

Humane Coronaviren: Entwicklung und Anwendung eines Immunoassays und Untersuchungen zur zellvermittelten Immunität



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN

(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III

– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON

CHRISTIAN LEHMANN

AUS LANDSHUT

REGENSBURG, JULI 2008

Humane Coronaviren: Entwicklung und Anwendung eines Immunoassays und Untersuchungen zur zellvermittelten Immunität



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN

(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III

– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON

CHRISTIAN LEHMANN

AUS LANDSHUT

REGENSBURG, JULI 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 16.07.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 09.09.2008

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Rosemarie Baumann (1. Vorsitzende)
Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (1. Prüfer,
Erstgutachten)
Prof. Dr. Hans Wolf (2. Prüfer, Zweitgutachten)
Prof. Dr. Gernot Längst (3. Prüfer)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, im Juli 2008

(Christian Lehmann)

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| I. EINLEITUNG..... | 1 |
| 1. Coronaviren..... | 1 |
| 1.1 Klassifikation..... | 1 |
| 1.2 Morphologie und Struktur | 2 |
| 1.3 Genomaufbau..... | 3 |
| 1.4 Replikation..... | 4 |
| 2. Humane Coronaviren und ihre klinische Bedeutung..... | 5 |
| 2.1 HCoV-229E und HCoV-OC43 verursachen Erkältungskrankheiten..... | 5 |
| 2.2 Das SARS-assoziierte Coronavirus | 6 |
| 2.3 Neue Coronaviren der post-SARS-Ära: HCoV-NL63 und HCoV-HKU1.... | 8 |
| 3. Diagnostik von HCoV-Infektionen | 9 |
| 3.1 Virusisolierung und Elektronenmikroskopie | 9 |
| 3.2 Nukleinsäurenachweis mittels RT-PCR..... | 10 |
| 3.3 Serologische Methoden | 10 |
| 3.4 Nachweis erregerspezifischer T-Zellen..... | 12 |
| 4. Therapie und Impfstoffentwicklung | 12 |
| 5. Zielsetzung | 14 |
| | |
| II. MATERIAL UND METHODEN..... | 16 |
| 1. Viruspropagierung und virale RNA | 16 |
| 1.1 Coronavirusstämme und Anzucht in Zellkultur..... | 16 |
| 1.2 Isolierung viraler RNA..... | 16 |
| 2. Klonierung von HCoV Genen..... | 17 |
| 2.1 Reverse Transkription und PCR | 17 |
| 2.1.1 Oligonukleotide..... | 17 |
| 2.1.2 cDNA-Synthese | 17 |
| 2.1.3 PCR-Amplifikation | 17 |
| 2.2 Vektoren | 18 |
| 2.3 Restriktionsverdau und Ligation..... | 19 |
| 2.4 <i>E. coli</i> -Stämme und Transformation | 20 |
| 2.5 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA | 20 |
| 2.6 Herstellung von Dauerkulturen | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Expression von HCoV Genen | 21 |
| 3.1 Expressionsstämme und Transformation | 21 |
| 3.2 Überexpression von HCoV Genen und Expressionsanalyse | 22 |
| 3.2.1 Expression im Minimaßstab..... | 22 |
| 3.2.2 Expressionsanalyse mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot | 23 |
| 4. Reinigung rekombinanter Proteine | 25 |
| 4.1 Zellaufschluss..... | 25 |
| 4.2 Affinitätschromatographie | 26 |
| 4.3 Ionen-Austauscher-Chromatographie..... | 27 |
| 4.4 Gelfiltration | 27 |
| 5. Aufkonzentrierung und Analyse von gereinigten rekombinanten Proteinen | 28 |
| 5.1 Aufkonzentrierung..... | 28 |
| 5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 28 |
| 5.2.1 Bicinchoninsäure (BCA)-Assay..... | 28 |
| 5.2.2 Photometrische Bestimmung..... | 28 |
| 5.3 Überprüfung der Reinheit | 29 |
| 6. Herstellung von Line-Immunoassay-Streifchen..... | 29 |
| 7. Durchführung des Line-Immunoassays | 30 |
| 7.1 Humane Seren..... | 30 |
| 7.2 Assaybedingungen, Antikörper und Antiseren | 30 |
| 7.3 Aviditätsassay..... | 31 |
| 7.4 Quantifizierung..... | 32 |
| 8. T-Zell-Diagnostik..... | 32 |
| 8.1 Blutentnahme und Spender | 32 |
| 8.2 Peptide und Antigene | 32 |
| 8.3 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten | 34 |
| 8.4 Stimulation von T-Zellen und Detektion von IFN- γ -Produktion mittels <i>ELISPOT</i> | 35 |
| 9. Computerprogramme, Datenbanken und Internetressourcen..... | 36 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| III. | ERGEBNISSE..... | 37 |
| 1. | Sequenzanalyse der geklonten Nukleokapsid Gene | 37 |
| 2. | Herstellung rekombinanter Antigene | 38 |
| 3. | Etablierung des HCoV-Line-Immunoassays..... | 39 |
| 3.1 | HCoV-OC43 und HCoV-229E | 39 |
| 3.2 | SARS-CoV..... | 41 |
| 3.3 | HCoV-NL63 | 42 |
| 3.4 | Testevaluierung mit Humanseren gesunder Spender..... | 42 |
| 3.5 | Inhibierung von Kreuzreaktionen | 43 |
| 3.5.1 | Erhöhung der NaCl Konzentration..... | 43 |
| 3.5.2 | Harnstoffelution | 44 |
| 4. | HCoV-Line-Immunoassay: Anwendungen..... | 46 |
| 4.1 | HCoV-Seroprävalenz..... | 46 |
| 4.1.1 | Gesunde Spender | 46 |
| 4.1.2 | HIV-positive Spender..... | 48 |
| 4.1.3 | SARS-CoV-Seroprävalenz | 49 |
| 4.2 | Rekonvaleszente SARS-Patienten | 50 |
| 4.3 | Antikörperprofile in SARS-Patienten und Auswirkung vorangehender HCoV-Infektionen auf den klinischen Verlauf der Erkrankung..... | 51 |
| 4.4 | HCoV-NL63 und Kawasaki Disease | 55 |
| 5. | T-Zell-Diagnostik..... | 56 |
| 5.1 | Stimulation mit rekombinanten Nukleokapsid Proteinen..... | 56 |
| 5.2 | Stimulation mit HLA-Klasse-I restringierten Peptiden | 57 |
| 5.3 | Stimulation mit 15-mer Peptiden..... | 60 |
| IV. | DISKUSSION..... | 62 |
| 1. | Etablierung des HCoV-Line-Immunoassays und Nukleokapsid Proteine als Antigene..... | 62 |
| 1.1 | Der Line-Immunoassay als Detektionssystem | 62 |
| 1.2 | Nukleokapsid Proteine als Antigene | 63 |
| 1.2.1 | Sensitivität und Spezifität..... | 65 |
| 1.2.2 | Inhibierung von Kreuzreaktionen | 69 |
| 2. | HCoV-Seroprävalenz | 70 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3. | Antikörperprofile in Seren akut erkrankter und rekonvaleszenter SARS-Patienten und Einfluss von vorausgehenden HCoV-Infektionen auf den klinischen Verlauf von SARS | 75 |
| 4. | HCoV-NL63 und Kawasaki Disease..... | 79 |
| 5. | T-Zell-Diagnostik..... | 81 |
| V. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 84 |
| VI. | LITERATURVERZEICHNIS..... | 87 |
| VII. | ANHANG..... | 103 |
| VIII. | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 105 |
| IX. | PUBLIKATIONEN..... | 108 |
| X. | DANKSAGUNG..... | 109 |

I. EINLEITUNG

1. Coronaviren

Coronaviren wurden erstmals in den 1930er und 1940er Jahren bei Tieren im Zusammenhang mit Erkrankungen der Atemwege, des Verdauungstraktes und des zentralen Nervensystems isoliert und beschrieben. Ökonomisch haben tierpathogene Coronaviren immer noch große Bedeutung, da sie Rinder, Geflügel und Schweine infizieren und großen wirtschaftlichen Schaden anrichten können (Lai *et al.*, 2007). Humanpathogene Coronaviren (HCoV) sind seit den 1960er Jahren als wichtige Erreger selbstlimitierender Erkältungskrankheiten des Menschen bekannt (van der Hoek, 2007). Das Bild von diesen eher harmlosen Atemwegspathogenen wurde 2003 empfindlich gestört, als ein bis dato unbekanntes Coronavirus, SARS-CoV, als Erreger der schweren Atemwegsinfektion SARS (Severe Acute Respiratory Sndrome) identifiziert wurde (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003). Ein durch die SARS-Epidemie ausgelöster „Boom“ in der Coronavirus-Forschung führte zur Entdeckung zweier weiterer humaner Coronavirusspezies und mehreren tierpathogenen CoV (Pyrce *et al.*, 2007b).

1.1 Klassifikation

Die Ordnung *Nidovirales* wird aus den Familien *Arteriviridae*, *Roniviridae* und *Coronaviridae* gebildet, wobei letztere in die Genera *Torovirus* und *Coronavirus* unterteilt ist. Basierend auf serologischen Kreuzreaktivitäten und Genomanalysen, werden Coronaviren in drei unterschiedliche Gruppen eingeordnet. Gruppe I umfasst neben den beiden humanen Coronaviren 229E und NL63 mehrere Tierpathogene, wie TGEV und FIPV. In Gruppe II werden ebenfalls Coronaviren mit veterinärmedizinischer Relevanz (z. B. MHV, BCoV) und die humanpathogenen Vertreter HCoV-OC43 und -HKU1 zusammengefasst. Vertreter der Gruppe III (z. B. IBV und TCoV) infizieren ausschließlich Vögel (Gonzales *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2007; Weiss & Navas-Martin, 2005). Das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) ist mit allen anderen bisher sequenzierten Coronaviren entfernt verwandt. Aufgrund von größeren Sequenzunterschieden wurde für SARS-CoV zunächst eine

neue, eigenständige Gruppe IV postuliert. Spätere Genomanalysen legten eine gewisse Verwandtschaft zu Gruppe-II-Viren nahe (Eickmann *et al.*, 2003). SARS-CoV wird nun als einziger Vertreter der Gruppe IIb klassifiziert (Gorbalenya *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006).

1.2 Morphologie und Struktur

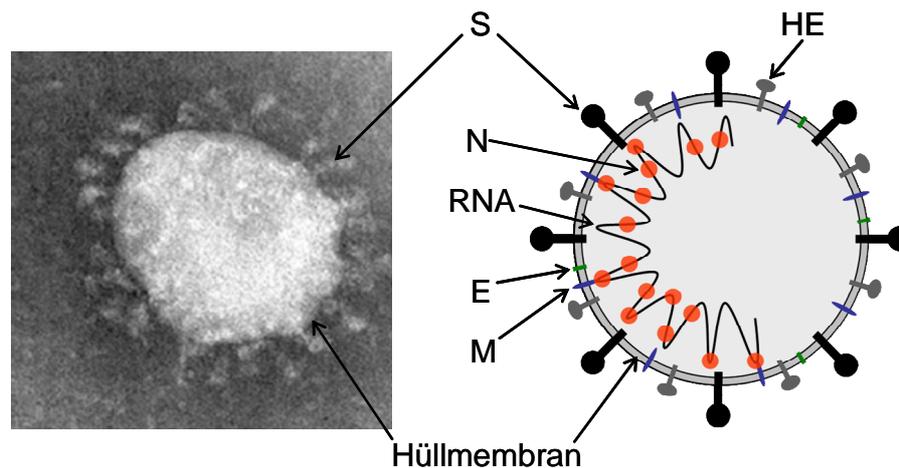


Abb. I-1. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines SARS-CoV-Partikels und schematische Darstellung eines CoV-Virions. Das einzelsträngige, positiv orientierte RNA-Genom bildet zusammen mit basischen Nukleokapsid (N) Phosphoproteinen das Nukleokapsid. An der Innenseite der Lipiddoppelschicht interagiert das Membran (M) Protein mit N. Ebenfalls in die Membran eingelagert sind das Envelope (E) Protein, sowie das Spike (S) Protein. Das Hämaggglutinin-Esterase (HE) Glykoprotein kommt bei einigen Gruppe-II-Viren vor, nicht jedoch bei SARS-CoV. (Elektronenmikroskopische Aufnahme: Dr. Fred Murphy, CDC, Atlanta, GA, USA. Durchmesser ca. 120 nm).

Die kugelförmigen Virionen der Coronaviren haben einen Durchmesser von 80-160 nm. (Abb. I-1). Mit der Lipiddoppelschicht sind mindestens drei Proteine assoziiert. Das glycosylierte Spike (S) Protein ragt als Oligomer etwa 20 nm aus der Membranoberfläche heraus und ist für das typische Erscheinungsbild der Coronaviren unter dem Elektronenmikroskop verantwortlich (*corona*: lat. „Strahlenkranz“). S bindet an spezifische zelluläre Rezeptoren und induziert neutralisierende Antikörper (Tan *et al.*, 2005). Das Membran (M) Protein spielt gemeinsam mit dem hydrophoben Envelope (E) Protein eine Schlüsselrolle beim Zusammenbau der Partikel. Einige Gruppe-II-Viren besitzen zusätzlich ein Hämaggglutinin-Esterase Glykoprotein (HE), das aber nicht essentiell für die Replikation ist. Nukleokapsid (N) Phosphoproteine interagieren mit der viralen RNA und können starke Immunantworten auslösen (Timani *et al.*, 2004; Weiss & Navas-Martin, 2005). Für SARS-CoV wurde gezeigt, dass akzessorische Proteine als

weitere strukturelle Komponenten der Viruspartikel auftreten können (Huang *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2005).

1.3 Genomaufbau

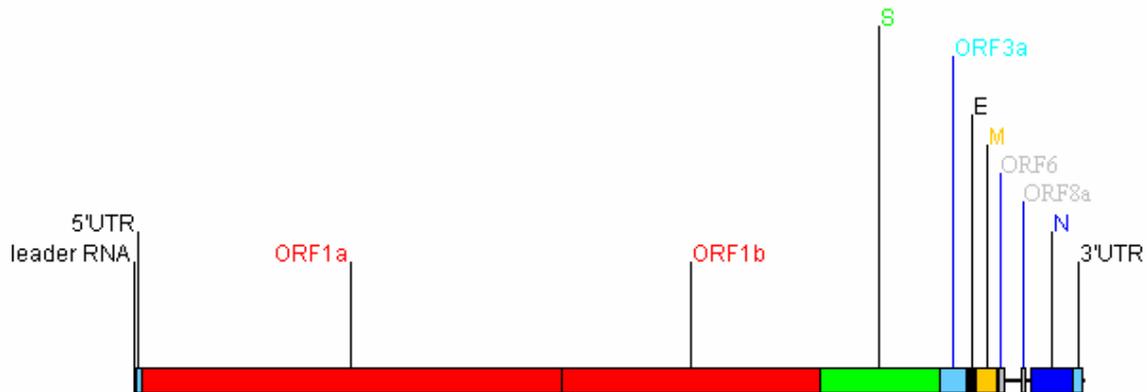


Abb. I-2. Genomorganisation von SARS-CoV. GenBank Zugangsnummer (accession number) AY310210, 29740 nt. Am 5'-Ende befindet sich die Cap-Gruppe (nicht eingezeichnet), gefolgt von einer leader-RNA-Sequenz, die auch auf allen subgenomischen mRNAs vorhanden ist. Nichttranslatierte Regionen (UTRs) befinden sich downstream der RNA-leader-Sequenz bzw. am 3'-Ende vor dem poly(A)-Schwanz. Die UTRs sind für RNA-Replikation und Transkription notwendig. ORFs 1a und 1b werden in ein ca. 700 kD großes Polyprotein (Pol) translatiert. Dieses wird in für Transkription und Replikation notwendige Proteine (u. a. zwei Proteinasen und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase) gespalten. ORF3a codiert für ein zusätzliches Strukturprotein. Daneben beinhaltet das SARS-CoV Genom noch 7 weitere für akzessorische Proteine codierende ORFs, wovon ORF6 und ORF8a hier exemplarisch dargestellt sind.

In Abb. I.2 ist die Genomarchitektur der Coronaviren exemplarisch für SARS-CoV dargestellt. Coronaviren besitzen ein positiv orientiertes, einzelsträngiges RNA ((+)-ssRNA)-Genom mit einer Länge von 27317 (HCoV-229E) bis 31357 (MHV) Nukleotiden und weisen damit das größte Genom aller RNA-Viren auf. Die genomische RNA beinhaltet 7-14 ORFs, ist am 5'-Ende mit einer Cap-Gruppe modifiziert und am 3'-Ende polyadenyliert. Sie kann als mRNA agieren und ist infektiös. Vom 5'-Ende beginnend, bestehen etwa 2/3 des Genoms aus zwei überlappenden ORFs, 1a und 1b, die für Proteine des Transkriptions-Replikations-Komplexes codieren. Downstream folgen die für die Strukturproteine S, E, M und N codierenden Gene. Diese Anordnung ist bei allen Coronaviren identisch. Dazwischen finden sich für verschiedene Nichtstrukturproteine codierende ORFs, die bezüglich Anzahl und Sequenz sehr unterschiedlich sein können, aber innerhalb derselben Gruppe konserviert sind. Diese gruppenspezifischen Proteine sind nicht essentiell für

die Replikation, aber ihre Deletion kann Attenuierung verursachen (Brian & Baric, 2005; Lai *et al.*, 2007).

1.4 Replikation

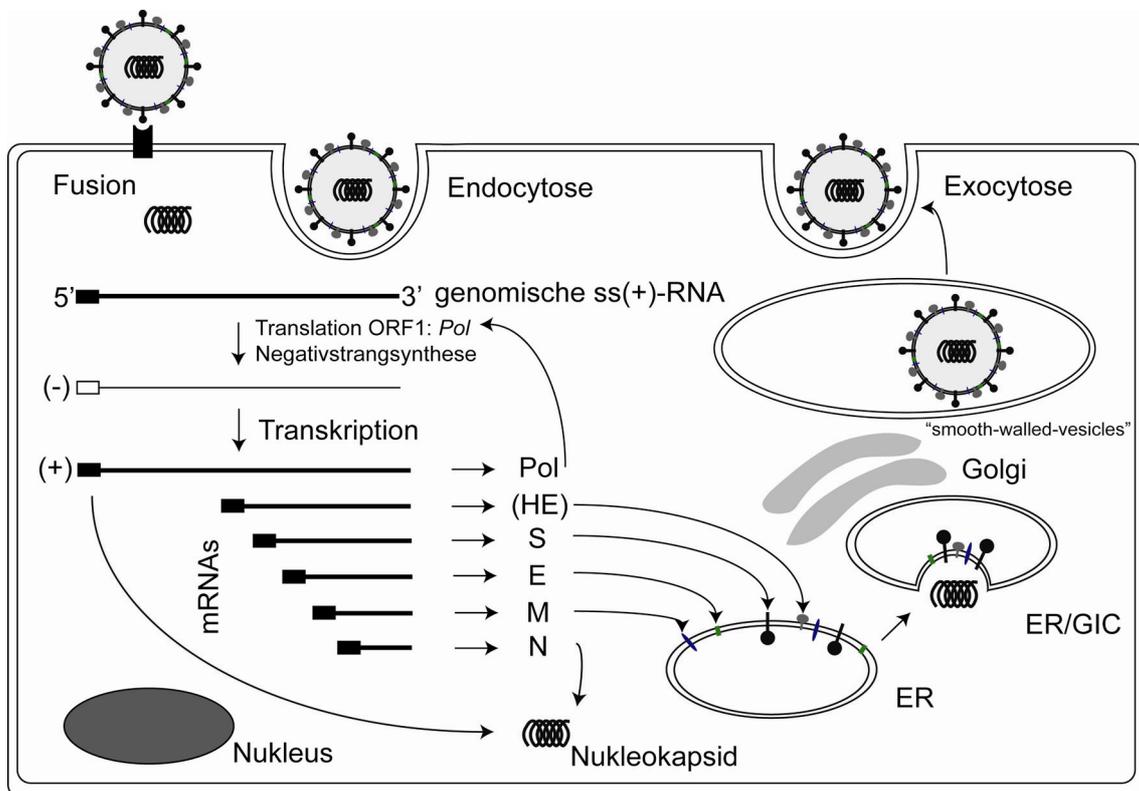


Abb. I-3. Coronaviraler Replikationszyklus. Die Virionen binden mit dem Spike Protein an spezifische zelluläre Rezeptormoleküle. Das Nukleokapsid gelangt entweder durch direkte Fusion der viralen Hüllmembran mit der Membran, oder durch rezeptorvermittelte Endozytose in das Zytoplasma. Die eintretende virale (+)ss-RNA dient als Matrize zur Synthese von ORF1ab Polyprotein, welches co- oder posttranslational in Enzyme des Transkriptase-Replikase-Komplexes prozessiert wird. Genomische RNA dient auch als Matrize zur Negativstrang-Synthese, welche wiederum als Vorlage zur Herstellung von genomischer RNA und subgenomischer mRNA (sg mRNA) dient. Die unterschiedlich langen sg mRNA-Moleküle besitzen alle am 5'-Ende eine einheitliche leader-RNA-Sequenz und identische 3'-Enden. Nur der jeweils am 5'-Ende gelegene ORF auf den mRNAs wird translatiert. Die Strukturproteine S, E und M werden in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) eingelagert, während N mit der genomischen RNA komplexiert und helikale Strukturen bildet. N interagiert mit M am endoplasmatischen Retikulum/Golgi intermediate compartment (ER/GIC), wo die Knospung („budding“) stattfindet. Viruspartikel enthaltende Vesikel („smooth-walled-vesicles“) fusionieren mit der Zytoplasmamembran und setzen infektiöse Nachkommenviren frei.

Der virale Infektionszyklus beginnt mit der Bindung des Spike Proteins (und des HE Proteins bei Gruppe-II-Viren) an spezifische Glykoproteine oder Glykane auf den Oberflächen der Zielzellen. Diese erste Interaktion bestimmt Artspezifität, Gewebetropismus und Virulenz der verschiedenen Coronaviren. Mehrere unterschiedliche Rezeptortypen konnten bislang identifiziert werden (Wentworth &

Holmes, 2007). So bindet z. B. HCoV-229E an die Aminopeptidase N (APN) und MHV an das Carcinogenic Embryonic Antigen (CEA), während SARS-CoV und HCoV-NL63 interessanterweise denselben zellulären Rezeptor, das Angiotensin-Converting-Enzyme-2 (ACE2) benützen (Hofmann *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2003). Die Replikation findet wie bei allen (+)ss-RNA-Viren im Zytoplasma an intrazellulären Membranen statt. Abb. I.3 gibt einen schematischen Überblick über den Infektionszyklus (Enjuanes *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2007; Weiss & Navas-Martin, 2005).

2. Humane Coronaviren und ihre klinische Bedeutung

2.1 HCoV-229E und HCoV-OC43 verursachen Erkältungskrankheiten

Das erste humane Coronavirus, B814, wurde in den 1960er Jahren aus einem an einer typischen Erkältung (Rhinitis, Kopf-, Gliederschmerzen, Reizhusten) leidenden Patienten isoliert und in Organkultur vermehrt. Gesunde Testpersonen, die mit dem propagierten Virus inokuliert wurden, entwickelten ebenfalls eine Erkältung (Kendall *et al.*, 1962; Tyrrell & Bynoe, 1965). 1966 konnten Hamre und Procknow den Prototyp der Gruppe-I-Viren, HCoV-229E, isolieren (Hamre & Procknow, 1966). Wenig später gelang McIntosh *et al.* die Isolierung weiterer Coronaviren aus Patienten mit akuten Atemwegserkrankungen, darunter HCoV-OC43 (McIntosh *et al.*, 1967). Da HCoV-229E und HCoV-OC43 am einfachsten zu kultivieren waren, konzentrierten sich nachfolgende Studien nur noch auf diese beiden Virusstämme. Alle anderen frühen Isolate gingen im Laufe der Jahre verloren und stehen bedauerlicherweise nicht mehr zur Verfügung (van der Hoek, 2007).

Allgemein verursachen HCoV-229E und HCoV-OC43 bei gesunden Erwachsenen Infektionen der oberen Atemwege (URTI: upper respiratory tract infection), die häufig inapparent verlaufen. Ansonsten sind die Auswirkungen überwiegend harmlos, wie etwa Schnupfen (Koryza), Kopf- und Halsschmerzen. Bei Kindern, älteren Menschen und immunsupprimierten Patienten scheinen gelegentlich auch die unteren Atemwege betroffen zu sein (LRTI: lower respiratory tract infection), was sich hauptsächlich durch Bronchitis, Laryngotracheitis, Bronchiolitis und Lungenentzündung äußert (Bradburne *et al.*, 1967; van Elden *et al.*, 2004). Etwa 10

bis 30% aller Erkältungskrankheiten werden durch diese Coronaviren verursacht und symptomatische Reinfektionen sind möglich (Larson *et al.*, 1980; Reed, 1984).

Neben Infektionen des respiratorischen Trakts, steht HCoV-OC43 im Verdacht, Durchfallerkrankungen zu verursachen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen und Virusisolierungen von Patienten mit Infekten des Gastrointestinalsystems legten diesen Zusammenhang nahe (Gerna *et al.*, 1985; MacNaughton & Davie, 1981). Auch zeigten auf RT-PCR basierende Studien, dass Coronaviren Mittelohrentzündungen (Otitis media) verursachen können (Pitkäranta *et al.*, 1998). Darüber hinaus wird ein möglicher Einfluss von HCoV-Infektionen bei multipler Sklerose (MS) diskutiert. Aus dem Gehirngewebe an MS verstorbener Patienten wurden Coronaviren isoliert und kultiviert (Burks *et al.*, 1980). Allerdings konnten HCoV-229E und HCoV-OC43 nicht bei allen an multipler Sklerose erkrankten Patienten detektiert werden. HCoV RNA ließ sich öfter bei Patienten mit MS, als bei einer gesunden Kontrollgruppe nachweisen (Arbour *et al.*, 2000; Dessau *et al.*, 2001). Weitere Studien müssen klären, ob es sich hierbei um opportunistische oder krankheitsrelevante Infektionen handelt.

2.2 Das SARS-assoziierte Coronavirus

Unter den humanen Coronaviren verursacht SARS-CoV das schwerste Krankheitsbild. SARS gilt als systemische Erkrankung. Das Virus vermag sich in schweren Fällen in Darm, Niere, Leber und Milz zu verbreiten (Farcas *et al.*, 2005), infiziert aber hauptsächlich die oberen Atemwege und alveoläre Epithelzellen. Dies kann zu massiver Schädigung der Lunge führen (diffuse alveolar damage, DAD). Nach einer Inkubationszeit von 2-7 Tagen beginnt die Erkrankung meist mit grippeähnlicher Symptomatik, wie etwa schnell ansteigendem Fieber, Muskelschmerzen, Husten, Kopfschmerzen und Atemnot. Der verursachte Schaden an den Pneumozyten kann im weiteren Verlauf zu Lungenentzündung, ARDS (acute respiratory distress syndrome) und schließlich Versagen der Atmung führen, was die Hauptursache für die Todesfälle darstellt. Die Zerstörung von Lungengewebe bei SARS Patienten scheint sowohl direkt durch virale Replikation, als auch indirekt durch eine überschießende Immunantwort verursacht zu werden. Diese Phase der Erkrankung ist vor allem durch eine erhöhte Zytokin- und Chemokinproduktion charakterisiert („Zytokinsturm“) und Patienten mit stark erhöhten Werten haben eine

schlechtere Prognose (Hui & Chan, 2008). Etwa 40% bis 70% der Patienten leiden zusätzlich unter Durchfall (Chen & Subbarao, 2007; Nicholls & Peiris, 2007), reaktive Hepatitis wurde in bis zu 69% der Patienten beobachtet (Hui & Chan, 2008).

Die Übertragung findet hauptsächlich durch den Respirationstrakt über Tröpfchen statt, aber auch fäkal-orale Transmission wurde beschrieben (Poutanen & Low, 2004; Weiss & Navas-Martin, 2005).

Das schwere akute respiratorische Syndrom (SARS) trat erstmals im November 2002 in der südchinesischen Provinz Guangdong auf. Dort wurde zunächst eine infektiöse, atypische Pneumonie vermehrt unter Marktarbeitern und ihren Familien beobachtet. Kurz darauf erkrankte auch medizinisches Personal, welches die Patienten versorgte (Peiris *et al.*, 2004). Bis zur offiziellen Eindämmung der Epidemie im Juli 2003, breitete sich SARS in 29 Ländern auf fünf Kontinenten aus und infizierte 8096 Menschen, wovon 9,6% der Krankheit erlagen (WHO, 2003). Die weltweite Zusammenarbeit von mehreren Forschungsinstituten und der WHO führte zur raschen Identifikation des Krankheitserregers. Ein bis dato unbekanntes Coronavirus, SARS-CoV, konnte aus Lungengewebe und Sputum der Patienten isoliert und in Meerkatzen-Nierenzellen (Vero E6) vermehrt werden (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003). Phylogenetische Analysen und Sequenzvergleiche zeigten, dass SARS-CoV mit den bisher bekannten humanpathogenen Coronaviren 229E und OC43 nur entfernt verwandt ist (Marra *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003). Das plötzliche Auftreten von SARS und das Fehlen jeglicher Seroprävalenz in der breiten Bevölkerung vor der Epidemie, legen einen zoonotischen Ursprung nahe. Die Übertragung von Tier auf Mensch fand offensichtlich auf den Fleischmärkten Guangdongs statt, begünstigt durch den engen Kontakt mit Tieren und dessen Verzehr. SARS-ähnliche Viren, welche mit den humanen Isolaten eng verwandt sind (99,8% Sequenzhomologie), konnten in verschiedenen auf den Märkten gehandelten Spezies, wie z. B. Schleichkatzen (*Paguma larvata*) und Marderhunden (*Nyctereutes procyonoides*), nachgewiesen werden. Interessanterweise fanden Guan *et al.* unter Marktarbeitern eine erhöhte Seroprävalenz von humanen und animalen SARS Coronaviren, wobei keine der untersuchten Personen tatsächlich SARS entwickelte (Guan *et al.*, 2003). Eine schrittweise Anpassung an den Menschen führte letztendlich zur erfolgreichen Infektion und zur effizienten Mensch-zu-Mensch Übertragung (Chen & Subbarao, 2007; Holmes, 2005; Qu *et al.*, 2005). Als natürliches Reservoir SARS-ähnlicher

Coronaviren konnten Fledermäuse ausgemacht werden (Li *et al.*, 2005a; Normile, 2005).

Die globale Epidemie von 2002 und 2003 konnte hauptsächlich durch Quarantäne-Maßnahmen unter Kontrolle gebracht werden (Pyrce *et al.*, 2007b). Seither zirkuliert SARS-CoV nicht mehr in der Bevölkerung. Allerdings wurden bis Januar 2004 in China sporadisch weitere SARS-Erkrankungen bestätigt. Die meisten davon gingen auf Laborinfektionen zurück, bei vier Personen jedoch schien es sich um ein erneutes Überschreiten des Virus vom Tier auf den Menschen zu handeln. Obwohl diese Fälle schnell behandelt werden konnten und ohne weitere Folgen blieben, zeigten sie eindrucksvoll, dass ein plötzliches Wiederauftauchen von SARS durchaus im Bereich des Möglichen liegt und eine Gefahr für die Bevölkerung darstellt (Liang *et al.*, 2004).

2.3 Neue Coronaviren der post-SARS-Ära: HCoV-NL63 und HCoV-HKU1

Das wieder auflebende Interesse an Coronaviren nach der SARS-Epidemie führte zur Identifikation von zwei weiteren humanen Coronaviren. 2004 berichteten van der Hoek *et al.* über die Isolierung eines neuen Gruppe-I-Virus, HCoV-NL63, aus einem sieben Monate altem Kleinkind, das an Bronchiolitis erkrankt war (van der Hoek *et al.*, 2004). Die etwa zur selben Zeit beschriebenen Virusstämme HCoV-NL (Fouchier *et al.*, 2004) und HCoV-NH (Esper *et al.*, 2005b) sind praktisch mit HCoV-NL63 identisch und repräsentieren dasselbe Virus (Kahn, 2006; van der Hoek & Berkhout, 2005). RT-PCR basierende Analysen lassen vermuten, dass HCoV-NL63 weltweit verbreitet ist und hauptsächlich bei Kindern, älteren oder immunsupprimierten Menschen in Zusammenhang mit Infekten der oberen und unteren Atemwege detektiert wird (Arden *et al.*, 2005; Bastien *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2005; Garbino *et al.*, 2006; Kaiser *et al.*, 2005). HCoV-NL63 ist besonders mit schweren Erkrankungen der unteren Atemwege bei Kindern, wie Morbus Krupp (Laryngotracheitis), assoziiert (van der Hoek *et al.*, 2005). Ein Zusammenhang zwischen einer HCoV-NL63-Infektion und der Kawasaki Krankheit, einer systemischen Vasculitis bei Kindern (Burns & Glode, 2004), wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert (Belay *et al.*, 2005; Ebihara *et al.*, 2005; Esper *et al.*, 2005a; Pyrc *et al.*, 2007c; Shimizu *et al.*, 2005).

Das neue Gruppe-II-Virus HCoV-HKU1 wurde 2005 in einem an Lungenentzündung erkrankten 71 Jahre alten Mann in HongKong entdeckt (Woo *et al.*, 2005a). Auch

HKU1 tritt global in Zusammenhang mit respiratorischen Infekten (LRTI und URTI) auf (Esper *et al.*, 2006; Garbino *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2006; Sloots *et al.*, 2006; Vabret *et al.*, 2008). Meist wurden Fälle von Pneumonie und Bronchiolitis beschrieben, aber auch weniger schwerwiegende Symptomatik wie Rhinorrhö und Halsschmerzen (Gerna *et al.*, 2007). Oft sind hierbei Patienten mit anderen zugrunde liegenden Erkrankungen betroffen, wobei HKU1 das Krankheitsbild stark verschlechtert (Pyrç *et al.*, 2007c). Darüber hinaus scheint HCoV-HKU1 eine Rolle bei Infektionen des Gastrointestinaltraktes zu spielen (Vabret *et al.*, 2006).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass HCoV-NL63 und HCoV-HKU1, ähnlich wie HCoV-229E und HCoV-OC43, weit verbreitete Erreger gewöhnlicher Erkältungskrankheiten sind. Sie können bei Kleinkindern, geschwächten oder immunsupprimierten Menschen schwerere klinische Symptome auslösen, rufen jedoch im Allgemeinen keine lebensbedrohlichen Infektionen hervor.

3. Diagnostik von HCoV-Infektionen

Abgesehen von SARS werden HCoV assoziierte Infekte normalerweise nicht diagnostiziert, da die resultierende Symptomatik relativ mild und die Infektionen selbstlimitierend sind. Antivirale Medikamente sind kaum vorhanden und selten erforderlich. Wie die meisten respiratorischen Viren können Coronaviren nicht einfach durch klinisch apparente Merkmale festgestellt werden. Hierfür wird labortechnische Diagnostik benötigt, die größtenteils zum Zwecke klinischer und epidemiologischer Studien durchgeführt wird (Lai *et al.*, 2007).

3.1 Virusisolierung und Elektronenmikroskopie

Isolierung von humanen Coronaviren und ihre Kultivierung direkt aus Patientenmaterial ist oft sehr schwierig. HCoV-229E kann in humanen diploiden Zelllinien, wie MRC-5 vermehrt werden, während HCoV-OC43 meist Organkultursysteme benötigt. Laboradaptierte OC43-Stämme replizieren allerdings in verschiedenen Zelllinien. SARS-CoV und HCoV-NL63 wurden u. a. in Meerkatzen Nierenzellen erfolgreich kultiviert (Lai *et al.*, 2007), während HCoV-HKU1 bislang noch nicht in Zellkultur vermehrt werden konnte (Drosten, C., pers. Komm.). Obwohl die Elektronenmikroskopie einen wichtigen Beitrag bei der Identifizierung und

Charakterisierung von Coronaviren geleistet hat (Ksiazek *et al.*, 2003), dient sie nicht standardmäßig zu diagnostischen Zwecken, da andere Partikel in klinischen Proben ähnlich wie Coronaviren aussehen können und darüber hinaus ein hoher Titer im zu untersuchenden Material benötigt wird. Die elektronenmikroskopische Visualisierung Coronavirus-ähnlicher Partikel wird meist nur noch bei Kleinkindern und Säuglingen mit Durchfallerkrankungen durchgeführt (Lai *et al.*, 2007).

3.2 Nukleinsäurenachweis mittels RT-PCR

In einer Vielzahl diagnostischer Verfahren werden Nukleinsäuretechniken routinemäßig zum schnellen und sicheren Erregernachweis herangezogen. So stellen real-time RT-PCR Assays eine sehr sensitive Methode zur HCoV-Detektion dar. Weniger als fünf RNA-Kopien pro Reaktionsansatz können reproduzierbar nachgewiesen werden (Emery *et al.*, 2004). Allerdings muss das Probenmaterial von guter Qualität sein und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. In klinischen Untersuchungen lassen sich meist Nasenabstriche, Bronchiallavage oder auch Serum als Ausgangsmaterial verarbeiten. Zur allgemeinen Coronavirus-Detektion können universelle Oligonukleotide herangezogen werden, die die Amplifikation konservierter Genombereiche (z. B. Regionen der ORFs 1a/1b) erlauben. Durch entsprechendes PCR-Primerdesign, kann durch Amplifikation typspezifischer, variabler Bereiche eine sehr hohe Spezifität erreicht werden. So lassen sich in einem einzigen Ansatz die fünf humanpathogenen CoV Stämme unterscheiden (Adachi *et al.*, 2004; Moes *et al.*, 2005; Stephensen *et al.*, 1999). Die exzellente Sensitivität erhöht jedoch auch die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse aufgrund von Kontaminationen.

Die Nukleinsäurediagnostik eignet sich vor allem zum Nachweis akuter Infektionen, da mit beginnender Rekonvaleszenz Coronaviren komplett aus dem System entfernt werden und somit nicht mehr direkt nachweisbar sind.

3.3 Serologische Methoden

Zur HCoV-spezifischen Antikörperbestimmung in humanem Serum oder Plasma werden mehrere serologische Methoden wie Neutralisationstest, Immunfluoreszenz (IF), Enzyme-linked Immunoassay (EIA) und Western-Blotting (WB) in verschiedenen

Varianten eingesetzt (Bermingham *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004a; Sizun *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 2004c). Als Antigene treten hierbei Pseudoviren, synthetisierte Peptide und rekombinante Strukturproteine (S, E, M, N) immer weiter in den Vordergrund (Temperton *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003). Die Entwicklung von Tests zur Diagnose von SARS-CoV-Infektionen wird durch rekombinante Techniken immens erleichtert, da die Viruspropagierung in Zellkultur, welche BSL-3 Einrichtungen erfordert, vermieden werden kann. SARS spezifische IFAs und ELISAs erreichen je nach Antigen und zu detektierender Immunglobulin-Subklasse (IgA, IgM, IgG) meist eine Sensitivität und Spezifität zwischen 90 und 98% (Bermingham *et al.*, 2004), gelegentlich auch mehr (Yu *et al.*, 2007). Der diagnostische Nutzen serologischer Assays ist auch für akute SARS-CoV-Infektionen offensichtlich, da IgM und IgG Serokonversion oft bereits wenige Tage nach Krankheitsbeginn festgestellt werden kann (Hsueh *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2007).

Zur Früherkennung von SARS wird auch der Einsatz neuartiger Proteomik-Technologien wie SELDI-TOF diskutiert. Bei dieser Methode werden diagnostische und prognostische Biomarker in Körperflüssigkeiten (z. B. das Akutphase-Protein Serum Amyloid A, SAA) identifiziert. Durch einen Vergleich mit Kontrollseren von gesunden Probanden ist eine schnelle Diagnose und eine Überwachung des Krankheitsverlaufs möglich (Kang *et al.*, 2005; Yip *et al.*, 2005).

Der direkte Virusnachweis mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern kann die RT-PCR Methodik ergänzen, ist aber in der Regel weniger empfindlich und kommt allenfalls in Sonderfällen zum Einsatz. Virusdetektion in Nasenabstrichen wurde für HCoV-229E und HCoV-HKU1 von Gerna *et al.* beschrieben (Gerna *et al.*, 2007). Ebenso konnte das SARS Nukleokapsid Protein in Serumproben von akut an SARS erkrankten Patienten direkt nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2005b).

Serologische Methoden sind unerlässlich, um etwa positive RT-PCR Ergebnisse zu bestätigen oder bei negativen Resultaten eine Infektion gänzlich auszuschließen. Für großflächig angelegte epidemiologische Untersuchungen und Überwachung der Seroprävalenz humaner Coronaviren im großen Maßstab, sollten immunologische Testverfahren weiter entwickelt werden.

3.4 Nachweis erregerspezifischer T-Zellen

Der Nachweis erregerspezifischer Lymphozyten bei viralen Erkrankungen gilt als sehr effiziente Methode, um Aufschlüsse über eine akute oder bereits überwundene Infektion zu erhalten.

T-Zellen lassen sich allgemein in zwei Klassen unterteilen. T-Helferzellen sind durch Expression von CD4-Molekülen auf ihrer Oberfläche charakterisiert. Sie können von antigenpräsentierenden Zellen (APZ; Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten) aufgenommene, prozessierte und als Peptide auf HLA-Klasse-II-Molekülen geladene Antigene erkennen. Die dadurch aktivierten T-Helferzellen steuern die zelluläre Immunantwort durch Produktion von $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$ und IL-2 ($\text{T}_{\text{H}1}$ -Subtyp) und aktivieren den humoralen Arm des Immunsystems durch Sezernierung von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 ($\text{T}_{\text{H}2}$ -Subtyp). CD8^+ zytotoxische T-Zellen hingegen lysieren ihre Zielzellen. Sie erkennen in Assoziation mit HLA-Klasse-I-Molekülen lineare Epitope endogener Herkunft, die also von der Zelle selbst oder von intrazellulären Parasiten, wie etwa Viren, synthetisiert wurden. HLA-Klasse-I-assoziierte Peptide besitzen eine Länge von nur 8-11 Aminosäuren, während auf HLA-Klasse-II-Moleküle geladene Peptide meist 12-16 AS umfassen (Zinkernagl, 2005). Die T-Zellantwort ist somit äußerst spezifisch. Für jedes HLA-Molekül existieren mehrere Allele und in der Regel wird ein bestimmtes Peptid nur von einem einzigen HLA-Typ präsentiert. Einerseits wird hierdurch die Spezifität weiter erhöht, andererseits aber auch die Kenntnis des HLA-Genotyps des Patienten und die Verfügbarkeit des entsprechenden Peptids vorausgesetzt. Diese HLA-Restriktion kann durch den Einsatz vollständiger viraler Proteine, worauf meist mehrere Epitope vorhanden sind, umgangen werden (Barabas, 2007).

4. Therapie und Impfstoffentwicklung

Obwohl Coronaviren schon vor etwa 50 Jahren als humane Pathogene identifiziert wurden, gibt es erst seit dem Auftreten von SARS intensive Anstrengungen, antiviral wirksame Medikamente und Impfstoffe gegen humanpathogene Coronaviren zu entwickeln. Die Forschung konzentriert sich hier fast ausschließlich auf das SARS-assoziierte Coronavirus, da es im Vergleich zu den anderen HCoV für eine ungewöhnlich hohe Morbidität und Mortalität verantwortlich ist. Obwohl SARS-CoV nicht mehr in der Bevölkerung zirkuliert, stellt ein erneutes Übertreten von

Coronaviren aus animalen Reservoirs eine ständige Bedrohung dar. Die Entwicklung von Wirkstoffen gegen Coronaviren bleibt daher unerlässlich.

Da während der SARS-Epidemie keine wirksame Therapie zur Behandlung der Patienten vorhanden war, wurden mehrere empirische Strategien verfolgt. Breitband-Antibiotika wurden prophylaktisch zur Vermeidung von bakteriellen Sekundärinfektionen gegeben. Nukleosid-Analoga, wie Ribavirin, wirken gegen ein weites Spektrum von RNA-Viren, zeigten aber bei Behandlung von SARS-Patienten keinen signifikanten Effekt (Keyaerts *et al.*, 2007). Interferone (IFN) spielen bei der Abwehr von Virusinfektionen eine Schlüsselrolle, indem sie das innate Immunsystem aktivieren und die Expression von HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche von infizierten Zellen erhöhen. Ein antiviraler Effekt von IFN- α wurde bei HCoV-229E infizierten Testpersonen beobachtet (Turner *et al.*, 1986) und die frühzeitige Applikation von IFN- α bei SARS-Patienten schien sich ebenfalls günstig auszuwirken (Keyaerts *et al.*, 2007). Die Gabe von anti-inflammatorischen Corticosteroiden während der SARS-Epidemie führte in einigen Fällen zur Linderung des schädigenden Effekts lokaler Entzündungsreaktionen, während in anderen Studien kein direkter Nutzen einer Steroidbehandlung beobachtet werden konnte (Pyrç *et al.*, 2007a). Schwere Fälle von SARS wurden erfolgreich mit Plasma von rekonvaleszenten SARS-Patienten behandelt (Wong *et al.*, 2003).

Insgesamt sind Daten über die therapeutische Behandlung von Coronavirus-Infektionen, insbesondere SARS, sehr limitiert. Die Suche nach antiviral wirksamen Stoffen konzentriert sich auf die verschiedenen Schritte des viralen Replikationszyklus, wie etwa Fusion, Polyprotein Prozessierung und Exozytose. Die größten Probleme auf der Suche nach dem perfekten Target stellen die genetische Variabilität und die Ähnlichkeit zu humanen Proteinen dar. Ein Medikament für die Therapie sollte daher auf relativ konservierte und einzigartige Bereiche der Coronaviren abzielen. Obwohl in den letzten Jahren mehrere Wirkstoffkandidaten vorgeschlagen worden sind, steht bis heute kein Coronavirus-spezifisches Therapeutikum für den klinischen Gebrauch zur Verfügung. Aussichtsreiche Kandidaten sind u. a. kohlenhydratbindende Substanzen, wie etwa pflanzliche Lektine, die durch Interaktion mit stark glycosylierten viralen Proteinen den Viruseintritt in die Zelle und die Replikation hemmen können (Golda & Pyrc, 2008). Viel versprechend scheint auch der Einsatz von siRNA-Molekülen zu sein, die gegen verschiedene virale Gene gerichtet sind (He *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2008).

Mehrere SARS Impfstoff-Kandidaten sind derzeit in Erprobung. Sie basieren auf inaktivierten und attenuierten Viren, rekombinanten Proteinen, DNA-Vakzinen, sowie vaccinia-, rhabdo- oder adenoviralen Vektoren und viele wurden schon erfolgreich in Tiermodellen getestet. Ebenfalls in Tierversuchen konnte ein Schutz vor SARS-CoV-Infektion durch passive Immunisierung erzeugt werden (Rockx & Baric, 2007). Trotz vieler aussichtsreicher Ansätze ist eine sichere Impfung gegen SARS derzeit noch nicht möglich.

5. Zielsetzung

Das plötzliche Auftreten von SARS-CoV und die darauf folgende SARS-Epidemie 2003 zeigten deutlich, dass neue, bisher unbekannte Coronaviren potentiell Speziesbarrieren überschreiten und ernste Krankheiten mit hoher Morbidität und Mortalität im Menschen erzeugen können. Die damit verbundene Intensivierung der Forschung auf dem Gebiet der Coronaviren führte zur Entdeckung von zwei weiteren humanpathogenen Vertretern und unterstrich deren immense Bedeutung bei Infektionen der oberen und unteren Atemwege, insbesondere bei Kindern, alten oder immunsupprimierten Menschen.

Die Coronavirus-Diagnostik wird von auf RT-PCR basierenden Verfahren dominiert. Coronavirale RNA lässt sich jedoch nur während der akuten Phase der Infektion oder kurz darauf nachweisen, weshalb RT-PCR für epidemiologische Untersuchungen ungeeignet ist. Obwohl eine Reihe von serologischen Verfahren zur Detektion von Antikörpern gegen SARS-CoV zur Verfügung steht, gibt es bislang keine Testformate, die einzelne HCoV-Typen unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein Line-Immunoassay zur spezifischen und sensitiven Detektion von Antikörpern gegen alle fünf bekannten humanpathogenen Coronaviren (229E, NL63, OC43, HKU1 und SARS-CoV) entwickelt werden. Durch anschließende serologische Untersuchungen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Allgemeine Seroprävalenz humanpathogener Coronaviren: welche HCoV-Typen zirkulieren und sind dabei die neu entdeckten Vertreter NL63 und HKU1 von Bedeutung?

2. Vergleich von Seroprävalenzen: gibt es regionale Abweichungen, Unterschiede zwischen Kindern und Erwachsenen, gesunden und HIV-positiven Spendern?
3. SARS-CoV-Seroprävalenz: gibt es inapparente SARS-Infektionen?
4. SARS im Zusammenhang mit anderen HCoV-Infektionen: wirken sich vorangegangene HCoV-Infektionen auf den Krankheitsverlauf bei SARS-Patienten aus?
5. Besteht eine Assoziation zwischen dem Kawasaki Syndrom und einer HCoV-NL63-Infektion?

Darüber hinaus sollte die gegen HCoV Nukleokapsid Proteine gerichtete, zelluläre Immunantwort untersucht und mit serologischen Befunden verglichen werden. Durch Screening von zwei verschiedenen, von HCoV-NL63 N abgeleiteten, Peptidbibliotheken sollten Peptide identifiziert werden, die spezifisch von CD4⁺ T_H-Zellen und/oder von CD8⁺ CTL erkannt werden können.

II. MATERIAL UND METHODEN

Sämtliche Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck, Applichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Zefa Laborservice (Fraunberg) bezogen.

1. Viruspropagierung und virale RNA

1.1 Coronavirusstämme und Anzucht in Zellkultur

Die humanpathogenen Coronaviren 229E, Isolat VR-740 (Hamre & Procknow, 1966) und OC43, Isolat VR-759 (McIntosh *et al.*, 1967) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, bezogen.

Zur Viruspropagierung wurden humane embryonale Lungenfibroblasten (MRC-5 Zellen; ECACC 97112601) verwendet. Die Zelllinie wurde in D-MEM + 10% FKS (Invitrogen, Karlsruhe) bei 35°C in CO₂-haltiger Atmosphäre (5%) kultiviert und bei einer Konfluenz von 70-90% mit einer multiplicity of infection (m.o.i.) von 0,01 infiziert. Der Viruspartikel enthaltende Zellkulturüberstand wurde bei beginnendem zytopathischem Effekt (CPE), 24-52 h nach Infektion, abgenommen und entweder direkt zur RNA-Isolierung verwendet, oder als Virusstock aliquotiert und bei -80°C weggefroren.

1.2 Isolierung viraler RNA

HCoV-229E- und HCoV-OC43-RNA wurde mit dem SV Total RNA Isolation System (Promega, Mannheim) oder dem QIAamp viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellervorgaben aus Zellkulturüberstand isoliert, aliquotiert und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Genomische HCoV-NL63-RNA wurde von Dr. Lia van der Hoek (Universität Amsterdam, Niederlande) isoliert und an unser Labor gesendet. Dr. Astrid Vabret (Universitätskrankenhaus Caen, Frankreich) und Dr. Markus Eickmann (Universität Marburg) stellten vorpräparierte HCoV-HKU1-RNA (Stamm Caen) bzw. SARS-CoV-RNA (Stamm FRA) zur Verfügung.

2. Klonierung von HCoV Genen

2.1 Reverse Transkription und PCR

2.1.1 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide für reverse Transkription (cDNA-Synthese) und PCR-Amplifikation wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert (Tab. II-1).

| HCoV | GenBank Zugangsnr., Position | Gen | Nr. ^a | Sequenz in 5' à 3' Orientierung | Cloning site |
|------------------|---|-----|------------------|---|-----------------|
| 229E (VR-740) | DQ243939 ^b | N | 1-f | GAACGAAC CATATGG CTACAGTCAAATGGG | <i>NdeI</i> |
| | | | 2-r | GT GGATCC TTTAGTTTAC | <i>BamHI</i> |
| OC43 (VR-759) | AY585228 ^c | N | 3-f | AAATTTTAC CATATG TCTTTTACTCCGTG | <i>NdeI</i> |
| | | | 4-r | GGT GAATTCT CTTATATTTCTGAG | <i>EcoRI</i> |
| NL63 | AY567487 ^c , 26133- 27266 ^d | N | 106-f | TAAACTAAACC CATATGG CTTAGTG | <i>NdeI</i> |
| | | | 107-r | T GGAATTC CAAAACAATTTAATGC | <i>EcoRI</i> |
| SARS (FRA) | AY310120 ^c , 28120- 29388 ^d | N | 16-f | ACAAATT CATATG TCTGATAATGG | <i>NdeI</i> |
| | | | 17-r | GG GGATCC TGAGTGTTTATGCC | <i>BamHI</i> |
| HKU1 (Caen) | DQ778921 ^b | N | 130-f | ATCTA CCCGCTT AGTATGTCTTATAC | <i>FauI</i> |
| | | | 131-r | ATTAG AATTC ATTCTCATTAAAG | <i>EcoRI</i> |

Tab. II-1. Oligonukleotide für RT und PCR. Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind hervorgehoben.

^a fortlaufende laborinterne Kennzeichnung; f: forward, r: reverse

^b Zugangsnummern für Nukleokapsid Gene

^c Zugangsnummern für Genomsequenzen

^d Nukleotidpositionen der Nukleokapsid Gene

2.1.2 cDNA-Synthese

Die Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe der M-MLV- oder AMV-Reverse Transkriptase-Kits (Promega, Mannheim) nach Vorgaben des Herstellers. Pro Reaktion wurden jeweils 1-2 µl virale RNA, sowie 2 pmol genspezifische Rückwärtsprimer (Tab. II-1) eingesetzt. Die Ansätze wurden 1 h bei 45°C inkubiert. Erststrang-cDNA wurde entweder direkt als Matrize für die Zweitstrang-Synthese und PCR benützt oder bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.1.3 PCR-Amplifikation

Zur Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte wurden PfuTurbo[®] hotstart Polymerase (Stratagene, Heidelberg), Phusion[™] hotstart high-fidelity Polymerase oder Taq

Polymerase (NEB, Frankfurt) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Pro 50 µl Ansatz wurden standardmäßig 10 mM dNTP-Mix (NEB) und je 20 pmol Forward und Reverse Primer (Tab. II-1) eingesetzt. Als Matrize wurden 1-7 µl cDNA aus der Erststrang-Synthesereaktion oder 1-50 ng Plasmid-DNA benutzt. Die Amplifikation wurde in einem iCycler Gerät (Bio-Rad, München) wie folgt durchgeführt:

| | | |
|-----------------------|---|-------------|
| 40 sec/4 min: 94/98°C | Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges | } 35 Zyklen |
| 10 sec/1 min: 94/98°C | Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges | |
| 20 sec/1 min: 50-58°C | Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz („annealing“) | |
| 10 sec/2 min: 72°C | DNA-Polymerisierung („primer extension“) | |
| 5 min/10 min: 72°C | Finale DNA-Polymerisierung | |

Inkubationszeiten und -temperaturen sind jeweils für die Enzyme Phusion™ bzw. PfuTurbo® und Taq angegeben. Die Annealingtemperaturen für die verschiedenen Primerpaare (Tab. II-1) wurden wie folgt gewählt: 1-f/2-r: 50°C, 3-f/4-r: 50°C, 106-f/107-r: 58°C, 16-f/17-r: 55°C, 130-f/131-r: 55°C.

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,8% [w/v] Agarose; 1 h, 60 V) in TBE-Puffer (89 mM Tris, pH 8.0, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, Ethidiumbromid 1µg/ml) und anschließender Kontrolle auf einem UV-Schirm (254 nm). Schließlich wurden die Amplifikate mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.2 Vektoren

| Vektor | Verwendung | Größe [bp] | Resistenz | Referenz/Bezugsquelle |
|----------------------|---------------------------|------------|-----------|--|
| pET22b(+) | Klonierung/ Expression | 5493 | amp | Novagen (Schwalbach) |
| pCS04 | Klonierung/ Expression | 5451 | amp | Lindner, P. (unveröffentlicht); XbaI/BamHI-Modifikation von pET22b(+): Entfernung der pelB- leader-Sequenz und Einführung von sechs sequentiellen CAT Codons (His- Tag) nach Startcodon |
| pCR®4Blunt- TOPO® | Klonierung | 3956 | amp/kan | Invitrogen (Karlsruhe) |

Tab. II-2. Vektoren für Klonierung und Expression. amp, Ampicillin; kan, Kanamycin; bp, Basenpaare.

Tab. II-2 zeigt die zur Klonierung und Expression (siehe II.3) viraler Gene benutzten Vektoren. Die verwendeten Expressionsvektoren codieren für zusätzliche Hexa-Histidinsequenzen, um Detektion (II.3.2.2) und Reinigung (II.4.2) der rekombinanten Proteine zu erleichtern.

2.3 Restriktionsverdau und Ligation

Die blunt-end PCR-Produkte wurden entweder ligasefrei in den pCR[®]4Blunt-TOPO[®]-Vektor nach Herstellerangaben kloniert oder mit Restriktionsenzymen hydrolysiert und mit vorpräparierten Klonierungs-/Expressionsvektoren wie unten beschrieben ligiert.

Sämtliche Restriktionsenzyme (Tab. II-1) und der für Ligationen verwendete Quick Ligation[™] Kit wurden von der Firma NEB, Frankfurt, bezogen und nach Anweisungen des Herstellers verwendet.

Zunächst wurden Vektor- und Insert-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen vollständig hydrolysiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und aus dem Gel mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) eluiert. Reinheit und Konzentration der DNA-Fragmente wurden UV-spektroskopisch wie folgt bestimmt:

- 1 Einheit A_{260} = 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA in H_2O ; Absorptionswerte sollten zwischen 0,1 und 1,0 liegen; gegebenenfalls wurde die DNA für die Messung mit H_2O verdünnt
- $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ bei reiner DNA; Werte darunter weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, Werte > 2 zeigen RNA-Kontamination an

Für die Ligation wurden 50 ng Vektor mit dem dreifachen molaren Überschuss an Insert-DNA kombiniert. Hierzu wurde die Stoffmenge wie folgt ermittelt:

$$\text{pmol (dsDNA)} = \mu\text{g (dsDNA)} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ pmol}}{660 \text{ pg}} \times \frac{1}{N_{\text{bp}}} = \frac{\mu\text{g (dsDNA)} \times 1515}{N_{\text{bp}}}$$

N_{bp} entspricht der Anzahl der Basenpaare des präparierten Inserts bzw. des Vektors. Nach erfolgter Ligation (5 min, RT) wurde der Ansatz entweder direkt für Transformationsexperimente (II.2.4) verwendet oder bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.4 *E. coli*-Stämme und Transformation

Tab. II-3 fasst alle zur Klonierung verwendeten *Escherichia coli*-Stämme zusammen.

| Stamm | Genotyp | Referenz/Bezugsquelle |
|--|---|--|
| DH5 α | F ⁻ ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> | Mobitec, Göttingen (Hanahan, 1983) |
| One Shot [®] Mach1 [™] -T1 ^R | F ⁻ ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i> | Invitrogen, Karlsruhe |
| DH10B | <i>E. coli</i> K12 Δ (<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>) <i>mcrA recA1</i> | Paulus, C. & Nevels, M., Regensburg |

Tab. II-3. *E. coli*-Stämme für Klonierungen.

Alle für Klonierungen und Expressionen (II.3) verwendeten *E. coli*-Stämme wurden nach laborüblichem Protokoll mit Rubidiumchlorid für die Aufnahme von DNA chemisch kompetent gemacht (Hanahan, 1983; Lindner, 2000), in 50-100 μ l enthaltenden Aliquots über flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2 μ l des Ligationsansatzes wurden in ein 14 ml Rundboden-Falcon[™]-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt, mit 100 μ l auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten Zellen vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz 45 sec bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Schließlich wurden 900 μ l steriles LB-Medium (1% Pepton [w/v], 0.5% Hefeextrakt [w/v], 1% NaCl [w/v] in H₂O_{bidest}) dazu pipettiert und 1 h bei 37°C geschüttelt (220 rpm). Nach Expression der phänotypischen Antibiotikaresistenz wurden 50-200 μ l des Transformationsansatzes auf Ampicillin enthaltende LB-Agarplatten (50 μ g/ml Ampicillin; 1,8% Agar-Agar [w/v]) ausgestrichen und bei 37°C üN bebrütet. Nur Zellen, die das rekombinante Plasmid enthalten, sind durch Expression einer β -Lactamase zur Ampicillinresistenz befähigt und bilden auf den Platten Einzelkolonien.

2.5 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse von der Platte abgenommen, in 5 ml LB-Amp-Medium (LB-Medium, 50 μ g/ml Ampicillin) überführt und üN bei 37°C geschüttelt (220 rpm). Die Zellen wurden pelletiert (Labofuge[®]; Heraeus, Hanau; 4500 x g, 5 min) und die Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Mit dem UV-

Spektrometer wurde die DNA-Konzentration und -Reinheit bestimmt (II.2.3). Zur weiteren Analyse der Konstrukte wurde zunächst eine Restriktionskontrolle durchgeführt. Hierfür wurden standardmäßig 5 µl der frisch isolierten Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit den entsprechenden Restriktionsenzymen hydrolysiert, über ein ethidiumbromidhaltiges, 0,8%iges Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert. Bei korrekter Klonierung zeigt das Gelbild zwei klare Banden für den linearisierten Vektor und das herausgeschnittene Insert. Zur Prüfung der Sequenzintegrität wurde von der Firma Geneart, Regensburg, die jeweilige Insert-DNA komplett und doppelsträngig sequenziert.

2.6 Herstellung von Dauerkulturen

Zur Konservierung von rekombinanten *E. coli* Klonen wurden 5 ml üN Kulturen abzentrifugiert (Labofuge[®]; 3000 x g, 3 min) und in 500 µl eiskaltem LB-Medium resuspendiert. 500 µl eiskaltes steriles Glycerin (87%) wurden in 1,5 ml CryoTubes (Nunc, Wiesbaden) vorgelegt, die Zellsuspension dazugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Glycerinkulturen konnten bei -80°C dauerhaft aufbewahrt werden. Zur Rekultivierung wurde mit einer sterilen Impföse etwas Bakteriensuspension aufgenommen und direkt in flüssiges LB-Antibiotika-Medium gegeben oder auf LB-Antibiotika-Platten ausgestrichen.

3. Expression von HCoV Genen

3.1 Expressionsstämme und Transformation

Prokaryotische Expression von HCoV Genen fand grundsätzlich in *lon*- und *ompT*-Protease defizienten, T7 RNA-Polymerase exprimierenden (λ DE3 lysogenen) Derivaten von *E. coli* BL21 statt (Tab. II-4). Diese Stämme gewährleisteten durch verminderten proteolytischen Abbau des rekombinanten Proteins eine verbesserte Proteinstabilität, sowie eine einfache und effiziente Induktion der Expression durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die Produktion heterologer Proteine in *E. coli* hängt auch von der Abundanz bestimmter tRNAs ab. Für bestimmte Basentriplets (am häufigsten codierend für die Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Leucin und Prolin) besitzt *E. coli* verhältnismäßig wenige tRNA-Moleküle („seltene

tRNAs“), wodurch es bei hohen Expressionsraten zu einem Translationsabbruch oder dem Einbau falscher Aminosäuren in die wachsende Peptidkette kommen kann. Durch Einführung zusätzlicher, für seltene tRNAs codierender Gene in die kommerziell erhältlichen BL21-CodonPlus[®]-Stämme, wird eine hohe Expressionsrate heterologer Gene in *E. coli* gewährleistet.

| Stamm | Genotyp | Bezugsquelle |
|--------------------------------------|---|----------------------------|
| BL21-CodonPlus (DE3)-RIL | <i>E.coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r] | Stratagene (Heidelberg) |
| BL21-CodonPlus [®] (DE3)-RP | <i>E.coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU proL Cam</i> ^r] | |

Tab. II-4. *E. coli*-Stämme für Expression.

100 µl Aliquots von kompetenten BL21-CodonPlus[®](DE3)-RIL- oder BL21-CodonPlus[®](DE3)-RP-Zellen wurden nach Arbeitsanweisung des Herstellers mit 1-50 ng Expressionsvektor durch Hitzeschock (20 sec, 42°C) transformiert und auf Ampicillin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) enthaltende LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach üN Inkubation bei 37°C konnten Einzelkolonien auf Produktion von rekombinanten Virusproteinen analysiert werden.

3.2 Überexpression von HCoV Genen und Expressionsanalyse

3.2.1 Expression im Minimaßstab

Zur Überprüfung heterologer Proteinproduktion wurden zunächst Vorkulturen herangezogen. Hierzu wurden jeweils 5 frische Einzelkolonien von der Platte mit einer sterilen Impföse aufgenommen, in je 5 ml flüssiges LB-Amp/Cam-Medium (LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) überführt und üN geschüttelt (37°C, 220 rpm). Mit diesen Vorkulturen wurden 10 ml LB-Amp-Cam-Medium zu einer OD_{600nm} von 0,1 angeimpft und bei 37°C so lange geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht wurde. Die Expression heterologer Gene wurde dann durch Zugabe von 0,5-1 mM IPTG induziert. Zur Kontrolle der Proteinproduktion wurden zu den Zeitpunkten 0, 1 h und 3 h je 600 µl Aliquots entnommen und zentrifugiert (Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg; 14000 rpm, 1 min). Die Pellets wurde in je 60 µl 1 x Laemmli-Auftragspuffer für SDS-PAGE (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS [w/v], 5% 2-Mercaptoethanol [v/v], 10% Glycerin [v/v], 0,1% Bromphenolblau [w/v]) resuspendiert und bei -20°C bis zur weiteren Analyse weggefroren.

3.2.2 Expressionsanalyse mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Der Aufbau der Apparaturen erfolgte nach Beschreibung des Geräteherstellers (Biometra, Göttingen). Trenn- und Sammelgellösungen wurden wie folgt hergestellt (Tab. II-5).

| Komponenten | Trenngel (12,5%) | Sammelgel (5%) |
|--|------------------|----------------|
| Protogel [®] , reinst (30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid; Biozym, Oldendorf) | 2,5 ml | 330 µl |
| 1,88 M Tris-HCl, pH 8,8 | 1,2 ml | |
| 0,625 M Tris-HCl, pH 6,8 | | 400 µl |
| 0,5% SDS [w/v] | 1,2 ml | 400 µl |
| H ₂ O _{bidest} | 1,1 ml | 870 µl |
| TEMED | 5 µl | 2 µl |
| 10% APS [w/v] | 30 µl | 10 µl |

Tab. II-5. Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele.

TEMED und APS wurden erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugegeben. Das Trenngel wurde zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und mit ca. 300 µl Isopropanol (p.a.) überschichtet. Nach Polymerisierung (45 min) wurde das Isopropanol abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, in das zügig ein Kamm mit 24 Proben-Auftragstaschen gesteckt wurde. Nach erneuter Polymerisierung (45 min) wurden die SDS-Gele entweder direkt verwendet oder bei 4°C in feuchter Atmosphäre aufbewahrt.

Die Aliquots der Miniexpressions-Zeitreihen wurden 5 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und je 10 µl auf die Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung des *E. coli*-Rohextraktes erfolgte in Tris-Glycin-Puffer (Tab. II-6) bei 21 mA für ca. 2 h (Spannungsquelle ECPS 3000/150, GE Healthcare). Nach Auftrennung wurde das Gel aus den Glasplatten genommen und in Coomassie-Färbelösung 30 min bei 50°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung ebenfalls bei 50°C so lange geschüttelt, bis keine Blaufärbung der Lösung mehr auftrat. Erfolgreiche Expression nach Induktion konnte durch distinkte Banden auf Höhe des entsprechenden Molekulargewichts des rekombinanten Proteins sichtbar gemacht werden. Zur Konservierung wurden die Gele in Trocknungspuffer entwässert und mit dem DryEase™ Mini-Gel System (Invitrogen) zwischen Cellophanmembranen getrocknet.

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|----------------------|---|
| Tris-Glycin | 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 1% SDS [w/v] |
| Coomassie-Färbung | 1 Tablette PhastGel™ R-350 (GE Healthcare, Freiburg), 30% Methanol [v/v], 10% Eisessig [v/v] ad 400 ml H ₂ O _{bidest} |
| Coomassie-Entfärbung | 30% Methanol [v/v], 10% Eisessig [v/v] |
| Geltrocknung | 30% Ethanol [v/v], 10% Glyzerin (87%) [v/v] |

Tab. II-6. Lösungen für Elektrophorese und Gelfärbung.

Zur immunologischen Detektion rekombinanter Proteine wurde das durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemisch auf Nitrozellulosemembranen (Protran 0,45 µm; Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Der Transfer erfolgte im Semidry-Verfahren in Blotting-Puffer (Tab. II-7) mit einer Fast Blot B33-Apparatur (Biometra, Göttingen) bei 5 mA pro cm² Membranfläche für 30 min. Zur Kontrolle des Transfers wurden die auf der Membran immobilisierten Proteine reversibel mit Ponceau S-Lösung angefärbt und anschließend mit TTBS gewaschen und wieder entfärbt.

Nach Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierungslösung (1 h, RT) erfolgte die Inkubation mit Maus Penta-His™ Antikörper (Qiagen, Endkonz. 267 ng/ml in TBS) für 2 h bei RT oder üN bei 4°C unter leichtem Schütteln. Nach drei Waschschritten (je 5 min in TTBS) wurden gebundene Primärantikörper mittels Meerrettich-Peroxidase-(HRP)-konjugierten, polyklonalen Kaninchen anti-Maus Antikörpern (Daco, Hamburg; Endkonz. 1,3 µg/ml in TBS; 1 h, RT) colorimetrisch nachgewiesen. Hierzu wurden nach erneutem Waschen in TTBS (3 x 15 min) 25 ml Detektionslösung zugegeben und 2-10 min inkubiert. Ein grau-brauner unlöslicher Niederschlag zeigte rekombinante Proteinbanden an. Die Membran wurde kurz mit H₂O_{bidest} gespült und dann getrocknet.

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|-----------------------|---|
| Blotting Puffer | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol [v/v] |
| Ponceau S | 1% Ponceau S [w/v], 5% Essigsäure [v/v] |
| TBS Verdünnungspuffer | 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl |
| TTBS Waschpuffer | 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Tween-20 [v/v] |
| Blockierung | 5% Magermilch [w/v] in TBS |
| Detektion | 21.3 ml H ₂ O _{bidest} , 2.5 ml Tris-HCl, pH 7.5, 1.2 ml 10% NiCl ₂ -Lösung [w/v], Spatelspitze Diaminobenzidin, 15 µl 30% H ₂ O ₂ [v/v] |

Tab. II-7. Lösungen für Western-Blots.

Virusprotein exprimierende Klone wurden wie unter II.2.6 beschrieben konserviert. Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden Expressionen im Großmaßstab durchgeführt. 4 Liter LB-Amp/Cam-Medium wurden mit einer üN-Vorkultur zu einer OD_{600nm} von 0,15 angeimpft. Nach Induktion mit 1 mM IPTG bei OD_{600nm} = 0,6-0,7

wurde 3-4 h exprimiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (Sorvall RC-5C Plus, DuPont, Bad Homburg; GS3 Rotor, 8000 rpm, 10 min) und die Pellets gewogen. Anschließend wurde die Zellmasse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Reinigung aufbewahrt.

4. Reinigung rekombinanter Proteine

Alle in *E. coli* rekombinant produzierten Virusantigene wurden über drei chromatographische Methoden bis zur Homogenität aufgereinigt. Unlösliche Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen analog dem Vorgehen bei löslichen Proteinen gereinigt, wobei alle Puffer zusätzlich mit 1 M (HCoV-OC43 N) bzw. 3 M Harnstoff (HCoV-HKU1 N) versetzt wurden.

4.1 Zellaufschluss

Die Zellmasse (6-8 g) wurde bei RT aufgetaut und in 60-80 ml (10 ml/g) eiskaltem Aufschlusspuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol) resuspendiert. Um proteolytischen Abbau der rekombinanten Proteine zu vermeiden, wurde die Zellsuspension mit den Proteaseinhibitoren Pefabloc SC[®] (2 mM; Biomol, Hamburg) oder Protease Inhibitor Cocktail VII (Novagen, Darmstadt; 100 µl/g Zellmasse) versetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe des Hochdruck-Aufschluss-Gerätes Basic-Z (IUL Instruments, Königswinter; 2 Passagen, 1.5 bar) bei 4°C lysiert. Zur Entfernung von kontaminierender DNA wurden dem Lysat zunächst 2 U/ml Benzonase[®] (Merck, Darmstadt) sowie 2 mM MgCl_2 zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Enthielt das Lysat unlösliche rekombinante Proteine, wurde nach der Benzonase[®]-Inkubation zentrifugiert (Sorvall RC-5C Plus, Rotor SS34; 45000 x g, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet unter denaturierenden Bedingungen (s. u.) weiter gereinigt. Bei der Präparation löslicher rekombinanter Proteine, wurde wie oben zentrifugiert und restliche DNA im Überstand durch eine Protaminsulfat-Fällung beseitigt. Hierzu wurde Protaminsulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim) in Laufpuffer gelöst (2% [w/v]) und unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 0,7% dem Lysat zugetropft. Nach Zentrifugation (Sorvall RC-5C Plus, Rotor SS34; 45000 x g, 10 min, 4°C) wurde das Pellet verworfen und der Überstand weiter gereinigt.

4.2 Affinitätschromatographie

Rekombinante Proteine können mittels eines His-Tags (N-, C-terminal, intern) in einem ersten Reinigungsschritt durch Metall-Affinitätschromatographie („immobilized metal affinity chromatography“, IMAC) aufgereinigt werden. Die His-Tag Sequenz (6-8 aufeinander folgende Histidinreste) bindet hierbei an divalente Kationen (Ni^{2+} , Co^{2+}), welche an einer Trägermatrix (Sepharose, NTA, IDA) immobilisiert sind. Nachdem ungebundene Proteine gewaschen wurden, kann das Zielprotein durch Imidazol oder Absenken des pH-Werts eluiert werden.

Alle rekombinanten Virusantigene wurden N-terminal mit einem His-Tag (6 Histidine) modifiziert. Die Reinigung erfolgte bei 4°C über eine Ni^{2+} -Sepharose-Säule (GE Healthcare, München; Bettvolumen 17 ml) mit Hilfe des High Load™-Systems (Pharmacia, Freiburg). Überstand bzw. in denaturierendem Aufschlusspuffer gelöstes Pellet nach Zellaufschluss wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die mit Aufschlusspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Nachdem mindestens mit 3 Säulenvolumen nachgewaschen wurde, konnten die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 20 bis 500 mM Imidazol in Aufschlusspuffer eluiert werden (10 Säulenvolumen, Flussrate 1,5 ml/min). Das gesamte Elutionsvolumen wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt (RediFrac, Pharmacia), wobei kontinuierlich die Absorption bei 280 nm gemessen und die Werte auf einen Schreiber (REC102, Pharmacia) übertragen wurden. Somit ließen sich bei der Auswertung Protein enthaltende Fraktionen identifizieren. Zur Kontrolle wurden anhand der Absorption ausgewählte Fraktionen (5 µl Aliquots) auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (II.3.2.2).

Fraktionen, die rekombinantes Virusantigen enthielten (350-450 mM Imidazol) wurden gepoolt und zweimal für mindestens 3 h gegen 1 Liter IEx-Laufpuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8,0, 50 mM NaCl) bei 4°C dialysiert (Spectra/Por® Membran, MWCO: 3,5 kD; Roth, Karlsruhe). Um eventuell während dieses Vorgangs ausgefallene Verunreinigungen abzutrennen, wurde das Dialysat zentrifugiert (Sorvall RC-5C Plus, Rotor SS34; 45000 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand weiter aufgereinigt.

4.3 Ionen-Austauscher-Chromatographie

Mit der Ionen-Austauscher-Chromatographie können Proteine anhand ihrer Ladung voneinander getrennt werden. Die Proteine müssen eine positive oder negative Nettoladung besitzen, um mit dem geladenen Säulenmaterial in Wechselwirkung treten zu können. Der pH-Wert des Puffersystems wird so gewählt, dass dieser mindestens 1,5 pH-Einheiten vom isoelektrischen Punkt des Zielproteins entfernt liegt. Proteine mit negativer Nettoladung binden an Anionentauscher (z. B. Diethylaminoethyl), während positiv geladene Biomoleküle an Kationentauscher (z. B. Sulfopropyl-Gruppen) binden können. Die Elution erfolgt schließlich durch steigende Elektrolytkonzentrationen.

Um verbleibende Verunreinigungen nach der Affinitätschromatographie abzutrennen, wurde das Dialysat an einem BioCad 700E-Gerät (Applied Biosystems, Weiterstadt) über eine SP-Poros[®] Kationentauscher-Säule (Applied Biosystems; Bettvolumen 1,6 ml) geleitet. Nach Waschen mit mindestens 10 Säulenvolumen IEx-Laufpuffer wurde das gebundene rekombinante Protein mit einem linearen Gradienten von 50 mM bis 1 M NaCl in IEx-Laufpuffer über 25-35 Säulenvolumen eluiert (Flussrate 5 ml/min). Abermals wurde das gesamte Elutionsvolumen in Aliquots zu je 2 ml gesammelt. Protein enthaltende Fraktionen wurden durch erhöhte Absorptionen bei 220 und 280 nm angezeigt. Mittels SDS-PAGE wurde deren Reinheit kontrolliert und die saubersten Antigen-Fractionen (500-900 mM NaCl) erneut gepoolt.

4.4 Gelfiltration

Gelfiltrationsmaterialien bestehen aus natürlichen oder synthetischen hydrophilen Polymeren, die ähnlich einem Molekularsieb wirken. Niedermolekulare Substanzen dringen in die Poren des Materials ein, während größere Moleküle in dessen Ausschlussvolumen eluieren. Dadurch wird eine Auftrennung des Probengemisches nach Molekulargewicht erreicht, wobei größere Moleküle zuerst eluieren.

Im letzten Reinigungsschritt wurde eine mit GFC-Laufpuffer (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 8,0, 150 mM NaCl) äquilibrierte präparative 16/60 Superdex[™] 75 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare; Bettvolumen 120 ml) benutzt. Mit Hilfe des High Load[™]-Systems (Pharmacia) wurden die nach der Kationentauscher-Chromatographie gepoolten Antigen-Fractionen in Aliquots zu je 3 ml über die Säule gegeben (Flussrate 1ml/min, 4°C). Die Elution des Zielproteins erfolgte mit GFC-

Laufpuffer und wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm überwacht. Protein enthaltende Fraktionen wurden abermals gepoolt.

5. Aufkonzentrierung und Analyse von gereinigten rekombinanten Proteinen

5.1 Aufkonzentrierung

Durch die Gelfiltration wurden die Proteinlösungen etwa im Verhältnis 1:10 verdünnt. Gegebenenfalls wurden die gereinigten rekombinanten Proteine durch Zentrifugalkonzentration oder Ultrafiltration wie folgt eingeeengt.

10-15 ml Proteinlösung wurden in ein Macrosep[®] 10k Omega Röhrchen (Pall, Dreieich; MWCO 10 kD) gefüllt und bei 4500 x g (Labofuge) 30-60 min zentrifugiert bis ein Endvolumen von 1-1,5 ml erreicht wurde.

10-50 ml Proteinlösung wurden in eine Amicon[®] 8050-Rührzelle (Millipore, Schwalbach) gegeben und mit 1,5 bar Argon-Überdruck (Linde, Pullach) unter Rühren durch einen Zellulosefilter (Millipore; MWCO: 3 kD) gepresst und auf ca. 10% des Ausgangsvolumens eingeeengt. Die aufkonzentrierten Proteinlösungen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

5.2.1 Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Die Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (Sigma-Aldrich) beruht auf der Bildung eines stabilen Farbkomplexes, dessen Absorption bei Bestrahlung von Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm proportional zur vorhandenen Proteinmenge ist. Mittels einer BSA-Eichkurve (100, 200, 400, 600, 800 und 1000 µg/ml) konnte die Konzentration rekombinanten Proteins in Lösung nach Herstellerangaben bestimmt werden.

5.2.2 Photometrische Bestimmung

Die Konzentration der Proteinlösungen konnte auch durch Messung der Absorption bei 280 nm nach folgender Formel ermittelt werden.

$$\text{Konzentration (mg/ml)} = \frac{A_{280\text{nm}} \times \text{MW}}{\epsilon_M}$$

ϵ_M : molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

MW: Molekulargewicht [g/mol]

$A_{280\text{nm}}$: Absorption bei 280 nm

5.3 Überprüfung der Reinheit

Die erforderliche hohe Reinheit der Proteinpräparationen wurde mittels SDS-PAGE, wie unter II.3.2.2 beschrieben, bestätigt. Um geringe, im Gel nicht darstellbare Verunreinigungen durch Fremdproteine des Expressionswirts auszuschließen, wurden die Fraktionen auf Nitrozellulosemembranen übertragen, mit Maus anti-*E. coli* Immunglobulinen inkubiert (Dako; 13 $\mu\text{g/ml}$ Endkonz. in TBS; 1 h, RT) und anschließend mit HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörpern (Dako; 1,3 $\mu\text{g/ml}$ Endkonz. in TBS; 1h, RT) detektiert.

6. Herstellung von Line-Immunoassay-Streifchen

Unter Verwendung des Accutran ACC100/0 cross-blot Systems (Schleicher & Schüll) wurden Antigene sowie entsprechende Immunglobulin (Ig)-Kontrollen (Quartett, Luckenwalde) auf Nitrozellulosemembranen (Protran) immobilisiert. Die dazu verwendeten in GFC-Laufpuffer gelösten Antigene enthielten 50 ng (NL63 N, OC43 N, SARS N), 25 ng (229E N) oder 15 ng (HKU1) Protein/ μl . Die Ig-Reaktionskontrollen wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 ng/ μl (humanes IgG und IgA) oder 75 ng/ μl (humanes IgM) verdünnt, während die als cut-off konzipierte schwach-positive IgG-Kontrolle (w/+) auf 4 ng/ μl eingestellt wurde.

Die Membran (5,7 x 13,1 cm) wurde mit TBS befeuchtet und in die Accutran-Maske eingespannt. Jeweils 900 μl Proteinlösung wurden in die horizontal verlaufenden Kammern pipettiert und für 2,5 h bei RT auf der Membran leicht geschüttelt. Nach Absaugen der Lösungen wurde die Membran zweimal kurz in TBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 0,2% I-BlockTM [w/v] (Applied Biosystems) in TTBS blockiert (2 h, 37°C). Die Membran wurde nochmals zweimal kurz in TBS gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in 3 x 57 mm große Streifen geschnitten (Kinematic Automation, Twain Harte, CA, USA). Die nun

gebrauchsfertigen Line-Immunoassay-Streifchen waren bei -20°C mehrere Monate haltbar.

7. Durchführung des Line-Immunoassays

7.1 Humane Seren

Mit Hilfe des Line-Immunoassays wurden verschiedene Serumproben untersucht (Tab. II-8).

| Serumproben | Bezugsquelle/Herkunft | Anmerkung |
|---|---|---|
| Serumpaare; akute und rekonvaleszente HCoV-229E bzw. HCoV-OC43-Infektion | Dr. R.B. Couch, Respiratory Pathogen Research Unit, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA | Titer mit ELISA und Mikroneutralisationstests überprüft; je 6 Paare |
| sequentielle Proben; akute und rekonvaleszente HCoV-NL63-Infektion | Dr. L. van der Hoek, Universität Amsterdam, Niederlande | Proben von einem HIV-Patienten |
| rekonvaleszente SARS-Patienten (Innere Mongolei, China) | Dr. Yiming Shao, Dr. Jianguo Xu, Chinese Center for Disease Control, Beijing, China | SARS-Ausbruch 2003; Titer mit ELISA, Western-Blot und IFA überprüft |
| akute und rekonvaleszente SARS-Patienten (Toronto, Kanada) | Dr. D. Low, Dr. T. Mazzulli, Dr. B. Willey, Mt. Sinai Hospital; Dr. S. Drews, Ministry of Health Laboratories, Toronto, Kanada | SARS-Ausbruch 2003; Titer mit IFA überprüft |
| Bevölkerung: | | zufällig ausgewählte Proben |
| <ul style="list-style-type: none"> • China (Anhui, Beijing, Henan, Shanxi, Sichuan, Xinjiang) • Weißrussland (Minsk) • Finnland (Helsinki) • Deutschland (Regensburg) | <ul style="list-style-type: none"> Dr. Yiming Shao, Chinese Center for Disease Control, Beijing, China Dr. E. Samoilovich, Universität Minsk J. Lindner, Universität Regensburg B. Hottenträger, Universität Regensburg | <ul style="list-style-type: none"> gesunde und HIV-positive Spender (Kinder/Erwachsene) gesunde Spender (Kinder/Erwachsene) |
| Kinder mit Kawasaki Krankheit | Dr. S. Gerling, St. Hedwig Klinik, Regensburg; Dr. K. Klein, Regensburg Dr. J.P. Gutendeutsch, Regensburg | Patienten in Behandlung wegen Kawasaki Syndrom |

Tab. II-8. Verwendete Serumproben.

7.2 Assaybedingungen, Antikörper und Antiseren

Alle Inkubationen erfolgten bei RT unter Schütteln. Verdünnungen von Seren und Antikörpern wurden entsprechend Tab. II-9 hergestellt.

Zur Detektion von Antikörpern wurden die antigenbeschichteten Nitrozellulosestreifen 1 h in Serumverdünnungen inkubiert. Nach Absaugen der Lösungen wurde zweimal je 5 min in TTBS gewaschen. Anschließend wurden die Streifen mit dem entsprechenden sekundären Antikörperkonjugat (Dako) ebenfalls 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 15 min) in TTBS, wurden gebundene Antikörper colorimetrisch wie unter II.3.2.2 beschrieben nachgewiesen.

| Serum | Verdünnung in TBS | sekundärer Antikörper, HRP-Konjugat, Konz. 1,3 mg/ml | Verdünnung in 70% LowCross-Buffer ^a |
|------------------------------------|-------------------|--|--|
| human | 1:100 | Kaninchen anti-human IgG | 1:1000 |
| | 1:50 | Kaninchen anti-human IgA | 1:2000 |
| | 1:50 | Kaninchen anti-human IgM | 1:500 |
| Kaninchen anti-SARS N ^b | 1:10000 | Schwein anti-Kaninchen Ig | 1:1000 |
| Kaninchen 23N ^c | 1:1000 | Schwein anti-Kaninchen Ig | |

Tab. II-9. Serum- und Antikörperverdünnungen für Line-Immunoassay.

^a Um Hintergrund- und Matrixeffekte zu reduzieren, wurden Sekundärantikörper in 70% LowCrossTM-Buffer (Candor Bioscience, Weißensberg) [v/v] + 30% TBS [v/v] verdünnt.

^b Anti-SARS N Kaninchenserum wurde durch Injektion von rekombinantem SARS Nukleokapsid in Kaninchen hergestellt (Davids Biotechnologie, Regensburg)

^c Kaninchen 23N Serum enthält gegen das Nukleokapsid von HCoV-NL63 gerichtete Antikörper. Es wurde von Dr. Lia van der Hoek, Universität Amsterdam, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

7.3 Aviditätsassay

Kreuzreagierende Antikörper stellen in vielen serologischen Assays ein Problem dar. Oft handelt es sich hierbei um Bindungen mit niedriger Affinität. Um schwache Antigen-Antikörper Wechselwirkungen an ihrer Ausprägung zu hindern, kann die Konzentration an kleinen, stark geladenen Ionen, wie etwa Na⁺ oder K⁺, im Inkubationspuffer erhöht werden. Aufgrund dessen wurden für Aviditätsassays die Serumproben in einem Hochsalzpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 M NaCl) verdünnt. Durch den Einsatz von chaotropen Salzen (z. B. KSCN, Harnstoff) im Waschpuffer können niederaffine Antigen-Antikörper Bindungen wieder gelöst werden (Harnstoffelution). Hierzu wurden die Streifen nach der Seruminkubation einmal 5 min in TTBS gewaschen und anschließend für exakt 3 min in TTBS + 6 M Harnstoff geschüttelt. Anschließend wurde nochmals in TTBS gewaschen und wie unter II.7.2 dargestellt fortgefahren. Diese Methode diente auch zur Messung der Antikörperreifung im Verlauf einer HCoV-Infektion.

7.4 Quantifizierung

Quantitative Analysen wurden genau wie unter II.7.2 und II.7.3 beschrieben durchgeführt, wobei allerdings das HRP-Konjugat durch fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 555 goat anti-human IgG und Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG; Invitrogen) ersetzt wurde. Durch Laser-Anregung wurden gebundene Antikörper mit einem LS200 Scanner (Tecan, Crailsheim) detektiert und die erhaltenen Fluoreszenz-Daten mit Hilfe der Array Pro Software (Tecan) ausgewertet.

8. T-Zell-Diagnostik

8.1 Blutentnahme und Spender

Die Blutentnahmen wurden von Dr. med. H. H. Niller durchgeführt. Es wurden 30-60 ml Vollblut entnommen und mit Heparin (Endkonzentration 25 IU/ml) gemischt. Die Proben konnten vor Weiterverarbeitung (II.8.3) bis zu 24 h bei RT gelagert werden.

Alle Probanden waren gesund und als potentielle Spender in einer internen Datenbank (Dr. L. Deml) verzeichnet. Sie wurden aufgrund ihrer HLA-Konstellation und/oder wegen ihrer serologischen Befunde ausgewählt. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission der Universität Regensburg begutachtet und genehmigt.

8.2 Peptide und Antigene

Zur Stimulation erregerspezifischer Immunzellen wurden die rekombinanten HCoV Nukleokapsid Proteine (Volllänge) verwendet.

Um spezifische T-Zell-Epitope (CTL und T-Helferzellen) bestimmen zu können, wurden zwei Peptidbibliotheken basierend auf Nukleokapsid Proteinen (Tab. II-10) synthetisch hergestellt (JPT Peptide Technologies, Berlin).

| Peptidbank 1: Decamere | | | | | |
|---|-------------|------------------|------------|-------------|-------------------|
| HLA-A*0201 | | | HLA-B*0702 | | |
| Nr. | AS-Position | AS-Sequenz | Nr. | AS-Position | AS-Sequenz |
| 1 | NL63_128 | SIALPPELSV | 25 | NL63_222 | QPRADKPSQL |
| 2 | NL63_366 | SAIIEIVNEV | 26 | NL63_16 | FPPPSFYMPL |
| 3 | NL63_129 | IALPPELSVV | 27 | NL63_32 | APYRVIPRNL |
| 4 | NL63_367 | AIIEIVNEVL | 28 | 229E_34 | QPWKVIPRNL |
| 5 | NL63_35 | RVIPRNLVPI | 29 | NL63_72 | LPPKVHFYYL |
| 6 | 229E_37 | KVIPRNLVPI | 30 | 229E_74 | LSPKLHFYYL |
| 7 | NL63_80 | YLGTGPHKDL | 31 | OC43_119 | LLPRWYFYFL |
| 8 | 229E_82 | YLGTGPHKDA | 32 | SARS_105 | LSPRWYFYFL |
| 9 | OC43_127 | YLGTGPHAKD | 33 | NL63_17 | PPPSFYMPLL |
| 10 | NL63_184 | DLVAAVTLAL | 34 | NL63_18 | PPSFYMPLLV |
| 11 | NL63_63 | RMRRGQRVDL | 35 | NL63_131 | LPPELSVVEV |
| 12 | 229E_65 | RTRKGKRVDL | 36 | NL63_359 | KPLADDDSAI |
| 13 | NL63_310 | MLVAKDNKNL | 37 | NL63_114 | GNRKRNRQKPL |
| 14 | NL63_100 | WVAKEGAKTV | 38 | NL63_352 | NASIPESKPL |
| 15 | 229E_102 | WVAVDGAKTE | 39 | NL63_121 | KPLEPKFSIA |
| 16 | NL63_286 | ALFFDSEVST | 40 | NL63_23 | MPLLVSSDKA |
| 17 | NL63_276 | QLAELIPNQA | 41 | NL63_319 | LPKFIEQISA |
| 18 | NL63_336 | KEMQSQSSHV | 42 | NL63_233 | KPRWKRVPTR |
| 19 | NL63_303 | QITYTYKMLV | 43 | NL63_268 | GVDAKGFPQL |
| 20 | NL63_92 | RQRSDGVVWV | 44 | 229E_283 | GVKAKGY PQF |
| 21 | NL63_230 | QLKKPRWKRV | 45 | NL63_278 | AELIPNQAAL |
| 22 | NL63_360 | PLADDDSAII | 49 | 229E_20 | IPYSLYSPLL |
| 23 | NL63_122 | PLEPKFSIAL | 50 | 229E_362 | NPSQTSPATA |
| 24 | NL63_187 | AAVTLALKNL | 53 | OC43_307 | DPQFPILAEI |
| 46 | 229E_318 | VLTFTTRVTV | 54 | OC43_417 | RVQQNKSREL |
| 47 | 229E_29 | LVDSEQPWKV | 57 | HKU1_400 | SPELFDSLNL |
| 48 | 229E_379 | SIETDIIDEV | 58 | HKU1_204 | QSRGPNRSL |
| 51 | OC43_139 | GTDIDGVYVW | 62 | SARS_151 | NPNNNAATVL |
| 52 | OC43_402 | GQGENDNISV | 63 | SARS_344 | DPQFKDNVIL |
| 55 | HKU1_427 | LLATLDDPYV | | | |
| 56 | HKU1_138 | GESLEGVFWV | | | |
| Peptidbank 2: 15-mere; HCoV-NL63 N umspannend | | | | | |
| Nr. | AS-Position | AS-Sequenz | Nr. | AS-Position | AS-Sequenz |
| 1 | 1 | MASVNWADDRAARKK | 17 | 193 | LKNLGFNDQSKSPSS |
| 2 | 13 | RKKFPPPSFYMPLL | 18 | 205 | PSSSGTSTPKKPNKP |
| 3 | 25 | LLVSSDKAPYRVIPR | 19 | 217 | NKPLSQPRADKPSQL |
| 4 | 37 | IPRNLVPIGKGNKDE | 20 | 229 | SQLKKPRWKRVPTRE |
| 5 | 49 | KDEQIGYWNVQERWR | 21 | 241 | TREENVICFCGPRDF |
| 6 | 61 | RWRMRRGQRVDLPPK | 22 | 253 | RDFNHNMGDSDLVQN |
| 7 | 73 | PPKVHFYYLGTGPHK | 23 | 265 | VQNGVDAKGFPQLAE |
| 8 | 85 | PHKDLKFRQRSQDVV | 24 | 277 | LAELIPNQAALFFDS |
| 9 | 97 | GVVWVAKEGAKTVNT | 25 | 289 | FDSEVSTDEVGDNVQ |
| 10 | 109 | VNTSLGNRKRNRQKPL | 26 | 301 | NVQITYTYKMLVAKD |
| 11 | 121 | KPLEPKFSIALPPEL | 27 | 313 | AKDNKNLPPKIEQIS |
| 12 | 133 | PELSVVEFEDRSNNS | 28 | 325 | QISAFKPSIKEMQ |
| 13 | 145 | NSSRASSRSSTRNN | 29 | 337 | EMQSQSSHVAQNTVL |
| 14 | 157 | RNNSRDSSRSTSRQQ | 30 | 349 | TVLNASIPESKPLAD |
| 15 | 169 | RQSRTRSDSNQSSS | 31 | 361 | LADDDSAIIEIVNEVLH |
| 16 | 181 | SSSDLVAAVTLALKN | | | |

Tab. II-10. Peptidbanken und Aminosäuresequenzen. Peptidbank 1 umfasst potentielle CTL-Epitope. Die Epitope wurden mit Hilfe der Online-Programme bimas (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) und syfpeithi (<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>) für die HLA-Klasse-I-Allele HLA-A*0201 und HLA-B*0702 vorhergesagt. Peptide Nr. 4, 7, 10, 11, 24 und 31 wurden als Bindungspartner für beide HLA-Allele vorgeschlagen. Peptidbank 2 umspannt das HCoV-NL63 N Protein mit Überlappungen von je 3 AS. Aufgrund ihrer Länge (15 AS), konnten diese Peptide zur Stimulation von CD4⁺-Zellen benutzt werden.

Um das Screeningverfahren zu vereinfachen, wurden Peptidpools wie folgt hergestellt.

Peptidbank 1, HLA-A*0201 (5er Peptidpools): P1 (Nr. 1-4, 10), P2 (Nr. 13, 16-19), P3 (Nr. 20-24), P4 (Nr. 5-9), P5 (Nr. 11, 12, 14, 15, 31), P6 (Nr. 46-48, 51, 52), P7 (Nr. 55, 56, 59-61).

Peptidbank 1, HLA-B*0702 (5er Peptidpools): P8 (Nr. 25, 26, 33-35), P9 (Nr. 36-40), P10 (Nr. 39-42, 45), P11 (Nr. 27-31), P12 (Nr. 11, 27, 32, 43, 44), P13 (Nr. 44, 49, 50, 53, 54), P14 (Nr. 57-61).

Peptidbank 2 (2er Peptidpools): es wurden jeweils 2 Peptide gepoolt; Peptid Nr. 31 wurde immer einzeln eingesetzt.

8.3 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten

Periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus 30-60 ml heparinisiertem Vollblut wie folgt isoliert. 15 ml Ficoll (PAN, Aidenbach) wurden in 50 ml Falcons (Becton Dickinson) mit 1:2 in PBS verdünntem Vollblut überschichtet und 30 min bei 880 x g zentrifugiert (Multifuge 3S-R, Kendro, Langenselbold; Ausschwingrotor, Bremseinstellung 0, RT), wodurch eine Auftrennung in Erythrozyten, PBMCs und Plasma erreicht wurde. Die PBMCs wurden mit einer sterilen Plastikpipette abgezogen, in ein frisches 50 ml Falcon überführt und zweimal mit ca. 30 ml PBS gewaschen (300 x g, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml T-Zellmedium (TZM; RPMI-1640 [PAN], 10% humanes Serum [v/v]) resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim) bestimmt.

Bei Bedarf konnten CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen mit Hilfe der Dynabeads[®] CD4 bzw. Dynabeads[®] CD8 Kits (Invitrogen) nach Vorgaben des Herstellers aus vorgereinigten PBMCs depletiert werden.

Alle Arbeiten wurden unter einer Laminar-Flow Einheit (BDK, Sonnenbühl-Genkingen) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

8.4 Stimulation von T-Zellen und Detektion von IFN- γ -Produktion mittels *ELISPOT*

Antigenspezifische T-Zellen können anhand ihrer Zytokinsekretion mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens (enzyme-linked immunospot assay) detektiert werden. Diese schnelle und hochsensitive Testmethode erlaubt eine quantitative Aussage über die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen.

Mit Nitrozellulose beschichtete 96-well Mikrotiterplatten (MAHA N 45; Millipore) wurden mit 100 μ l/Well monoklonalem anti-human IFN- γ -Antikörper (Mabtech, Hamburg; 5 μ g/ml in PBS) \ddot{u} N bei 4°C oder 1 h bei 37°C beschichtet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (200 μ l/well). Darauf wurden je 2 x 10⁵ PBMCs in einem Volumen von 100 μ l TZM pro Napf ausgesät.

Zur Stimulation wurden HCoV Nukleokapsid Proteine oder Peptide verdünnt in TZM (50 μ l pro Napf; Endkonz. 10 μ g/ml bei Stimulation mit einzelnen Peptiden und N Proteinen, 20 bzw. 50 μ g/ml bei Stimulation mit 2er bzw. 5er Peptidpools) zugegeben. Als Negativkontrolle wurden entweder ein irrelevantes HIV-Peptid (E10F, 10 μ g/ml in TZM) oder PSA (prostate specific antigen, 10 μ g/ml in TZM), als Positivkontrolle eine Mischung aus Phorbolmyristataacetat (PMA; 5 ng/ml Endkonz.) und Ionomycin (1 μ g/ml Endkonz.; Sigma-Aldrich) verwendet. Jede Stimulation wurde in 3 bis 5 Parallelen durchgeführt.

Bei niedrigen Frequenzen antigenspezifischer Immunzellen können zur Erhöhung der Sensitivität co-stimulatorische Antikörper zu den Ansätzen hinzu gegeben werden, ohne dass dabei eine unspezifische Zytokinproduktion induziert wird (Ott *et al.*, 2004; Waldrop *et al.*, 1998). Um die Detektion der IFN- γ -Antworten zu maximieren, wurden gegebenenfalls die kultivierten PBMCs mit den monoklonalen Antikörpern Maus anti-human CD28 und Maus anti-human CD49d (BD Pharmingen, Heidelberg; Endkonz. je 1 μ g/ml) zusätzlich stimuliert.

Die Platten wurden anschließend für eine Dauer von 19-48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Der Stimulationsansatz wurde verworfen und die Mikrotiterplatten gewaschen (6 x 3 min, PBS + 0,1% Tween 20 [v/v]), um restliche anhaftende Zellen zu entfernen. Anschließend wurden 100 μ l/Well biotinylierter anti-human IFN- γ -Antikörper (Mabtech; Endkonz. 1 μ g/ml in PBS) zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei RT oder \ddot{u} N bei 4°C wurden die Platten gewaschen (6 x 3 min, PBS) und für 1 h bei RT mit je 100 μ l Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (AP)-Konjugat (Mabtech;

1 µg/ml in PBS) inkubiert. Nach erneutem Waschen (6 x 3 min, PBS), erfolgte die colorimetrische Detektion. NBT/BCIP Stammlösung (Boehringer, Mannheim) wurde im Verhältnis 1:50 mit Färbepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) verdünnt und sofort 100 µl/Well zugegeben. Darauf wurde im Dunkeln bei RT solange inkubiert, bis Spots sichtbar wurden (ca. 5 bis 30 min). Anschließend wurde die Färbelösung verworfen, die Reaktion durch Waschen mit H₂O gestoppt und die Platten üN bei RT getrocknet.

Die automatische Auszählung der Mikrotiterplatten erfolgte an einem Bioreader 2000 (Bio-Sys, München) mit zugehöriger Software.

9. Computerprogramme, Datenbanken und Internetressourcen

Zur Textverarbeitung, Graphikerstellung und Tabellenkalkulation wurde das MS Office 2003 Package (Microsoft) verwendet. Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe der Programme Illustrator CS2 und Photoshop CS (Adobe). pdf-Dokumente wurden mit der pdf-Brewer Software (Macrovision) generiert und mit dem Adobe Reader v8 angezeigt. Mit dem Programm MathType 5.0 (Design Science, Long Beach, CA, USA) wurden mathematische Gleichungen erstellt.

Die Programme Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd.), BioLign 4.0.6 (Tom Hall, bio-soft), SimVector 2.0 (Premier Biosoft Int.) sowie verschiedene Online Tools des HUSAR Bioinformatics Lab (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>; DKFZ, Heidelberg) und des ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>; Swiss Institute of Bioinformatics) dienen zur Bearbeitung, Analyse und Darstellung von Protein bzw. DNA-Sequenzdaten.

Die Coronavirus DataBase (CoVDB) der Universität Hongkong wurde für HCoV spezifische Sequenzanalysen in Anspruch genommen (<http://covdb.microbiology.hku.hk/>).

Für Datenbank- und Literaturrecherchen wurde das Online-Angebot der U.S. National Library of Medicine und der National Institutes of Health (www.pubmed.gov) benutzt.

Das Literaturverzeichnis wurde mit Hilfe des Programms EndNote 9.0.1 (Thomson Scientific, München) erstellt.

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit benutzten Programme wurden von der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt oder waren frei im Internet verfügbar.

III. ERGEBNISSE

1. Sequenzanalyse der geklonten Nukleokapsid Gene

Sequenzanalysen zeigten, dass die Nukleotidsequenzen der klonierten Nukleokapsid Gene von HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 und SARS-CoV vollständig mit bereits veröffentlichten Sequenzen übereinstimmen (vgl. Tab. II-1 für GenBank Zugangsnummern).

Die Nukleinsäuresequenz des HCoV-HKU1 Nukleokapsid Gens, welches aus einem Nasenabstrich von einem Kleinkind (A. Vabret, pers. Komm.) mittels RT-PCR erhalten wurde, weicht hingegen von bisher publizierten Sequenzen ab. Auf DNA-Ebene zeigt die neu identifizierte Sequenz gegenüber ihrer nächstverwandten Sequenz (HCoV-HKU1, Stamm N3; GenBank DQ415903, nt 28314-29639)(Woo *et al.*, 2006) 20 Basenaustausche bei einer Länge von 1326 Nukleotiden (98,49% Übereinstimmung), was auf Proteinebene 97,96% Ähnlichkeit und 97,28% Homologie entspricht.

Aufgrund dieser Unterschiede wurde die Sequenz des im Rahmen dieser Arbeit klonierten HCoV-HKU1 N Gens (Stamm Caen) in öffentlich zugänglichen Datenbanken unter der GenBank Zugangsnummer DQ778921 hinterlegt.

Eine genetische Variabilität zwischen verschiedenen HCoV-HKU1-Isolaten wurde bereits beschrieben (Sloots *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2005b; Woo *et al.*, 2006). Vergleiche mit anderen, in der HCoV DataBase (Huang *et al.*, 2008) hinterlegten HKU1-Sequenzen, legten eine Verwandtschaft mit dem Genotyp A nahe. Die neue Sequenz unterscheidet sich von den 13 Nukleokapsid-Sequenzen des Genotyps A in nur 20 bis 27 Nukleotiden, während Vergleiche mit Genotyp B (3 Sequenzen) und C (6 Sequenzen) 65-71 Änderungen aufweisen. In den Bereichen, wo die HKU1 (Stamm Caen)-Sequenz von den Sequenzen des Genotyps A abweicht, entspricht sie dort den Genotypen B und C. Abb. III-1 zeigt als Beispiel einen Ausschnitt aus einem Nukleokapsid-Alignment von HCoV-HKU1 (Stamm Caen) mit jeweils zwei Vertretern der Genotypen A, B und C.

| | | | | | | |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| Caen | GGCTGACCAA | TCTGACCGAA | ATTACCAAAC | CTTTAATAGA | GGCAGAAAAA | CCCAACCTAA |
| DQ415896^a | GGCTGACCAA | TCTGACCGAA | ATTACCAAAC | CTTTAATAGA | GGCAGAAAAA | CCCAACCTAA |
| DQ415914^a | GGCTGACCAA | TCTGACCGAA | ATTACCAAAC | CTTTAATAGA | GGCAGAAAAA | CCCAACCTAA |
| DQ415902^b | GGTTGACCAA | TCTGACCGAA | GCCATCAAAC | CTATAATAGA | GGCAGAAAAA | CCCAACCTAA |
| DQ415911^b | GGTTGACCAA | TCTGACCGAA | GCCATCAAAC | CTATAATAGA | GGCAGAAAAA | CCCAACCTAA |
| DQ415913^c | GGTTGACCAA | TCTGACCGAA | GCCATCAAAC | CTATAATAGA | GGCAGAAAAA | CCCAACCTAA |
| DQ415912^c | GGTTGACCAA | TCTGACCGAA | GCCATCAAAC | CTATAATAGA | GGCAGAAAAA | CCCAACCTAA |

Abb. III-1. Genetische Variabilität bei HCoV-HKU1. Gezeigt ist der Nukleinsäurevergleich der *N* Gene verschiedener HKU1-Genotypen im Bereich von nt 80 bis nt 140 des 1326 nt langen *N* Gens. Mit Ausnahme von Position nt 96, wo die Caen-Sequenz den Genotypen B und C entspricht, korreliert Caen mit dem Genotyp A.

^a Genotyp A, ^b Genotyp B, ^c Genotyp C. Es sind jeweils die GenBank Zugangsnummern für Genomsequenzen angegeben. Die Farben heben Bereiche mit Sequenzunterschieden hervor.

2. Herstellung rekombinanter Antigene

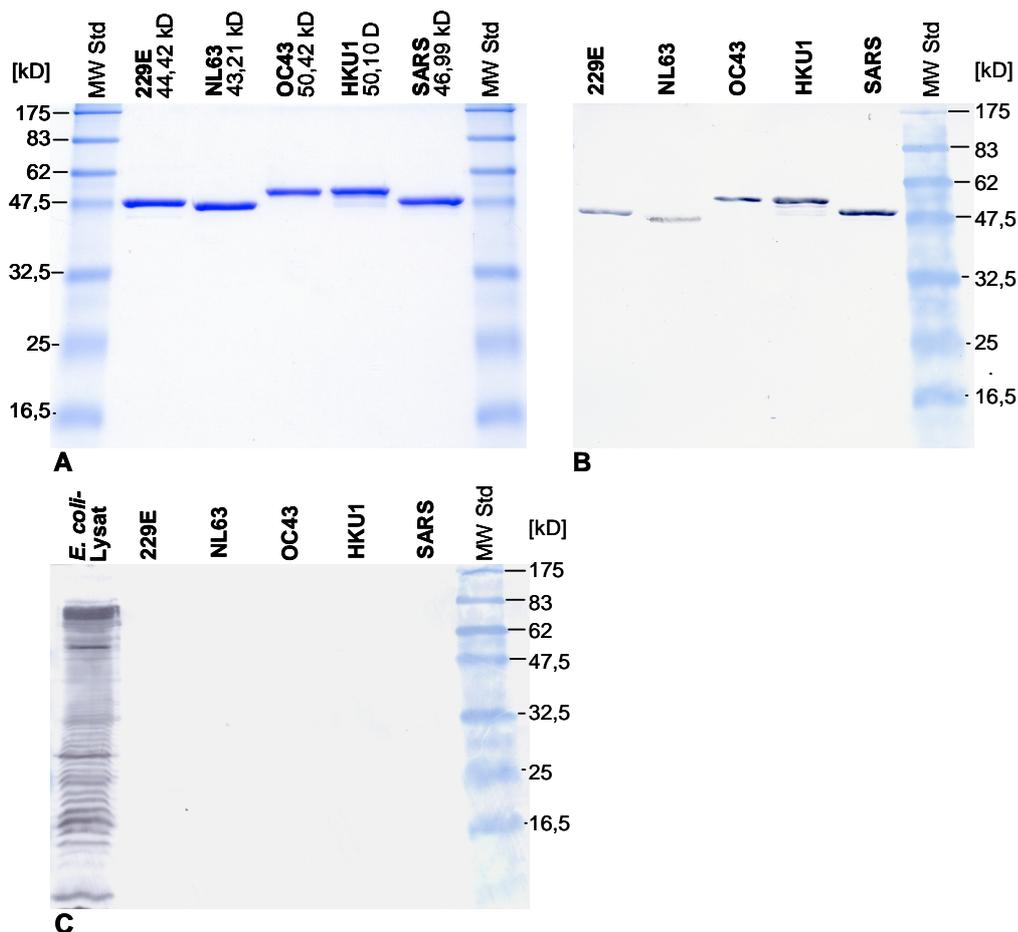


Abb. III-2. Rekombinante HCoV Nukleokapsid Antigene. **A:** SDS-PAGE und Coomassie-Färbung mit aufgereinigten Nukleokapsid Proteinen (1 µg/Spur). Das theoretische Molekulargewicht inklusive His-Tag ist jeweils angegeben. **B:** Western-Blot von A. Der N-terminale His-Tag wurde mit monoklonalen Antikörpern detektiert. **C:** Western-Blot von A. Als Positivkontrolle wurde *E. coli*-Lysat (BL21-CodonPlus®(DE3)-RP, nicht transformiert) aufgetragen. Es konnte keine Reaktion von gereinigten Nukleokapsid Proteinen mit anti-*E. coli* Immunglobulinen beobachtet werden. MW Std, Größenstandard; kD, Kilodalton.

Die Nukleokapsid Gene von allen bekannten humanpathogenen Coronaviren (HCoV-229E, -NL63, OC43, -HKU1, SARS-CoV) wurden in *Escherichia coli* überexprimiert und bis zur Homogenität aufgereinigt (Abb. III-2A). Weiterhin wurde die Identität der rekombinanten Proteine anhand ihres N-terminalen His-Tags durch Reaktion mit monoklonalen Maus Penta-His™ Antikörpern bestätigt (Abb. III-2B; vgl. II.3.2.2).

Nukleokapsid Protein enthaltende Fraktionen wurden vor ihrer Anwendung in serologischen Assays mit Western-Blotting Experimenten auf bakterielle Kontaminationen überprüft (vgl. II.5.3). In den für Immunoassays verwendeten Fraktionen konnten keine Verunreinigungen des Expressionswirts detektiert werden (Abb. III-2C). Somit ließ sich ausschließen, dass eventuelle immunologische Effekte von fremden *E. coli* Bestandteilen herrühren.

3. Etablierung des HCoV-Line-Immunoassays

Zunächst wurde die Immunogenität der rekombinanten Nukleokapsid Proteine und ihre Eignung als Antigene in einem Line-Immunoassay Format überprüft.

Zur Etablierung des Line-Immunoassays wurden die antigenbeschichteten Nitrozellulosestreifen (vgl. II.6) mit klinisch definierten humanen Seren getestet. Die humanen Serumproben wurden während und/oder nach Infektion mit HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 bzw. SARS-CoV entnommen. Zusätzlich wurden Antiseren tierischen Ursprungs (Kaninchen anti-SARS-N, Kaninchen 23N; vgl. II.7.2) zur Evaluation verwendet. Unglücklicherweise waren keine Serumproben erhältlich, die nach bestätigter HCoV-HKU1-Infektion gesammelt wurden.

Schließlich wurden zufällig ausgewählte, nicht näher definierte Serumproben gesunder Spender zur weiteren Evaluation herangezogen.

3.1 HCoV-OC43 und HCoV-229E

Zur Überprüfung der OC43 und 229E Nukleokapsid Antigene, wurden Serumpaare verwendet, die während der akuten und rekonvaleszenten Phase einer nachgewiesenen Infektion mit HCoV-OC43 bzw. -229E entnommen wurden (vgl. Tab. II-8). Hierbei interessierte sowohl die spezifische und sensitive Reaktion mit dem entsprechenden immobilisierten Antigen, als auch der Vergleich der IgG-

Signalintensitäten zwischen akuter (A) und rekonvaleszenter (B) Infektion (Tab. III-1, Abb. III-3).

| | Serum Nr. | | 229E N | | NL63 N | | OC43 N | | HKU1 N | | SARS N | |
|------------------------|-----------|---------|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|---|
| HCoV-OC43 ^a | BCM-1A | BCM-1B | ++ | ++ | ++ | ++ | - | +++ | - | +++ | - | - |
| | BCM-2A | BCM-2B | - | - | + | + | - | +++ | - | ++ | - | - |
| | BCM-3A | BCM-3B | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - |
| | BCM-4A | BCM-4B | - | - | + | + | + | +++ | - | +++ | - | - |
| | BCM-5A | BCM-5B | ++ | +++ | ++ | +++ | + | +++ | + | +++ | - | - |
| | BCM-6A | BCM-6B | ++ | ++ | +++ | ++ | + | ++ | + | ++ | - | - |
| HCoV-229E ^b | BCM-7A | BCM-7B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - | - |
| | BCM-8A | BCM-8B | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | - | - | - |
| | BCM-9A | BCM-9B | - | +++ | ++ | +++ | + | + | - | - | - | - |
| | BCM-10A | BCM-10B | + | + | + | + | - | ++ | - | + | - | - |
| | BCM-11A | BCM-11B | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | - | - |
| | BCM-12A | BCM-12B | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | - | - |

Tab. III-1. IgG-Reaktionen klinisch definierter Seren mit HCoV Nukleokapsiden.

^a BCM-1 bis BCM-6: Serumproben von HCoV-OC43 infizierten Patienten.

^b BCM-7 bis BCM-12: Serumproben von HCoV-229E infizierten Patienten.

A: akute Phase, B: rekonvaleszente Phase. Positive Reaktionen sind mit + (moderat), ++ (stark) und +++ (sehr stark) gekennzeichnet. Negative/keine Reaktionen ist mit - dargestellt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Alle von rekonvaleszenten Patienten erhaltenen Seren (BCM-1B bis BCM-12B) reagierten wie erwartet mit den entsprechenden Antigenen. Eine starke Induktion der IgG-Antwort zwischen akuter und rekonvaleszenter Phase wurde für OC43 in 5 von 6 und für 229E in 3 von 6 Fällen beobachtet (Tab. III-1, schattiert). Zusätzlich reagierte in allen rekonvaleszenten OC43-Seren das HKU1 Antigen, mit Ausnahme von BCM-3B, wo insgesamt nur schwache Reaktionen detektiert werden konnten und keine Zunahme der Signalintensität für OC43 N beobachtet wurde. In Seren von HCoV-229E infizierten Patienten wurde ein Intensitätszuwachs von akut nach rekonvaleszent in 3 Probenpaaren festgestellt (BCM-9A/B, BCM-11A/B, BCM-12A/B), während in den übrigen 3 Paaren (BCM-7A/B, BCM-8A/B, BCM-10A/B) keine klare Verstärkung detektiert werden konnte. Die nur schwach mit 229E N

reagierende Probe BCM-10B zeigte definierte Reaktionen mit den Antigenen OC43 N und HKU1 N. Möglicherweise deutet dieser Befund auf eine zeitnahe Infektion mit OC43 hin. Darüber hinaus zeigten alle definierten Seren von HCoV-229E infizierten Personen (BCM-7 bis BCM-12) einen basalen Titer an NL63 spezifischen Antikörpern. Im Falle des Serumpaars BCM-9A/B wurde neben der starken Induktion von gegen 229E N gerichtetem IgG auch eine Verstärkung des NL63 Signals beobachtet. Keines der getesteten Seren reagierte mit dem SARS Nukleokapsid.

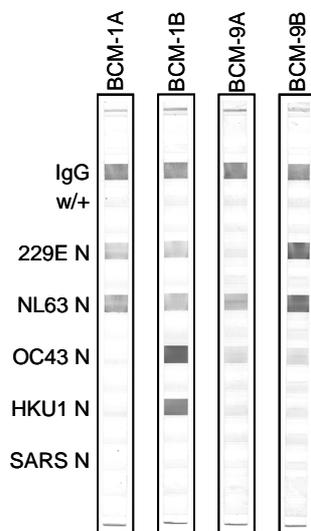
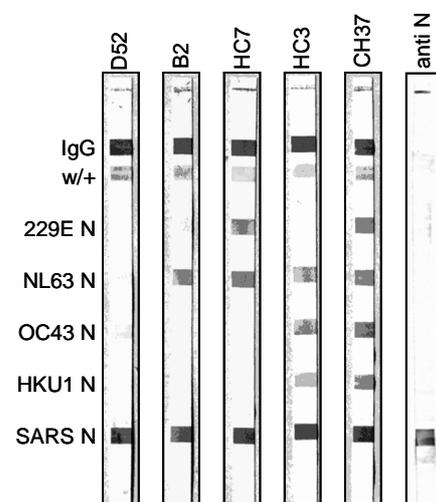


Abb. III-3: Line-Immunoassay Evaluation. Die mit rekombinanten Nukleokapsid Proteinen beschichteten Membranstreifen wurden mit klinisch definierten Serumpaaren von HCoV-OC43 (BCM-1A/B) oder HCoV-229E (BCM-9A/B) infizierten Patienten getestet. BCM-1A: Serum aus akuter Phase einer OC43-Infektion; BCM-1B: Serum aus rekonvaleszenter Phase, entnommen 55 Tage nach BCM-1A. BCM-9A: Akutphasen Serum einer 229E-Infektion; BCM-9B: rekonvaleszente Phase, entnommen 116 Tage nach BCM-9A. In den Proben, die während der akuten Krankheitsphase entnommen wurden, konnten keine OC43- oder 229E-spezifischen IgG detektiert werden. Sehr starke, gegen die entsprechenden Antigene gerichtete, humorale Antworten wurden in rekonvaleszenten Serumproben gemessen. Co-Reaktionen mit den Nukleokapsiden von HKU1 (BCM1) bzw. NL63 (BCM9) könnten von kreuzreagierenden Antikörpern herrühren (vgl. III.3.5). w/+, schwach-positive IgG-Kontrolle.

3.2 SARS-CoV

Zur weiteren Evaluation wurden 49 Serumproben von rekonvaleszenten SARS-Patienten getestet. Alle Proben zeigten starke Signale mit dem SARS Nukleokapsid (IgG). Abb. III-4 zeigt eine repräsentative Auswahl an entwickelten Immunoassay-Streifen.

Abb. III-4. Line-Immunoassay Evaluation mit Seren von rekonvaleszenten SARS-Patienten. Entnahme der Serumproben in Tagen nach Auftreten der ersten Symptome: D52, 115; B2, 104; HC7, 107; HC3, 105; CH37, 111. Alle getesteten Seren zeigten eine robuste IgG-Antwort gegen das SARS Nukleokapsid. Des Weiteren konnten spezifische Antikörper gegen andere HCoV in verschiedenen Kombinationen detektiert werden. Anti N: zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Streifen mit anti-SARS Nukleokapsid Kaninchenserum inkubiert. w/+, schwach-positive IgG-Kontrolle.



Gegen SARS N gerichtete Antikörper reagierten nicht mit Nukleokapsiden anderer humaner Coronaviren kreuz (vgl. z. B. Abb. III-4, D52 und B2). Die Reaktionen sind spezifisch und sensitiv (vgl. III.4.2).

3.3 HCoV-NL63

Um Spezifität und Sensitivität des NL63 Antigens zu testen, wurden die Immunoassays mit einer sequentiellen Serumreihe (10 Aliquots insgesamt, 2 akute, 8 rekonvaleszente) eines mit HCoV-NL63 infizierten Patienten durchgeführt. Zur weiteren Kontrolle wurde anti-NL63 Nukleokapsid Kaninchenserum verwendet (Abb. III-5). Ein IgG Titeranstieg zwischen akuter und rekonvaleszenter Phase der Infektion ist festzustellen.

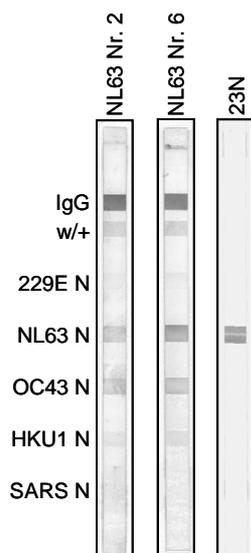


Abb. III-5: Line-Immunoassay Evaluierung mit HCoV-NL63 Serumreihe. Serumprobe Nr. 2 wurde während der akuten, Serumprobe Nr. 6 während der rekonvaleszenten Phase einer HCoV-NL63-Infektion entnommen. 23N: anti-NL63 Nukleokapsid Kaninchenserum. w/+, schwach-positive IgG-Kontrolle.

3.4 Testevaluierung mit Humansenen gesunder Spender

Um die Leistungsfähigkeit des Assays im Zusammenhang mit natürlicher Coronavirus-Seroprävalenz zu untersuchen, wurden 25 zufällig ausgewählte Serumproben gesunder Spender (Serumbank Klinikum Regensburg) getestet. Es konnten IgG Antikörper gegen einen, zwei und mehrere HCoV-Typen detektiert werden (Abb. III-6). 3 Serumproben zeigten keine Serokonversion, 2 davon stammten von Kindern (vgl. Abb. III-6, C-7). Keine der 25 Proben reagierte mit dem SARS Antigen.

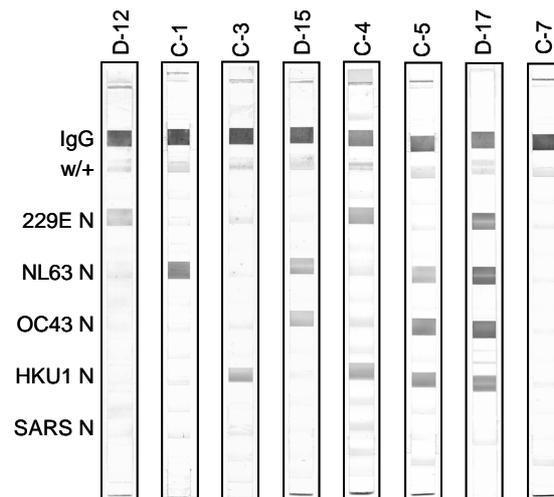


Abb. III-6. Line-Immunoassay Evaluation mit Seren gesunder Spender. Gezeigt ist eine repräsentative Auswahl der 25 getesteten Seren. Es konnten Antikörper gegen verschiedene humane Coronaviren nachgewiesen werden. w/+, schwach-positive IgG-Kontrolle.

3.5 Inhibierung von Kreuzreaktionen

HCoV Nukleokapside als Antigene zeichnen sich als Antigene generell durch hohe Sensivität und Spezifität aus (III.3.2 und III.3.4). Die Daten von Versuchen mit klinisch definierten Serumpaaren (III.3.1) zeigten jedoch, dass kreuzreagierende Epitope innerhalb der HCoV-Gruppen I (229E und NL63) und II (OC43 und HKU1) an einer IgG Antwort beteiligt sein könnten.

Die Avidität spezifischer Antikörper erhöht sich während der Reifung der IgG Antwort, d. h. die Bindungsstärken der Antigen-Antikörper Wechselwirkungen nehmen zu und werden auf hohem Niveau beibehalten. Kreuzreaktive Antikörper hingegen binden mit niedriger Avidität, da das erkannte Epitop nicht der „idealen“ Determinante entspricht. Solche Bindungen können durch stringente Assaybedingungen unterdrückt werden. Zur Inhibierung möglicher auftretender Kreuzreakтивitäten wurden sowohl der Verdünnungspuffer für das Serum, als auch der Waschpuffer modifiziert. Die Bindung niedrig-avider Antikörper wurde zum einen durch den Zusatz verschiedener NaCl Konzentrationen zum Serumverdünnungspuffer, sowie durch die Zugabe verschiedener Harnstoffkonzentrationen im Waschpuffer unterdrückt und die erhaltenen Signalstärken quantitativ ausgewertet.

3.5.1 Erhöhung der NaCl Konzentration

Um niederaffine Bindungen von unspezifischen Antikörpern an die Antigene zu verhindern, wurde die ionische Stärke im Serumverdünnungspuffer von 0,5 M auf

2 M NaCl erhöht (vgl. II.7.3). Ein Beispiel zeigt in Abb. III-7 den Effekt von Hochsalzbedingungen auf die Signalstärken. Optimale Ergebnisse wurden bei 2 M NaCl erreicht.

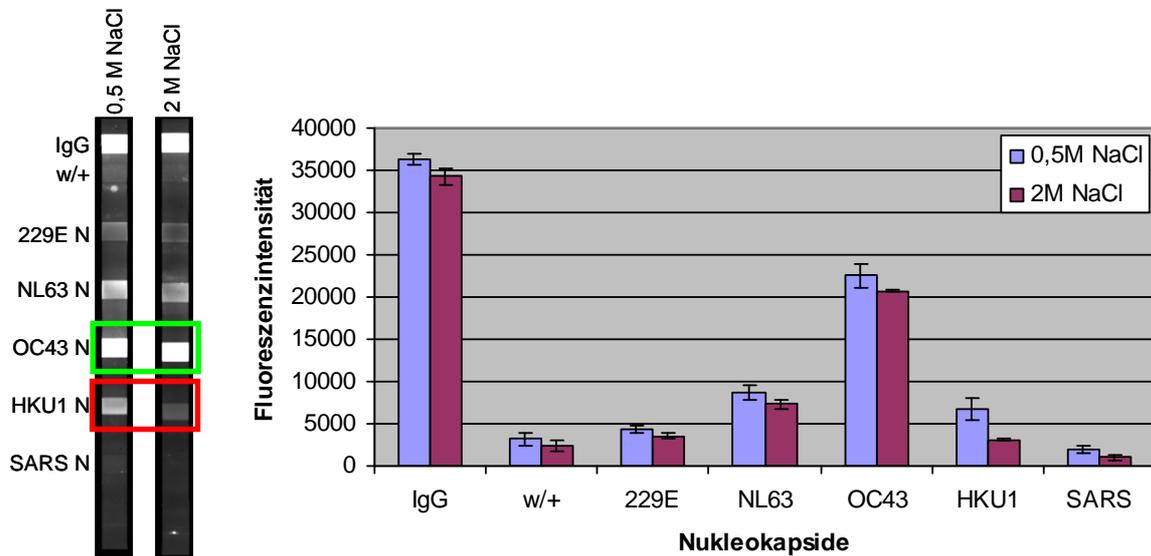


Abb. III-7. Aviditätsassay: Hochsalzbedingungen. Der Line-Immunoassay wurde mit Serum eines gesunden Spenders durchgeführt. Die Verdünnung erfolgte in 0,5 M NaCl bzw. 2 M NaCl enthaltendem Puffer. Eine starke Intensitätsabschwächung für das unspezifische HKU1 Signal ist festzustellen (rotes Rechteck), während die anderen Signale kaum an Intensität verlieren (z. B. grünes Rechteck). Alle Versuche wurden in 3 Replikaten durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern wie unter II.7.4 beschrieben.

Im Vergleich zu normalen Assaybedingungen (0,5 M NaCl) nehmen unter stringenteren Bedingungen (2 M NaCl) die Signalintensitäten für 229E und NL63 nur leicht ab (18,7 bzw. 15,8%), während sich die Signalstärke für die unspezifische HKU1-Bindung um 53,5% verringert. OC43-Signale verlieren nur um 8% an Intensität, was auf spezifische und hoch-avide Antikörpererkennung schließen lässt.

3.5.2 Harnstoffelution

Durch Zusatz von Harnstoff während eines Waschschriffs nach Seruminkubation konnten mit niedriger Avidität gebundene Antikörper eluiert und somit die Spezifität weiter erhöht werden (Abb. III-8A bis C).

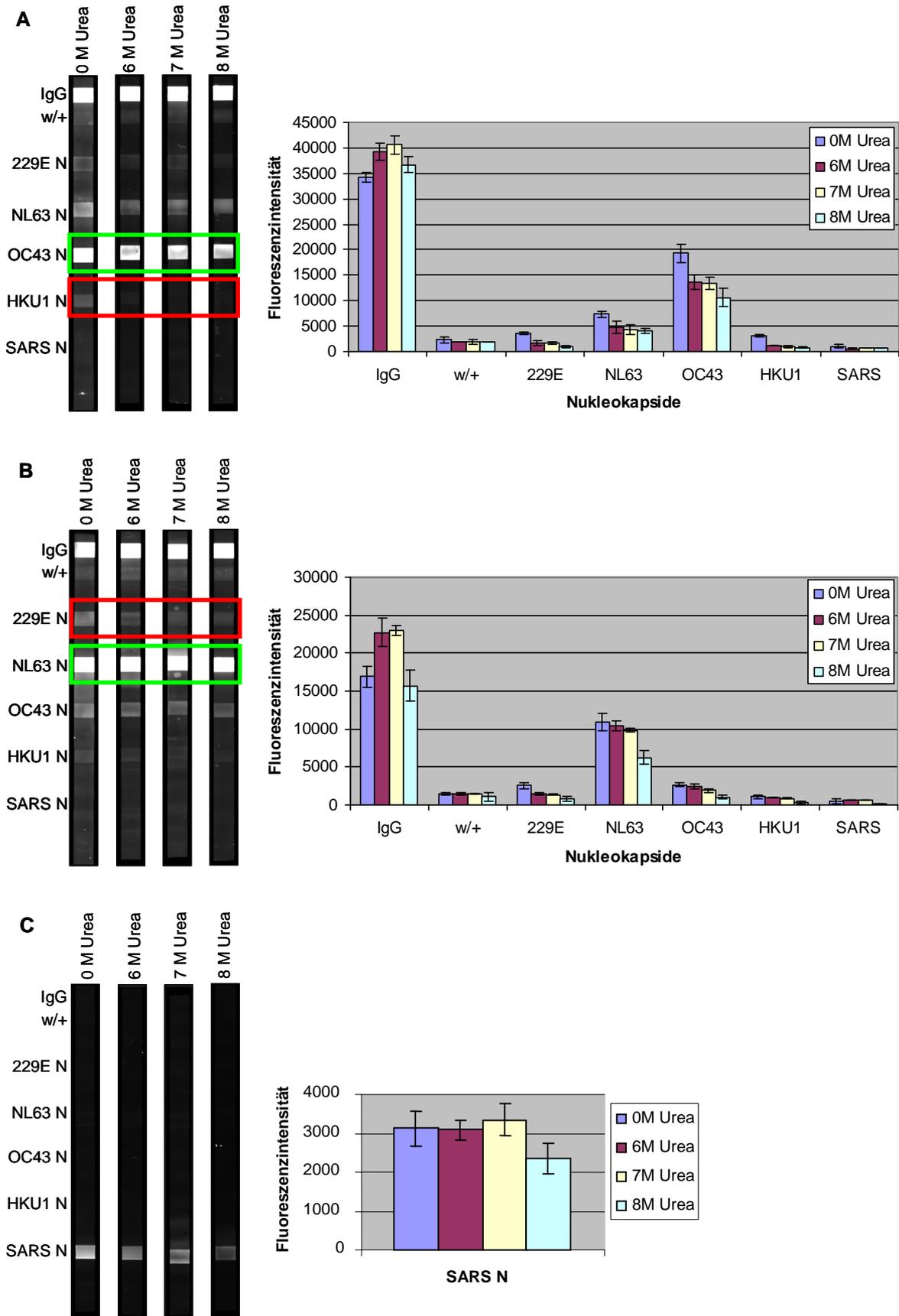


Abb. III-8. Harnstoffelution. A und B: Line-Immunoassay mit zwei humanen Seren und stringentem Waschschritt. Die spezifischen Reaktionen (grüne Rechtecke) bleiben bei 6 und 7 M Harnstoff größtenteils unbeeinflusst, während unspezifische niederaffine Antikörper eluiert werden können (rote

Rechtecke). **C:** Zum Vergleich wurde der Aviditätsassay mit anti-SARS N Kaninchenserum durchgeführt. Die spezifischen Reaktionen werden bei Harnstoffkonzentrationen bis 7 M kaum beeinflusst. Die Versuche wurden in 3 Replikaten durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern wie unter II.7.4 beschrieben.

Die Versuche zeigten, dass unspezifisch gebundene IgG Antikörper bei einer optimalen Harnstoffkonzentration von 6 M eluiert werden können. Unter diesen Bedingungen werden spezifische Bindungen kaum beeinträchtigt.

4. HCoV-Line-Immunoassay: Anwendungen

4.1 HCoV-Seroprävalenz

4.1.1 Gesunde Spender

| Land | Weißrussland | | Finnland | | Deutschland | | China | |
|-----------------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|--------------|-----------------|-------------------|-----------|
| Kinder (K) / Erwachsene (E) | K | E | K | E | K | E | K | E |
| Probenzahl (w/m) | 43 (n.v.) | 43 (n.v.) | 22 (9/13) | 11 (7/4) | 21 (10/11) | 59 (30/29) | 43 (22/21) | 92 (n.v.) |
| Alter (Intervall) | 4 J. (0,8-10) | 39,3 J. (20-60) | 74 T. (1-213) | 45,1 J. (23-67) | 4,1 J. (3-6) | 32,3 J. (23-75) | 5,4 J. (2,5-11,5) | n.v. |
| Anz. Positive (%) | | | | | | | | |
| 229E | 6 (14) | 11 (15,5) | 3 (13,6) | 6 (54,5) | 4 (19) | 26 (44,1) | 29 (67,8) | 79 (85,9) |
| NL63 | 13 (30,2) | 27 (62,8) | 8 (36,4) | 9 (81,2) | 11 (52,3) | 49 (83,1) | 32 (74,4) | 87 (94,6) |
| OC43 | 14 (32,6) | 22 (51,2) | 13 (59,1) | 8 (72,3) | 6 (28,6) | 39 (66,1) | 35 (81,4) | 77 (83,7) |
| HKU1 | 9 (20,9) | 8 (18,6) | 5 (22,7) | 2 (18,2) | 5 (23,8) | 7 (11,9) | 32 (74,4) | 66 (71,7) |
| SARS | 0 | 1 (2,3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (4,7) | 2 (2,2) |
| seronegativ | 20 (46,5) | 4 (9,3) | 7 (31,8) | 0 | 7 (33,3) | 5 (8,5) | 2 (4,7) | 1 (1,1) |
| Anz. Positive (%) | | | | | | | | |
| einfach | 9 (20,9) | 17 (39,5) | 6 (27,3) | 4 (36,4) | 7 (33,3) | 12 (20,3) | 1 (2,3) | 6 (6,5) |
| doppelt | 10 (23,3) | 16 (37,2) | 4 (18,2) | 2 (18,2) | 4 (19) | 23 (39) | 10 (23,3) | 12 (13) |
| dreifach | 3 (7) | 12 (9,3) | 4 (18,2) | 3 (27,3) | 1 (4,8) | 13 (22) | 15 (34,9) | 14 (15,2) |
| vierfach | 1 (2,3) | 2 (4,7) | 1 (4,5) | 2 (18,2) | 2 (9,5) | 6 (10,2) | 15 (34,9) | 58 (63) |
| fünffach | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (1,1) |
| Prävalenz/Serum | 0,98 | 1,51 | 1,36 | 2,27 | 1,24 | 2,05 | 2,93 | 3,36 |

Tab. III-2. HCoV-Seroprävalenz bei gesunden Spendern. Die Serumproben wurden mit dem Line-Immunoassay auf HCoV IgG untersucht. Anz., Anzahl; n.v., nicht verfügbar; w, weiblich; m, männlich; J., Jahre; T., Tage; Prävalenz/Serum = Summe Anzahl Positive/Anzahl Serumproben. Erläuterungen siehe Text.

Um die natürliche Verbreitung der verschiedenen humanen Coronavirus Typen in unterschiedlichen Populationen zu untersuchen, wurde mit Hilfe des Line-Immunoassays in zufällig ausgewählten Serumproben anti-HCoV Nukleokapsid IgG detektiert. Die Spendergruppen stammten aus verschiedenen Ländern (Weißrussland, Finnland, Deutschland, China) und setzten sich sowohl aus Kindern, als auch aus erwachsenen Spendern zusammen (vgl. II.7.1, Tab. II-8). In Tab. III-2 ist die Seroprävalenz einzelner Coronavirus-Typen für die verschiedenen Länder, in Kinder und erwachsene Spender unterteilt, zusammengestellt. Zusätzlich ist jeweils die Anzahl seronegativer, einfach und mehrfach reagierender Proben angegeben. In Abb. III-9 sind einige Daten aus Tab. III-2 graphisch dargestellt.

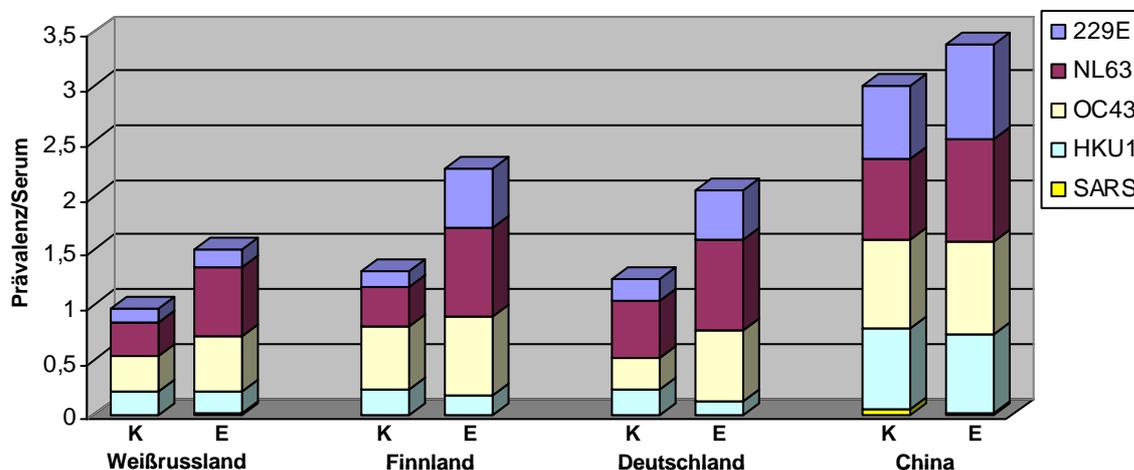


Abb. III-9. HCoV-Seroprevalenz. Es ist die durchschnittliche Prävalenz pro Serumprobe angegeben. Für jede Spendergruppe ist zusätzlich der jeweilige Anteil der einzelnen HCoV-Typen an der Gesamtprevalenz abgebildet. Kinder (K) sind Erwachsenen (E) gegenübergestellt.

Wie zu erwarten war, ist die HCoV-Seroprevalenz unter Erwachsenen insgesamt höher als unter Kindern. Als einziges Coronavirus-Antigen reagiert das HKU1 Nukleokapsid etwas öfter mit Kinderseren als mit Proben von Erwachsenen.

Allgemein ist die höchste Seroprävalenz bei Proben aus China zu finden (2,93 bzw. 3,36 Positive/Serum). Hier wurden insgesamt nur drei seronegative Aliquots (2 Kinder, 1 Erwachsener) identifiziert, während in 27,9% aller weißrussischen Seren keine anti-HCoV IgG detektiert werden konnte.

HCoV-NL63 und -OC43 scheinen insgesamt am weitesten verbreitet zu sein, HKU1 und 229E treten dagegen – mit Ausnahme von SARS – am seltensten auf. Anti-SARS N IgG konnte bei 2 Kindern (4,7%) und 2 Erwachsenen (2,2%) aus China detektiert werden. Eine Serumprobe aus Weißrussland reagierte sowohl mit dem

HKU1 als auch mit dem SARS Antigen sehr stark. Alle Proben, in denen anti-SARS Nukleokapsid IgG nachgewiesen werden konnte, wurden weitergehend analysiert (siehe III.4.1.3).

Die Kinder-Serumproben aus Finnland wurden von Säuglingen entnommen (Alter 1-213 Tage). Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei den detektierten IgG hauptsächlich um maternale Antikörper handelt.

4.1.2 HIV-positive Spender

Zusätzlich zu den Serumproben gesunder chinesischer Spender wurden 60 HIV-positive Kinder und 255 HIV-positive Erwachsene aus China getestet und die Daten miteinander verglichen. Generell zeigt sich bei HIV-positiven Kindern eine geringere Seroprävalenz bezüglich sämtlicher Coronavirus Typen. Bei diesen Kindern fiel die Coronavirus-Seroprävalenz (Prävalenz/Serum) mit 0,83 weit geringer aus als für die gesunde Kontrollgruppe (2,93). Abb. III-10 zeigt eine Gegenüberstellung HIV-positiver und gesunder Kinder bezüglich ihrer Seroreaktivität (%) für die jeweiligen Coronavirus Typen.

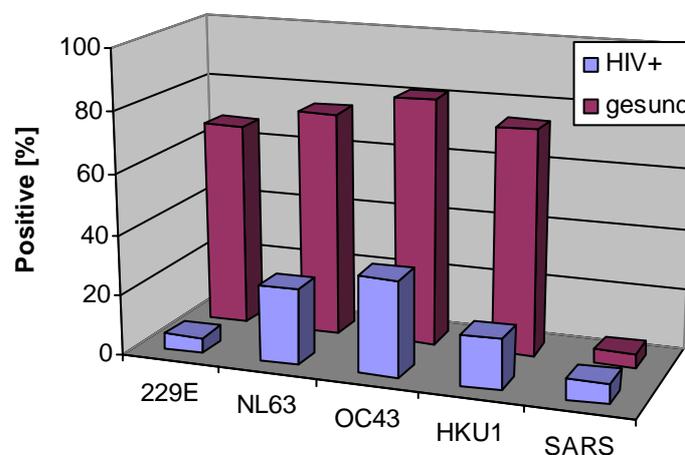


Abb. III-10. HCoV-Seroprävalenz bei HIV-positiven Kindern aus China. Reaktionen mit HCoV Nukleokapsiden bei 60 HIV-positiven Kindern (21 w, 39 m; mittleres Alter: 8 Jahre, Intervall 3-14 J.). Spenderdaten siehe Tab. III-2. 229E: 3 (5%), NL63: 15 (25%), OC43: 19 (31,7%), HKU1: 10 (16,7%), SARS: 4 (6,7%). Seronegativ: 27 (45%), einfach pos.: 20 (33,3%), doppelt pos.: 9 (15%), dreifach pos.: 4 (6,7%).

Im Vergleich zu den von den Kinderseren erhaltenen Daten, weisen adulte HIV-positive Spender mit Ausnahme von HCoV-HKU1 eine nur leicht geringere HCoV-Seroprävalenz wie gesunde Spender auf (Abb. III-11; Prävalenz/Serum: 2,96 vs. 3,36; HKU1-positiv: 71,1% vs. 45,1%). Während die Seroprävalenz bei erwachsenen HIV-positiven zu gesunden Spendern nur um den Faktor 1,1 ansteigt, erhöhte sich

die Seroprävalenz bei HIV-positiven Kindern im Vergleich zu gesunden Kindern 3,5-fach.

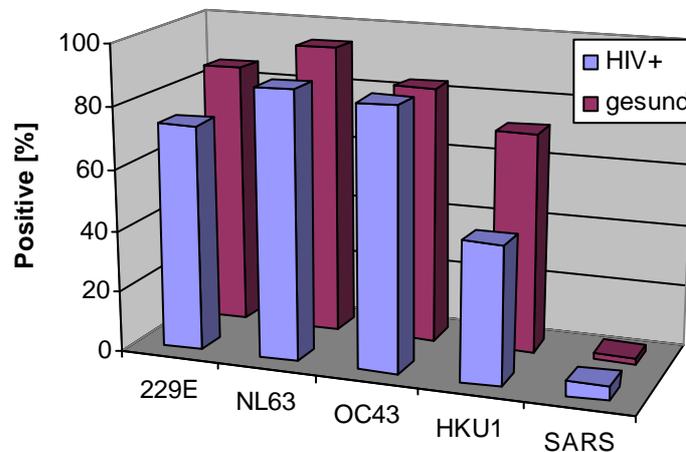


Abb. III-11. HCoV-Seroprävalenz bei HIV-positiven und gesunden Erwachsenen aus China. Reaktionen mit HCoV Nukleokapsiden bei 255 HIV-positiven Spendern: Spenderdaten siehe Tab. III-2. 229E: 188 (73,7%), NL63: 223 (87,5%), OC43: 217 (85,1%), HKU1: 115 (45,1%), SARS: 12 (4,7%). Seronegativ: 12 (4,7%), einfach pos.: 19 (7,5%), doppelt pos.: 42 (17,6%), dreifach pos.: 90 (35,7%), vierfach pos.: 87 (34,1%), fünffach pos.: 5 (2%).

4.1.3 SARS-CoV-Seroprävalenz

Von insgesamt 194 getesteten Seren aus Weißrussland, Finnland und Deutschland konnte in einer einzigen Probe anti-SARS IgG nachgewiesen werden (Tab. III-2, Abb. III-12). Dieses Serum wurde im Jahr 1996 einem gesunden 48-jährigen Mann aus Minsk, Weißrussland, entnommen und zwar 6 Jahre vor dem Ausbruch der weltweiten SARS-Epidemie. Das Serum erkannte ausschließlich die Nukleokapside von HKU1 und SARS und mit beiden Antigenen wurde eine sehr starke Farbreaktion festgestellt (Abb. III-12: 1). Die gebundenen IgG-Antikörper wiesen allerdings sehr niedrige Aviditäten auf, wie durch Harnstoffelution gezeigt werden konnte (Abb. II-12: 2). Es wurden keine IgM und IgA Antikörper nachgewiesen (Abb. III-12: 5 bzw. 6).

Um zu prüfen, ob es sich um Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen HCoV Antigenen handelt, wurden Competitionsassays durchgeführt. Dazu wurde das Serum jeweils mit 50 ng/µl HKU1 N bzw. SARS N 30 Minuten bei RT vorinkubiert. Anschließend wurde der Immunoassay standardmäßig zur Detektion von IgG durchgeführt. Die Inkubation mit den homologen Proteinen führte in beiden Fällen zum kompletten Verschwinden des jeweiligen Signals (Abb. III-12: 3,4), während die Inkubation mit heterologen Proteinen keinen Einfluss auf die Signalintensität hatte.

Folglich konnte keine Kreuzreaktion zwischen HKU1 und SARS nachgewiesen werden und die beobachteten Reaktionen wurden als spezifische, niedrig-avide Antikörpererkennung interpretiert.

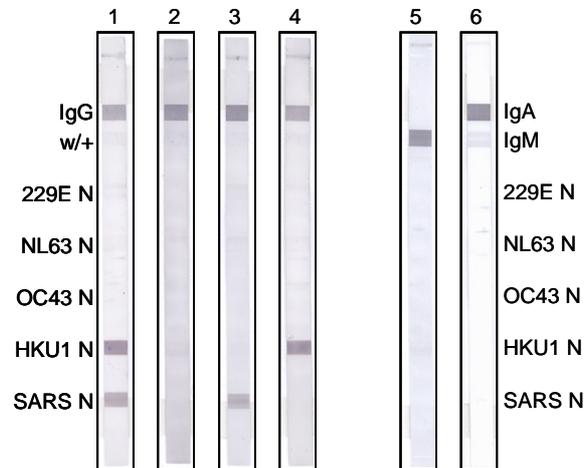


Abb. III-12. HCoV-Serologie bei einem weißrussischen Spender. (1) anti-HCoV N IgG Detektion unter konventionellen Bedingungen. HKU1 und SARS Nukleokapside reagieren gleichermaßen heftig. (2) IgG Nachweis unter stringenten Bedingungen. Die mit niedriger Avidität gebundenen Antikörper werden komplett eluiert. (3) Vorinkubation der Serumverdünnung mit 50 ng/μl HKU1 Nukleokapsid. Die Reaktion mit dem homologen Protein wird vollständig unterdrückt, während das SARS-Signal unverändert bleibt. (4) Analoges Vorgehen, Vorinkubation mit SARS N. (5) Es konnten keine IgM oder (6) IgA Antikörper nachgewiesen werden.

Unter den insgesamt 450 überprüften Seren aus China reagierten 20 (4,4%; 2 gesunde und 4 HIV-positive Kinder, 2 gesunde und 12 HIV-positive Erwachsene) mit dem SARS Nukleokapsid (Tab. III-2). Bei keinem dieser anti-SARS IgG-positiven Spender wurde die Krankheit tatsächlich diagnostiziert. Bei 16 anti-SARS IgG-positiven Proben wurde zusätzlich nach anti-SARS IgA und IgM gesucht (Daten nicht gezeigt). Bei einem anti-SARS IgG-positiven Spender konnte zusätzlich anti-SARS IgA und bei 4 weiteren zusätzlich anti-SARS-IgM nachgewiesen werden.

4.2 Rekonvaleszente SARS-Patienten

Serumaliquots von 49 rekonvaleszenten SARS-Patienten aus China (Provinz Innere Mongolei, freundlicherweise von J. Xu zur Verfügung gestellt) wurden mit Hilfe des Line-Immunoassays auf das Vorhandensein von anti-HCoV Nukleokapsid Immunglobulinen (IgG, IgA und IgM) getestet (Tab. III-3, Abb. III-13; vgl. auch III.3.2).

| | | 229E | NL63 | OC43 | HKU1 | SARS |
|----------------|-----|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| P. pos. (%) | IgG | 42 (85,7) | 46 (93,7) | 40 (81,6%) | 26 (53,1) | 49 (100) |
| | IgM | 5 (10,2) | 1 (2) | 5 (10,2) | 1 (2) | 19 (38,8) |
| | IgA | 3 (6,1) | 6 (12,2) | 2 (4,1) | 0 | 26 (53,1) |

Tab. III-3. Rekonvaleszente SARS-Patienten: IgG, IgM und IgA gegen HCoV Nukleokapside. 25 w, 24 m. Die Entnahme der Serumproben erfolgte durchschnittlich 100,5 Tage (Intervall 71 T. – 121 T.) nach Einsetzen der ersten Symptome (Fieber).

In allen Serumproben konnte anti-SARS N IgG nachgewiesen werden, IgM und IgA gegen SARS Nukleokapsid wurden in 19 (38,8%) bzw. 26 (53,1%) Proben detektiert. Weiterhin konnten 3 Proben identifiziert werden, welche ausschließlich mit dem SARS Nukleokapsid Protein reagierten (6,1%; z. B. Abb. III-13, HC1) und 5 (10,2%), die nur ein weiteres HCoV Antigen erkannten. Die Seroprävalenz bezüglich der anderen humanpathogenen Coronaviren entspricht in etwa der der gesunden chinesischen Bevölkerung (siehe Tab- III-2).

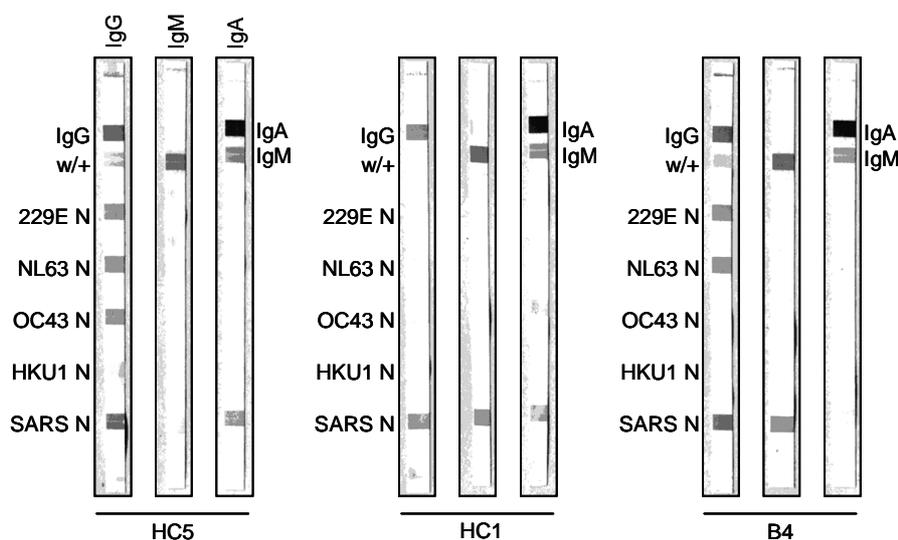


Abb. III-13. IgG-, IgM- und IgA-Antworten in Seren rekonvaleszenter SARS-Patienten. Es sind exemplarisch die entwickelten Streifen von drei Patienten (HC5, HC1, B4) dargestellt. Das linke Immunoassay-Streifen wurde jeweils mit anti-human IgG inkubiert, das mittlere bzw. rechte mit anti-human IgM bzw. IgA. Hierfür wurden Streifen mit entsprechenden Positivkontrollen (IgA, IgM) benützt. Anti-human IgA/HRP Antikörper reagieren mit dem humanen Kontroll-IgM kreuz. Für die Auswertung ist dies jedoch ohne Bedeutung.

4.3 Antikörperprofile in SARS-Patienten und Auswirkung vorangehender HCoV-Infektionen auf den klinischen Verlauf der Erkrankung

Das klinische Bild von SARS kann sehr unterschiedlich ausfallen und reicht von asymptomatischen Fällen bis hin zu Atmungsversagen und Tod. Hierfür können verschiedene prognostische Faktoren und zugrunde liegende Mechanismen in Betracht gezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte u. a. untersucht werden, ob der Krankheitsverlauf bei einzelnen SARS-Patienten durch vorangehende Infektionen mit anderen humanen Coronaviren beeinflusst werden kann und wie sich die verschiedenen Antikörpertiter von akuter nach rekonvaleszenter Krankheitsphase entwickeln.

Von 13 SARS-Patienten (Toronto, Kanada) wurden zu mehreren Zeitpunkten während und nach der Erkrankung insgesamt 43 Serumproben (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Willey) entnommen und auf HCoV-Seroprävalenz überprüft. Hierzu wurde neben der konventionellen IgG Detektion auch der IgG-Aviditätsassay (II.7.3) durchgeführt, um einerseits Kreuzreaktionen zu unterdrücken und andererseits die Reifung der gegen das SARS Nukleokapsid gerichteten Antikörper im Zeitverlauf verfolgen zu können. Ferner wurde die Proben auch nach HCoV-IgM und -IgA durchsucht (Tab. III-4).

Die serologischen Ergebnisse wurden mit den verfügbaren klinischen Daten der Patienten (siehe Anhang) verglichen, um mögliche Rückschlüsse auf die Schwere der SARS-Erkrankung ziehen zu können. Hierzu wurden die Patienten in die Gruppen „schwerer klinischer Verlauf“ und „milder klinischer Verlauf“ eingeteilt. Maßgeblich hierfür waren Dauer des Krankenhausaufenthaltes, Ausmaß und Dauer der Symptomatik (Husten, Durchfall, Fieber, Kopfschmerzen, Lungeninfiltrate [einseitig, bilateral]), klinische/biochemische Parameter (Blutbild [Laktatdehydrogenase-Aktivität, Gesamtzahl Neutrophile, Leukozyten, Thrombozyten], Zytokin- und Chemokinspiegel [INF- γ , IL-12p70, TNF- α , IL-2, IL-8, CXCL10, CCL2]) und zusätzlicher Sauerstoff-Bedarf während der Behandlung. Es wurden 7 milde und 6 schwere Krankheitsverläufe identifiziert.

Das Durchschnittsalter der Gruppe mit mildem Verlauf lag mit 38,7 Jahren (Intervall 24-66 J.) nur leicht unter dem der schwer erkrankten Patienten (40,7 J.; Intervall 24-66 J.). Die Dauer des Krankenhausaufenthaltes bei milden Fällen lag mit durchschnittlich 11,5 Tagen (Intervall 8-14 T.) deutlich unter den durchschnittlichen 18 Tagen (Intervall 12-24 T.) der schweren Fälle.

In Tab. III-4 sind die serologischen Befunde zusammengefasst.

| Patient Nr. | Geschl. | Alter | Klinischer Verlauf | Entnahme -Tag/Phase | 229E | NL63 | OC43 | HKU1 | SARS | SARS hochavide | SARS IgM | SARS IgA |
|-------------|---------|-------|--------------------|---------------------|------|------|------|------|------|----------------|----------|----------|
| 03-001 | m | 37 | sr | 5/akut | + | + | ++ | + | - | - | - | - |
| | | | | 98/rekon | +++ | +++ | ++ | + | +++ | ++ | + | ++ |
| | | | | 128/rekon | +++ | +++ | ++ | + | +++ | +++ | + | + |
| 03-004 | f | 50 | sr | 0/akut | + | + | ++ | - | - | - | - | |
| | | | | 9/rekon | ++ | ++ | ++ | - | ++ | - | - | - |
| | | | | 10/rekon | +++ | +++ | ++ | - | +++ | ++ | + | + |
| 03-007 | f | 21 | sr | 4/akut | + | ++ | - | - | - | - | - | |
| | | | | 9/rekon | + | ++ | - | - | + | - | - | + |
| | | | | 24/rekon | +++ | +++ | - | - | +++ | + | - | + |
| 03-014 | f | 50 | sr | 2/akut | + | + | ++ | + | - | - | - | |
| | | | | 12/rekon | + | + | ++ | + | + | - | - | +++ |
| | | | | 26/rekon | + | ++ | ++ | + | +++ | + | +++ | +++ |
| | | | | 56/rekon | ++ | ++ | ++ | + | +++ | +++ | + | +++ |
| | | | | 206/rekon | + | + | ++ | + | +++ | +++ | - | + |
| 03-016 | m | 51 | sr | 3/akut | ++ | +++ | + | - | + | - | - | |
| | | | | 25/rekon | +++ | +++ | ++ | - | +++ | - | + | ++ |
| | | | | 33/rekon | +++ | +++ | ++ | - | +++ | ++ | + | + |
| 03-018 | m | 35 | sr | 6/akut | + | + | + | + | + | - | - | |
| | | | | 27/rekon | +++ | +++ | + | + | +++ | + | + | ++ |
| | | | | 58/rekon | ++ | ++ | + | + | +++ | +++ | + | ++ |
| 03-012 | m | 29 | md | 4/akut | + | ++ | +++ | ++ | + | - | - | |
| | | | | 7/akut | + | ++ | +++ | ++ | + | - | - | - |
| | | | | 12/rekon | ++ | +++ | +++ | + | +++ | + | + | ++ |
| | | | | 14/rekon | ++ | +++ | +++ | + | +++ | ++ | + | +++ |
| 03-013 | f | 24 | md | 6/akut | + | ++ | + | - | - | - | - | |
| | | | | 16/rekon | + | ++ | ++ | - | +++ | + | + | + |
| | | | | 31/rekon | ++ | ++ | ++ | - | + | - | - | - |
| 03-015 | f | 26 | md | 9/akut | - | ++ | + | - | - | - | + | |
| | | | | 33/rekon | - | ++ | + | - | +++ | + | + | + |
| | | | | 146/rekon | - | ++ | + | - | +++ | +++ | - | - |
| 03-017 | m | 48 | md | 7/akut | - | ++ | - | - | - | - | - | |
| | | | | 8/rekon | - | ++ | - | - | - | - | - | - |
| | | | | 26/rekon | - | ++ | - | - | ++ | + | + | + |
| 03-022 | m | 36 | md | 1/akut | - | + | +++ | - | - | - | - | |
| | | | | 2/akut | - | + | +++ | - | - | - | - | - |
| | | | | 102/rekon | - | + | +++ | - | +++ | + | + | + |
| | | | | 125/rekon | - | + | +++ | - | +++ | +++ | - | - |
| 06-004 | m | 66 | md | 7/akut | + | ++ | + | - | - | - | - | |
| | | | | 23/rekon | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | | | | 34/rekon | +++ | +++ | + | - | +++ | +++ | ++ | ++ |
| 07-001 | m | 42 | md | 7/akut | - | + | + | - | - | - | - | |
| | | | | 22/rekon | - | + | + | - | +++ | - | + | +++ |
| | | | | 111/rekon | - | + | + | - | +++ | +++ | + | - |

Tab. III-4. HCoV-Serologie bei akut erkrankten und rekonvaleszenten SARS-Patienten. In 43 Serumproben von 13 Patienten wurde HCoV-IgG gemessen. Zusätzlich ist anti-SARS N IgM und IgA angegeben. Der klinische Verlauf der SARS-Erkrankung ist mit sr, schwer oder md, mild zusammengefasst (weitere Erläuterungen siehe Text und Anhang). Die Entnahmezeitpunkte sind in Tagen nach Beginn der ersten Symptome angegeben. Der Tag, an dem die erste Serumprobe verfügbar war, entspricht gleichzeitig dem ersten Tag des Krankenhausaufenthaltes. Rekon, rekonvaleszent. + entspricht einer schwachen, ++ einer moderaten und +++ einer starken Reaktion.

Bei den milden Krankheitsverläufen fällt die HCoV-Seroprävalenz für 229E und HKU1 deutlich niedriger aus als bei den schwerer erkrankten Patienten (229E: 43%

vs. 100%, NL63: 100% vs. 100%, OC43: 86% vs. 83%, HKU1:14% vs. 50%). Weiterhin ist festzustellen, dass bei 9 Patienten die Titer von 229E-, NL63- bzw. OC43-spezifischem IgG im Fortgang der Infektion ansteigen („Recall“, Abb. III-14). In dieser Gruppe sind alle 6 Personen vertreten, die unter einer schweren SARS-Form zu leiden hatten. Dieser Recall-Effekt bezieht sich hauptsächlich auf 229E und NL63. Nur in 2 Fällen steigt der OC43-Antikörpertiter leicht an (03-013 und 03-016). Eine Kreuzinduktion findet immer dann statt, wenn auch ein Titeranstieg SARS-spezifischer Antikörper zu verzeichnen ist. In der späten rekonvaleszenten Phase fallen bei den Patienten 03-014 und 03-018 die 229E- und NL63-Antikörpertiter wieder ab.

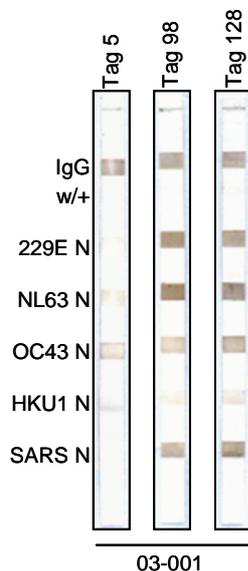
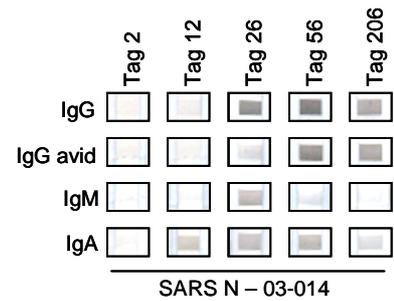


Abb. III-14. Recall-Effekt auf 229E- und NL63-Antikörpertiter durch SARS-CoV. Gezeigt ist die HCoV-Serologie (IgG) von Patient 03-001 während der akuten (Tag 5) und rekonvaleszenten Phase (Tag 98 und Tag 128). Deutlich zu erkennen ist der starke Titeranstieg spezifischer, hoch-avider 229E und NL63 Antikörper, während die Basalspiegel von OC43 und HKU1 IgG praktisch unbeeinflusst bleiben. Ferner reagierte der Patient auf die SARS-Infektion mit einer robusten IgG-Antwort.

Die 4 Patienten, bei denen kein Recall-Effekt festzustellen war (03-015, 03-017, 03-022 und 07-001) weisen eine niedrige HCoV-Seroprävalenz auf und sind nur NL63- oder NL63/OC43-seropositiv. Interessanterweise werden bei diesen Personen nur milde Krankheitsverläufe festgestellt (Tab. III-4).

In 12 von 13 Patienten ist an der humoralen Antwort gegen das SARS Nukleokapsid IgM beteiligt, IgA konnte bei allen Personen nachgewiesen werden. Meistens treten IgM oder IgA gleichzeitig mit IgG auf, gelegentlich kann aber auch IgG als erste Immunglobulinsubklasse detektiert werden. Als Beispiel ist in Abb. III-15 das Antikörperprofil eines SARS-Patienten dargestellt.

Abb. III-15. Profil SARS N-spezifischer Antikörper im Infektionsverlauf. Gezeigt ist die Entwicklung der humoralen Immunantwort während und nach der SARS-CoV-Infektion von Patient 03-014. IgA ist ab Tag 12 nachweisbar, wohingegen IgM und noch nicht ausgereiftes IgG erst ab Tag 26 in Erscheinung treten. Die IgG-Antikörperreifung ist spätestens am Tag 56 abgeschlossen und bleibt bestehen (Tag 206). Die IgM-Antwort ist nur von kurzer Dauer und auch der IgA-Titer nimmt ab Tag 26 wieder ab. IgG avid, nur hoch-avide IgG-Antikörper wurden detektiert.



Bei allen Patienten wurde der Aufbau einer IgG-Antwort erfasst. Ebenso ist immer eine Antikörperreifung hin zu hoch-avidem IgG festzustellen. Nur in einem Fall wurde innerhalb des betrachteten Zeitraumes ein Rückgang des SARS-Antikörpertiters beobachtet (03-013). Ansonsten blieb ein hoher IgG-Titer bis zu 206 Tage (03-014) nach Krankheitsbeginn erhalten. Die schwer erkrankten Patienten wurden im Schnitt 3,3 Tage (Intervall 0-6 T.) nach Einsetzen der ersten Beschwerden in stationäre Behandlung genommen. Bei den Patienten 03-016 und 03-018 kann bereits an Tag 3 respektive Tag 6 (akute Phase) SARS spezifisches IgG nachgewiesen werden. In der Gruppe mit mildem Verlauf (Krankenseinweisung 5,9 Tage [Intervall 1-9 T.]) wurden ebenfalls bei zwei Personen während der akuten Phase Antikörper detektiert (03-012: IgG, 03-015: IgM), 4 bzw. 9 Tage nach Beginn der Symptome.

4.4 HCoV-NL63 und Kawasaki Disease

In diesem Teil der Arbeit sollte ein postulierter Zusammenhang zwischen einer systemischen Vaskulitis bei Kindern, der so genannten Kawasaki Disease, und einer akuten bzw. rekonvaleszenten HCoV-NL63-Infektion auf serologischer Basis überprüft werden. Hierzu wurden 19 Serumproben von 14 erkrankten Kindern auf anti-HCoV IgG, IgM und IgA getestet. Keines der Kinder litt zum Zeitpunkt der Blutentnahme an Erkrankungen der unteren oder oberen Atemwege. Sämtliche Proben wurden vor Beginn der medikamentösen Therapie entnommen, um Fehlbestimmungen zu vermeiden.

Die Ergebnisse des Antikörperscreenings sind in Tab. III-5 zusammengefasst. 8 der 19 überprüften Aliquots waren seronegativ (42,1%). Antikörper gegen HCoV-NL63 (IgG und IgA) konnten in einem 11 Monate alten Mädchen (Serum Nr. 7) und einem 4-jährigen Jungen (Serum Nr. 9 und 9a) nachgewiesen werden. Dagegen zeigten 5 Kinder HCoV-OC43-Serokonversion.

| Serum Nr. | Geschl. | Alter | IgG | IgM | IgA |
|-----------|---------|-------|------------|------------|------------------|
| 1 | m | 1 | 229E | - | - |
| 2 | m | 5 | - | 229E | HKU1 |
| 3 | f | 2,8 | - | - | - |
| 4 | m | 2,9 | OC43 | 229E, HKU1 | - |
| 5 | m | 3 | 229E | - | 229E |
| 6 | f | 2,5 | OC43 | - | OC43, HKU1 |
| 7 | f | 0,9 | NL63, OC43 | - | NL63, OC43 |
| 8 | m | 1 | - | - | - |
| 8a | | 1,5 | - | - | - |
| 9 | m | 4 | NL63, OC43 | - | 229E, NL63, OC43 |
| 9a | | 4,5 | NL63, OC43 | - | - |
| 10 | m | 5 | - | - | - |
| 11 | f | 3 | - | - | - |
| 11a | | 3,5 | - | - | - |
| 12 | m | 0,8 | - | - | - |
| 13 | m | 10 | OC43, HKU1 | - | OC43 |
| 13a | | n. v. | OC43, HKU1 | - | OC43 |
| 13b | | n. v. | OC43, HKU1 | - | OC43 |
| 14 | f | 3 | - | - | - |

Tab. III-5. Kawasaki Disease und HCoV-Seroprävalenz. Detektion von anti-HCoV IgG, IgM und IgA in Serumproben von an Kawasaki Syndrom erkrankten Kindern. 8a, 9a, 11a, 13a, 13b: seriell entnommene Proben. Geschl., Geschlecht; n. v., nicht verfügbar.

5. T-Zell-Diagnostik

5.1 Stimulation mit rekombinanten Nukleokapsid Proteinen

Mit Hilfe des Elispot-Verfahrens sollte die Frequenz antigenspezifischer T-Lymphozyten näher untersucht werden. In allen Stimulationsexperimenten wurden rekombinante Nukleokapsid Proteine der fünf humanpathogenen Coronaviren eingesetzt, um die Frequenzen restimulierbarer Gedächtnis T-Zellen (CTL und/oder T-Helferzellen) bestimmen zu können.

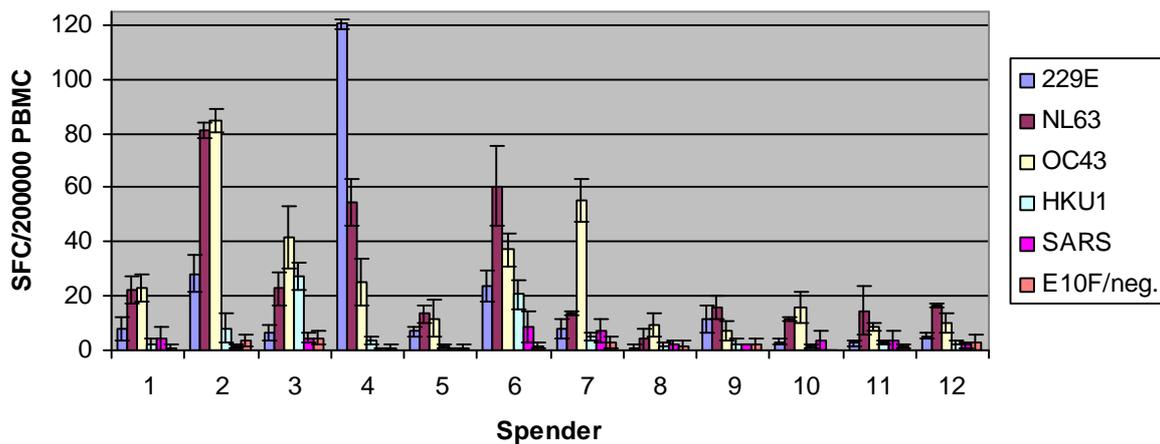


Abb. III-16. Restimulation spezifischer T-Zellen nach Inkubation mit rekombinanten Nukleokapsiden. Je 2×10^5 PBMCs von 12 verschiedenen Spendern (1-12) wurden mit je $10 \mu\text{g/ml}$ rekombinanten HCoV Nukleokapsiden, sowie $10 \mu\text{g/ml}$ E10F-Peptid als Negativkontrolle 19-24 h inkubiert. Die Anzahl INF- γ -sezernierender Zellen (SFC, spot forming cells) ist repräsentativ als Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 parallel durchgeführten Stimulationsansätzen dargestellt.

Alle Spender besitzen restimulierbare, gegen HCoV-NL63 und HCoV-OC43 gerichtete spezifische T-Zellen. Die Frequenzen reichen für NL63 N von 4 bis 81 (Spender 8 bzw. 2) und für OC43 N von 7 bis 85 (Spender 9 bzw. 2) pro 2×10^5 PBMCs. 11 von 12 Spendern zeigen für 229E N Werte, die über der Negativkontrolle liegen, jedoch mit insgesamt geringeren Frequenzen. Eine Ausnahme bildet hier Spender 4, bei welchem 120 SFC/ 2×10^5 PBMCs detektiert wurden. Wie nach den Untersuchungen zur Seroprävalenz humaner Coronaviren (vgl. III.4.1) zu erwarten war, ist die Frequenz HKU1 Nukleokapsid spezifischer T-Lymphozyten im untersuchten Spenderpool gering. Bei den Spendern 3 und 6 konnten 27 bzw. 20 SFC gezählt werden. In den Stimulationsansätzen mit SARS N bei den beiden Spendern 6 und 7, wurden 9 bzw. 7 Spots gezählt. In Anbetracht der jeweils hohen Standardabweichung und im Vergleich mit den jeweiligen Negativkontrollen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um unspezifischen Hintergrund handelt.

5.2 Stimulation mit HLA-Klasse-I restringierten Peptiden

In weiterführenden Experimenten sollte unter Einsatz einer Decamer-Peptidbank untersucht werden, ob zytotoxische T-Zellen an der Immunantwort beteiligt sind. Spezifische und eventuell vorhandene kreuzreaktive HLA-Klasse-I restringierte Epitope auf dem HCoV-NL63 Nukleokapsid sollten identifiziert werden. Zusätzlich

wurde mit je zwei für die anderen vier HCoV spezifischen Peptiden stimuliert (vgl. Tab. II-10). Die Decamere enthielten für die HLA-Klasse-I-Allele A*0201 bzw. B*0702 vorhergesagte CTL-Epitope (Peptidbank 1; vgl. II-8.2 und Tab. II-10). Periphere Blutlymphozyten von den Spendern 1, 3, 4 und 7 (HLA-A*0201), sowie von den Spendern 2 und 3 (HLA-B*0702) wurden mit den entsprechenden Peptidpools (Endkonz. 50 µg/ml) 20-36 h stimuliert. In keinem der Ansätze konnten durch das ELISPOT-Verfahren spezifische zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden, während durch Stimulation mit rekombinanten Nukleokapsiden stets IFN-γ Sekretion detektiert wurde.

Diese Feststellung legte den Verdacht nahe, dass an der zellvermittelten Immunantwort gegen HCoV Nukleokapside keine CD8⁺ CTL, sondern ausschließlich Zytokin-sezernierende CD4⁺ T_H1-Zellen beteiligt sind. Um diese Hypothese experimentell weiter zu überprüfen, wurden zunächst von vorgereinigten PBMCs der Spender 2, 3 und 4 jeweils CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen depletiert und je 2 x 10⁵ CD4⁺-angereicherte PBMCs (CD8⁺-Depletion) bzw. CD8⁺-angereicherte PBMCs (CD4⁺-Depletion) mit HCoV N Proteinen wie oben beschrieben stimuliert. In keinem der Ansätze mit CD4⁺-depletierten PBMCs ließen sich antigenspezifische Zellen stimulieren (Spender 4), während in allen CD8⁺-Depletionsansätzen INF-γ-sezernierende Zellen nachgewiesen wurden (Spender 2, 3 und 4). Die Anzahl der SFC in den CD8⁺-depletierten Ansätzen ist jeweils mit der Anzahl Zytokin produzierender Zellen bei Stimulationen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen enthaltenden PBMCs vergleichbar (Abb. III-17).

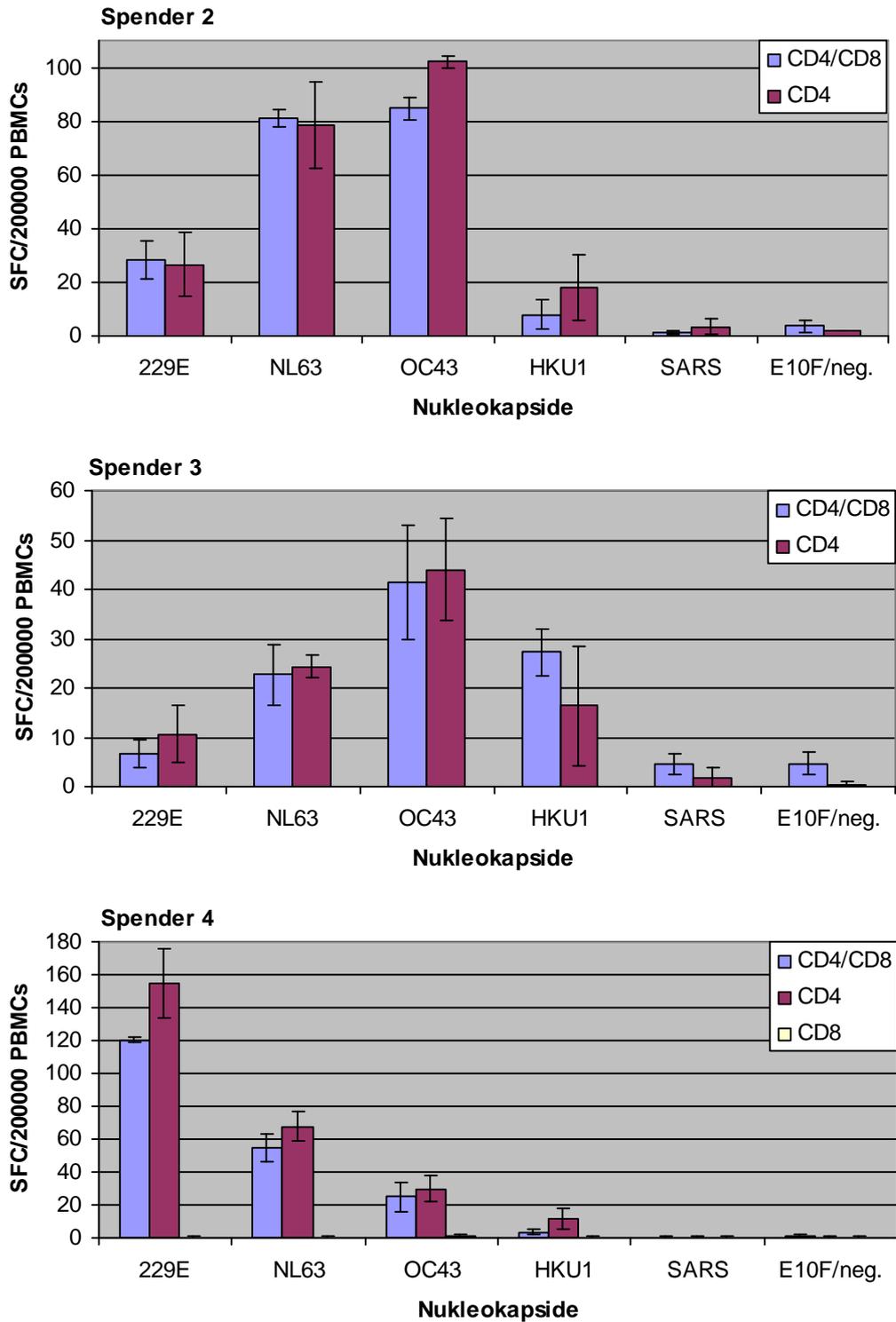


Abb. III-17. Nukleokapsid-Stimulation von PBMCs und Vergleich von Ansätzen mit Depletion von CD8⁺- oder CD4⁺-Zellen. Die Spender besitzen antigenspezifische restimulierbare CD4⁺ T-Helferzellen. Stimulierbare CD8⁺-Zellen konnten nicht nachgewiesen werden (Spender 4).

5.3 Stimulation mit 15-mer Peptiden

Nachdem festgestellt wurde, dass durch HLA-Klasse-I restringierte Peptide keine Restimulation von zytotoxischen T-Zellen erreicht werden kann, sollte überprüft werden, ob Zielstrukturen für T-Helferzellen vorhanden sind. Hierzu wurde eine HLA-Klasse-II relevante Peptidbibliothek untersucht, wodurch antigenspezifische CD4⁺ T-Helferzellen detektiert und immunoreaktive Epitope auf dem HCoV-NL63 N Protein identifiziert werden sollten. Es wurden jeweils 15 Aminosäurereste lange Peptide, welche bei drei AS-Überlappungen das gesamte NL63 Nukleokapsid Protein umspannen, zur Stimulation von peripheren Lymphozyten eingesetzt.

PBMCs von 9 Spendern (Spender 1, 2, 5, 6-7, 9-12) wurden aus Vollblut isoliert (vgl. II.8.3) und zunächst mit Peptidpools bestehend aus je 2 Einzelpeptiden (Endkonz. 20 µg/ml; vgl. II.8.2) für 24 h stimuliert. Nach erfolgreicher Stimulation mit Peptidpools wurden die entsprechenden einzelnen Peptide eingesetzt. Als Positivkontrolle diente neben den unspezifisch stimulierenden PMA/Ionomycin auch rekombinante HCoV Nukleokapside, als Negativkontrolle wurde E10F oder PSA eingesetzt (vgl. II.8.4).

Die Peptide induzierten im Gegensatz zu den rekombinanten Proteinen unter den gegebenen Bedingungen nur sehr schwache Reaktionen im ELISPOT. Um die Sensitivität zu erhöhen und die Signale zu verstärken, wurden die co-stimulatorischen Antikörper anti-human CD28 und anti-human CD49d den Ansätzen zugegeben. Des Weiteren wurde die Inkubationszeit auf 48 h verlängert.

| Spender | SFC rek. NL63 N | SFC (Peptidnr., vgl. II.8.2) | SFC Negativkontrolle |
|---------|-----------------|------------------------------|----------------------|
| 1 | 15,3 | 3,3 (3); 2,3 (4); 3,7 (24) | 0,3 |
| 2 | 50,7 | 3,3 (13); 3,7 (19) | 1 |
| 6 | 31,3 | 7,7 (11); 9,7 (25); 6,7 (26) | 1,3 |
| 7 | 11,7 | 3,3 (24); 2,3 (28) | 1 |
| 12 | 16 | 2,7 (3); 2,3 (4) | 0,7 |

Tab. III-6: PBMC-Stimulation mit NL63 N abgeleiteten 15-mer Peptiden. SFC: *spot forming cells*/2 x 10⁵ PBMCs; rek. NL63 N: rekombinantes NL63 Nukleokapsid; Negativkontrolle: 10 µg/ml PSA + je 1 µg/ml co-stimulatorische Antikörper. Die Versuche wurden in 3 Parallelen durchgeführt; angegeben sind jeweils die Mittelwerte.

Die Anzahl der Zellen, welche auf rekombinantes NL63 Nukleokapsid reagierten, fiel trotz co-Stimulation im Vergleich mit den vorangehenden Experimenten mit Volllänge-Proteinen (Tab. III-6, vgl. Abb. III-16) etwas geringer aus. Allerdings sezernierten die T-Zellen unter den hier gegebenen Voraussetzungen insgesamt mehr INF-γ.

Durch die Zugabe von co-stimulatorischen Antikörpern und die verlängerte Inkubationszeit wurden die Signale verstärkt, ohne jedoch unspezifische Zytokinproduktion zu induzieren (vgl. Tab. III-6, SFC Negativkontrolle, 10 µg/ml PSA).

Die Vorläuferfrequenzen Peptid-spezifischer T-Zellen waren insgesamt sehr gering. Nur bei 5 der 9 getesteten Spender konnte eine erhöhte Frequenz an INF- γ -produzierenden Zellen beobachtet werden (Tab. III-6). Die Anzahl der SFC war dabei immer größer als die der Negativkontrolle.

Die Peptide Nr. 3, 4 und 24 riefen bei den Spendern 1 und 12, bzw. bei den Spendern 1 und 7 Reaktionen hervor. Die robusteste Stimulation gelang mit den Peptiden 11, 25 und 26 bei Spender 6, wie in Abb. III-18 dargestellt.

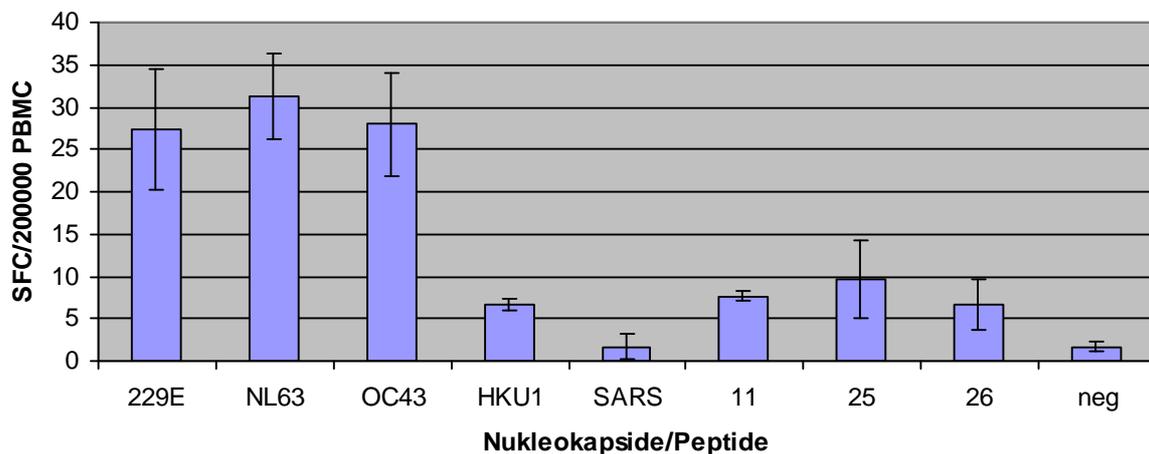


Abb. III-18. Identifikation NL63-spezifischer immunreaktiver Peptide. Die vom NL63 Nukleokapsid Protein abgeleiteten, spezifischen Peptide 11, 25 und 26 stimulierten PBMCs des Spenders 6, allerdings in geringerem Ausmaß als die rekombinanten Antigene.

IV. DISKUSSION

1. Etablierung des HCoV-Line-Immunoassays und Nukleokapsid Proteine als Antigene

Die Entwicklung eines gleichermaßen spezifischen wie sensitiven Immunoassays zum Nachweis von Serumantikörpern, setzt eine sorgfältige Auswahl der denkbaren Test- und Detektionssysteme, der einzusetzenden viralen Antigene und deren Herstellungsmöglichkeiten voraus.

1.1 Der Line-Immunoassay als Detektionssystem

Prinzipiell können eine Vielzahl verschiedener Formate in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise Varianten des Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western- und Dot-Blot, Radio- und Fluoreszenzimmunoassay (RIA und FIA) oder Immuno-PCR.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Line-Immunoassay ein Testsystem gewählt, das einfach zu handhaben ist, einen hohen Probendurchsatz garantiert und ohne großen experimentellen Aufwand qualitative Aussagen über Antikörperprävalenzen zulässt. Bis zu neun Antigene und Kontrollen werden direkt (nativ) als parallele Linien gleichmäßig auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht, eine gelelektrophoretische Auftrennung (und damit Denaturierung) und der anschließende Elektro-Transfer auf eine Membran, wie beim Western-Blotting Verfahren, ist nicht nötig. Ebenso entfällt eine aufwendige chemische Kopplung des Antigens an die Trägeroberfläche, die Immobilisierung der Proteine erfolgt passiv. Eine mit Antigenen beladene Membran (5,7 x 13,1 cm) kann in bis zu 45 einzelne Streifen geschnitten und mehrere Monate aufbewahrt werden. Bei diesem Assayformat können diverse Messparameter in einem einzigen Test gleichzeitig abgefragt werden. Die indirekte Detektion von gebundenen Immunglobulinen aus der Serumprobe mittels Enzym-gekoppelten sekundären Antikörpern und die damit verbundene Signalamplifikation gewährleistet eine sehr hohe Sensitivität. Da es sich hierbei um eine Farbreaktion handelt, werden keine Lesegeräte wie z. B. für ELISA-Platten oder Fluoreszenzreader für IFA benötigt. Die entwickelten Streifen können

getrocknet, aufgehoben und bei Bedarf erst später ausgewertet werden. Der grau-braune Farbniederschlag beginnt erst nach Monaten langsam auszubleichen. Eine Quantifizierung der Messergebnisse ist bei diesem System kaum aufwendiger als beispielsweise bei ELISA-Formaten. Der Enzym-gekoppelte Detektorantikörper kann durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper ersetzt, mit einem Fluoreszenzscanner ausgelesen und mit der zugehörigen Software ausgewertet werden (vgl. III.3.5).

Da die Durchführung des HCoV-Line-Immunoassays schnell und unkompliziert ist und hierfür keine kostspielige Laborausstattung benötigt wird, stellt dieses System eine ideale Methode zur raschen Diagnostik dar und könnte Anwendung in Arztpraxen und Krankenhäusern finden.

1.2 Nukleokapsid Proteine als Antigene

Die meisten serologischen Untersuchungen auf dem Gebiet der humanen Coronaviren wurden in den 1970er Jahren durchgeführt, lange vor dem Auftreten von SARS und der Entdeckung der HCoVs NL63 und HKU1. Diese Studien beruhten auf langwierigen, arbeitsintensiven und teuren Methoden, wie etwa Neutralisationsassays, Hämagglutinin-Inhibition, Komplement-Fixierung, oder dem Einsatz von aufgereinigten, aufwändig in Zellkultur propagierten Viruspartikeln (Lai *et al.*, 2007). Durch Einsatz rekombinanter DNA-Technik und Expression viraler Gene in verschiedensten Systemen, können heute viele diagnostisch relevante Antigene in hoher Reinheit und großer Menge hergestellt und in serologischen Assays eingesetzt werden.

Bei der Entscheidung für oder gegen bestimmte Antigene müssen Kriterien wie Immunogenität, Sequenzvarianz und -konservierung, aber auch deren Darstellbarkeit unter ökonomischen und technischen Gesichtspunkten berücksichtigt werden. Gruppenspezifische Proteine, wie etwa die akzessorischen Proteine des SARS-Coronavirus, bieten ein hohes Maß an Spezifität und gelegentlich konnten auch gegen die Proteine 3a, 3b, 7b, 8a und 9b gerichtete Antikörper in den Seren rekonvaleszenter SARS-Patienten nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2005). Da diese gruppenspezifischen Proteine aber meist für eine erfolgreiche virale Replikation verzichtbar sind (ähnlich dem HE-Protein der Gruppe-II-CoV), ist wenig über ihr tatsächliches Expressionsmuster *in vivo* bekannt und somit auch über ihre Fähigkeit, robuste Immunantworten auslösen zu können (Tan *et al.*, 2005). Hier

treten die viralen Strukturproteine S, E, M und N in den Vordergrund. Die beiden in die virale Hülle integrierten Proteine E und M scheinen immunologisch eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, auch wenn vereinzelt über die erfolgreiche Anwendung von M Protein zur Diagnose von SARS-CoV-Infektionen berichtet wurde (Han *et al.*, 2004b). Die meisten Studien, die Antikörperprofile in SARS-Patienten untersuchten, fanden keine oder nur niedrige Titer an E- und M-spezifischen Antikörpern (Leung *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003).

Während der Infektion werden vor allem die coronaviralen Proteine Spike und Nukleokapsid exprimiert und beide können starke humorale und zellvermittelte Immunantworten induzieren (Lai *et al.*, 2007; Timani *et al.*, 2004). In den meisten neuen serologischen Assays werden folgerichtig S und/oder N Proteine bzw. deren Fragmente als diagnostische Antigene zum Nachweis von HCoV Antikörpern angewendet (Dijkman *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2004; Mourez *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2005a; Yu *et al.*, 2007). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die humorale Antwort gegen das SARS Nukleokapsid im Laufe der Infektion eher nachzuweisen ist und zu weitaus höheren Titern führt, als bei neutralisierenden anti-Spike Antikörpern festgestellt werden konnte (Han *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007b). Tatsächlich handelt es sich bei Spike um ein Glykoprotein und die Glykosylierungsmuster bei Expression in Hefe- oder Insektenzellen unterscheiden sich von den Modifikationen in infizierten Menschen, was zu einer verminderten Antikörpererkennung rekombinanter S Proteine führen könnte (Zhu *et al.*, 2006). Das N Protein hingegen besitzt keine potentiellen Glykosylierungsstellen, weshalb die einfache und kostengünstige Darstellung in prokaryotischen Systemen in Erwägung gezogen werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten alle HCoV Nukleokapsid Gene in *Escherichia coli* mit großer Effizienz exprimiert werden (Ausbeute von gereinigtem Protein ~10 mg/l). Die rekombinant hergestellten Proteine wurden bis zur Homogenität aufgereinigt (vgl. II.4 und III.2). Durch Western-Blotting Experimente wurde gezeigt, dass in den Antigenlösungen keine immunoreaktiven Bestandteile des Expressionswirts mehr vorhanden sind (III.2).

Punktmutationen und Rekombinationsereignisse führen zu einer gewissen genetischen Variabilität innerhalb der verschiedenen zirkulierenden HCoV-Typen, wobei Aminosäureaustausche bei Nukleokapsiden im Vergleich zu anderen HCoV Proteinen relativ seltene Ereignisse darstellen (Chibo & Birch, 2006; Gerna *et al.*, 2006; Vijgen *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2006). Die Sequenzen der in dieser Arbeit als

Antigene verwendeten Nukleokapside von HCoV-229E, -OC43, -NL63 und SARS-CoV entsprechen den bekannten Datenbanksequenzen. Eine bisher unveröffentlichte Sequenzvariante zeigte das N Gen eines HKU1-Isolats aus Caen in Frankreich (A. Vabret), weshalb diese unter der GenBank Zugangsnummer DQ778921 in öffentlich zugänglichen Datenbanken hinterlegt wurde. Diese Sequenz ist dem HCoV-HKU1 Genotyp A am nächsten verwandt (vgl. III.1), zeigt aber auch Ähnlichkeiten mit den Genotypen B und C, wobei letzterer aus einer Rekombination zwischen Typ A und B entstanden ist (Woo *et al.*, 2006). Zur weiteren Klassifizierung und genaueren Einordnung des neuen HCoV-HKU1-Isolats ist die Sequenzierung und Analyse der S und *pol* Gene erforderlich (Woo *et al.*, 2006).

Auch bei HCoV-NL63 (Pyrce *et al.*, 2007c) und HCoV-OC43 (Vijgen *et al.*, 2005) wurde Sequenzheterogenität festgestellt. Antikörper gegen sämtliche bisher bekannten zirkulierenden HCoV-Varianten sollten von den eingesetzten Antigenen erkannt werden, da die Aminosäureunterschiede insgesamt nur gering ausfallen.

1.2.1 Sensitivität und Spezifität

Durch die Testung von humanen Rekonvaleszenten-Seren wurde die Fähigkeit von HCoV N, robuste humorale Immunantworten induzieren zu können, geprüft. Die Blutproben wurden Patienten entnommen, die an einer bestätigten Infektion mit HCoV-229E, -OC43, -NL63 bzw. SARS-CoV litten. Wie unter III.3 dargestellt, ist der HCoV-Line-Immunoassay in der Lage, bei allen getesteten Spendern gegen das korrespondierende Nukleokapsid Protein gerichtete IgG zu detektieren. Dies entspricht einer Sensitivität von 100% und unterstreicht die extreme Immunogenität des N Proteins.

Um zu überprüfen, ob die gegen Nukleokapside gerichteten Antikörper Spezies-spezifisch reagieren, oder möglicherweise Kreuzreaktionen zu erwarten sind, wurden zunächst die Aminosäuresequenzen der HCoV Nukleokapsid Proteine untereinander verglichen (Tab. IV-1). Die höchste Sequenzhomologie wurde zwischen den Gruppe-II-Viren OC43 und HKU1 festgestellt (68,2%), was diese beiden Vertreter zu den wahrscheinlichsten Kandidaten für Kreuzreaktionen macht (siehe unten). Die Aminosäuresequenzen der anderen Coronaviren weisen weniger Homologien und Ähnlichkeiten untereinander auf (31,9-49,3% Homologie, 38,5-57,8% Ähnlichkeit).

| | | | | | |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| 229E | 100 | | | | |
| NL63 | 49.3 (57.8) | 100 | | | |
| OC43 | 38.3 (44.9) | 35.4 (41.2) | 100 | | |
| HKU1 | 42.0 (48.7) | 36.4 (44.1) | 68.2 (74.5) | 100 | |
| SARS | 31.9 (38.5) | 35.8 (44.2) | 42.8 (49.1) | 41.8 (49.4) | 100 |
| | 229E | NL63 | OC43 | HKU1 | SARS |

Tab. IV-1. HCoV Nukleokapsid Protein Analyse. Paarweiser AS-Sequenzvergleich der Coronavirus Nukleokapsid Proteine (GCG Wisconsin Package, bestfit, scoring matrix blosum62). Die Werte geben die Aminosäure-Homologie (Aminosäure-Ähnlichkeit) in Prozent an.

Bereiche mit erhöhter Homologie sind nicht auf bestimmte Abschnitte auf dem Nukleokapsid beschränkt, sondern erstrecken sich über die gesamte Länge des Proteins.

SARS Nukleokapsid: Das SARS Nukleokapsid wurde mit Ausnahme einer Probe aus Weißrussland (III.4.1.3 und IV.2) und 20 Proben aus der chinesischen Bevölkerung (III.4.1.3) ausschließlich von Seren erkannt, die von rekonvaleszenten SARS-Patienten stammten. Aus den 49 auf IgG getesteten Serumproben rekonvaleszenter chinesischer SARS-Patienten wurden drei Proben identifiziert, die ausschließlich mit dem SARS-CoV Antigen reagierten, fünf weitere Seren erkannten neben SARS N nur ein weiteres Nukleokapsid (III.3.2 und III.4.2). Zusätzlich reagiert anti-SARS Nukleokapsid Kaninchenserum ausschließlich mit SARS N (Abb. III-4, anti N). Unspezifische Bindung von SARS-spezifischen Antikörpern ist unter den beschriebenen Bedingungen also extrem unwahrscheinlich. Die Signale waren aufgrund des hohen Antikörpertiters sehr stark (vgl. Abb. III.4). Unspezifische Reaktionen mit dem SARS Antigen wurden in keiner der Serumproben von nicht mit SARS-CoV infizierten Personen festgestellt, auch nicht in solchen Fällen, wo die Spender heftig mit den übrigen vier HCoV Nukleokapsiden reagierten (Abb. III-6, D-17). Darüber hinaus lieferte polyklonales anti-NL63-N-Kaninchenserum nur Signale mit dem zugehörigen Antigen, nicht jedoch mit SARS N, oder anderen HCoV Antigenen (Abb. III-5, 23N). Die hohe Spezifität von SARS N als diagnostisches Antigen wurde von anderen Arbeitsgruppen sowohl bestätigt (Tan *et al.*, 2004; Timani *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2004a), als auch angezweifelt (Maache *et al.*, 2006; Vlasova *et al.*, 2007). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch unterschiedliche Methoden bei der Antigenpräparation zu erklären sein. So haben Maache *et al.* und Vlasova *et al.* SARS N als Einschlusskörperchen in *E. coli* exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt, während in anderen Studien und auch in der vorliegenden Arbeit, das SARS Nukleokapsid in nativer

Form in die Immunoassays eingesetzt wurde. Weiterhin könnten vom Expressionswirt stammende Verunreinigungen, wie LPS oder bakterielle Proteine für falsch-positive Ergebnisse verantwortlich sein. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass in den meisten veröffentlichten Studien die Reinigung rekombinanter Proteine nur über einfache Affinitätschromatographie erfolgt und die Reinheit der Antigene vor Einsatz in serologischen Assays nicht weiter überprüft wird. Alle in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine wurden hingegen mehrfach chromatographisch aufgereinigt (II.4) und, wie bereits erwähnt, mit Western-Blotting Experimenten auf deren Homogenität hin überprüft (III.2).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass SARS-CoV spezifische Antikörper nicht mit Nukleokapsiden der anderen HCoV reagieren. Das SARS-CoV Nukleokapsid bietet somit ein ideales Zielantigen, um in serologischen Untersuchungen zwischen einer Infektion mit SARS-CoV und anderen humanen Coronaviren unterscheiden zu können.

HCoV-229E und HCoV-NL63 Nukleokapside: Kreuzreaktivitäten zwischen den N Proteinen von 229E und NL63 bzw. OC43 und HKU1 sind bislang kaum untersucht. Unspezifische Bindungen innerhalb der Gruppe-I-Viren erscheinen eher unwahrscheinlich, da ein Vergleich der Aminosäuresequenzen nur eine Übereinstimmung von 49,3% ergibt (Tab. IV-1). Trotzdem wurde in einem einzelnen 229E-positiven Serumpaar ein Titeranstieg von 229E und NL63 N bindenden Antikörpern beobachtet (Tab. III-1, Abb. III-3, BCM-9A und BCM-9B). Hierbei scheint es sich um eine von HCoV-229E ausgelöste Co-Induktion von NL63-spezifischem IgG zu handeln. In diesem Probenpaar und auch in allen anderen definierten 229E-positiven Seren (BCM-7 bis BCM-12) konnte ein Basalniveau an NL63-Antikörpern nachgewiesen werden (Tab. III-1). Die für 229E und OC43 definierten Proben wurden hinsichtlich einer Infektion mit NL63 bzw. HKU1 nicht überprüft, da zum Zeitpunkt der Blutentnahme diese Virustypen noch nicht beschrieben waren. Die Detektion von NL63-bindenden Antikörpern beweist keinesfalls Kreuzreaktion mit 229E, sondern deutet eher darauf hin, dass die Spender vorangehenden Kontakt mit HCoV-NL63 hatten und somit spezifisches anti-HCoV-NL63 N IgG nachweisbar ist. Diese Annahme stimmt auch mit der weiter unten diskutierten sehr hohen NL63-Seroprävalenz überein. Abgesehen davon konnten im Zuge dieser Arbeit eine Reihe an Seren identifiziert werden, welche mit dem 229E- bzw. NL63-Antigen reagierten,

ohne jeweils NL63 bzw. 229E N zu erkennen, was einer grundsätzlichen Kreuzreaktivität widerspricht (Abb. III-6, D-12, C-1, D-15, C-4, C-5). Wenige Studien haben bisher 229E/NL63 Kreuzreaktivität untersucht. Dijkman *et al.* zeigten kürzlich mit Hilfe eines Kompetitions-ELISA, dass keine Kreuzreaktionen zwischen den beiden rekombinant exprimierten Nukleokapsiden bestehen (Dijkman *et al.*, 2008). Eine andere Arbeitsgruppe hingegen fand, dass Teile des HCoV-NL63 N Proteins von Serum einer mit HCoV-229E immunisierten Ziege erkannt werden können (Shao *et al.*, 2007). Die Relevanz dieses Befundes für die Serologie humaner Proben wurde allerdings nicht weiter untersucht.

HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 Nukleokapside: Mit einer AS-Sequenzhomologie von 68,2% (Tab. IV-1) ähneln sich die beiden N Proteine von HCoV-OC43 und -HKU1 am meisten. In der Tat wurden unspezifische Bindungen an das HKU1 Antigen in definierten OC43-Serumpaaren (akut/rekonvaleszent) beobachtet (III.3.1, Tab. III-1). In den Seren von fünf wieder genesenen Spendern wurden sehr starke Reaktionen mit dem HKU1 Nukleokapsid gemessen, wobei in zwei der dazugehörigen Akutphase-Proben kein HKU1-Signal detektiert werden konnte (BCM-1A und -2A) und in drei weiteren Proben ein niedriger Basalspiegel beobachtet wurde (BCM-4A, -5A und -6A). Gleichzeitige Infektion von HCoV-OC43 und -HKU1 in fünf verschiedenen Patienten scheint in diesem Zusammenhang äußerst unwahrscheinlich zu sein, auch wenn die Proben nicht auf eine HKU1-Infektion getestet wurden. Trotz dieser offensichtlichen Kreuzreaktion zwischen den beiden Gruppe-II-Viren, konnten einige Serumproben identifiziert werden, welche IgG enthielten, die OC43 N bzw. HKU1 N erkannten, ohne jeweils an das andere Nukleokapsid zu binden (Abb. III-6, C-3, D-15, C-4).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Nukleokapsid Proteine humaner Coronaviren mehrere verschiedene Epitope enthalten, wovon manche kreuzreagieren könnten. Diese Heterogenität wurde auch von anderen Arbeitsgruppen für SARS N beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die antigenen Determinanten über die gesamte Sequenz des Nukleokapsid Proteins verteilt liegen (sowohl lineare als auch Konformationsepitope) und nicht als Cluster gehäuft auftreten (Chen *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2005). Eine Möglichkeit eventuelle Kreuzreaktionen zu vermeiden, wäre die Herstellung von typ-spezifischen immunoreaktiven Nukleokapsid-Fragmenten oder -Peptiden und deren Anwendung

im Line-Immunoassay. In dieser Arbeit wurden mehrere Fragmente von HCoV N Proteinen exprimiert, gereinigt und getestet (Daten nicht gezeigt). Die Reaktionen mit diesen Fragmenten waren ganz im Gegensatz zu den Volllänge-Proteinen, aus den oben genannten Gründen, insgesamt zu schwach, um den Ansprüchen der durchzuführenden Serologie genügen zu können. Deshalb wurden andere Methoden in Betracht gezogen, eventuell auftretende Kreuzreaktionen zu vermeiden.

1.2.2 Inhibierung von Kreuzreaktionen

Avidität umschreibt die Stärke mit der ein multivalenter Antikörper an ein multivalentes Antigen bindet, während Affinität die Stärke einer einzelnen Antigen-Antikörperwechselwirkung darstellt. Niedrig-avide Antikörper werden für gewöhnlich während der Primärantwort gebildet und die Avidität eines Antikörpers steigt während der Reifung der IgG-Antwort (Chan *et al.*, 2007). Die Antigen-Antikörperbindungskräfte setzen sich aus Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen, hydrophoben Interaktionen und van-der-Waals Wechselwirkungen zusammen. Da kreuzreaktive Antikörper ähnliche, aber nicht identische Epitope erkennen, können bei einer solchen Bindung insgesamt weniger Interaktionen ausgebildet werden und die Affinität sinkt.

Durch den Einsatz von kleinen, stark geladenen Ionen wie Na^+ oder K^+ im Serumverdünnungspuffer können Antigen-Antikörper Wechselwirkungen gestört werden. Unter III.3.5.1 wurde gezeigt, dass bei einer Erhöhung der Salzkonzentration von 0,5 M auf 2 M unspezifische Bindungen von OC43-spezifischem IgG an HKU1 N inhibiert werden können, ohne dabei die spezifischen Bindungen signifikant zu beeinträchtigen (Abb. III-7).

Zusätzlich kann nach erfolgter Seruminkubation ein stringenter Waschschrift erfolgen, um niederaffine Antikörper zu eluieren. Hierzu eignen sich vor allem chaotrope Salze wie etwa Kaliumthiocyanat (KSCN) oder Harnstoff, die hydrophobe Effekte verhindern und Wasserstoffbrückenbindungen aufbrechen können. So werden Harnstoffelutions-Assays zur Aviditätsmessung routinemäßig bei der EBV- und Parvovirus B19-Serologie durchgeführt, um den Infektionsstatus ermitteln zu können (Pfrepper *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2003).

HCoV-Infektionen rufen eine polyklonale Immunantwort hervor. Es werden verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Affinitäten zu ihren Epitopen gebildet, was zur Folge hat, dass bei Inhibierung von Kreuzreaktionen immer auch spezifische, niederaffine Antikörper eluiert werden. Ebenso können zu lange

Inkubationszeiten und zu hohe Harnstoffkonzentration zur Denaturierung der Antikörper und der immobilisierten Antigene führen, was wiederum im Verlust des Signals resultieren könnte. Daher ist eine Optimierung der Bedingungen und Kontrolle der Ergebnisse durch Quantifizierung nötig. Abb. III-8 zeigt die Auswirkungen verschiedener Harnstoffkonzentrationen auf die Antikörperbindung bei einer Inkubation von jeweils drei Minuten. Bei einer Konzentration von 6 M Harnstoff werden unspezifische Bindungen stark gehemmt, während das spezifische Signal kaum beeinträchtigt wird.

Bei serologischen Untersuchungen muss beachtet werden, dass unter diesen stringenten Bedingungen bei einer erst kürzlich erfolgten HCoV-Infektion spezifische, aber niederaffine weil unreife, IgG ebenfalls eluiert werden. Zusätzlich sollte also der Line-Immunoassay unter konventionellen Bedingungen durchgeführt werden. Auch die zusätzliche Detektion von IgM und IgA kann Informationen liefern, ob es sich um eine frische Infektion handelt oder nicht.

2. HCoV-Seroprävalenz

Bis zur Identifikation des SARS-CoV im Jahre 2003 waren als einzige humanpathogene Coronaviren HCoV-229E (Gruppe I) und HCoV-OC43 (Gruppe II) bekannt, auch wenn Daten aus den 1960er Jahren schon darauf hindeuteten, dass weitere Coronaviren in der Bevölkerung zirkulieren könnten (Kahn & McIntosh, 2005).

Seroepidemiologische Untersuchungen bezüglich HCoV-229E und HCoV-OC43-Infektionen sind rar (Cereda *et al.*, 1986; Hasony & MacNaughton, 1982; Hruskova *et al.*, 1990; Kaye *et al.*, 1971; McIntosh *et al.*, 1970; Pohl-Koppe *et al.*, 1995). Die verfügbaren Daten weisen auf eine hohe 229E- und OC43-Seroprävalenz hin. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in diesen Studien eher gruppenspezifische als typspezifische Antikörper detektiert wurden, da in den älteren Arbeiten gereinigte Viruspartikel als Antigene in die Assays eingesetzt wurden. Dadurch bedingte mögliche Kreuzreaktionen mit anderen, bis dato unentdeckten HCoV, sollten berücksichtigt werden.

HCoV-NL63 und HCoV-HKU1 gelten als weit verbreitete Erreger von respiratorischen Erkrankungen (Pyrce *et al.*, 2007c). Trotzdem sind nur wenige Daten zur NL63-Seroprävalenz erhoben worden (Dijkman *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2007),

serologische Analysen zur HKU1-Verbreitung fehlen völlig. Ähnliches gilt auch für das SARS-CoV außerhalb der Epidemie. Nach der erfolgreichen Eindämmung scheint das Virus zwar nicht mehr in der Bevölkerung zu zirkulieren, es fehlen jedoch Untersuchungen über dessen tatsächliche Verbreitung. Studien, die in der gesunden Bevölkerung nach SARS-spezifischen Antikörpern suchen, sind knapp (Yu *et al.*, 2005). Der Kontakt mit SARS-CoV kann aber in einigen Fällen zu asymptomatischen Infektionen führen, weshalb diese unerkannt bleiben (Che *et al.*, 2006; Wilder-Smith *et al.*, 2005). Eine serologische Überwachung könnte hier eine stille Verbreitung des Virus aufdecken und durch Eindämmungsmaßnahmen einen erneuten Ausbruch verhindern.

Vor diesem Hintergrund wurden mit dem HCoV-Line-Immunoassay Untersuchungen zur Seroprävalenz humaner Coronaviren in verschiedenen Bevölkerungsgruppen durchgeführt. Zunächst sollte ein Querschnitt durch die gesunde, erwachsene Bevölkerung aus vier verschiedenen Ländern (Weißrussland, Finnland, Deutschland, China) betrachtet werden. Serologische Belege für eine Infektion mit den „alten“ humanen Coronaviren 229E bzw. OC43 fanden sich bei 15,5% bis 85,9% bzw. 51,2% bis 83,7% der Probanden (Tab. III-2). Dies spricht allgemein für eine hohe Frequenz und weite Verbreitung, jedoch mit großen regionalen Unterschieden in der Infektionshäufigkeit (Abb. III-9). Auf RT-PCR basierende Studien weisen ebenfalls auf eine weite Verbreitung beider Virustypen hin, wobei insgesamt HCoV-OC43 häufiger detektiert wird als HCoV-229E (Garbino *et al.*, 2006; Vabret *et al.*, 2008).

Wie in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, tragen die erst kürzlich beschriebenen humanpathogenen Coronaviren NL63 und HKU1 signifikant zur gesamten HCoV-Seroprävalenz bei. HCoV-NL63-Antikörper wurden in allen Kohorten am häufigsten nachgewiesen (62,8% bis 94,6%). HKU1-IgG konnte in 11,9% bis 71,7% detektiert werden (Tab. III-2). Auch bei diesen beiden neu entdeckten Gruppe-I- bzw. Gruppe-II-Viren sind große regionale Unterschiede in den Frequenzen zu beobachten und sie werden ebenfalls beständig mit RT-PCR-Technik in erkrankten Personen nachgewiesen (Chiu *et al.*, 2005; Vabret *et al.*, 2006).

Die HCoV-Seroprävalenz bei den getesteten Kindern liegt in den Bevölkerungsgruppen aus Weißrussland, Finnland und Deutschland ca. 40% und in der Gruppe aus China ca. 13% unter der Seroprävalenz der Erwachsenen. Dijkman *et al.* untersuchten kürzlich die HCoV-229E und -NL63-Seropävalenz bei holländischen Kindern. Sie fanden, dass 65% bzw. 75% der Kinder in einem Alter

von 1,5-3,5 Jahren für 229E respektive NL63 seropositiv sind (Dijkman *et al.*, 2008). Die Proben von chinesischen Kindern weisen ähnlich hohe Seroprävalenzen auf (229E: 67,8%, NL63: 74,5%; Tab. III-2), während bei Kindern aus den anderen Regionen (Weißrussland, Deutschland, Finnland) weit weniger häufig HCoV-Antikörper nachgewiesen wurden. Dies ist durch die oben beschriebenen unterschiedlichen regionalen Frequenzen zu erklären, aber auch Anzahl und Alter der Testpersonen können Einfluss auf die Ergebnisse nehmen.

Eine Sonderstellung nehmen die Serumproben von neugeborenen Kindern (Durchschnittsalter 74 Tage, Intervall 1-213 Tage) aus Finnland ein. Die meisten der dort detektierten Antikörper dürften maternalen Ursprungs sein, da Neugeborene erst ab etwa dem dritten Lebensmonat mit der Produktion von eigenen Antikörpern beginnen (Glezen, 2003). In zwei Studien wurde gezeigt, dass maternale, gegen 229E und NL63 N gerichtete IgG in Seren von Neugeborenen vorhanden sein können und ca. 3-5 Monate lang nach der Geburt nachweisbar sind (Dijkman *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2007). Die Annahme, dass bei den finnischen Kindern hauptsächlich maternale Antikörper gemessen wurden, wird durch ein sequentielles Serumpaar gestützt. Bei einem weiblichen Säugling konnten in Serum, das am Tag 127 nach der Geburt entnommen wurde, eine starke Reaktion mit den NL63 und OC43 Antigenen gemessen werden, während eine am Tag 213 entnommene Probe seronegativ getestet wurde. Dies ist als natürlicher Titerrückgang maternaler IgG zu betrachten. Darüber hinaus wurden drei Proben, welche in der ersten Woche nach Geburt entnommen wurden, für verschiedene HCoV-Typen seropositiv (IgG) getestet. Eine entsprechende Immunantwort auf eine Coronavirus-Infektion ist in dieser Zeitspanne nicht möglich.

Des Weiteren sollte die HCoV-Seroprävalenz bei HIV-positiven Patienten untersucht und mit gesunden Spendern verglichen werden. Hierzu wurde der Line-Immunoassay zunächst mit Proben von 60 HIV-positiven chinesischen Kindern durchgeführt und die erhaltenen Daten der gesunden Gruppe gegenübergestellt (Abb. III-10). Die Seroprävalenz aller HCoV-Typen (mit Ausnahme von SARS-CoV) unter HIV-positiven Kindern ist im Vergleich zu den gesunden Kindern weitaus niedriger (Rückgang um 92,6% bei 229E, 66,4% bei NL63, 61,1% bei OC43 und 77,6% bei HKU1). Analog zur Kontrollgruppe konnten OC43- und NL63-Antikörper (31,7% und 25%) am häufigsten, 229E und HKU1 (5% und 16,7%) am seltensten nachgewiesen werden. Auch bei erwachsenen HIV-positiven Spendern ist eine

Tendenz festzustellen (Abb. III-11). Die HCoV-Seroprävalenz dieser Gruppe fällt im Vergleich zu gesunden Spendern um 14,2% (229E), 9,4% (NL63) und 37,1% (HKU1) niedriger aus, während für OC43 eine leichte Zunahme verzeichnet wurde (1,6%).

HIV-Infektion führt also offensichtlich zur verminderten Fähigkeit, eine robuste humorale Immunantwort gegen HCoV-Infektionen aufbauen zu können. Es gibt keine Gründe, von einer tatsächlich niedrigeren Infektionsrate in den HIV-positiven Kohorten auszugehen, denn die gesunden und HIV-positiven Probanden stammten aus den gleichen Regionen. Vielmehr kann der immunsupprimierte Zustand HIV-positiver Spender die Antikörperantwort gegen andere Krankheitserreger beeinflussen, wie beispielsweise für opportunistische Adenovirus- (Lord *et al.*, 2000) und Mykobakterien-Infektionen (Ashino *et al.*, 2008) gezeigt wurde. Dass dieser Effekt bei HIV-positiven Erwachsenen sehr viel schwächer ausfällt, ließe sich durch die Annahme erklären, bei den meisten getesteten Probanden habe der Kontakt mit den humanen Coronaviren vor der HIV-Infektion stattgefunden. Daher wären diese Spender in der Lage gewesen, eine robuste Immunantwort gegen HCoV aufzubauen, die sich auch nach der HIV-Infektion messen lässt. Es ist davon auszugehen, dass die meisten Kinder bereits während der Geburt von ihren Müttern mit dem HI-Virus infiziert wurden. Bei einer darauf folgenden HCoV-Infektion ist die normale humorale Immunantwort beeinträchtigt und anti-HCoV-Antikörper sind in den meisten HIV-positiven Kindern nicht nachzuweisen, obwohl HCoV-Kontakt tatsächlich stattgefunden hat, wie aufgrund der oben diskutierten seroepidemiologischen Untersuchungen anzunehmen ist. Ähnliche Schlussfolgerungen wurden auch in einer Studie gezogen, in der die Antikörperantwort gegen das Masern-Virus bei HIV-positiven Erwachsenen und Kindern untersucht wurde (Brunell *et al.*, 1995).

Interessanterweise wurden unter den gesunden Testpersonen in einem europäischen und vier chinesischen Seren und in 16 weiteren Proben HIV-positiver Probanden Antikörper gegen SARS N detektiert. Wie unter III.4.1.3 beschrieben, wurde die stark mit HKU1 und SARS N reagierende Serumprobe aus Weißrussland näher untersucht. Es wurde festgestellt, dass IgG niedriger Avidität für beide Reaktionen verantwortlich ist, was auf eine unreife Antikörperantwort hinweist (Abb. III-12). Die negativen IgA- und IgM-Testresultate konnten eine vermutete zeitnahe Infektion weder ausschließen noch bestätigen. Der im Anschluss durchgeführte

Kompetitionsassay deutete auf spezifische Reaktionen mit HKU1 und SARS N hin, da nur das jeweils homologe Antigen in der Lage ist, Bindung an das entsprechende immobilisierte Antigen zu verhindern, während die Signale am jeweiligen heterologen Antigen völlig unbeeinflusst blieben. Im Falle einer bestehenden Kreuzreaktivität zwischen anti-HKU1 und anti-SARS Antikörpern wäre ein Effekt auf die Bindung am zugehörigen heterologen Protein zu erwarten gewesen. Kreuzreaktionen scheinen auch aufgrund der relativ geringen Sequenzübereinstimmungen (41,8%) eher unwahrscheinlich.

Studien, die SARS-CoV-Seroprävalenz in der gesunden Bevölkerung untersuchen, sind selten und fehlen außerhalb von China völlig. SARS gilt als Erkrankung zoonotischen Ursprungs und SARS-ähnliche Viren konnten in einer Reihe von Tieren nachgewiesen werden (Shi & Hu, 2008). Eine erhöhte SARS-CoV-Seroprävalenz bei Marktarbeitern in Südchina (Guan *et al.*, 2003) weist darauf hin, dass ein Überspringen des Virus von Tier auf Mensch möglich ist, ohne Symptome im neuen Wirt zu verursachen. Als SARS-CoV Reservoir wurden Fledermäuse identifiziert (Li *et al.*, 2005a; Normile, 2005). Diese Säugetiere sind mit einer enormen Artenvielfalt weltweit vertreten und können auch eine Reihe anderer CoV beherbergen (Gloza-Rausch *et al.*, 2008). Eine subklinisch verlaufende Infektion mit einem SARS-CoV ähnlichem Virus über eine Fledermaus oder einen Zwischenwirt wäre demnach durchaus denkbar. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass der weißrussische Spender sechs Jahre vor dem Auftreten der Epidemie tatsächlich mit einem bislang nicht identifizierten Coronavirus infiziert wurde. Aufgrund der kontinuierlichen Verbesserung molekularbiologischer Detektions-Methoden und die seit dem SARS-Ausbruch stark intensivierte Forschung auf dem Gebiet der Coronaviren, wäre die Entdeckung weiterer in der Bevölkerung zirkulierender HCoV keine große Überraschung (Pyrç *et al.*, 2007b).

Etwa 4,4% (20/450) der überprüften chinesischen Seren erkannten das SARS Nukleokapsid (Abb. III-10 und -11). Obwohl bei keinem dieser Patienten SARS diagnostiziert wurde, ist eine Infektion mit diesem Coronavirus möglich. Neben IgG Antikörpern wurden in vier Proben zusätzlich IgM und in einer Probe IgA nachgewiesen, was bei diesen Spendern auf einen zeitnahen Kontakt mit SARS-CoV hindeutet. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Blutproben vor der SARS-Epidemie 2002 und 2003 entnommen wurden, oder die serologischen Resultate im Zusammenhang mit der landesweiten Verbreitung von SARS-CoV in China zu

betrachten sind. Trotzdem betonen diese Befunde die Existenz von asymptomatischen und daher unerkannten SARS-Infektionen. Ob eine Transmissionsgefahr von diesen Menschen ausgeht und wenn ja, ob diese Infektionen zum klinischen Vollbild von SARS führen können, ist bislang nicht geklärt.

3. Antikörperprofile in Seren akut erkrankter und rekonvaleszenter SARS-Patienten und Einfluss von vorausgehenden HCoV-Infektionen auf den klinischen Verlauf von SARS

Die Folgen einer Infektion mit dem SARS-CoV reichen von subklinischen Manifestationen ohne jegliche Symptomatik bis hin zum akuten Atemnotsyndrom mit tödlichem Ausgang. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. So wurden auch einige genetische Prädispositionen mit einer besonderen Empfänglichkeit für SARS in Zusammenhang gebracht (Chong *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2004). Für einen ungünstigen Verlauf der Erkrankung werden als bedeutendste Risikofaktoren jedoch meist Alter und co-morbide Zustände angeführt, wie etwa Diabetes mellitus und Herz-Kreislauf-Beschwerden. Kinder entwickeln nur sehr milde Symptome. Bislang sind keine schweren klinischen Verläufe bekannt geworden. Abgesehen davon scheinen sie das Virus auch kaum weitergeben zu können (Hon *et al.*, 2003; Stockman *et al.*, 2007). Die Sterblichkeitsrate bei Patienten, welche älter als 65 Jahre sind, steigt hingegen auf über 60% (Chan *et al.*, 2003). Die biologischen Mechanismen, die dieser unterschiedlichen Morbidität und Mortalität zugrunde liegen, sind nicht bekannt. Es wurde vorgeschlagen, dass fehlregulierte Zytokin- und Chemokinantworten verantwortlich sein könnten (Cameron *et al.*, 2007) oder dass der Verlauf der Erkrankung durch andere Pathogene, welche die IFN-vermittelte antivirale Antwort stören, beeinflusst werden könnte (Chen & Subbarao, 2007).

Die humorale Immunantwort auf eine SARS-CoV-Infektion scheint einen wichtigen Effekt auf den Krankheitsverlauf zu haben. So fand eine Arbeitsgruppe bei Patienten mit milder Form besonders hohe Titer an Spike- und Nukleokapsid-spezifischen Antikörpern (Zhang *et al.*, 2006). Mehrfach wurde berichtet, dass frühe Serokonversion und robuste IgG-Antwort eine ungünstige Entwicklung der Krankheit provozieren können (Lee *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2006). Die schnelle Reaktion des Immunsystems könnte durch einen Priming-Effekt einer vorangegangenen Infektion mit

einem nicht-SARS-CoV induziert worden sein, welcher durch kreuzreaktive, aber nicht-neutralisierende Antikörper ausgelöst wird (Ho *et al.*, 2005).

Infektionen mit weniger pathogenen Coronaviren vor einer SARS-CoV-Infektion könnten aber auch unmittelbare Auswirkungen auf den klinischen Verlauf bei SARS haben. So führt einerseits bei Herpesviren des Menschen eine abgelaufene Infektion mit HSV-1 zu einer abgeschwächten Symptomatik einer darauf folgenden HSV-2-Infektion, die in der Regel auch nicht zu Rezidiven führt (Xu *et al.*, 2002). Andererseits ist eine potentielle Verstärkung klinischer Symptome bei aufeinander folgenden Infektionen mit unterschiedlichen Dengueviren (Guzman & Kouri, 2002) festzustellen. Diese Beobachtungen führten zu einer Kernfrage der vorliegenden Arbeit: gibt es einen Einfluss auf den klinischen Verlauf einer Infektion mit SARS-CoV durch vorherige Infektion mit anderen humanen Coronaviren?

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit einerseits SARS-spezifische Antikörperprofile in Serumproben von akut erkrankten und rekonvaleszenten SARS-Patienten beleuchtet, andererseits die serologischen Untersuchungen auf alle bisher bekannten humanpathogene Coronaviren ausgeweitet und in Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf gebracht werden.

Die 13 betrachteten kanadischen Patienten wurden in die Gruppen „schwerer klinischer Verlauf“ und „milder klinischer Verlauf“ eingeteilt (III.4.3, Tab. III-4). Während bei den schwer erkrankten Personen eine insgesamt höhere HCoV-Seroprävalenz festgestellt wurde, fanden sich in nur drei von sieben Patienten mit milder Ausprägung Antikörper gegen 229E (03-012, 03-013, 06-004) und in nur einer Serumreihe anti-HKU1 N IgG (03-012). Obwohl die Gesamtzahl der Patienten gering ist, bestätigt diese Beobachtung die Vermutung, dass Infektionen mit anderen HCoV den klinischen Verlauf bei SARS verschlechtern könnten.

Abgesehen davon wurde bei allen schwer erkrankten Personen eine starke Induktion von Basalspiegel-Antikörpern gegen 229E N und NL63 N, sowie bei einer Person (03-016) ein Titeranstieg von OC43-spezifischen IgG festgestellt. Ähnliche Phänomene wurden bereits von zwei anderen Arbeitsgruppen beobachtet, die mit IFA, Neutralisationsassays und Western-Blotting Experimenten serielle Serumproben von SARS-Patienten untersuchten (Chan *et al.*, 2005a; Che *et al.*, 2005). Beide schlossen aus den serologischen Ergebnissen, dass es sich hierbei um Kreuzreaktionen handelt, auch wenn Che *et al.* diese auf Nukleokapsid-Ebene ausschlossen. Dass die beobachteten Reaktionen tatsächlich unspezifische

Bindungen von SARS-Antikörpern an die 229E, NL63 und OC43 Antigene darstellen, erscheint äußerst unwahrscheinlich. Zum einen weisen die Antikörper eine sehr hohe Avidität auf, zum anderen ist nur ein Titeranstieg zu verzeichnen, wenn ein Basalspiegel vorhanden ist (vgl. Tab. III-4, 03-015, 03-017, 03-022 und 07-001). Chan *et al.* fanden auch keine Hinweise auf eine unspezifische polyklonale Aktivierung von B-Gedächtniszellen durch SARS-CoV. Es handelt sich also offenbar um anamnestic Reaktionen auf früher erworbene HCoV-Infektionen. Die Tatsache, dass dieses Phänomen bei den 13 überprüften Patienten nur bei zwei mild verlaufenden, aber bei allen schweren SARS-Erkrankungen auftritt, erhärtet den Verdacht auf einen infektionsverstärkenden Mechanismus durch schon vorhandenes (und co-induziertes) HCoV IgG. Dieser Effekt würde auch die Tatsache erklären, dass Patienten mit einer sehr frühen und heftigen Antikörperantwort meist ältere Menschen mit schlechterer Prognose sind, denn die Wahrscheinlichkeit sich mit anderen HCoV zu infizieren, steigt mit dem Alter.

Nicht-neutralisierende Antikörper (die kreuzreaktiv ein ähnliches Epitop binden) vermögen das Fortschreiten einer viralen Infektion zu unterstützen, indem sie beispielsweise mit Fc-Rezeptoren auf Makrophagen interagieren. Dies kann sich durch eine verbesserte Infektion der Zellen, gefolgt von verstärkter Virusreplikation, Dissemination und Fehlleitung der Zytokinantwort infektionsverstärkend auswirken (Thomas *et al.*, 2006). Der noch nicht völlig verstandene Mechanismus ist als *antibody-dependent enhancement* (ADE) bekannt und wird bei Infektionen mit Dengueviren (Guzman & Kouri, 2002), respiratorischen Syncytialviren (RSV) (Osiowy *et al.*, 1994) und interessanterweise auch bei den Gruppe-II-Coronaviren der infektiösen Peritonitis (FIPV) der Katzen beobachtet (Hohdatsu *et al.*, 1998).

Darüber hinaus demonstrieren auch *in vitro* Daten, dass Immunantworten den Eintritt in Zielzellen erleichtern können. So zeigten Yang und Kollegen für humane Nierenepithelzellen, dass die Aufnahme von SARS-CoV Pseudoviren, welche das Schleichkatzen Spike Protein exprimieren, durch humane S-spezifische neutralisierende Antikörper stark verbessert wird (Yang *et al.*, 2005). Eine weitere Studie verweist auf einen Zusammenhang zwischen einem Fc γ -Rezeptor IIA-Polymorphismus (Fc γ RIIA-R/R131) und einem schweren klinischen Verlauf bei SARS (Yuan *et al.*, 2005). Es wäre denkbar, dass zirkulierende, gegen humane Coronaviren gerichtete Antikörper, an das SARS-CoV unspezifisch binden und durch den beschriebenen Rezeptor-Polymorphismus leichter in Zielzellen gelangen

können. Tatsächlich wurde 2006 berichtet, dass anti-S IgG den Eintritt über einen Fc γ RIIA-abhängigen Mechanismus in humane B-Zelllinien vermittelt (Kam *et al.*, 2007). Es bleibt zu zeigen, ob dies auch für andere Fc γ RIIA-exprimierende Zellen gilt, denn B-Zellen werden nur gelegentlich von SARS-CoV befallen.

Diese Befunde lassen sich in einem hypothetischen Modell wie folgt zusammenfassen.

1. SARS Patienten, die während der akuten Phase keinen 229E-spezifischen Antikörpertiter aufweisen, entgehen meist einem schwereren Krankheitsverlauf und zeigen mildere Symptomatik, denn durch die Bildung von SARS-CoV-spezifischen, neutralisierenden Antikörpern kann das Virus effizient aus dem System entfernt werden.

2a) Hat der SARS-Patient durch eine vorangegangene 229E-Infektion einen Basalspiegel an 229E-spezifischem IgG erworben, so ist die Wahrscheinlichkeit für einen schwereren klinischen Verlauf erhöht. Das SARS-assoziierte Coronavirus veranlasst über kreuzreaktive Epitope 229E-spezifische B-Zellklone zur Differenzierung in Plasmazellen und Sezernierung von 229E-spezifischen Antikörpern. Diese treten in Konkurrenz mit spezifischen anti-SARS-Antikörpern. Die kreuzreaktiven 229E-spezifischen IgG binden zwar mit niedriger Affinität an das SARS-CoV, können es aber nicht neutralisieren.

2b) Der Virus-Antikörperkomplex wird über Fc γ -Rezeptoren in z. B. Makrophagen und B-Zellen aufgenommen. Es folgt eine erhöhte Virusreplikation, Verbreitung im Organismus und eine fehlgeleitete Zytokinantwort. Dies resultiert in erhöhtem immunpathologischen Schaden und schwerer Ausprägung der Symptomatik.

Die Beobachtungen der chronologischen Evolution von IgG, IgM und IgA nach einer SARS-CoV-Infektion stimmen weitgehend mit Berichten anderer Arbeitsgruppen überein (Hsueh *et al.*, 2004). Die IgG Serokonversion fand gleichzeitig oder früher statt als die für IgM und IgA. Nur in einem milden Fall wurde IgM an Tag neun als erste Ig-Subklasse detektiert (Patient Nr. 03-015). Insgesamt scheint die Serokonversion bei Patienten mit schwerer Ausprägung der Erkrankung etwas eher einzutreten als bei milden klinischen Verläufen, dies konnte aber aufgrund der niedrigen Zahl an seriellen Serumproben und der unterschiedlichen Entnahmezeitpunkte nicht beantwortet werden.

Eine robuste IgG-Antwort war bei allen Patienten zu beobachten, auch die Immunglobulin Subklassen IgM und IgA sind stark an der humoralen Antwort beteiligt. Dies zeigt sich u. a. in den Seren rekonvaleszenter SARS-Patienten aus China (vgl. III.4.2). In 49 Proben (100%) wurde IgG nachgewiesen, 38,8% bzw. 53,1% waren seropositiv für IgM bzw. IgA. Auch alle kanadischen SARS Seren testeten während des Krankheitsverlaufes positiv für IgG und IgA und bei nur einer Person konnte kein IgM nachgewiesen werden. IgG zirkulierte bis zu 206 Tage nach Beginn der Symptome in hohen Titern (Patient Nr. 03-014). Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Woo *et al.* gemacht (Woo *et al.*, 2004b).

Ausgereifte, hoch-avide IgG-Antikörper konnten ab Tag 34 detektiert werden (Patient Nr. 06-004), wobei alle Probanden in der Lage waren, hoch-avide Antikörper zu produzieren. Ein Zusammenhang zwischen der Schwere einer SARS-Erkrankung und dem Ausmaß, Dauer und Qualität der spezifischen humoralen Immunantwort gegen SARS-CoV konnte in der untersuchten Patientengruppe nicht gefunden werden.

Da in der frühen Phase der Erkrankung die Avidität von spezifischem IgG stark zunimmt (vgl. Tab. III-4 und Abb. III-15, Tag 26 und 56), kann mit Harnstoffelution zwischen einer erst kürzlich erfolgten und länger zurück liegenden Infektion unterschieden werden (Chan *et al.*, 2005b). Dies ist ein wichtiger Vorteil gegenüber der Detektion von IgM (und IgA) zur Diagnose von frischen Infektionen, da in diesem Zusammenhang die Prävalenz nicht sehr aussagekräftig ist.

Im Falle eines Wiederauftretens von SARS müssen serologische Untersuchungen durchgeführt werden um den epidemiologischen Charakter des Ausbruchs definieren zu können. Da die Verbreitung des Virus in Regionen stattfinden könnte, wo ein Teil der Bevölkerung bereits während der letzten Epidemie Kontakt mit SARS-CoV hatte, ist eine verlässliche Methode zur Unterscheidung zwischen Primärinfektion und erneuter Exposition dringend nötig.

4. HCoV-NL63 und Kawasaki Disease

Die Kawasaki Krankheit oder -Syndrom, ist eine selbst-limitierende Vasculitis, die bei Kleinkindern auftritt und mehrere Organe wie Haut, Lymphknoten, Blutgefäße und das Herz in Mitleidenschaft ziehen kann. Symptome wie Ausschlag, rote Augen, geschwollene Hände und Füße sind häufig. Klinische und epidemiologische Daten

weisen auf eine infektiöse Ursache der Erkrankung hin (Rowley *et al.*, 2008). Bislang konnte jedoch kein Krankheitserreger zweifelsfrei in Zusammenhang mit der Kawasaki Disease gebracht werden (Burns & Glode, 2004). Verschiedene virale (u. a. EBV, HHV-6, Parvoviren), bakterielle (u. a. Streptokokken, Rickettsien, Chlamydien) und eukaryotische Erreger (Pilze) wurden bereits diskutiert (Rowley & Shulman, 2007).

Esper *et al.* konnten in einem an Kawasaki Syndrom leidendem Kleinkind HCoV-NL63-RNA nachweisen. In einer anschließend durchgeführten Fall-Kontroll Studie wurden in acht von elf erkrankten Kindern, jedoch nur in einem von 22 gesunden Kontrollpatienten HCoV-NL63 detektiert. Die Autoren schlossen daraus einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Kawasaki Disease und einer HCoV-NL63-Infektion (Esper *et al.*, 2005a). Mehrere Arbeitsgruppen suchten daraufhin ebenfalls nach einer Assoziation von Kawasaki Disease mit HCoV-NL63 (Belay *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2006; Ebihara *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2005). Jedoch konnte in keiner dieser Studien ein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Allerdings konzentrierten sich sämtliche Analysen auf den Erregernachweis mittels RT-PCR. Coronavirale Nukleinsäuren sind jedoch nur während der aktiven Virusreplikation nachweisbar. Die notwendigen serologischen Untersuchungen wurden bisher vernachlässigt.

Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit in 19 Blutproben von 14 an Kawasaki Syndrom leidenden Kindern nach anti-HCoV-NL63 Antikörpern (IgG, IgM, IgA) gefahndet. Wie in Tab. III-5 dargestellt, konnten in nur drei Serumproben von zwei verschiedenen Kindern (Nr. 7, 9 und 9a) serologische Anhaltspunkte auf NL63-Infektion gefunden werden. Am häufigsten wurden IgG- und IgA-Antikörper gegen HCoV-OC43 nachgewiesen (36% der getesteten Kinder). Die Proben wurden vor Beginn einer medikamentösen Behandlung entnommen. Eine durch Immunsuppression beeinträchtigte humorale Antwort gegen HCoV ist somit auszuschließen (S. Gerling, pers. Komm.).

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Kawasaki Syndrom und einer HCoV-NL63-Infektion (oder einer Infektion mit einem anderen Coronavirus) hergestellt werden. Diese serologische Untersuchung stützt die auf RT-PCR basierenden Studien, die ebenfalls keine Assoziation feststellen konnten. HCoV-NL63 kann mithin nicht mehr als mögliche Ursache der Kawasaki Krankheit betrachtet werden.

5. T-Zell-Diagnostik

Die zellvermittelte Immunität gegen humane Coronaviren ist kaum erforscht. Die Aufklärung zugrunde liegender Mechanismen der Infektions-Kontrolle ist jedoch von immenser Bedeutung. So ist die Identifikation potentieller Zielstrukturen für die Entwicklung neuer diagnostischer, therapeutischer und präventiver Verfahren von großer Relevanz.

Für HCoV-229E konnten HLA-Klasse-II restringierte T-Zell-Epitope auf den Spike und Nukleokapsid Proteinen identifiziert werden (Spencer *et al.*, 1995). Während mehrere Arbeitsgruppen die T-Zellantwort in SARS-Patienten untersuchten (Libraty *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2006a; Yang *et al.*, 2007), existieren keine Studien über die zellvermittelte Immunität gegen die neu entdeckten Coronaviren NL63 und HKU1.

Zum besseren Verständnis der T-Zellantwort nach HCoV-Infektionen wurden zunächst von zwölf verschiedenen Spendern die Frequenzen Nukleokapsid-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen bestimmt. Aufgrund der hohen HCoV-Seroprävalenz einerseits und bereits veröffentlichter Daten zur Identifikation immunoreaktiver T-Zell-Epitope auf dem SARS N Protein andererseits (Peng *et al.*, 2006b; Zhao *et al.*, 2007a), wurde angenommen, dass restimulierbare Gedächtniszellen in einigen Spendern nachgewiesen werden können.

Wie unter III.5.1 und Abb. III-16 dargestellt, konnte bei allen getesteten Personen eine T-Zellantwort durch Stimulation mit den NL63- und OC43-Antigenen induziert werden. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den in dieser Arbeit gesammelten serologischen Daten (vgl. IV.2). HCoV-NL63 und -OC43 zirkulieren am häufigsten in der Bevölkerung und restimulierbare Gedächtniszellen können häufig detektiert werden. Die Frequenzen von INF- γ -produzierenden Zellen im Bezug auf das 229E Nukleokapsid sind insgesamt geringer, aber nur ein Spender zeigte überhaupt keine Reaktion. Bei einer Person wurden mit $120 \text{ SFC}/2 \times 10^5 \text{ PBMCs}$ eine sehr hohe Frequenz 229E-spezifischer T-Zellen festgestellt, was auf eine zeitnahe Infektion hindeuten könnte. T-Lymphozyten, welche Epitope innerhalb des HKU1 N Proteins erkennen, konnten bei nur 2 Spendern nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den anderen HCoV wurde auch eine geringere Seroprävalenz von HKU1 beschrieben. Wie bereits unter III.5.1 erläutert, handelt es sich bei den mit SARS N stimulierbaren T-Zellen aufgrund des hohen Hintergrunds um unspezifische Reaktionen.

In anschließenden Experimenten wurde nur das HCoV-NL63 N Protein näher untersucht, da sämtliche verfügbaren Spender mit diesem Antigen restimulierbare T-

Lymphozyten besaßen und bis dato noch keine Daten zur NL63-spezifischen T-Zellantwort publiziert worden sind. Es sollte geklärt werden, ob das NL63 Nukleokapsid Protein HLA-Klasse-I und/oder HLA-Klasse-II restringierte Epitope enthält und ob es sich im Vergleich zu den anderen HCoV dabei um spezifische oder kreuzreaktive Bereiche handelt.

In der Literatur wurden bereits HLA-Klasse-I restringierte Epitope auf dem SARS Nukleokapsid beschrieben (Peng *et al.*, 2006b; Tsao *et al.*, 2006). Deshalb wurde zunächst eine aus Decameren bestehende Peptidbibliothek zur Detektion von virusspezifischen CD8⁺ CTL eingesetzt. Es wurden für die HLA-Allele A*0201 und B*0702 restringierte Epitope innerhalb des NL63 Nukleokapsids vorhergesagt (Tab. II-10; III.5.2). Zusätzlich wurden je zwei spezifische 229E-, OC43-, HKU1- und SARS-Decamere eingesetzt. Auch nach mehrfacher Wiederholung der Stimulation und Verlängerung der Inkubationszeit von 20 h auf 36 h, konnte mit den Decamer-Peptidpools bei keinem der vier getesteten Spender zytotoxische T-Lymphozyten zur INF- γ -Produktion angeregt werden. Die parallel zur Kontrolle eingesetzten Volllänge-Proteine führten jedoch stets zur Stimulation. Es wäre möglich, dass der verwendete Peptidpool nicht alle präsentierbaren CTL-Epitope beinhaltet. Dies erscheint wegen der großen Anzahl an eingesetzten Peptiden und ihrer Vorhersage mittels zweier verschiedener Programme (vgl. Tab. II-10) jedoch eher unwahrscheinlich. Vielmehr könnten HCoV Nukleokapside ausschließlich CD4⁺ T-Helferzellantworten induzieren, die nicht auf Decamer-Peptide reagieren, da von HLA-Klasse-II-Molekülen nur Peptide mit mindestens zwölf AS Länge gebunden werden können. Diese Annahme konnte durch Depletionsexperimente bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass INF- γ -sezernierende Zellen nur in Ansätzen festzustellen sind, in denen CD8⁺ T-Zellen depletiert wurden (Abb. III-17, Spender 2 und 3). Nach Depletion von CD4⁺-Zellen hingegen konnte keine Stimulation mehr erfasst werden (Abb. III-17, Spender 4).

In den darauf folgenden Untersuchungen wurden, wie unter III.5.3 erläutert, vom NL63 Nukleokapsid Protein abgeleitete, 15 Aminosäurereste lange Peptide zur Stimulation von CD4⁺ T-Helferzellen eingesetzt. Die Signale im ELISPOT nach erfolgter Inkubation waren im Vergleich zu den Reaktionen mit den Volllänge-Proteinen durchweg schwach, weswegen co-stimulatorische Antikörper zugegeben wurden. Insgesamt wurden neun verschiedene immunoreaktive Peptide identifiziert (Tab. III-6). Die Peptide Nr. 3, 4 und 24 induzierten eine Immunreaktion in verschiedenen Spendern. Diese Testpersonen könnten identische HLA-Allele

besitzen, welche in der Lage sind, diese Epitope zu präsentieren. Eine weitere Analyse war leider nicht möglich, da nur von den Spendern 2 und 7 die entsprechenden HLA-Klasse-II-Allele verfügbar waren.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die identifizierten reaktiven Peptide HCoV-NL63 spezifische Epitope enthalten, da bei einem Alignment keine größeren Sequenzhomologien zu den Nukleokapsiden der anderen humanen Coronaviren festgestellt werden konnten.

Die im Vergleich zum Volllänge-Nukleokapsid insgesamt schwache Reaktivität der NL63-Peptide könnte durch die Auswahl der 15-meren bedingt sein. Zwar wurde das Nukleokapsid Protein von 31 Peptiden mit je drei AS Überlappungen komplett umspannt. Es ist jedoch möglich, dass durch diese Methode die Epitope nicht den idealen Sequenzen entsprechen, was zum kompletten Verlust oder Verminderung der Reaktivität geführt haben könnte. Ferner kann die relativ lange Inkubationszeit dazu führen, dass nah beieinander liegende Spots verschmelzen und deshalb vom Lesegerät als Einzelereignisse erkannt werden.

Während Peng *et al.* feststellten, dass vom SARS Nukleokapsid abgeleitete Peptide sowohl CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten als auch CD4⁺ T_H1-Zellen zu induzieren vermögen (Peng *et al.*, 2006b), fanden andere Gruppen überhaupt keine Reaktion mit N Peptiden (Zhou *et al.*, 2006). Auch in anderen Arbeiten wurde berichtet, dass die gegen N Peptide gerichtete T-Zellantwort hauptsächlich über T-Helferzellen läuft (Spencer *et al.*, 1995). CTL-Epitope wurden überwiegend auf dem Spike Protein identifiziert (Chen *et al.*, 2005).

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, ein serologisches Nachweisverfahren zu etablieren, welches in der Lage ist Serumantikörper (IgG, IgM und IgA) gegen alle fünf bisher bekannten humanen Coronaviren (HCoV-229E, -NL63, -OC43, -HKU1 und SARS-CoV) parallel in einem einzigen Ansatz zu detektieren. Hierfür werden nur minimale Mengen an Serum benötigt (15 µl). Als ideale Antigene wurden HCoV Nukleokapsid Proteine identifiziert. Diese sind in der Lage, eine äußerst robuste humorale Immunantwort zu induzieren und ergeben eine ausgezeichnete Sensitivität. Die Spezifität konnte durch Erhöhung der ionischen Stärke im Serumverdünnungspuffer gekoppelt mit einer anschließenden Harnstoffelution entscheidend optimiert werden. Hierdurch konnten gelegentlich auftretende Kreuzreaktionen innerhalb der Gruppe-II-Viren (HCoV-OC43 und HCoV-HKU1) weitgehend unterdrückt werden. Die einfache und unkomplizierte Handhabung verbunden mit einer hohen Spezifität und Sensitivität, sowie die geringen Herstellungskosten, machen das neu entwickelte System zur idealen Methode bei der vertieften Diagnostik und zu einem geeigneten System für groß angelegte epidemiologische Analysen.

Die Leistungsfähigkeit des Line-Immunoassays wurde unter anderem durch Untersuchungen der HCoV-Seroprävalenz bestätigt. In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass die erst kürzlich entdeckten humanen Coronaviren NL63 (Erstbeschreibung 2004) und HKU1 (2005) signifikant zum allgemeinen Spektrum der HCoV-Infektionen beitragen (Seroprävalenz in gesunder erwachsener Bevölkerung NL63: 62,8-94,6%; HKU1: 11,9-71,7%) und wie die anderen humanpathogenen Coronaviren, mit Ausnahme von SARS-CoV, weltweit verbreitet sind. Tatsächlich weist NL63 in allen untersuchten Populationen die höchste Seroprävalenz auf und kann als bedeutender Erreger respiratorischer Erkrankungen betrachtet werden.

Immunsuppression wirkt sich negativ auf den Aufbau einer robusten IgG Antikörperantwort gegen die verschiedenen HCoV aus. Dies konnte durch Vergleiche HIV-infizierter Personen mit gesunden Kontrollgruppen aufgezeigt werden.

Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit der postulierte Zusammenhang zwischen einer HCoV-NL63-Infektion und der Kawasaki Disease, einer systemischen Vasculitis

bei Kindern, zum ersten Mal auf serologischer Basis untersucht. Da kein Hinweis auf erhöhte Seroprävalenz oder akute Infektion mit diesem Gruppe-I-Virus bei an Kawasaki Syndrom leidenden Kindern festgestellt werden konnte, ist eine Assoziation auszuschließen.

Durch Testungen von Blutproben chinesischer und kanadischer SARS-Patienten konnte die Entwicklung einer robusten humoralen Immunantwort (IgG, IgM und IgA) nach einer SARS-CoV-Infektion nachgewiesen werden. Zudem wurden in einer europäischen und in 20 chinesischen Proben von Blutspendern, bei denen niemals eine SARS Erkrankung diagnostiziert wurde, IgG-Antikörper gegen SARS-CoV detektiert. Es ist daher davon auszugehen, dass in der Bevölkerung gelegentlich Kontakt zu SARS oder SARS-ähnlichen Viren besteht, welcher zu Serokonversion und asymptomatisch verlaufenden Infektionen führt.

Wie durch Versuche mit Blutproben chinesischer und kanadischer SARS-Patienten festgestellt werden konnte, wird eine robuste humorale Immunantwort nach einer SARS-CoV-Infektion aufgebaut (IgG, IgM und IgA).

Bei insgesamt 13 SARS-Patienten mit mildem oder schwerem klinischem Krankheitsverlauf wurden während der akuten und der rekonvaleszenten Phase die Antikörperprofile aller fünf humanen Coronaviren untersucht. Patienten mit milder Erkrankung weisen eine niedrigere Seroprävalenz bezüglich 229E und HKU1 auf als schwerer Erkrankte. Ein durch SARS-CoV ausgelöster Recall-Effekt, der die Basalspiegel von in der akuten Phase vorhandenen 229E und NL63 (und in geringerem Ausmaße auch OC43) Antikörpern stark ansteigen lässt, ist in allen Patienten mit ungünstigem Verlauf zu beobachten. Die Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass es sich hierbei um einen infektionsverstärkenden Mechanismus von nicht-neutralisierenden, kreuzreaktiven anti-229E IgG handeln könnte. Dieser Effekt wurde auch bei anderen viralen Infektionen als *antibody-dependent enhancement* (ADE) beschrieben. Der Befund ermöglicht erstmals eine diagnostische Prädisposition für einen schwereren klinischen Verlauf und die frühzeitige Einleitung von Gegenmaßnahmen.

Mit Versuchen zur zellvermittelten Immunität wurde gezeigt, dass HCoV Nukleokapsid Proteine geeignete Antigene für die T-Zell-Diagnostik darstellen. Die meisten Spender besitzen restimulierbare, für 229E, NL63 und OC43 spezifische T-Zellen. Dagegen konnten bei Stimulation mit dem HKU1 Antigen nur in zwei von zwölf Spendern T-Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen

weitgehend die in dieser Arbeit durchgeführten serologischen Untersuchungen. Durch Stimulation mit HLA-Klasse-I restringierten Peptiden und durch Depletionsexperimente konnte mit Hilfe des ELISPOT-Assays festgestellt werden, dass bei der Erkennung von Epitopen auf dem NL63 Nukleokapsid ausschließlich CD4⁺ T-Helferzellen beteiligt sind. Spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen konnten nicht detektiert werden. Durch Screening einer 15-AS-Peptidbibliothek, welche von dem HCoV-NL63 Nukleokapsid abgeleitet wurde, konnten insgesamt neun verschiedene immunoreaktive Peptide identifiziert werden. Das Nukleokapsid Protein dient als wichtiges Antigen in der zellvermittelten Immunantwort auf HCoV-Infektionen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi D., Johnson G., Draker R., Ayers M., Mazzulli T., Talbot P. & Tellier R. (2004). Comprehensive detection and identification of human coronaviruses, including the SARS-associated coronavirus, with a single RT-PCR assay. *J Virol Methods* 122:29-36.
- Arbour N., Day R., Newcombe J. & Talbot P.J. (2000). Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J Virol* 74:8913-8921.
- Arden K.E., Nissen M.D., Sloots T.P. & Mackay I.M. (2005). New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J Med Virol* 75:455-462.
- Ashino Y., Guio H., Iwamoto A., Yano I., Matsumura T. & Hattori T. (2008). Serological response against Mycobacterium avium complex glycolipid antigens in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Microbiol Immunol* 52:36-39.
- Barabas S. (2007). Immunologische Mechanismen des Harnstoff-vermittelten Proteintransfers in antigenpräsentierenden Zellen und dessen Bedeutung für den Nachweis antigenspezifischer T-Zellen und ihrer Zielstrukturen. *Dissertation (Dr. rer. nat.)*. Naturwissenschaftliche Fakultät III, Universität Regensburg.
- Bastien N., Anderson K., Hart L., Van Caesele P., Brandt K., Milley D., Hatchette T., Weiss E.C. & Li Y. (2005). Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J Infect Dis* 191:503-506.
- Belay E.D., Erdman D.D., Anderson L.J., Peret T.C.T., Schrag S.J., Fields B.S., Burns J.C. & Schonberger L.B. (2005). Kawasaki disease and human coronavirus. *J Infect Dis* 192:352-353.
- Bermingham A., Heinen P., Iturriza-Gomara M., Gray J., Appleton H. & Zambon M.C. (2004). Laboratory diagnosis of SARS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359:1083-1089.
- Bradburne A.F., Bynoe M.L. & Tyrrell D.A. (1967). Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. *Br Med J* 3:767-769.
- Brian D.A. and Baric R.S. (2005). Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 287:1-30.
- Brunell P.A., Vimal V., Sandu M., Courville T.M., Daar E. & Israele V. (1995). Abnormalities of measles antibody response in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *J AIDS Hum Retrovirol* 10:540-548.

- Burks J.S., DeVald B.I., Jankovsky I.D. & Gerdes J.C. (1980). Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science* 209:933-934.
- Burns J.C. and Glode M.P. (2004). Kawasaki syndrome. *Lancet* 364:533-544.
- Cameron M.J., Ran L., Xu L., Danesh A., Bermejo-Martin J.F., Cameron C.M., Muller M.P., Gold W.L., Richardson S.E., Poutanen S.M., Willey B.M., DeVries M.E., Fang Y., Seneviratne C., Bosinger S.E., Persad D., Wilkinson P., Greller L.D., Somogyi R., Humar A., Keshavjee S., Louie M., Loeb M.B., Brunton J., McGeer A.J., the Canadian S.R.N. & Kelvin D.J. (2007). Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute Respiratory syndrome. *J Virol* 81:8692-8706.
- Cereda P.M., Pagani L. & Romero E. (1986). Prevalence of antibody to human coronaviruses 229E, OC43 and neonatal calf diarrhea coronavirus (NCD CV) in patients of Northern Italy. *Eur J Epidemiol* 2:112-117.
- Chan K.H., Cheng V.C.C., Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Poon L.L.M., Guan Y., Seto W.H., Yuen K.Y. & Peiris J.S.M. (2005a). Serological responses in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection and cross-reactivity with human coronaviruses 229E, OC43, and NL63. *Clin Vac Immunol* 12:1317-1321.
- Chan K.H., Sonnenberg K., Niedrig M., Lam S.Y., Pang C.M., Chan K.M., Ma S.K., Seto W.H. & Peiris J.S.M. (2007). Use of antibody avidity assays for diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Clin Vaccine Immunol* 14:1433-1436.
- Chan K.S., Zheng J.P., Mok Y.W., Li Y.M., Liu Y.N., Chu C.M. & Ip M.S. (2003). SARS: prognosis, outcome and sequelae. *Respirology* 8:S36-S40.
- Chan P.K.S., Lim P.-L., Liu E.Y.M., Cheung J.L.K., Leung D.T.M. & Sung J.J.Y. (2005b). Antibody avidity maturation during severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *J Infect Dis* 192:166-169.
- Chang L.Y., Chiang B.L., Kao C.L., Wu M.H., Chen P.J., Berkhout B., Yang H.C., Huang L.M. & Kawasaki Disease Research G. (2006). Lack of Association between infection with a novel human coronavirus (HCoV), HCoV-NH, and Kawasaki disease in Taiwan. *J Infect Dis* 193:283-286.
- Che X.y., Di B., Zhao G.p., Wang Y.d., Qiu L.w., Hao W., Wang M., Qin P.z., Liu Y.f., Chan K.h., Cheng V.C.C. & Yuen K.y. (2006). A patient with asymptomatic severe acute respiratory syndrome (SARS) and antigenemia from the 2003-2004 community outbreak of SARS in Guangzhou, China. *Clin Infect Dis* 43:e1-e5.
- Che X.y., Qiu L.w., Liao Z.y., Wang Y.d., Wen K., Pan Y.x., Hao W., Mei Y.b., Cheng V.C.C. & Yuen K.y. (2005). Antigenic cross-reactivity between severe acute

- respiratory syndrome-associated coronavirus and human coronaviruses 229E and OC43. *J Infect Dis* 191:2033-2037.
- Chen H., Hou J., Jiang X., Ma S., Meng M., Wang B., Zhang M., Zhang M., Tang X., Zhang F., Wan T., Li N., Yu Y., Hu H., Yang R., He W., Wang X. & Cao X. (2005). Response of memory CD8⁺ T cells to severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus in recovered SARS patients and healthy individuals. *J Immunol* 175:591-598.
- Chen J. and Subbarao K. (2007). The Immunobiology of SARS. *Annu Rev Immunol* 25:443-472.
- Chen Z., Pei D., Jiang L., Song Y., Wang J., Wang H., Zhou D., Zhai J., Du Z., Li B., Qiu M., Han Y., Guo Z. & Yang R. (2004). Antigenicity analysis of different regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *Clin Chem* 50:988-995.
- Chibo D. and Birch C. (2006). Analysis of human coronavirus 229E spike and nucleoprotein genes demonstrates genetic drift between chronologically distinct strains. *J Gen Virol* 87:1203-1208.
- Chiu S.S., Hung Chan K., Wing Chu K., Wai Kwan S., Guan Y., Lit Man Poon L. & Peiris J.S.M. (2005). Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin Infect Dis* 40:1721-1729.
- Chong W., Ip W., Tso G., Ng M., Wong W., Law H., Yung R., Chow E., Au K., Chan E., Lim W., Peiris J. & Lau Y. (2006). The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. *BMC Infect Dis* 6:82.
- Dessau R.B., Lisby G. & Frederiksen J.L. (2001). Coronaviruses in brain tissue from patients with multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 101:601-604.
- Dijkman R., Jebbink M.F., El Idrissi N.B., Pyrc K., Muller M.A., Kuijpers T.W., Zaaijer H.L. & van der Hoek L. (2008). Human coronavirus NL63 and 229E seroconversion in children. *J Clin Microbiol* online Vorabveröffentlichung, doi:10.1128/jcm.00533-00508.
- Dominguez S.R., Anderson M.S., Glode M.P., Robinson C.C. & Holmes K.V. (2006). Blinded case-control study of the relationship between human coronavirus NL63 and Kawasaki syndrome. *J Infect Dis* 194:1697-1701.
- Drosten C., Gunther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R.A., Berger A., Burguiere A.M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J.C., Muller S., Rickerts V., Sturmer M., Vieth S., Klenk H.D., Osterhaus A.D., Schmitz H. & Doerr H.W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348:1967-1976.

- Ebihara T., Endo R., Ma X., Ishiguro N. & Kikuta H. (2005). Lack of association between new haven coronavirus and Kawasaki disease. *J Infect Dis* 192:351-352.
- Eickmann M., Becker S., Klenk H.D., Doerr H.W., Stadler K., Censini S., Guidotti S., Masignani V., Scarselli M., Mora M., Donati C., Han J.H., Song H.C., Abrignani S., Covacci A. & Rappuoli R. (2003). Phylogeny of the SARS coronavirus. *Science* 302:1504-1505.
- Emery S., Erdman D., Bowen M., Newton B., Winchell J., Meyer R., Tong S., Cook B., Holloway B., McCaustland K., Rota P., Bankamp B., Lowe L., Ksiazek T., Bellini W. & Anderson L. (2004). Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg Infect Dis* 10:311-316.
- Enjuanes L., Sola I., Zuniga S. & Moreno J.L. (2007). Coronavirus RNA synthesis: transcription. In: *Coronaviruses*, Thiel V. (Hrsg.), S. 81-108. Caister Academic Press, Norfolk.
- Esper F., Shapiro E.D., Weibel C., Ferguson D., Landry M.L. & Kahn J.S. (2005a). Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J Infect Dis* 191:499-502.
- Esper F., Weibel C., Ferguson D., Landry M.L. & Kahn J.S. (2005b). Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J Infect Dis* 191:492-498.
- Esper F., Weibel C., Ferguson D., Landry M.L. & Kahn J.S. (2006). Coronavirus HKU1 infection in the United States. *Emerg Infect Dis* 12:775-779.
- Farcas G., Poutanen S., Mazzulli T., Willey B., Butany J., Asa S., Faure P., Akhavan P., Low D. & Kain K. (2005). Fatal severe acute respiratory syndrome is associated with multiorgan involvement by coronavirus. *J Infect Dis* 191:193-197.
- Fouchier R.A., Hartwig N.G., Bestebroer T.M., Niemeyer B., de Jong J.C., Simon J.H. & Osterhaus A.D. (2004). A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6212-6216.
- Garbino J., Crespo S., Aubert J.D., Rochat T., Ninet B., Deffernez C., Wunderli W., Pache J.C., Soccac P.M. & Kaiser L. (2006). A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin Infect Dis* 43:1009-1015.
- Gerna G., Campanini G., Rovida F., Percivalle E., Sarasini A., Marchi A. & Baldanti F. (2006). Genetic variability of human coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. *J Med Virol* 78:938-949.

- Gerna G., Passarani N., Battaglia M. & Rondanelli E.G. (1985). Human enteric coronaviruses: antigenic relatedness to human coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 151:796-803.
- Gerna G., Percivalle E., Sarasini A., Campanini G., Piralla A., Rovida F., Genini E., Marchi A. & Baldanti F. (2007). Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. *J Clin Virol* 38:244-250.
- Glezen W.P. (2003). Effect of maternal antibodies on the infant immune response. *Vaccine* 21:3389-3392.
- Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Göttsche M., Panning M., Drexler F.J., Petersen N., Annan A., Grywna K., Müller M., Pfefferle S. & Drosten C. (2008). Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg Infect Dis* 14:626-631.
- Golda A. and Pyrc K. (2008). Recent antiviral strategies against human coronavirus-related respiratory illnesses. *Curr Opin Pulm Med* 14:248-253.
- Gonzales J.M., Gomez-Puertas P., Cavanagh D., Gorbalenya A.E. & Enjuanes L. (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch Virol* 148:2207-2235.
- Gorbalenya A.E., Snijder E.J. & Spaan W.J.M. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J Virol* 78:7863-7866.
- Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., Luo S.W., Li P.H., Zhang L.J., Guan Y.J., Butt K.M., Wong K.L., Chan K.W., Lim W., Shortridge K.F., Yuen K.Y., Peiris J.S.M. & Poon L.L.M. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302:276-278.
- Guo J.P., Petric M., Campbell W. & McGeer P.L. (2004). SARS coronavirus peptides recognized by antibodies in the sera of convalescent cases. *Virology* 324:251-256.
- Guzman M.G. and Kouri G. (2002). Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2:33-42.
- Hamre D. and Procknow J.J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 121:190-193.
- Han D.P., Kim H.G., Kim Y.B., Poon L.L.M. & Cho M.W. (2004a). Development of a safe neutralization assay for SARS-CoV and characterization of S-glycoprotein. *Virology* 326:140-149.
- Han X., Bartlam M., Jin Y.h., Liu X., He X., Cai X., Xie Q. & Rao Z. (2004b). The expression of SARS-CoV M gene in *P. pastoris* and the diagnostic utility of the expression product. *J Virol Methods* 122:105-111.

- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- Hasony H.J. and MacNaughton M.R. (1982). Prevalence of human coronavirus antibody in the population of southern Iraq. *J Med Virol* 9:209-216.
- He M.-L., Zheng B.-J., Chen Y., Wong K.-L., Huang J.-D., Lin M.C., Peng Y., Yuen K.Y., Sung J.J.Y. & Kung H.-f. (2006). Kinetics and synergistic effects of siRNAs targeting structural and replicase genes of SARS-associated coronavirus. *FEBS Lett* 580:2414-2420.
- Ho M.S., Chen W.J., Chen H.Y., Lin S.F., Wang M.C., Di J., Lu Y.T., Liu C.L., Chang S.C., Chao C.L., King C.C., Chiou J.M., Su I.J. & Yang J.Y. (2005). Neutralizing antibody response and SARS severity. *Emerg Infect Dis* 11:1730-1737.
- Hofmann H., Pyrc K., van der Hoek L., Geier M., Berkhout B. & Pohlmann S. (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci* 102:7988-7993.
- Hohdatsu T., Yamada M., Tominaga R., Makino K., Kida K. & Koyama H. (1998). Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline alveolar macrophages and human monocyte cell line U937 by serum of cats experimentally or naturally infected with feline coronavirus. *J Vet Med Sci* 60:49-55.
- Holmes K.V. (2005). Structural Biology: adaptation of SARS coronavirus to humans. *Science* 309:1822-1823.
- Hon K.L.E., Leung C.W., Cheng W.T.F., Chan P.K.S., Chu W.C.W., Kwan Y.W., Li A.M., Fong N.C., Ng P.C. & Chiu M.C. (2003). Clinical presentations and outcome of severe acute respiratory syndrome in children. *Lancet* 361:1701-1703.
- Hruskova J., Heinz F., Svandova E. & Pennigerova S. (1990). Antibodies to human coronaviruses 229E and OC43 in the population of C.R. *Acta Virol* 34:346-352.
- Hsueh P.R., Huang L.M., Chen P.J., Kao C.L. & Yang P.C. (2004). Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. *Clin Microbiol Infect* 10:1062-1066.
- Huang C., Ito N., Tseng C.T. & Makino S. (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J Virol* 80:7287-7294.
- Huang L.R., Chiu C.M., Yeh S.H., Huang W.H., Hsueh P.R., Yang W.Z., Yang J.Y., Su I.J., Chang S.C. & Chen P.J. (2004). Evaluation of antibody responses against SARS coronaviral nucleocapsid or spike proteins by immunoblotting or ELISA. *J Med Vir* 73:338-346.

- Huang Y., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. & Yuen K.-Y. (2008). CoVDB: a comprehensive database for comparative analysis of coronavirus genes and genomes. *Nucl Acids Res* 36:D504-511.
- Hui D. and Chan P.K.S. (2008). Clinical features, pathogenesis and immunobiology of severe acute respiratory syndrome. *Curr Opin Pulm Med* 14:241-247.
- Ito N., Mossel E.C., Narayanan K., Popov V.L., Huang C., Inoue T., Peters C.J. & Makino S. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *J Virol* 79:3182-3186.
- Kahn J.S. (2006). The widening scope of coronaviruses. *Curr Opin Pediatr* 18:42-47.
- Kahn J.S. and McIntosh K. (2005). History and recent advances in coronavirus discovery. *J Pediatr Infect Dis* 24:S223-227.
- Kaiser L., Regamey N., Roiha H., Deffernez C. & Frey U. (2005). Human coronavirus NL63 associated with lower respiratory tract symptoms in early life. *Pediatr Infect Dis J* 24:1015-1017.
- Kam Y., Kien F., Roberts A., Cheung Y., Lamirande E., Vogel L., Chu S., Tse J., Guarner J., Zaki S., Subbarao K., Peiris M., Nal B. & Altmeyer R. (2007). Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγRII-dependent entry into B cells in vitro. *Vaccine* 25:729-740.
- Kang X., Xu Y., Wu X., Liang Y., Wang C., Guo J., Wang Y., Chen M., Wu D., Wang Y., Bi S., Qiu Y., Lu P., Cheng J., Xiao B., Hu L., Gao X., Liu J., Wang Y., Song Y., Zhang L., Suo F., Chen T., Huang Z., Zhao Y., Lu H., Pan C. & Tang H. (2005). Proteomic fingerprints for potential application to early diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem* 51:56-64.
- Kaye H.S., Marsh H.B. & Dowdle W.R. (1971). Seroepidemiologic survey of coronavirus (strain OC 43) related infections in a children's population. *Am J Epidemiol* 94:43-49.
- Kendall E.J., Bynoe M.L. & Tyrrell D.A. (1962). Virus isolations from common colds occurring in a residential school. *Br Med J* 5297:82-86.
- Keyaerts E., Vijgen L. & Van Ranst M. (2007). Current status of antiviral severe acute respiratory syndrome research. In: *Coronaviruses*, Thiel V. (Hrsg.), S. 321-346. Caister Academic Press, Norfolk.
- Kim O.J., Lee D.H. & Lee C.H. (2006). Close relationship between SARS-coronavirus and group 2 coronavirus. *J Microbiol* 44:83-91.
- Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Peret T., Emery S., Tong S., Urbani C., Comer J.A., Lim W., Rollin P.E., Dowell S.F., Ling A.-E., Humphrey C.D., Shieh W.-J., Guarner J., Paddock C.D., Rota P., Fields B., DeRisi J., Yang J.-Y., Cox N., Hughes J.M., LeDuc J.W., Bellini W.J. & Anderson L.J.

- (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348:1953-1966.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lai M.M.C., Perlman S. & Anderson L.J. (2007). Coronaviridae. In: *Fields Virology*, Vol. 1; Fields B.N., Knipe D.M. & Howley P.M. (Hrsg.), S. 1305-1336. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Larson H.E., Reed S.E. & Tyrrell D.A. (1980). Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults. *J Med Virol* 5:221-229.
- Lau S.K.P., Woo P.C.Y., Yip C.C.Y., Tse H., Tsoi H.W., Cheng V.C.C., Lee P., Tang B.S.F., Cheung C.H.Y., Lee R.A., So L.Y., Lau Y.L., Chan K.H. & Yuen K.Y. (2006). Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 44:2063-2071.
- Lee N., Chan P.K.S., Ip M., Wong E., Ho J., Ho C., Cockram C.S. & Hui D.S. (2006). Anti-SARS-CoV IgG response in relation to disease severity of severe acute respiratory syndrome. *J Clin Virol* 35:179-184.
- Leung D.T.M., Tam F.C.H., Ma C.H., Chan P.K.S., Cheung J.L.K., Niu H., Tam J.S.L. & Lim P.L. (2004). Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. *J Infect Dis* 190:379-386.
- Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H. & Farzan M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:450-454.
- Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., Wang H., Crameri G., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B.T., Zhang S. & Wang L.F. (2005a). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310:676-679.
- Li Y.H., Li J., Liu X.E., Wang L., Li T., Zhou Y.H. & Zhuang H. (2005b). Detection of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus in serum: comparison with results of other viral markers. *J Virol Methods* 130:45-50.
- Liang G., Chen Q., Xu J., Liu Y., Lim W., Peiris J., Anderson L., Ruan L., Li H., Kan B., Di B., Cheng P., Chan K., Erdman D., Gu S., Yan X., Liang W., Zhou D., Haynes L., Duan S., Zhang X., Zheng H., Gao Y., Tong S., Li D., Fang L., Qin P. & Xu W. (2004). Laboratory diagnosis of four recent sporadic cases of community-acquired SARS, Guangdong Province, China. *Emerg Infect Dis* 10:1774-1781.
- Liang Y., Wan Y., Qiu L.w., Zhou J., Ni B., Guo B., Zou Q., Zou L., Zhou W., Jia Z., Che X.y. & Wu Y. (2005). Comprehensive antibody epitope mapping of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS)

- coronavirus: insight into the humoral immunity of SARS. *Clin Chem* 51:1382-1396.
- Libraty D.H., O'Neil K.M., Baker L.M., Acosta L.P. & Olveda R.M. (2007). Human CD4(+) memory T-lymphocyte responses to SARS coronavirus infection. *Virology* 368:317-321.
- Lindner P. (2000). In Vitro Charakterisierung der Promotor-Bindung von zwei essentiellen Transkriptionsfaktoren bei *Pyrodictium occultum*. *Dissertation (Dr. rer. nat.)*. Naturwissenschaftliche Fakultät III, Universität Regensburg.
- Lo A.W., Tang N.L. & To K.F. (2006). How the SARS coronavirus causes disease: host or organism? *J Pathol* 208:142-151.
- Lord A., Bailey A.S., Klapper P.E., Snowden N. & Khoo S.H. (2000). Impaired humoral responses to subgenus D adenovirus infections in HIV-positive patients. *J Med Virol* 62:405-409.
- Maache M., Komurian-Pradel F., Rajoharison A., Perret M., Berland J.L., Pouzol S., Bagnaud A., Duverger B., Xu J., Osuna A. & Paranhos-Baccala G. (2006). False-positive results in a recombinant severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid-based western blot assay were rectified by the use of two subunits (S1 and S2) of spike for detection of Antibody to SARS-CoV. *Clin Vaccine Immunol* 13:409-414.
- MacNaughton M.R. and Davie H.A. (1981). Human enteric coronaviruses: a brief review. *Arch Virol* 70:301-313.
- Marra M.A., Jones S.J.M., Astell C.R., Holt R.A., Brooks-Wilson A., Butterfield Y.S.N., Khattra J., Asano J.K., Barber S.A., Chan S.Y., Cloutier A., Coughlin S.M., Freeman D., Girn N., Griffith O.L., Leach S.R., Mayo M., McDonald H., Montgomery S.B., Pandoh P.K., Petrescu A.S., Robertson A.G., Schein J.E., Siddiqui A., Smailus D.E., Stott J.M., Yang G.S., Plummer F., Andonov A., Artsob H., Bastien N., Bernard K., Booth T.F., Bowness D., Czub M., Drebot M., Fernando L., Flick R., Garbutt M., Gray M., Grolla A., Jones S., Feldmann H., Meyers A., Kabani A., Li Y., Normand S., Stroher U., Tipples G.A., Tyler S., Vogrig R., Ward D., Watson B., Brunham R.C., Kraiden M., Petric M., Skowronski D.M., Upton C. & Roper R.L. (2003). The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300:1399-1404.
- McIntosh K., Dees J.H., Becker W.B., Kapikian A.Z. & Chanock R.M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci* 57:933-940.
- McIntosh K., Kapikian A.Z., Turner H.C., Hartley J.W., Parrott R.H. & Chanock R.M. (1970). Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am J Epidemiol* 91:585-592.
- Moes E., Vijgen L., Keyaerts E., Zlateva K., Li S., Maes P., Pyrc K., Berkhout B., van der Hoek L. & Van Ranst M. (2005). A novel pancoronavirus RT-PCR assay:

- frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect Dis* 5:6.
- Mourez T., Vabret A., Han Y., Dina J., Legrand L., Corbet S. & Freymuth F. (2007). Baculovirus expression of HCoV-OC43 nucleocapsid protein and development of a western blot assay for detection of human antibodies against HCoV-OC43. *J Virol Met* 139:175-180.
- Ng M.H.L., Lau K.-M., Li L., Cheng S.-H., Chan W.Y., Hui P.K., Zee B., Leung C.-B. & Sung J.J.Y. (2004). Association of humanleukocyte-antigen class I (B*0703) and class II (DRB1*0301) genotypes with susceptibility and resistance to the development of severe acute respiratory syndrome. *J Infect Dis* 190:515-518.
- Nicholls J.M. and Peiris J.S.M. (2007). SARS coronavirus: pathogenesis and correlation with clinical disease. In: *Coronaviruses*, Thiel V. (Hrsg.), S. 225-238. Caister Academic Press, Norfolk.
- Normile D. (2005). Virology: researchers tie deadly SARS virus to bats. *Science* 309:2154-2155.
- Osiowy C., Horne D. & Anderson R. (1994). Antibody-dependent enhancement of respiratory syncytial virus infection by sera from young infants. *Clin Diagn Lab Immunol* 1:670-677.
- Ott P.A., Berner B.R., Herzog B.A., Guerkov R., Yonkers N.L., Durinovic-Bello I., Tary-Lehmann M., Lehmann P.V. & Anthony D.D. (2004). CD28 costimulation enhances the sensitivity of the ELISPOT assay for detection of antigen-specific memory effector CD4 and CD8 cell populations in human diseases. *J Immunol Methods* 285:223-235.
- Peiris J.S.M., Guan Y. & Yuen K.Y. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med* 10:88-97.
- Peiris J.S.M., Lai S.T., Poon L.L.M., Guan Y., Yam L.Y.C., Lim W., Nicholls J., Yee W.K.S., Yan W.W., Cheung M.T., Cheng V.C.C., Chan K.H., Tsang D.N.C., Yung R.W.H., Ng T.K. & Yuen K.Y. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361:1319-1325.
- Peng H., Yang L., Li J., Lu Z., Wang L., Koup R., Bailer R. & Wu C. (2006a). Human memory T cell responses to SARS-CoV E protein. *Microbes Infect* 8:2424-2431.
- Peng H., Yang L., Wang L., Li J., Huang J., Lu Z., Koup R., Bailer R. & Wu C. (2006b). Long-lived memory T lymphocyte responses against SARS coronavirus nucleocapsid protein in SARS-recovered patients. *Virology* 351:466-475.
- Pfreppep K.I., Enders M. & Motz M. (2005). Human parvovirus B19 serology and avidity using a combination of recombinant antigens enables a differentiated picture of the current state of infection. *J Vet Med B* 52:362-365.

- Pitkäranta A., Jero J., Arruda E., Virolainen A. & Hayden F. (1998). Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion. *J Pediatr* 133:390-394.
- Pohl-Koppe A., Raabe T., Siddell S.G. & ter Meulen V. (1995). Detection of human coronavirus 229E-specific antibodies using recombinant fusion proteins. *J Virol Methods* 55:175-183.
- Poutanen S.M. and Low D.E. (2004). Severe acute respiratory syndrome: an update. *Curr Opin Infect Dis* 17:287-294.
- Pyrc K., Berkhout B. & van der Hoek L. (2007a). Antiviral strategies against human coronaviruses. *Infect Disord Drug Targets* 7:59-66.
- Pyrc K., Berkhout B. & van der Hoek L. (2007b). Identification of new human coronaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5:245-253.
- Pyrc K., Berkhout B. & van der Hoek L. (2007c). The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol* 81:3051-3057.
- Qu X.X., Hao P., Song X.J., Jiang S.M., Liu Y.X., Wang P.G., Rao X., Song H.D., Wang S.Y., Zuo Y., Zheng A.H., Luo M., Wang H.L., Deng F., Wang H.Z., Hu Z.H., Ding M.X., Zhao G.P. & Deng H.K. (2005). Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. *J Biol Chem* 280:29588-29595.
- Reed S.E. (1984). The behaviour of recent isolates of human respiratory coronavirus in vitro and in volunteers: evidence of heterogeneity among 229E-related strains. *J Med Virol* 13:179-192.
- Robertson P., Beynon S., Whybin R., Brennan C., Vollmer-Conna U., Hickie I. & Lloyd A. (2003). Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. *J Med Virol* 70:617-623.
- Rockx B. and Baric R.S. (2007). Grand challenges in human coronavirus vaccine development. In: *Coronaviruses*, Thiel V. (Hrsg.), S. 257-287. Caister Academic Press, Norfolk.
- Rota P.A., Oberste M.S., Monroe S.S., Nix W.A., Campagnoli R., Icenogle J.P., Penaranda S., Bankamp B., Maher K., Chen M.h., Tong S., Tamin A., Lowe L., Frace M., DeRisi J.L., Chen Q., Wang D., Erdman D.D., Peret T.C.T., Burns C., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Sanchez A., Liffick S., Holloway B., Limor J., McCaustland K., Olsen-Rasmussen M., Fouchier R., Gunther S., Osterhaus A.D.M.E., Drosten C., Pallansch M.A., Anderson L.J. & Bellini W.J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300:1394-1399.
- Rowley A.H., Baker S.C., Orenstein J.M. & Shulman S.T. (2008). Searching for the cause of Kawasaki disease - cytoplasmic inclusion bodies provide new insight. *Nat Rev Micro* 6:394-401.

- Rowley A.H. and Shulman S.T. (2007). New developments in the search for the etiologic agent of Kawasaki disease. *Curr Opin Pediatr* 19:71-74.
- Shao X., Guo X., Esper F., Weibel C. & Kahn J.S. (2007). Seroepidemiology of group I human coronaviruses in children. *J Clin Virol* 40:207-213.
- Shi Z. and Hu Z. (2008). A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res* 133:74-78.
- Shimizu C., Shike H., Baker S.C., Garcia F., Hoek L.v.d., Kuijpers T.W., Reed S.L., Rowley A.H., Shulman S.T., Talbot H.K.B., Williams J.V. & Burns J.C. (2005). Human coronavirus NL63 is not detected in the respiratory tracts of children with acute Kawasaki Disease. *J Clin Infect Dis* 192:1767-1771.
- Sizun J., Arbour N. & Talbot P.J. (1998). Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronaviruses 229E and OC43 in cell culture. *J Virol Methods* 72:145-152.
- Sloots T.P., McErlean P., Speicher D.J., Arden K.E., Nissen M.D. & Mackay I.M. (2006). Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol* 35:99-102.
- Spencer J.S., Cabirac G.F., Best C., McLaughlin L. & Murray R.S. (1995). Characterization of human T cell clones specific for coronavirus 229E. *Adv Exp Med Biol* 380:121-129.
- Stephensen C.B., Casebolt D.B. & Gangopadhyay N.N. (1999). Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res* 60:181-189.
- Stockman L., Massoudi M., Helfand R., Erdman D., Siwek A., Anderson L. & Parashar U. (2007). Severe acute respiratory syndrome in children. *Pediatr Infect Dis J* 26:68-74.
- Tan Y.-J., Lim S.G. & Hong W. (2005). Characterization of viral proteins encoded by the SARS-coronavirus genome. *Antivir Res* 65:69-78.
- Tan Y.J., Goh P.Y., Fielding B.C., Shen S., Chou C.F., Fu J.L., Leong H.N., Leo Y.S., Ooi E.E., Ling A.E., Lim S.G. & Hong W. (2004). Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers. *Clin Vac Immunol* 11:362-371.
- Tang Q., Li B., Woodle M. & Lu P.Y. (2008). Application of siRNA against SARS in the rhesus macaque model. *Methods Mol Biol* 442:139-158.
- Temperton N., Chan P., Simmons G., Zambon M., Tedder R., Takeuchi Y. & Weiss R. (2005). Longitudinally profiling neutralizing antibody response to SARS coronavirus with pseudotypes. *Emerg Infect Dis* 11:411-416.

- Thomas S., Redfern J.B., Lidbury B.A. & Mahalingam S. (2006). Antibody-dependent enhancement and vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 5:409-412.
- Timani K.A., Ye L., Ye L., Zhu Y., Wu Z. & Gong Z. (2004). Cloning, sequencing, expression, and purification of SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS. *J Clin Virol* 30:309-312.
- Tsao Y., Lin J., Jan J., Leng C., Chu C., Yang Y. & Chen S. (2006). HLA-A*0201 T-cell epitopes in severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid and spike proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 344:63-71.
- Turner R., Felton A., Kosak K., Kelsey D. & Meschievitz C. (1986). Prevention of experimental coronavirus colds with intranasal alpha-2b interferon. *J Infect Dis* 154:443-447.
- Tyrrell D.A. and Bynoe M.L. (1965). Cultivation of novel type common-cold virus in organ cultures. *Br Med J* 1:1467-1470.
- Vabret A., Dina J., Gouarin S., Petitjean J., Corbet S. & Freymuth F. (2006). Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin Infect Dis* 42:634-639.
- Vabret A., Dina J., Gouarin S., Petitjean J., Tripey V., Brouard J. & Freymuth F. (2008). Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. *J Paediatr Child Health* 44:176-181.
- van der Hoek L. (2007). Human coronaviruses: what do they cause? *Antivir Ther* 12:651-658.
- van der Hoek L. and Berkhout B. (2005). Questions concerning the New Haven Coronavirus. *J Infect Dis* 192:350-351.
- van der Hoek L., Pyrc K., Jebbink M.F., Vermeulen-Oost W., Berkhout R.J., Wolthers K.C., Wertheim-van Dillen P.M., Kaandorp J., Spaargaren J. & Berkhout B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 10:368-373.
- van der Hoek L., Sure K., Ihorst G., Stang A., Pyrc K., Jebbink M.F., Petersen G., Forster J., Berkhout B. & Uberla K. (2005). Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med* 2:e240.
- van Elden L.J.R., van Loon A.M., van Alphen F., Hendriksen K.A.W., Hoepelman A.I.M., van Kraaij M.G.J., Oosterheert J.J., Schipper P., Schuurman R. & Nijhuis M. (2004). Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 189:652-657.
- Vijgen L., Keyaerts E., Lemey P., Moes E., Li S., Vandamme A.M. & Van Ranst M. (2005). Circulation of genetically distinct contemporary human coronavirus OC43 strains. *Virology* 337:85-92.

- Vlasova A.N., Zhang X., Hasoksuz M., Nagesha H.S., Haynes L.M., Fang Y., Lu S. & Saif L.J. (2007). Two-way antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and group 1 animal CoVs is mediated through an antigenic site in the N-terminal region of the SARS-CoV nucleoprotein. *J Virol* 81:13365-13377.
- Waldrop S.L., Davis K.A., Maino V.C. & Picker L.J. (1998). Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J Immunol* 161:5284-5295.
- Wang J., Wen J., Li J., Yin J., Zhu Q., Wang H., Yang Y., Qin E.d., You B., Li W., Li X., Huang S., Yang R., Zhang X., Yang L., Zhang T., Yin Y., Cui X., Tang X., Wang L., He B., Ma L., Lei T., Zeng C., Fang J., Yu J., Wang J., Yang H., West M.B., Bhatnagar A., Lu Y., Xu N. & Liu S. (2003). Assessment of immunoreactive synthetic peptides from the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clin Chem* 49:1989-1996.
- Wang Y., Chang Z., Ouyang J., Wei H., Yang R., Chao Y., Qu J., Wang J. & Hung T. (2005). Profiles of IgG antibodies to nucleocapsid and spike proteins of the SARS-associated coronavirus in SARS patients. *DNA Cell Biol* 24:521-527.
- Weiss S.R. and Navas-Martin S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:635-664.
- Wentworth D.E. and Holmes K.V. (2007). Coronavirus binding and entry. In: *Coronaviruses*, Thiel V. (Hrsg.), S. 3-31. Caister Academic Press, Norfolk.
- WHO (2003). Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. Updated: 21.04.2004. http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html. Date accessed: 17.03.2008.
- Wilder-Smith A., Teleman M.D., Heng B.H., Earnest A., Ling A.E. & Leo Y.S. (2005). Asymptomatic SARS coronavirus infection among healthcare workers, Singapore. *Emerg Infect Dis* 11:1142-1145.
- Wong V., Dai D., Wu A. & Sung J. (2003). Treatment of severe acute respiratory syndrome with convalescent plasma. *Hong Kong Med J* 9:199-201.
- Woo P., Lau S., Tsoi H., Chan K., Wong B., Che X., Tam V., Tam S., Cheng V., Hung I., Wong S., Zheng B., Guan Y. & Yuen K. (2004a). Relative rates of non-pneumonic SARS coronavirus infection and SARS coronavirus pneumonia. *Lancet* 363:841-845.
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Chu C.M., Chan K.H., Tsoi H.W., Huang Y., Wong B.H.L., Poon R.W.S., Cai J.J., Luk W.K., Poon L.L.M., Wong S.S.Y., Guan Y., Peiris J.S.M. & Yuen K.Y. (2005a). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 79:884-895.

- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Tsoi H.w., Huang Y., Poon R.W.S., Chu C.m., Lee R.A., Luk W.k., Wong G.K.M., Wong B.H.L., Cheng V.C.C., Tang B.S.F., Wu A.K.L., Yung R.W.H., Chen H., Guan Y., Chan K.h. & Yuen K.y. (2005b). Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 192:1898-1907.
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Wong B.H.L., Chan K.h., Chu C.m., Tsoi H.w., Huang Y., Peiris J.S.M. & Yuen K.y. (2004b). Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. *Clin Vac Immunol* 11:665-668.
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Wong B.H.L., Tsoi H.W., Fung A.M.Y., Chan K.H., Tam V.K.P., Peiris J.S.M. & Yuen K.Y. (2004c). Detection of specific antibodies to severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. *J Clin Microbiol* 42:2306-2309.
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Yip C.C.Y., Huang Y., Tsoi H.W., Chan K.H. & Yuen K.Y. (2006). Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. *J Virol* 80:7136-7145.
- Xu F., Schillinger J., Sternberg M., Johnson R., Lee F., Nahmias A. & Markowitz L. (2002). Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988-1994. *J Infect Dis* 185:1019-1024.
- Yang L., Peng H., Zhu Z., Li G., Huang Z., Zhao Z., Koup R.A., Bailer R.T. & Wu C. (2007). Persistent memory CD4+ and CD8+ T-cell responses in recovered severe acute respiratory syndrome (SARS) patients to SARS coronavirus M antigen. *J Gen Virol* 88:2740-2748.
- Yang Z.y., Werner H.C., Kong W.p., Leung K., Traggiai E., Lanzavecchia A. & Nabel G.J. (2005). Evasion of antibody neutralization in emerging severe acute respiratory syndrome coronaviruses. *Proc Natl Acad Sci* 102:797-801.
- Yip T.T.C., Chan J.W.M., Cho W.C.S., Yip T.-T., Wang Z., Kwan T.-L., Law S.C.K., Tsang D.N.C., Chan J.K.C., Lee K.-C., Cheng W.-W., Ma V.W.S., Yip C., Lim C.K.P., Ngan R.K.C., Au J.S.K., Chan A. & Lim W.W.L. (2005). Protein chip array profiling analysis in patients with severe acute respiratory syndrome identified serum amyloid A protein as a biomarker potentially useful in monitoring the extent of pneumonia. *Clin Chem* 51:47-55.
- Yu F., Le M.Q., Inoue S., Hasebe F., Parquet M.d.C., Morikawa S. & Morita K. (2007). Recombinant truncated nucleocapsid protein as antigen in a novel immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Clin Vaccine Immunol* 14:146-149.
- Yu S., Qiu M., Chen Z., Ye X., Gao Y., Wei A., Wang X., Yang L., Wang J., Wen J., Song Y., Pei D., Dai E., Guo Z., Cao C., Wang J. & Yang R. (2005).

- Retrospective serological investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus antibodies in recruits from mainland China. *Clin Vac Immunol* 12:552-554.
- Yuan F., Tanner J., Chan P., Biffin S., Dyer W., Geczy A., Tang J., Hui D., Sung J. & Sullivan J. (2005). Influence of FcγRIIA and MBL polymorphisms on severe acute respiratory syndrome. *Tissue Antigens* 66:291-296.
- Zhang L., Zhang F., Yu W., He T., Yu J., Yi C.E., Ba L., Li W., Farzan M., Chen Z., Yuen K.-Y. & Ho D. (2006). Antibody responses against SARS coronavirus are correlated with disease outcome of infected individuals. *J Med Virol* 78:1-8.
- Zhao J., Huang Q., Wang W., Zhang Y., Lv P. & Gao X.-M. (2007a). Identification and characterization of dominant helper T-Cell epitopes in the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 81:6079-6088.
- Zhao J., Wang W., Wang W., Zhao Z., Zhang Y., Lv P., Ren F. & Gao X.-M. (2007b). Comparison of immunoglobulin G responses to the spike and nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus in patients with SARS. *Clin Vaccine Immunol* 14:839-846.
- Zhou M., Xu D., Li X., Li H., Shan M., Tang J., Wang M., Wang F.-S., Zhu X., Tao H., He W., Tien P. & Gao G.F. (2006). Screening and identification of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-specific CTL epitopes. *J Immunol* 177:2138-2145.
- Zhu H., Hu S., Jona G., Zhu X., Kreiswirth N., Willey B.M., Mazzulli T., Liu G., Song Q., Chen P., Cameron M., Tyler A., Wang J., Wen J., Chen W., Compton S. & Snyder M. (2006). Severe acute respiratory syndrome diagnostics using a coronavirus protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4011-4016.
- Zinkernagl R.M. (2005). Mechanismen und Typen von Immunantworten. In: *Medizinische Mikrobiologie*, Vol. 11; Kayser F.H. (Hrsg.), S. 75-121. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

VII. ANHANG

Klinische Daten zu den SARS-Patienten aus Toronto, Kanada

| Nr. | Ser | PC | Alt | Ges | Hus | Dur | Fie | Kw | O ₂ | O ₂ 5 | Inf | Infb | Ints | Ldh | Tbz | Lkz | Dau | SK | SF | SA | SH | Rib | Ster | Ant |
|--------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|----|----------------|------------------|-----|------|------|------|-----|------|-----|----|----|----|----|-----|------|-----|
| 03-001 | 1 | neg | 37 | m | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | | 86 | 3,7 | 19 | 5 | 0 | 4 | 4 | 1 | 1 | 1 |
| 03-004 | 1 | n.a. | 50 | f | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 236 | 4,56 | 24 | 0 | 0 | 8 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 03-007 | 1 | n.a. | 21 | f | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 222 | 172 | 4,09 | 13 | 4 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 03-012 | 1 | neg | 29 | m | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 178 | 116 | 4,47 | 13 | 4 | 3 | | 9 | 1 | 1 | 1 |
| 03-013 | 1 | n.a. | 24 | f | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1183 | 185 | 3,34 | 13 | 6 | 1 | | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 03-014 | 1 | pos | 50 | f | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 594 | 131 | 2,93 | 20 | 2 | 0 | | 7 | 1 | 1 | 0 |
| 03-015 | 1 | n.a. | 26 | f | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 219 | 168 | 3,23 | 13 | 9 | 0 | | 9 | 1 | 1 | 1 |
| 03-016 | 1 | n.a. | 51 | m | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 214 | 125 | 4,6 | 20 | 3 | 0 | 5 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 03-017 | 1 | pos | 48 | m | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 184 | 110 | 3,4 | 8 | 7 | 6 | | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 03-018 | 1 | pos | 35 | m | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 201 | 140 | 3,1 | 12 | 6 | 1 | 7 | 4 | 1 | 0 | 1 |
| 03-022 | 1 | pos | 36 | m | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 293 | 177 | 5,4 | 12 | 1 | 0 | | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 06-004 | 1 | pos | 66 | m | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | 8 | 7 | 0 | 4 | 10 | 1 | 0 | 1 |
| 07-001 | 1 | pos | 42 | m | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 670 | 176 | 2,6 | 14 | 7 | 0 | 7 | 7 | 1 | 0 | 1 |

1: ja, 2: nein, neg: negativ, n. a.: nicht verfügbar, pos: positiv, m: männlich, w: weiblich; Nr.: Ser: Serologie, PC: PCR-Assay, Alt: Alter in Jahren, Ges.: Geschlecht, Hus: unproduktiver Husten, Dur: Durchfall, Fie: Fieber, Kw: Kopfschmerzen, O₂: Patient benötigte Sauerstoff für mind. 24 h während Klinikaufenthalt, O₂5: Patient benötigte 50% Sauerstoff oder mehr für mind. 24 h während Klinikaufenthalt, Inf: Infiltrat (Röntgenbild), Infb: bilaterales Infiltrat, Ints: Intensivstation, Ldh: Laktatdehydrogenase [IU/l], Tbz: Thrombozyten, Lkz: Leukozyten [10⁹/l], Dau: Dauer des Klinikaufenthaltes, SK: Tage von Symptombeginn bis Klinikeinlieferung, SF: S.beg. bis Fieber, SA: S.beg. bis Atemnot, SH: S.beg bis Husten, Rib.: Ribavirinbehandlung, Ster: Steroidbehandlung, Ant: Antibiotikagabe; Die Patienten hatten keine Komorbiditäten und mussten nicht mechanisch beatmet werden.

Zytokin- Chemokinkonzentrationen bei SARS-Patienten aus Toronto, Kanada

| Nr. | TS | IFN-γ | IL2 | IL12P70 | TNF-α | IL8 | CXCL10 | CCL2 |
|----------------------------------|-----------|--------------------------------|------------|----------------|--------------------------------|------------|---------------|-------------|
| 03001 | 37 | 9,90 | ,00 | 30,90 | 7,20 | 551,90 | 1144,50 | 657,30 |
| 03004 | 2 | 74,90 | 3,20 | 92,50 | 18,70 | 80,60 | 1447,80 | 159,10 |
| 03004 | 11 | 33,90 | 3,40 | 49,00 | 9,80 | 31,40 | 840,80 | 124,70 |
| 03004 | 13 | 27,60 | 5,50 | 76,30 | 20,90 | 274,70 | 373,50 | 117,60 |
| 03004 | 15 | 25,70 | 5,30 | ,00 | 6,70 | ,00 | 394,60 | 138,80 |
| 03004 | 19 | 23,90 | 3,50 | 16,70 | 6,60 | 18,70 | 341,00 | 99,30 |
| 03004 | 23 | 16,90 | 3,10 | 17,30 | 63,00 | 4414,30 | 473,50 | 348,60 |
| 03004 | 25 | 10,50 | ,00 | 9,40 | 34,10 | 952,60 | 428,30 | 465,00 |
| 03007 | 11 | 28,40 | 6,30 | 7,70 | 8,80 | 253,00 | 1541,90 | 596,80 |
| 03007 | 13 | 26,00 | 5,90 | 11,40 | 13,30 | 10,80 | 544,60 | 583,50 |
| 03012 | 10 | 319,70 | 8,90 | 55,70 | 98,90 | 4854,60 | 5244,10 | 4758,10 |
| 03012 | 15 | 136,80 | 7,30 | 26,20 | 23,20 | 2931,20 | 526,90 | 184,90 |
| 03012 | 17 | 55,90 | 8,10 | 38,30 | 9,60 | 30,30 | 550,80 | 149,20 |
| 03013 | 12 | 30,10 | 7,00 | 39,60 | 12,50 | 32,90 | 302,20 | 180,40 |
| 03013 | 13 | 12,20 | 3,80 | 46,80 | 6,10 | 378,40 | 466,20 | 149,20 |
| 03013 | 15 | 20,00 | 5,80 | 47,20 | 8,00 | 132,80 | 338,90 | 273,00 |
| 03013 | 27 | 624,90 | 55,90 | 7,30 | ,00 | 16,50 | 305,00 | 237,00 |
| 03014 | 10 | 38,00 | 5,70 | ,00 | 3,20 | 239,40 | 591,00 | 468,70 |
| 03014 | 13 | 85,30 | 6,00 | 3,30 | 3,10 | 23,00 | 1397,50 | 384,70 |
| 03014 | 21 | 22,40 | 2,20 | 4,80 | ,00 | 709,60 | 581,60 | 325,20 |
| 03014 | 26 | 24,10 | 1,70 | 11,40 | ,00 | 116,50 | 517,00 | 429,50 |
| 03015 | 15 | 15,00 | 2,80 | 43,50 | 29,80 | 10,30 | 2645,30 | 255,90 |
| 03015 | 33 | ,00 | ,00 | 26,10 | 6,60 | 13,00 | 330,80 | 106,50 |
| 03018 | 60 | 1,20 | 1,70 | 161,40 | 15,10 | 29,90 | 150,70 | 185,60 |
| 03022 | 42 | 19,10 | ,00 | 6,10 | ,00 | 8,10 | 293,50 | 366,80 |
| Kontrolle gesunde Spender | | | | | | | | |
| 1 | f33y | 20,80 | 3,00 | 8,30 | 2,70 | 9,00 | 563,00 | 266,50 |
| 2 | m27y | 14,20 | 4,70 | 41,10 | 4,20 | 13,40 | 435,40 | 96,40 |
| 3 | m37y | 15,40 | 4,00 | 234,60 | 21,90 | 85,10 | 443,60 | 164,20 |
| 4 | f29y | 37,90 | 5,10 | 550,00 | 77,00 | 75,80 | 442,90 | 160,00 |
| 5 | m29y | 23,20 | 3,00 | 28,80 | 6,00 | 10,70 | 324,00 | 158,20 |
| 6 | m32y | 24,30 | 3,20 | 14,90 | 3,20 | 10,00 | 512,50 | 184,90 |
| 7 | f25y | 38,50 | 5,40 | 47,40 | 6,70 | 12,50 | 313,70 | 173,00 |
| 8 | f27y | 26,00 | 4,70 | 57,60 | 9,70 | 18,60 | 842,80 | 209,30 |
| 9 | m23y | 36,00 | 6,80 | 139,30 | 11,90 | 28,00 | 529,90 | 283,80 |
| 10 | f31y | 24,10 | 3,60 | 12,90 | 5,10 | 8,00 | 824,80 | 179,50 |

Alle Angaben in pg/ml Plasma; TS: Tage seit Krankheitsbeginn; f, female; m, male; y, years.

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ADE | <i>antibody-dependent enhancement</i> |
| Amp | Ampicillin |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| APZ | antigenpräsentierende Zelle |
| ARDS | akutes Atemnotsyndrom (<i>acute respiratory distress syndrome</i>) |
| AS | Aminosäure |
| BCoV | Rinder Coronavirus (<i>bovine coronavirus</i>) |
| BCIP | 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat p-Toluidin |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CA | Kalifornien |
| ca. | circa |
| Cam | Chloramphenicol |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CDC | <i>centers for disease control and prevention</i> |
| CPE | zytopathischer Effekt |
| CTL | zytotoxischer T-Lymphozyt |
| °C | Grad Celsius |
| d. h. | das heißt |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DKFZ | Deutsches Krebsforschungszentrum |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>) |
| E | kleines Hüllprotein (<i>Envelope</i>) |
| ECACC | Europäische Zellkultursammlung (<i>European Collection of Cell Cultures</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EIA | Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunoassay</i>) |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ELISPOT | <i>enzyme linked immunospot assay</i> |
| FIPV | Virus der infektiösen Peritonitis bei Katzen (<i>feline infectious peritonitis virus</i>) |
| FKS | fötales Kälberserum |
| g | 1. Gramm 2. Erdschwerebeschleunigung |
| Geschl. | Geschlecht |
| GFC | Gelfiltrationssäule (<i>gel filtration column</i>) |
| h | Stunde |
| HCoV | humanes Coronavirus |
| HE | Hämagglutinin Esterase |
| HLA | Humanes Leukozyten Antigen |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| HSV | Herpes-simplex-Virus |
| IBV | Virus der infektiösen Bronchitis bei Vögeln (<i>infectious bronchitis virus</i>) |
| IDA | Iminodiessigsäure |

| | |
|-------------|--|
| IEx | <i>ion-exchange-chromatography</i> |
| IFA | Immunfluoreszenz Assay |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IU | internationale Einheiten (<i>international units</i>) |
| J. | Jahre |
| kD | Kilodalton |
| lat. | lateinisch |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| LRTI | Infektion der unteren Atemwege (<i>lower respiratory tract infection</i>) |
| M | 1. Membranprotein(<i>Membrane</i>) 2. molar |
| m | männlich |
| m.o.i. | zahlenmäßiges Verhältnis Viren/Zellen bei Infektion in Zellkultur (<i>multiplicity of infection</i>) |
| mA | Milliampere |
| md | mild |
| MHV | Mäuse Hepatitis Virus (<i>mouse hepatitis virus</i>) |
| min | Minute(n) |
| ml | Mililiter |
| M-MLV | <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> |
| MRC-5 | humane embryonale Lungenfibroblasten (<i>medical research council 5</i>) |
| mRNA | Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>) |
| MS | multiple Sklerose |
| MWCO | <i>molecular weight cut-off</i> |
| μ | mikro- (10^{-6}) |
| n | nano- (10^{-9}) |
| N | Nukleokapsid Protein (<i>Nucleocapsid</i>) |
| n.v. | nicht verfügbar |
| NBT | Nitro-blau Tetrazoliumchlorid |
| NEB | <i>New England Biolabs</i> |
| Nr. | Nummer |
| nt | Nukleotid(e) |
| NTA | Nitrilotriessigsäure |
| OD | optische Dichte |
| ORF | offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>) |
| p | piko- (10^{-12}) |
| p.a. | <i>pro anaylsi</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| Pat. | Patient |
| PBMCs | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | Mit Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| pers. Komm. | persönliche Kommunikation |
| PMA | Phorbol-Myristat-Acetat |
| Pos. | Positive |
| rekon | rekonvaleszent |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |

| | |
|-----------------------|--|
| rpm | Rotationen pro Minute |
| RSV | respiratorisches Syncytialvirus |
| RT | 1. reverse Transkriptase 2. Raumtemperatur |
| S | Oberflächenglykoprotein (<i>Spike</i>) |
| S. | Seite |
| S.beg. | Symptombeginn |
| SARS | Schweres akutes Atemwegssyndrom (<i>severe acute respiratory syndrome</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulphate</i>) |
| sec | Sekunde(n) |
| SELDI-TOF | <i>surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight</i> |
| SFC | <i>spot forming cells</i> |
| sr | schwer |
| T. | Tage |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | Mit Tris gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>) |
| TCoV | Truthahn Coronavirus (<i>turkey coronavirus</i>) |
| TEMED | Tetramethyldiamin |
| TGEV | Virus der übertragbaren Gastroenteritis bei Schweinen (<i>transmissible gastroenteritis virus</i>) |
| T _H -Zelle | T-Helferzelle |
| tRNA | Transfer RNA |
| TZM | T-Zell Medium |
| u. a. | unter anderem |
| ün | über Nacht |
| URTI | Infektion der oberen Atemwege (<i>upper respiratory tract infection</i>) |
| USA | <i>United States of America</i> |
| V | Volt |
| v/v | <i>volume/volume</i> |
| VA | Virginia |
| vgl. | vergleiche |
| w | weiblich |
| w/v | <i>weight/volume</i> |
| WB | <i>western blotting</i> |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organization</i>) |
| z. B. | zum Beispiel |

IX. PUBLIKATIONEN

Artikel in Fachzeitschriften:

Lehmann C., Wolf H., Xu J., Zhao Q., Shao Y., Motz M. & Lindner P. (2008). A line immunoassay utilizing recombinant nucleocapsid proteins for detection of antibodies to human coronaviruses. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61:40-48.

Posterbeiträge bei Fachtagungen:

Lehmann C., Wolf, H., Motz M. & Lindner P. (2008). A highly specific HCoV-Line-Immunoassay: Inhibition of potential cross-reactions. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Heidelberg, 05. – 08. März 2008.*

Lehmann C., Wolf H., Xu J., Zhao Q., Shao Y., Motz M. & Lindner P. (2007). A line immunoassay utilizing recombinant nucleocapsid proteins for detection of antibodies to human coronaviruses. *3. Europäischer Kongress für Virologie (GfV, ESCV), Nürnberg, 01. – 05. September 2007.*

X. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Hans Wolf** für die Aufnahme an seinem Lehrstuhl und die Möglichkeit, diese Dissertation dort durchführen zu können. Sein stetes Interesse an meiner Arbeit und seine Hilfe bei der Planung der Auslandsaufenthalte waren eine große Motivation für mich.

Herrn **Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer** danke ich für die unbürokratische Übernahme des Erstgutachtens, wodurch diese „externe“ Arbeit erst möglich wurde.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Dr. Petra Lindner** für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Die lockere Atmosphäre und der große Gestaltungsfreiraum in ihrer Arbeitsgruppe waren gleichermaßen Inspiration und Ansporn für mich.

Für eben dieses hervorragende Arbeitsklima gilt mein Dank auch **Karin Stadtherr, Ramona Molz, Elke Perthen** und **Christian Gerdas**, der mir stets eine große Hilfe und in Sachen Proteinreinigung für meine Arbeit unverzichtbar war.

Ich danke **Dr. Christina Paulus, PD Dr. Michael Nevels** und **PD Dr. Ludwig Deml** für ihr offenes Ohr bei wissenschaftlichen Problemen aller Art und ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Bei **Dominik Altmann** und **Dr. Sascha Barabas** möchte ich mich für die Unterstützung bei den T-Zell-Experimenten bedanken.

PD Dr. Hans Helmut Niller war stets bereit, die nötigen Blutentnahmen für meine Versuche vorzunehmen. Vielen Dank dafür.

Dr. Stephan Gerling (Krankenhaus Barmherzige Brüder) danke ich für die inspirierende Zusammenarbeit und die Überlassung der „Kawasaki-Seren“.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Yiming Shao** (China CDC, Peking, China) für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und **Quanbi Zhao**, der durch sein Engagement meinen Aufenthalt in Peking zu einem unvergesslichen Erlebnis werden ließ.

Ebenso danke ich **Dr. Donald Low, Dr. Steven Drews, Dr. Mark Cameron, Dr. Matthew Muller** und **Dr. Barbara Willey** (Mt. Sinai Hospital, Toronto, Kanada) für die unkomplizierte Bereitstellung von SARS-Seren, die komplizierte Beschaffung der Patientendaten und die Möglichkeit, in ihren Labors forschen zu dürfen.

Durch die finanzielle Unterstützung des **Boehringer Ingelheim Fonds** sind diese Forschungsaufenthalte im Ausland erst möglich geworden.

Dr. Lia van der Hoek, Dr. Astrid Vabret, Dr. Robert Couch, Dr. Elena Samoilovich und **Dr. Markus Eickmann** danke ich für die Überlassung von viraler RNA und Serumproben.

Meiner **Familie** und **Freunden**, allen voran aber meiner **Sonja** danke ich für die andauernde Unterstützung, Hilfe und Motivation. Ohne Euch hätte ich diese Arbeit nicht zustande gebracht.