativkontrollen (d.h. nicht SARS-CoV-2-infizierten Proben) verglichen, wodurch die Arbeit wichtige methodische Erkenntnisse im Hinblick auf die Schwierigkeiten der Virusdetektion von SARS-CoV-2 im Gewebe liefert.

Aber nicht nur die Methoden zur Detektion, sondern auch die Interpretation der immunhistochemischen Färbungen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist schwierig und komplex, und stellt Wissenschaftler weltweit vor Herausforderungen bei hohem öffentlichem Druck einen schnellen Erkenntnisgewinn zu erzielen. Oft fehlen in den bisher in der ersten Phase der Pandemie publizierten Arbeiten notwendige Kontrollen und Ergebnisse wurden überinterpretiert^{80,90-92}.

Für den von uns im Rahmen dieser Studie verwendeten Anti-SARS-Spike-Glykoprotein-Antikörper (Klon 3A2, ab272420, Abcam) erfolgte durch den Hersteller keine Validierung im Hinblick auf die Sensitivität und Spezifität. Weiterhin handelt es sich bei dem Antikörper nicht um einen spezifischen Antikörper für SARS-CoV-2, sodass eine potentielle Kreuzreaktivität des Antikörpers mit anderen Coronaviren nicht ausgeschlossen werden kann. Entsprechend der aktuell gültigen Richtlinien wurden als Positivkontrollen Proben der Riechschleimhaut und Lunge von SARS-CoV-2-infizierten Personen und als Negativkontrollen nicht SARS-CoV-2-infizierte ZNS-Proben mitgeführt⁹³. Im Rahmen der Anwendung des Antikörpers an FFPE-Proben aus dem ZNS von an COVID-19-Verstorbenen detektierten wir eine feingranuläre, perinukleär betonte Immunreaktivität für SARS-CoV Spike-Protein in den Endothelzellen der Blutgefäße. Kritisch zu beleuchten ist, dass sich ein ähnliches Färbemuster in geringerer Intensität in 2 von 10 Negativkontrollen zeigte, was beispielsweise auf eine unspezifische Färbereaktion oder Kreuzreaktivität des Antikörpers mit anderen Coronaviren zurückgeführt werden könnte. Schwierigkeiten in der Interpretation der Färbeergebnisse finden sich auch in anderen Studien^{80,94-96}.

Die Elektronenmikroskopie ist der Goldstandard zur morphologischen Identifizierung eines Virus, so auch von SARS-CoV-2. Aufgrund ihrer Komplexität ist diese Methode jedoch nicht als Screening Methode geeignet, sondern vielmehr zur Validierung. Die Durchführung und Interpretation von ultrastrukturellen Aufnahmen im (Autopsie-)Gewebe bergen zahlreiche Fallstricke, welche nicht unterschätzt werden sollten. Fehlinterpretationen im Zusammenhang mit dem elektronenmikroskopischen/ultrastrukturellen Nachweis von SARS-CoV-2 finden sich in der Literatur häufig⁹⁰⁻⁹². Zahlreiche Arbeiten interpretieren subzelluläre Strukturen wie multivesikuläre Körper (multivesicular bodies), umhüllte Vesikel, raues endoplasmatisches

Retikulum oder geschwollene Mitochondrien fälschlicherweise als Coronaviruspartikel. Die genannten Strukturen können aufgrund einer ähnlichen Morphologie leicht mit Coronaviren verwechselt werden. Die im Rahmen der vorliegenden Studie angefertigten ultrastrukturellen Aufnahmen dienen daher als Positivkontrolle und Referenzbilder.

Vor diesem Hintergrund sind systematische Studien zur Festlegung von Standards für immunhistochemische Analysen und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Verbesserung der Qualität von COVID-19-Autopsiestudien notwendig. In ersten Übersichtsarbeiten werden die unterschiedlichen Detektionsmethoden von SARS-CoV-2 im Gewebe bereits im Hinblick auf Fehlerquellen, Spezifität und Sensitivität der Methoden untersucht. Hierbei wird der PCR-Analyse und In-situ-Hybridisierung (d.h. RNA-basierten Nachweismethoden) gegenüber dem Nachweis von viralen Proteinen bzw. Antigenen mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz eine höhere Sensitivität und Spezifität zugesprochen⁸⁰.

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen ultrastrukturell intakte Coronavirus-Partikel in Zilien-tragenden Zellen der humanen respiratorischen Schleimhaut nachzuweisen. Weiterhin gelang der Nachweis von SARS-CoV Spike-Protein in neuronalen/neuronalen Zellen der Riechschleimhaut. Andere, nachfolgende Studien konnten dies ebenfalls für SARS-CoV-2 Nukleoprotein in Nasenabstrichen von SARS-CoV-2-infizierten Personen mit Riechstörungen⁹⁷ sowie im Hamster-Tiermodell⁹⁸ zeigen. Ein Nachweis von SARS-CoV-2 im Hirnparenchym gelang sowohl ultrastrukturell als auch unter Zuhilfenahme der IHC und ISH nicht. In der Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse und anderen Studien aus Autopsiegewebe und/oder Tiermodellen ist die Evidenz für eine direkte Invasion von SARS-CoV-2 in das Hirnparenchym gering^{59,65,70,99,100}, abgesehen von einzelnen Zellen, die wahrscheinlich Viruspartikel phagozytiert haben. Infolgedessen ist zu diskutieren, ob der positive Nachweis von SARS-CoV-2-RNA im Hirngewebe via PCR im Rahmen einer Kontamination, durch das Vorhandensein von SARS-CoV-2 im Blut oder einzelne Leukozyten, die Tausende Viruspartikel oder RNA-Kopien in sich tragen, verursacht wird. Es gilt zu bedenken, dass mittels der PCR-Analyse SARS-CoV-2-RNA nachgewiesen wird und nicht intakte Viruspartikel. Virale RNA kann auch in die Wirtszellen integriert werden und dann ohne Hinweis auf eine Infektion noch nachweisbar sein¹⁰¹. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass virusinfizierte (neuronale) Zellen absterben und sich somit der Entdeckung entziehen.

Aufgrund der geringen Evidenz einer direkten Invasion von SARS-CoV-2 in das Hirngewebe ist zu diskutieren, ob neuroimmunologische Pathomechanismen wie eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems im ZNS indirekt zu einer Schädigung des Gefäßsystems und/oder des

Hirngewebes führen und Ursache der mit einer COVID-19-Erkrankung assoziierten neurologischen Symptome sind.

Hierfür spricht auch, dass wir in Einklang mit anderen Studien im ZNS eine starke angeborene Immunantwort, vermittelt durch HLA-DR+-Mikroglia als Effektoren einer myeloischen Entzündungsreaktion, nachweisen konnten. In der vorliegenden Studie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich als Korrelat dieser starken angeborenen Immunantwort auch im Liquor cerebrospinalis eine deutliche Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren fand.

Die ausgeprägte Immunzellaktivierung im Hirnstamm könnte zudem auch funktionellen Einfluss auf die Nervenzellen der im Hirnstamm verorteten zentralen Atem- und Kreislaufregulationszentren haben und die Herz-Kreislauf- und Lungenfunktion bei Patient*innen mit schwerem bzw. letalem Krankheitsverlauf negativ beeinflussen¹⁰².

Da Riech- und Geschmacksstörungen zu den am häufigsten beschriebenen neurologischen Symptomen und als typisches Frühsymptom einer SARS-CoV-2-Infektion beschrieben werden, war es Ziel der Arbeit neue Erkenntnisse im Hinblick auf das Vorkommen und des Tropismus von SARS-CoV-2 in der Riechschleimhaut zu erlangen. Bemerkenswerterweise treten die durch SARS-CoV-2 ausgelösten Riechstörungen sehr plötzlich auf; sie variieren in ihrer Dauer verschwinden jedoch in den meisten Fällen nach nur wenigen Tagen¹⁰³.

Eine olfaktorische Dysfunktion nach Virusinfektion kann auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Bei einem Großteil der Betroffenen treten während der Infektion mit SARS-CoV-2 zwar Riech- und Geschmacksstörungen auf, diese werden jedoch häufig nicht durch eine Rhinitis begleitet, wodurch sich nicht das Bild einer typischen obstruktiven (konduktiven) Riechstörung abzeichnet, sondern insbesondere eine Schädigung des Riechepithels selbst Ursache der Riech- und Geschmacksstörungen in Frage kommt¹⁰⁴.

In der vorliegenden Studie visualisierten wir mittels immunhistochemischer Färbetechniken und der In-situ-Hybridisierung SARS-CoV Spike-Protein und virale RNA in Gewebeproben der Riechschleimhaut. Im Riechepithel fand sich hierbei einerseits in den Epithelzellen, andererseits in Kollokalisierung mit neuralen/neuronalen Zellen eine distinkte Immunreaktivität für SARS-CoV Spike-Protein. Insgesamt könnte somit eine Funktionsstörung unterschiedlicher Zelltypen von Bedeutung sein wie eine Schädigung der olfaktorischen Rezeptorneurone selbst im Sinne einer sensorineuralen Dysfunktion, aber auch eine Störung der umgebenen nicht neuronalen Zellen, wie Stützzellen und Bowman-Drüsen. Hierbei könnten Veränderungen der Menge und/oder Funktion von geruchsstoffbindenden Transport- und Rezeptormolekülen von Bedeutung sein.

Die Koexistenz von intakten Coronavirus-Partikeln und SARS-CoV-2-RNA in der Riechschleimhaut sowie der Nachweis von SARS-CoV-2-RNA in neuroanatomischen Regionen die Projektionen der Riechbahn erhalten kann auf eine SARS-CoV-2-Neuroinvasion über axonalen Transport hindeuten. Der morphologische Nachweis einzelner Viruspartikel in Axonen ist jedoch aufgrund der (wenn überhaupt) zu erwartenden sehr geringen Anzahl an Viruspartikeln sehr schwierig, da der virale Reproduktionsapparat in den neuronalen Somata angesiedelt sein soll.

Eine Limitation der Studie stellt das lange Postmortal-Intervall der untersuchten Gewebeproben dar, wobei es im Angesicht der Pandemiesituation und damit verbundenen Belastungen nicht gelungen ist diese relevant zu verkürzen. Postmortale Veränderungen und Abbauprozesse (Autolyse) erschweren die Interpretation morphologischer, immunhistochemischer und molekularer Analysen aufgrund einer oft nur begrenzten strukturellen Erhaltung. Durch die Kryokonservierung wurde die Virusdetektionsmöglichkeit wahrscheinlich verbessert, da das Formalin die RNA-Integrität beeinträchtigt¹⁰⁵, wobei diesbezüglich für SARS-CoV-2 keine systematischen Vergleiche bekannt sind. Bei anderen Viren ist allerdings eine Reduktion der Virusdetektionsmöglichkeit um $2\log_{10}$ in FFPE-Material beschrieben¹⁰⁶. Auch die Hypoxiezeit spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle.

Neben neuen Erkenntnissen über die möglichen Eintrittspforten von SARS-CoV-2 in das Gehirn konnten Einblicke in die gewebetypischen Veränderungen der Riechschleimhaut sowie des ZNS bei COVID-19 gewonnen werden. Dies zeigt trotz Limitierungen das außerordentliche Potential von systematischen Autopsiestudien bei dem Verständnis neuer Erkrankungen. Kenntnisse über die Pathophysiologie von COVID-19 sind Grundvoraussetzung zur Entwicklung gezielter Therapien und Biomarker sowie einer verbesserten Diagnostik.

Literaturverzeichnis

1. Corman, V. M., Lienau, J. & Witzentz, M. Coronaviren als Ursache respiratorischer Infektionen. *Internist* **60**, 1136–1145 (2019).
2. Zubair, A. S., McAlpine, L. S., Gardin, T., Farhadian, S., Kuruvilla, D. E. & Spudich, S. Neuropathogenesis and Neurologic Manifestations of the Coronaviruses in the Age of Coronavirus Disease 2019: A Review. *JAMA Neurol* **77**, 1018–1027 (2020).
3. Cyranoski, D. Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. *Nature* **581**, 22–26 (2020).
4. Desforges, M., Le Coupanec, A., Dubeau, P., Bourgoignie, A., Lajoie, L., Dubé, M. & Talbot, P. J. Human Coronaviruses and Other Respiratory Viruses: Underestimated Opportunistic Pathogens of the Central Nervous System? *Viruses* **12**, E14 (2019).
5. Mao, L., Jin, H., Wang, M., Hu, Y., Chen, S., He, Q., Chang, J., Hong, C., Zhou, Y., Wang, D., Miao, X., Li, Y. & Hu, B. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* **77**, 683–690 (2020).
6. Pezzini, A. & Padovani, A. Lifting the mask on neurological manifestations of COVID-19. *Nat Rev Neurol* **16**, 636–644 (2020).
7. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J. & Cao, B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* **395**, 497–506 (2020).
8. Abdelaziz, O. S. & Waffa, Z. Neuropathogenic human coronaviruses: A review. *Rev Med Virol* **30**, e2118 (2020).
9. Arbour, N., Côté, G., Lachance, C., Tardieu, M., Cashman, N. R. & Talbot, P. J. Acute and Persistent Infection of Human Neural Cell Lines by Human Coronavirus OC43. *J Virol* **73**, 3338–3350 (1999).
10. Arbour, N., Day, R., Newcombe, J. & Talbot, P. J. Neuroinvasion by Human Respiratory Coronaviruses. *J Virol* **74**, 8913–8921 (2000).
11. von Bartheld, C. S., Hagen, M. M. & Butowt, R. Prevalence of Chemosensory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis Reveals Significant Ethnic Differences. *ACS Chem Neurosci* **11**, 2944–2961 (2020).
12. Lechien, J. R., Chiesa-Estomba, C. M., De Siaty, D. R., 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., Leich, P., Souchay, C., Rossi, C., Journe, F., Hsieh, J., Edjlali, M., Carlier, R., Ris, L., Lovato, A., De Filippis, C., Coppee, F., Fakhry, N., Ayad, T. & Saussez, S. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus

- disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **277**, 2251–2261 (2020).
13. Moriguchi, T., Harii, N., Goto, J., Harada, D., Sugawara, H., Takamino, J., Ueno, M., Sakata, H., Kondo, K., Myose, N., Nakao, A., Takeda, M., Haro, H., Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., Kubokawa, K., Ogihara, S., Sasaki, T., Kinouchi, H., Kojin, H., Ito, M., Onishi, H., Shimizu, T., Sasaki, Y., Enomoto, N., Ishihara, H., Furuya, S., Yamamoto, T. & Shimada, S. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int J Infect Dis* **94**, 55–58 (2020).
 14. Conde Cardona, G., Quintana Pájaro, L. D., Quintero Marzola, I. D., Ramos Villegas, Y. & Moscote Salazar, L. R. Neurotropism of SARS-CoV 2: Mechanisms and manifestations. *J Neurol Sci* **412**, 116824 (2020).
 15. Romero-Sánchez, C. M., Díaz-Maroto, I., Fernández-Díaz, E., Sánchez-Larsen, Á., Layos-Romero, A., García-García, J., González, E., Redondo-Peñas, I., Perona-Moratalla, A. B., Del Valle-Pérez, J. A., Gracia-Gil, J., Rojas-Bartolomé, L., Feria-Vilar, I., Monteagudo, M., Palao, M., Palazón-García, E., Alcahut-Rodríguez, C., Sopelana-Garay, D., Moreno, Y., Ahmad, J. & Segura, T. Neurologic manifestations in hospitalized patients with COVID-19: The ALBACOVID registry. *Neurology* **95**, e1060–e1070 (2020).
 16. Varatharaj, A., Thomas, N., Ellul, M. A., Davies, N. W. S., Pollak, T. A., Tenorio, E. L., Sultan, M., Easton, A., Breen, G., Zandi, M., Coles, J. P., Manji, H., Al-Shahi Salman, R., Menon, D. K., Nicholson, T. R., Benjamin, L. A., Carson, A., Smith, C., Turner, M. R., Solomon, T., Kneen, R., Pett, S. L., Galea, I., Thomas, R. H., Michael, B. D., & CoroNerve Study Group. Neurological and neuropsychiatric complications of COVID-19 in 153 patients: a UK-wide surveillance study. *Lancet Psychiatry* **7**, 875–882 (2020).
 17. Belani, P., Schefflein, J., Kihira, S., Rigney, B., Delman, B. N., Mahmoudi, K., Mocco, J., Majidi, S., Yeckley, J., Aggarwal, A., Lefton, D. & Doshi, A. H. COVID-19 Is an Independent Risk Factor for Acute Ischemic Stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* **41**, 1361–1364 (2020).
 18. Heming, M., Li, X., Räuber, S., Mausberg, A. K., Börsch, A.-L., Hartlehnert, M., Singhal, A., Lu, I.-N., Fleischer, M., Szepanowski, F., Witzke, O., Brenner, T., Dittmer, U., Yosef, N., Kleinschnitz, C., Wiendl, H., Stettner, M. & Meyer Zu Hörste, G. Neurological Manifestations of COVID-19 Feature T Cell Exhaustion and Dedifferentiated Monocytes in Cerebrospinal Fluid. *Immunity* **54**, 164-175.e6 (2021).
 19. Fotuhi, M., Mian, A., Meysami, S. & Raji, C. A. Neurobiology of COVID-19. *J Alzheimers Dis* **76**, 3–19 (2020).
 20. Baig, A. M. Chronic COVID syndrome: Need for an appropriate medical terminology for long-COVID and COVID long-haulers. *J Med Virol* **93**, 2555–2556 (2021).
 21. Marshall, M. The lasting misery of coronavirus long-haulers. *Nature* **585**, 339–341 (2020).
 22. Sivan, M. & Taylor, S. NICE guideline on long covid. *BMJ* m4938 (2020). doi:10.1136/bmj.m4938

23. El Sayed, S., Shokry, D. & Gomaa, S. M. Post-COVID-19 fatigue and anhedonia: A cross-sectional study and their correlation to post-recovery period. *Neuropsychopharmacol Rep* **41**, 50–55 (2021).
24. Ortelli, P., Ferrazzoli, D., Sebastianelli, L., Engl, M., Romanello, R., Nardone, R., Bonini, I., Koch, G., Saltuari, L., Quartarone, A., Oliviero, A., Kofler, M. & Versace, V. Neuropsychological and neurophysiological correlates of fatigue in post-acute patients with neurological manifestations of COVID-19: Insights into a challenging symptom. *J Neurol Sci* **420**, 117271 (2021).
25. Yong, S. J. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infectious Diseases* **53**, 737–754 (2021).
26. Nalbandian, A., Sehgal, K., Gupta, A., Madhavan, M. V., McGroder, C., Stevens, J. S., Cook, J. R., Nordvig, A. S., Shalev, D., Sehwat, T. S., Ahluwalia, N., Bikdeli, B., Dietz, D., Der-Nigoghossian, C., Liyanage-Don, N., Rosner, G. F., Bernstein, E. J., Mohan, S., Beckley, A. A., Seres, D. S., Choueiri, T. K., Uriel, N., Ausiello, J. C., Accili, D., Freedberg, D. E., Baldwin, M., Schwartz, A., Brodie, D., Garcia, C. K., Elkind, M. S. V., Connors, J. M., Bilezikian, J. P., Landry, D. W. & Wan, E. Y. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* **27**, 601–615 (2021).
27. Logue, J. K., Franko, N. M., McCulloch, D. J., McDonald, D., Magedson, A., Wolf, C. R. & Chu, H. Y. Sequelae in Adults at 6 Months After COVID-19 Infection. *JAMA Netw Open* **4**, e210830 (2021).
28. Holbrook, E. H., Wu, E., Curry, W. T., Lin, D. T. & Schwob, J. E. Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue: Human Olfactory Tissue Characterization. *The Laryngoscope* **121**, 1687–1701 (2011).
29. Leopold, D. A., Hummel, T., Schwob, J. E., Hong, S. C., Knecht, M. & Kobal, G. Anterior Distribution of Human Olfactory Epithelium: *The Laryngoscope* **110**, 417–421 (2000).
30. Hatt, H. Molecular and Cellular Basis of Human Olfaction. *C&B* **1**, 1857–1869 (2004).
31. Liang, F. Sustentacular Cell Enwrapment of Olfactory Receptor Neuronal Dendrites: An Update. *Genes (Basel)* **11**, E493 (2020).
32. Moran, D. T., Jafek, B. W. & Rowley, J. C. in *The Human Sense of Smell* (eds. Laing, D. G., Doty, R. L. & Breipohl, W.) 3–28 (Springer Berlin Heidelberg, 1991). doi:10.1007/978-3-642-76223-9_1
33. Suzuki, Y., Takeda, M. & Farbman, A. I. Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. *J Comp Neurol* **376**, 509–517 (1996).
34. Cunningham, A. M., Manis, P. B., Reed, R. R. & Ronnett, G. V. Olfactory receptor neurons exist as distinct subclasses of immature and mature cells in primary culture. *Neuroscience* **93**, 1301–1312 (1999).
35. Wang, Y.-Z., Fan, H., Ji, Y., Reynolds, K., Gu, R., Gan, Q., Yamagami, T., Zhao, T., Hamad, S., Bizen, N., Takebayashi, H., Chen, Y., Wu, S., Pleasure, D., Lam, K. & Zhou, C. J. Olig2

- regulates terminal differentiation and maturation of peripheral olfactory sensory neurons. *Cell Mol Life Sci* **77**, 3597–3609 (2020).
36. Durante, M. A., Kurtenbach, S., Sargi, Z. B., Harbour, J. W., Choi, R., Kurtenbach, S., Goss, G. M., Matsunami, H. & Goldstein, B. J. Single-cell analysis of olfactory neurogenesis and differentiation in adult humans. *Nat Neurosci* **23**, 323–326 (2020).
 37. Naessen, R. The identification and topographical localisation of the olfactory epithelium in man and other mammals. *Acta Otolaryngol* **70**, 51–57 (1970).
 38. Li, Z., Liu, T., Yang, N., Han, D., Mi, X., Li, Y., Liu, K., Vuylsteke, A., Xiang, H. & Guo, X. Neurological manifestations of patients with COVID-19: potential routes of SARS-CoV-2 neuroinvasion from the periphery to the brain. *Front Med* **14**, 533–541 (2020).
 39. Oprych, K., Cotfas, D. & Choi, D. Common olfactory ensheathing glial markers in the developing human olfactory system. *Brain Struct Funct* **222**, 1877–1895 (2017).
 40. Mackay-Sim, A. & St John, J. A. Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries. *Exp Neurol* **229**, 174–180 (2011).
 41. Chehrehasa, F., Windus, L. C. E., Ekberg, J. A. K., Scott, S. E., Amaya, D., Mackay-Sim, A. & St John, J. A. Olfactory glia enhance neonatal axon regeneration. *Mol Cell Neurosci* **45**, 277–288 (2010).
 42. Butowt, R. & Bilinska, K. SARS-CoV-2: Olfaction, Brain Infection, and the Urgent Need for Clinical Samples Allowing Earlier Virus Detection. *ACS Chem Neurosci* **11**, 1200–1203 (2020).
 43. Harberts, E., Yao, K., Wohler, J. E., Maric, D., Ohayon, J., Henkin, R. & Jacobson, S. Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13734–13739 (2011).
 44. Moran, D. T., Rowley, J. C. & Jafek, B. W. Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell. *Brain Res* **253**, 39–46 (1982).
 45. Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., Ramoni, R. & Cambillau, C. Mammalian odorant binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 229–240 (2000).
 46. van Riel, D., Verdijk, R. & Kuiken, T. The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system: The olfactory nerve: a shortcut for viruses into the CNS. *J. Pathol.* **235**, 277–287 (2015).
 47. Durrant, D. M., Ghosh, S. & Klein, R. S. The Olfactory Bulb: An Immunosensory Effector Organ during Neurotropic Viral Infections. *ACS Chem Neurosci* **7**, 464–469 (2016).
 48. Iwasaki, T., Itamura, S., Nishimura, H., Sato, Y., Tashiro, M., Hashikawa, T. & Kurata, T. Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation. *Acta Neuropathol* **108**, 485–492 (2004).
 49. Majde, J. A., Bohnet, S. G., Ellis, G. A., Churchill, L., Leyva-Grado, V., Wu, M., Szentirmai, E., Rehman, A. & Krueger, J. M. Detection of mouse-adapted human influenza virus in the olfactory bulbs of mice within hours after intranasal infection. *J Neurovirol* **13**, 399–409 (2007).

50. van Riel, D., Leijten, L. M., Verdijk, R. M., GeurtsvanKessel, C., van der Vries, E., van Rossum, A. M. C., Osterhaus, A. D. M. E. & Kuiken, T. Evidence for influenza virus CNS invasion along the olfactory route in an immunocompromised infant. *J Infect Dis* **210**, 419–423 (2014).
51. Jacomy, H. & Talbot, P. J. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* **315**, 20–33 (2003).
52. Galougahi, M. K., Ghorbani, J., Bakhshayeshkaram, M., Naeini, A. S. & Haseli, S. Olfactory Bulb Magnetic Resonance Imaging in SARS-CoV-2-Induced Anosmia: The First Report. *Acad Radiol* **27**, 892–893 (2020).
53. Coolen, T., Lolli, V., Sadeghi, N., Rovai, A., Trotta, N., Taccone, F. S., Creteur, J., Henrard, S., Goffard, J.-C., Dewitte, O., Naeije, G., Goldman, S. & De Tiège, X. Early postmortem brain MRI findings in COVID-19 non-survivors. *Neurology* **95**, e2016–e2027 (2020).
54. Laurendon, T., Radulesco, T., Mugnier, J., G erault, M., Chagnaud, C., El Ahmadi, A.-A. & Varoquaux, A. Bilateral transient olfactory bulb edema during COVID-19-related anosmia. *Neurology* **95**, 224–225 (2020).
55. Politi, L. S., Salsano, E. & Grimaldi, M. Magnetic Resonance Imaging Alteration of the Brain in a Patient With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Anosmia. *JAMA Neurol* **77**, 1028–1029 (2020).
56. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Kr uger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., M uller, M. A., Drosten, C. & P ohlmann, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).
57. Clausen, T. M., Sandoval, D. R., Spliid, C. B., Pihl, J., Perrett, H. R., Painter, C. D., Narayanan, A., Majowicz, S. A., Kwong, E. M., McVicar, R. N., Thacker, B. E., Glass, C. A., Yang, Z., Torres, J. L., Golden, G. J., Bartels, P. L., Porell, R. N., Garretson, A. F., Laubach, L., Feldman, J., Yin, X., Pu, Y., Hauser, B. M., Caradonna, T. M., Kellman, B. P., Martino, C., Gordts, P. L. S. M., Chanda, S. K., Schmidt, A. G., Godula, K., Leibel, S. L., Jose, J., Corbett, K. D., Ward, A. B., Carlin, A. F. & Esko, J. D. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell* **183**, 1043-1057.e15 (2020).
58. Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G. & Decroly, E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res* **176**, 104742 (2020).
59. Cantuti-Castelvetri, L., Ojha, R., Pedro, L. D., Djannatian, M., Franz, J., Kuivanen, S., van der Meer, F., Kallio, K., Kaya, T., Anastasina, M., Smura, T., Levanov, L., Szirovicza, L., Tobi, A., Kallio-Kokko, H.,  sterlund, P., Joensuu, M., Meunier, F. A., Butcher, S. J., Winkler, M. S., Mollenhauer, B., Helenius, A., Gokce, O., Teesalu, T., Hepojoki, J., Vapalahti, O., Stadelmann, C., Balistreri, G. & Simons, M. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* **370**, 856–860 (2020).

60. 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., Cullen, P. J. & Yamauchi, Y. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* **370**, 861–865 (2020).
61. NIH COVID-19 Autopsy Consortium, HCA Oral and Craniofacial Biological Network, Huang, N., Pérez, P., Kato, T., Mikami, Y., Okuda, K., Gilmore, R. C., Conde, C. D., Gasmi, B., Stein, S., Beach, M., Pelayo, E., Maldonado, J. O., Lafont, B. A., Jang, S.-I., Nasir, N., Padilla, R. J., Murrah, V. A., Maile, R., Lovell, W., Wallet, S. M., Bowman, N. M., Meinig, S. L., Wolfgang, M. C., Choudhury, S. N., Novotny, M., Aebermann, B. D., Scheuermann, R. H., Cannon, G., Anderson, C. W., Lee, R. E., Marchesan, J. T., Bush, M., Freire, M., Kimple, A. J., Herr, D. L., Rabin, J., Grazioli, A., Das, S., French, B. N., Pranzatelli, T., Chiorini, J. A., Kleiner, D. E., Pittaluga, S., Hewitt, S. M., Burbelo, P. D., Chertow, D., Frank, K., Lee, J., Boucher, R. C., Teichmann, S. A., Warner, B. M. & Byrd, K. M. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nat Med* **27**, 892–903 (2021).
62. Delorey, T. M., Ziegler, C. G. K., Heimberg, G., Normand, R., Yang, Y., Segerstolpe, Å., Abbondanza, D., Fleming, S. J., Subramanian, A., Montoro, D. T., Jagadeesh, K. A., Dey, K. K., Sen, P., Slyper, M., Pita-Juárez, Y. H., Phillips, D., Biermann, J., Bloom-Ackermann, Z., Barkas, N., Ganna, A., Gomez, J., Melms, J. C., Katsyv, I., Normandin, E., Naderi, P., Popov, Y. V., Raju, S. S., Niezen, S., Tsai, L. T.-Y., Siddle, K. J., Sud, M., Tran, V. M., Vellarikkal, S. K., Wang, Y., Amir-Zilberstein, L., Atri, D. S., Beechem, J., Brook, O. R., Chen, J., Divakar, P., Dorceus, P., Engreitz, J. M., Essene, A., Fitzgerald, D. M., Fropf, R., Gazal, S., Gould, J., Grzyb, J., Harvey, T., Hecht, J., Hether, T., Jané-Valbuena, J., Leney-Greene, M., Ma, H., McCabe, C., McLoughlin, D. E., Miller, E. M., Muus, C., Niemi, M., Padera, R., Pan, L., Pant, D., Pe'er, C., Pfiffner-Borges, J., Pinto, C. J., Plaisted, J., Reeves, J., Ross, M., Rudy, M., Rueckert, E. H., Siciliano, M., Sturm, A., Todres, E., Waghray, A., Warren, S., Zhang, S., Zollinger, D. R., Cosimi, L., Gupta, R. M., Hacohen, N., Hibshoosh, H., Hide, W., Price, A. L., Rajagopal, J., Tata, P. R., Riedel, S., Szabo, G., Tickle, T. L., Ellinor, P. T., Hung, D., Sabeti, P. C., Novak, R., Rogers, R., Ingber, D. E., Jiang, Z. G., Juric, D., Babadi, M., Farhi, S. L., Izar, B., Stone, J. R., Vlachos, I. S., Solomon, I. H., Ashenberg, O., Porter, C. B. M., Li, B., Shalek, A. K., Villani, A.-C., Rozenblatt-Rosen, O. & Regev, A. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Nature* **595**, 107–113 (2021).
63. HCA Lung Biological Network, Sungnak, W., Huang, N., Bécavin, C., Berg, M., Queen, R., Litvinukova, M., Talavera-López, C., Maatz, H., Reichart, D., Sampaziotis, F., Worlock, K. B., Yoshida, M. & Barnes, J. L. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med* **26**, 681–687 (2020).

64. Netland, J., Meyerholz, D. K., Moore, S., Cassell, M. & Perlman, S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J Virol* **82**, 7264–7275 (2008).
65. 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., Castaldi, C., Heltke, J., Ng, E., Wheeler, J., Alfajaro, M. M., Levavasseur, E., Fontes, B., Ravindra, N. G., Van Dijk, D., Mane, S., Gunel, M., Ring, A., Kazmi, S. A. J., Zhang, K., Wilen, C. B., Horvath, T. L., Plu, I., Haik, S., Thomas, J.-L., Louvi, A., Farhadian, S. F., Huttner, A., Seilhean, D., Renier, N., Bilguvar, K. & Iwasaki, A. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *Journal of Experimental Medicine* **218**, e20202135 (2021).
66. Chen, M., Shen, W., Rowan, N. R., Kulaga, H., Hillel, A., Ramanathan, M. & Lane, A. P. Elevated ACE-2 expression in the olfactory neuroepithelium: implications for anosmia and upper respiratory SARS-CoV-2 entry and replication. *Eur Respir J* **56**, 2001948 (2020).
67. Bilinska, K., Jakubowska, P., Von Bartheld, C. S. & Butowt, R. Expression of the SARS-CoV-2 Entry Proteins, ACE2 and TMPRSS2, in Cells of the Olfactory Epithelium: Identification of Cell Types and Trends with Age. *ACS Chem. Neurosci.* **11**, 1555–1562 (2020).
68. Schurink, B., Roos, E., Radonic, T., Barbe, E., Bouman, C. S. C., de Boer, H. H., de Bree, G. J., Bulle, E. B., Aronica, E. M., Florquin, S., Fronczek, J., Heunks, L. M. A., de Jong, M. D., Guo, L., du Long, R., Lutter, R., Molenaar, P. C. G., Neefjes-Borst, E. A., Niessen, H. W. M., van Noesel, C. J. M., Roelofs, J. J. T. H., Snijder, E. J., Soer, E. C., Verheij, J., Vlaar, A. P. J., Vos, W., van der Wel, N. N., van der Wal, A. C., van der Valk, P. & Bugiani, M. Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study. *Lancet Microbe* **1**, e290–e299 (2020).
69. Deigendesch, N., Sironi, L., Kutza, M., Wischnewski, S., Fuchs, V., Hench, J., Frank, A., Nienhold, R., Mertz, K. D., Cathomas, G., Matter, M. S., Siegemund, M., Tolnay, M., Schirmer, L., Pröbstel, A.-K., Tzankov, A. & Frank, S. Correlates of critical illness-related encephalopathy predominate postmortem COVID-19 neuropathology. *Acta Neuropathol* **140**, 583–586 (2020).
70. 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., Krasemann, S., Aepfelbacher, M. & Glatzel, M. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol* **19**, 919–929 (2020).
71. Al-Dalahmah, O., Thakur, K. T., Nordvig, A. S., Prust, M. L., Roth, W., Lignelli, A., Uhlemann, A.-C., Miller, E. H., Kunnath-Velayudhan, S., Del Portillo, A., Liu, Y., Hargus, G., Teich, A. F., Hickman, R. A., Tanji, K., Goldman, J. E., Faust, P. L. & Canoll, P. Neuronophagia and microglial nodules in a SARS-CoV-2 patient with cerebellar hemorrhage. *Acta Neuropathol Commun* **8**, 147 (2020).

72. Fabbri, V. P., Foschini, M. P., Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Cenacchi, G., Gallo, C., Aspide, R., Frascaroli, G., Cortelli, P., Riefolo, M., Giannini, C. & D'Errico, A. Brain ischemic injury in COVID-19-infected patients: a series of 10 post-mortem cases. *Brain Pathol* **31**, 205–210 (2021).
73. Hanley, B., Naresh, K. N., Roufousse, C., Nicholson, A. G., Weir, J., Cooke, G. S., Thursz, M., Manousou, P., Corbett, R., Goldin, R., Al-Sarraj, S., Abdolrasouli, A., Swann, O. C., Baillon, L., Penn, R., Barclay, W. S., Viola, P. & Osborn, M. Histopathological findings and viral tropism in UK patients with severe fatal COVID-19: a post-mortem study. *Lancet Microbe* **1**, e245–e253 (2020).
74. Jensen, M. P., Le Quesne, J., Officer-Jones, L., Teodòsio, A., Thaventhiran, J., Ficken, C., Goddard, M., Smith, C., Menon, D. & Allinson, K. S. J. Neuropathological findings in two patients with fatal COVID-19. *Neuropathol Appl Neurobiol* **47**, 17–25 (2021).
75. Reichard, R. R., Kashani, K. B., Boire, N. A., Constantopoulos, E., Guo, Y. & Lucchinetti, C. F. Neuropathology of COVID-19: a spectrum of vascular and acute disseminated encephalomyelitis (ADEM)-like pathology. *Acta Neuropathol* **140**, 1–6 (2020).
76. Bryce, C., Grimes, Z., Pujadas, E., Ahuja, S., Beasley, M. B., Albrecht, R., Hernandez, T., Stock, A., Zhao, Z., AlRasheed, M. R., Chen, J., Li, L., Wang, D., Corben, A., Haines, G. K., Westra, W. H., Umphlett, M., Gordon, R. E., Reidy, J., Petersen, B., Salem, F., Fiel, M. I., El Jamal, S. M., Tsankova, N. M., Houldsworth, J., Mussa, Z., Veremis, B., Sordillo, E., Gitman, M. R., Nowak, M., Brody, R., Harpaz, N., Merad, M., Gnjjatic, S., Liu, W.-C., Schotsaert, M., Miorin, L., Aydilillo Gomez, T. A., Ramos-Lopez, I., Garcia-Sastre, A., Donnelly, R., Seigler, P., Keys, C., Cameron, J., Moultrie, I., Washington, K.-L., Treatman, J., Sebra, R., Jhang, J., Firpo, A., Lednický, J., Paniz-Mondolfi, A., Cordon-Cardo, C. & Fowkes, M. E. Pathophysiology of SARS-CoV-2: the Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. *Mod Pathol* **34**, 1456–1467 (2021).
77. Jaunmuktane, Z., Mahadeva, U., Green, A., Sekhawat, V., Barrett, N. A., Childs, L., Shankar-Hari, M., Thom, M., Jäger, H. R. & Brandner, S. Microvascular injury and hypoxic damage: emerging neuropathological signatures in COVID-19. *Acta Neuropathol* **140**, 397–400 (2020).
78. Hernández-Fernández, F., Sandoval Valencia, H., Barbella-Aponte, R. A., Collado-Jiménez, R., Ayo-Martín, Ó., Barrena, C., Molina-Nuevo, J. D., García-García, J., Lozano-Setién, E., Alcahut-Rodríguez, C., Martínez-Martín, Á., Sánchez-López, A. & Segura, T. Cerebrovascular disease in patients with COVID-19: neuroimaging, histological and clinical description. *Brain* **143**, 3089–3103 (2020).
79. Solomon, I. H., Normandin, E., Bhattacharyya, S., Mukerji, S. S., Keller, K., Ali, A. S., Adams, G., Hornick, J. L., Padera, R. F. & Sabeti, P. Neuropathological Features of Covid-19. *N Engl J Med* **383**, 989–992 (2020).
80. von Stillfried, S. & Boor, P. Nachweismethoden von SARS-CoV-2 in Gewebe. *Pathologe* **42**, 208–215 (2021).

81. Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M. P. & Drosten, C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* **25**, (2020).
82. Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., Niemeyer, D., Jones, T. C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C. & Wendtner, C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* **581**, 465–469 (2020).
83. DocCheck Medical Services GmbH, *DocCheck Flexikon*, Nucleus tractus solitarii, https://flexikon.doccheck.com/de/Nucleus_tractus_solitarii (letzter Zugriff 14.10.2021, 20:20 Uhr)
84. DocCheck Medical Services GmbH, *DocCheck Flexikon*, Atemzentrum, <https://flexikon.doccheck.com/de/Atemzentrum> (letzter Zugriff 14.10.2021, 20:20 Uhr)
85. Goldsmith, C. S. & Miller, S. E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin Microbiol Rev* **22**, 552–563 (2009).
86. Mondal, S., Quintili, A. L., Karamchandani, K. & Bose, S. Thromboembolic disease in COVID-19 patients: A brief narrative review. *J Intensive Care* **8**, 70 (2020).
87. Elezkurtaj, S., Greuel, S., Ihlow, J., Michaelis, E. G., Bischoff, P., Kunze, C. A., Sinn, B. V., Gerhold, M., Hauptmann, K., Ingold-Heppner, B., Miller, F., Herbst, H., Corman, V. M., Martin, H., Radbruch, H., Heppner, F. L. & Horst, D. Causes of death and comorbidities in hospitalized patients with COVID-19. *Sci Rep* **11**, 4263 (2021).
88. Fajgenbaum, D. C. & June, C. H. Cytokine Storm. *N Engl J Med* **383**, 2255–2273 (2020).
89. Puelles, V. G., Lütgehetmann, M., Lindenmeyer, M. T., Sperhake, J. P., Wong, M. N., Allweiss, L., Chilla, S., Heinemann, A., Wanner, N., Liu, S., Braun, F., Lu, S., Pfefferle, S., Schröder, A. S., Edler, C., Gross, O., Glatzel, M., Wichmann, D., Wiech, T., Kluge, S., Püschel, K., Aepfelbacher, M. & Huber, T. B. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* **383**, 590–592 (2020).
90. Dittmayer, C., Meinhardt, J., Radbruch, H., Radke, J., Heppner, B. I., Heppner, F. L., Stenzel, W., Holland, G. & Laue, M. Why misinterpretation of electron micrographs in SARS-CoV-2-infected tissue goes viral. *The Lancet* **396**, e64–e65 (2020).
91. Dittmayer, C., Meinhardt, J., Radbruch, H., Radke, J., Heppner, B. I., Heppner, F. L., Stenzel, W., Holland, G. & Laue, M. Using EM data to understand COVID-19 pathophysiology – Authors' reply. *The Lancet* **397**, 197–198 (2021).
92. Goldsmith, C. S., Miller, S. E., Martines, R. B., Bullock, H. A. & Zaki, S. R. Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task. *Lancet* **395**, e99 (2020).

93. Hewitt, S. M., Baskin, D. G., Frevert, C. W., Stahl, W. L. & Rosa-Molinar, E. Controls for Immunohistochemistry: The Histochemical Society's Standards of Practice for Validation of Immunohistochemical Assays. *J Histochem Cytochem.* **62**, 693–697 (2014).
94. Baeck, M., Hoton, D., Marot, L. & Herman, A. Chilblains and COVID-19: why SARS-CoV-2 endothelial infection is questioned. *Br J Dermatol* **183**, 1152–1153 (2020).
95. Larsen, C. P., Bourne, T. D., Wilson, J. D., Saqqa, O. & Sharshir, M. A. Collapsing Glomerulopathy in a Patient With COVID-19. *Kidney Int Rep* **5**, 935–939 (2020).
96. Smith, K. D., Akilesh, S., Alpers, C. E. & Nicosia, R. F. Am I a coronavirus? *Kidney International* **98**, 506–507 (2020).
97. de Melo, G. D., Lazarini, F., Levallois, S., Hautefort, C., Michel, V., Larrous, F., Verillaud, B., Aparicio, C., Wagner, S., Gheusi, G., Kergoat, L., Kornobis, E., Donati, F., Cokelaer, T., Hervochon, R., Madec, Y., Roze, E., Salmon, D., Bourhy, H., Lecuit, M. & Lledo, P.-M. COVID-19–related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci. Transl. Med.* **13**, eabf8396 (2021).
98. Zhang, A. J., Lee, A. C.-Y., Chu, H., Chan, J. F.-W., Fan, Z., Li, C., Liu, F., Chen, Y., Yuan, S., Poon, V. K.-M., Chan, C. C.-S., Cai, J.-P., Wu, K. L.-K., Sridhar, S., Chan, Y.-S. & Yuen, K.-Y. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infects and Damages the Mature and Immature Olfactory Sensory Neurons of Hamsters. *Clinical Infectious Diseases* **73**, e503–e512 (2021).
99. 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. 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 (2020).
100. 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., Eils, R., Stenzel, W., Windgassen, M., Rößler, L., Goebel, H.-H., Gelderblom, H. R., Martin, H., Nitsche, A., Schulz-Schaeffer, W. J., Hakrrouch, S., Winkler, M. S., Tampe, B., Scheibe, F., Körtvélyessy, P., Reinhold, D., Siegmund, B., Köhl, A. A., Elezkurtaj, S., Horst, D., Oesterhelweg, L., Tsokos, M., Ingold-Heppner, B., Stadelmann, C., Drosten, C., Corman, V. M., Radbruch, H. & Heppner, F. L. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* **24**, 168–175 (2021).
101. Zhang, L., Richards, A., Barrasa, M. I., Hughes, S. H., Young, R. A. & Jaenisch, R. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **118**, e2105968118 (2021).
102. Li, Y.-C., Bai, W.-Z. & Hashikawa, T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J Med Virol* **92**, 552–555 (2020).

103. Butowt, R. & von Bartheld, C. S. Anosmia in COVID-19: Underlying Mechanisms and Assessment of an Olfactory Route to Brain Infection. *Neuroscientist* 1073858420956905 (2020). doi:10.1177/1073858420956905
104. Otte, M. S., Klußmann, J. P. & Luers, J. C. Riechstörungen bei COVID-19 – aktueller Wissensstand. *Laryngorhinotologie* **99**, 531–535 (2020).
105. Susman, S., Berindan-Neagoe, I., Petrushev, B., Pirlog, R., Florian, I.-S., Miha, C.-M., Berce, C., Craciun, L., Grewal, R. & Tomuleasa, C. The role of the pathology department in the preanalytical phase of molecular analyses. *CMAR Volume 10*, 745–753 (2018).
106. McKinney, M. D., Moon, S. J., Kulesh, D. A., Larsen, T. & Schoepp, R. J. Detection of viral RNA from paraffin-embedded tissues after prolonged formalin fixation. *Journal of Clinical Virology* **44**, 39–42 (2009).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jenny Meinhardt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neuropathologische Veränderungen bei schwerem COVID-19/Neuropathological changes in severe COVID-19“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer und der Zweitbetreuerin angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, 09.05.2022

Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Jenny Meinhardt hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Jenny Meinhardt*, Josefine Radke*, Carsten Dittmayer*, Jonas Franz, Carolina Thomas, Ronja Mothes, Michael Laue, Julia Schneider, Sebastian Brünink, Selina Greuel, Malte Lehmann, Olga Hassan, Tom Aschman, Elisa Schumann, Robert Lorenz Chua, Christian Conrad, Roland Eils, Werner Stenzel, Marc Windgassen, Larissa Rößler, Hans-Hilmar Goebel, Hans R. Gelderblom, Hubert Martin, Andreas Nitsche, Walter J. Schulz-Schaeffer, Samy Hakrrouch, Martin S. Winkler, Björn Tampe, Franziska Scheibe, Péter Körtvélyessy, Dirk Reinhold, Britta Siegmund, Anja A. Köhl, Sefer Elezkurtaj, David Horst, Lars Oesterhelweg, Michael Tsokos, Barbara Ingold-Heppner, Christine Stadelmann, Christian Drosten, Victor Max Corman, Helena Radbruch und Frank L. Heppner „*Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19*“. Nat Neurosci 24, 168–175 (2021).

*In dieser Publikation teile ich mir die Erstautorenschaft mit PD Dr. Josefine Radke und Dr. Carsten Dittmayer, deren Anteilserklärungen der Dissertation gesondert beiliegen.

Beitrag im Einzelnen: Studiendesign und -planung; Durchführung der Hirnobduktionen; Präparation, Einbettung und Kryokonservierung des Gewebes sowie Optimierung dieser Prozesse; Probenasservierung und -versand; Neuropathologische Befundung der obduzierten Gehirne; Erhebung und Auswertung der Patientenbezogenen Daten sowie der histopathologischen Daten; Auswertung immunhistochemischer Analysen; Auswertung der In-situ-Hybridisierung; Auswertung der PCR-Daten; Grafische Aufarbeitung der Daten in GraphPad Prism; Erstellen der Comics und Heatmap mittels CorelDRAW 19; Anteilig Schreiben und Revision des Manuskripts.

Anteile an den Abbildungen im Einzelnen: Figure 1: Vollständige Erstellung; Figure 2: Erstellung der Comics (2a, d), Auswahl histologischer und immunhistochemischer Abbildungen; Figure 3: Auswahl der immunhistochemischen Abbildungen; Figure 5: Vollständige Erstellung; Figure 6: Erstellung des Schemas, Auswahl histologischer und immunhistochemischer Abbildungen; Supplementary Figure 1: Vollständige Erstellung; Supplementary Figure 4: Grafische Darstellung der Boxplots in GraphPad Prism, Auswahl immunhistochemischer Abbildungen; Supplementary Figure 5: Vollständige Erstellung.

Publikation

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“NEUROSCIENCES”** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 267 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	43,107	33.162	0.068480
2	NATURE NEUROSCIENCE	63,390	21.126	0.164700
3	ACTA NEUROPATHOLOGICA	20,206	18.174	0.041660
4	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	9,377	17.194	0.010240
5	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	27,095	16.173	0.040040
6	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	10,695	15.221	0.010560
7	NEURON	95,348	14.403	0.218680
8	TRENDS IN NEUROSCIENCES	20,163	12.314	0.024480
9	Annual Review of Neuroscience	14,042	12.043	0.015020
10	MOLECULAR PSYCHIATRY	20,353	11.973	0.049290
11	BRAIN	52,970	11.814	0.074030
12	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	43,122	11.501	0.053320
13	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	12,929	10.658	0.013230
14	Nature Human Behaviour	1,230	10.575	0.006550
15	SLEEP MEDICINE REVIEWS	6,920	10.517	0.010920
16	ANNALS OF NEUROLOGY	37,336	9.496	0.048630
17	Molecular Neurodegeneration	4,248	8.274	0.011350

Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5>.



Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19

Jenny Meinhardt^{1,25}, Josefine Radke^{1,2,3,25}, Carsten Dittmayer^{1,25}, Jonas Franz^{4,5,6}, Carolina Thomas^{4,6}, Ronja Mothes¹, Michael Laue⁷, Julia Schneider⁸, Sebastian Brünink⁸, Selina Greuel⁹, Malte Lehmann¹⁰, Olga Hassan¹, Tom Aschman¹, Elisa Schumann^{1,3}, Robert Lorenz Chua¹¹, Christian Conrad¹¹, Roland Eils^{11,12}, Werner Stenzel¹, Marc Windgassen¹³, Larissa Rößler¹³, Hans-Hilmar Goebel¹, Hans R. Gelderblom⁷, Hubert Martin¹, Andreas Nitsche⁷, Walter J. Schulz-Schaeffer¹⁴, Samy Hakrrouch¹⁵, Martin S. Winkler¹⁶, Björn Tampe¹⁷, Franziska Scheibe^{18,19}, Péter Körtvélyessy^{18,20}, Dirk Reinhold²¹, Britta Siegmund¹⁰, Anja A. Kühl²², Sefer Elezkurtaj⁹, David Horst⁹, Lars Oesterhelweg¹³, Michael Tsokos¹³, Barbara Ingold-Heppner²³, Christine Stadelmann⁴, Christian Drosten⁸, Victor Max Corman⁸, Helena Radbruch^{1,26} and Frank L. Heppner^{1,2,19,24,26} ✉

The newly identified severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causes COVID-19, a pandemic respiratory disease. Moreover, thromboembolic events throughout the body, including in the CNS, have been described. Given the neurological symptoms observed in a large majority of individuals with COVID-19, SARS-CoV-2 penetrance of the CNS is likely. By various means, we demonstrate the presence of SARS-CoV-2 RNA and protein in anatomically distinct regions of the nasopharynx and brain. Furthermore, we describe the morphological changes associated with infection such as thromboembolic ischemic infarction of the CNS and present evidence of SARS-CoV-2 neurotropism. SARS-CoV-2 can enter the nervous system by crossing the neural-mucosal interface in olfactory mucosa, exploiting the close vicinity of olfactory mucosal, endothelial and nervous tissue, including delicate olfactory and sensory nerve endings. Subsequently, SARS-CoV-2 appears to follow neuro-anatomical structures, penetrating defined neuroanatomical areas including the primary respiratory and cardiovascular control center in the medulla oblongata.

There is increasing evidence that SARS-CoV-2 not only affects the respiratory tract but also impacts the CNS, resulting in neurological symptoms such as loss of smell and taste, head-

ache, fatigue, nausea and vomiting in more than one-third of individuals with COVID-19 (refs. ^{1,2}). Moreover, acute cerebrovascular disease and impaired consciousness have been reported³. While

¹Department of Neuropathology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ²Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany. ³German Cancer Consortium (DKTK), Partner Site Berlin, CCC (Campus Mitte), Berlin, Germany. ⁴Institute of Neuropathology, University Medical Center, Göttingen, Germany. ⁵Campus Institute for Dynamics of Biological Networks, University of Göttingen, Göttingen, Germany. ⁶Max Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany. ⁷Centre for Biological Threats and Special Pathogens (ZBS), Robert Koch Institute, Berlin, Germany. ⁸Institute of Virology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health and German Centre for Infection Research, Berlin, Germany. ⁹Institute of Pathology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ¹⁰Division of Gastroenterology, Infectiology and Rheumatology, Medical Department, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ¹¹Center for Digital Health, Berlin Institute of Health (BIH) and Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany. ¹²Health Data Science Unit, Faculty of Medicine, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. ¹³Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ¹⁴Institute of Neuropathology, University of the Saarland, Homburg, Germany. ¹⁵Institute of Pathology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany. ¹⁶Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany. ¹⁷Department of Nephrology and Rheumatology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany. ¹⁸Department of Neurology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ¹⁹Cluster of Excellence, NeuroCure, Berlin, Germany. ²⁰German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Magdeburg, Germany. ²¹Institute of Molecular and Clinical Immunology, Otto-von-Guericke-University Magdeburg, Magdeburg, Germany. ²²Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, and iPATH, Berlin, Berlin, Germany. ²³Institute of Pathology, DRK Kliniken Berlin, Berlin, Germany. ²⁴German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) Berlin, Berlin, Germany. ²⁵These authors contributed equally: Jenny Meinhardt, Josefine Radke, Carsten Dittmayer. ²⁶These authors jointly supervised this work: Helena Radbruch, Frank L. Heppner. ✉e-mail: frank.heppner@charite.de

recent studies have described the presence of viral RNA in the brain and cerebrospinal fluid (CSF), they have lacked proof of genuine SARS-CoV-2 infection^{4,5}. A systematic analysis of autopsy brains and peripheral tissues aimed at understanding the port of entry and distribution for SARS-CoV-2 within the CNS has therefore been missing⁶.

Currently, there are seven types of coronavirus (CoV) that naturally infect humans^{7,8}, and, of these, at least two endemic strains have been shown to enter and persist in the CNS. In one autopsy study, 48% of the investigated cases carried detectable human CoV RNA in the CNS⁹. Additionally, the neuroinvasive potential of SARS-CoV and Middle East respiratory syndrome (MERS)-CoV, which are evolutionarily closely related to SARS-CoV-2, has previously been described^{10–12}.

SARS-CoV, including SARS-CoV-2, are known to enter human host cells primarily by binding to the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and by the action of the serine protease TMPRSS2 for spike (S) protein priming¹³. Supporting evidence comes from animal studies demonstrating that SARS-CoV is capable of entering the brain upon intranasal infection of mice expressing human ACE2 (refs. ^{12,14}). In the lung, bronchial transient secretory cells express ACE2 and TMPRSS2 (ref. ¹⁵). Similarly, there is evidence for ACE2 expression in neuronal and glial cells in the human CNS¹⁶. In human olfactory mucosa, ACE2 was shown to be expressed by non-neuronal cells under physiological conditions¹⁷, while little is known about ACE2 expression in an inflammatory or septic setting¹⁸.

Because knowledge of SARS-CoV-2 neurotropism and potential mechanisms of CNS entry and viral distribution is key for a better understanding of COVID-19 diagnosis, prognosis and interventional measures, we assessed olfactory mucosa, its nervous projections and several defined CNS regions in 33 individuals who died in the context of COVID-19.

Results

We analyzed the cellular mucosal–nervous micromilieu as a first site of viral infection and replication, followed by thorough regional mapping of the consecutive olfactory nervous tracts and defined CNS regions, in autopsy material from 33 individuals with COVID-19 ($n=22$ male and $n=11$ female) examined between March and August of 2020 (Supplementary Tables 1 and 2). The median age at death was 71.6 years (interquartile range, 67–79 years; range, 30 to 98 years), and the time from onset of COVID-19 symptoms to death ranged from 4 to 79 days, with a median of 31 days. Cases were not preselected with regard to clinical and/or neurological symptoms, which, owing to the pandemic situation, in some instances were not fully documented or not possible to retrieve. Clinically documented COVID-19-associated neurological alterations included impaired consciousness ($n=5$), intraventricular hemorrhage ($n=2$), headache ($n=2$) and behavioral changes ($n=2$); acute cerebral ischemia was reported for 2 individuals, while neuropathological postmortem workup revealed acute infarcts in 6 individuals (Supplementary Table 2). Coexisting conditions included diabetes mellitus ($n=4$), hypertension ($n=21$), cardiovascular disease ($n=9$), hyperlipidemia ($n=2$), chronic kidney disease ($n=2$), prior stroke ($n=6$) and dementia ($n=5$) (Supplementary Table 1). Although all 33 individuals required mechanical ventilation and at the time of autopsy were found to have suffered from COVID-19-associated lung disease, 9 did not receive mechanical ventilation according to the will of the respective individual. Additional clinical information on comorbidities is provided in Supplementary Table 1. Thirty-one individuals were proven to be positive by quantitative PCR with reverse transcription (RT–qPCR) for SARS-CoV-2 before death ($n=31$ of 33), while 2 individuals showed a clinical presentation highly suggestive of COVID-19 ($n=2$ of 33). Correspondingly, ACE2 was detectable in olfactory mucosa by means of immunohistochemistry, while

we found no reliable ACE2 immunoreactivity in the parenchyma of the CNS, namely, in the olfactory bulb and medulla oblongata (Supplementary Fig. 1).

Regional mapping of SARS-CoV-2 RNA in olfactory mucosa, its nervous projections and distinct CNS regions. Assessment of viral load by means of RT–qPCR in regionally defined tissue samples including the olfactory mucosa (R1), olfactory bulb (R2), olfactory tubercle (R3), oral mucosa (uvula; R4), trigeminal ganglion (R5), medulla oblongata (R6) and cerebellum (R7) demonstrated the highest levels of viral RNA for SARS-CoV-2 within the olfactory mucosa sampled directly beneath the cribriform plate ($n=20$ of 30; Fig. 1a). Lower levels of viral RNA were found in the cornea, conjunctiva and oral mucosa, highlighting the oral and ophthalmic routes as additional potential sites of SARS-CoV-2 CNS entry (Fig. 1b–d). In only a few COVID-19 autopsy cases, the cerebellum ($n=3$ of 24) was positive for SARS-CoV-2 by means of RT–qPCR. The carotid artery wall served as a control tissue for excluding or proving systemic (vascular) entry routes to the CNS and was found to be negative in 12 of the 13 samples analyzed; the one positive result was derived from the carotid artery of an individual with acute COVID-19 disease. Subgenomic RNA (sgRNA) is used as a surrogate for active viral replication. We obtained a positive result in 4 of 20 olfactory mucosa samples positive for SARS-CoV-2 RNA and 1 of 6 uvula samples positive for SARS-CoV-2 RNA, but in none of the other tissues analyzed in this study (Fig. 1b–d and Supplementary Table 2). Disease duration inversely correlated with the amount of detectable SARS-CoV-2 RNA in the CNS, with high SARS-CoV-2 RNA levels found in individuals with COVID-19 who had relatively short disease duration, whereas individuals with prolonged COVID-19 disease typically had low RNA load (correlation coefficient $r=-0.5$, $**P=0.006$ from $n=29$ individuals; Fig. 1e).

The olfactory mucosal–nervous milieu as a SARS-CoV-2 CNS entry-prone interface. Anatomical proximity of neurons, nerve fibers and mucosa within the oro- and nasopharynx (Fig. 2a–f) and the reported clinical–neurological signs related to alterations in smell and taste perception suggest that SARS-CoV-2 exploits this neural–mucosal interface as a port of entry into the CNS. The olfactory epithelium is organized as a pseudostratified epithelial structure mainly composed of olfactory sensory neurons (OSNs), apical sustentacular cells, Bowman's gland (BG), microvillous cells and neural stem cells¹⁹. Horizontal basal cells (HBCs) and globose basal cells (GBCs) complete the spectrum of immature and mature neural/neuronal cells^{20,21}. On the apical side of the olfactory mucosa, the dendrites of OSNs project into the nasal cavity, while on the basal side the axons of OSNs merge into fila, which protrude through the cribriform plate directly into the olfactory bulb (Fig. 2), thereby also having contact with CSF²². OSNs are bipolar cells, and somatic (including dendritic and axonal) expression of olfactory membrane protein (OMP) indicates their mature state (Fig. 2g), while expression of class III β -tubulin (TuJ1) corresponds to both immature and mature neuronal cells within the olfactory mucosa²⁰ (Fig. 2h). The neuronal cells coalesce with the other cells to the epithelial layer.

SARS-CoV-2 tropism within the olfactory mucosa. When assessing the local distribution of SARS-CoV-2 within SARS-CoV-2 PCR-positive tissue at the cellular level, we found that SARS-CoV-2 protein was most prevalent in the olfactory mucosa. Using immunohistochemistry, distinct immunoreactivity for SARS-CoV S protein, including a characteristic granular, partly perinuclear pattern, was found in morphologically distinct cell types indicative of neuronal/neural origin (Fig. 3a). SARS-CoV-2 RNA was detectable in cells of the olfactory epithelium and in olfactory mucus by RNAScope in situ hybridization (ISH) in formalin-fixed and paraffin-embedded

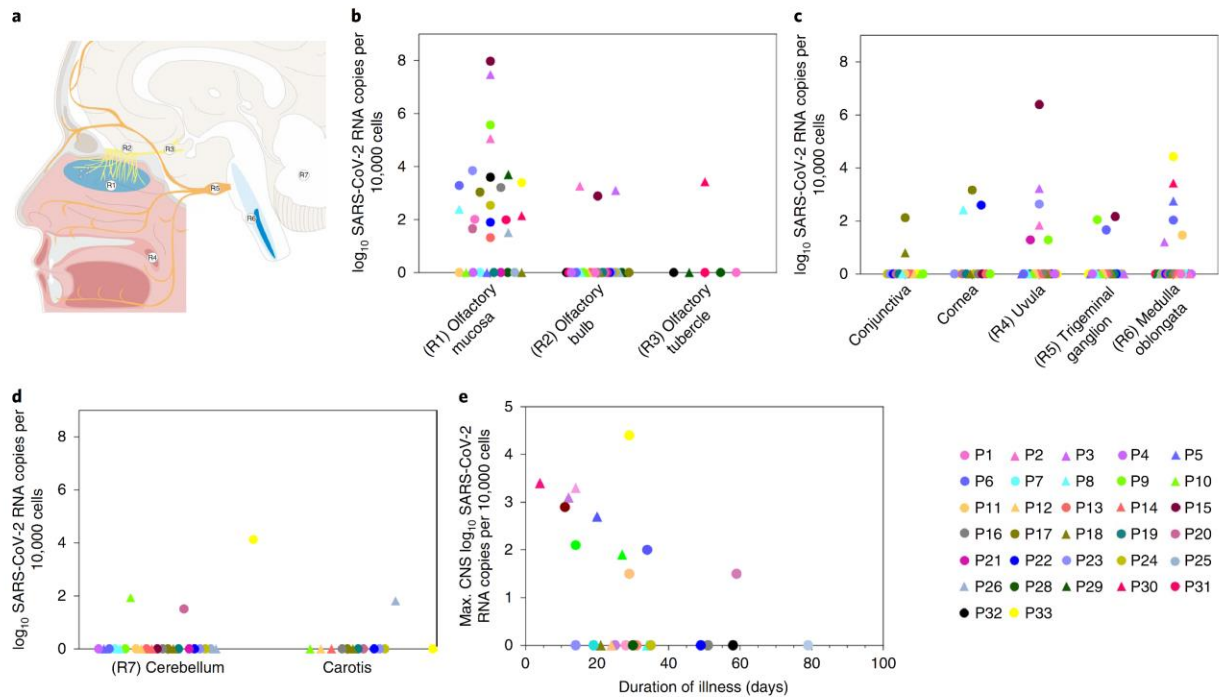


Fig. 1 | Detection of SARS-CoV-2 in deceased individuals with COVID-19 in anatomically distinctly mapped oro- and nasopharyngeal as well as CNS regions. **a**, Cartoon depicting the anatomical structures sampled for histomorphological, ultrastructural and molecular analyses including SARS-CoV-2 RNA measurement from fresh (non-formalin-fixed) specimens of deceased individuals with COVID-19. Specimens were taken from the olfactory mucosa underneath the cribriform plate (anatomical region R1, blue, $n=30$), the olfactory bulb (R2, yellow, $n=31$), the olfactory tubercle (R3, $n=7$), different branches of the trigeminal nerve (including conjunctiva ($n=16$) and cornea ($n=13$)), mucosa covering the uvula (R4, $n=22$), the respective trigeminal ganglion (R5, orange, $n=22$), the cranial nerve nuclei in the medulla oblongata (R6, dark blue, $n=31$), the cerebellum (R7, $n=24$) and the carotid artery wall ($n=13$). **b–d**, Quantitative data for each individual shown on a logarithmic scale normalized on 10,000 cells. **e**, Correlation of disease duration and viral RNA load in the CNS (typically measured in the olfactory bulb or medulla oblongata). The length of disease duration correlates inversely with the amount of detectable SARS-CoV-2 RNA (correlation coefficient $r=-0.5$, $**P=0.006$ from $n=29$ individuals). Females are represented by triangles and males are represented by circles; no data for P27 is shown because no viral testing could be performed on naive or cryopreserved tissue of P27.

(FFPE) samples (Fig. 3b). On the ultrastructural level, we were able to detect intact CoV particles in an individual with high viral RNA load and presence of sgRNA (Fig. 3c–f). Re-embedding of FFPE olfactory mucosa for electron microscopy (EM) allowed selective assessment of a tissue region with a strong SARS-CoV-2 RNA ISH signal (Fig. 3b). Characteristic CoV substructures within the respective cellular compartments were found as expected, including surface projections (spikes) and partially visible membrane envelope as well as a heterogeneous and partly granular electron-dense interior due to the presence of ribonucleoprotein (RNP). Only subtle ultrastructural differences as compared to CoV-infected cell cultures were noted. These were clearly discernible from intrinsic cellular structures or artifacts and can be entirely explained by the FFPE re-embedding procedure^{23–28} (Supplementary Fig. 2).

To further pinpoint which cells within the olfactory mucosa harbor SARS-CoV-2, we performed colocalization studies using various neuronal markers and SARS-CoV S protein, finding perinuclear SARS-CoV S protein immunoreactivity in TuJ1⁺ (Fig. 4a–d), neurofilament 200 (NF200)⁺ (Fig. 4e–h) and OMP⁺ (Fig. 4i–l) neural/neuronal cells in three individuals with COVID-19 where adequate tissue for this type of analysis was available; olfactory mucosa from two individuals without COVID-19 was used as a negative control and showed no immunoreactivity for SARS-CoV S protein in otherwise equally detectable TuJ1⁺ or OMP⁺ neural/neuronal cells (Supplementary Fig. 3g,h).

The results of the different approaches used to detect SARS-CoV-2 including SARS-CoV S immunostaining, ISH for SARS-CoV-2 RNA and ultrastructural analyses to visualize CoV particles at various sites and regions are summarized in a heatmap-like manner (Fig. 5), ultimately supporting the hypothesis of a site-specific, local CNS infection by SARS-CoV-2.

The SARS-CoV-2-mediated neuroinflammatory response. As an indirect sign of local infection and ongoing inflammation, we looked for small cell clusters of early activated macrophages expressing myeloid-related protein 14 (MRP14), which were detected in the olfactory epithelium (Supplementary Fig. 1). These cells can initiate and regulate an immune cascade that, upon influenza virus infection, has been shown to act as an endogenous damage-associated molecular pattern (DAMP), ultimately initiating a virus-associated inflammatory response via TLR4–MyD88 signaling²⁹. In the CNS, we found strong upregulation of human leukocyte antigen (HLA)-DR on microglia/macrophages, which were often arranged in so-called microglial nodules, in 13 of 25 individuals analyzed (Supplementary Table 2 and Supplementary Fig. 4b–f). There was no evidence of MRP14⁺ cells nor of infiltrating lymphomonocytic cells within the CNS. A correlate of this HLA-DR-positive, presumably myeloid-driven inflammatory response was found in the CSF, where levels of inflammatory mediators such as interleukin (IL)-6, IL-18, CC-chemokine ligand 2 (CCL2) and soluble

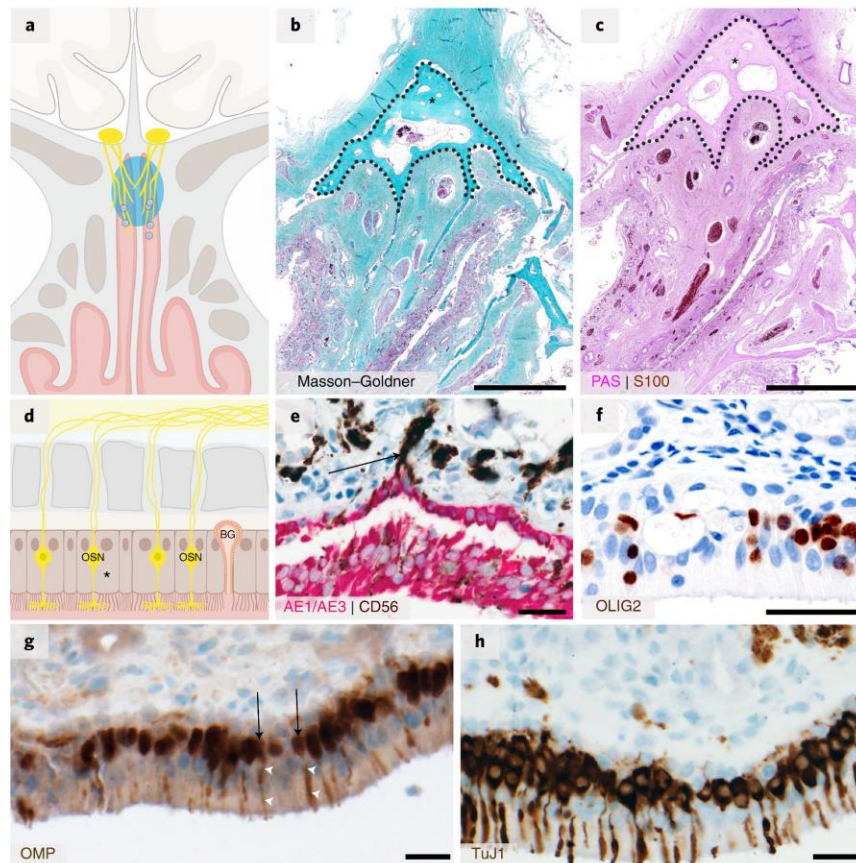


Fig. 2 | Close anatomical proximity of nervous and epithelial tissues in the olfactory mucosa. **a–c**, Cartoon (**a**) and histopathological coronal cross-sections (**b,c**; individual P9) depicting the paranasal sinus region with the osseous cribriform plate (turquoise asterisk and dotted line in **b**; pink asterisk and dotted line in **c**) and the close anatomical proximity of the olfactory mucosa (green in **b**, purple in **c**) and nervous tissue characterized by nerve fibers immunoreactive for S100 protein (**c**, brown). **d**, Cartoon representing the olfactory mucosa, which is composed of pseudostratified ciliated columnar epithelium (asterisk), basement membrane and lamina propria and also contains mucus-secreting BGs and bipolar OSNs, which coalesce to the epithelial layer. **e,f**, Immunohistochemical staining of the olfactory mucosa showing epithelial cells (**e**, immunoreactivity for the pan-cytokeratin marker AE1/AE3, red, individual P9), which closely intermingle with staining for OLIG2 specifying late neuronal progenitor cells and newly formed neurons (**f**, nuclear staining, brown, individual P27)⁴⁵. In **e**, the basement membrane underneath the columnar AE1/AE3-positive epithelium is discontinued due to CD56-positive (brown) nerve fibers of either olfactory or trigeminal origin (arrow). **g**, Cell bodies (arrows) and dendrites (arrowheads) of OMP-positive mature OSNs (brown, control individual C6 without COVID-19) are shown. **h**, Immunostaining for TuJ1 corresponding to both immature and mature neural/neuronal cells and their dendrites (brown, control individual C6 without COVID-19). Scale bars: 0.5 cm (**b,c**), 30 μ m (**e,g,h**) and 50 μ m (**f**).

intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) were found to be increased (Supplementary Fig. 4a)³⁰.

Cerebral microthrombosis and acute CNS infarcts. In line with recent clinical data demonstrating thromboembolic CNS events in a few individuals with COVID-19 (ref. ³¹), we found in 18% of the 33 individuals investigated ($n=6$ of 33) a histopathological correlate of microthrombosis and subsequent acute territorial brain infarcts (Fig. 6a–c and Supplementary Table 2). Of note, there was increased immunoreactivity to SARS-CoV S protein (which is thought to also recognize other CoV types) in endothelial cells within these acute cerebral infarcts (Fig. 6b,c) in comparison to a weaker but similarly distributed endothelial staining pattern in some control individuals (Supplementary Fig. 5). Because of the limitations in obtaining accessible and appropriate frozen, unfixed CNS tissue from these acute infarcts, we were only able to assess an infarct located within the medulla oblongata in one individual (P3) by means of RT-qPCR, finding that this sample was positive for SARS-CoV-2

RNA. As shown for the CNS, microthromboembolic events were also detectable in the olfactory mucosa in one individual.

Discussion

Several recent tissue-based studies assessing CNS alterations in fatal COVID-19 have provided the first hints at histopathological changes occurring in COVID-19 such as hypoxia-related pathology including CNS infarction due to cerebral thromboembolism and signs of a CNS-intrinsic myeloid cell response^{32–38} and/or have presented data on the presence of viral RNA in the CNS^{4,39}. To extend existing knowledge and to provide further proof for the presence and distribution of SARS-CoV-2 in the olfactory mucosa and within the CNS, we visualized viral RNA and protein using ISH and immunohistochemical staining techniques. This allowed us to dissect the cells harboring the virus and shed light on the mechanism of SARS-CoV-2 CNS entry at the neural–mucosal interface in olfactory mucosa. We were also able to visualize intact CoV particles at the ultrastructural level. Such data are often

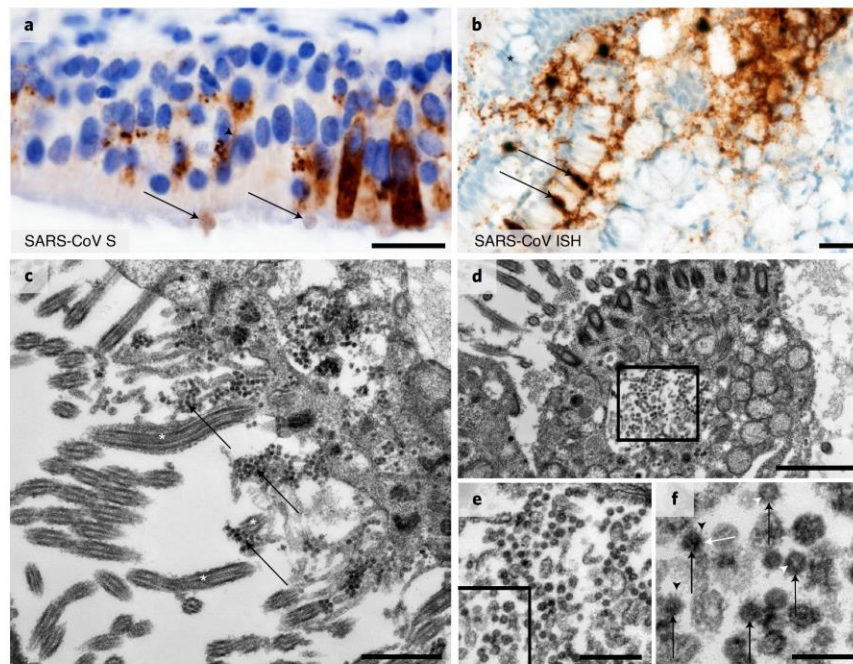


Fig. 3 | Immunohistochemistry-, in situ hybridization- and electron microscopy-based detection of SARS-CoV within the olfactory mucosa. a, CoV antigen detected by anti-SARS-CoV S protein antibodies (brown, individual P30) exhibits a cytoplasmic, often perinuclear, signal for CoV-positive cells resembling epithelial cells and cells harboring dendrite-like projections (arrowhead) with tips (arrows), which morphologically qualify as OSNs. **b**, SARS-CoV-2 RNA ISH showing intense signals in the mucus layer and cells (arrows) of the epithelium (asterisk) (brown, individual P15). **c–f**, Ultrastructural images of re-embedded FFPE material showing numerous extracellular CoV particles (**c**, arrows) attached to kinocilia (**c**, white asterisks) and intracellular CoV particles (**d–f**, increasing magnification) in a ciliated cell (individual P15, punch biopsy from the area in **b**). In **e** and **f**, intracellular CoV particles are located within cellular compartments of different sizes and are similar in their size and substructure. In **f**, at high magnification, five particles in this region show a particularly well-recognizable substructure (black arrows) that includes characteristic surface projections (black arrowhead), a heterogeneous and partly granular electron-dense interior, most likely representing RNP (white arrowheads), and a membrane envelope (white arrows). Scale bars: 20 μm (**a**), 50 μm (**b**), 1 μm (**c**), 2 μm (**d**), 500 nm (**e**) and 200 nm (**f**).

misinterpreted⁴⁰, especially when conclusions are solely based on relatively ill-defined virus-like substructures⁴¹. In tissues positive for SARS-CoV-2 RNA, we found SARS-CoV S protein in the cytoplasm of endothelial cells, in contrast to the findings of Solomon et al.³⁶; the different results are most likely due to methodological differences between the staining protocols used. The presence of SARS-CoV-2 in the CNS was found to result in a local CNS response mediated through HLA-DR⁺ microglia as effectors of a myeloid-driven inflammatory response. This innate immune response has a correlate in the CSF, where the levels of inflammatory mediators were found to be increased.

Presence of intact CoV particles together with SARS-CoV-2 RNA in the olfactory mucosa, as well as in neuroanatomical areas receiving olfactory tract projections (Fig. 1b), may suggest SARS-CoV-2 neuroinvasion occurring via axonal transport. However, morphological detection of single viral particles in axons is (if possible at all) very difficult owing to the very low number of viral particles that are expected, given that the viral reproduction apparatus is thought to be located in the neuronal somata. This difficulty in visualizing SARS-CoV-2 within the CNS on a cellular level is further aggravated by the fact that the olfactory bulb is a relatively small CNS region with a limited number of neurons, which is evidenced by the small amount of viral RNA that was obtained in COVID-19 cases harboring SARS-CoV-2 PCR-positive olfactory bulbs. In addition, the ability to detect SARS-CoV-2 may also be affected by the duration of COVID-19 infection, as the duration determines the viral load at a given time point and location, and we cannot exclude the

possibility that virus-infected (neuronal) cells might die and thus evade detection.

As we were able to detect SARS-CoV-2 RNA in some individuals in CNS regions that have no direct connection to the olfactory mucosa, such as the cerebellum, there may be other mechanisms or routes of viral entry into the CNS, possibly in addition to or in combination with axonal transport. For instance, migration of SARS-CoV-2-carrying leukocytes across the blood–brain barrier (BBB) or viral entry along CNS endothelia cannot be excluded. The latter is a valid possibility, at least in addition to a presumably axonal route, as we found immunoreactivity to SARS-CoV S protein in cerebral and leptomeningeal endothelial cells (Fig. 6b,c and Supplementary Fig. 5).

Widespread dysregulation of the cardiovascular, pulmonary and renal systems has been thought to be a leading cause of disease in severe or lethal COVID-19 cases⁴². In light of previous reports of infection by SARS-CoV and other CoVs in the nervous system⁴³ and our observations of SARS-CoV-2 in the brainstem, which comprises the primary respiratory and cardiovascular control center, it is possible that SARS-CoV-2 infection, at least in some instances, might aggravate respiratory or cardiac insufficiency—or even cause failure—in a CNS-mediated manner⁴⁴. The presence of acute infarcts in the brainstem ($n=2$ of 6 individuals analyzed; Supplementary Table 2) might support this notion. Even in the absence of clear signs of widespread distribution of SARS-CoV-2 in neuronal or glial cells of the CNS parenchyma in the COVID-19 autopsy cases investigated here, SARS-CoV-2 in the CNS endothelium might facilitate

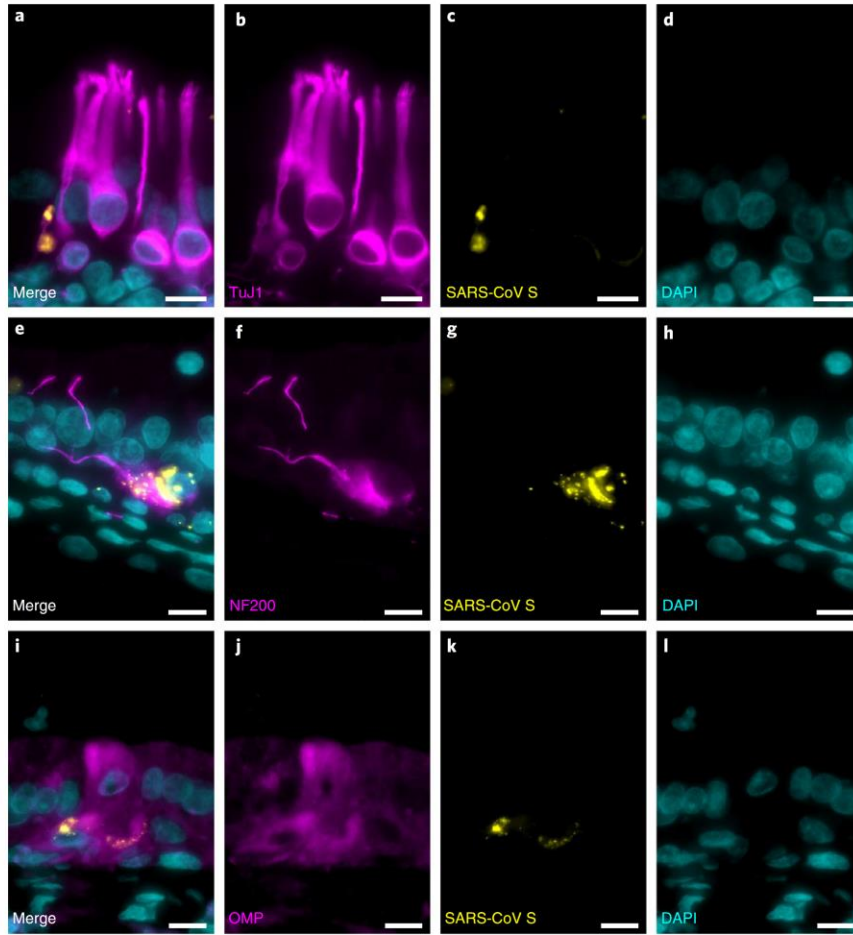


Fig. 4 | Colocalization of SARS-CoV spike protein with neural/neuronal cells in distinct olfactory mucosa samples from individuals with COVID-19. **a-l**, Representative maximum-intensity projections of confocal (**a-d** and **i-l**) or epifluorescence (**e-h**) microscopy images of olfactory mucosa showing intracytoplasmic staining for SARS-CoV S protein within TuJ1+ (**a-d**, individual P27), NF200+ (**e-h**, individual P27) and OMP+ (**i-l**, individual P27) OSNs. Staining for TuJ1, NF200 and OMP (magenta, Alexa Fluor 488) marks cells of neuronal origin, staining for SARS-CoV S protein (yellow, Alexa Fluor 555) visualizes the presence of SARS-CoV and DAPI staining (petrol) identifies all cell nuclei ($n = 3$ individuals with COVID-19 (P27, P30 and P32) were analyzed; $n = 2$ individuals without COVID-19 served as controls; shown are representative images from P27). Scale bars, (all panels) 10 μ m.

	P3	P5	P6	P9	P10	P11	P15	P20	P23	P29	P30	P31	P32	P33
PCR	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive	OM positive
IHC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ISH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EM	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

■ OM positive
 ■ CNS positive
 ■ OM/CNS negative
 NA/NA OM/CNS Not available

Fig. 5 | Summary of various SARS-CoV detection measures in deceased individuals with COVID-19. Various SARS-CoV-related investigations of the individuals who tested positive for SARS-CoV-2 by RT-qPCR in the olfactory mucosa (OM), the CNS or both. SARS-CoV-2 RT-qPCR positivity was combined with results derived from SARS-CoV-specific immunohistochemistry (IHC) and ISH as well as EM in appropriate tissue as available.

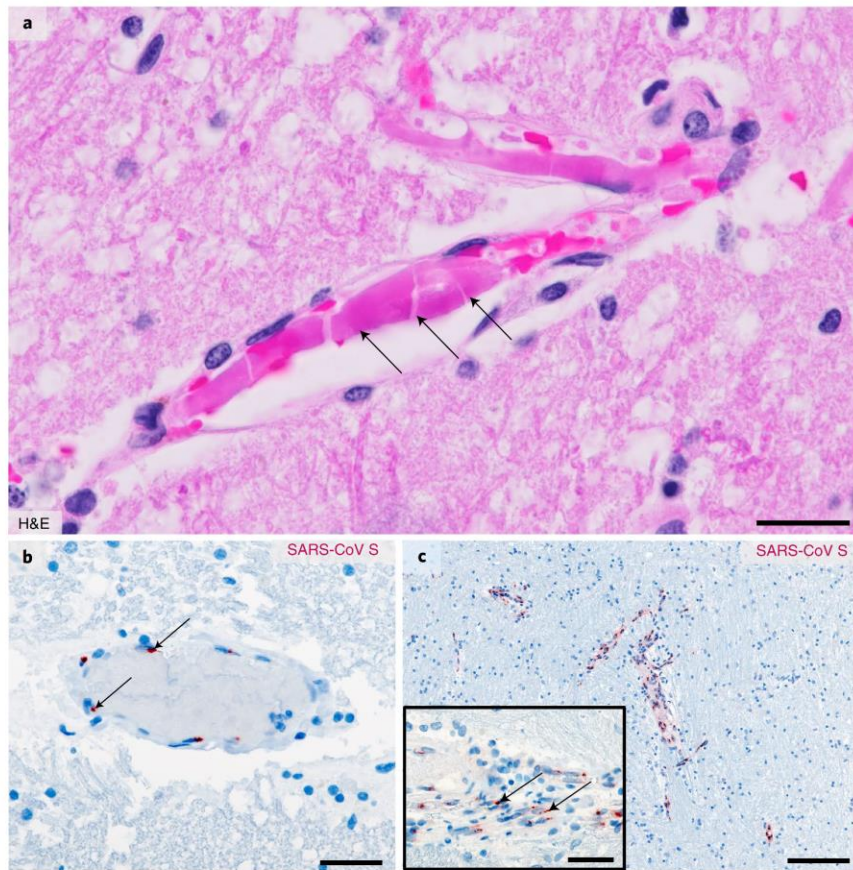


Fig. 6 | Signs of (micro)thromboembolic events and SARS-CoV-2 immunostaining in the CNS of deceased individuals with COVID-19. **a**, Hematoxylin and eosin (H&E)-stained FFPE section of the thalamus obtained from a deceased individual with COVID-19 (individual P26). Several small vessels exhibit fresh thrombi (pink, indicated by arrows) resulting in a large infarct of surrounding CNS tissue characterized by a substantial reduction of detectable neuronal and glial nuclei, edema and vacuolation. **b, c**, SARS-CoV-2 S protein observed in the endothelial cells of small CNS vessels. Tissue with no obvious ischemic damage exhibits only sparse staining intensity in endothelial cells (**b**, medulla oblongata, $n = 3$ of 6; red, indicated by arrows, individual P3) when compared to endothelial cells within acute infarct areas (**c**, pons, $n = 3$ of 4; red, indicated by arrows, individual P4; inset depicts a magnified vessel from a different region of the same specimen exhibiting SARS-CoV-2 S protein deposits within endothelial cells). Scale bars: 30 μm (**a**), 50 μm (**b**), 200 μm (**c**) and 40 μm (inset in **c**).

vascular damage and allow the virus to spread more widely to other brain regions over time, thus eventually contributing to a more severe or even chronic disease course, depending on various factors such as the duration of viral persistence, viral load and immune status, among others.

Taking our findings together, we provide evidence that SARS-CoV-2 neuroinvasion can occur at the neural–mucosal interface by transmucosal entry via regional nervous structures. This may be followed by transport along the olfactory tract of the CNS, thus explaining some of the well-documented neurological symptoms in COVID-19, including alterations of smell and taste perception. One caveat to note with the COVID-19 cases reported here is the relatively long postmortem interval, an almost insurmountable obstacle in autopsy studies, especially when performed under the emergency-like conditions encountered during a pandemic situation. Analysis of these samples is limited by well-known restrictions resulting from autolysis of cells and tissues, ultimately complicating the interpretation of morphological and molecular analyses. In spite of these limitations, we were able to retrieve numerous valuable insights. These included the detection of well-preserved CoV

particles at the ultrastructural level in an individual with an 82-hour postmortem interval (P15) and important pathogenetic insights, thus enabling further, more detailed and mechanistic investigations while encouraging further autopsy studies including broad sampling to allow multiple complementary analyses and the application of state-of-the-art methodologies. Such studies will allow identification of the precise cellular and molecular SARS-CoV-2 entry mechanism as well as receptors on OSNs, where non-neuronal pathways may also have a role¹⁷.

Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, extended data, supplementary information, acknowledgements, peer review information; details of author contributions and competing interests; and statements of data and code availability are available at <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5>.

Received: 13 June 2020; Accepted: 12 November 2020;
Published online: 30 November 2020

References

- Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497–506 (2020).
- Conde Cardona, G., Quintana Pájaro, L. D., Quintero Marzola, I. D., Ramos Villegas, Y. & Moscote Salazar, L. R. Neurotropism of SARS-CoV-2: mechanisms and manifestations. *J. Neurol. Sci.* **412**, 116824 (2020).
- Mao, L. et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127> (2020).
- Puelles, V. G. et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMc2011400> (2020).
- Moriguchi, T. et al. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-coronavirus-2. *Int. J. Infect. Dis.* **94**, 55–58 (2020).
- Otero, J. J. Neuropathologists play a key role in establishing the extent of COVID-19 in human patients. *Free Neuropathology* <https://doi.org/10.17879/FRENEUROPATHOLOGY-2020-2736> (2020).
- Zubair, A. S. et al. Neuropathogenesis and neurologic manifestations of the coronaviruses in the age of coronavirus disease 2019: a review. *JAMA Neurol.* <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.2065> (2020).
- Cyranoski, D. Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. *Nature* **581**, 22–26 (2020).
- Arbour, N., Day, R., Newcombe, J. & Talbot, P. J. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J. Virol.* **74**, 8913–8921 (2000).
- Glass, W. G., Subbarao, K., Murphy, B. & Murphy, P. M. Mechanisms of host defense following severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) pulmonary infection of mice. *J. Immunol.* **173**, 4030–4039 (2004).
- Li, K. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus causes multiple organ damage and lethal disease in mice transgenic for human dipeptidyl peptidase 4. *J. Infect. Dis.* **213**, 712–722 (2016).
- Netland, J., Meyerholz, D. K., Moore, S., Cassell, M. & Perlman, S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J. Virol.* **82**, 7264–7275 (2008).
- Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* **181**, 271–280 (2020).
- Doobay, M. F. et al. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin–angiotensin system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R373–R381 (2007).
- Lukassen, S. et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.* **39**, e105114 (2020).
- Khan, S. & Gomes, J. Neuropathogenesis of SARS-CoV-2 infection. *eLife* **9**, e59136 (2020).
- Brann, D. H. et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci. Adv.* **6**, eabc5801 (2020).
- Butowt, R. & Bilinska, K. SARS-CoV-2: olfaction, brain infection, and the urgent need for clinical samples allowing earlier virus detection. *ACS Chem. Neurosci.* **11**, 1200–1203 (2020).
- Schwob, J. E. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat. Rec.* **269**, 33–49 (2002).
- Holbrook, E. H., Wu, E., Curry, W. T., Lin, D. T. & Schwob, J. E. Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue: human olfactory tissue characterization. *Laryngoscope* **121**, 1687–1701 (2011).
- Carter, L. A., MacDonald, J. L. & Roskams, A. J. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J. Neurosci.* **24**, 5670–5683 (2004).
- van Riel, D., Verdijk, R. & Kuiken, T. The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J. Pathol.* **235**, 277–287 (2015).
- Varga, Z. et al. Endothelial cell infection and endothelitis in COVID-19. *Lancet* **395**, 1417–1418 (2020).
- Goldsmith, C. S., Miller, S. E., Martinez, R. B., Bullock, H. A. & Zaki, S. R. Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task. *Lancet* [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31188-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31188-0) (2020).
- Goldsmith, C. S. & Miller, S. E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 552–563 (2009).
- Goldsmith, C. S. et al. Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 320–326 (2004).
- Ksiazek, T. G. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1953–1966 (2003).
- Blanchard, E. & Roingard, P. Virus-induced double-membrane vesicles. *Cell. Microbiol.* **17**, 45–50 (2015).
- Tsai, S.-Y. et al. DAMP molecule S100A9 acts as a molecular pattern to enhance inflammation during influenza A virus infection: role of DDX21–TRIF–TLR4–MyD88 pathway. *PLoS Pathog.* **10**, e1003848 (2014).
- Körtvelyessy, P. et al. Serum and CSF cytokine levels mirror different neuroimmunological mechanisms in patients with LGI1 and Caspr2 encephalitis. *Cytokine* **135**, 155226 (2020).
- Oxley, T. J. et al. Large-vessel stroke as a presenting feature of Covid-19 in the young. *N. Engl. J. Med.* **382**, e60 (2020).
- Deigendesch, N. et al. Correlates of critical illness-related encephalopathy predominate postmortem COVID-19 neuropathology. *Acta Neuropathol.* **140**, 583–586 (2020).
- Schurink, B. et al. Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study. *Lancet Microbe* [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30144-0](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30144-0) (2020).
- Jensen, M. P. et al. Neuropathological findings in two patients with fatal COVID-19. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1111/nan.12662> (2020).
- Reichard, R. R. et al. Neuropathology of COVID-19: a spectrum of vascular and acute disseminated encephalomyelitis (ADEM)-like pathology. *Acta Neuropathol.* **140**, 1–6 (2020).
- Schaller, T. et al. Postmortem examination of patients with COVID-19. *JAMA* **323**, 2518–2520 (2020).
- von Weyhern, C. H., Kaufmann, I., Neff, F. & Kremer, M. Early evidence of pronounced brain involvement in fatal COVID-19 outcomes. *Lancet* **395**, e109 (2020).
- Solomon, I. H. et al. Neuropathological features of Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **383**, 989–992 (2020).
- Matschke, J. et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol.* **19**, 919–929 (2020).
- Dittmayer, C. et al. Why misinterpretation of electron micrographs in SARS-CoV-2-infected tissue goes viral. *Lancet* [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32079-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32079-1) (2020).
- Paniz-Mondolfi, A. et al. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J. Med. Virol.* **92**, 699–702 (2020).
- Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J. & Prescott, H. C. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA* **324**, 782–793 (2020).
- Desforges, M., Le Coupanec, A., Brisson, E., Meessen-Pinard, M. & Talbot, P. J. Neuroinvasive and neurotropic human respiratory coronaviruses: potential neurovirulent agents in humans. *Adv. Exp. Med. Biol.* **807**, 75–96 (2014).
- Baig, A. M., Khaleeq, A., Ali, U. & Syeda, H. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host–virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms. *ACS Chem. Neurosci.* **11**, 995–998 (2020).
- Wang, Y.-Z. et al. Olig2 regulates terminal differentiation and maturation of peripheral olfactory sensory neurons. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03385-x> (2019).

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature America, Inc. 2020

Methods

Study design. Thirty-three deceased individuals with COVID-19 either confirmed by PCR for SARS-CoV-2 ($n = 31$ of 33) or with clinical features highly suggestive of COVID-19 ($n = 2$ of 33) were included (Supplementary Table 1). Individuals were not preselected with regard to their clinical symptoms. Autopsies were performed at the Department of Neuropathology and the Institute of Pathology, Charité-Universitätsmedizin Berlin ($n = 25$ of 33), including one referral from the Institute of Pathology, DRK Kliniken Berlin, the Institutes of Pathology and of Neuropathology, University Medical Center Göttingen ($n = 6$ of 33) and the Institute of Forensic Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin ($n = 1$ of 33). This study was approved by the local ethics committees (Berlin: EA1/144/13, EA2/066/20 and EA1/075/19; Göttingen: 42/8/20) as well as by the Charité-BIH COVID-19 research board and was in compliance with the Declaration of Helsinki; autopsies were performed on the legal basis of §1 of the Autopsy Act of the state Berlin and §25(4) of the German Infection Protection Act. In all deceased individuals, a whole-body autopsy was performed, which included a thorough histopathological and molecular evaluation comprising virological assessment of SARS-CoV-2 RNA and/or SARS-CoV-2 protein levels in the carotid artery, cornea, conjunctiva, optic nerve, uvula, olfactory mucosa, olfactory bulb, olfactory tract, trigeminal ganglion, medulla oblongata and cerebellum as indicated in Supplementary Table 2. To exclude cross-contamination, clean instruments for the preparation and sampling of each organ and region were always used. All individuals with COVID-19 with known disease duration and available PCR-tested appropriate CNS tissue were included ($n = 29$ of 33) to calculate the correlation coefficient for the correlation between disease duration and CNS SARS-CoV-2 viral load. Therefore, we could not perform randomization as all individuals with SARS-CoV-2 RNA were included in the COVID-19 group and controls were defined as individuals negative for SARS-CoV-2 by PCR. Where available, clinical records were assessed thoroughly for preexisting medical conditions and medications and progression of the disease as well as COVID-19-related symptoms before death, with a special focus on neurological symptoms including alterations in olfaction and taste.

SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2-specific PCR including subgenomic RNA assessment. For PCR-based assessment of SARS-CoV-2 RNA, unfixed and, where possible, non-cryopreserved (i.e., native) tissue samples were used. RNA was purified from ~50 mg of homogenized tissue obtained from all organs by using the MagNA Pure 96 system and the MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume kit (Roche) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time PCR for SARS-CoV-2 was performed on RNA extracts with RT-qPCR targeting the SARS-CoV-2 *E* gene. Quantification of viral RNA was performed using photometrically quantified *in vitro* RNA transcripts as described previously⁴⁶. Total DNA was measured in all extracts by using the Qubit dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific). The RT-qPCR analysis was replicated at least once for each sample.

Detection of sgRNA, as a correlate of active virus replication in the tested tissue, was performed by using oligonucleotides targeting the leader transcriptional regulatory sequence and a region within the sgRNA encoding the SARS-CoV-2 *E* gene, as described previously⁴⁷.

Histological and immunohistochemical techniques. FFPE tissue blocks were taken at the day of autopsy when the postmortem interval was shorter than 24 h and fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde. Otherwise, brain tissue was fixed for 14 d in 4% paraformaldehyde before cutting. Routine histological staining (H&E, Masson-Goldner, periodic acid-Schiff (PAS) reaction and toluidine blue) was performed according to standard procedures. Immunohistochemical staining was performed either on a Benchmark XT autostainer (Ventana Medical Systems) with standard antigen retrieval methods (CC1 buffer, pH 8.0, Ventana Medical Systems) or manually using 1- μ m- or 4- μ m-thick FFPE tissue sections. The following primary antibodies were used: polyclonal rabbit anti-S100 (Dako, Z0311; 1:3,000), monoclonal mouse anti-AE1/AE3 (Dako, M3515; 1:200), monoclonal mouse anti-MRP14 (Acris, BM4026B; 1:500, pretreatment protease), monoclonal mouse anti-CD56 (Serotec, ERIC-1; 1:200), mouse monoclonal anti-SARS spike glycoprotein (Abcam, ab272420; 1:100), goat anti-OMP (Wako, 019-22291; 1:1,000), rabbit monoclonal anti- β III tubulin (Abcam, ab215037; 1:2,000), rabbit polyclonal anti-NF200 (Sigma, N4142; 1:100), rabbit polyclonal anti-ACE2 (Proteintech, 21115-1-AP; 1:3,000) and rabbit polyclonal anti-OLIG2 (IBL, 18953; 1:150, pretreatment Tris-EDTA + microwave). Briefly, primary antibodies were applied and developed by using either the iVIEW DAB Detection kit (Ventana Medical Systems) and the ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection kit (Ventana Medical Systems) or manual application of biotinylated secondary antibodies (biotinylated donkey anti-sheep-goat (1:200; Amersham, RPN 1025), biotinylated donkey anti-rabbit (1:200), biotinylated sheep anti-mouse (1:200; Amersham, RPN 1001), rabbit immunoglobulin (RPN1004), peroxidase-conjugated avidin and diaminobenzidine (DAB; Sigma, D5637) or 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC). Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in a graded alcohol and xylene series, mounted and coverslipped. Immunohistochemistry sections were evaluated by at least two board-certified neuropathologists with concurrence. To biologically validate all

immunohistological staining, control tissues harboring or lacking the expected antigens were used. Staining patterns were compared to expected results as specified in the Supplementary Information (Supplementary Fig. 1a–d (ACE2), Supplementary Fig. 5e (SARS-CoV S), Supplementary Fig. 6 (NF200, SARS-CoV S) and Supplementary Fig. 3 (S100, OLIG2, HLA-DR, CD56, CD45, AE1/AE3, OMP and Tuj1)).

For immunofluorescence, the protocol was adapted as follows: Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (1:100; Jackson, 111515003) and Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-mouse (1:100; Invitrogen) were used as secondary antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (Invitrogen, D3571), and sections were subsequently mounted on slides with Dako mounting medium (S3023).

SARS-CoV-2 immunohistochemistry and immunofluorescence.

Immunohistochemical staining with mouse monoclonal anti-SARS spike glycoprotein antibodies (clone 3A2, ab272420, Abcam, 1:100) was performed using 1- μ m-thick FFPE tissue sections. Slides were cooked in sodium citrate (pH 6.0; 95–100 °C) for 20 min, followed by enzymatic antigen retrieval with Triton X-100 and hydrogen peroxide for 15 min. Slides were blocked with 10% normal goat serum. Primary antibody (1:100, diluted in ProTaqS Antibody Diluent for IHC (Quartett) with 10% normal goat serum) was applied, and samples were incubated overnight. Then, secondary antibody (Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories), diluted 1:100 in ProTaqS Antibody Diluent for IHC, was applied, and samples were incubated for 2 h. Next, Streptavidin-HRP Reagent (RE7104, Leica Biosystems) and DAB substrate-chromogen (Agilent) were applied according to the manufacturer's instructions. Slides were rinsed, counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted.

Staining signals were compared to those of non-COVID-19 control samples with respect to the staining intensity and staining pattern as specified in the Supplementary Information (Supplementary Fig. 5a–d; SARS-CoV S, Supplementary Table 2).

Image acquisition and processing. For fluorescence microscopy, an Olympus BX63 (DP80 camera) automated fluorescence microscope was used, if not specified otherwise, for confocal images. For confocal microscopy, fluorescence signals were collected with an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope using a $\times 60$ oil-immersion objective. For post-acquisition image processing, the image analysis software Fiji was used⁴⁸. For data handling of whole-slide images, an OME-TIFF workflow was used⁴⁹.

Electron microscopy. Autopsy tissues were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, postfixed with 1% osmium tetroxide in 0.05 M sodium cacodylate, dehydrated using a graded acetone series and then infiltrated and embedded in Renlam resin. Block-contrasting with uranyl acetate and phosphotungstic acid was performed at the dehydration step with 70% acetone. 500-nm semithin sections were cut using an ultramicrotome (UltraCut E, Reichert-Jung) and a Histo Jumbo diamond knife (Diatome), transferred onto glass slides, stretched at 120 °C on a hot plate and stained with toluidine blue at 80 °C. 70-nm ultrathin sections were cut using the same ultramicrotome and an Ultra 35^o diamond knife (Diatome), stretched with xylene vapor, collected onto polyolefin-coated slot grids and then stained with lead citrate. Standard transmission EM was performed using a Zeiss 906 microscope in conjunction with a 2k CCD camera (TRS). Large-scale digitization was performed using a Zeiss Gemini 300 field-emission scanning electron microscope in conjunction with a STEM detector via Atlas 5 software at a pixel size of 4–6 nm. Regions of interest from the large-scale datasets were saved by annotation ('mapped') and then recorded at very high resolution using a pixel size of 0.5–1 nm.

Alternatively, ultrastructural analysis was performed from FFPE tissues. For virus detection, we took 3-mm punch biopsy cylinders from paraffin-embedded tissue. The respective regions were selected on the basis of the SARS-CoV-2 ISH or immunohistochemistry signal. After deparaffinization in xylene, samples were rehydrated and postfixed in 1% formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M HEPES buffer (pH 7.2) for a minimum of 2–4 h at room temperature. Postfixation, block contrasting (tannic acid, uranyl acetate) and embedding in epon resin were performed according to a standard protocol⁵⁰. Ultrathin sections were analyzed using a transmission electron microscope operated at 120 kV (Tecnaï Spirit, Thermo Fisher), and images were recorded using a CCD camera (MegaviewIII, EMSIS).

Cytokine array. To analyze cytokine levels in CSF samples from deceased individuals with COVID-19 and controls (each $n = 4$), a human cytokine array (Bio-technie) was used according to the manufacturer's instructions⁵¹. We analyzed all CSF samples from individuals with COVID-19 accessible at the time of analysis. This assay enables the semi-quantitative measurement of 36 cytokines and related proteins (CCL1, CCL2, MIP-1 α , CCL5, CD40L, C5/C5a, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, G-CSF, GM-CSF, ICAM-1, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-16, IL-17A, IL-17E, IL-18, IL-21, IL-27, IL-32a, MIF, serpin E1, TNF- α , TREM-1). Twelve of these 36 cytokines

were above the detection limit in our samples. Using the software Kodak D1 3.6 (Eastman Kodak), a semiquantitative analysis was performed by determining the background-corrected sum intensity for each region of interest on the membrane. Separate membranes were normalized to each other using the results for the positive controls. We could not perform a statistical test owing to the limited access to sufficient CSF samples. Data represent single data points and the mean, range and 25th and 75th percentiles.

In situ hybridization. For detection of mRNA, the RNAscope 2.5 HD Reagent Kit-BROWN (ACD Europe SRL) was used. Briefly, paraffin sections were freshly cut, dried for 1 h at 60°C and dewaxed before mild unmasking with Target Retrieval buffer and protease. Pretreated sections were hybridized with specific probes to *Ppib* as a positive control and irrelevant probe to *dappβ* as a negative control (both ACD Europe SRL). Virus-specific probe V-ncov2019-S (ACD Europe SRL) was used for samples from individuals with COVID-19 and was accompanied by an additional slide with FFPE lung tissue from an individual with COVID-19 (P15) as a further positive control. After hybridization signal amplification, binding of probes was visualized with DAB. Nuclei were stained with hematoxylin, and sections were coverslipped with Ecomount.

Images were acquired using an AxioImager Z1 microscope (Carl Zeiss MicroImaging).

Statistics and reproducibility. All statistical analyses were performed and all graphs were created in GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). No statistical methods were used to predetermine sample sizes; sample sizes in the current study are similar to those in previous COVID-19 autopsy reports by others^{4,32,38}. We included all individuals with COVID-19 and material that were available as specified in the description of study design. The RT-qPCR analysis was replicated at least once for each positive sample. We did not exclude any data points from the performed analyses. To compute correlation between disease duration and viral load, Spearman nonparametric correlation was used. A two-tailed *P* value was calculated. Values were considered to be significant at *P* < 0.05. Statistical details for each analysis (for example, *n*, *P* and *r* values) are mentioned in each figure legend or in the respective part of the text. Owing to the nature of the investigation, data collection and analyses could not always be done in a blinded fashion. Histological staining, immunohistochemistry, immunofluorescence, ISH and EM results were analyzed independently by various neuropathologists in two distinct neuropathological institutions (Berlin and Göttingen) for each individual, region and specific staining/method. Histological staining, immunohistochemistry, immunofluorescence and ISH analyses were replicated at least once. EM was performed in one individual. The representative micrographs shown were adjusted in brightness and contrast to different degrees (depending on the need resulting from the range of brightness and contrast of the raw images), rotated and cropped in Adobe Photoshop.

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. The three electron microscopy datasets in Supplementary Fig. 2 are available for open access pan-and-zoom analysis at <http://www.nanotomography.org/>.

References

- Corman, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro. Surveill.* **25**, 2000045 (2020).
- Wölfel, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* **581**, 465–469 (2020).
- Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
- Besson, S. et al. Bringing open data to whole slide imaging. *Digit. Pathol.* **2019**, 3–10 (2019).
- Laue, M. Electron microscopy of viruses. *Methods Cell. Biol.* **96**, 1–20 (2010).

Acknowledgements

We are indebted to F. Egelhofer, R. Koll, P. Matylewski, K. Permien, V. Wolf, S. Meier, R. Müller, U. Scheidt, K. Guttek, F. Paap, B. Maruschak and K. Schulz for excellent technical assistance and advice. We thank the Core Facility for Electron Microscopy of the Charité for support in acquisition of the data. We also thank H. Bohnenberger, S. Küffer and the Institute of Pathology of the University Medical Center, Göttingen, for their support. The authors are most grateful to the individuals with COVID-19 and their relatives for consenting to autopsy and subsequent research, which were facilitated by the Biobank of the Department of Neuropathology, Charité-Universitätsmedizin Berlin. Cartoon images were partially created with Biorender.com. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy EXC-2049-390688087, as well as SFB TRR 167 and HE 3130/6-1 to F.L.H., SFB 958/Z02 to J.S., SFB TRR 130 TP17 to H.R., EXC 2067/1-390729940, SFB TRR 274 and STA 1389/5-1 to C.S. and SFB TRR 241 to B.S. and A.A.K., by the German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) Berlin, by the European Union (PHAGO, 115976; Innovative Medicines Initiative-2; FP7-PEOPLE-2012-ITN: NeuroKine) and by the Ministry for Science and Education of Lower Saxony through the program 'Niedersächsisches Vorab' to J.F. Furthermore, we thank the Charité Foundation (Max Rubner Preis 2016) for financial support to C. Dittmayer.

Author contributions

J.M., J.R., R.M., J.F., C.T., O.H., M.W., L.R., H.M., W.J.S.-S., C.S., S.H., M.S.W., B.T., F.S., P.K., M.L., A.A.K., T.A., S.G., E.S., D.R., A.N., B.S., R.L.C., C.C., R.E., S.E., D.H., L.O., M.T., B.I.-H., H.R. and F.L.H. performed clinical workup and section and/or histological analyses. C. Dittmayer, H.-H.G., H.R.G., M.L. and W.S. performed ultrastructural analyses. J.S., S.B., C. Drosten and V.M.C. carried out viral RT-qPCR analyses. All authors contributed to the experiments and analyzed data. H.R. and F.L.H. designed and supervised the study. J.M., J.R., H.R. and C. Dittmayer prepared the figures. All authors wrote, revised and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.L.H.

Peer review information *Nature Neuroscience* thanks Roxana Carare and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

1. **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 RL, Conrad C, Eils R, Stenzel W, Windgassen M, Rößler L, Goebel HH, Gelderblom HR, Martin H, Nitsche A, Schulz-Schaeffer WJ, Hakrrouch S, Winkler MS, Tampe B, Scheibe F, Körtvélyessy P, Reinhold D, Siegmund B, Kühl AA, Elezkurtaj S, Horst D, Oesterhelweg L, Tsokos M, Ingold-Heppner B, Stadelmann C, Drosten C, Corman VM, Radbruch H, Heppner FL. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci.* 2021 Feb;24(2):168-175. doi: 10.1038/s41593-020-00758-5. Epub 2020 Nov 30. PMID: 33257876. * shared authorship (Impact Factor 2020; 24,884)
2. Ihlow J, Seelhoff A, Corman VM, Gruber AD, Dökel S, **Meinhardt J**, Radbruch H, Späth-Schwalbe E, Elezkurtaj S, Horst D, Herbst H. COVID-19: a fatal case of acute liver failure associated with SARS-CoV-2 infection in pre-existing liver cirrhosis. *BMC Infect Dis.* 2021 Sep 3;21(1):901. doi: 10.1186/s12879-021-06605-7. PMID: 34479499. (Impact Factor 2020; 3,090)
3. Lehmann M, Allers K, Heldt C, **Meinhardt J**, Schmidt F, Rodriguez-Sillke Y, Kunkel D, Schumann M, Böttcher C, Stahl-Hennig C, Elezkurtaj S, Bojarski C, Radbruch H, Corman VM, Schneider T, Loddenkemper C, Moos V, Weidinger C, Kühl AA, Siegmund B. Human small intestinal infection by SARS-CoV-2 is characterized by a mucosal infiltration with activated CD8 + T cells. *Mucosal Immunol.* 2021 Aug 21:1-12. doi: 10.1038/s41385-021-00437-z. Online ahead of print. PMID: 34420043. (Impact Factor 2020; 7,313)
4. Aschman T, Schneider J, Greuel S, **Meinhardt J**, Streit S, Goebel HH, Büttnerova I, Elezkurtaj S, Scheibe F, Radke J, Meisel C, Drosten C, Radbruch H, Heppner FL, Corman VM, Stenzel W. Association Between SARS-CoV-2 Infection and Immune-Mediated Myopathy in Patients Who Have Died. *JAMA Neurol.* 2021 Aug 1;78(8):948-960. doi: 10.1001/jamaneurol.2021.2004. PMID: 34115106.
5. Greuel S, Ihlow J, Dragomir MP, Streit S, Corman VM, Haberbosch L, Winkler D, **Meinhardt J**, Aschman T, Schneider J, Trotsyuk I, Kunze CA, Maurer L, Radbruch H, Heppner FL, Horst D, Elezkurtaj S. COVID-19: Autopsy findings in six patients between

26 and 46 years of age. *Int J Infect Dis.* 2021 Jul;108:274-281. doi: 10.1016/j.ijid.2021.05.069. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34089883.

(Impact Factor 2020; 3,623)

6. Ochs M, Timm S, Elezkurtaj S, Horst D, **Meinhardt J**, Heppner FL, Weber-Carstens S, Hocke AC, Witzernath M. Collapse induration of alveoli is an ultrastructural finding in a COVID-19 patient. *Eur Respir J.* 2021 May 6;57(5):2004165. doi: 10.1183/13993003.04165-2020. Print 2021 May. PMID: 33446606.

(Impact Factor 2020; 16,671)

7. Ihlow J, Michaelis E, Greuel S, Heynol V, Lehmann A, Radbruch H, **Meinhardt J**, Miller F, Herbst H, Corman VM, Westermann J, Bullinger L, Horst D, von Brünneck AC, Elezkurtaj S. B cell depletion and signs of sepsis-acquired immunodeficiency in bone marrow and spleen of COVID-19 deceased. *Int J Infect Dis.* 2021 Feb;103:628-635. doi: 10.1016/j.ijid.2020.12.078. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33401036.

(Impact Factor 2020; 3,623)

8. Dittmayer C, **Meinhardt J**, Radbruch H, Radke J, Heppner BI, Heppner FL, Stenzel W, Holland G, Laue M. Why misinterpretation of electron micrographs in SARS-CoV-2-infected tissue goes viral. *Lancet.* 2020 Oct 31;396(10260):e64-e65. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32079-1. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33031763.

(Impact Factor 2020; 79,321)

9. Dittmayer C, **Meinhardt J**, Radbruch H, Radke J, Heppner BI, Heppner FL, Stenzel W, Holland G, Laue M. Using EM data to understand COVID-19 pathophysiology - Authors' reply. *Lancet.* 2021 Jan 16;397(10270):197-198. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00032-5. PMID: 33453781.

(Impact Factor 2020; 79,321)

10. Knoche, T., Hain, E.G., **Meinhardt, J.**, Euskirchen, P., Kowski, A.B. 56-jährige Patientin mit rasch progredientem, atraumatischem Konus-Kauda-Syndrom. *DGNeurologie* 4, 393–396 (2021).

11. von Stillfried S, Bülow RD, Röhrig R, Boor P; German Registry of COVID-19 Autopsies (DeRegCOVID), DeRegCOVID Collaborators. First report from the German COVID-19 autopsy registry. *Lancet Reg Health Eur.* 2022 Feb 18;15:100330. doi: 10.1016/j.lanpe.2022.100330. PMID: 35531493; PMCID: PMC9073019.

12. Krasemann S, Dittmayer C, von Stillfried S, **Meinhardt J**, Heinrich F, Hartmann K, Pfefferle S, Thies E, von Manitius R, Aschman TAD, Radke J, Osterloh A, Schmid S, Buhl EM, Ihlow J, Dubois F, Arnhold V, Elezkurtaj S, Horst D, Hocke A, Timm S, Bachmann S, Corman V, Goebel HH, Matschke J, Stanelle-Bertram S, Gabriel G, Seilhean D, Adle-Biassette H, Ondruschka B, Ochs M, Stenzel W, Heppner FL, Boor P, Radbruch H, Laue M, Glatzel M. Assessing and improving the validity of COVID-19 autopsy studies - A multicentre approach to establish essential standards for immunohistochemical and ultrastructural analyses. *EBioMedicine*. 2022 Sep;83:104193. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104193. Epub 2022 Aug 2. PMID: 35930888; PMCID: PMC9344879.
(Impact Factor 2022; 11,205)
13. Ehret F, Hansch A, **Meinhardt J**, Hain EG, Misch M, Onken J, Roohani S, Koch A, Schweizer L, Radke J, Kaul D. Loss of IDH mutation or secondary tumour manifestation? Evolution of an IDH-mutant and 1p/19q-codeleted oligodendroglioma after 15 years of continuous temozolomide treatment and radiotherapy: A case report. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2023 Feb;49(1):e12859. doi: 10.1111/nan.12859. Epub 2022 Dec 14. PMID: 36332636.
(Impact Factor 2022; 6,25)
14. Mothes R, Pascual-Reguant A, Koehler R, Liebeskind J, Liebheit A, Bauherr S, Philipsen L, Dittmayer C, Laue M, von Manitius R, Elezkurtaj S, Durek P, Heinrich F, Heinz GA, Guerra GM, Obermayer B, **Meinhardt J**, Ihlow J, Radke J, Heppner FL, Enghard P, Stockmann H, Aschman T, Schneider J, Corman VM, Sander LE, Mashreghi MF, Conrad T, Hocke AC, Niesner RA, Radbruch H, Hauser AE. Distinct tissue niches direct lung immunopathology via CCL18 and CCL21 in severe COVID-19. *Nat Commun*. 2023 Feb 11;14(1):791. doi: 10.1038/s41467-023-36333-2. PMID: 36774347; PMCID: PMC9922044.
(Impact Factor 2021; 17,690)

Abstract (Posterpräsentation)

1. European Congress of Neuropathology (EURO-CNS, 2021)

Olfactory transmucosal SARS-CoV2 invasion as port of central nervous system entry in COVID-19.

Jenny Meinhardt, Josefine Radke, Carsten Dittmayer, Jonas Franz, Carolina Thomas, Simon Streit, Tom D. Aschman, Ronja Mothes, Hubert Martin, Werner Stenzel, Hans-Hilmar Goebel, Michael Laue, Walter J. Schulz-Schaeffer, Sefer Elezkurtaj, Julia Schneider, Victor Max Corman, Christine Stadelmann, Helena Radbruch, Frank L. Heppner

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich in erster Linie Prof. Dr. Frank Heppner von Herzen meinen Dank aussprechen, der den gesamten Prozess dieser Arbeit sehr eng betreute, förderte und mir stets mit seiner fachlichen Expertise und Erfahrung zur Seite stand.

Meine tiefe Dankbarkeit gilt Dr. Helena Radbruch – Sie hat mich an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt und mich durch ihre ansteckende Begeisterung vorangetrieben und motiviert. Ich danke ihr für die stetige Förderung – auch über diese Arbeit hinaus – sowie ihre unendliche Hilfsbereitschaft und Fürsorglichkeit. Danke für all' die Pizzen, selbst um Mitternacht.

Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. Josefine Radke und Dr. Carsten Dittmayer für die produktiven Gespräche, Diskussionen und angenehme Zusammenarbeit. Gemeinsam mit Josefine habe ich meine ersten immunhistochemischen Färbungen angefertigt – für ihre Bereitschaft ihr Wissen jederzeit zu teilen danke ich ihr.

Weiterhin danke ich allen Kolleginnen und Kollegen in unserem Institut für Neuropathologie – insbesondere auch den Mitarbeiterinnen in unserem Labor, sowie allen Kollaborationspartnern, die diese Arbeit durch ihre Ideen bereicherten.

Im Besonderen danke ich meiner Freundin Sarah für ihre Ausgeglichenheit, Geduld und Unterstützung zu jeder Zeit.