

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jörg Timm

Die humorale Immunantwort zu SARS-CoV-2 und vier saisonalen
Coronaviren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Denise Rabl

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ingo Drexler

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Adams O, Andrée M, Rabl D, Ostermann PN, Schaal H, Lehner E, Ackerstaff S, Müller L, Fischer JC. Humoral response to SARS-CoV-2 and seasonal coronaviruses in COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*. 2022; 94(3): 1096-1103.

I. Zusammenfassung

Ende Dezember 2019 wurden in Wuhan, China, die ersten Fälle der später so genannten Erkrankung *coronavirus disease 19* (COVID-19), verursacht durch das neuartige Coronavirus *severe acute respiratory distress syndrome 2* (SARS-CoV-2), gemeldet. Neben SARS-CoV-2 sind bis dato sechs weitere humanpathogene Coronaviren bekannt, von denen vier als saisonal bezeichnet werden, da sie endemisch zirkulieren. Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche direkte oder indirekte Korrelation zwischen der humoralen Immunantwort auf SARS-CoV-2 und den vier saisonalen Coronaviren nachzuweisen. Dazu wurde ein spezifisches zweistufiges Anti-Coronavirus-N-Protein GST capture ELISA Protokoll verwendet. Hierbei wurde die Prävalenz und die Höhe der Antikörperreaktionen auf das N-Protein des Coronavirus SARS-CoV-2 sowie vier weiterer saisonaler Coronaviren (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-229E und HCoV-NL63) in einer Kohorte von 115 rekonvaleszenten Plasmaspendern, die mit SARS-CoV-2 infiziert waren (1 - 61 Tage nach Auftreten der Symptome), gemessen. Im Vergleich dazu wurden die Antikörperspiegel von 114 Personen ohne Hinweis auf eine kürzlich erfolgte Infektion mit SARS-CoV-2 ebenfalls ermittelt. Bei zehn Personen aus der COVID-Gruppe wurde der Verlauf der Antikörperspiegel über die Zeit ausgewertet. Bei der humoralen Reaktion auf die saisonalen Coronaviren, zeigten in der COVID-Gruppe nur die Testungen auf HCoV-HKU1 und HCoV-229E leicht erhöhte Antikörperspiegel, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während in der COVID-Gruppe die Werte der SARS-CoV-2-Antikörper signifikant mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierten, wurde bei den Antikörperspiegeln der saisonalen Coronaviren kein Zusammenhang festgestellt. Über die Zeit konnte ein Rückgang der Antikörperspiegel aller getesteten Coronaviren festgestellt werden. Das auffälligste Ergebnis in beiden Gruppen war, dass die Antikörperspiegel gegen alle getesteten Coronaviren eine hochsignifikante Korrelation zueinander aufwiesen. Es scheint eine individuelle Prädisposition für eine schwächere oder stärkere humorale Immunantwort gegen die saisonalen humanen Coronaviren sowie das neue SARS-CoV-2 zu geben, was auf eine Unterscheidung von *Low-* und *High-Respondern* gegen humane Coronaviren (HCoV) schließen ließe. Dies könnte sich möglicherweise auf die Bewertung der Antikörperspiegel und des Schutzes nach einer Infektion auswirken.

II. Zusammenfassung (Englisch)

In late December 2019, the first cases of coronavirus-disease-19 (COVID-19) caused by the novel coronavirus severe acute respiratory distress syndrome 2 (SARS-CoV-2) were reported in Wuhan, China. In addition to SARS-CoV-2, six other human pathogen coronaviruses have been reported so far, four of which are considered seasonal, as they circulate endemically. The aim of this work was to demonstrate a possible direct or indirect correlation between the humoral immune response against SARS-CoV-2 and these four seasonal coronaviruses. We used a specific Anti-Coronavirus-N-protein GST capture ELISA protocol to determine the prevalence and level of antibody responses to the nucleocapsid (N) protein of coronavirus SARS-CoV-2 and the four seasonal human coronaviruses (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-229E, and HCoV-NL63) in a cohort of 115 convalescent plasma donors infected with SARS-CoV-2 (1 - 61 days after symptom onset) compared with antibody levels from 114 individuals without evidence of recent infection with SARS-CoV-2. The course of antibody levels of ten individuals of the COVID group over time was also evaluated separately. The humoral response to the four seasonal coronaviruses, showed slightly increased antibody levels in the COVID group for HCoV-HKU1 and HCoV-229E, compared with the control group. While SARS-CoV-2 antibody levels significantly correlated with disease severity in the COVID group, no correlation was observed for seasonal coronavirus antibody levels. Over time, a decrease in antibody levels of all coronaviruses tested was recorded. The most striking finding in both groups was that antibody levels to all five coronaviruses, including the new SARS-CoV-2, showed a highly significant correlation with each other. There appears to be an individual predisposition to a weaker or stronger humoral immune response to all known seasonal human coronaviruses as well as the new SARS-CoV-2, which could lead to a definition of low- and high-responders to human coronaviruses. This could potentially impact the assessment of antibody levels and protection post-infection.

III. Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

ACE2	Human Angiotensin Converting Enzyme 2
ADE	Antibody-dependent enhancement
APN	Aminopeptidase N
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
BSA	Bovine Serum Albumin
Bzw.	beziehungsweise
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CTD	C-terminale Domäne
DMV	Doppelmembran Vesikel
DPBS	Dulbecco's Phosphate-buffered saline
E	Envelope Protein
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GST	Glutathion-S-Transferase
HCoV	Humane Coronaviren
HCoV-HKU1	Humanes Coronavirus HKU1
HCoV-NL63	Humanes Coronavirus NL63
HCoV-OC43	Humanes Coronavirus OC43
HCoV-229E	Humanes Coronavirus 229E
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JCV	John Cunningham Virus
M	Membran Protein
MBP	Maltose-Bindeprotein
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome coronavirus

MgCl ₂	Magnesium Chlorid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N	Nukleokapsid Protein
NEM	N-Ethylmaleinimid
N-terminal	Aminosäure-terminal
nsp	Nichtstrukturprotein
NTD	N-terminale Domäne
ORF	Offener Leserahmen (Open reading frame)
PBS	Phosphate-buffered saline
POC	Point-of-Care
RDT	Rapid Diagnostic Test
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S	Spike Protein
SARS	Severe acute respiratory syndrome
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
Sulfo-SMPB	Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl] butyrate
TBE	Tris-Borate-EDTA
TMPRSS2	Transmembrane Serinprotease 2
UTR	Untranslatierte Region
WHO	World Health Organization

Einheiten

AU	Arbitrary Units
AU/ ml	Arbitrary Units/ Milliliter
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Cat.	Kategorie
g	Gramm
kb	Kilobase
l	Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
No.	Number
OD	Optische Dichte
pH	$-\log[\text{H}^+]$
rpm	Revolutions per minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

IV. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Humane Coronaviren	1
1.1.1. Einteilung der humanen Coronaviren	1
1.1.2. Transmission der humanen Coronaviren	2
1.1.3. Das Genom humaner Coronaviren	3
1.1.4. Struktur humaner Coronaviren	4
1.1.5. Strukturproteine humaner Coronaviren	5
1.1.6. Replikationszyklus humaner Coronaviren	7
1.2. Saisonale Coronaviren	10
1.3. SARS-CoV und MERS-CoV	11
1.4. SARS-CoV-2	12
1.5. SARS-CoV-2 als COVID-19 Erkrankung	13
1.5.1. Transmission von SARS-CoV-2	13
1.5.2. Krankheitsverlauf	14
1.5.3. Klinische Diagnostik	15
1.5.4. Prävention und Therapie	16
1.6. Humorale Immunantwort	17
1.6.1. Antikörperproduktion	17
1.6.2. Zeitlicher Verlauf der Antikörperproduktion bei Coronaviren	18
1.6.3. Serologische Diagnostik	19
1.7. Ziele der Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Arbeitsplatzübergreifendes Material	22
2.1.2. Enzyme	23
2.1.3. Antikörper	23
2.1.4. Kits	23
2.1.5. In-Vitro Diagnostikum	23
2.1.6. Software	24
2.1.7. Geräte	24
2.1.8. Chemikalien, Medien und Lösungen	25
2.1.9. Escherichia coli Stamm	25
2.1.10. Oligonukleotid-Klone	25
2.1.11. Rekombinante Plasmide	26
2.2. Methoden	26
2.2.1. Isolierung der DNA	27
2.2.2. Restriktion und Ligation des Plasmids	27
2.2.3. Klonierung durch Transformation kompetenter E. coli Bakterienstämme mit Plasmid-DNA	29
2.2.4. Präparative Plasmid-Isolierung („Maxi-Präp“)	30
2.2.5. IPTG-Induktion von chemisch kompetenten E. coli für die Antigengewinnung	31
2.2.6. Bradford Proteinbestimmung	32
2.2.7. Antigenbindung über Glutathion-Casein	34

2.2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	35
2.2.9. Masern-Antikörper-Bestimmung	40
2.2.10. Studienpopulation	40
2.3. Studiendesign.....	42
2.3.1. Ethikvotum	42
2.3.2. Testung der Proben	42
2.4. Statistische Auswertung	42
3. Ergebnisse	44
3.1. SARS-CoV-2-Antikörperspiegel der SARS-CoV-2 positiven rekonvaleszenten Patienten und der Kontrollgruppe.....	44
3.2. Antikörper-Bestimmung der saisonalen Coronaviren bei den SARS-CoV-2 positiven rekonvaleszenten Patienten und der Kontrollgruppe	46
3.3. Korrelation der Antikörpertiter und des Krankheitsverlaufs	46
3.4. Analyse der Korrelation aller Antikörperspiegel der SARS-CoV-2 positiven rekonvaleszenten Patienten und der Kontrollgruppe	47
3.5. Zeitlicher Verlauf der Antikörperkonzentration	50
4. Diskussion	54
4.1. Antikörpertiter und Schweregrad der COVID-19 Erkrankung	54
4.1.1. SARS-CoV-2 Antikörper und Schweregrad der COVID-19 Erkrankung....	54
4.1.2. Einfluss einer vorangegangenen Infektion mit saisonalen Coronaviren auf eine SARS-CoV-2 Infektion.....	55
4.2. Antikörpertiter im zeitlichen Verlauf.....	57
4.3. Humorale Immunantwort und Immunität	58
4.4. Schlussfolgerungen.....	61
5. Literatur- und Quellenverzeichnis	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammbaum und Einteilung der Coronaviren	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des SARS-CoV-2 Genoms	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Genoms von SARS-CoV-2 und des Nukleokapsid Proteins	7
Abbildung 4: Darstellung des zeitlichen Verlaufs des SARS-CoV-2 Ausbruchs	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufs bei einer COVID-19 Infektion über die Zeit.....	15
Abbildung 6: pGEX-Plasmid	26
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Anticoronavirus-N-Protein GST capture ELISA	38
Abbildung 8: Antikörperspiegel für SARS-CoV-2 und saisonale Coronaviren in der SARS-CoV-2- und der Kontrollgruppe	45
Abbildung 9: Antikörperspiegel bei Rekonvaleszenten mit SARS-CoV-2 in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung.....	47
Abbildung 10: Korrelation der Antikörper gegen SARS-CoV-2 und HCoV-HKU1 in der COVID-Gruppe (AU/ ml)	49
Abbildung 11: Korrelation der Antikörper gegen HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 in der COVID-Gruppe (AU/ ml).	50
Abbildung 12: Korrelation der Antikörper gegen HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 in der Kontrollgruppe (AU/ ml).	50
Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Antikörperspiegel in AU/ ml gegen SARS-CoV- 2 und saisonale Coronaviren bei zehn COVID-19 Patienten.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht wichtiger Eigenschaften der unterschiedlichen HCoV's	10
Tabelle 2: Restriktionsansatz 1	28
Tabelle 3: Restriktionsansatz 2	29
Tabelle 4: Ligationsansatz	29
Tabelle 5: Zusammensetzung der Proteinstandards	33
Tabelle 6: Pipettierschema Bradford Proteinbestimmung.....	33
Tabelle 7: Übersicht der Plasmide, der rekombinanten Proteine und ihre Proteinkonzentrationen ($\mu\text{g Protein/ ml}$)	34
Tabelle 8: Pipettierschema Vorverdünnungsplatte	38
Tabelle 9: Pipettierschema der ELISA-Platte Nr. 1 - Hinzufügen von Casein- Blockierungspuffer und der Standards.....	39
Tabelle 10: Pipettierschema der ELISA-Platte Nr. 1 - Hinzufügen der Vorverdünnung	39
Tabelle 11: Pipettierschema mit den Endkonzentrationen.....	40
Tabelle 12: Charakteristika der Studienpopulation und der Blutproben.....	41
Tabelle 13: Korrelation der unterschiedlichen humanen Coronaviren in der COVID-Gruppe [Korrelationskoeffizient nach Pearson (p-Wert)]	48
Tabelle 14: Korrelation der unterschiedlichen humanen Coronaviren in der Kontrollgruppe [Korrelationskoeffizient nach Pearson (p-Wert)]	49

1. Einleitung

1.1. Humane Coronaviren

Der erste Bericht einer Infektion mit Coronaviren stammt aus dem Jahr 1965 und wurde von Tyrrell and Bynoe veröffentlicht [1]. Coronaviren sind dem Menschen bereits seit längerem als Auslöser von meist oberer und unterer Atemwegsinfektionen mit im Regelfall milden selbstlimitierenden Krankheitsverläufen bekannt. Vermehrt bei Neugeborenen, Kleinkindern, älteren und immunsupprimierten Patienten können schwere Krankheitsverläufe auftreten. Seit Beginn des 21. Jahrhunderts haben sie sich aber zu einer zunehmenden Bedrohung für die öffentliche Gesundheit entwickelt. 2002 kam es erstmals zu der Übertragung von *severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV) auf den Menschen und zum Ausbruch einer Endemie mit dem Auftreten des *severe acute respiratory syndrom* (SARS), welches ursächlich für die Namensgebung des Erregers ist. Darauf folgte im Jahr 2012 im arabischen Raum ein weiteres neuartiges Coronavirus, *Middle East respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV), welches rund 1.800 Menschen infizierte [2]. Ende 2019 wurden mit dem vermehrten Auftreten von Pneumonien ohne bekannte Ätiologie die ersten Infektionen mit dem *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) beim Menschen bekannt. Am 11. März 2020 wurde die Erkrankung *coronavirus disease 19* (COVID-19), ausgelöst durch SARS-CoV-2, durch die World Health Organisation (WHO) als globale Pandemie, welche die Gesundheit, die Wirtschaft und im Allgemeinen die globalisierte Welt bedroht, definiert. Der Name ist auf die enge Verwandtschaft zu SARS-CoV zurückzuführen [2].

1.1.1. Einteilung der humanen Coronaviren

Coronaviren sind die größte Gruppe von Viren, die zur Ordnung der Nidovirales gehören und die Familien Coronaviridae, Arterviridae, Mesonviridae und Roniviridae umfassen. Die Coronavirinae bilden eine von zwei Unterfamilien der Coronaviridae-Familie, wobei die anderen die Torovirinae sind. Die kronenartige Anordnung der Spike Proteine (S-Proteine) an der Virusoberfläche verleihen dem Coronavirus seinen Namen. Die Subgruppen der Coronavirus-Familie, wie in Abbildung 1 dargestellt, werden in das Alpha- (α), Beta- (β), Gamma- (γ) und Delta- (δ) Coronavirus eingeteilt. Während die Viren ursprünglich auf Grundlage der

Serologie in diese Gattungen eingeteilt wurden, findet die Zuordnung heutzutage anhand von phylogenetischen Eigenschaften statt. Alle Viren der Ordnung Nidovirales sind umhüllte Ribonukleinsäure (RNA) (+) Viren [3, 4].

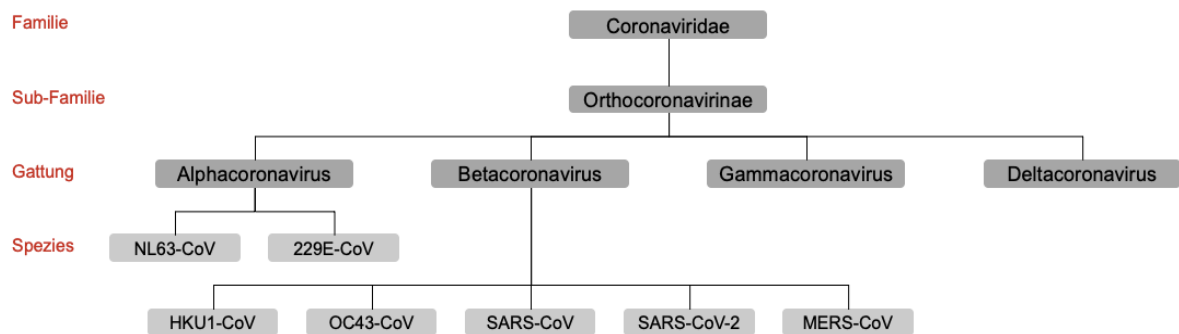


Abbildung 1: Stammbaum und Einteilung der Coronaviren modifiziert nach Kirtipal et al. [5]

Die vier Gattungen der Coronavirinae sind Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren. Die humanpathogenen Viren NL-63 und 229E gehören zu den Alphacoronaviren. Die weiteren humanpathogenen Spezies HKU1-, OC43-, SARS-, SARS-2- und MERS-Coronaviren sind Betacoronaviren.

1.1.2. Transmission der humanen Coronaviren

Aus den vier Subfamilien infizieren explizit Alpha- und Betacoronaviren Säugetiere. Zu den humanen Coronaviren (HCoV), die auf den Menschen übertragen werden können, gehören die beiden Alphacoronaviren HCoV-NL63 und HCoV-229E, sowie die fünf Betacoronaviren HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV und SARS-CoV-2 [2]. Zu einer initialen Transmission von der Tierwelt auf den Menschen kommt es hauptsächlich durch den Verzehr von infizierten Tieren [3]. Für die Transmission von SARS-CoV im Jahr 2002 werden die Rhinolophus-Fledermäuse, bei welchen entsprechende Antikörper nachgewiesen werden konnten, verantwortlich gemacht [6]. Anders als bei SARS-CoV, vermutete man bei dem erstmals 2012 in Saudi-Arabien aufgetretenen Erreger MERS-CoV zunächst, dass Kamele die zoologischen Überträger seien. In weiterer Folge konnten jedoch bei Pipistrellius- und Perimyotis-Fledermäusen MERS-CoV-Antikörper isoliert werden, was die Theorie der Übertragung von der Fledermaus auf das Kamel stützt [7]. Auch beim Ausbruch von SARS-CoV-2 in Wuhan wird die Fledermaus als Ursprung der Transmission vermutet. Auf dem Markt von Hunan, welcher der wahrscheinliche Ausgangspunkt der Infektionen ist, werden häufig lebende Tiere, wie unter anderem

Frösche, Schlangen, Vögel, Kaninchen, aber auch Fledermäuse, zum Verzehr angeboten [8].

1.1.3. Das Genom humaner Coronaviren

Coronaviren enthalten ein RNA-Genom von ca. 30 kb. Das Genom humaner Coronaviren besteht aus einem ca. zwei Drittel ausmachenden Abschnitt, der für Nichtstrukturproteine (nsp) kodiert, und einem weiteren Abschnitt, der für strukturelle und akzessorische Proteine kodiert. Der 5'-Terminus des Genoms enthält die Leitsequenz und untranslatierte Regionen (UTR), die bei der RNA-Replikation und -Transkription erforderlich sind. Außerdem befinden sich am Anfang jedes Struktur- und akzessorischen Gens transkriptionelle regulatorische Sequenzen, die für die Expression jedes dieser Gene erforderlich sind. Die Gene am 3'-Terminus kodieren Proteine, welche für die Replikation und Synthese viraler RNA benötigt werden. Die Struktur des Coronavirus-Genoms ist wie folgt: 5'-führende-UTR-Replikase, offener Leserahmen 1a und 1ab (ORF1a, ORF1ab), Spike- (S), Envelope- (E), Membran- (M) und Nukleokapsid- (N) 3' UTR-poly (A) Schwanz. Diese Gliederung haben alle Coronaviren gemeinsam und ist in der Abbildung 2 grafisch dargestellt [2, 4]. ORF1a und ORF1b werden während der Translation in die Polyproteine 1a und 1ab umgewandelt und im späteren Verlauf in eine Vielzahl von nsps gespalten. Nsp 1-16 bilden den *replication and transcription complex* und sind maßgeblich an der Virusreplikation und -transkription beteiligt. Die Transmembranproteine nsp3, nsp4 und nsp6 nutzen die Membran des endoplasmatischen Retikulums des Wirts und ordnen sie neu an, um dann die Bildung von Doppelmembran Vesikeln (DMV) zu induzieren. Als organellenähnliche Struktur ist der DMV nicht nur für die Virusreplikation von Vorteil, sondern hilft auch dabei, die angeborene Immunantwort des Wirts zu umgehen. Unter diesen nsps gibt es drei Transmembranproteine, welche aus mehreren Transmembran- und Luminaldomänen bestehen und eine recht aufwendige Struktur aufweisen. Nsp11 ist ein kurzes Peptid, das aus lediglich sieben Aminosäuren besteht. Der konkrete Aufbau von nsp4 und nsp6 ist bis dato noch nicht endgültig geklärt [9].

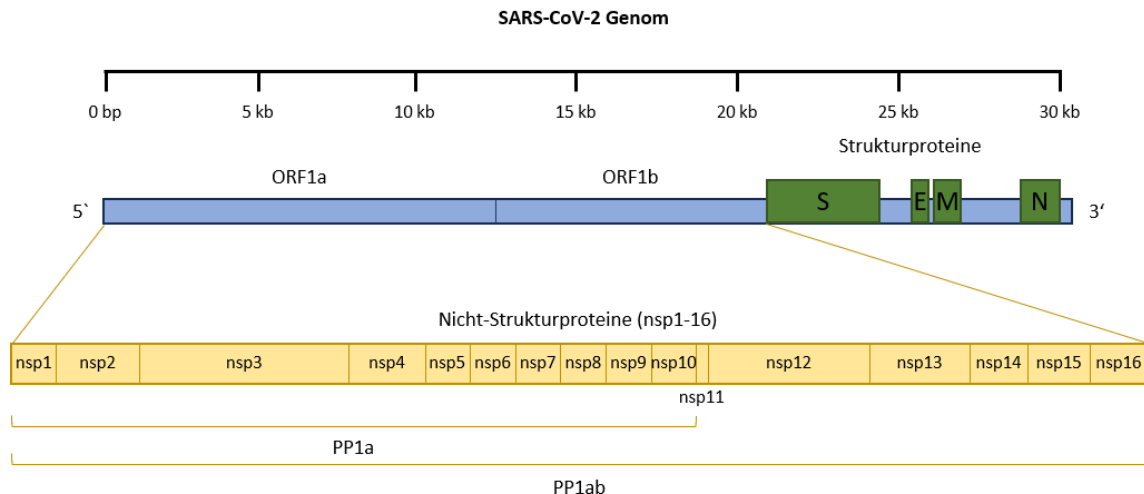


Abbildung 2: Schematische Darstellung des SARS-CoV-2 Genoms nach Raskin, S. [10]

Das Genom von SARS-CoV-2 besteht aus 30 kb. Ein Abschnitt dieses Genoms kodiert für die Nichtstrukturproteine (nsp 1-16), welche aus zwei offener Leserahmen ORF1a und ORF1b und den Strukturproteinen gebildet werden. ORF1a und ORF1b werden während der Translation in die Polyproteine PP1a und PP1ab umgewandelt. Diese werden im weiteren Verlauf in eine Vielzahl von nsps gespalten und sind endgültig für die Virusreplikation und -transkription notwendig. Die Strukturproteine setzen sich zusammen aus dem Spike (S), Envelope (E), Membran (M) und Nukleokapsid Protein (N).

Die hohe Plastizität des Genoms der Coronaviren macht diese Viren zu Erregern mit einem hohen Evolutionspotenzial. Die beiden wichtigsten Evolutionsmechanismen der Coronaviren sind die Mutation und die Rekombination [11].

1.1.4. Struktur humaner Coronaviren

Coronavirus-Virionen haben eine sphärische oder pleomorphe Form und weisen einen Durchmesser von etwa 125 nm auf, wie Studien mittels Kryo-Elektronentomographie und Kryo-Elektronenmikroskopie zeigen [12]. Besonders heben sich Coronaviren aufgrund ihrer keulenförmigen Spike-Projektionen, die von der Oberfläche des Virions ausgehen, hervor. Diese Stacheln sind charakteristisch und haben die Namensgebung des Coronavirus maßgeblich beeinflusst. In der Hülle des Virions befindet sich das Nukleokapsid, welches anders als bei den meisten positiv-strängigen RNA-Viren, schraubenförmig und symmetrisch angeordnet ist [4].

1.1.5. Strukturproteine humaner Coronaviren

Es gibt vier Hauptstrukturproteine, welche das S-Protein, das Membran Protein (M), das Envelope Protein (E) und das Nukleokapsid Protein (N) sind, die alle am 3'-Ende des viralen Genoms kodiert werden, wie in Abbildung 2 dargestellt [4].

Das S-Protein bildet Homotrimere, welche für die charakteristische Spike-Struktur verantwortlich sind. Bei den meisten Coronaviren wird es durch Proteasen der Wirtszelle, hauptsächlich Furin und Transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2), in zwei separate Polypeptide, S1 und S2 gespalten. S1 bildet die große rezeptorbindende Domäne des S-Proteins und S2 den Stiel des Spike-Moleküls [13]. Darüber hinaus stellt es den wichtigsten Ansatzpunkt der zellulären und der humoralen Immunantwort dar und induziert die Bildung von neutralisierenden Antikörpern. Wie die meisten Oberflächenproteine weist auch das S-Protein hypervariable Regionen auf, die es ihm ermöglichen, sich dem Immundruck zu entziehen und gegebenenfalls seinen zellulären Tropismus zu erweitern [14]. Im Laufe der Pandemie haben sich fünf weltweit anerkannte Varianten des Virus entwickelt (Alpha, Beta, Gamma, Delta und Omikron) sowie mehrere Varianten von Interesse (Epsilon, Zeta, Eta, Iota, Theta, Kappa, Lambda und Mu). Die deutliche Mehrzahl der Mutationen im Rahmen der Evolution des Virus befinden sich am S-Protein, welches nach wie vor das Hauptziel vieler der bis dato entwickelten Medikamente gegen SARS-CoV-2 ist. Diese sind beispielsweise neutralisierende monoklonale Antikörper, Impfstoffe und andere Inhibitoren. Insbesondere die rasche Mutation stellt jedoch eine Herausforderung dar [9].

Das M-Protein kommt von allen Strukturproteinen am häufigsten im Virus vor. Es ist klein, besitzt drei transmembrane Domänen und ist der Hauptbestandteil der Virushülle und somit für die Form und die Größe des Virions verantwortlich [15]. Zudem ist das M-Protein an der Verarbeitung, Modifizierung und dem Transport mehrerer viraler Proteine sowie am Zusammenbau und der Freisetzung von Viruspartikeln beteiligt [9]. Das E-Protein liegt nur in geringen Mengen vor. Die bisherigen Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass es sich um ein Transmembranprotein handelt. Es besitzt eine Ionenkanalaktivität und trägt zur Assemblierung und Freisetzung des Virus bei [4, 16].

Das einzige im Nukleokapsid vorhandene Protein ist das N-Protein. Als multifunktionales Protein beteiligt es sich nicht nur an der viralen Replikation und Synthese, sondern greift auch in den Interferonweg des Wirts ein [9]. Es ist ein strukturell heterogenes, 419 Aminosäuren langes, RNA-bindendes Protein. Gebildet wird es aus zwei separaten Domänen, N-terminale Domäne (NTD) und C-terminale Domäne (CTD), welche jeweils in der Lage sind, RNA in vitro zu binden. Verbunden sind CTD und NTD über eine *central linking region*. Diese *central linking region* umfasst eine Seryl/ Arginin-reiche Region, die mutmaßliche Phosphorylierungsstellen enthält. Darüber hinaus gibt es zwei inhärent ungeordnete Regionen auf beiden Seiten der NTD und CTD, die als N-Arm und C-Schwanz bezeichnet werden. Sie sind für die Regulierung der RNA-Bindungsaktivität und Oligomerisierung von NTD und CTD verantwortlich [17]. Der Aufbau ist in der Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Das N-Protein ist eines der am häufigsten vorkommenden Strukturproteine in virusinfizierten Zellen und kann als immundominantes Antigen verwendet werden, um eine schützende Immunantwort auszulösen [9]. Dies macht es zu einem wichtigen Ziel für die Entwicklung von Diagnostika und Impfstoffen. Außerdem hat das N-Protein viel Aufmerksamkeit als potenzieller Angriffspunkt für Arzneimittel auf sich gezogen, da es konservativer und stabiler ist und weniger Mutationen aufweist als die anderen viralen Proteine, wie z. B. das zuvor erläuterte S-Protein. Die Erforschung und Entwicklung von Medikamenten gegen das N-Protein basiert hauptsächlich auf dessen Struktur, Funktion und Lebenszyklus. Da die RNA-Bindungsaktivität des N-Proteins für die virale Ribonukleoproteinbildung und Genomreplikation sehr wichtig ist, hat sich die Entwicklung von Medikamenten, die die RNA-Bindung der NTD oder CTD blockieren, als gute antivirale Strategie erwiesen [17]. Die hier beschriebenen Eigenschaften des N-Proteins machten wir uns auch im Rahmen dieser Arbeit zu Nutzen.

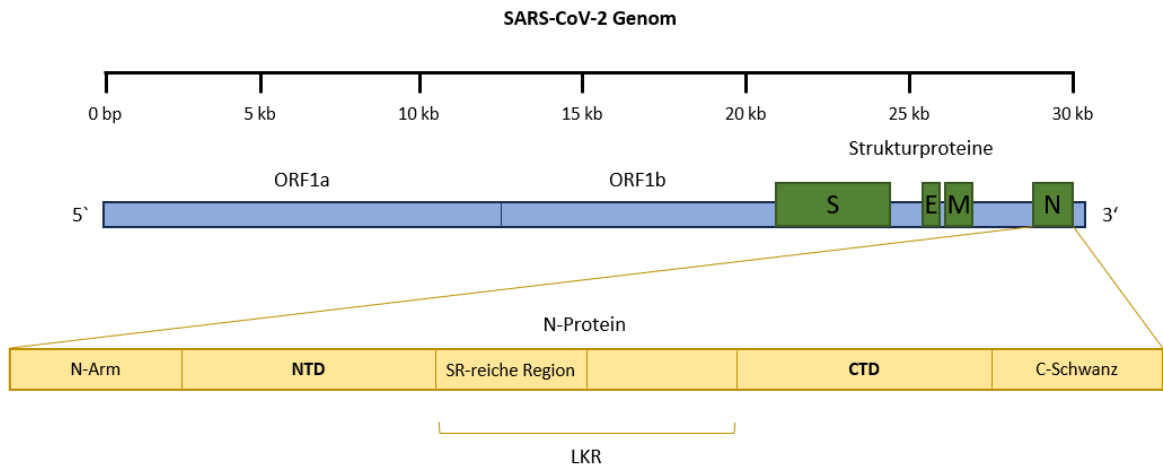


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Genoms von SARS-CoV-2 und des Nukleokapsid Proteins nach Wu, W. [17]

Das Genom von SARS-CoV-2 besteht aus zwei offenen Leserahmen ORF1a und ORF1b und den Strukturproteinen. Diese Strukturproteine setzen sich zusammen aus dem Spike (S), Envelope (E), Membran (M) und Nukleokapsid Protein (N). Das N-Protein hat zwei Domänen, die N-terminale Domäne (NTD) und die C-terminale Domäne (CTD), welche über die *central linking region* (LKR) miteinander verbunden sind. Ein Teil der LKR ist die Seryl/ Arginin-reiche Region (SR-reiche Region). Am 5'-Ende befindet sich der N-Arm und am 3'-Ende der C-Schwanz.

Als fünfte und letzte Struktur ist die Hämagglutinin-Esterase in nur einer der Untergruppen der Betacoronaviren vorhanden [4].

1.1.6. Replikationszyklus humaner Coronaviren

Grundsätzlich werden virale Infektionen durch den Kontakt von viralen Proteinen mit den Rezeptoren der Wirtszelle initiiert. Bei den humanen Coronaviren erfolgt die Anheftung durch eine Wechselwirkung zwischen dem S-Protein und seinem Rezeptor. Die Rezeptorbindungsdomäne innerhalb der S1-Region des Coronavirus-S-Proteins unterscheidet sich hier je nach Virus [18]. Die Interaktion ist die wichtigste Determinante dafür, dass ein Virus die Zelle infizieren kann. Viele Coronaviren verwenden Peptidasen als zellulären Rezeptor. Alphacoronaviren setzen die Aminopeptidase N (APN) als Rezeptor ein, SARS-CoV-2 und HCoV-NL63 nutzen das Human Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) [4].

Der Zugang zum Zytosol der Wirtszelle erfolgt grundsätzlich durch eine säureabhängige proteolytische Spaltung des S-Proteins durch die TMPRSS2,

gefolgt von einer Fusion der viralen und zellulären Membran [4]. Bei einigen Viren werden die bei Eintritt in die Zelle bestehenden Glykoproteine noch vor der Freisetzung des Virus aus der Zelle in eine transmembranöse und in eine extrazelluläre Einheit gespalten. SARS-CoV-2 gehört wie MERS-CoV zu dieser Kategorie: Das S-Protein wird durch Proprotein-Konvertasen, wie beispielsweise bei SARS-CoV-2 Furin, in den virusproduzierenden Zellen gespalten. So entstehen zwei nicht kovalent assoziierte Untereinheiten. Bei SARS-CoV-2 sind dies die Untereinheit S1, welche ACE2 bindet und die Untereinheit S2, welche das S-Protein in der Membran verankert. Das Vorhandensein einer multibasischen Stelle (Arg-Arg-Ala-Arg) an der S1-S2-Grenze, die von Furin gespalten wird, unterscheidet SARS-CoV-2 von SARS-CoV und allen anderen bekannten humanen Coronaviren, deren S-Protein während der Virusreifung in der infizierten Zelle nicht von Furin-ähnlichen Proteasen gespalten wird. Die Spaltung der S1-S2-Grenze ist eine Voraussetzung für die weitere Abspaltung des S2'. Dabei sind beide Spaltungsvorgänge für die Einleitung des Membranfusionsprozesses unerlässlich. Diese frühzeitige Spaltung destabilisiert die Eintritts Glykoproteine nicht, da diese weiterhin über eine stabile Interaktion verbunden bleiben. Resultierend wird die S2-Untereinheit leichter abgespalten und ist nicht von den Proteasen der Zielzelle abhängig. Dies verhilft SARS-CoV-2 zu deutlich mehr Effizienz bei der Replikation [19].

Die Aktivierung des Rezeptors durch virale Eintritts Glykoproteine führt - in der Regel zusammen mit anderen Auslösern - zu dramatischen Konformationsänderungen in beiden Untereinheiten, die die virale und die zelluläre Membran zusammenführen und schließlich eine Fusionspore schaffen, durch die das virale Genom in weiterer Folge mittels *Uncoating* in das Zellzytoplasma gelangen kann [19].

Nach Eintritt in die Zelle wird die genomische RNA freigesetzt und die Übersetzung des Replikase-Gens aus der genomischen RNA des Virions findet statt. Bei der viralen RNA-Synthese entstehen durch diskontinuierliche Transkription sowohl genomische als auch subgenomische RNAs. Die subgenomischen RNAs dienen als Messenger Ribonukleinsäuren (mRNAs) für strukturelle und akzessorische Gene und werden final zu relevanten Virusproteinen translatiert [3, 4]. Die

genomische RNA wird von einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase repliziert, die über kein Fehlerkorrektursystem verfügt und folglich zahlreiche Mutationen erzeugen und weitergeben kann. Schließlich werden die Virionen durch Exozytose aus der infizierten Zelle freigesetzt [20].

Coronaviren besitzen die Fähigkeit, sich durch homologe Rekombination zu rekombinieren. Dieses Phänomen tritt häufig bei RNA (+) Viren auf und scheint bei Coronaviren durch den diskontinuierlichen Transkriptionsmodus begünstigt zu werden. Es handelt sich hierbei um den Austausch von genetischem Material, welcher homolog, zwischen zwei unterschiedlichen Virusvarianten stattfindet. Die Rekombination spielt eine relevante Rolle in der viralen Evolution, da die genetische Variation gesteigert wird und so neuartige Selektionsvorteile entstehen können. Rekombinationsereignisse kommen häufig bei Betacoronaviren vor. Eine Voraussetzung hierfür ist die simultane Infektion einer Wirtszelle mit zwei unterschiedlichen Virusvarianten, bei deren Replikationszyklen sich Teile des genetischen Materials neu kombinieren, wodurch Hybridgenome entstehen [11, 21, 22].

Virale Proteine und RNA werden kontinuierlich in Virionen im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat der Zelle gesammelt und in Vesikeln transportiert, um durch Exozytose aus der Zelle freigesetzt zu werden. Es gibt mehrere Coronaviren (z.B. HKU-1), bei denen das S-Protein nicht in ein neues Virus eingebaut wird, sondern an die Zelloberfläche gelangt. So kommt es zur Zell-Zell-Fusion zwischen benachbarten infizierten und nicht-infizierten Zellen. Es bilden sich riesige, vielkernige Zellen, die es dem Virus ermöglichen, sich innerhalb eines infizierten Organismus auszubreiten, ohne von virusspezifischen Antikörpern entdeckt und neutralisiert zu werden [3, 4]. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Charakteristika der unterschiedlichen humanpathogenen Coronaviren zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht wichtiger Eigenschaften der unterschiedlichen HCoV's modifiziert nach Fielding et al. und Kesheh et al. [23] [24]

Hier sind die wichtigsten Eigenschaften der sieben humanpathogenen Coronaviren mit ihrer erstmaligen Sequenzierung, ihrem Rezeptor, den Weg des Eintritts in die Wirtszelle, der Inkubationszeit, dem Krankheitsverlauf und ihrem Ursprung zusammengefasst.

USA = United States of America, APN = Aminopeptidase N, ACE2 = Human Angiotensin Converting Enzyme 2, DPP4 = Dipeptidyl Peptidase 4, TMPRSS 2 = Transmembrane Serinprotease 2, HCoV = Humoral Corona Virus

Virus	Erstmalige Sequenzierung	Rezeptor	Eintritt in Wirtszelle	Inkubationszeit	Krankheitsverlauf	Ursprung
HCoV-229-E	1962/ USA	APN	Endozytose	2-4 Tage	Mild bei Immunkompetenten, schwer bei Kindern, Älteren und Immunsupprimierten	Fledermaus
HCoV-OC43	1967/ USA	N-acetyl-9-O-acetylneuramin	Caveolin-1-abhängige Endozytose	2-4 Tage	Mild bei Immunkompetenten, schwer bei Kindern, Älteren und Immunsupprimierten	Fledermaus
SARS-CoV	2002/ China	ACE2	Rezeptorvermittelt	2-10 Tage	Mild bis schwer bei einer Mortalitätsrate von ca. 10%	Fledermaus
HCoV-NL63	2004/ Niederlande	ACE2	Endosomal	2-4 Tage	Mild bei Immunkompetenten, schwer bei Kindern, Älteren und Immunsupprimierten	Fledermaus
HCoV-HKU1	2005/ Hong Kong	O-acetyliert Sialinsäure	Oberflächliches TMPRSS2	2-4 Tage	Mild bis schwer bei einer Mortalitätsrate von nahezu 35%	Fledermaus
MERS-CoV	2012/ Saudi Arabien	DPP4	- Endosomal in der Anwesenheit von Cathepsin L - Zellmembranfusion mithilfe von TMPRSS2	2-14 Tage	Mild bis schwer bei einer Mortalitätsrate von nahezu 35%	Fledermaus
SARS-CoV-2	2019/ China	ACE2	- endosomal - Zellmembranfusion	2-12 Tage	Mild bis schwer	Fledermaus

1.2. Saisonale Coronaviren

Saisonale Coronaviren verursachen beim Menschen Infektionen der oberen und unteren Atemwege. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass das Auftreten der Infektionen saisonal und global unterschiedlich ist. Darüber hinaus konnten sich unterschiedliche dominierende HCoV Varianten für unterschiedliche Jahre etablieren [25]. Nahezu 15 % aller Erkältungen beim Menschen werden durch eine Infektion mit einem der saisonalen Coronaviren HCoV-HKU1, HCoV-229E, HCoV-NL63 und HCoV-OC43 in Verbindung gebracht [26]. Obwohl sie unterschiedliche Wirtrezeptoren zum Eintritt in die Zelle nutzen, exprimieren alle HCoV's das S-Protein an ihrer Oberfläche [27].

Die Viren HCoV-229E und HCoV-OC43 wurden vor über 50 Jahren isoliert, während HCoV-NL63 und HCoV-HKU1 erst kürzlich nach dem Ausbruch von SARS-CoV zum ersten Mal beschrieben wurden [28-30]. Über 90 % der Bevölkerung sind für mindestens drei der vier saisonalen Coronaviren seropositiv [31]. Die Infektionsrate ist bei Kindern und Jugendlichen wesentlich höher als bei

Erwachsenen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass Kinder aufgrund der Betreuung immer in engem Kontakt zu potenziell infizierten Personen stehen und sie nur eine geringe Immunität gegen HCoV besitzen [27]. Fieber, Husten, Rhinorrhoe und Pharyngitis sind die häufigsten klinischen Symptome. Bei Kindern sind die unteren Atemwege häufiger betroffen und die Infektion äußert sich in diesen Fällen primär als Bronchitis oder Pneumonie [23]. Nachdem Erstinfektionen in den ersten Lebensjahren auftreten, folgen Reinfektionen während der gesamten Lebenszeit. Diese Reinfektionen sind in etwa 45 % der Fälle symptomatisch. Die Reinfektionsrate ist, im Gegensatz zu anderen respiratorischen Viren, bei welchen diese mit zunehmendem Lebensalter sinkt, in allen Altersgruppen ungefähr gleich verteilt [32].

1.3. SARS-CoV und MERS-CoV

In den Jahren 2002 - 2003 trat SARS-CoV erstmals in Guangdong, China, auf und breitete sich dann mit etwa 8.000 Infizierten und 800 bestätigten Todesfällen auf 29 Länder aus. Die infizierten Patienten wiesen, ähnlich wie bei SARS-CoV-2, bei schweren Krankheitsverläufen Pneumonien mit einer diffusen Alveolarschädigung auf, die zu einem akuten Atemnotsyndrom, auch *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) genannt, führten [24].

Etwa ein Jahrzehnt später, im Jahr 2012, stellte sich in Dschidda, Saudi-Arabien, ein 60-jähriger Patient mit Verdacht auf eine Pneumonie und Nierenversagen in einer Privatklinik vor. Eine Genomsequenzierung identifizierte ein neues humanpathogenes Coronavirus, das MERS-CoV [33]. Die Namensgebung *Middle East respiratory syndrom* erfolgte aufgrund der Tatsache, dass fast alle Infektionen auf den Nahen Osten zurückgeführt werden konnten. Bis Juli 2013 wurden mehr als 1.000 Infektionen nachgewiesen. Die Sterblichkeitsrate lag bei ca. 34 %. Die hohe Mortalitätsrate ist aufgrund der Fokussierung der WHO auf schwere Krankheitsverläufe vermutlich leicht verfälscht [34].

Im Vergleich zu SARS-CoV scheint die Infektiosität bei einer Reproduktionszahl von ca. 0,3 bis 1,3 bei MERS-CoV geringer zu sein. Dies erklärt unter anderem die eingeschränkte Ausbreitung. Ein weiterer Aspekt, der die weitaus geringeren

Infektionszahlen im Vergleich zu SARS-CoV erklärt, ist die breite Forschung im Bereich der Coronaviren, die seit dem SARS-CoV-Ausbruch 2003, erfolgt. Die klinischen Erfahrungen mit dem Virus und die gesammelten genomischen Daten haben die rasche Entwicklung von diagnostischen Tests, die Testung möglicher antiviraler Wirkstoffe, den Einsatz von Infektionskontrollmaßnahmen und die Identifizierung von zoologischen Reservoiren für MERS-CoV erleichtert [34].

1.4. SARS-CoV-2

Im Dezember 2019 sind in den medizinischen Einrichtungen von Wuhan, China, vermehrt Pneumonien mit unbekanntem Erreger aufgetreten, die alle mit einer Markthalle in der Provinz Hubei in Verbindung gebracht werden konnten. Die Sequenzierung des Erregers erbrachte die Erkenntnis eines neuen humanpathogenen Virus mit der Zugehörigkeit zur Familie der Coronaviren. Die Sequenzierung des neuartigen Virus wurde am 12. Januar 2020 unter dem Namen SARS-CoV-2 veröffentlicht [35]. Innerhalb kürzester Zeit breitete sich das Virus auch in anderen Ländern außerhalb von China, wie Thailand, Vietnam, Japan und Korea, aus [36]. Die Abbildung 4 zeigt einen Zeitstrahl mit den wichtigsten Ereignissen zu Beginn des SARS-CoV-2 Ausbruchs. Die hohe Infektiosität beschleunigte die Ausbreitung und die Anzahl der Infektionen, im Vergleich zu anderen Viren, rasant. Ungefähr drei Monate nach der ersten bekannten Infektion gab es global bereits 100.000 bestätigte Fälle [37]. Es gab keinen Teil der Welt, der nicht von der SARS-CoV-2 Pandemie betroffen war.

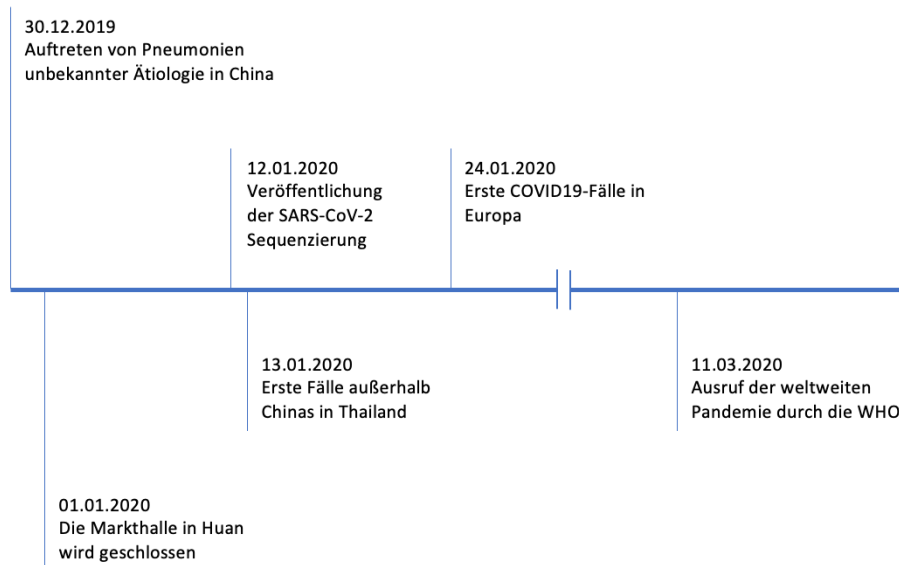


Abbildung 4: Darstellung des zeitlichen Verlaufs des SARS-CoV-2 Ausbruchs modifiziert nach Wang et al. [8]

Hier ist der zeitliche Verlauf wichtiger Ereignisse im Rahmen des SARS-CoV-2 Ausbruchs dargestellt. Entlang der X-Achse werden die einzelnen Daten den wichtigsten Ereignissen zugeordnet. Zur vereinfachten Darstellung wurde die Zeitspanne zwischen Januar und März 2020 in der Grafik verkürzt.

Mit der ersten Genomsequenzierung von SARS-CoV-2 konnte die enge Verwandtschaft zu SARS-CoV nachgewiesen werden, welche die Benennung des Virus beeinflusste. Das SARS-CoV-2-Genom stimmt zu 79 % mit SARS-CoV und zu 50 % mit MERS-CoV überein [38, 39]. Die Aminosäuren-Analyse von SARS-CoV-2 zeigte, dass die erste Untereinheit des S-Proteins und die Kern-Rezeptor-Bindungsdomäne zu 66 % und 68 % mit denen von SARS-CoV übereinstimmt [40].

1.5. SARS-CoV-2 als COVID-19 Erkrankung

Die Erkrankung, die durch SARS-CoV-2 ausgelöst wird, wird als COVID-19 bezeichnet [41]. Von der Diagnostik über die Therapie bis hin zur Impfstoffentwicklung als wichtigste Präventionsmaßnahme, stellten das Virus und das dadurch verursachte Krankheitsbild die Wissenschaft vor große Herausforderungen [42].

1.5.1. Transmission von SARS-CoV-2

Die Transmission von Mensch-zu-Mensch erfolgt durch direkten Kontakt und über die Luft durch Aerosole. Die häufigsten Übertragungswege sind das Einatmen von

Tröpfchen, die durch das Husten und Niesen der Überträger freigesetzt werden, sowie der Kontakt mit Mund-, Nasen- und Augenschleimhäuten der Infizierten. Weitere Quellen der Virusverbreitung sind die Ausscheidung von Viruspartikeln über die Atemwege, Fäkalien und Urin. Bei einer höheren Viruslast steigt die Wahrscheinlichkeit der Übertragung proportional an [42]. Im Vergleich zu SARS-CoV und MERS-CoV, ist die Viruslast bei SARS-CoV-2 in den oberen Atemwegen zu Beginn der Infektion am höchsten, sofern die Patienten asymptomatisch sind oder nur milde Symptome aufweisen. Dies trägt zur hohen Infektiosität des Virus bei, da auch scheinbar gesunde Personen Überträger sein können [43].

1.5.2. Krankheitsverlauf

Das klinische Bild reicht von asymptomatischen Patienten bis zum ARDS mit fatalem Ausgang. In über 80 % der Fälle treten die Symptome in Form von leichtem Fieber, trockenem Husten und Kurzatmigkeit auf. Bei schweren Verläufen kommt es zu Dyspnoe, Hypoxie (Sauerstoffmangel in Teilen oder im gesamten Körper) oder hohem Fieber [44]. Insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen verlaufen viele Infektionen asymptomatisch, wohingegen Menschen über 60 Jahre und Menschen mit Komorbiditäten ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf haben. Kinder weisen eine unreifere Form des ACE2-Rezeptors auf, was die geringere Infektionsrate erklären könnte [45]. Die Inkubationszeit beträgt im Durchschnitt fünf Tage. Im Anschluss kann sich eine schwere Erkrankung, durchschnittlich ungefähr acht Tage nach Auftreten der ersten Symptome, entwickeln, während kritische Erkrankungen bzw. der Tod nach ca. durchschnittlich 16 Tagen eintreten [46]. Die folgende Abbildung 5 fasst einen typischen Krankheitsverlauf bei einer COVID-19 Infektion über die Zeit grafisch zusammen [46].

Histopathologische Veränderungen bei COVID-19 Patienten treten hauptsächlich in der Lunge auf. Es zeigen sich bilaterale diffuse Alveolarschäden, die Bildung hyaliner Membranen, Desquamation von Pneumozyten und Fibrinablagerungen in der Lunge [47].

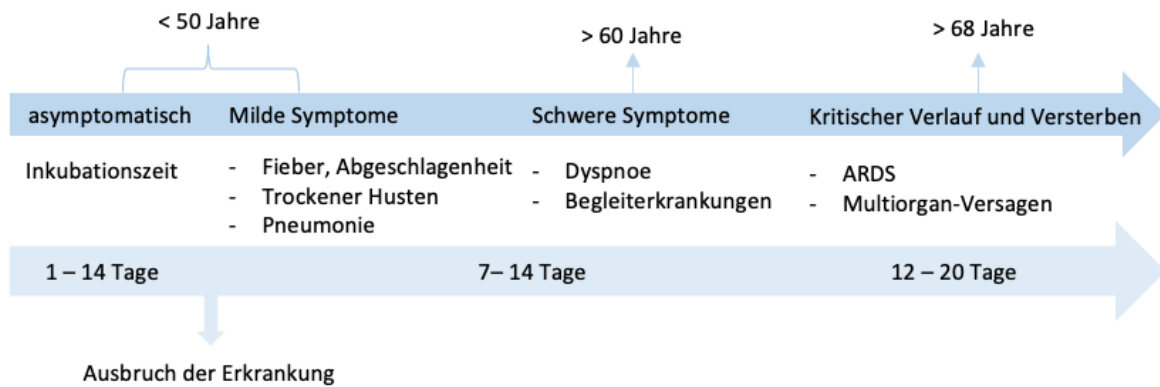


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Krankheitsverlaufs bei einer COVID-19 Infektion über die Zeit modifiziert nach Hu et al. [46]

Initial kommt es kurz nach der Infektion zur asymptomatischen Inkubationszeit, welche 1 - 14 Tage dauern kann, im Durchschnitt aber ca. 5 Tage beträgt. Danach kommt es zum Ausbruch der Erkrankung mit milden Symptomen. Im weiteren Verlauf kann es zu schweren Symptomen, wie Dyspnoe und Begleitsymptomen, kommen. Ein geringer Anteil der Erkrankungen kann innerhalb von 12 - 20 Tagen einen kritischen bis tödlichen Verlauf nehmen. Das Risiko für einen schweren Verlauf ist ab einem Alter über 60 Jahren, sowie ein kritischer Verlauf bzw. Versterben ab einem Alter über 68 Jahren, erhöht. Der zeitliche Verlauf ist hier entlang der X-Achse dargestellt.

1.5.3. Klinische Diagnostik

Die frühe Diagnose ist bei COVID-19 aufgrund der hohen Transmissionsrate äußerst wichtig. Hierfür gibt es verschiedene Methoden. Der erste Schritt ist im Regelfall das Screening zum Nachweis von genomischem Virusmaterial mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Mithilfe der genauen Sequenzierung von SARS-CoV-2 schon zu Beginn der Pandemie, entwickelten und optimierten Chan et al. Primer für die RT-PCR zum Nachweis des S-Gens, welches ein explizites Charakteristikum für das neue Coronavirus ist [48]. In weiterer Folge wurde diese Methodik fortlaufend verbessert und auch für weitere Gene, wie zum Beispiel auch manche nsps, etabliert [49].

Die radiologische Bildgebung der Lunge mittels Computertomographie wird als ergänzende Diagnostik im stationären Setting bei schwereren Krankheitsverläufen eingesetzt. Bei positivem Befund sind milchglasartige Verdichtungen und im späteren Verlauf Fibrosierungen des Lungengewebes erkennbar [48].

Bei der serologischen Untersuchung werden Serumproben von Patienten auf immunologische Reaktionen geprüft, die im Zusammenhang mit der SARS-CoV-2 Infektion stehen. Bei Krankheitsverläufen, die eine intensivmedizinische

Versorgung erfordern, konnte ein sogenannter Zytokinsturm festgestellt werden, wobei hier ein Anstieg der Zytokine bzw. Interleukine IL-6, IL-2, IL-7 und IL-10 nachweisbar war. Das Auftreten dieser Laborveränderungen ist mit Langzeitfolgen nach dem Überwinden der Infektion assoziiert [50]. Es besteht unter anderem die Möglichkeit Antikörpertestungen durchzuführen und folglich die humorale Immunantwort zu untersuchen. Diese sind insbesondere für die Immunität, ob als Resultat einer Impfung oder aufgrund einer durchgemachten Infektion, relevant. So kann ein möglicher längerfristiger Schutz nachgewiesen und erforscht werden, wie auch im Rahmen dieser Arbeit [49]. Zu weiteren Blutbildveränderungen zählen eine Leukopenie, ein erhöhter Wert des C-reaktiven-Proteins, eine hohe Erythrozytensedimentationsrate und erhöhte D-Dimere [51]. Außerdem ist es noch wichtig anzumerken, dass einige der unterschiedlichen humanen Coronaviren weiterhin schwer zu kultivieren sind. SARS-CoV-2 und HCoV-229E lassen sich beispielsweise besser anzüchten [14].

1.5.4. Prävention und Therapie

Die Entwicklung einer effektiven Therapie für die Viruserkrankung COVID-19 stellt wie bei den meisten Viruserkrankungen eine Herausforderung dar. Somit spielt insbesondere die Prävention eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Verbreitung des Virus.

Die weltweite Bedrohung durch SARS-CoV-2 führte zu einer so raschen Impfstoffentwicklung, wie noch nie zuvor. Innerhalb eines Jahres nach der ersten beschriebenen Infektion kam es zur Fertigstellung und Zulassung von drei verschiedenen Impfstoffen: BNT162b2 von Pfizer-BioNTech, mRNA1273 von Moderna und Ad26.COV2.S von Janssen. Seitdem sind noch weitere Impfstoffe auf den Markt gekommen oder in der Entwicklung. Insbesondere schwere Krankheitsverläufe konnten nachweislich mit der rasanten Durchimpfung der weltweiten Bevölkerung reduziert werden [52].

Trotz zahlreicher Studien zur Entwicklung von COVID-19-Therapeutika sind die Endergebnisse nicht vielversprechend. Die vorhandenen Möglichkeiten reduzieren sich auf monoklonale Antikörper-Therapien, Kortikosteroide und antivirale Medikamente [53].

1.6. Humorale Immunantwort

Grundsätzlich ist die menschliche Bevölkerung nicht immun gegen HCoV und daher anfällig für neue Coronaviren, wie beispielsweise SARS-CoV-2 [5]. Bei Kontakt mit Viruspartikeln kommt es sowohl zur humoralen als auch zur zellulären Reaktion des menschlichen Immunsystems. Wichtige Bestandteile der adaptiven Immunität sind CD4⁺ T-Zellen, die die Immunantwort koordinieren, B-Zellen, die Antikörper synthetisieren, und CD8⁺ T-Zellen, die für die Abtötung infizierter Zellen verantwortlich sind [54].

1.6.1. Antikörperproduktion

Die Qualität der Antikörperproduktion, und somit der humoralen Immunantwort, ist ausschlaggebend für die langfristige Immunisierung gegen jegliche Art schädlicher Viren. Die gebildeten Antikörper durchlaufen einen komplizierten Prozess der Anpassung an die präsentierten viralen Antigene, welcher auch als Affinitätsreifung bezeichnet wird. Die sporadische Differenzierung von B-Zellen im Keimzentrum der Plasmazellen, die Antikörper freigeben, ist für die progressive Verbesserung des Antikörpertiters im zeitlichen Verlauf verantwortlich. Das Ausmaß, in dem die Affinitätsreifung für die Bildung von schützenden und neutralisierenden Antikörpern erforderlich ist, variiert von Virus zu Virus [55].

Es sind mehrere Klassen von Antikörpern an der humoralen Immunantwort beteiligt: Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin D (IgD) und Immunglobulin E (IgE). Jede dieser Klassen hat ihre eigenen biophysikalischen Eigenschaften, Funktionen, Gewebeverteilungen und individuelle Halbwertszeit [56]. Während einer Immunreaktion wird als erstes IgM exprimiert. Daher werden häufig IgM-Antikörper zur Diagnose einer akuten Exposition gegenüber einem Pathogen, auch SARS-CoV-2, verwendet [56]. IgA liegt insbesondere an Schleimhautoberflächen, in Sekreten, Speichel und der Muttermilch vor und spielt dabei eine entscheidende Rolle beim Schutz der Schleimhautoberflächen vor Toxinen, Viren und Bakterien, indem es diese direkt neutralisiert oder deren Bindung an die Schleimhautoberfläche verhindert. Insbesondere bei Infektionen der Atemwege, wie COVID-19, spielt es eine

relevante Rolle [56, 57]. IgG ist der im Körper vorherrschende Immunglobulin-Isotyp und hat die längste Serumhalbwertszeit. Er ist direkt an der Immunantwort beteiligt, einschließlich der Neutralisierung von Viren und Toxinen [56]. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der mit der Immunantwort auf HCoV im Zusammenhang stehenden Antikörper-Bildung von IgG.

Aufgrund von *Class Switching* kommt es zur Umwandlung von einer Immunglobulinklasse in eine andere. Das *Class Switching* wird durch charakteristische Zytokine, die als Reaktion auf den Erreger freigesetzt werden, induziert [58]. Die Antikörperbildung bietet im Regelfall einen Infektionsschutz. Es gibt aber auch Viren, wie das Dengue-Virus, bei denen es zu einem sogenannten *Antibody-dependent enhancement* (ADE) kommt und ein erneuter Kontakt mit einer anderen Variante des Virus zu einer überschießenden Immunreaktion führt und paradoxerweise eine Alteration der Erkrankung induziert wird [59]. Ein weiteres Phänomen ist die Kreuzreaktion. Hierbei bindet derselbe Antikörper divergente Antigene, die gleiche oder ähnliche Epitope aufweisen, sodass es in weiterer Folge zu einer Immunreaktion kommt [56]. Im Kontext von SARS-CoV-2 wurde beispielsweise eine Kreuzreaktivität der Antikörper gegen Dengue-Viren mit dem S-Antigen von SARS-CoV-2 sowie umgekehrt beobachtet [60].

Zusätzlich hemmt SARS-CoV-2, ähnlich wie andere Coronaviren, die Antigenpräsentation, indem es die *Major Histocompatibility Complex* MHC-I und -II Moleküle herunterreguliert, was zu einer Hemmung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion führt [61].

1.6.2. Zeitlicher Verlauf der Antikörperproduktion bei Coronaviren

Obwohl die humorale Immunantwort gegen unterschiedliche virale SARS-CoV-2 Proteine rasch erfolgt und bei den meisten Patienten stattfindet, sind ihr Ausmaß und zeitlicher Verlauf sehr variabel. Die Reaktion ist durch das fast parallele Auftreten von virusspezifischen IgA-, IgM- und IgG-Antikörpern, die neutralisierende Antikörper enthalten, gekennzeichnet. Diese neutralisierenden Antikörper können sich gegen diverse virale Proteine, insbesondere aber gegen das S- und das N-Protein, richten [62]. Im Allgemeinen können neutralisierende Antikörper, die an einen bestimmten Erreger binden, die Invasion der Zelle hemmen oder die

Membranfusion einer infizierten mit einer nicht infizierten Zelle verhindern. Somit neutralisieren sie Krankheitserreger, verringern ihre Viruslast und schützen so das körpereigene Gewebe vor Pathogenen [63].

Eine frühe Studie mit 173 SARS-CoV-2 Infizierten zeigte bei ca. 93 % der Probanden im Schnitt nach 11 Tagen eine Serokonversion [62]. Weitere Forschungen präsentierten ähnliche Ergebnisse mit einem Zeitraum von 10 bis 14 Tagen [46, 64-66]. Ähnliches wird bei der Aktivität von neutralisierenden Antikörpern beobachtet. Etwa 6 bis 15 Tage nach dem Auftreten der Infektion können diese, allerdings mit einer großen Bandbreite an Titern, nachgewiesen werden. Danach sinkt die Menge der neutralisierenden Antikörper allmählich über einen Zeitraum von drei Monaten [67]. Der rasche Rückgang der Antikörpertiter nach einer Coronainfektion konnte sowohl bei saisonalen HCoV, bei SARS-CoV, bei MERS-CoV, als auch bei SARS-CoV-2, beobachtet werden. Reinfektionen nach einem Zeitraum von sechs Monaten wurden vielfach dokumentiert und stellen eine große Herausforderung dar [68].

1.6.3. Serologische Diagnostik

Mit dem Fortschreiten der SARS-CoV-2 Pandemie stiegen auch die Nachfrage und die Relevanz der serologischen Testung auf SARS-CoV-2 Antikörper und Antikörper anderer Coronaviren. Anhand dieser sollen unter anderem Analysen der Seroprävalenz in der Bevölkerung, der Immunität und ihre Dynamik, sowie der Impfstoffentwicklung erfolgen.

Prinzipiell stehen zwei Kategorien an serologischen Tests zur Verfügung, welche *Rapid Diagnostic Tests* (RDTs) und *Non-Rapid Tests* sind [69]. RDTs sind hauptsächlich *Lateral Flow Assays*, welche Antikörper gegen mehrere Virusantigene innerhalb von 30 Minuten detektieren können. Hierfür wird nur die Zugabe der flüssigen Patientenprobe benötigt, ohne dass weitere Lösungen erforderlich sind. Sie liefern schnelle, qualitativ hochwertige, leicht verständliche Ergebnisse, die auch auf eine *Point-of-Care* (POC) -Umgebung ausgelegt werden können [70]. Für die Forschung stellen sie aufgrund ihrer hohen Kosten, ihrer Unfähigkeit, mehrere Proben zeitgleich zu testen, und insbesondere ihres Mangels quantitative Daten zu eruieren, jedoch kein nützliches Konzept dar [71].

Im Kontrast dazu stehen die *Non-Rapid Tests*, welche von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden müssen. Die am häufigsten eingesetzten Tests sind *Solid-phase immunoassays*, wie *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Chemiluminescent immunoassay*, *Enzyme-linked fluorescent assay* und *Dried Blood Spot ELISA* [69]. Mit diesen Methoden kann die Quantität der Antikörper nachgewiesen werden, welche wissenschaftlich einen hohen Stellenwert hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten zur Seroprävalenz von saisonalen HCoV und SARS-CoV-2 ebenfalls anhand der ELISA-Methodik, welche mittels eigenen Positiv- und Negativkontrollen kalibriert wurde, ermittelt.

1.7. Ziele der Arbeit

Mit dem Auftreten von SARS-CoV-2 und seinen Folgen etablierte sich eine neue Herausforderung für die Forschung und die Menschheit. Kein Bereich des Lebens blieb von den Auswirkungen der Pandemie verschont. Umso wichtiger ist es, mehr Wissen über das Virus, seine Eigenschaften und insbesondere die Möglichkeiten des Erlangens einer weltweiten Herdenimmunität zu erarbeiten. Hierfür sind unter anderem die breite Forschung im Bereich der HCoV-Antikörper und die Überschneidungen mit dem bereits vorhandenen Wissen ausschlaggebend.

Ziel der Arbeit ist es, mögliche Zusammenhänge der Antikörperbildung gegen saisonale Coronaviren und dem neuen Coronavirus SARS-CoV-2 zu erforschen. Eine der Fragestellungen lautet, ob eine vorherige Infektion mit einem der saisonalen Coronaviren, HCoV-HKU1, HCoV-229E, HCoV-NL63 oder HCoV-OC43, einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Antikörperbildung gegen SARS-CoV-2 hat. Dabei gilt es, eine mögliche Korrelation zwischen saisonalen HCoV-Antikörper-Aktivitäten und der Höhe der Antikörper gegen SARS-CoV-2 zu eruieren. Hierfür wurden mittels der ELISA-Methode bei 115 Konvaleszenzplasmen von mit SARS-CoV-2 infizierten Spendern und einer Vergleichsgruppe mit 114 Plasmen, von Spendern ohne nachweislicher SARS-CoV-2-Infektion, die Antikörperprävalenz für SARS-CoV-2 und vier saisonale HCoV gemessen.

Eine weitere vielfach gestellte Frage ist, ob die Höhe der Antikörpertiter mit dem Schweregrad des Krankheitsverlaufs korreliert. Auch dieser Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen, indem die Antikörpertiter mit den zur Verfügung gestellten Informationen zum Verlauf der COVID-19 Erkrankung verglichen wurden.

Darüber hinaus wollten wir in dieser Arbeit bei einem Anteil der Seren den zeitlichen Verlauf der Antikörpertiter der saisonalen HCoV und von SARS-CoV-2 innerhalb beobachteter Zeiträume analysieren, um so die Dauer der möglichen Immunität nach einer SARS-CoV-2 Infektion zu eruieren. Die Immunität stellt einen besonderen Aspekt dar, da sie den weiteren Verlauf der COVID-19-Pandemie beziehungsweise eine mögliche Herdenimmunität der Gesamtbevölkerung beeinflusst. Diese Herdenimmunität kann am ehesten durch eine Kombination aus der Antikörperbildung nach einer Impfung oder nach einer SARS-CoV-2 Infektion erreicht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Arbeitsplatzübergreifendes Material

- Einkanalpipetten
 - Gilson Pipetman, Frankreich
 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- ELISA-Platten
 - U96 MaxiSorp Nunc-Immuno-Plate, Cat. No. 449824, Nunc, Dänemark
- Faltenfilter
 - Durchmesser 240 mm, 595/ ½, Cat. No. 10311651, Whatmann GmbH, Dassel, Deutschland
- Parafilm „M“-Laboratory Film
 - Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
- Pipettenspitzen
 - 0,1 - 10 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S1121 - 3810, TipOne Filter Tip, Starlab-GmbH, Ahrensburg, Deutschland
 - 1 - 20 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S1120 - 1810, TipOne Filter Tip, Starlab-GmbH, Ahrensburg, Deutschland
 - 1 - 200 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S1120 - 8810, TipOne Filter Tip, Starlab-GmbH, Ahrensburg, Deutschland
 - 101-1.000 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S1122 -1 830, TipOne Filter Tip, Starlab-GmbH, Ahrensburg, Deutschland
- Reaktionsgläser
 - 1,5 ml-Reaktionsglas Safe-Seal-Microtubes, Cat. No. 72.706.400, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
 - 2,0 ml-Reaktionsglas Safe-Lock-Tubes, Cat. No. 0030120.094, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Reaktionssäulen
 - PD10 Säule, Cat. No. 17-0851-01, Amersham BioSciences, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
- Sterile Einmalpipetten

- 1,0 ml Volumen, Cat. No. 604181, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- 2,0 ml Volumen, Cat. No. 4486, Costar, Corning, USA
- 5,0 ml Volumen, Cat. No. 4487, Costar, Corning, USA
- 10,0 ml Volumen, Cat. No. 4488 Costar, Corning, USA
- 25,0 ml Volumen, Cat. No. 4489, Costar, Corning, USA
- Zentrifugenröhrchen
 - 15 ml Volumen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 - 50 ml Volumen, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
 - Polyallomer-tubes 25 x 89 mm, Cat. No. 326823, Beckmann, Krefeld, Deutschland

2.1.2. Enzyme

- Roche Inhibitor Cocktail Complete 25 x, Cat. No. 11 697 498 001, Roche, Basel, Schweiz

2.1.3. Antikörper

- Anti-Human IgG Peroxidase, Cat. No. A0293-ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Humanes Immunglobulin, Ig Privigen, CSL Behring GmbH, Hattersheim, Deutschland

2.1.4. Kits

- Plasmid Maxi Kit (25), Cat. No. 12163, Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.5. In-Vitro Diagnostikum

- Anti-Masern-Viren-ELISA (IgG), Cat. No. EI 2610-9601 G, Euroimmun, Lübeck, Deutschland
- Anti-SARS-CoV-2-ELISA S-Protein (IgG), Cat. No. EI 2606-9601 G, Euroimmun, Lübeck, Deutschland

2.1.6. Software

- Deepl.com
- EndNote 20
- Graph-Pad Prism 5.01 (GraphPad Software)
- Microsoft Excel
- Microsoft Power Point
- Microsoft Word
- Statistical Package for the Social Science (SPSS-Statistics)

2.1.7. Geräte

- Gelkammer, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Immunoassay
 - o Liasison analyzer, DiaSorin, Saluggia, Italien
- Kolbenschüttler
 - o Stuart, Asbach, Deutschland
 - o Inkubator Shaker Model G25, New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, USA
- Magnetrührer
 - o IKAMAG RH, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Littau, Schweiz
- Photometer
 - o Sunrise, Tecan, Crailsheim, Deutschland
 - o UV Mini 1240, UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan
- Pipettierhilfe
 - o Pipetboy acu, IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
- Power Supply, Consort E122, Consort, Turnhout, Belgien
- Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Ultraschallbad
 - o Sonifier 450, Branson, Dietzenbach, Deutschland
- Vortexer
 - o VV3, VWR, Darmstadt, Deutschland
 - o VIBROFIX VF1 Electronic, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Littau, Schweiz
- Waagen
 - o Feinwaage, MC 210 S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

- Mettler PC 2000, Mettler-GmbH, Gießen, Deutschland
- Zentrifugen
 - Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Beckmann Avanti J-E, Coulter, Krefeld, Deutschland
 - Beckmann Otima L70K Ultrazentrifuge, Krefeld, Deutschland

2.1.8. Chemikalien, Medien und Lösungen

Soweit nicht anders angeführt, wurden für die Versuche Chemikalien der Firmen Merck, Roth, Serva und Sigma verwendet. Die Angaben zur Zusammensetzung der Medien und Lösungen sind in den jeweiligen Versuchsprotokollen oder in den gängigen Lehrbüchern dokumentiert [72], [73].

2.1.9. Escherichia coli Stamm

Der Escherichia coli (E. coli) Stamm BL21 (GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) wurde zur Transformation und Amplifikation der Plasmid-DNA verwendet.

2.1.10. Oligonukleotid-Klone

- 229E-N-Klon-F, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- 229E-N-Klon-R, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- CoV-E-F, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- CoV-E-pr, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- CoV-E-R, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- CoV-N-Klon-F, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- CoV-N-Klon-R, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- HKU1-N-Klon-F, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- HKU1-N-Klon-R, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- NL63-N-Klon-F, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- NL63-N-Klon-R, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- OC43-N-Klon-F, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
- OC43-N-Klon-R, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland

2.1.11. Rekombinante Plasmide

- pEX-A258-HCoV-HKU1, Cat. No. aK44N-2, Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

Die verwendeten Plasmide waren pGEX-HKU1, pGEX-229E, pGEX-OC43, pGEX-NL63, pGEX-SARS-CoV-2, -SARS-CoV-2 und pMAL-OC43. Abbildung 6 zeigt beispielhaft ein Plasmid. Die rekombinanten Plasmide wurden, mit Ausnahme von pGEX-HKU1, selbst hergestellt.

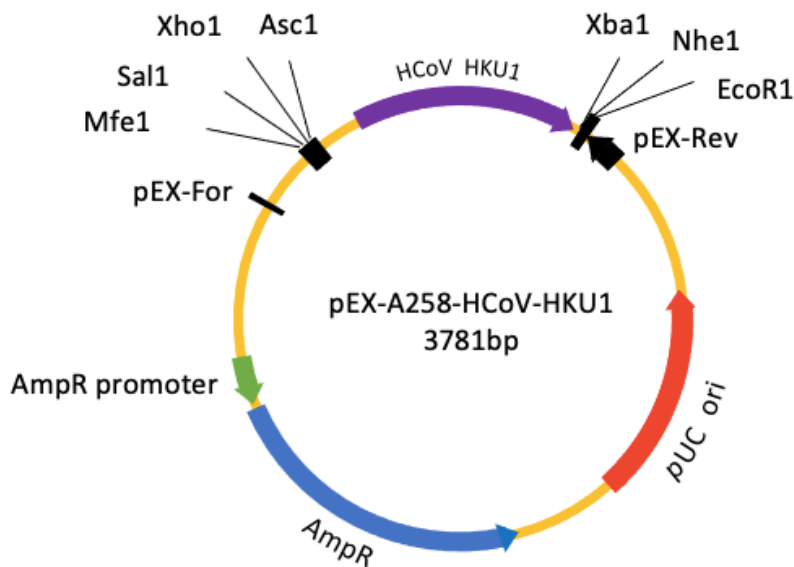


Abbildung 6: pGEX-Plasmid

Hier beispielhaft dargestellt pGEX-HKU1.

AmpR = Ampicillin Resistenz, ORI = Origin of Replication (Replikationsursprung)

Restriktionsenzyme: Asc1 = *Arthrobacter species*, EcoR1 = *E. coli*, Sal1 = *Streptomyces albus*, Mfe1 = *Mycoplasma fermentans*, Nhe1 = *Neisseria mucosa heidelbergensis*, Xba1 = *Xanthomonas badrii*, und Xho1 = *Xanthomonas holcicola*.

2.2. Methoden

Die Methoden für den Anticoronavirus-N-Protein GST Capture ELISA basieren auf früheren Arbeiten zum Nachweis von Antikörpern gegen die humanen Polyomaviren John Cunningham Virus (JCV) und BKV von Warnke, C., et al. [74, 75].

2.2.1. Isolierung der DNA

Für die Klonierung der N-Gene von SARS-CoV-2, HCoV-OC43, -NL63 und -229E wurden RNA-Eluate aus Patientenproben mit gesicherten Coronavirus-Infektionen des Universitätsklinikums Düsseldorf isoliert und die N-Gene anschließend mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert, mit Ausnahme des N-Gens von HCoV-HKU1, welches synthetisch hergestellt wurde.

2.2.2. Restriktion und Ligation des Plasmids

Zunächst wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, um die durch RT-PCR gewonnenen PCR-Produkte zu verdauen und in Plasmide einzubauen. Restriktionsenzyme sind Nukleasen, die ausgewählte, meist palindromische DNA-Abschnitte erkennen und eine gezielte Spaltung von Fremd-DNA bewirken. Die Kombination unterschiedlicher Restriktionsenzyme in der Molekularbiologie bietet die Möglichkeit, zueinander passende DNA-Abschnitte zu erstellen. Diese können anschließend durch Ligation mittels DNA-Ligase, hier T4-Ligase, zu rekombinanter DNA verbunden werden [76]. Bei diesem Vorgang wurden die gewünschten DNA-Sequenzen aus dem im vorherigen Schritt gewonnenen PCR-Produkt ausgeschnitten und folgend mit Hilfe einer DNA-Ligase in die Öffnung des zuvor komplementär geschnittenen Plasmids eingebaut. Diese Genabschnitte unterschieden sich für die verschiedenen zu testenden humanen Coronaviren, um für jedes Virus einen spezifischen Test zu generieren.

In dieser Arbeit wurden hierfür die Expressionsvektoren pGEX und pMAL verwendet. Der pGEX-Vektor ermöglicht die Expression von Glutathion-S-Transferase (GST) -Fusionsproteinen, die eine spezifische Bindung an Glutathion-haltige Affinitätsträger erlauben. Der pMAL-Vektor hingegen dient der Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) -Fusionsproteinen, die über das Maltose-Bindeprotein an Amylose-haltige Affinitätsträger binden. Beide Systeme erleichtern die Reinigung und Detektion der rekombinanten Proteine und bilden die Grundlage für die Herstellung der Coronavirus-spezifischen Fusionsantigene.

Am Beispiel von pGEX-HKU1 wird der Aufbau eines Plasmids nachfolgend dargestellt. Die Reaktion erfolgte im 20 µl - Ansatz. PGEX-JCV-2 diente als Vektor (Ansatz 1) und das synthetisch hergestellte Plasmid pGEX-A25Y-HCoV-HKU1

(Ansatz 2) als *Insert*. In den Tabellen 2 und 3 sind die Restriktionsansätze 1 und 2 dargestellt. Die beiden Ansätze wurden jeweils eine Stunde lang bei 37 °C verdaut. In der Zwischenzeit wurde ein 1,2 % Nu-Sieve-Low-Melt-Agarosegel gegossen. Hierfür wurden 0,6 g Agarose in 50 ml Tris-Borate-EDTA (TBE) Puffer mit reduziertem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) -Gehalt (5 x TBE – 1/ 10 EDTA) in der Mikrowelle gekocht. Anschließend wurden 2 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ ml) hinzugefügt. Die Restriktionsprodukte wurden auf einem 1,2 % Nu-Sieve-Low-Melt-Agarosegel in einer 6-Spur-Gelkammer (1 mm) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TBE/ EDTA 1/ 10.

Die verdauten DNA-Proben wurden in die vorgesehenen Gel-Slots eingesetzt und bei einer Stromstärke von 20 – 30 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Unter langwelligem UV-Licht wurden die Banden des Vektors und des *Inserts* auf ausreichende Trennung geprüft, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) übertragen. Um die Agarose zu schmelzen, inkubierten wir die beiden Ansätze für 5 Minuten bei 68 °C. In einem weiteren Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) wurde der Ligationsansatz gemäß Tabelle 4 angesetzt. Sowohl der Vektor-, als auch der *Insert*-Ansatz wurden zentrifugiert und zu den DNA-Fragmenten im 37 °C-Verdauansatz hinzugefügt. Zum Ligationsansatz wurden 1 µl Vektor und 2 µl *Insert* pipettiert und zunächst 30 Minuten bei 37 °C, anschließend bis zum Folgetag bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Tabelle 2: Restriktionsansatz 1

Restriktionsspaltung	Menge [µl]
pGEX-JCV-2	2
BamHI	1
Sall	1
Puffer Smart	2
Aqua dest.	14

Tabelle 3: Restriktionsansatz 2

Restriktionsspaltung	Menge [µl]
pGEX-A25Y-HCoV-HKU1	15
BamHI	1
Sall	1
Puffer Smart	2
Aqua dest.	1

Tabelle 4: Ligationsansatz

Ligationsansatz	Menge [µl]
T4-Ligase	1
10 x Ligationspuffer	2
Aqua dest.	14 - 15

2.2.3. Klonierung durch Transformation kompetenter E. coli Bakterienstämme mit Plasmid-DNA

Unter Transformation versteht man die Aufnahme rekombinanter Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen zur Vermehrung der gewünschten DNA-Abschnitte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in den vorherigen Schritten hergestellten Plasmide in kompetente E. coli Bakterien transformiert. Dieser verwendete E. coli Stamm BL21 trägt durch eine genetische Veränderung das Gen für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Durch den Einbau des Plasmids während der Transformation erwirbt das Bakterium auch eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin, welche ebenfalls auf dem Plasmid kodiert ist. Erfolgreich transformierte Zellen können dann durch die Anzucht auf antibiotikahaltigem Nährmedium (Ampicillin) wachsen und selektiert werden. Der hier eingesetzte kompetente E. coli Bakterienstamm wurde vor der Verwendung bei -70 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 100 µl des Bakterienstamms E. coli BL21 für 10 Minuten inkubiert und 5 µl der gelösten und zunächst 1:100 verdünnten Plasmide, auch Transformationsansatz genannt, hinzugefügt. Auf eine erneute Inkubation auf Eis für 10 Minuten folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden im Thermomixer comfort und eine erneute Inkubation der Zellen auf Eis für 90 Sekunden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 800 µl LB-Medium (LB: lysogeny broth, Invitrogen, 20 µl 1 M Glucose und 5 µl 2 M Magnesiumchlorid

(MgCl₂) aufgenommen und eine Stunde bei 37 °C unter stetiger Bewegung im Bakterenschüttler bei 220 rpm bebrütet, sodass die Resistenzgene exprimiert werden konnten. Auf LB_{AMP}-Platten (LB: lysogeny broth, Invitrogen; Agar: 15 g/l, DIFCO Bitek; Amp: Ampicillin 100 µl/ml, Roche Molecular Biochemicals) wurden jeweils 0,3 ml der Bakteriensuspension ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C bebrütet, um die gewünschten Bakterienkulturen wachsen zu lassen. Die entstandenen Kolonien wurden anschließend auf das Vorliegen des Plasmids mit der gewünschten DNA-Sequenz überprüft. Auf diese Weise konnten die gewünschten DNA-Abschnitte für die weiteren Schritte hergestellt und kloniert werden.

2.2.4. Präparative Plasmid-Isolierung („Maxi-Präp“)

Mithilfe der „Maxi-Präp“-Methode von Qiagen werden große Mengen an Plasmid-DNA aus den Bakterienstämmen isoliert. Das Verfahren wurde nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Die über Nacht bebrüteten Bakterienkulturen wurden am nächsten Tag bei 6.000 rpm (Beckmann JS-21, JA10/ 14 Rotor) für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Bakterienpellet wurde in 10 ml kaltem Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 400 µg/ml RNase A; 280 µl/ 280 ml *LyseBlue reagent*) resuspendiert. Dazu wurden 10 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) gegeben, durch leichtes Schütteln gemischt und bei RT für 5 Minuten inkubiert. Die Lösung färbte sich durch das *LyseBlue reagent* blau. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 10 ml des vorgekühlten Puffers P3 (3 M KAc, pH 5,5) zugefügt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von P3 wurde die Lösung wieder farblos. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 4 °C und 1.200 rpm (Beckmann JS-S1, JA 10/ 14 Rotor) zentrifugiert. Mit einem Faltenfilter (Ø 240 nm, 595/ ½, Whatmann GmbH, Dassel, Deutschland) wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, filtriert und isoliert. Das filtrierte Produkt wurde auf eine Säule aufgetragen, die zuvor mit 10 ml Puffer (QBT /750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 % Isopropanol (v/v); 0,15 Triton X-100 (v/v)) equilibriert worden war. Beim Auftragen der Probe band die Plasmid-DNA aufgrund ihrer Affinität zur Matrix fest an die Säule, während Verunreinigungen im Durchfluss entfernt wurden. Die Säule wurde dann zweimal mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 % Isopropanol (v/v))

gewaschen, bevor die Elution der Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF (QF 1,25 M NaCl; 50 ml Tris Cl H 8,5; 15 % Isopropanol (v/ v)) erfolgte. Die DNA wurde durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens an Isopropanol präzipitiert. Das Gemisch wurde für 30 Minuten bei 4 °C und 10.000 rpm (Beckmann JS-S1, JA 10/ 14 Rotor) erneut zentrifugiert und der entstandene Überstand vorsichtig dekantiert. Das resultierende DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und bei RT 10 Minuten bei 1.000 rpm (Beckmann JS-S1, JA 10/ 14 Rotor) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde wieder verworfen. Das DNA-Pellet, das im Anschluss für 5 - 10 Minuten luftgetrocknet wurde, wurde in 100 – 200 µl Minimal Tris-EDTA (Min-TE, pH 8,0) aufgenommen und die Konzentration photometrisch (Photometer, Sunrise, Tecan) bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm gemessen. Die DNA-Konzentration wurde auf 1 µg/ µl eingestellt. Die Qualität des Präparats wurde durch Restriktionsverdau und Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft.

2.2.5. IPTG-Induktion von chemisch kompetenten E. coli für die Antigengewinnung
Zur Induktion chemisch kompetenter E. coli Bakterien wurde eine Vorkultur (100 ml, 37 °C, OD₆₀₀ > 2,0) transformierter BL21 E. coli verwendet. 15 - 25 ml dieser Präkultur wurden zu 150 ml LB/ Amp-Medium (LB = lysogeny broth, Invitrogen; Amp: Ampicillin 100 µl/ ml Roche Molecular Biochemicals) hinzugefügt. Die OD₆₀₀ lag nun bei 0,3 – 0,5. Es folgte die Zugabe von 0,25 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und die Bebrütung im Bakterienschüttler für etwa sechs Stunden bei 30 °C. Dann wurden 37,5 ml Aliquote in jedes von vier Falcon-Röhrchen mit einem Maximalvolumen von 50 ml übertragen. Die Falcon-Röhrchen wurden im Anschluss 30 Minuten lang bei 4.000 rpm und 4 °C (Eppendorf 5810 R) zentrifugiert und der resultierende Überstand wurde verworfen. Die verbleibenden Zell-Pellets wurden mit 10 ml Lysis Puffer (40 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 2 mM DTT (1,4-Dithiothreitol); 1 mM EDTA; Aqua destillata (Aqua dest.); 25 x Roche Protease Inhibitor Cocktail Complete (400 µl/ 10 ml)) pro Falcon-Röhrchen vermengt und mittels Ultraschalltechnik (Branson Sonifier 450, Output control 5,5 = ca. 25 %, Leistung = ca. 100 Watt, Timer 10 Minuten, Dutycycle 50 %) lysiert. Die Reagenzinhalt aller vier Falcon-Röhrchen wurden zusammengeführt und mit 2 mM ATP und 5 mM MgCl₂ versetzt. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei RT wurde die Suspension in Polyallumer-Tubes (5 x 89 mm, Beckmann) für 30 Minuten

bei 4 °C und 30.000 rpm (Beckmann Otima L70K Ultrazentrifuge im SW32Ti Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Glycerin 50 % (v/v) versetzt und nach der Proteinbestimmung nach Bradford, die wie in Kapitel 2.2.7. beschrieben durchgeführt wurde, bei -20 °C gelagert.

2.2.6. Bradford Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration der jeweils hergestellten Proteine wurde der Bradford-Assay eingesetzt. Er basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums entlang einer Kalibrierungsgeraden bekannter Proteinkonzentrationen. Zunächst wurden die Bovine Serum Albumin-Standards (BSA) mit Endkonzentrationen 0, 20, 40, 60, 80 und 120 µg/ ml vorbereitet. Zur Herstellung der Proteinstandards wurden 0,1 g BSA in 10 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst (=10 mg/ ml bzw. 100 µg/ 10 µl), wie in Tabelle 5 angegeben. Daraus resultierte die Standardkurve für die Proteinbestimmung.

Das gesuchte Antigen und das vergleichbare Kontrollantigen wurden mit Aqua dest. in den Konzentrationen 1:20 und 1:40 vorverdünnt. Das als Antigen bezeichnete Probenmaterial enthielt die gesuchten virusassoziierten Proteine, wohingegen das Kontrollantigen diese nicht enthielt und als Negativkontrolle diente. Dabei handelte es sich beim Kontrollantigen nicht um ein echtes Antigen, sondern um ein Basiszellantigen der nicht antigenexprimierenden Zellen. Das Kontrollmaterial erfasst Hintergrundbindungen des eigentlichen Antigens und unterstützt eine korrekte Interpretation der spezifischen Signale.

Anschließend wurden 200 µl der Bradford-Reagenz in jedes Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Pro Well wurden 50 µl Standard oder 50 µl Probe gemäß des in Tabelle 6 angegebenen Pipettierschemas hinzugefügt. Beide wurden im Doppelansatz bestimmt. Die Mikrotiterplatten wurden im SLT-Rainbow-Photometer mit definierter Voreinstellung bei einer OD von 620 nm gemessen.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Proteinstandards

Die Stammlösung wurde mittels Aqua dest. zu den Standards 1 - 6 zu 1:0, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 und 1:120 verdünnt.

Standard Nr.	Stammlösung (10 mg/ ml) [μ l]	Aqua dest. [ml]	Konzentration [μ g/ ml]
1	0	10.0	0
2	20	9.98	20
3	40	9.96	40
4	60	9.94	60
5	80	9.92	80
6	120	9.88	120

Tabelle 6: Pipettierschema Bradford Proteinbestimmung

Im Doppelansatz wurden auf einer 96-Well-ELISA-Platte von Spalte 1 - 2 jeweils A-F die Standards (STD) 1 - 6 aufgetragen. Die 3. Spalte wurde mit dem Antigen (Ag) und die 4. Spalte mit dem Kontroll-Antigen (Ko-Ag) jeweils in den Konzentrationen 1:20 und 1:40 beschichtet. Das Ag enthielt Proteine von infizierten Zellen und das Ko-Ag Proteine von nicht infizierten Zellen. Das Ko-Ag diente hier als Negativkontrolle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1 (0)	STD1 (0)	Ag 1:20	Ko-Ag 1:20								
B	STD2 (20)	STD2 (20)	Ag 1:40	Ko-Ag 1:40								
C	STD3 (40)	STD3 (40)										
D	STD4 (60)	STD4 (60)										
E	STD5 (80)	STD5 (80)										
F	STD6 (120)	STD6 (120)										
G												
H												

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit hergestellten und für den Anticoronavirus-N-Protein GST Capture ELISA verwendeten Plasmide und ihre rekombinanten Fusionsproteine mit ihrer Konzentration und dem Datum der Herstellung aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht der Plasmide, der rekombinanten Proteine und ihre Proteinkonzentrationen ($\mu\text{g Protein/ ml}$)

Aus den gelisteten Plasmiden wurden die rekombinanten Proteine entweder als GST- (pGEX) oder als MBP- (pMAL) Fusionsprotein exprimiert.

Plasmid (zur Proteinherstellung)	Rekombinantes Protein (MBP- / GST-Fusionsprotein)	Datum der Herstellung	Konzentration [$\mu\text{g Protein/ ml}$]
pMAL-SARS-CoV-2	SARS-CoV-2-Protein	11.05.2020	880
pGEX-SARS-CoV-2	SARS-CoV-2-Protein	18.05.2020	1.250
pMAL-SARS-CoV-2	SARS-CoV-2-Protein	25.05.2020	880
pGEX-OC43	HCoV-OC43-Protein	13.06.2020	600
pGEX-NL63	HCoV-NL63-Protein	25.06.2020	700
pGEX-229E	HCoV-229E-Protein	03.07.2020	860
pMAL-OC43	HCoV-OC43-Protein	23.07.2020	804
pMAL-SARS-CoV-2	SARS-CoV-2-Protein	01.09.2020	1.070
pGEX-HKU1	HCoV-HKU1-Protein	17.09.2020	860

2.2.7. Antigenbindung über Glutathion-Casein

Zu Beginn wurden 150 mg Casein in 25 ml Phosphate-buffered saline (PBS) gelöst (= $\sim 0,2$ mM Cystein; 2,4 - 3 mM Lysin). Zur Derivatisierung von Casein-Cystein mit N-Ethylmaleinimid (NEM) (Pierce) wurden 0,5 ml NEM (0,4 mM) zu dem Produkt gegeben und 15 Minuten lang unter kontinuierlicher Rotation bei RT inkubiert. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation unter Rotation bei RT nach Zugabe von 50 mg (4,36 mM) Sulfo-SMPB (Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl] butyrate) (Pierce). Dieser Schritt führt zur Bindung der *Crosslinker* an das Casein. Die Präzipitate wurden durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 6.000 rpm (Eppendorf 5810 R) entfernt. Vom resultierenden Überstand wurden 2,5 ml zur PD10 Säule (PD10 Säule, Amersham) gegeben, die zuvor mit Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) äquilibriert worden war. Der erste Lauf wurde dabei verworfen. Folgend wurden 3 ml DPBS auf die Säule aufgetragen und das entstandene Eluat aufgefangen. Nun konnte die Säule mit 15 ml DPBS gewaschen und das beschriebene Verfahren mit den nächsten 2,5 ml des Überstands wiederholt

werden. Durch die Aufarbeitung wurde das freie Sulfo-SMPB eliminiert. Zuletzt wurde die Bindung des Glutathions an Casein-MBP durchgeführt. Dazu wurden 30 ml des Eluats mit 6 ml Glutathionlösung (120 mM Glutathion in PBS; 10 mM EDTA, pH 7,4; 20 mM NaOH) gemischt und bei RT 60 Minuten unter stetiger Rotation inkubiert. Um das ungebundene Glutathion zu entfernen, wurde das gleiche Verfahren wie bei der Entfernung von freiem Sulfo-SMPB angewandt. Das finale Produkt wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Anticoronavirus-N-Protein GST Capture ELISA diente dem serologischen Nachweis von Antikörpern gegen SARS-CoV-2, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-229E und HCoV-OC43 in Seren rekonvaleszenter SARS-CoV-2-Plasmaspender sowie der Kontrollgruppe. Dabei wurden zwei unterschiedliche Fusionsprotein-Systeme verwendet. Die pMAL-basierten MBP-Fusionsproteine dienten der Vorabsorption der Seren, während pGEX-basierte GST-Fusionsproteine das jeweilige zielantigenspezifische Coronavirus-N-Protein darstellten. Dieses Vorgehen ermöglichte eine spezifische Detektion von Antikörpern gegen die einzelnen HCoVs. Zur Reduktion unspezifischer Kreuzreaktionen wurden alle Proben, die auf saisonale HCoV (HCoV-HKU1, -NL63, -229E, -OC43) getestet wurden, vor der Testung mit pMAL-SARS-CoV-2 vorabsorbiert. Proben, die auf SARS-CoV-2-Antikörper untersucht wurden, wurden entsprechend mit pMAL-HCoV-OC43 vorabsorbiert. Das Versuchsprinzip ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Die 96-Well-Polysorb-Platten (Nunc) wurden zunächst mit 150 µl Glutathion-Casein in 50 mM Carbonat Puffer pH 9,6 (200 ng/ well) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dazu wurde die Glutathion-Casein-Präparation auf eine Konzentration von 1,33 µg/ ml eingestellt. Am Folgetag wurden die 96-Well-Platten mit 180 µl Casein-Blockierungspuffer (0,2 g Casein; 50 µl Tween 20; 100 ml DPBS) pro Well für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach diesen Schritten wurden die beschichteten Platten mit Waschpuffer (DPBS mit 0,5 % Tween 20) gewaschen, bei Raumluft getrocknet und in einer luftdichten Verpackung bei 4 °C für die nachfolgenden Arbeitsschritte gelagert. In jedes Well der 96-Well-Platten wurden 100 µl der in den

vorherigen Schritten hergestellten Proteine bzw. Antigene (SARS-CoV-2, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-OC43 oder HCoV-229E) aufgetragen. Diese wurden zuvor in Casein-Blockierungspuffer (250 µg/ ml) gelöst. Auf eine weitere 96-Well-Platte, die Vorverdünnungsplatte, wurden 95 µl pMAL-SARS-CoV-2 oder pMAL-HCoV-OC43, vermengt mit Casein-Blockierungspuffer, und jeweils 5 µl der Seren der rekonvaleszenten SARS-CoV-2 Plasmaspender bzw. der Kontrollgruppe aufgetragen. Das Pipettierschema ist in Tabelle 8 grafisch dargestellt. Für den SARS-CoV-2-Assay wurden die Proben mit dem löslichen HCoV-OC43-N-Protein und für die saisonalen HCoV-Assays mit dem löslichen SARS-CoV-2-N-Protein, voradsorbiert. Auf beiden 96-Well-Platten wurden vier Felder in der zweiten Spalte mit je einer Probe *High-Positive* (HPOS), *Medium-Positive* (MPOS), *Low-Positive* (LPOS) und *Negative* (NEG) gefüllt. Die Positivität bezieht sich hier auf den Nachweis von SARS-CoV-2 Antikörpern. Sie dienten als Kontrolle, dass negative Seren tatsächlich in negativen Ergebnissen und positive Seren in positiven Ergebnissen resultierten. Mit diesen Kontrollen wurde in gleicher Weise wie mit den Seren der Probanden verfahren. Um den ersten Schritt abzuschließen, wurden beide 96-Well-Platten für eine Stunde oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die beschichteten Platten wurden anschließend mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl Casein-Blockierungspuffer in alle Wells aufgetragen, wie in Tabelle 9 dargestellt. Ausgenommen hiervon war die Standardreihe, welche später für die photometrische Messung relevant wurde. Mit Ausnahme von den Standardreihen, wurden von der Vorverdünnungsplatte 33 µl pro Probe zu jedem Well der beschichteten 96-Well-Platte hinzugefügt. Daraufhin wurden 33 µl des resultierenden Produkts auf Platte 1 verworfen. Das Schema der Beschichtung ist in Tabelle 10 dargestellt. Die antigenbeschichteten ELISA-Platten wurden nun eine Stunde bei RT mit den vorabsorbierten Seren mit einer Verdünnung von 1:160 inkubiert. Tabelle 11 stellt dieses Pipettierschema grafisch dar. Die beschichteten Platten wurden dann dreimal mit Waschpuffer gewaschen und eine erneute Inkubation mit einem polyklonalen Anti-Human-IgG-Peroxidase-Antikörper (11 ml Puffer und 0,55 µl Anti-Human-IgG [Sigma-Aldrich]) wurde zur Detektion der Antikörper durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde das Produkt wiederholt für eine Stunde bei RT inkubiert. Auch hier wurden die beschichteten Platten dreimal mit

Waschpuffer gewaschen und jedes Well mit 100 µl Tetramethylbenzidine (BD Bioscience) gefüllt. Bei RT in einem abgedunkelten Raum wurden die beschichteten Platten ein letztes Mal für acht Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mittels 50 µl Stopplösung (1 M H₂SO₄) gestoppt.

Nun erfolgte die photometrische Messung bei einer OD von 450 nm. Die Antikörperaktivität wurde in *Arbitrary Units* (AU) berechnet und der dynamische Bereich der ELISA wurde durch serielle Verdünnung von humanem Immunglobulin (Ig, Privigen, CSL Behring GmbH) zum Nachweis von saisonalen Coronavirus-Antikörpern bestimmt. Die OD-Werte der Proben wurden mit einer Standardkurve unter Verwendung einer Punkt-zu-Punkt-Berechnung zur Kurvenanpassung verglichen. Da für die saisonalen HCoV kein eindeutiger Schwellenwert zur Unterscheidung eines seropositiven von einem seronegativen Status definiert werden konnte, wurden alle AU/ ml > 0 für die statistische Analyse berücksichtigt. Für den SARS-CoV-2-Antikörpertest wurden Seren von fünf eindeutig seropositiven rekonvaleszenten Patienten bestimmt, gepoolt, verdünnt und mit einem kommerziellen SARS-CoV-2-Antikörpertest getestet. Eine OD₄₅₀ von 2,0 wurde willkürlich als 1.000 AU definiert.

Zusätzlich wurden alle Seren der rekonvaleszenten COVID-Gruppe mit dem Euroimmun-S-Protein-Antikörper-Assay (Euroimmun; Lübeck, Deutschland #EI 2606-9601 G) getestet, um einen standardisierten Vergleich zu ermöglichen.

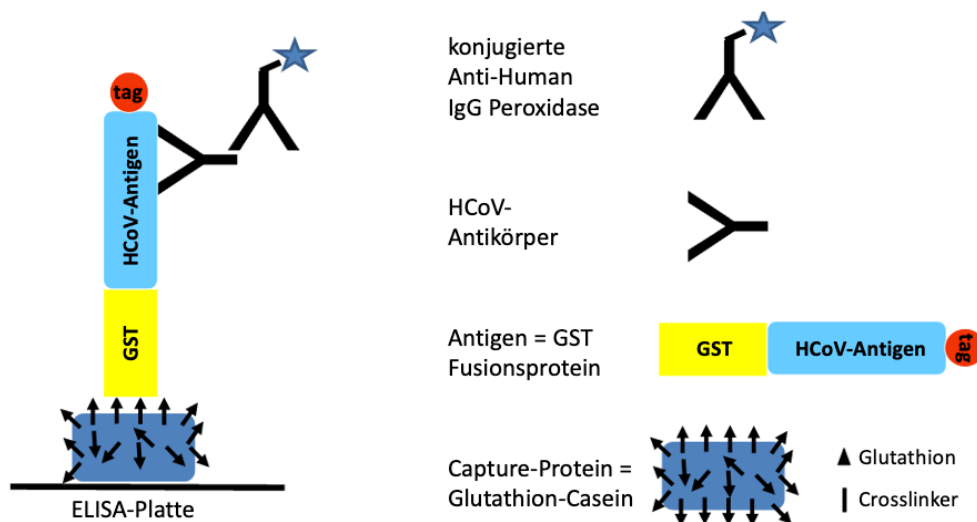


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Anticoronavirus-N-Protein GST capture ELISA

Auf der ELISA-Platte diente Glutathion-Casein, das über *Crosslinker* an die Oberfläche gebunden war, als Capture-Protein. Die GST-Fusionsproteine, bestehend aus Glutathion-S-Transferase (GST) und dem jeweiligen HCoV-N-Protein-Antigen, banden über die GST-Domäne an die Glutathionreste der Plattenbeschichtung. Bei Vorhandensein spezifischer HCoV-Antikörper im getesteten Serum interagierten diese mit dem entsprechenden HCoV-Antigen. Die eingesetzten rekombinanten HCoV-Antigene stammten aus den jeweiligen pGEX-Expressionsplasmiden (SARS-CoV-2, HKU1, NL63, OC43 und 229E). Zur Detektion wurde ein mit Peroxidase konjugierter Anti-Human-IgG-Antikörper, eingesetzt. Die anschließende Umsetzung des Substrats Tetramethylbenzidin führte zu einem messbaren Farbumschlag, der proportional zur Menge der gebundenen Antikörper war.

Tabelle 8: Pipettierschema Vorverdünnungsplatte

Auf der Vorverdünnungsplatte wurden die Seren mit pMAL-OC43 oder pMAL-SARS-CoV2 vorabsorbiert. Hierfür wurden in jedem Feld, außer 1A - D (Standard = STD), 5 µl Probenserum aus der Konvaleszenz- und der Kontrollgruppe zu 95 µl der Vorabsorption (pMAL-OC43 bzw. pMAL-SARS-CoV-2) hinzugefügt. Der gleiche Prozess erfolgte auch für *High*-, *Medium*-, *Low-Positive* und *Negative*. HPOS = *High Positive*, MPOS = *Medium Positive*, LPOS = *Low Positive*, NEG = *Negative*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	95 HPOS	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
B	STD2	95 MPOS	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
C	STD3	95 LPOS	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
D	STD4	95 NEG	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
E	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
F	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
G	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
H	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95

Tabelle 9: Pipettierschema der ELISA-Platte Nr. 1 - Hinzufügen von Casein-Blockierungspuffer und der Standards

Jedes Feld, außer Spalte 1 A - D, wurde mit 100 µl Casein-Blockierungspuffer beschichtet. Jeweils 100 µl der Standards 1 - 4 (STD 1 - 4) wurden in der Spalte 1 A-D aufgetragen. HPOS = *High Positive*, MPOS = *Medium Positive*, LPOS = *Low Positive*, NEG = *Negative*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 STD1	100 HPOS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B	100 STD2	100 MPOS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C	100 STD3	100 LPOS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D	100 STD4	100 NEG	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
E	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
F	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
H	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle 10: Pipettierschema der ELISA-Platte Nr. 1 - Hinzufügen der Vorverdünnung

Zu den 100 µl Casein Blockierungspuffer in Tabelle 7 wurden jeweils 33 µl aus den Feldern der Vorverdünnungsplatte mit den vorabsorbierten und verdünnten Seren hinzugefügt, resuspendiert und danach 33 µl verworfen. Erneut von dem Ablauf ausgenommen waren die Felder mit 1A - D, welche jeweils zuvor mit den Standards (STD) ohne Vorverdünnung befüllt wurden. HPOS = *High Positive*, MPOS = *Medium Positive*, LPOS = *Low Positive*, NEG = *Negative*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 STD1	33 HPOS	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
B	100 STD2	33 MPOS	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
C	100 STD3	33 LPOS	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
D	100 STD4	33 NEG	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
E	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
F	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
G	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
H	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33

Tabelle 11: Pipettierschema mit den Endkonzentrationen

In der ersten Spalte von A-D befanden sich die Standards (STD) 1 - 4 zur Berechnung der Standardkurve. Spalte 2A - D enthielt die Kontrollen (HPOS, MPOS, LPOS, NEG). In den restlichen Feldern wurden Proben aus der Konvaleszenz- und der Kontrollgruppe aufgetragen. Die Proben und die Kontrollen wurden endgültig mit dem Verdünnungsfaktor 1:160 verdünnt. HPOS = *High Positive*, MPOS = *Medium Positive*, LPOS = *Low Positive*, NEG = *Negative*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	1:160 HPOS	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
B	STD2	1:160 MPOS	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
C	STD3	1:160 LPOS	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
D	STD4	1:160 NEG	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
E	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
F	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
G	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
H	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160

2.2.9. Masern-Antikörper-Bestimmung

Der Antikörpernachweis und die Reaktivität gegen das Masernvirus wurden mit einem voll automatisierten kommerziellen ELISA (REF EI 2610-9601-1 G, EUROIMMUN, Lübeck, Deutschland) gemessen. Gemäß den Empfehlungen des Herstellers wurde dabei ein Liaison Immunoassay-Test verwendet. Alle Seren der rekonvaleszenten SARS-CoV-2 Plasmaspender und der Kontrollgruppe wurden auf das Vorliegen von Antikörpern gegen Masern getestet.

2.2.10. Studienpopulation

Die Charakteristika der Studienpopulation sind in der Tabelle 12 zusammengefasst. Die Seren der rekonvaleszenten SARS-CoV-2 Plasmaspender wurden uns freundlicherweise von Dr. Johannes C. Fischer aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika am Universitätsklinikum Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Von all diesen rekonvaleszenten SARS-CoV-2 Plasmaspendern (N = 115) wurde vor der Blutentnahme eine informierte Einverständniserklärung eingeholt. Die Kontrollseren (N = 114) stammen aus einer

routinemäßigen serologischen Untersuchung vor einem operativen Eingriff am Universitätsklinikum Düsseldorf. Bei den ausgewählten Patienten wurden bekannte chronische Grunderkrankungen oder immunsuppressive Therapien bewusst ausgeschlossen, um externe Einflussfaktoren zu minimieren. Die grundlegenden demografischen Daten waren bei beiden Gruppen, wie in Tabelle 12 dargestellt, angepasst. Der Schweregrad der COVID-19 Erkrankung wurde als 0 bei Patienten ohne jegliche Symptome (n = 5), als 1 bei Patienten mit nur leichten Symptomen und keiner relevanten Einschränkung der Aktivitäten (n = 28), als 2 bei Patienten mit mittelgradigen Symptomen (n = 44) und als Schweregrad 3 bei schwerer Symptomatik (n = 18) eingestuft. Für 20 Patienten lagen keine Angaben zur Klassifikation vor. Keiner der Patienten wurde in ein Krankenhaus eingewiesen. Alle Blutproben der Studiengruppe und der Kontrollgruppe wurden zwischen März 2020 und Juli 2020 entnommen und bei -20 °C gelagert. Zusätzlich war es möglich, von zehn COVID-19-Plasmaspendern sequenzielle Seren für bis zu sechs Monate nach Auftreten der Symptome auszuwerten [77].

Tabelle 12: Charakteristika der Studienpopulation und der Blutproben

KI = Konfidenzintervall, N = numerische Anzahl, k. A. = keine Angabe, p = p-Wert

Charakteristika	Plasmaspender	Tage nach ersten Symptomen	Kontrollgruppe	p
Insgesamt N (%)	115 (100)		114 (100)	
Geschlecht				
männlich N (%)	60 (52)		67 (59)	1.000
weiblich N (%)	55 (48)		47 (41)	1.000
Durchschnittsalter in Jahren (CI)	44.5 (42.0 – 47.1)		46.6 (44.1 – 49.2)	0.252
Median des Alters in Jahren (min– max)	47.9 (19.9 – 77.1)		50.2 (20.3 – 77.9)	
Schweregrad der Erkrankung N (%)				
0	5 (4)	26.3 (-1.1 – 53.8)	n. a.	
1	28 (24)	47.0 (37.2 – 56.8)	n. a.	
2	44 (38)	53.9 (48.3 – 59.5)	n. a.	
3	18 (16)	51.0 (41.3 – 60.6)	n. a.	
Nicht klassifiziert	20 (17)			
Zeitraum der Probenentnahme	März – Juli 2020		März – Juli 2020	

2.3. Studiendesign

2.3.1. Ethikvotum

In dieser Arbeit wurden humane Serumproben verwendet. Ein positives Ethikvotum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf liegt vor:

Referenznummer: 20201148 (Prof. Dr. Hohlfeld/ Prof. Dr. Kröncke)

Datum: 23.11.2020

2.3.2. Testung der Proben

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden sowohl die Serumproben der rekonvaleszenten SARS-CoV-2 Plasmaspender als auch der Kontrollgruppe nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und in gemeinsamen Durchläufen auf der 96-Well-Platte mittels ELISA-Verfahren auf die jeweiligen Antikörper getestet.

Um die Spezifität zu erhöhen, wählten wir ein Protokoll, bei dem kreuzreaktive Antikörper in einem Vorinkubationsschritt mit Serumantikörpern und einem löslichen heterologen Coronavirus N-Protein gebunden werden. So wurden lösliche SARS-CoV-2-N und HCoV-OC43-N, die bakteriell als Fusionsprotein mit Aminosäure-terminalem (N-terminalem) Maltose-bindendem Protein exprimiert wurden, für die Vorabsorption aller Seren vor dem Nachweis der Antikörper erzeugt. Die genauen Charakteristika der Gesamtgruppe der 229 Serumproben sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

2.4. Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit *Statistical Package for the Social Science* (SPSS-Statistics) 25 (IBM) und *Graph-Pad Prism 5.01* (GraphPad Software) ausgewertet. Kategoriale Daten wurden je nach Stichprobengröße mit dem exakten Test von Fisher oder dem Chi-Quadrat-Test von Pearson analysiert. Das 95 %-Konfidenzintervall (95 % KI) für die Proportionen wurde mit der modifizierten Wald-Methode berechnet. Die quantitativen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test für zwei Gruppen und mit dem Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei Gruppen ausgewertet. Die Korrelationskoeffizienten (r^2) wurden bestimmt, um die Qualität der Anpassung der quantitativen Ergebnisse der verschiedenen ELISA-Tests zu

berechnen. Alle Tests waren T-Tests und $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit zu Antikörpertitern gegen HCoV und SARS-CoV-2 erzielt werden konnten, werden im Folgenden dargestellt und ausgewertet. Um Einflüsse bei der Analyse zu minimieren, wurden die Proben randomisiert getestet.

3.1. SARS-CoV-2-Antikörperspiegel der SARS-CoV-2 positiven rekonvaleszenten Patienten und der Kontrollgruppe

Zur Beantwortung der Frage, ob Zusammenhänge zwischen der Antikörperbildung, bzw. in weiterer Folge der Immunität, gegen saisonale Coronaviren und dem neuen Coronavirus SARS-CoV-2 bestehen, war eine adäquate Bestimmung der Antikörpertiter gegen SARS-CoV-2 und saisonale HCoV unverzichtbar. Um einheitliche Werte aufführen und sie miteinander gezielt vergleichen zu können, wurden folgende Schritte vorgenommen. Die ermittelten OD-Werte, hervorgehend aus den ELISA-Testungen der Proben aus der COVID-Gruppe und der Kontrollgruppe, wurden mit einer Standardkurve verglichen, wobei eine Kurvenanpassung mittels Punkt-zu-Punkt-Berechnung vorgenommen wurde. Da für die saisonalen Coronaviren kein eindeutiger Schwellenwert definiert werden konnte, der einen seropositiven von einem seronegativen Status unterscheiden könnte, wurden alle AU/ ml > 0 für die statistische Auswertung berücksichtigt. Für den SARS-CoV-2 GST capture ELISA Antikörpertest wurden Seren von fünf seropositiven rekonvaleszenten Patienten, die mit einem kommerziellen SARS-CoV-2-Antikörpertest charakterisiert wurden, gepoolt und verdünnt. Sie dienten als *High-Positive-* (HPOS), *Medium-Positive-* (MPOS) und *Low-Positive-* (LPOS) Kontrollen zur Quantifizierung der Ergebnisse der getesteten Seren. In einer vierten Probe waren keine SARS-CoV-2-Antikörper nachweisbar, weshalb sie als Negativ-Kontrolle (NEG) diente. Eine OD450 von 2,0 wurde willkürlich als 1.000 AU definiert, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Zusätzlich wurden die Seren von rekonvaleszenten COVID-19-Patienten mit dem kommerziellen Euroimmun-S-Protein-Antikörper-Assay (Euroimmun; Lübeck, Deutschland #EI 2606-9601 G) auf SARS-CoV-2-Antikörper getestet, um einen Abgleich der Resultate mit einem etablierten Test durchführen zu können [77].

Zur Analyse des SARS-CoV-2 GST capture ELISA, wurden die Antikörperspiegel von 111 der 115 Seren aus der an COVID-19 erkrankten Gruppe mit den Antikörperspiegeln verglichen, welche mit dem Euroimmun-Anti-Spike-Protein-Assay bestimmt wurden. Aufgrund von fehlendem Probenvolumen, konnten die ausstehenden vier Proben nicht ausgewertet werden. Es stellte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Assays heraus ($R = 0,572$, $p \leq 0,001$). Von den 111 getesteten Seren im Euroimmun-S-Protein-Antikörper-Assay waren 18 Proben (16,2 %) seronegativ. Im GST capture ELISA lag der mittlere Antikörpertiter dieser 18 Seren bei 12 AU/ ml. Der mittlere Antikörpertiter aller Seren der seropositiven rekonvaleszenten Plasmaspender (PD) lag bei 71,5 AU/ ml (KI: 49,6 – 93,4 AU/ ml). Im Vergleich dazu stand die Kontrollgruppe (C) mit einer sehr geringen SARS-CoV-2-Antikörperaktivität im GST capture ELISA (Mittelwert 3,8 AU/ ml; KI: 3,3 – 4,3 AU/ ml, $p < 0,0001$). In der Abbildung 8 sind die Werte grafisch und zum visuellen Vergleich in den ersten beiden Plots dargestellt [77].

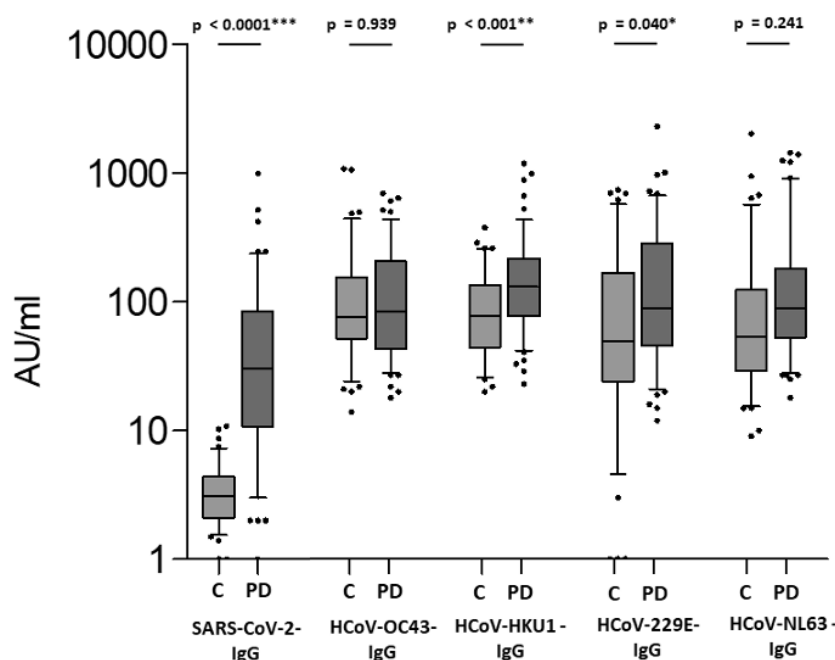


Abbildung 8: Antikörperspiegel für SARS-CoV-2 und saisonale Coronaviren in der SARS-CoV-2- und der Kontrollgruppe nach [77]

Die Box-Whisker-Plots zeigen die Antikörperspiegel gegen SARS-CoV-2 und saisonale Coronaviren. Die Boxen umfassen den Interquartilsbereich, die Linie innerhalb jeder Box stellt den Median dar und die Whisker zeigen das 5. und das 95. Perzentil an. Ausreißer sind durch schwarze Sternchen gekennzeichnet. Die Werte sind in Arbitrary Units (AU) für die Kontrollgruppe (C) (hellgraue Boxen) und die Plasmaspender (PD) der SARS-CoV-2-Gruppe (dunkelgraue Boxen) angegeben. *p wurde durch den t-Test berechnet.

3.2. Antikörper-Bestimmung der saisonalen Coronaviren bei den SARS-CoV-2 positiven rekonvaleszenten Patienten und der Kontrollgruppe

Die Testung auf Antikörper gegen die saisonalen Coronaviren HCoV-NL63, HCoV-228E, HCoV-HKU1 und HCoV-OC43 zeigte bei der COVID-Gruppe, auch als Plasmaspender (PD) bezeichnet, im Vergleich zur Kontrollgruppe, tendenziell höhere Antikörperwerte. Für HCoV-HKU1 wurden in der COVID-Gruppe signifikant höhere Mengen an Antikörpern gemessen (173 AU/ ml [KI: 142-205 AU/ ml] vergleichsweise 105 AU/ ml [KI: 84-126 AU/ ml], $p < 0,001$), als in der Kontrollgruppe. Ähnliches zeigte sich bei dem Vergleich der Werte von HCoV-229E der beiden getesteten Gruppen (201 AU/ ml [KI: 150 – 253 AU/ ml] in der COVID-Gruppe vs. 136 AU/ ml [KI: 102 – 171 AU/ ml] in der Kontrollgruppe, $p = 0,04$). Für HCoV-NL63 und -OC43 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Außerdem hatte das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss auf die Antikörperbildung. In beiden getesteten Gruppen waren die Antikörpertiter gegen saisonale Coronaviren bei den Frauen etwas niedriger als bei den Männern (mittlerer Unterschied: 27,5 AU/ ml, Spannbreite von 3,3 bis 57,0 AU/ ml). Dieser Unterschied war nicht signifikant. Darüber hinaus hatte auch das Alter keinen Einfluss auf die Resultate, mit der einzigen Ausnahme der HCoV-HKU1-Antikörper, die nur in der COVID-Gruppe einen signifikanten Anstieg mit dem Alter zeigten ($p \leq 0,05$). Die Resultate der Antikörpermessung sind für jedes saisonale Coronavirus in der Abbildung 8 mittels Box-Whisker-Plots dargestellt [77].

3.3. Korrelation der Antikörpertiter und des Krankheitsverlaufs

Bei der Gruppe der SARS-CoV-2 positiven rekonvaleszenten Patienten gab es eine eindeutige Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung, welcher im Kapitel 2.2.11. definiert wurde, und der Menge der SARS-CoV-2-Antikörper, welche mit dem GST capture ELISA gemessen wurden ($p = 0,003$). In der kleinen Gruppe der asymptomatischen Patienten ($n = 5$), lag der durchschnittliche SARS-CoV-2 Antikörperspiegel bei 7,8 AU/ ml (Bereich: 2 – 13 AU/ ml), die Gruppe mit Schweregrad 1 ($n = 28$) hatte einen Wert von 40,1 AU/ ml (0 – 224 AU/ ml), die Gruppe mit Schweregrad 2 ($n = 44$) von 70,7 AU/ ml (5 – 520 AU/ ml) und zuletzt mit Schweregrad 3 ($n = 18$) von 131 AU/ ml (6 – 421 AU/ ml). Im Gegensatz dazu imponierte bei den Messungen der Antikörperspiegel gegen die vier saisonalen

Coronaviren mit dem GST capture ELISA kein signifikanter Unterschied oder gar ein Trend. Der mittlere Antikörperspiegel lag in allen Fällen bei etwa 100 AU/ ml. Die Ergebnisse sind anhand Box-Whisker-Plots in der Abbildung 9 dargestellt. Mit dem Durchschnittsalter der Gruppen stieg der Schweregrad (1 – 3) der Erkrankung an. Bei Schweregrad 1 lag das Durchschnittsalter bei 39,12 Jahren und im Vergleich dazu bei Schweregrad 3 bei 48,67 Jahren. Die Unterschiede erwiesen sich aber als statistisch nicht signifikant [77].

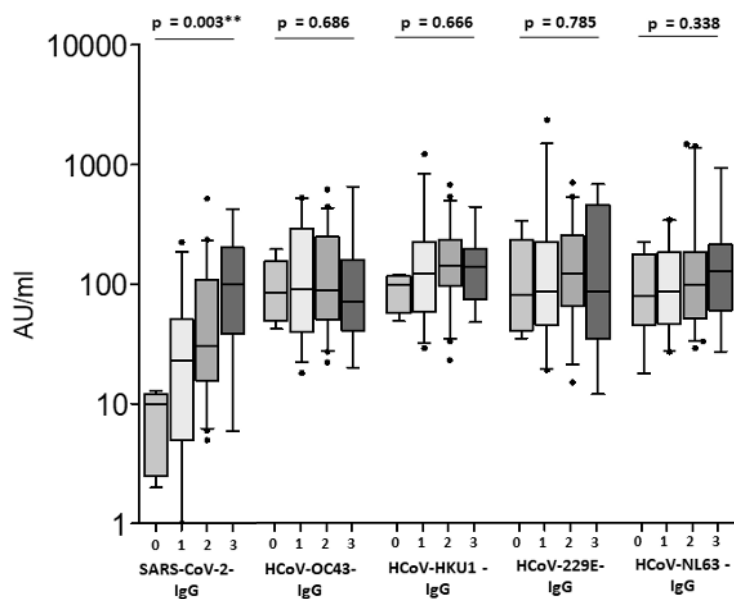


Abbildung 9: Antikörperspiegel bei Rekonvaleszenten mit SARS-CoV-2 in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung nach [77]

Box-Whisker-Plots zur Darstellung der Antikörperspiegel gegen SARS-CoV-2 und saisonale Coronaviren. Die Boxen umfassen den Interquartilsbereich, die Linie innerhalb jeder Box stellt den Median dar und die Whisker zeigen das 5. und das 95. Perzentil an. Ausreißer sind durch schwarze Sternchen gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Antikörperspiegel für jedes Coronavirus wurden nach dem Schweregrad der COVID-19 Erkrankung von 0 (asymptomatisch) bis 3 (schwere Erkrankung) gruppiert, wie am unteren Rand des Diagramms dargestellt. *p wurde durch einen Einweg-ANOVA-Analysetest berechnet. ANOVA = Analyse der Varianz.

3.4. Analyse der Korrelation aller Antikörperspiegel der SARS-CoV-2 positiven rekonvaleszenten Patienten und der Kontrollgruppe

Als auffälligste Erkenntnis dieser Arbeit zeigte sich eine hohe Korrelation der Antikörperspiegel zwischen allen Coronavirus-Typen. In der COVID-Gruppe wurden hochsignifikante Korrelationen ($p \leq 0,05$) zwischen der Höhe der Antikörper gegen SARS-CoV-2 und saisonale Coronaviren festgestellt, wobei HCoV-HKU1 den

höchsten Korrelationskoeffizienten ($R = 0,514$) aufwies. Im Vergleich dazu zeigten die Pearson-Korrelationskoeffizienten insgesamt eher mäßige Werte zwischen 0,3 und 0,4, wobei sie bei HCoV-HKU1 mit einem Koeffizienten von 0,514 etwas höher waren. Darüber hinaus wurden auch zwischen den anderen Antikörperspiegeln der saisonalen Coronaviren hochsignifikante Korrelationen festgestellt. Hierbei lag der höchste Korrelationskoeffizient zwischen den saisonalen Coronaviren HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 ($R = 0,649$), dicht gefolgt von dem Wert ($R = 0,624$) zwischen HCoV-HKU1 und HCoV-229E. Ähnlich eindeutige Korrelationen zwischen den Antikörpertitern der vier saisonalen Coronaviren wurden in der Kontrollgruppe nachgewiesen. Auch in dieser Gruppe lag der Höchstwert zwischen HCoV-HKU1 und HCoV-OC43 ($R = 0,808$). Es konnte allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Antikörperwerten gegen Coronaviren und gegen das Masernvirus, welches zusätzlich getestet wurde, gefunden werden. Die ergänzende Testung der einzelnen Proben auf das Masernvirus diente in dieser Arbeit als Vergleich zwischen der humoralen Immunantwort auf Coronaviren und der humoralen Immunantwort auf eine weitere Virengruppe. Die Tabellen 13 und 14 stellen die jeweilig untersuchten Korrelationen und ihre Ergebnisse in der COVID- und in der Kontrollgruppe dar. Die Abbildungen 10, 11 und 12 bilden beispielhaft drei ausgewählte signifikante Korrelationen graphisch ab [77].

Tabelle 13: Korrelation der unterschiedlichen humanen Coronaviren in der COVID-Gruppe [Korrelationskoeffizient nach Pearson (p-Wert)] [77]

Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen (fettgedruckt dargestellt).

	SARS-CoV-2-IgG	HCoV-OC43-IgG	HCoV-HKU1-IgG	HCoV-229E-IgG	HCoV-NL63-IgG	Masern-IgG
SARS-CoV-2-IgG	1,000	0,327 ($\leq 0,05$)	0,514 ($\leq 0,05$)	0,375 ($\leq 0,05$)	0,399 ($\leq 0,05$)	0,040 (0,686)
HCoV-OC43-IgG		1,000	0,649 ($\leq 0,05$)	0,434 ($\leq 0,05$)	0,325 ($\leq 0,05$)	-0,060 (0,544)
HCoV-HKU1-IgG			1,000	0,624 ($\leq 0,05$)	0,382 ($\leq 0,05$)	0,007 (0,942)
HCoV-229E-IgG				1,000	0,430 ($\leq 0,05$)	-0,068 (0,493)
HCoV-NL63-IgG					1,000	-0,045 (0,650)

Tabelle 14: Korrelation der unterschiedlichen humanen Coronaviren in der Kontrollgruppe [Korrelationskoeffizient nach Pearson (p-Wert)] [77]

Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen (fettgedruckt dargestellt).

	HCoV-OC43-IgG	HCoV-HKU1-IgG	HCoV-229E-IgG	HCoV-NL63-IgG	Masern-IgG
HCoV-OC43-IgG	1,000	0,808 ($\leq 0,05$)	0,502 ($\leq 0,05$)	0,220 ($\leq 0,05$)	0,009 (0,927)
HCoV-HKU1-IgG		1,000	0,398 ($\leq 0,05$)	0,249 ($\leq 0,05$)	-0,118 (0,231)
HCoV-229E-IgG			1,000	0,423 ($\leq 0,05$)	0,027 (0,781)
HCoV-NL63-IgG				1,000	-0,105 (0,288)
Masern-IgG					1,000

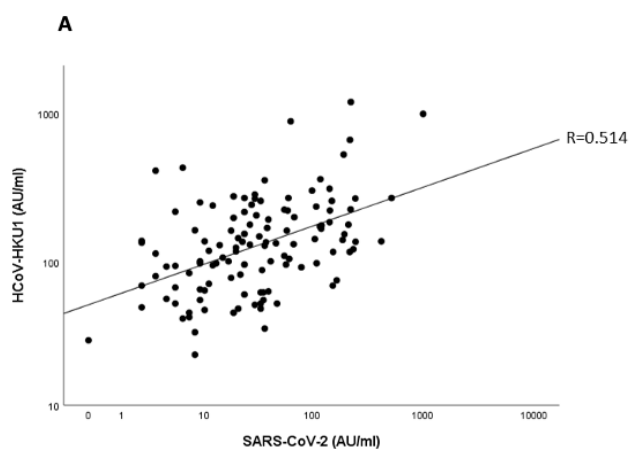


Abbildung 10: Korrelation der Antikörper gegen SARS-CoV-2 und HCoV-HKU1 in der COVID-Gruppe (AU/ ml)

Die Punkte stellen die jeweils gemessenen Werte der Antikörper gegen SARS-CoV-2 und HCoV-HKU1 (AU/ ml) in der Gruppe der COVID-19 Patienten dar. Anhand der Linie zeigt sich eine Korrelation mit einem positivem Korrelationskoeffizient (R) von 0,514.

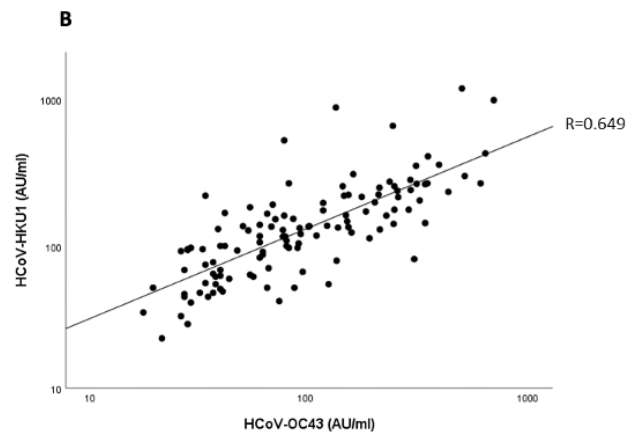


Abbildung 11: Korrelation der Antikörper gegen HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 in der COVID-Gruppe (AU/ ml).

Die Punkte stellen die jeweils gemessenen Werte der Antikörper gegen HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 (AU/ ml) in der Gruppe der COVID-19 Patienten dar. Anhand der Linie zeigt sich eine Korrelation mit einem positivem Korrelationskoeffizient (R) von 0,649.

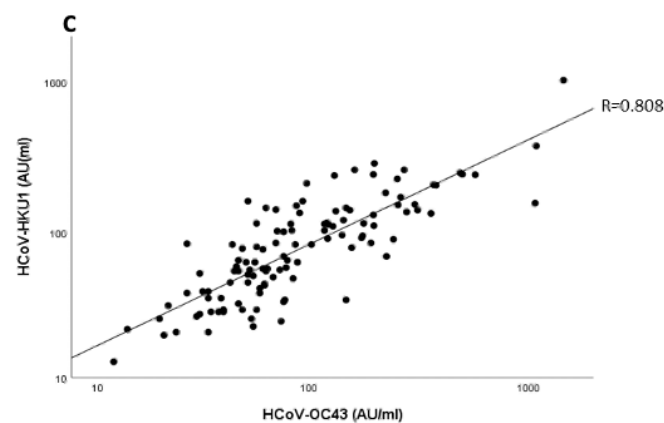


Abbildung 12: Korrelation der Antikörper gegen HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 in der Kontrollgruppe (AU/ ml).

Die Punkte stellen die jeweils gemessenen Werte der Antikörper gegen HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 (AU/ ml) in der Kontrollgruppe dar. Anhand der Linie zeigt sich eine Korrelation mit einem positivem Korrelationskoeffizient (R) von 0,808.

3.5. Zeitlicher Verlauf der Antikörperkonzentration

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Antikörperspiegel wurden Serumproben aus Plasmaspenden von zehn Spendern analysiert, die bis zu sechs Monate nach dem Auftreten erster COVID-19-Symptome entnommen wurden. Die Zeitspanne befand sich in einem Rahmen von 36 bis 188 Tagen. So konnte eine Bewertung der Kinetik und der Langlebigkeit der Antikörperreaktion gegen SARS-CoV-2 und saisonale Coronaviren erfolgen. Es konnten signifikante Abweichungen in den Antikörperspiegeln zwischen den getesteten Patienten zum Zeitpunkt der

ersten und der letzten Entnahme gezeigt werden. Die erste Probenentnahme erfolgte im Durchschnitt 24,5 Tage nach Symptombeginn (Bereich: 10 – 50 Tage). Das letzte Serum stammte im Durchschnitt vom 61,5. Tag nach Symptombeginn (Bereich: 36 – 188 Tage) [77].

Der SARS-CoV-2 Antikörpertiter reduzierte sich signifikant von einem Medianwert von 61 AU/ ml (Interquartilsbereich [IQR]: 12 – 205) in der Startprobe auf 22,5 AU (IQR: 9,5 – 67,5) in der letzten Entnahme. Waren die primären Antikörperreaktionen im messbaren Bereich, war der Rückgang signifikant größer. Bei vier der untersuchten Personen konnte in der gemessenen Zeitspanne keine spezifische humorale Reaktion beobachtet werden. Darüber hinaus kam es bei einem Probanden zunächst zu einem Anstieg von 65 AU/ ml auf 155 AU/ ml bis zum 55. Tag nach Symptombeginn und folgend zu einem Abfall des Werts auf 44 AU/ ml. Die Patientengruppe *SARS-CoV-2-High-Responder* (A – E, n = 5) hatte einen mittleren Schweregrad von 2,2 (KI: 1,16 – 3,24) und ein durchschnittliches Alter von 54,7 Jahren (KI: 44,6 – 64,82). Im Vergleich dazu steht die *SARS-CoV-2-Low-Responder* Gruppe (F – I, n = 4) mit einem geringeren Schweregrad der Erkrankung von 1,0 (KI: -0,3 – 2,3) und einem jüngeren Durchschnittsalter von 30,65 Jahren (KI: 20,2 – 41,1) [77].

Ebenfalls einen Rückgang über die Zeit zeigten die Antikörperkonzentrationen gegen saisonale Coronaviren. Hier präsentierten sich folgende Resultate: Für HCoV-HKU1 von einem Median von 63,5 AU/ ml (IQR: 33 – 111) auf 34,0 AU/ ml (IQR = 13,5 – 101) ($p = 0,03$), für HCoV-OC43 von einem Median von 87 AU/ ml (IQR: 42,8 – 165) auf 31,5 AU/ ml (IQR: 23,8 – 63,3) ($p = 0,01$), für HCoV-NL63 von einem Median von 115,5 AU/ ml (IQR: 45,3 – 167) auf 36,5 AU/ ml (IQR: 21 - 116) ($p = 0,002$) und für HCoV-229E von einem Median von 82 AU/ ml (IQR: 29,5 – 110,5) auf 29 AU/ ml (IQR: 14,5 – 114) ($p = 0,006$). Zusammenfassend konnte ein Rückgang der Antikörper im Beobachtungszeitraum in der Gruppe der *SARS-CoV-2-High-Responder* und in der Gruppe der *SARS-CoV-2-Low-Responder* beobachtet werden. In der Abbildung 13 sind die Verläufe der Antikörperspiegel über die Zeit graphisch dargestellt [77].

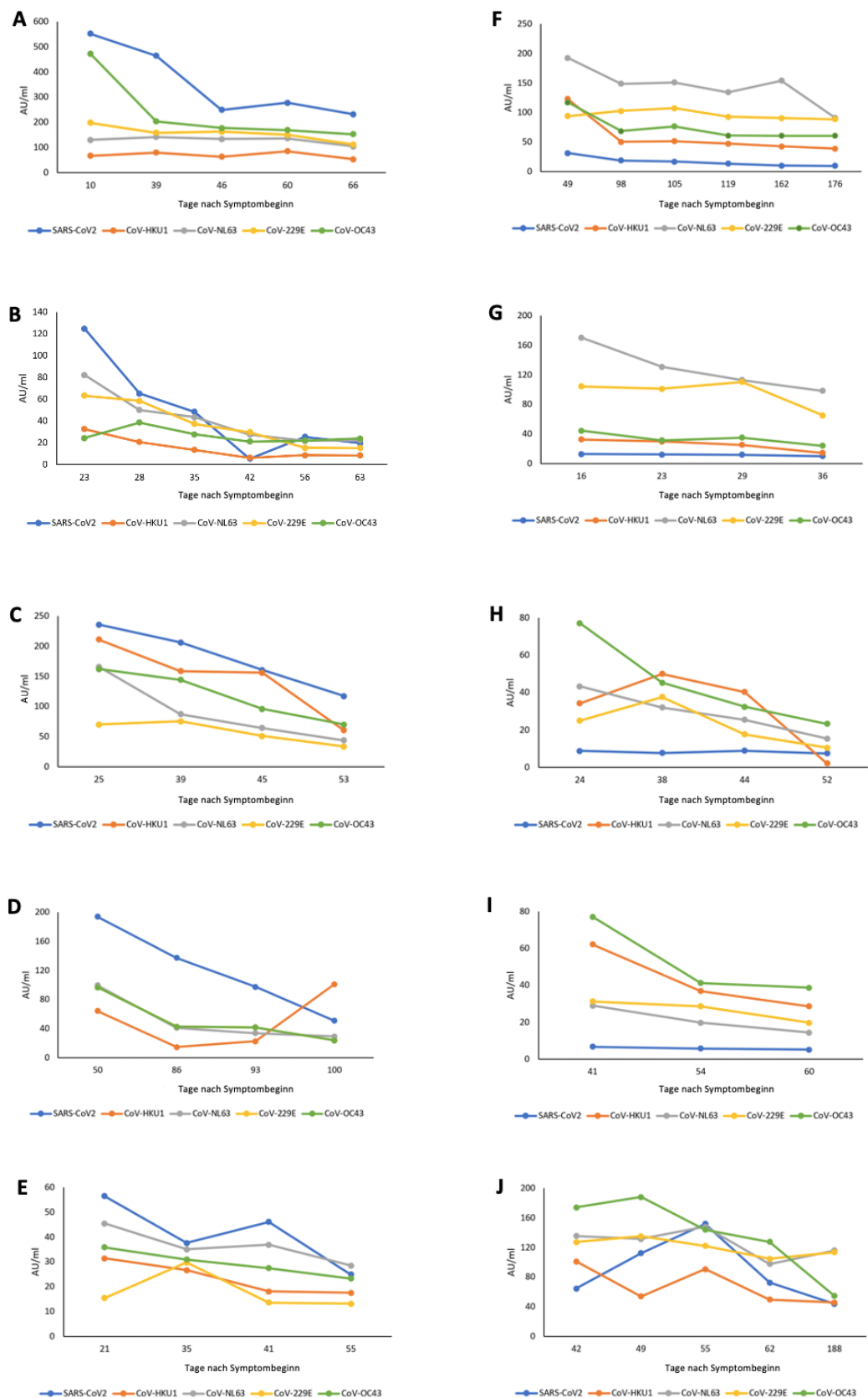


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Antikörperspiegel in AU/ ml gegen SARS-CoV-2 und saisonale Coronaviren bei zehn COVID-19 Patienten nach Adams O. et al [77]

Jede Grafik steht für einen von zehn Patienten (A – J). Die Patienten A – E sind sogenannte *SARS-CoV-2-High-Responder*, die Patienten F – I sind *SARS-CoV-2-Low-Responder* und Patient J zeigt einen verzögerten Anstieg der SARS-CoV-2-Antikörper. Nähere Details sind im Fließtext angeführt. Jeder der Punkte steht für eine Messung der Antikörper in AU/ ml zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Symptombeginn (Tage nach Symptombeginn). Die unterschiedlichen Farben (blau = SARS-CoV-2, orange = CoV-HKU1, grau = CoV-NL63, gelb = CoV-229E, grün = CoV-OC43) kennzeichnen die unterschiedlichen Antigene, die getestet wurden.

4. Diskussion

Zum Nachweis von Antikörpern gegen das N-Protein der vier endemischen saisonalen Coronaviren und SARS-CoV-2, wurde für diese Arbeit ein spezifisches zweistufiges Capture-ELISA-Protokoll entwickelt, das auf einer Technik basiert, die zuvor im Rahmen einer Arbeit für humane Polyomaviren veröffentlicht wurde [74, 75]. Basierend auf den gesammelten Daten, können wir die in diesem Kapitel aufgeführten Schlussfolgerungen ziehen.

4.1. Antikörpertiter und Schweregrad der COVID-19 Erkrankung

4.1.1. SARS-CoV-2 Antikörper und Schweregrad der COVID-19 Erkrankung

Wie bereits in anderen Veröffentlichungen gezeigt, wurde auch in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der COVID-19 Erkrankung und der Menge an Antikörpern gegen SARS-CoV-2 nachgewiesen [78-82]. In Kapitel 3.4. und in Abbildung 7 der hiesigen Schrift, wurden die von uns gesammelten Resultate bereits beleuchtet und visualisiert. Anhand der Einteilung in vier Schweregrade (0 – 3) wurden die unterschiedlichen Antikörpertiter der getesteten Seren aus der COVID-Gruppe verglichen. Hier zeigte sich ein Anstieg der gemessenen Medianwerte von 7,8 AU/ ml (Schweregrad 0) auf 40,1 AU/ ml (Schweregrad 1) auf 70,7 AU/ ml (Schweregrad 2) und zuletzt auf 131 AU/ ml (Schweregrad 3) [77].

Ko et al. untersuchten bei 70 SARS-CoV-2 positiv getesteten Patienten, wobei 15 davon asymptomatisch waren, 49 milde Symptome aufwiesen und 6 eine Pneumonie entwickelt hatten, die Antikörpertiter mittels ELISA-Verfahren. Die Probanden mit Pneumonie wiesen die meisten Antikörper auf, während bei jenen, welche asymptomatisch blieben, die wenigsten detektiert wurden. Hier konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass mit dem Schweregrad der Erkrankung auch die Antikörpertiter für SARS-CoV-2 steigen [79].

De Oliveira et al. führten eine insgesamt einjährige Beobachtungs- und Längsschnittstudie zwischen August 2020 und Juni 2021 durch. Hier wurden 238 Personen analysiert, welche sich von einer COVID-19 Infektion erholt hatten. Eine semiquantitative Messung der SARS-CoV-2-S-IgG Antikörper erfolgte bis zu 90, 90-180 und über 180 Tage nach der Infektion. Die Einteilung der Personen erfolgte in

zwei Gruppen; jene die im Krankenhaus behandelt wurden, und jene, welche ambulant versorgt werden konnten. Resultat der Studie waren höhere Titer und eine höhere Wahrscheinlichkeit der Persistenz von IgG-S1 bei schweren Verläufen einer SARS-CoV-2-Primärinfektion bei ungeimpften Patienten [83].

Auch Amrutha et al. kamen bei einer Längsschnitt-Beobachtungsstudie zu ähnlichen Ergebnissen. Über eineinhalb Jahre hinweg wurden 45 ungeimpfte Patienten in einer Post-COVID-19 Ambulanz nach einer SARS-CoV-2 Infektion auf ihre SARS-CoV-2 Antikörper getestet. Diese Testungen fanden 30, 60 und 90 Tage nach der Infektion statt. Darüber hinaus wurde der Schweregrad der Erkrankung erhoben, wobei alle Probanden im Zuge ihrer akuten Erkrankung initial hospitalisiert wurden. Ebenfalls wurde eine signifikante positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,374 zwischen den Serum-IgG-Spiegeln nach 30 Tagen und dem Schweregrad der Erkrankung festgestellt [82].

Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen der hiesigen Arbeit keine Korrelation der Antikörpertiter für saisonale Coronaviren mit dem Schweregrad der COVID-19 Erkrankung nachgewiesen werden. Der Medianwert lag hier in allen Fällen bei ca. 100 AU/ ml [77].

4.1.2. Einfluss einer vorangegangenen Infektion mit saisonalen Coronaviren auf eine SARS-CoV-2 Infektion

Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass bei einer Infektion mit SARS-CoV-2 auch die Antikörpertiter für das N-Protein der vier endemischen saisonalen Coronaviren simultan ansteigen. Diese Reaktion wurde als eine Kreuzstimulation von B-Zellen interpretiert. Ob diese kreuzstimulierten Antikörper auch funktionell aktiv sind, d.h. ob sie eine Schutzfunktion für den Wirt übernehmen können, kann anhand der vorliegenden Daten nicht differenziert werden. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob vorangegangene Infektionen mit saisonalen Coronaviren einen Einfluss auf den Schweregrad der COVID-19 Erkrankung haben. Außerdem liegen keine Informationen darüber vor, ob diese Kreuzstimulation von Antikörpern auch gegen Epitope anderer viraler Proteine, wie beispielsweise das S-Protein des SARS-CoV-2-Virus, erfolgt [77].

Strömer et al. konnten eine isolierte Reaktivität bei Seren, welche aus der Wintersaison 2018/19 und somit vor der ersten Sequenzierung von SARS-CoV-2 stammen, in SARS-CoV-2-Immunoassays nachweisen. Bei keiner dieser Proben konnten aber SARS-CoV-2-neutralisierende Antikörper detektiert werden, welche für den Schutz vor einer Infektion essenziell sind. Die Analyse der Immunoblot-Ergebnisse zeigte außerdem, dass Seren von SARS-CoV-2-infizierten Patienten gleichzeitig mit den Antigenen von HCoV-229E, HCoV-HKU-1, HCoV-NL63, HCoV-OC43 und SARS-CoV-2 reagieren können [84].

Zu einem ähnlichen Entschluss kommen auch Aguilar-Bretones et al., welche zwar einen Anstieg der Antikörper gegen saisonale Coronaviren während einer Infektion mit SARS-CoV-2 dokumentieren, aber keinen Anstieg der neutralisierenden Antikörper [85]. Ergänzend zeigen die Daten der Studie von Anderson et al. ebenfalls bekräftigende Ergebnisse für unsere Schlussfolgerungen: Es wurden 431 Seren aus dem Jahr 2017 mittels ELISA-Verfahren auf SARS-CoV-2 Antikörper und Antikörper für saisonale HCoV getestet. Im Vergleich dazu wurden Seren der Studienpopulation erneut im Jahr 2020 zum Zeitpunkt einer nachgewiesenen SARS-CoV-2 Infektion mit demselben Verfahren getestet. Jene Probanden, die nach einer SARS-CoV-2-Infektion hospitalisiert wurden, wurden nun mit jenen verglichen, die nicht hospitalisiert wurden. Es fand sich kein Unterschied zwischen den präpandemisch gemessenen Antikörperspiegeln gegen SARS-CoV-2 und gegen saisonale Coronaviren. Sie stellten fest, dass etwa 20 % der Gesamtgruppe präpandemisch nicht-neutralisierende Antikörper besaßen, die mit dem SARS-CoV-2-S- und -N-Protein reagierten. Diese Antikörper standen weder mit einem Schutz vor einer SARS-CoV-2 Infektion bzw. einem milden Krankheitsverlauf noch mit einer stark symptomatischen COVID-19 Erkrankung bis hin zur Hospitalisierung in Verbindung [86].

Ein ADE, wie bereits in Kapitel 1.6.1. definiert, wurde bereits im Kontext mit der Pathogenität von SARS-CoV-2 erörtert und bei anderen Virusinfektionen, z. B. den Dengue-Virus-Serotypen 1-4, nachgewiesen und auch bei SARS-CoV-2 Infektionen diskutiert [59, 87-89]. Bei einer Erstinfektion mit einem der vier Dengue Viren bildet das Immunsystem schützende typspezifische Antikörper, wobei der dominierende Anteil dieser kreuzreaktiv und nicht-neutralisierend ist. Diese verstärken eine

Folgeinfektion mit einem der drei anderen Serotypen des Dengue-Virus, indem sie nach der Bindung an ein Virion-Oberflächenantigen einen IgG-Immunkomplex bilden, welcher mit Fcγ-Rezeptoren die intrazelluläre Infektion erhöht und so durch einen Mechanismus, der als intrinsische ADE bezeichnet wird, zur Schwere der Erkrankung beiträgt [59]. Die intrinsische ADE wurde mit einer 100-fachen Steigerung der Virusproduktion, im Vergleich zu einer 3-fachen bei der extrinsischen, gemessen [90]. Dies spiegelt den Effekt auch objektiviert in Prozentsätzen deutlich wider. Da der Verdacht besteht, dass ein früher und hoher Antikörpertiter mit einem schweren Krankheitsverlauf zusammenhängt, galt es die Fragestellung bezüglich eines ADE auch bei SARS-CoV-2 zu klären [78]. Liu et al. zeigten, dass Anti-Spike-IgG, und insbesondere ihre hohen Titer, schwere akute Pneumonien verursachen können. Außerdem wurde die Wundheilungsreaktion verkürzt und die Bildung von proinflammatorischen Monozyten und Makrophagen in der Lunge gefördert [64]. Darüber hinaus besteht die Vermutung, dass eine vorherige Infektion mit HCoV zu Kreuzstimulation führen könnte, sei es im Sinne der ADE oder der Protektion mit rascher Antikörperbildung [78].

Anderson et al. konnten keine positive Korrelation der Antikörpertiter für saisonale Coronaviren und dem Schweregrad der COVID-19 Erkrankung feststellen [86]. Auch die Ergebnisse aus der hier vorliegenden Arbeit können eine Aggravation der COVID-19 Erkrankung im Sinne eines ADE aufgrund einer vorherigen Infektion mit saisonalen Coronaviren nicht bekräftigen [77].

Zusammenfassend scheint somit eine vorangegangene Infektion mit den endemischen humanpathogenen Coronaviren keinen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung im Rahmen einer SARS-CoV-2 Infektion zu haben.

4.2. Antikörpertiter im zeitlichen Verlauf

Bei zehn Spendern wurden die Antikörperspiegel aller fünf getesteten Coronaviren über einen Zeitraum von bis zu sechs Monaten ausgewertet. Bei der Mehrzahl der Fälle waren erhöhte Antikörperspiegel gegen HCoV im Ausgangsserum nachweisbar, welche konsekutiv abnahmen. Es kam zu einem signifikanten Abfall der Antikörpertiter um im Median 38,5 AU/ ml von der ersten bis zur letzten Messung

(Abbildung 11). Auch der hier beschriebene rasante Abfall der SARS-CoV-2 Antikörper, sowie der SARS-CoV und der MERS-CoV Antikörper wurde in einer Vielzahl von Publikationen dokumentiert. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings erstmals gezeigt werden, dass dieser Rückgang auch die zunächst erhöhten Antikörper gegen saisonale Coronaviren betrifft [77, 81, 82, 84, 91-94].

Ob dieser rasche Abfall der Antikörpertiter auch einen Schutz vor einer erneuten SARS-CoV-2 Infektion beeinflusst, können wir anhand dieser Daten nicht beantworten. Nicht auszuschließen wäre ein umso schnellerer Anstieg der Antikörper bei einem zweiten Kontakt mit dem Virus, bzw. einer Vakzinierung, aufgrund eines möglichen Booster Effekts [84]. In einer großen epidemiologischen Studie in den USA wurde landesweit auf eine große Datenbank mit Längsschnittdaten von Patienten zugegriffen, welche sich von einer COVID-19 Infektion erholt hatten. Alfego et al. konnten aufzeigen, dass bei 39.086 Proben nach 300 Tagen eine 87%ige Seropositivität für Antikörper gegen das S-Protein bestand [95]. Holmer et al. haben die Daten von 27 Studien zu Antikörperspiegeln gegen SARS-CoV-2 und den Schutz vor einer Reinfektion mit neuen Varianten in einem Review zusammengefasst. Hier imponierte, dass eine vorangegangene Infektion mit der Delta-Variante oder Omicron-Variante BA.1 oder BA.2 einige Monate lang vor einer Reinfektion mit der Omicron-Variante schützt. Dieser Schutz war jedoch geringer als bei den vorherigen Varianten und nur für einen begrenzten Zeitraum gegeben. Die wichtigste Schlussfolgerung, welche die Autoren aus der Studie ziehen, ist, dass das Vorhandensein von Antikörpern nicht ausreicht, um den Grad des Schutzes einer Person vor einer Reinfektion abzuschätzen [96]. Dieses Phänomen sollte insbesondere bei der Impfstoffentwicklung und der Frage nach notwendigen Booster-Impfungen beachtet werden. Um eine Herdenimmunität zu erreichen, ist eine effiziente langlebige humorale Immunantwort mit einer regelrechten Antikörperbildung essenziell.

4.3. Humorale Immunantwort und Immunität

Das auffälligste Ergebnis der vorliegenden Studie ist die hochsignifikante Korrelation der Antikörperspiegel zwischen allen getesteten Coronaviren, einschließlich der Antikörper gegen SARS-CoV-2 in der COVID-Gruppe. Die

Korrelation in letzterer ist etwas geringer, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass sich die COVID-19 Patienten noch in der postinfektiösen Phase befanden, in der andere Faktoren wie der Zeitpunkt der Blutentnahme und der Schweregrad der Erkrankung die Antikörperspiegel beeinflussen. Es kann spekuliert werden, dass sich die SARS-CoV-2 Antikörpertiter dieser Patienten in einem späteren postinfektiösen Zeitraum an die Antikörpertiter der saisonalen Coronaviren anpassen werden [77].

Wie bereits in anderen Studien gezeigt wurde, fanden auch wir in den Post-COVID-19 Seren große individuelle Unterschiede der Antikörperspiegel [81, 84, 97, 98]. Basierend auf unserer Erkenntnis, dass Personen mit keiner oder nur geringer Immunantwort gegen SARS-CoV-2 auch geringere Antikörperspiegel gegen saisonale Coronaviren aufweisen, schlussfolgern wir, dass es eine individuell angepasste humorale Immunantwort gegen die gesamte Familie der humanen Coronaviren gibt. Dementsprechend könnte man zwischen *High-* und *Low-Coronavirus-Respondern* unterscheiden, wobei letztere offensichtlich nicht schlechter geschützt sind, sondern nur geringere Antikörperspiegel benötigen, um das Virus zu kontrollieren. Diese Beobachtung könnte für Folgestudien zur Bewertung des durch den SARS-CoV-2 Impfstoff induzierten Schutzes durch das humorale Immunsystem von Bedeutung sein. Dies scheint jedoch keine allgemeine Eigenschaft des Wirts zu sein und sich nicht gegenüber Virusinfektionen mit Nicht-Coronaviren widerzuspiegeln, da wir keine Korrelation mit dem Gehalt an Antikörpern gegen das Masernvirus feststellen konnten. Um einen aussagekräftigen Vergleich anstellen zu können, wurden aufgrund der mehr als 90%igen Seroprävalenz bei Erwachsenen die Masern-Antikörper als Korrelat ausgewählt [77].

Eine andere Interpretation der gesammelten Daten führt zu dem Begriff der trainierten Immunität, auch *trained immunity* genannt. Mihai G. Netea et al. unterscheiden 2011 in ihrer Publikation diese von der klassischen adaptiven Immunabwehr, welche eine deutlich höhere Spezifität und Verstärkung vorweist. Das Gedächtnis der *trained immunity* wird als eine verstärkte Reaktion auf eine Sekundärinfektion definiert, die sowohl gegenüber demselben Mikroorganismus als auch gegenüber einem anderen Mikroorganismus ausgeübt werden kann

(Kreuzprotektion) [99]. Dieses Konzept der *trained immunity* beruht auf der langfristigen funktionellen Umstellung der Zellen des angeborenen Immunsystems. Hierbei kommt es nach der Exposition mit einem sterilen oder infektiösen Stimulus zu einer epigenetischen Veränderung von Transkriptionswegen, welche nach der Rückkehr der Zelle in einen inaktiven Zustand zu einer veränderten folgenden Immunreaktion führen kann. Diese erneute Reaktion auf einen nachfolgenden unspezifischen Reiz kann so modifiziert werden, dass die Immunzellen schwächer oder stärker als ursprünglich reagieren, was in kontext- und zeitangepassten Reaktionen resultiert. Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort, wird die *trained immunity* nicht durch Genrekombination, sondern durch epigenetische Veränderungen von Transkriptionswegen vermittelt [77, 100]. Darüber hinaus ist anzumerken, dass die *trained immunity* reversibel und von vergleichsweise kurzer Dauer ist [101].

Im Zusammenhang mit diesem Phänomen, gibt es zusammengefasst von Benn et al. umfangreiche Sammlungen epidemiologischer Daten, die besagen, dass Lebendimpfstoffe, wie zum Beispiel der BCG-, Masern-, Pocken- oder Polio-Schluck-Impfstoff, positive, unspezifische Schutzwirkungen gegen andere Infektionen als die Zielerkrankung haben [102].

Es gibt Hinweise darauf, dass auch der Influenza-Impfstoff diese *trained immunity* gegen SARS-CoV-2 induziert, was zu einem relativen Schutz gegen COVID-19 führen kann [103]. Folglich könnten die hiesigen Ergebnisse als *trained immunity* interpretiert werden, die durch frühere Infektionen mit saisonalen Coronaviren induziert wurde. Es könnte daher sinnvoll sein, vor einer Impfung gegen SARS-CoV-2 die vorbestehende Immunität gegen saisonale Coronaviren zu bestimmen, um festzustellen, ob eine geringe Reaktion auf einen Impfstoff lediglich eine allgemeine Konstitution des Patienten als *Coronavirus-Low-Responder* widerspiegelt [77].

4.4. Schlussfolgerungen

Es lässt sich aus den Ergebnissen der hier vorgestellten Arbeit schließen, dass es keinen Hinweis auf eine gesteigerte Immunität für SARS-CoV-2 bei vorangegangenen Infektionen mit den saisonalen Coronaviren gibt. Somit schützen bereits vorhandene Antikörper gegen saisonale Coronaviren nicht vor dem neuen Coronavirus, auch wenn die Antikörpertiter der saisonalen Coronaviren im Rahmen einer SARS-CoV-2 Infektion als Zeichen einer Kreuzstimulation ansteigen. Folglich scheint es somit eine *trained immunity* zu geben, wobei sich in diesem Zusammenhang die individuelle humorale Immunantwort im Laufe der Lebenszeit aufgrund von externen und internen Einflüssen anpassen kann. Man kann außerdem in Bezug auf die quantitative Antikörperbildung von sogenannten *High-* und *Low-Respondern* sprechen. Dies sollte insbesondere in zukünftigen Schritten im Bereich der SARS-CoV-2 Vakzinierung und Immunisierung beachtet werden.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Tyrrell DA, Bynoe ML, Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *British Medical Journal*. 1965, 1(5448): 1467-70.
2. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*. 2021; 61(3): 180-202.
3. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*. 2020; 24: 91-98.
4. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 2015; 1282: 1-23..
5. Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020; 85: 104502.
6. Shi Z, Hu Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Research*. 2008; 133(1): 74-87.
7. Paden CR, Yusof MFBM, Al Hammadi ZM, Queen K, Tao Y, Eltahir YM, Elsayed EA, Marzoug BA, et al. Zoonotic origin and transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the UAE. *Zoonoses and Public Health*. 2018; 65(3): 322-333.
8. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. 2020; 395(10223): 470-473.
9. Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022; 7(1): 26.
10. Raskin S. Genetics of COVID-19. *Journal de Pediatria*. 2021; 97(4): 378-386.
11. Keck JG, Makino S, Soe LH, Fleming JO, Stohlman SA, Lai MM. RNA recombination of coronavirus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1987; 218: 99-107.
12. Bárcena M, Oostergetel GT, Bartelink W, Faas FGA, Verkleij A, Rottier PJM, Koster AJ, Bosch BJ. Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106(2): 582-587.
13. De Groot RJ, Luytjes W, Horzinek MC, Van der Zeijst BA, Spaan WJ, Lenstra JA. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *Journal of Molecular Biology*. 1987; 196(4): 963-966.

14. Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F. Human coronaviruses. *Pathologie-Biologie*. 2009; 57(2): 149-160.
15. Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, Rottier P, Warren G. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature*. 1984; 308(5961): 751-752.
16. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdiá-Báguena C, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLOS Pathogens*. 2014; 10(5): e1004077.
17. Wu W, Cheng Y, Zhou H, Sun C, Zhang S. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Virology Journal*. 2023; 20(1): 6.
18. Kubo H, Yamada YK, Taguchi F. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *Journal of Virology*. 1994; 68(9): 5403-5410.
19. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022; 23(1): 3-20.
20. Vabret A, Dina J, Mourez T, Gouarin S, Petitjean J, Van der Werf S, Freymuth F. Inter- and intra-variant genetic heterogeneity of human coronavirus OC43 strains in France. *Journal of General Virology*. 2006; 87(11): 3349-3353.
21. Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ, De Groot RJ. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *Journal of Virology*. 1998; 72(5): 4508-4514.
22. Schroeder S, Mache C, Kleine-Weber H, Corman VM, Muth D, Richter A, Drosten C, et al. Functional comparison of MERS-coronavirus lineages reveals increased replicative fitness of the recombinant lineage 5. *Nature Communications*. 2021; 12(1): 5324.
23. Fielding BC. Human coronavirus NL63: a clinically important virus? *Future Microbiology*. 2011; 6(2): 153-159.
24. Kesheh MM, Hosseini P, Soltani S, Zandi M. An overview on the seven pathogenic human coronaviruses. *Reviews in Medical Virology*. 2022; 32(2): e2282.
25. Killerby ME, Biggs HM, Hanyes A, Dahl RM, Mustaquim D, Gerber SI, Watson JT. Human coronavirus circulation in the United States 2014-2017. *Journal of Clinical Virology*. 2018; 101: 52-56.
26. Hoehl S, Ciesek S. Die Virologie von SARS-CoV-2. *Der Internist*. 2020; 17(6): 378-384.

27. Guthmiller JJ, Wilson PC. Remembering seasonal coronaviruses. *Science*. 2020; 370(6522): 1272-1273.
28. Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1966; 121(1): 190-193.
29. Woo PCY, Lau SKP, Chu C, Chan K, Tsoi H, Huang Y, Wong BHL, Poon RWS, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of Virology*. 2005; 79(2): 884-895.
30. Pyrc K, Berkhout B, Van der Hoek L. Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*. 2004; 10(4): 368-373.
31. Gorse GJ, Patel GB, Vitale JN, O'Connor TZ. Prevalence of antibodies to four human coronaviruses is lower in nasal secretions than in serum. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010; 17(12): 1875-1880.
32. Vabret A, Mourez T, Dina J, Freymuth F. Coronavirus humains. *Virologie*. 2005; 9(4): 273-287.
33. Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*. 2012; 367(19): 1814-1820.
34. Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yuen K. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015; 28(2): 465-522.
35. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020; 382(8): 727-733.
36. World Health Organisation. Novel Coronavirus (2019-nCoV) situation report - 6, 26 January 2020. Geneva: WHO; 2020 [zitiert 20.07.2022]. Verfügbar unter: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200126-sitrep-6-2019--ncov.pdf?sfvrsn=beae0c_4..
37. Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Krishnan UM. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*. 2020; 179: 85-100.
38. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(3): 325-328.
39. Rahimi A, Mirzazadeh A, Tavakolpour S. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics*. 2021; 113(1 Pt 2): 1221-1232.

40. Chan JF, Kok K, Zhu Z, Chu H, To KK, Yuan S, Yuen K. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes and Infections*. 2020; 9(1): 221-236.
41. Fisher D, Heymann D. Q&A: The novel coronavirus outbreak causing COVID-19. *BMC Medicine*, 2020; 18(1): 57.
42. Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, Dahal S, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate Medical Journal*. 2020; 96(1142): 753-758.
43. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, Yu J, Kang M, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *New England Journal of Medicine*. 2020; 382(12): 1177-1179.
44. Atzrodt CL, Maknojia I, McCarthy RDP, Oldfield TM, Po J, Ta KTL, Stepp HE, Clements TP. A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2. *FEBS Journal*. 2020; 287(17): 3633-3650.
45. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020; 367(6483): 1260-1263.
46. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*. 2021; 19(3): 141-154.
47. Martines RB, Ritter JM, Matkoiv E, Gary J, Bollweg BC, Bullock H, Goldsmith CS, Silva-Flannery L. Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal Coronavirus Disease, United States. *Emerging Infectious Disease*. 2020; 26(9): 2005-2015.
48. Chan JF, Yuan S, Kok K, To KK, Chu H, Yang J, Xing F, Liu J, Yip CC, Poon RW, Tsoi H. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020; 395(10223): 514-523.
49. Sharma A, Farouk IA, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*. 2021; 13(2): 202.
50. Zumla A, Hui DS, Azhar E, Memish ZA, Mauere M. Reducing mortality from 2019-nCoV: host-directed therapies should be an option. *Lancet*. 2020; 395(10224): e35-36.
51. Lei J, Li J, Li X, Qi X. CT Imaging of the 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia. *Radiology*. 2020; 295(1): 18.
52. Hahn WO, Wiley Z. COVID-19 Vaccines. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2022; 36(2): 481-494.

53. Mouffak S, Shubbar Q, Saleh E, El-Awady R. Recent advances in management of COVID-19: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021; 143: 112107.
54. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez S, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, Belanger S, Abbott RK, Kim C, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020; 183(4): 996-1012.
55. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. 2016; 45(3): 471-482.
56. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125(2 Suppl 2): S41-52.
57. Esmat K, Jamil B, Kheder RK, Kombe AJ, Zeng W, Ma H, Jin T., Immunoglobulin A response to SARS-CoV-2 infection and immunity. *Heliyon*. 2024; 10(1): e24031.
58. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nature Reviews Immunology*. 2012; 12(7): 517-531.
59. Halstead SB. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiology Spectrum*. 2014; 2(6): AID-0022-2014. doi:10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.
60. Dutta D, Ghosh A, Dutta C, Sukla S, Biswas S. Cross-reactivity of SARS-CoV-2 with other pathogens, especially dengue virus: A historical perspective. *Journal of Medical Virology*. 2023; 95(2): e28557.
61. Zhang Y, Chen Y, Li Y, Huang F, Luo B, Yuan Y, Xia B, Ma X, Yang T, Yu F, Liu J, Liu B, Song Z. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2021; 118(23): e2024202118.
62. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, Wang X, Yuan J, Li T, Li J, Qian S, Hong C, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Disease*. 2020; 71(16): 2027-2034.
63. Moog C, Dereuddre-Bosquet N, Teillaud J-L, Biedma ME, Holl V, Van Ham G, Heyndrickx L, Van Dorsselaer A, et al. Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. *Mucosal Immunology*. 2014; 7(1): 46-56.
64. Lou B, Li T-D, Zheng S-F, Su Y-Y, Li Z-Y, Liu W, Yu F, Ge S-X, Zou Q-D, Yuan Q, Lin S, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection after exposure and post-symptom onset. *European Respiratory Journal*. 2020; 56(2): 2000763.

65. Hueston L, Kok J, Guibone A, McDonald D, Hone G, Goodwin J, Carter I, Basile K, Sandaradura I, et al. The Antibody Response to SARS-CoV-2 Infection. *Open Forum Infectious Diseases*. 2020; 7(9): ofaa387.
66. Kellam P, Barclay W. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. *Journal of General Virology*. 2020; 101(8): 791-797.
67. Wang K, Long Q-X, Deng H-J, Hu J, Gao Q-Z, Zhang G-J, He C-L, Huang L-Y, Hu J-L, et al. Longitudinal Dynamics of the Neutralizing Antibody Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2021; 73(3): e531-539.
68. Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Loens K, Jebbink MF, Matser A, Kinsella CM, et al. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nature Medicine*. 2020; 26(11): 1691-1693.
69. Weissleder R, Lee H, Ko J, Pittet MJ. COVID-19 diagnostics in context. *Science Translational Medicine*. 2020; 12(546): eabc1931.
70. Jayawardena I, Wilson K, Plebanski M, Grøndahl M, Corrie S. Morphology and Composition of Immunodiffusion Precipitin Complexes Evaluated via Microscopy and Proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2021; 20(5): 2618-2627.
71. Bastos ML, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui L-P, Johnston JC, Lan Z, Law S, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020, 370: m2516.
72. Ausubel FMBR, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience; 1991.
73. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
74. Warnke C, Pawlita M, Dehmel T, Posevitz-Fejfar A, Hartung H-P, Wiendl H, Kieseier BC, Adams O. An assay to quantify species-specific anti-JC virus antibody levels in MS patients. *Multiple Sclerosis Journal*. 2013; 19(9): 1137-1144.
75. Warnke C, Dehmel T, Posevitz-Fejfar A, Chan A, Berthele A, Schmidt S, Haas J, Kronsbein HC, Seitz F, et al. Anti-JC-virus antibody prevalence in a German MS cohort. *Multiple Sclerosis Journal*. 2012; 18(7): 1054-1055.
76. Smith DR. Restriction endonuclease digestion of DNA. *Methods in Molecular Biology*. 1993; 18: 427-431.
77. Adams O, Andrée M, Rabl D, Ostermann PN, Schaal H, Lehnert E, Ackerstaff S, Müller L, Fischer JC. Humoral response to SARS-CoV-2 and seasonal coronaviruses in COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*. 2022. 94(3): 1096-1103.

78. Choe PG, Kang CK, Suh HJ, Jung J, Kang E, Lee SY, Song K-H, Kim HB, Kim NJ, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 at 8 Weeks Postinfection in Asymptomatic Patients. *Emerging Infectious Diseases*. 2020; 26(10): 2484-2487.
79. Ko J-H, Joo E-J, Park S-J, Baek JY, Kim WD, Jee J, Kim CJ, Jeong C, Kim Y-J, Shon HJ. Neutralizing Antibody Production in Asymptomatic and Mild COVID-19 Patients, in Comparison with Pneumonic COVID-19 Patients. *Journal of Clinical Medicine*. 2020; 9(7): 2268.
80. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, Wu G-C, Deng K, Chen Y-K, Liao P, Qiu J-F, Lin Y, Cai X-F, Wang D-Q, Hu Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine*. 2020; 26(6): 845-848.
81. Ripperger TJ, Uhrlaub JL, Wantanbe M, Wong R, Castaneda Y, Pizzato HA, Thompson MR, Bradshaw C, Weinkauff CC, Bime C, Erickson HL, et al. Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. *Immunity*. 2020; 53(5): 925-933.
82. Amrutha S, Kaur K, Aggarwal D, Sodhi MK, Jaswal S, Saini V. Serial evaluation of antibody titres in patients recovered from COVID-19 and their correlation with disease severity. *Monaldi Archives for Chest Disease*. 2024; 94(4): 2677.
83. De Oliveira MI, Aciole MR, Neves PAF, Palmares Oliveira E Silva V, Palmares Oliveira E Silva M, Barros de Lorena VM, Ramos de Araújo PS. A stronger antibody response in increased disease severity of SARS-CoV-2. *BMC Infectious Diseases*. 2024; 24(1): 17.
84. Strömer A, Rose R, Grobe O, Neumann F, Fickenscher H, Lorentz T, Krumbholz A. Kinetics of Nucleo- and Spike Protein-Specific Immunoglobulin G and of Virus-Neutralizing Antibodies after SARS-CoV-2 Infection. *Microorganisms*. 2020; 8(10): 1572.
85. Aguilar-Bretones M, Westerhuis BM, Raadsen MP, De Bruin E, Chandler FD, Okba NM, Haagmans BL, et al. Seasonal coronavirus-specific B cells with limited SARS-CoV-2 cross-reactivity dominate the IgG response in severe COVID-19. *Journal of Clinical Investigation*. 2021; 131(21): e150613.
86. Anderson EM, Goodwin EC, Verma A, Arevalo CP, Bolton MJ, Weirick ME, Gouma S, McAllister CM, Christensen SR, et al. Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection. *Cell*. 2021; 184(7): 1858–1864.
87. Yip MS, Leung HL, Li PH, Cheung CY, Dutry I, Li D, Daëron M, Bruzzone R, Peiris JS, Jaume M. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS. *Hong Kong Medical Journal*. 2016; 22(3 Suppl 4): 25-31.

88. Halstead SB. Dengue hemorrhagic fever: two infections and antibody dependent enhancement, a brief history and personal memoir. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2002; 54(3): 171-179.
89. Sette A, Crotty S. Pre-existing immunity to SARS-CoV-2: the knowns and unknowns. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20(8): 457-458.
90. Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, Tassaneetrithep B, Marovich MA. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Journal of Virology*. 2011; 85(4): 1671-1683.
91. Cao WC, Liu W, Zhang P-H, Zhang F, Richardus JH. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *New England Journal of Medicine*. 2007; 357(11): 1162-1163.
92. Wu LP, Wang N-C, Chang Y-H, Tian X-Y, Na D-Y, Zhang L-Y, Zheng L, Lan T, ang L-F, Liang G-D. Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; 13(10): 1562-1564.
93. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, Hemmings O, O'Byrne A, Kouphou N, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nature Microbiology*. 2020; 5(12): 1598-1607.
94. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, Valaperti A, Schreiner J, Wolfensberger A, Raeber ME, Adamo S, Weigang S, et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2021; 147(2): 545-557.
95. Alfego D, Sullivan A, Poirier B, Williams J, Adcock D, Letovsky S. A population-based analysis of the longevity of SARS-CoV-2 antibody seropositivity in the United States. *EClinicalMedicine*. 2021; 36: 100902.
96. Holmer HK, Mackey K, Fiordalisi CV, Helfand M. Major Update 2: Antibody Response and Risk for Reinfection After SARS-CoV-2 Infection-Final Update of a Living, Rapid Review. *Annals of Internal Medicine*. 2023; 176(1): 85-91.
97. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, Mills R, Erica T, et al. Dynamics and significance of the antibody response to SARS-CoV-2 infection. *MedRxiv*; 2020.
98. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E, Arnthorsson AO, Helgason D, Bjarnadottir K, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *New England Journal of Medicine*. 2020; 383(18): 1724-1734.
99. Netea MG, Quintin J, Van der Meer JWM. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host & Microbe*. 2011; 9(5): 355-61.

100. Dagenais A, Villalba-Guerrero C, Olivier M. Trained immunity: A "new" weapon in the fight against infectious diseases. *Frontiers in Immunology*. 2023; 14: 1147476.
101. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, Jossten LAB, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20(6): 375-388.
102. Benn CS, Netea MG, Selin LK, Aaby P. A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends in Immunology*. 2013; 34(9): 431-439.
103. Debisarun PA, Gössling KL, Bulut O, Kilic G, Zoodma M, Liu Z, Oldenburg M, Rüchel N, Zhang B, Xu C-J, Struycken B, et al. Induction of trained immunity by influenza vaccination - impact on COVID-19. *PLOS Pathogens*. 2021; 17(10): e1009928.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ingo Drexler, meinen tiefsten Dank für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit im August, 2023, danken. Seine fachliche Expertise war eine bereichernde Ergänzung zu der bereits erfolgten Arbeit.

Insbesondere hervorheben möchte ich die bedingungslose Unterstützung meines ursprünglichen Doktorvaters, Herrn Prof. Dr. Ortwin Adams. Mit seiner Geduld, seiner langjährigen Erfahrung und seiner Herzlichkeit hat er die Erstellung und Gestaltung dieser Arbeit zu einer bereichernden Erfahrung gemacht.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg, welcher freundlicherweise die Co-Betreuung dieser Arbeit übernommen hat.

Ein besonderer Dank gilt auch den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe am Institut für Virologie am Universitätsklinikum Düsseldorf, insbesondere Frau Dr. Lisa Müller und Herrn Dr. Marcel Andree, für ihre wertvollen Ratschläge und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente. Ihre fachlichen Beiträge sowie die angenehme Zusammenarbeit haben einen bedeutenden Einfluss auf die vorliegende Arbeit gehabt.

Auch meiner Familie und meinen Freunden möchte ich meinen Dank aussprechen. Sie haben mich motiviert und standen stets hinter mir, wofür ich ebenfalls dankbar bin.

Zum Schluss gilt mein Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, aber hier nicht namentlich erwähnt sind. Ihr Beitrag ist von unschätzbarem Wert, und ich weiß Ihre Unterstützung sehr zu schätzen.