

- [Einloggen](#)
- [Meine Alarme](#)
- [Mein Warenkorb](#)



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Journal of
Virology

Suche nach diesem Schlüsselwort

[Erweiterte Suche](#)

- [Startseite](#)
- [Artikel](#)
- [Für Autoren](#)
- [Über das Journal](#)
- [Abonnieren](#)

Pathogenese und Immunität

Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike-Antikörper lösen die Infektion humaner Immunzellen über einen pH- und Cysteinprotease-unabhängigen FcγR-Weg aus

Martial Jaume, Ming S. Yip, Chung Y. Cheung, Hiu L. Leung, Ping H. Li, Francois Kien, Isabelle Dutry, Benoît Callendret, Nicolas Escriou, Ralf Altmeyer, Beatrice Nal, Marc Daëron, Roberto Bruzzone, J. S. Malik Peiris

DOI: 10.1128/JVI.00671-11

- [Artikel](#)
- [Zahlen & Daten](#)
- [Infos & Metriken](#)
- [PDF](#)

ABSTRACT

Durch Maßnahmen der öffentlichen Gesundheit konnten Ausbrüche der Infektion mit dem schweren akuten respiratorischen Syndrom-Coronavirus (SARS-CoV) erfolgreich eingedämmt werden. Der Vorläufer des SARS-CoV verbleibt jedoch in seinem natürlichen Fledermaus-Reservoir, und das Wiederauftreten eines an den Menschen angepassten SARS-ähnlichen Coronavirus bleibt ein plausibles Problem für die öffentliche Gesundheit. Die Impfung ist eine wichtige Strategie, um das Wiederauftreten von SARS beim Menschen einzudämmen, und eine Reihe von Impfstoffkandidaten wurde in experimentellen Tiermodellen getestet. Wir haben bereits berichtet, dass ein SARS-CoV-Impfstoffkandidat, der auf rekombinanten Spike-Protein-Trimeren in voller Länge basiert, die Infektion menschlicher B-Zelllinien potenziert, obwohl er *in vivo* eine neutralisierende und schützende Immunantwort bei Nagern hervorruft. Diese Beobachtungen veranlassten uns, die Mechanismen zu untersuchen, die der Antikörper-abhängigen Verstärkung (ADE) der SARS-CoV-Infektion *in vitro* zugrunde liegen. Wir zeigen hier, dass Anti-Spike-Immenserum, während es den viralen Eintritt in eine permissive Zelllinie hemmt, die Infektion von Immunzellen durch SARS-CoV Spike-pseudotypisierte lentivirale Partikel sowie replikationskompetente SARS-Coronaviren potenziert. Die Antikörper-vermittelte Infektion war abhängig vom Fcγ-Rezeptor II, nutzte aber nicht den endosomalen/lysosomalen Weg, der von Angiotensin I Converting Enzyme 2 (ACE2), dem akzeptierten Rezeptor für SARS-CoV, genutzt wird. Dies deutet darauf hin, dass ADE von SARS-CoV einen neuartigen Zelleintrittsmechanismus in Immunzellen nutzt. Verschiedene SARS-Impfstoffkandidaten lösen Seren aus, die sich in ihrer Fähigkeit, ADE in Immunzellen zu induzieren, unterscheiden, trotz ihrer vergleichbaren Potenz, die Infektion in ACE2-tragenden Zellen zu neutralisieren. Unsere Ergebnisse deuten auf einen neuartigen Mechanismus hin, über den SARS-CoV in Zielzellen eindringen kann, und verdeutlichen die potenziellen Fallstricke, die mit einer Immunisierung gegen das Virus verbunden sind. Diese Befunde sollten Anlass für weitere Untersuchungen zur Pathogenese von SARS sein.

EINLEITUNG

Obwohl die Maßnahmen der öffentlichen Gesundheit die Ausbrüche der Infektion mit dem schweren akuten respiratorischen Syndrom-Coronavirus (SARS-CoV), einer Krankheit mit einer Sterblichkeitsrate von 10 % ([13](#), [32](#)), [beim](#) Menschen erfolgreich eingedämmt haben, bleibt das SARS-CoV-ähnliche Vorläufervirus in seinem natürlichen Fledermaus-Reservoir endemisch ([34](#)), und das zukünftige Wiederauftreten einer SARS-ähnlichen Krankheit bleibt eine glaubwürdige Bedrohung der öffentlichen Gesundheit. Daher wurden die Bemühungen fortgesetzt, sichere Impfstoffstrategien gegen SARS-CoV zu entwickeln.

Neutralisierende Antikörper werden bei Patienten, die sich von SARS erholen, hervorgerufen und Studien an experimentellen Tiermodellen haben gezeigt, dass Antikörper eine Infektion durch SARS-CoV verhindern können ([6](#)). Unter den vier wichtigsten strukturellen SARS-CoV-Proteinen wurde das Spike-Hüllenglykoprotein (S) als das wichtigste Antigen identifiziert, das neutralisierende und schützende Antikörper induziert ([1](#), [3](#), [72](#)). Darüber hinaus wurde

gezeigt, dass die Bindung von Spike an seinen Rezeptor Angiotensin I Converting Enzyme 2 (ACE2) ein Schlüsselereignis für den Eintritt von SARS-CoV in Zellen ist (40).

Mehrere Impfstoffstrategien, die darauf abzielen, eine Infektion durch SARS-CoV zu verhindern, zielen daher auf das Spike-Glykoprotein (14, 15). Eine solche Strategie ist jedoch bedenklich, da frühere Versuche der Impfung gegen Coronaviren zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Ein Immunschutz gegen tierische Coronaviren, wie z. B. Maushepatitis- und transmissible Gastroenteritis-Viren (11, 46), kann durch Immunisierung mit Spike-Glykoprotein induziert werden. Andererseits führte dieser Impfstoffansatz bei der feline Coronavirus (FCoV)-Infektion aufgrund der Induktion von infektionsverstärkenden Antikörpern zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs (8, 25, 44, 65). Es ist seit langem bekannt, dass immunvermittelte Infektionen und insbesondere das Antikörper-abhängige Enhancement (ADE) von einer Vielzahl von Viren, wie z. B. dem Dengue-Virus, HIV und FCoV, als alternativer Weg zur Infektion von Wirtszellen genutzt werden (59, 60). Zusätzlich zur Interaktion zwischen Virusprotein und Wirtsrezeptoren können diese Viren durch die Bindung von Virus/Antikörper-Immunkomplexen an Fc-Rezeptoren (FcR) oder Komplementrezeptoren oder alternativ durch die Induktion einer Konformationsänderung in Hüllglykoproteinen, die für die Virus-Zellmembran-Fusion erforderlich sind, in Zellen eindringen (59, 60). So führte die Immunisierung von Katzen mit rekombinanten Vacciniavirus-Präparationen, die das FCoV-Spike-Protein exprimieren, zur Induktion von Spike-spezifischen Antikörpern, die für eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Challenge-Infektion verantwortlich sind (65). Die verstärkte Infektion von Makrophagen nach Antikörper-vermitteltem Eintritt des FCoV ist verantwortlich für das Auftreten der schweren Erkrankung feline infektiöse Peritonitis (8, 25, 44).

Wir haben bereits berichtet, dass ein SARS-CoV-Impfstoffkandidat, der auf rekombinanten SARS-CoV-Spike-Protein-Trimeren in voller Länge basiert, eine Infektion menschlicher B-Zelllinien auslöst, obwohl er *in vivo* eine neutralisierende und schützende Immunantwort bei Nagern hervorruft (30). Diese Beobachtungen veranlassten uns, die molekularen und zellulären Mechanismen, die der ADE einer SARS-CoV-Infektion zugrunde liegen, *in vitro* weiter zu untersuchen.

Durch die Überwachung der Anfälligkeit von Immunzelllinien mit unterschiedlichen Mustern der Fcγ-Rezeptor (FcγR)-Expression haben wir die vorherrschende Rolle des humanen FcγRII (CD32) bei der Vermittlung von ADE von SARS-CoV nachgewiesen. Darüber hinaus haben wir den Nachweis erbracht, dass die ADE-Wege im Gegensatz zur ACE2-vermittelten Infektion unabhängig vom endosomalen oder lysosomalen pH-Wert sind und nur minimal von den Aktivitäten der Cysteinproteasen beeinflusst werden. Schließlich haben wir deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen SARS-Impfstoffen in ihrer Fähigkeit gefunden, eine humorale Immunantwort hervorzurufen, die eine Infektion durch SARS-CoV *in vitro* neutralisiert oder erleichtert, eine Beobachtung, die weitere Studien zur Entwicklung sicherer Immunisierungsprotokolle veranlassen sollte.

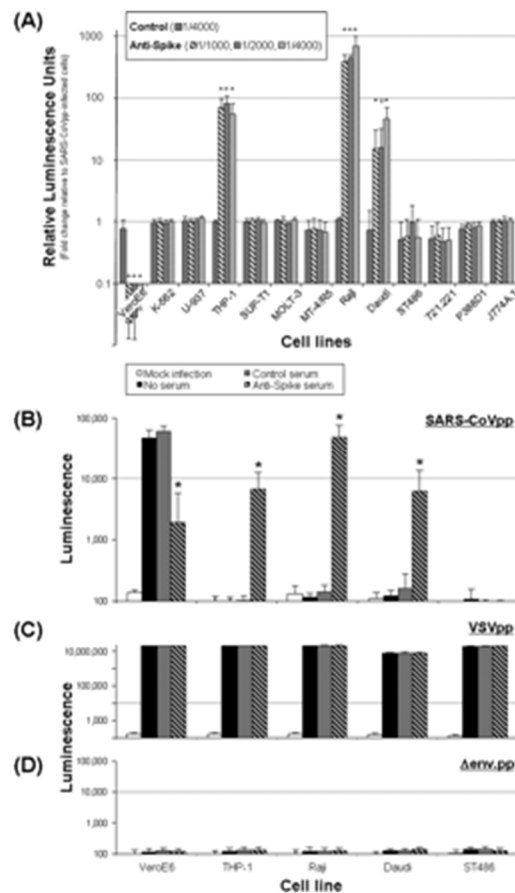
MATERIALIEN UND METHODEN

Zelllinien. Die folgenden Zelllinien wurden in der vorliegenden Studie verwendet: VeroE6 (Epithelzellen der afrikanischen grünen Affenniere), K-562 (humane chronische myeloische Leukämiezellen), U-937 (humane histiozytäre Lymphomzellen), THP-1 (humane akute monozytäre Leukämiezellen), SUP-T1 (humaner lymphoblastischer Leukämie/T-Lymphoblast), MOLT-3 (humane akute lymphoblastische Leukämie/T-Lymphoblasten), MT4/R5 (humane T-Zell-Lymphoblasten, die CCR5 exprimieren), Raji (Burkitt-Lymphom/B-Lymphoblasten), Daudi (Burkitt-Lymphom/B-Lymphoblasten), elterlicher ST486 (Burkitt-Lymphom/B-Lymphoblasten ohne Expression von FcγR) und FcγR/ST486, 721.221 (Epstein-Barr-Virus-transfizierte menschliche B-Zellen), sowie P388D1 und J774A.1 (murine makrophagenartige Lymphoblasten). VeroE6-Zellen wurden in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, das mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum (FBS) ergänzt wurde, und hämatopoetische Zellen wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, das mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, 4 mM L-GLUTAMIN, 1 mM Natriumpyruvat und 20 µM β2-Mercaptoethanol (alle von Invitrogen) ergänzt wurde. Alle Zellen wurden in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37°C mit einer 5%igen CO₂-Zufuhr gehalten.

Immunisierung mit rekombinanten Spike-Proteinen oder inaktiviertem SARS-CoV. Rekombinante SARS-CoV-Spike-Proteine wurden wie an anderer Stelle beschrieben hergestellt ([4](#), [30](#)). Sechs bis acht Wochen alte BALB/c-Mäuse ($n=4$ bis 5 pro Gruppe) wurden intraperitoneal mit einem der folgenden Antigene immunisiert: 2 µg rekombinantes codon-optimiertes SARS-CoV Spike in voller Länge (S, Aminosäuren [aa] 1 bis 1255), 2 µg rekombinantes codon-optimiertes SARS-CoV Spike Ektodomäne (S.ECD, aa 1 bis 1184), 2 µg rekombinanter, codon-optimierter SARS-CoV Spike Untereinheit 1 (S1, aa 1 bis 757) oder 10 µg rekombinanter, löslicher SARS-CoV Spike, der früh nach der Transmembrandomäne abgeschnitten wurde (Ssol, aa 1 bis 1193) (siehe [Abb. 8A](#) für Details). Alle rekombinanten Proteine wurden nach molekularbiologischen Standardtechniken mit FLAG markiert. Eine zusätzliche Gruppe, die mit 2 µg (Spike-Äquivalent) gammabestrahltm SARS-CoV-Virus (60Co-basiert, 50 KGy; whole killed virus [WKV]) immunisiert wurde, sowie eine Kontrollgruppe, die mit Kochsalzlösung injiziert wurde, waren ebenfalls enthalten. Die Mäuse erhielten zwei Immunisierungen in Anwesenheit von 1 mg Alaun im Abstand von 3 Wochen, und die Blutproben wurden durch Entlüften der Vena saphena magna an den Tagen -1, 27 und 55 nach der Immunisierung in Übereinstimmung mit den lokalen Richtlinien für den Umgang mit Tieren entnommen. Für alle Gruppen ($n=4$ bis 5) wurden am Tag 55 nach der Immunisierung Serumproben entnommen und ein gleiches Volumen von jedem Tier wurde gepoolt, für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert und bei -20°C für die spätere Verwendung gelagert.

Herstellung und Verwendung von lentiviralen pseudotypisierten Partikeln. Die pseudotypisierten viralen Partikel, die ein Luciferase-Reporter gen exprimieren, wurden im Wesentlichen wie an anderer Stelle beschrieben hergestellt ([42](#)). Kurz gesagt, SARS-CoV Spike-pseudotypisierte lentivirale Partikel (SARS-CoVpp), Vesikuläres Stomatitis-Virus-Glykoprotein (VSV-G)-pseudotypisierte lentivirale Partikel (VSVpp) oder lentivirale Partikel ohne Expression eines viralen Hüllproteins (Δ env.pp) wurden durch Transfektion von HEK293T-Zellen mit einer HIV-1-Provirus-Konstruktion (pNL4.3.LucR-E-pro-) und einem Plasmid, das für das virale Hüllprotein von Interesse kodiert, gewonnen, d.h., SARS-CoV Spike, VSV-G, bzw. leerer Vektor (pcDNA3.1; Invitrogen). Nach einem Reinigungsschritt auf einem 20%igen Saccharosekissen wurden die konzentrierten viralen Partikel mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für das Lentivirus-assoziierte HIV-1 p24-Protein entsprechend der Herstelleranweisung (Cell Biolabs, Inc.) titriert und die viralen Bestände bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für Neutralisations- und ADE-Assays wurden 100 µl serielle, 2-fache Verdünnungen von hitzeinaktiviertem Mausserum für 1 h bei 37 °C mit 100 µl pseudotypisierten Viruspartikeln inkubiert. Das gleiche Inokulum wurde dann verwendet, um parallel sowohl VeroE6- (SARS-CoVpp-Neutralisationstest) als auch hämatopoetische (ADE-Assay) Zellen zu infizieren. Kurz gesagt, 10^4 VeroE6-Zellen wurden 24 h vor der Infektion in einer 96-Well Opti-Platte (Perkin-Elmer) ausgesät. Am Tag der Infektion wurden die Zellen zweimal gewaschen und 25 µl des Inokulums wurden zu einem äquivalenten Volumen an supplementiertem DMEM hinzugefügt. Die hämatopoetischen Zellen wurden gewaschen und auf 2×10^6 Zellen/ml in supplementiertem RPMI 1640-Medium verdünnt. Portionen (25 µl) des Inokulums wurden in eine Opti-Platte mit 96 Vertiefungen gegeben, und ein gleiches Volumen der Zellsuspension wurde unmittelbar danach hinzugefügt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen gewaschen und für weitere 65 bis 75 h in 100 µl supplementiertem Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 100 µl BrightGlow-Luciferase-Substrat (Promega) direkt in jede Vertiefung gequencht, und die Luciferase-Aktivität wurde mit einem MicroBeta Jet-Zähler (Perkin-Elmer) gemessen. Die Hintergrundwerte, gemessen an nicht infizierten Zellen und an Zellen, die mit lentiviralen Partikeln ohne Expression eines viralen Hüllproteins (Δ env.pp) infiziert waren, lagen durchweg unter 200 relativen Lumineszenzeinheiten (siehe [Abb. 1](#) als Referenz).



- [In neuer Registerkarte öffnen](#)
- [Powerpoint herunterladen](#)

Abb. 1.

Empfindlichkeit von hämatopoetischen Zelllinien gegenüber einer Infektion durch SARS-CoV-Spike-Pseudopartikel (SARS-CoVpp). (A) SARS-CoVpp wurden in An- oder Abwesenheit verschiedener Verdünnungen (1/1.000, 1/2.000 und 1/4.000) von entweder Kontroll- (durchgezogene Balken) oder Anti-Spike-Serum (schraffierte Balken) für 1 h vor der Zugabe zu den Zellen inkubiert. 3 Tage nach der Infektion wurde das Luciferase-Substrat-Reagenz in die Vertiefungen gegeben und die Lumineszenz wurde gemessen. Die Daten wurden auf die Kontrollbedingungen normalisiert, *d. h.* Zellen, die mit SARS-CoVpp in Abwesenheit von Serum inkubiert wurden (als Einheit genommen), und werden als fache Veränderungen der Lumineszenz ausgedrückt. Da die Ergebnisse für SARS-CoVpp mit oder ohne Kontrollserum bei allen Zelllinien nahezu identisch waren, wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nur eine Verdünnung (1/4.000) gezeigt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte \pm die SD von sechs Messungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch Vergleich der entsprechenden Verdünnungen von Kontroll- und Anti-Spike-Serum ermittelt (\ddagger , $P < 0,05$; *, $P < 0,001$ [ungepaarter Student t-Test]). (B bis D) HIV Gag-normalisierte lentivirale Partikel (0,1 ng p24-Protein/ μ l), pseudotypisiert mit dem Hüllglykoprotein von SARS-CoV Spike (SARS-CoVpp [B]) oder vesikulärem Stomatitis-Virus (VSVpp [C]) oder ohne virales Hüllprotein (Δ env.pp [D]) wurden in An- oder Abwesenheit einer 1/1.000-Verdünnung von entweder Kontroll- (durchgezogene graue Balken) oder Anti-Spike-Serum (schraffierte Balken) für 1 h inkubiert, bevor sie zu den Zellen gegeben wurden. 3 Tage nach der Infektion wurde das Luciferase-Substrat-Reagenz zugegeben und die Lumineszenz gemessen. Die Ergebnisse

sind die Mittelwerte \pm die SD von neun Messungen aus drei unabhängigen Experimenten. Wenn nicht sichtbar, waren die SD-Werte innerhalb der Größe der Symbole enthalten. Anti-Spike-Serum verringerte entweder signifikant (VeroE6) oder erhöhte (THP-1, Raji und Daudi) den Eintritt von SARS-CoVpp. *, $P < 0,001$ (ungepaarter Student t-Test).

Infektion mit SARS-CoV. Serielle, 2-fache Verdünnungen von hitzeinaktivierten Mäuseseren wurden für 1 h bei 37°C mit einem gleichen Volumen an lebendem SARS-CoV (Stamm HKU-39849) unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen in einem BSL3-Labor (Department of Microbiology, The University of Hong Kong) inkubiert. Sowohl VeroE6- als auch Raji-Zellen wurden bei einer Infektionsmultiplikation (MOI) von 1 für 60 min bei 37°C infiziert, gewaschen und anschließend in supplementiertem Kulturmedium mit entsprechenden Verdünnungen von Mausserum inkubiert. Am Ende des Experiments wurden die Zellen entweder in 4% Paraformaldehyd (gelöst in phosphatgepufferter Kochsalzlösung) für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert oder in Lysepuffer (RLT-Puffer, RNeasy RNA minikit; Qiagen) für die Endpunkt- und quantitative Echtzeit-PCR resuspendiert und bis zur Verwendung entsprechend gelagert. Zusätzlich wurden Proben der Zellkulturüberstände (100 μ l), die zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet wurden, mit 350 μ l RLT-Puffer gemischt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Immunofluoreszenz-Mikroskopie. Zur Beurteilung der SARS-CoV-Infektion wurden sowohl VeroE6- als auch Raji-Zellen 45 Minuten lang entweder mit einem monoklonalen Maus-Antikörper, der für das virale Nukleoprotein (N) (7) spezifisch ist, oder mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern, die das virale Membranprotein (M) erkennen (ProSci), inkubiert, die durch sekundäre TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat)-konjugierte Ziegen-Anti-Maus (Zymed Laboratories) bzw. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper (Jackson Immunoresearch) nachgewiesen wurden. Objektträger wurden mit DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol)-haltigem Einbettungsreagenz (Southern Biotech) montiert und mit einem AxioObserver Z1 Mikroskop (Zeiss) analysiert. Bilder von 10 bis 30 zufällig ausgewählten Feldern wurden mit einer AxioCam MRm Kamera aufgenommen und mit der MetaMorph Software (Molecular Devices) bearbeitet.

Endpunkt- und quantitative Echtzeit-Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) für die virale Genexpression. Gesamt-RNAs wurden mit einem RNeasy RNA-Minikit (Qiagen) mit DNase-Verdau gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die extrahierten RNAs wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) und Random-Hexamer-Primer (Invitrogen) oder genspezifische Oligonukleotide wurden verwendet, um die RNAs in cDNAs umzuwandeln. Die Mengen an viraler und Wirts-RNA wurden entweder durch konventionelle Endpunkt-PCR oder durch quantitative Echtzeit-PCR mit TaqMan MGB-Sonden-basierter Technologie auf einem LightCycler 480-II-Gerät (Roche) gemessen. Die Primer und Bedingungen für den Nachweis der genomischen und subgenomischen GAPDH- und SARS-CoV-Spezies (18) sowie der SARS-CoV ORF1b- und Nukleoprotein-Gene (7) wurden bereits beschrieben. Positiv- und Negativkontrollen wurden in jeden Lauf eingeschlossen und, falls erforderlich, wurden die Konzentrationen der SARS-CoV-Genexpression auf die des 18S rRNA-Gens normalisiert, die unter Verwendung von 600 nM-Konzentrationen der Vorwärts- (5'-CggAggTTCgAAgACgATCA-3') und Rückwärts-Primer (5'-ggCgggTCATgggAATAAC-3') und einer 100 nM-Konzentration der Sonde (5'HEX-ATACCgTCgTAgTTCCgACCA-BHQ3') bestimmt wurden.

Humanes Fc γ -Rezeptor-Profilung durch konventionelle Endpunkt-PCR. Gesamt-RNAs wurden mit einem RNeasy RNA-Minikit (Qiagen) mit DNase-Verdau gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) und Random-Hexamer-Primer (Invitrogen) wurden für die Umwandlung der RNAs in cDNAs verwendet. Zusätzliche Proben, bestehend aus negativen RT-Kontrollen (RT-), wurden durch Weglassen von Superscript III während der reversen Transkription hergestellt. Die Mengen an RNA/cDNA, die für die Fc ϵ R1 γ -Kette, Fc γ RIA (CD64a), Fc γ RIIA (CD32a), Fc γ RIIB (CD32b), Fc γ RIIIA (CD16a), ACE2 und GAPDH kodieren, wurden mittels konventioneller Endpunkt-PCR unter Verwendung der in [Tabelle 2](#) beschriebenen Primerpaare gemessen. Negativ- und Positivkontrollen (d. h. ein DNA-Plasmid, das die vollständige kodierende Sequenz des interessierenden Gens enthält) waren in jedem Lauf enthalten. Das Amplifikationsverfahren bestand aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 min, gefolgt von 30 Zyklen mit drei Schritten von jeweils 45 s, einschließlich Denaturierung bei 94°C, Primer-Annealing bei 60°C und Primer-Extension bei 72°C. Das Protokoll beinhaltete auch einen abschließenden Verlängerungsschritt bei 72°C für 7 min. Die Amplikons wurden schließlich nach der Elektrophorese in einem 2%igen Agarosegel durch Ethidiumbromid-Färbung visualisiert und Negativbilder erstellt.

Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden bei 4 °C in phosphatgepufferter Kochsalzlösung, die 1 % FBS, 2 % normales Humanserum, 3 % normales Ziegeneserum, 2 mM EDTA und 0,1 % Natriumazid enthielt, geerntet und dann 30 bis 45 min bei 4 °C mit 1 µg entweder einer isotyp-angepassten Kontrolle oder einem monoklonalen Antikörper/ml für den angegebenen humanen FcγR inkubiert. Die folgenden monoklonalen Maus-Antikörper wurden verwendet: 3G8 anti-hCD16, 3D3, FL18.26 anti-hCD32 oder 10.1 anti-hCD64 (alle von BD Pharmingen) und MOPC-21 (IgG1, κ) oder MPC-11 (IgG2b, κ) Isotypkontrollen (beide von BioLegend). Die Zellen wurden dann gewaschen und die Bindung des primären Antikörpers durch Färbung bei 4°C für 30 min mit FITC-konjugierten Ziegen-Anti-Maus-Antikörpern (Jackson Immunoresearch) nachgewiesen. Schließlich wurden die gewaschenen Zellen mit einer optimalen Konzentration des fixierbaren Viabilitätsfarbstoffs eFluor 660 (FVD660; eBioscience) weiter inkubiert. Die Daten wurden von ≥30.000 singulären lebenden Zellen auf einem LSRII-Durchflusszytometer (BD Biosciences) erfasst und die Analysen nach der Erfassung mit der FlowJo-Software (TreeStar) durchgeführt.

Blockade des humanen Fcγ-Rezeptors *in vitro*. Die Zellen wurden mit kaltem, supplementiertem RPMI 1640-Medium gewaschen und nur während des Anti-FcγR-Blockierungsschritts auf Eis gehalten. Kurz gesagt wurden 2×10^5 Zellen für 45 bis 60 min in 200 µl supplementiertem Kulturmedium behandelt, das 5 µg eines FcγR-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpers (3G8, anti-hCD16; FL18.26, anti-hCD32; und 10.1, anti-hCD64 [BD Pharmingen]) oder isotyp-angepasste Kontrollen (Klon MOPC-21 und MPC-11 [BioLegend])/ml enthielt. Ein gleiches Volumen an Inokulum wurde direkt in die Röhrchen gegeben und die Proben wurden für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und in supplementiertem Kulturmedium (5×10^5 Zellen/ml) resuspendiert, und 100 µl (dreifach) wurden in eine 96-Well Opti-Platte (Perkin-Elmer) übertragen. Die Platten wurden dann bei 37 °C für 65 bis 75 h inkubiert und die Luciferase-Aktivität wurde wie oben beschrieben gemessen.

Konstruktion des lentiviralen Transfervektors. Wir konstruierten die lentiviralen Plasmide, die für die humane FcεRγ-Kette und/oder die humane FcγR kodieren, indem wir das Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) und/oder das Hygromycin-Resistenzgen aus dem bicistronischen Vektor pCHMWS-eGFP_IRES_hygromycin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Rik Gijssbers und Zeger Debyser [Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgien]) ersetzten. Die kodierende Sequenz der FcεRγ-Kette (GenBank-Hinterlegungsnummer [M33195](#)) wurde durch PCR-Amplifikation aus dem huFcRγ/pBJ1 neo-Plasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jean-Pierre Kinet [Harvard Medical School, Boston, MA]) gewonnen ([38](#)). Die einzigartigen Restriktionsstellen BamHI und XhoI wurden an den 5'- bzw. 3'-Enden hinzugefügt. Nach der Amplifikation wurde das humane FcεRγ-Ketten PCR-Produkt mit BamHI und XhoI verdaut und in das Transferplasmid eingefügt, um pCHMWS-huFcεRγ-chain_IRES_hygromycin zu erhalten. Die letztere Konstruktion wurde verwendet, um pCHMWS-huFcεRγ-chain_IRES_huFcγRIA und pCHMWS-huFcεRγ-chain_IRES_huFcγRIIIA zu generieren. Die humane FcγRIA (hCD64a) kodierende Sequenz (GenBank-Hinterlegungsnummer [NM_000566](#)) wurde durch PCR-Amplifikation aus dem huFcγRIA/pcDNA-1-Plasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Clark L. Anderson, Ohio State University, Columbus, OH) ([41](#)), mit BamHI- und SpeI-Linkern an den 5'- bzw. 3'-Enden, gewonnen. Nach der Amplifikation wurde das humane FcγRIA PCR-Produkt (1.151 bp) mit BamHI und SpeI verdaut und in das mit BclI und SpeI verdaute Transferplasmid eingefügt, um pCHMWS-huFcεRγ-chain_IRES_huFcγRIA zu erhalten. Ein humanes FcγRIIIA (hCD16a)-Fragment (1.417 bp) wurde aus dem LL649-Plasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Lewis L. Lanier, University of California, San Francisco, CA) ([33](#)) mit BamHI und EcoRI entfernt und mit denselben Restriktionsenzymen in das pIRES-Plasmid (Clontech) eingefügt. Ein cDNA-Fragment (183 bp) wurde mittels PCR aus humanen peripheren mononukleären Blutzellen unter Verwendung der Vorwärts- (5'-TgACggATCCAggAAATTggTgggTgACAg-3') und Rückwärts-Primer (5'-gTCAGgATCCTAgCAGAgCAGTTgggAggA-3') amplifiziert, die beide von einer BamHI-Stelle flankiert wurden, und dann in das LL649/pIRES-Plasmid an der BamHI-Stelle eingefügt. Die vollständige humane FcγRIIIA-Kodierungssequenz (GenBank-Zugangsnummer [NM_000569](#)) wurde durch Exzision des unerwünschten Fragments (225 bp) mit EcoRV und direkte Religation generiert, wodurch der huFcγRIIIA/pIRES-Shuttle-Vektor entstand. Das humane FcγRIIIA-Fragment wurde anschließend mit BamHI und NcoI+Klenow exzidiert und in den lentiviralen Vektor kloniert, wodurch der pCHMWS-huFcεRγ-chain_IRES_huFcγRIIIA entstand. Kodierende Sequenzen für humane FcγRIIA (hCD32a) Isoformen (huFcγRIIA.R131 und huFcγRIIA.H131 GenBank-Hinterlegungsnummer [NM_021642](#)) und humanes FcγRIIB1 (hCD32b; GenBank-Hinterlegungsnummer [AF543826](#)) flankiert von BglII- und Sall-Stellen wurden kommerziell synthetisiert (GeneArt, Regensburg, Deutschland). Die synthetischen Sequenzen wurden mit BglII und Sall verdaut und in das ursprüngliche Transferplasmid eingefügt, um pCHMWS-huFcγRIIA.R131_IRES_hygromycin, pCHMWS-huFcγRIIA.H131_IRES_hygromycin und pCHMWS-huFcγRIIB1_IRES_hygromycin zu erhalten. Um

sicherzustellen, dass die PCR-Amplifikations- und Klonierungsverfahren keine zufälligen Mutationen eingeführt hatten, wurden alle Konstrukte vom Genome Research Centre (The University of Hong Kong) sequenziert.

Generierung von FcγR-exprimierenden Zelllinien mittels lentiviraler Partikel-basierter Gentransduktion. Pseudotypisierte virale Partikel wurden im Wesentlichen wie an anderer Stelle beschrieben hergestellt (42). Kurz gesagt, VSV-G-pseudotypisierte lentivirale Partikel wurden durch Transfektion von HEK293T-Zellen mit einem Verpackungsplasmid (pCMVΔR8.91), einem Plasmid, das für die VSV-Hülle kodiert (pCI-VSVg), und einem von pCHMWS abgeleiteten Transferplasmid (wie oben beschrieben), das für einen humanen Fc-Rezeptor kodiert, gewonnen. Stabile Zelllinien wurden durch die Transduktion von monoklonalen ST486-Zellen mit den VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Partikeln erzeugt. Kurz gesagt, die Zielzellen wurden gewaschen und auf 3×10^6 Zellen/ml in supplementiertem RPMI 1640-Medium verdünnt. Ein Milliliter roher Überstand von Pseudopartikel-produzierenden 293T-Zellen wurde in eine 24-Well-Platte gegeben, und ein gleiches Volumen der Zellsuspension wurde unmittelbar danach hinzugefügt. Nach 3 bis 8 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gewaschen und für weitere 40 bis 48 h in 2 ml supplementiertem Kulturmedium inkubiert. 2 Tage nach der Infektion wurde die Zelloberflächenexpression des humanen FcγR mittels Durchflusszytometrie überwacht, und die Zellen wurden anschließend in selektivem Medium kultiviert, das gegebenenfalls 250 µg Hygromycin (Invitrogen)/ml enthält. Schließlich wurden mehrere monoklonale Zelllinien für jedes Konstrukt durch das Poisson-Verfahren der limitierenden Verdünnung isoliert, und die Expression des Transgens wurde durch RT-PCR (Daten nicht gezeigt) und Durchflusszytometrie bestätigt (siehe [Abb. 6A](#)).

Behandlungen mit lysosomotropen Wirkstoffen und Proteaseinhibitoren. Die Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an Medikamenten, entweder Ammoniumchlorid (NH₄Cl) oder E-64d/Cathepsin L-Inhibitor (Cat L Inh; Calbiochem), für 1 h bzw. 3 h vor der Infektion vorinkubiert. SARS-CoVpp, vorbehandelt mit Immun- oder Kontrollserum, wurden mit den gleichen Konzentrationen der Medikamente in Röhrchen gemischt und zu den Zellen gegeben. Nach 5 h (E-64d oder Cat L Inh) bzw. 7 h (NH₄Cl) wurden die Zellen gewaschen und mit frischem Medium ohne Medikament weiter inkubiert. Die Zellen wurden 60 bis 65 h nach der Infektion, wie oben beschrieben, auf ihre Luziferaseaktivität untersucht.

Statistische Analyse. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte ± die Standardabweichungen (SD) der angegebenen Anzahl von Beobachtungen dargestellt. Der statistische Unterschied zwischen den Gruppen wurde mit einem ungepaarten Student t-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,05 ermittelt.

ERGEBNISSE

Anti-Spike-Immuneserum fördert die Infektion menschlicher hämatopoetischer Zellen durch SARS-CoV. Die SARS-CoV-induzierte Pathologie ist nicht auf den Respirationstrakt beschränkt, sondern betrifft auch andere Gewebe und Organe, vor allem Zellen des Gastrointestinaltrakts und des Immunsystems (19, 39, 74). Obwohl mehrere Berichte gezeigt haben, dass SARS-CoV hämatopoetische Zellen infizieren kann, ist nicht bekannt, wie das Virus in diesen Immunzellen Fuß fassen kann, die den spezifischen SARS-CoV-Rezeptor ACE2 nicht exprimieren (20, 21).

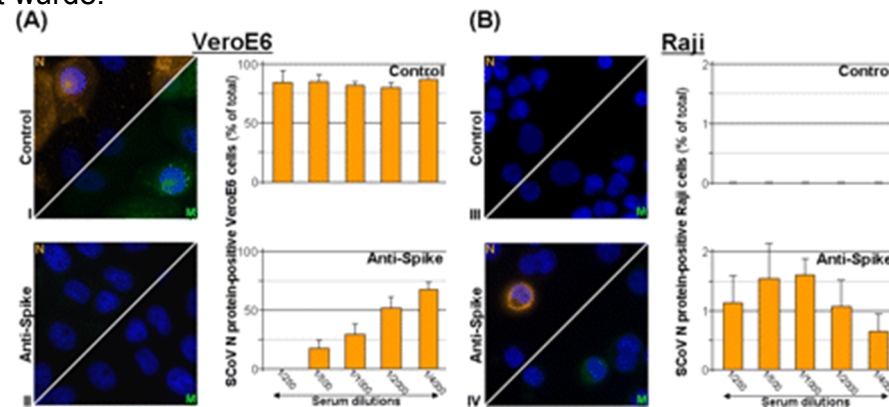
Um die Möglichkeit einer Antikörper-vermittelten Infektion von Immunzellen während der SARS-Pathogenese zu untersuchen, haben wir SARS-CoV Spike-pseudotypisierte Partikel (SARS-CoVpp) verwendet, um die Wirkung von Anti-Spike-Immuneserum auf die prototypischen permissiven VeroE6-Zellen und ein Panel von Immunzelllinien zu vergleichen ([Abb. 1A](#)). Diese rekombinanten Viren, die ein Reportergen kodieren und das SARS-CoV-Spike-Protein an der Virionoberfläche tragen, ahmen nachweislich den SARS-CoV-Eintrittsprozess getreu nach (57, 71). Wie erwartet, infizierte SARS-CoVpp effizient VeroE6-Zellen, während das Lumineszenzsignal, das in einem der Immunzelltypen detektiert wurde, nie Werte überstieg, die in Abwesenheit von SARS-CoVpp gemessen wurden ([Abb. 1B](#)). Um das Auftreten einer Antikörper-vermittelten Infektion zu untersuchen, haben wir SARS-CoVpp vor der Infektion entweder mit Maus-Anti-Spike-Immuneserum ([Abb. 1A und B](#), schraffierte Balken) oder mit Kontrollserum ([Abb. 1A und B](#), durchgezogene graue Balken) vorinkubiert und dann die resultierenden Lumineszenz-Signalintensitäten verglichen.

Das Ergebnis der Infektion mit SARS-CoVpp in Gegenwart von Anti-Spike-Immuneserum hing vom Zielzelltyp ab. Obwohl hitzeinaktiviertes Serum den Eintritt von SARS-CoVpp in die permissive VeroE6-Zelllinie dosisabhängig hemmte, was sich durch einen dramatischen Abfall der Lumineszenzintensität

zeigte ([Abb. 1A](#) und B, schraffierte Balken), erleichterte es die Infektion der humanen monozytären Zelllinie THP-1 und der B-Zelllinien Daudi und Raji. Im Gegensatz dazu wurde keine Infektion dieser Zelllinien festgestellt, wenn SARS-CoVpp mit Kontrollserum vorinkubiert wurde ([Abb. 1A](#) und B, durchgezogene Balken), und ähnliche Hintergrundwerte der Lumineszenz wurden nur in Anwesenheit von Immunsrum festgestellt (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswert ist, dass die Infektion der THP-1-, Raji- und Daudi-Zelllinien durch rekombinante virale Partikel, die mit dem Glykoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSVpp; [Abb. 1C](#)) oder ohne virales Hüllprotein (Δ env.pp; [Abb. 1D](#)) pseudotypisiert waren, durch die Anwesenheit von Anti-SARS-CoV-Spike-Immunsrum nicht beeinflusst wurde. Diese Experimente zeigen, dass Anti-Spike-Antikörper die Infektion von SARS-CoVpp - aber nicht von VSVpp oder Δ env.pp - in verschiedene Immunzelltypen erleichtern.

Veränderter Tropismus von replikationskompetentem SARS-CoV gegenüber menschlichen Immunzellen in Gegenwart von Anti-Spike-Immunsrum. Da Raji-Zellen die größte Anfälligkeit für eine Antikörper-vermittelte Infektion mit SARS-CoVpp zeigten ([Abb. 1A](#) und B), verwendeten wir diese von B-Zellen abgeleitete humane Zelllinie, um zu untersuchen, ob auch bei einer Infektion mit replikationskompetentem SARS-CoV eine Veränderung des Tropismus zu beobachten ist.

Wie bereits berichtet ([30](#)), blieb die Infektion von permissiven VeroE6-Zellen in Anwesenheit von Kontrollserum unverändert, während sie durch das Anti-Spike-Immunsrum vollständig aufgehoben wurde ([Abb. 2A](#)). Im Gegensatz dazu war bei der Infektion von Raji-Zellen in Anwesenheit von Anti-Spike-Immunsrum der Nachweis von intrazellulären viralen Proteinen (*d. h.* Membran und Nukleokapsid) deutlich anders als bei der Infektion in Anwesenheit von Kontrollserum ([Abb. 2B](#)). Eine solche verstärkte Infektion wurde auch auf molekularer Ebene nachgewiesen, da der virale Gennachweis mittels konventioneller RT-PCR (*d. h.* Endpunkt-PCR; [Abb. 3A](#)) vollständig mit den quantitativen Echtzeit-PCR-Messungen übereinstimmte ([Abb. 3B](#)). Im Vergleich zum Inokulum mit Kontrollserum wurde in Raji-Zellen, die in Gegenwart von Anti-Spike-Immunsrum infiziert wurden, ein signifikant erhöhter Nachweis von subgenomischer viraler RNA (sgRNA) und Nukleokapsid-Genen beobachtet ([Abb. 3B](#), $P < 0,001$). Obwohl wir in Zellen, die in Gegenwart von Kontrollserum herausgefordert wurden, nie SARS-CoV-Proteine nachweisen konnten, waren Spuren von PCR-Produkten im Zusammenhang mit SARS-CoV ORF1b (Daten nicht gezeigt), Nukleokapsidgenen und anderer viraler genomischer und subgenomischer RNA nachweisbar ([Abb. 3](#)). Diese Hintergrundwerte waren wahrscheinlich das Ergebnis einer unspezifischen Bindung/Aufnahme von SARS-CoV. Zusammengefasst deuten diese Experimente darauf hin, dass Anti-Spike-Serum eine Infektion von Immunzellen durch lebendes SARS-CoV auslösen kann, ähnlich wie dies mit den pseudotypisierten Viruspartikeln beobachtet wurde.

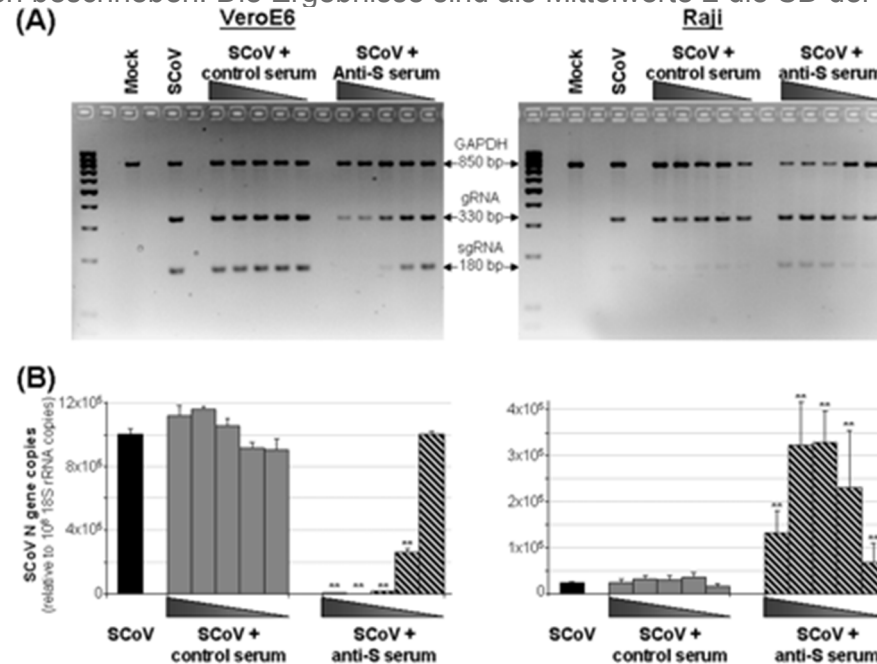


- [In neuer Registerkarte öffnen](#)
- [Powerpoint herunterladen](#)

Abb. 2.

Anti-Spike-Antikörper lösen SARS-CoV-Infektion von humanen Raji-B-Zellen aus. VeroE6- oder humane Raji-Zellen wurden mit dem SARS-CoV-Stamm HK39849 (SCoV) in Gegenwart von entweder Kontroll- oder Anti-Spike-Serum für 1 h infiziert (MOI=1). Die Proben wurden 15 h nach der Infektion mit 4%

Paraformaldehyd fixiert. Ein monoklonaler Maus-Antikörper, der für das SCoV-Nukleokapsid (N) spezifisch ist, und polyklonale Kaninchen-Antikörper, die für das SCoV-Membranprotein (M) spezifisch sind, wurden mit TRITC-konjugierten Ziegen-Anti-Maus- bzw. FITC-konjugierten Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörpern visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert, und es wurden separate Kanalbilder aufgenommen. (A) Wie erwartet wurde die SCoV-Infektion von VeroE6 (I) vollständig durch Anti-Spike-Serum (1/500, II) blockiert. (B) Im Gegensatz dazu wurden SCoV-Virusproteine in Raji-Zellen nur nachgewiesen, wenn sie mit Anti-Spike (1/500, IV) inkubiert wurden, aber nie mit Kontrollserum (III). Die Quantifizierung der Infektion (rechte Teile in den Tafeln A und B) erfolgte durch Zählung der positiven Zellen in 30 zufällig ausgewählten Feldern (630×, Endvergrößerung) unter Verwendung von Metamorph, wie in Materialien und Methoden beschrieben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± die SD der Anzahl der Felder angegeben.



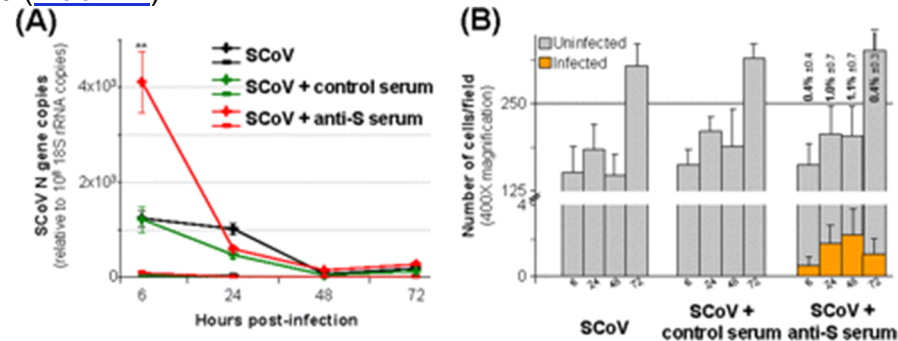
- [In neuer Registerkarte öffnen](#)
- [Powerpoint herunterladen](#)

Abb. 3.

Endpunkt- und Echtzeit-PCR-Nachweis von SARS-CoV-Genen in ADE-infizierten Raji-Zellen. (A) VeroE6- und humane Raji-Zellen wurden 1 h lang in Abwesenheit (mock) oder Anwesenheit des SARS-CoV-Stammes HK39849 (SCoV) inkubiert, entweder mit Kontroll- oder Anti-Spike (S)-Serum wie angegeben. Die Zellen wurden 15 h nach der Infektion lysiert, und die Gesamt-RNA wurde für die RT-PCR-Amplifikation extrahiert, wie in Materialien und Methoden beschrieben. Die Amplikons wurden durch Ethidiumbromid-Färbung nach Agarosegel-Elektrophorese visualisiert. Ein 1-kb-Molekulargewichtsstandard ist auf der linken Lane jedes Gels dargestellt. (B) Aus den in Panel A hergestellten cDNA-Proben wurden die Konzentrationen der SCoV-Nukleokapsid- und SCoV-ORF1b-Gene (nicht gezeigt) durch quantitative RT-PCR in Echtzeit bestimmt. Raji-Zellen wurden konsistent in Gegenwart serieller Verdünnungen (1/250 bis 1/4.000 in 2-facher Verdünnung) von Anti-Spike-Serum infiziert, das im Gegensatz dazu den viralen Eintritt in die empfindlichen VeroE6-Zellen dosisabhängig hemmte. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD von vier Messungen aus Duplikatkulturen dargestellt und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit ähnlichen Ergebnissen. **, $P < 0,001$ (ungepaarter Student t-Test).

Die Antikörper-vermittelte Verstärkung der SARS-CoV-Infektion in Raji-Zellen führt zu einer abortiven Infektion. Um die Fähigkeit von SARS-CoV zur produktiven Replikation in ADE-infizierten Raji-Zellen zu beurteilen, überwachten wir mittels PCR die zelluläre Viruslast sowie die Freisetzung von SARS-

CoV-Nachkommenschaft in den Zellkulturüberstand. Wie bereits zu 15 Stunden nach der Infektion (hpi) ([Abb. 3A](#)) wurden alle Proben mittels Endpunkt-PCR zum Nachweis von genomischer SARS-CoV-RNA als positiv eingestuft. Zu den meisten Zeitpunkten waren geringe, aber deutlich höhere Mengen an SARS-CoV sgRNA in Zellen sichtbar, die in Gegenwart von Anti-Spike-Serum infiziert wurden (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den quantitativen Messungen der positiven (d. h. genomischen und mRNA) bzw. negativen (d. h. subgenomischen replikativen Intermediate) RNA-Stränge, die eine erhöhte Viruslast bei 6 hpi zeigen, gefolgt von einer kontinuierlichen Abnahme beider viraler RNA-Spezies mit der Zeit, so dass später kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen festgestellt wurde ([Abb. 4A](#)). Interessanterweise wurde trotz des Nachweises von SARS-CoV-Nukleinsäure weder die SARS-CoV-Membran (nicht gezeigt) noch das Nukleokapsidprotein ([Abb. 4B](#)) in Zellen nachgewiesen, die in Abwesenheit oder Anwesenheit von Kontrollserum infiziert wurden. Im Gegensatz dazu wurde ein signifikanter Prozentsatz von SARS-CoV-Nukleokapsidprotein-positiven Zellen visualisiert, wenn sie in Gegenwart von Anti-Spike-Serum infiziert wurden, obwohl es keine Hinweise auf eine produktive Virusreplikation und Ausbreitung zur Infektion anderer Zellen gab ([Abb. 4B](#)).



- [In neuer Registerkarte öffnen](#)
- [Powerpoint herunterladen](#)

Abb. 4.

Abortive Replikation von SARS-CoV in Raji-Zellen nach Antikörper-vermittelter Infektion. (A) Humane Raji-Zellen wurden 1 h lang in Abwesenheit oder Anwesenheit des SARS-CoV-Stammes HK39849 (SCoV) mit 2-fachen seriellen Verdünnungen (1/250 bis 1/4.000) von entweder Kontroll- oder Anti-Spike (S)-Serum inkubiert. Die Zellen wurden bei 6, 24, 48 und 72 hpi lysiert, und die Gesamt-RNAs wurden extrahiert und in sinnsspezifische cDNA-Spezies revers transkribiert, wie in Materialien und Methoden beschrieben. Die Gehalte an positiven (+) und negativen (-) SCoV-Nukleokapsidsträngen wurden durch quantitative RT-PCR in Echtzeit bestimmt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur eine Serumverdünnung (1/1.000) dargestellt. Zu einem frühen Zeitpunkt (6 hpi) wurde durchweg eine hohe Viruslast in Zellen nachgewiesen, die in Gegenwart von Anti-Spike infiziert wurden, nicht aber in Kontrollserum. Zu späteren Zeitpunkten (24 bis 72 hpi) war kein weiterer Unterschied zwischen den Behandlungen erkennbar. Die Daten sind als Mittelwerte ± die SD von vier Messungen dargestellt. Wenn nicht sichtbar, waren die SD-Werte in der Größe der Symbole enthalten. **, $P < 0,001$ (ungepaarter Student t-Test). (B) Humane Raji-Zellen, die wie in Tafel A angegeben infiziert wurden, wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert und die Färbung für SCoV-Nukleokapsid und Zellkerne wurde wie in Materialien und Methoden beschrieben durchgeführt. Die Quantifizierung der infizierten und nicht infizierten Zellen erfolgte durch Auszählen von 10 zufällig ausgewählten Feldern mit der Metamorph-Software. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse nur für eine Serumverdünnung (1/1.000) dargestellt. Die Zellzahlen und der zugehörige Prozentsatz der Infektion sind als Mittelwert ± SD der Anzahl der Beobachtungen angegeben. Die SCoV-Infektion von Raji-Zellen trat nur in Gegenwart von Anti-Spike-Serum auf, aber der Prozentsatz der infizierten Zellen nahm im Laufe der Zeit nicht signifikant zu.

Um mehrere Antikörper-vermittelte Infektionszyklen zu ermöglichen, wurden die Zellen in kontinuierlicher Gegenwart von Kontroll- oder Anti-Spike-Serum kultiviert. Da das Anti-Spike-Immunsereum die Infektion der permissiven ACE2-tragenden Zellen neutralisierte, war es nicht möglich, die Überstände auf infektiöses Virus durch Titration der 50%igen infektiösen Gewebekultur-Dosis (TCID₅₀) oder Plaque-Assays zu titrieren. Daher war die Echtzeit-RT-PCR-

Quantifizierung der SARS-CoV-Virusgene in den Kulturüberständen die einzige verfügbare Option. Wie erwartet, beobachteten wir einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Nachweises sowohl der SARS-CoV ORF1b- als auch der N-Gene, wenn Überstände mit bekannten TCID50-Titern gemessen wurden ([Tabellen 1](#) und [2](#)). Ebenso konnten wir zunehmende virale Genkopien in Zellkulturüberständen von VeroE6-Zellen von > 1 bis 7 bis 9 Tagen postinfektios nachweisen. Während die Anwesenheit von Kontrollserum den Virustiter nicht beeinflusste, verringerte eine Infektion in Anwesenheit von Anti-Spike-Immunsrum diesen signifikant (log₁₀-Werte der Nukleokapsidgenkopien ± die SD bei 9 Tagen postinfection: SARS-CoV [6,22 ± 0,07] versus SARS-CoV + 1/1.000 Kontrollserum [5,88 ± 0,07] versus SARS-CoV + 1/1.000 Anti-S-Serum [0,54 ± 0,13]). Im Gegensatz dazu konnten wir keine Veränderung der viralen Genkopien feststellen, als wir die Viruslast in Überständen von Raji-infizierten Zellen bewerteten, unabhängig davon, ob sie in Gegenwart oder Abwesenheit von Immunsrum inkubiert wurden ([Tabelle 1](#)).

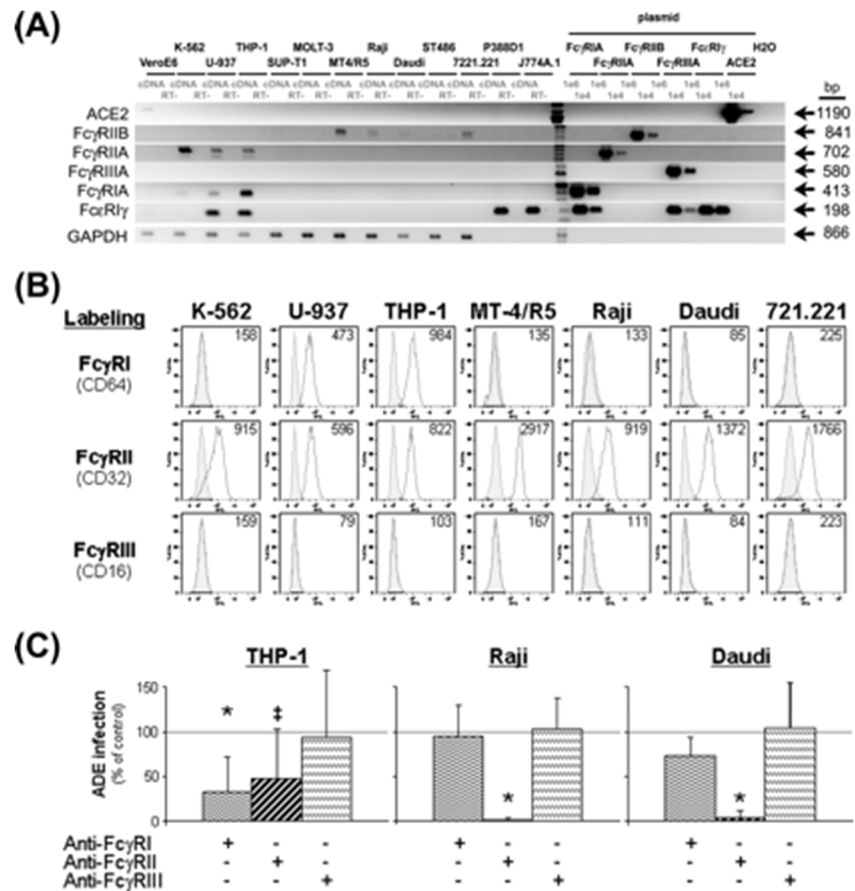
- [Inline-Ansicht](#)
- [Popup anzeigen](#)

Tabelle 1.

Virale Ausbeute in Kulturüberständen von SARS-CoV-infizierten Raji-Zellen

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass trotz der Fähigkeit von SARS-CoV, antivirale Antikörper auszunutzen, um in Raji-B-Zellen einzudringen, bei der Infektion nur eine abortive Replikation stattfindet und kein infektiöses Virus aus den ADE-infizierten Raji-Zellen freigesetzt wird.

Das Auftreten von ADE einer SARS-CoV-Infektion hängt von der Expression von humanem FcγRII (CD32) durch die Zielzellen ab. ADE beinhaltet mehrere Mechanismen, hauptsächlich durch Fc-Rezeptor(en) (FcR) und Komplementrezeptor(en) (CR). Da die ADE der SARS-CoV-Infektion in unserer Versuchsanordnung in Gegenwart von hitzeinaktiviertem Serum auftrat, haben wir den Beitrag von CR zu dem beobachteten Phänomen nicht weiter untersucht, sondern uns auf die mögliche Beteiligung von FcγR konzentriert, die auf den menschlichen Leukozyten exprimiert werden ([9](#), [49](#)). Da wir zuvor die Beteiligung von FcγRII an der Antikörper-vermittelten Infektion von Raji-B-Zellen gezeigt hatten ([30](#)), untersuchten wir mittels RT-PCR das Expressionsprofil aller hämatopoetischen Zelllinien, die auf ihre Anfälligkeit für die Antikörper-vermittelte Infektion mit SARS-CoVpp getestet wurden ([Abb. 5 A](#)). Die humanen Immunzelllinien, die ein nachweisbares Niveau an FcγR-Transkript aufwiesen, wurden anschließend einer Durchflusszytometrie unterzogen ([Abb. 5B](#)). Unsere Ergebnisse zeigen, dass U-937 und THP-1 eine Zelloberflächenexpression sowohl von FcγRI als auch von FcγRIIA aufwiesen. Wie mittels RT-PCR festgestellt wurde, exprimieren sie sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Isoform von FcγRIIA ([17](#), [66](#)). Die anderen Zellen exprimieren einen einzelnen FcγR, mit Ausnahme von SUP-T1, MOLT-3 und ST486 (zwei T-Zell-Linien bzw. eine B-Zell-Linie), die keine nachweisbaren Mengen eines FcγR aufweisen. Die Expression von FcγRIIA wurde in der Zelllinie K-562 nachgewiesen, während die anderen überwiegend FcγRIIB aufweisen. Bemerkenswert ist, dass zusätzliche schwache Banden für die FcγRIIA auch in Raji-Zellen gesehen wurden ([Abb. 5A](#) und B).



- [In neuer Registerkarte öffnen](#)
- [Powerpoint herunterladen](#)

Abb. 5.

Die Blockade von FcγRII hebt die Antikörper-vermittelte Infektion von humanen Zelllinien auf. (A) Gesamt-RNAs aus den angegebenen Zelllinien wurden für die RT-PCR-Amplifikation wie unter Materialien und Methoden beschrieben extrahiert. cDNAs und negative RT-Kontrollen (RT-) wurden für den Nachweis von FcεR1γ-Kette, FcγRI (CD64a), FcγRIIA (CD32a), FcγRIIB (CD32b), FcγRIIIA (CD16a), ACE2 und GAPDH sondiert. Als Positivkontrollen wurden DNA-Plasmide verwendet, die die kodierende Sequenz der humanen Fc-Rezeptoren oder des humanen ACE2 (104 und 106 Kopien) enthalten. Die Amplikons wurden nach der Agarosegel-Elektrophorese durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Als Referenz ist auch ein 1-kb-Molekulargewichtsstandard dargestellt. Aufgrund des murinen Ursprungs der makrophagenähnlichen P388D1- und J774A.1-Zelllinien und weil die Primer für den Nachweis von humanem FcR konzipiert wurden ([Tabelle 2](#)), wurden in P388D1- und J774A.1-Zellen keine FcγR-Transkripte nachgewiesen. (B) Hämatopoetische Zelllinien, die einen nachweisbaren Gehalt an FcγR-Transkript in Panel A aufwiesen, wurden einer Durchflusszytometrie unterzogen. Die Zelllinien wurden entweder mit isotyp-angepassten Kontroll-Antikörpern (grau gefüllte Histogramme) oder FcγR-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern (offene Histogramme) wie angegeben gefärbt, gefolgt von sekundären FITC-konjugierten Ziegen-Anti-Maus-Antikörpern. Die markierten Proben wurden dann mittels Durchflusszytometrie abgelesen und die Post-Acquisition-Analyse wurde mit der FlowJo-Software durchgeführt. Insets zeigen den Median der Fluoreszenzintensität der Anti-FcγR-Färbung. Wenn nicht sichtbar, wurden die offenen Histogramme mit den grau gefüllten überlagert.

Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit ähnlichen Ergebnissen. (C) Effekt der FcγR-Blockade auf die Anfälligkeit der Zellen für eine ADE-Infektion. Vor der Infektion wurden die Zellen mit anti-FcγR blockierenden Antikörpern behandelt. 3 Tage nach der Infektion wurde Luziferase-Substrat-Reagenz in die Wells gegeben und die Lumineszenz gemessen. Die Daten wurden auf die Kontrollbedingungen normalisiert, *d. h. auf* Zellen, die in Gegenwart von IgG-Isotyp-angepassten Kontrollantikörpern infiziert wurden, und als Prozentsatz der Lumineszenzänderungen ausgedrückt. Für alle Bedingungen wurden die Werte der Hintergrundlumineszenz (nie mehr als 3 % der Kontrolle) vor der Normalisierung subtrahiert. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte ± die SD von neun Messungen aus drei unabhängigen Experimenten. ‡, $P < 0,05$; *, $P < 0,001$ (ungepaarter Student t-Test).

- [Inline-Ansicht](#)
- [Popup anzeigen](#)

Tabelle 2.

Primer-Sequenzen für den RT-PCR-Nachweis von menschlichen Transkripten von FcRs, ACE2 und GAPDHα

Da THP-1-, Raji- und Daudi-Zellen anfällig für eine ADE-Infektion sind ([Abb. 1](#)) und weil sie den Fc-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren ([Abb. 5](#)), untersuchten wir die Wirkung der Blockierung einzelner FcγR auf das Auftreten einer ADE-Infektion ([Abb. 5C](#)). Obwohl die Behandlung mit anti-FcγRI oder anti-FcγRIII blockierenden Antikörpern praktisch keinen Effekt auf die ADE in Raji- und Daudi-Zellen hatte, hob die Blockierung von FcγRII die ADE-Infektion dieser Zellen vollständig auf. Bei THP-1 verringerte nicht nur die Anti-FcγRII-Behandlung die ADE-Infektion, wie erwartet, sondern auch FcγRI ([Abb. 5C](#)). THP-1-Zellen exprimieren in der Tat sowohl FcγRI als auch FcγRII, und intakte Antikörper konnten über ihren Fab-Anteil an den anvisierten FcγR und über ihren Fc-Anteil auch an andere, von denselben Zellen exprimierte FcγR binden. Zur Unterstützung dieser Interpretation ist Anti-FcγRI ein Maus-IgG1, das gut an FcγRII bindet, während Anti-FcγRII ein Maus-IgG2b ist, das weniger effizient an FcγRI bindet (M. Daëron et al., unveröffentlichte Beobachtungen).

Um die spezifische Rolle der FcγR-Subfamilie im ADE-Phänomen weiter zu etablieren, transduzierten wir die ST486 B-Zelllinie, die von Natur aus defizient in der Expression des FcγR ist, stabil mit verschiedenen Konstrukten, die für FcγRIA (CD64a), FcγRIIA (CD32a), FcγRIIB1 (CD32b) und FcγRIIIA (CD16a) kodieren. Aufgrund des allelischen Polymorphismus des humanen FcγRIIA und seiner vermuteten Bedeutung für die Krankheitsanfälligkeit ([48](#)) haben wir außerdem zwei Varianten des FcγRIIA generiert, die entweder ein Histidin (H) oder ein Arginin (R) an der Aminosäureposition 131 tragen. Wie in [Abb. 6](#) gezeigt, waren die parentalen ST486-Zellen sowohl für die direkte als auch für die Antikörper-vermittelte Infektion unempfindlich. Die Transduktion von ST486-Zellen durch lentivirale Partikel, die die verschiedenen FcR-kodierenden Sequenzen enthielten, führte zur Generierung stabiler Zelllinien, die das mRNA-Transgen hoch exprimieren (nicht gezeigt), sowie den kodierten FcγR an der Plasmamembran ([Abb. 6A](#)). Ähnlich wie die parentalen ST486-Zellen waren die FcγR-exprimierenden Zellen nicht permissiv für eine direkte SARS-CoVpp-Infektion, unabhängig vom Rezeptor-Subtyp ([Abb. 6B](#)). Wurden die Zellen jedoch in Gegenwart von Anti-SARS-CoV-Spike-Immunsrum infiziert ([Abb. 6B](#), schraffierte Balken), wurden ST486, die FcγRII exprimieren, empfänglich für eine Antikörper-vermittelte Infektion. Obwohl beide FcγRII-Mitglieder - FcγRIIA und FcγRIIB1 - eine erhöhte SARS-CoVpp-Immunkomplex-Infektiosität vermittelten, stellten wir fest, dass FcγRIIA dies offenbar effizienter tat. Sowohl FcγRIA als auch FcγRIIIA waren nicht in der Lage, ADE zu vermitteln, trotz der großen Bandbreite an getesteten Serumverdünnungen ([Abb. 6B](#)).

- [In neuer Registerkarte öffnen](#)
- [Powerpoint herunterladen](#)

Abb. 6.

Humane FcγRIIA und B1, aber weder huFcγRIA noch huFcγRIIIA, sind für die ADE von SARS-CoV-Pseudopartikeln (SARS-CoVpp) Infektion verantwortlich. (A) Humane Raji-, elterliche und monoklonale FcγR-transduzierte humane ST486 B-Zelllinien wurden entweder mit isotyp-angepassten Kontroll-Antikörpern (grau getöntes Histogramm) oder FcγR-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern (offenes Histogramm) wie angegeben angefärbt, gefolgt von sekundären FITC-konjugierten Ziegen-Anti-Maus-Antikörpern. Die markierten Proben wurden dann mittels Durchflusszytometrie ausgelesen und die Nacherfassungsanalyse wurde mit der FlowJo-Software durchgeführt. Der Inset zeigt den Median der Fluoreszenzintensität der Anti-FcγR-Färbung. Wenn nicht sichtbar, wurden die offenen Histogramme mit den grau gefüllten überlagert. (B) Die Potenz der FcγR(s), den Antikörpervermittelten Eintritt von SARS-CoVpp auszulösen, wurde unter Verwendung von ST486-Zelllinien untersucht, die einen einzelnen FcγR stabil exprimieren. SARS-CoVpp wurden in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Verdünnungen (1/1.000, 1/2.000 und 1/4.000) von entweder Kontroll- (durchgezogene Balken) oder Anti-Spike-Serum (schraffierte Balken) für 1 h vor der Zugabe zu den Zellen inkubiert. 3 Tage nach der Infektion wurde das Luziferase-Substrat-Reagenz in die Vertiefungen gegeben und die Lumineszenz gemessen. Die Daten wurden auf die Kontrollbedingungen normalisiert, *d. h.* Zellen, die mit SARS-CoVpp in Abwesenheit von Serum inkubiert wurden (schwarzer Balken, als Einheit genommen), und als fache Veränderung der Lumineszenz ausgedrückt. Da die Ergebnisse für SARS-CoVpp ± Kontrollserum bei allen Zelllinien nahezu identisch waren, wird aus Gründen der

Übersichtlichkeit nur eine Verdünnung (1/4.000) gezeigt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte \pm die SD von neun Messungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch Vergleich der entsprechenden Verdünnungen von Mock- und Anti-Spike-Serum ermittelt. ‡, $P < 0,05$; *, $P < 0,01$ (ungepaarter Student t-Test).

Die Antikörper-vermittelte Infektion durch SARS-CoV beruht nicht auf pH- und Protease-abhängigen Eintrittswegen. Um die zellulären Anforderungen der ACE2- und FcR-vermittelten Infektionswege zu vergleichen, untersuchten wir die Wirkung von Behandlungen mit lysosomotropen Mitteln und Proteaseinhibitoren auf ADE. Wie bereits beschrieben ([24](#), [71](#)), bewirkte die Zugabe von Ammoniumchlorid (NH₄Cl), das die Ansäuerung der endosomalen/lysosomalen Kompartimente verhindert, eine dosisabhängige Reduktion der SARS-CoVpp-Infektion in ACE2-exprimierenden VeroE6-Zellen ([Abb. 7 A](#), schwarze Quadrate). Eine ähnliche Behandlung von Raji-Zellen hemmte die Antikörper-vermittelte Infektion von SARS-CoVpp nicht, sondern verstärkte sie noch ([Abb. 7A](#), rote Kreise). Die Inkubation von VeroE6-Zellen mit dem breiten Cysteinprotease-Inhibitor E-64d sowie dem spezifischeren Cathepsin-L-Inhibitor III hob die ACE2-vermittelte Infektion auf ([26](#), [56](#)) ([Abb. 7C und D, schwarze Quadrate](#)). [7C](#) und D, schwarze Quadrate), während E-64d keinen Einfluss auf den ADE-Weg hatte und nur eine teilweise Reduktion der ADE von SARS-CoVpp in Raji mit den höchsten getesteten Konzentrationen des Cathepsin L-Inhibitors III beobachtet wurde ([Abb. 7C](#) und D, rote Kreise).

- [In neuer Registerkarte öffnen](#)
- [Powerpoint herunterladen](#)

Abb. 7.

Antikörper-vermittelte Infektion ist unabhängig von saurem pH-Wert und Cystein-Protease-Aktivität des endosomalen/lysosomalen Kompartiments. (A, C und D) Die pH- und Protease-Anforderungen für den ACE2- versus Antikörper-vermittelten Eintritt von SARS-CoVpp wurden mit verschiedenen pharmakologischen Behandlungen untersucht. Vor der Infektion wurden VeroE6- und Raji-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von Ammoniumchlorid (NH₄Cl) (A) für 1 h oder dem Cysteinproteaseinhibitor E-64d (C) und Cathepsin L-Inhibitor III (D) für 3 h vorinkubiert. SARS-CoVpp, mit oder ohne Anti-Spike-Serum (1/2.000), wurden dann in kontinuierlicher Gegenwart der Medikamente zu den Zellen gegeben. 3 Tage nach der Infektion wurde das Luziferase-Substrat-Reagenz in die Vertiefungen gegeben und die Lumineszenz gemessen. Die Daten wurden auf die entsprechenden Kontrollbedingungen (als Einheit genommen) mit SARS-CoVpp mit oder ohne Anti-Spike-Serum für Raji- bzw. VeroE6-Zellen normalisiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm die SD von neun Messungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Unterschiede zwischen VeroE6- und Raji-Zellen wurden mit dem ungepaarten Student t-Test ermittelt. **, $P < 0.005$. (B) Zelloberflächenexpression von FcγRII auf Raji-Zellen nach NH₄Cl-Behandlung. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des Wirkstoffs für 1, 3 und 5 h inkubiert, mit anti-huFcγRII-Antikörper markiert und

einer Durchflusszytometrie unterzogen. Die Daten wurden auf die mittlere Fluoreszenzintensität der Kontrollen (ohne Medikament) normalisiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm die SD von sechs Messungen aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Wenn nicht sichtbar, waren die SD-Werte innerhalb der Größe der Symbole enthalten.

In diesen Experimenten stellten wir fest, dass die Neutralisierung der Endosomen-/Lysosomenversauerung die Infektiosität von mit Anti-Spike-Immenserum behandeltem SARS-CoVpp erhöhte ([Abb. 7A](#), rote Kreise). Diese Beobachtung warf die Möglichkeit auf, dass die Alkalisierung der Zellen mit einer erhöhten Expression von Fc γ R an der Zelloberfläche verbunden war. Da Raji-Zellen nur Fc γ RII exprimieren ([Abb. 5](#) und [6](#)), untersuchten wir dessen Expressionsniveau an der Zelloberfläche nach Behandlung mit Ammoniumchlorid. Unsere Daten zeigen, dass die Oberflächenexpression von Fc γ RII bei 1, 3 und 5 h nach der Infektion in Gegenwart von NH $_4$ Cl nicht erhöht (sondern eher leicht verringert) war ([Abb. 7B](#)). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die beiden rezeptorvermittelten Infektionsprozesse, über ACE2 und Fc γ RII, sehr unterschiedlichen zellulären Wegen folgen.

Immunsere, die durch verschiedene SARS-Impfstoffkandidaten hervorgerufen werden, vermitteln deutlich unterschiedliche Profile der virusneutralisierenden oder -verstärkenden Aktivität. Das SARS-CoV Spike-Glykoprotein, das nachweislich für die Rezeptorbindung an zelluläres ACE2 verantwortlich ist, wurde als vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von Impfstoffen und Therapeutika vermutet ([14](#)). Da wir zuvor berichtet haben, dass Anti-Spike-Seren eine SARS-CoV-Infektion von Immunzellen auslösen können, haben wir nun die humoralen Immunantworten verglichen, die durch fünf humane SARS-CoV-Spike-basierte Immunogene ausgelöst werden.

Die Präparate bestanden entweder aus einem ganzen abgetöteten SARS-CoV-Virus (WKV) oder aus rekombinanten SARS-CoV-Spike-Proteinen ([Abb. 8A](#)), die aus Zelllysaten oder Zellkulturüberständen immunaufgereinigt worden waren. Beim ELISA-Vergleich der Bindungsaktivität gegen immobilisiertes rekombinantes SARS-CoV-Spike-Protein in voller Länge zeigten alle Seren außer der Kontrollgruppe eine ähnliche Bindungsaktivität gegen rekombinantes Spike ([Abb. 8D](#)). Starke neutralisierende humorale Immunantworten gegen SARS-CoVpp wurden in Seren von Tieren nachgewiesen, die mit rekombinanten Spike-Proteinen oder ganzen abgetöteten SARS-CoV-*Virionen* immunisiert wurden ([Abb. 8B](#)). Seren, die durch Immunisierung mit Ssol und WKV hervorgerufen wurden, zeigten die höchste Neutralisationsfähigkeit mit 50% neutralisierenden Titern von etwa 1/15.000 bzw. 1/12.000, gefolgt von Seren, die mit S1 (1/8.000), S (1/4.000) und S.ECD (1/3.000) immunisiert wurden. Wie erwartet, wurde praktisch keine Hemmung des SARS-CoVpp-Eintrags in VeroE6-Zellen mit Kontrollserum von spiegelbildlich immunisierten BALB/c-Mäusen beobachtet. Als die Seren auf ihre Fähigkeit, ADE auszulösen, getestet wurden, fielen sie in zwei unterschiedliche Gruppen ([Abb. 8C](#)). Während das Serum von WKV- und S.ECD-immunisierten Mäusen keinen Effekt hatte, lösten die Ssol-, S1- und S-Immunsere die Infektion der Raji-Zellen aus. Wir schlussfolgerten, dass diese Unterschiede die Folge der spezifischen Immunantwort sein könnten, die durch die verschiedenen Immunogene und Immunisierungsprotokolle ausgelöst wurde, und bestimmten daher die relative Menge der Anti-Spike-IgG-Subklassen der Immunsere ([Abb. 8D](#)). Bemerkenswert ist, dass die ADE-induzierenden Seren keine Anti-Spike-IgG2a-Antikörper enthielten, die in allen neutralisierenden/nicht verstärkenden Seren vorhanden waren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die relativen Mengen der IgG-Subklasse bei der Bestimmung des Auftretens einer Antikörper-vermittelten Infektion mit SARS-CoV eine Rolle spielen könnten.

- [In neuer Registerkarte öffnen](#)
- [Powerpoint herunterladen](#)

Abb. 8.

Auftreten von ADE der SARS-CoV-Infektion nach Immunisierung mit verschiedenen Impfstoffkandidaten. (A) Schematische Darstellung der verschiedenen Formen des rekombinanten SARS-CoV-Spike-Proteins, das zur Impfung von BALB/c-Mäusen verwendet wurde. Die Positionen der verschiedenen Regionen sind entsprechend der Swiss-Prot-Zugangsnummer angegeben. [P59594](#). (B und C) Neutralisierende und verstärkende Fähigkeiten von Antiseren, die nach Immunisierung mit verschiedenen SARS-Impfstoffkandidaten hervorgerufen wurden. SARS-CoVpp wurden in Gegenwart einer 2-fachen seriellen Verdünnung (1/1.1000 bis 1/16.000) von entweder Kontroll- oder Anti-Spike-Serum für 1 h inkubiert, bevor sie zu VeroE6-Zellen (B) (Neutralisationsassay) oder Raji-Zellen (C) (ADE-Assay) gegeben wurden. 3 Tage nach der Infektion wurde das Luciferase-Substrat-Reagenz in die Vertiefungen gegeben und die Lumineszenz gemessen. Fünf unabhängige Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, und die Daten sind als Mittelwert \pm SD eines repräsentativen Experiments dargestellt. (D) IgG-Zusammensetzung des Immunsersums von Mäusen, die mit den angegebenen Immunogenen geimpft wurden. Die Bindungsaktivität gegenüber immobilisiertem rekombinantem SARS-CoV-Spike-Protein aus gepooltem Serum (1/2.000 Verdünnung) wurde mittels ELISA gemessen, und gebundene IgGs wurden mit spezifischen polyklonalen Sekundärantikörpern nachgewiesen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm die SD von dreifachen Messungen ausgedrückt. Wenn nicht sichtbar, waren die SD-Werte in der Größe der Symbole enthalten.

DISKUSSION

Die Möglichkeit, dass eine Immunantwort auf Pathogene auch schädliche Auswirkungen auf die Homöostase des Wirts haben kann, stand im Mittelpunkt mehrerer Studien. Zum Beispiel wurde die Hyperinduktion von Zytokinen nach einer Infektion mit dem Vogelgrippevirus mit der Schwere der Erkrankung in Verbindung gebracht (47), und es ist bekannt, dass die Infektion von Zellen durch Antikörper-abhängige Verstärkung bei mehreren viralen Erkrankungen auftritt (59, 60). Wir zeigen hier, dass Anti-Spike-Antikörper die Infektion von Immunzellen durch SARS-Spike-pseudotypisierte lentivirale Partikel und replikationskompetente SARS-Coronaviren potenzieren. Die Antikörper-vermittelte Infektion ist abhängig von einem Subtyp des Fcγ-Rezeptors, FcγRII (CD32). Die durch FcγRII vermittelte ADE nutzt jedoch nicht den endosomalen/lysosomalen Weg, der von ACE2-gebundenen Viren genutzt wird, d.h. dem üblichen zellulären Rezeptor für SARS-CoV in empfänglichen Zellen. Schließlich haben wir Hinweise darauf gefunden, dass dieses ADE-Phänomen von der für die Impfstoffkandidaten verwendeten Immunisierungsstrategie abhängig ist.

Wir und andere (14, 15, 51) kamen zu dem Schluss, dass das SARS-CoV Spike-Glykoprotein, das nachweislich für die Anheftung und den Eintritt des Virus verantwortlich ist, ein wichtiges Ziel für die Entwicklung von SARS-Impfstoffen darstellt. Aufgrund früherer Berichte über eine immunvermittelte Verstärkung der Coronavirus-Infektion sowohl *in vitro* (8, 44, 73) als auch *in vivo* (65, 68) untersuchten wir diese Möglichkeit und berichteten über vorläufige Daten, dass ein neutralisierendes, Anti-Spike-Immuneserum eine ADE von SARS-CoVpp induziert (30). Die Wirkung von antiviralen SARS-CoV-Antikörpern auf ADE wurde in empfänglichen Zellen untersucht, aber es wurden widersprüchliche Daten veröffentlicht. Eine Gruppe wies eine Antikörper-abhängige Verstärkung von lentiviralen Partikeln nach, die mit SARS-CoV-Spike-Varianten pseudotypisiert waren, die bei Palmzibetkatzen nachgewiesen wurden, wenn sie mit monoklonalen Antikörpern aus Nagetieren (Impfstoff-ausgelöst) und rekonvaleszenten SARS-Patienten inkubiert wurden (73). Im Gegensatz dazu fand eine andere Gruppe unter Verwendung von Panels von isogenem SARS-CoV keine Hinweise auf ein infektionsverstärkendes Potenzial mit einer Reihe von monoklonalen Antikörpern (50).

Unsere Experimente zeigen schlüssig mit mehreren Beweislinien, dass sowohl SARS-CoVpp als auch replikationskompetentes SARS-Coronavirus bestimmte Immunzellen nur in Anwesenheit von Anti-Spike-Immuneserum und nicht in dessen Abwesenheit infizieren. Darüber hinaus haben wir festgestellt, dass homologes Anti-Spike-Immuneserum die Infektion der permissiven Epithelzelllinie VeroE6 niemals potenziert.

In Zellen, die über den ADE-Weg infiziert wurden, wiesen wir sowohl genomisches als auch subgenomisches Material von SARS-CoV nach, sowie die Expression von zwei viralen Proteinen, N und M. Es wird vermutet, dass ein Antikörper-vermittelter Infektionsweg SARS-CoV zusätzliche Eintrittswege bieten könnte, die es dem Virus ermöglichen, seinen Tropismus zu erweitern. Interessanterweise konnten wir früh nach einer ADE-Infektion weitaus mehr (ca. 50- bis 100-fach) SARS-CoV-positive RNAs im Vergleich zu seinem negativen Strang nachweisen, eine Situation, die bei der produktiven Replikation von Coronaviren zu finden ist (55) und sich von der abortiven Replikation von SARS-CoV unterscheidet, die nach einer direkten Infektion von Makrophagen berichtet wurde (7). Obwohl wir durch den Nachweis der *de novo*-Synthese der viralen Strukturproteine N und M eine laufende Infektion eindeutig nachweisen konnten, unterstützten die ADE-infizierten Raji-Zellen keine produktive Replikation von SARS-CoV. Nach der Initiierung der viralen Gentranskription und der viralen Proteinsynthese scheint es zu einem Block im Replikationsprozess zu kommen, der schließlich in einem abortiven viralen Zyklus ohne nachweisbare Freisetzung von Progeny-Viren endet (12). Ob ADE in anderen Immunzellen auftritt und ob eine solche Infektion abortiv verläuft, muss noch untersucht werden.

Obwohl es nicht zu einer produktiven Infektion kommt, bleibt es von Interesse, die Funktionalität und das Zellschicksal von ADE-infizierten Zellen zu untersuchen. So induzierte die ADE-Infektion die Initiierung der viralen Gentranskription - mit der Produktion von viralen Gen-Zwischenspezies - und der viralen Proteinsynthese. Angesichts der Fähigkeit intrazellulärer Sensoren des angeborenen Immunsystems, wie der Mustererkennungsrezeptorfamilien TLR und RLH, virale Genspezies zu erkennen (2, 69) und der Störung der Zellhomöostase durch virale SARS-CoV-Proteine (wie das 3a-Protein und die SARS-unique domain) (5, 36, 63), kann eine mögliche Beteiligung einer immunvermittelten verstärkten Erkrankung während der SARS-Pathogenese nicht

ausgeschlossen werden. Bemerkenswert ist, dass klinische Beobachtungen bereits über schlechte Krankheitsverläufe bei früh serokonvertierten SARS-Patienten berichtet haben ([22](#), [37](#), [76](#)).

Die Beobachtung einer Veränderung des Tropismus von SARS-CoV in Anwesenheit von antiviralem Immenserum unterscheidet die ADE der SARS-CoV-Infektion von vielen anderen Beispielen einer antikörpervermittelten Virusinfektion, bei der die Anwesenheit von antiviralen Antikörpern die Viruslast aufgrund der Infektion einer höheren Anzahl von bereits empfänglichen Zellen erhöht ([59](#), [60](#)). Bemerkenswert ist, dass eine Verschiebung des Tropismus von Epithel- zu Immunzellen, wenn auch durch einen anderen Mechanismus vermittelt, mit einem erhöhten Schweregrad der Erkrankung während des Verlaufs der tödlichen Coronavirus-induzierten infektiösen Peritonitis bei Katzen in Verbindung gebracht wurde ([52](#)).

FcγR-Blockierungsexperimente zeigen eindeutig die Beteiligung von FcγRII am Auftreten der ADE-Infektion von Raji- und Daudi-Zellen. Da jedoch sowohl Anti-FcγRI- als auch Anti-FcγRII-Behandlungen einen Einfluss auf das Auftreten der ADE-Infektion von THP-1-Zellen hatten, konnte keine eindeutige Aussage über den möglichen Beitrag von FcγRI getroffen werden. Aufgrund der Koexpression der beiden FcγR in dieser Zelllinie (vgl. [Abb. 5B](#), wo ~100% der Zellen FcγRI und FcγRII exprimierten), konnten blockierende Antikörper tatsächlich nicht nur an den anvisierten FcγR über ihre Fab-Anteile, sondern auch an andere FcγR über ihre Fc-Anteile binden. So konnte z. B. der Maus-IgG1-Anti-FcγRI-Antikörper über seine Fab-Anteile spezifisch an FcγRI und über seinen Fc-Anteil an FcγRII binden, wodurch beide FcγR für die Interaktion mit opsonierten Pseudopartikeln nicht mehr verfügbar waren. Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir uns entschlossen, eine systematische Analyse der individuellen Rolle der menschlichen Fcγ-Rezeptor-Subfamilien vorzunehmen. Unsere Experimente zeigen, dass nur FcγRIIA und in geringerem Maße FcγRIIB1 eine Infektion durch SARS-CoVpp in Gegenwart von Anti-Spike-Serum auslösen. Diese Ergebnisse erweitern unsere Beobachtungen mit FcγR-blockierenden Antikörpern in Raji-Zellen ([30](#)), da in dieser Zelllinie nur FcγRII, aber nicht FcγRI oder FcγRIII vorkommt. Angesichts der IgG-Zusammensetzung des in der vorliegenden Studie verwendeten Anti-Spike-Immunsersums und der Unfähigkeit von FcγRI und FcγRIII, Maus-IgG1 zu binden ([10](#)), sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um die Beteiligung dieser Rezeptoren an der Auslösung der ADE von SARS formell auszuschließen.

Trotz dieser Ergebnisse, die auf eine wichtige Rolle der FcγRII-Familie beim Auftreten von ADE von SARS-CoV hindeuten, muss unsere Schlussfolgerung durch die Beobachtung relativiert werden, dass andere humane Immunzelllinien (wie K-562, U-937, MT4-R5 und 721.221), die ebenfalls eine durchflusszytometrisch nachweisbare Zelloberflächenexpression von FcγRII aufweisen, gegenüber einer ADE-Infektion refraktär sind. Die Fähigkeit dieser Zelllinien, SARS-CoVpp/Anti-Spike-Immunkomplexe zu binden, wird nun untersucht. Wenn eine Bindung und/oder Internalisierung stattfindet, wäre es auch von Interesse, sicherzustellen, dass das Scheitern der Infektion nicht auf die Unfähigkeit der Viruspartikel zurückzuführen ist, sich in diesen Zellen zu entmanteln/eine Replikation zu initiieren. Um schließlich den Mechanismus genauer zu definieren, der der Anfälligkeit von Immunzellen für eine Antikörper-vermittelte SARS-CoV-Infektion zugrunde liegt, ist ein besseres Verständnis der Ereignisse erforderlich, die der Bindung der Immunkomplexe an die Fc-Rezeptoren nachgeschaltet sind.

Virale Glykoproteine vermitteln typischerweise die Anheftung, Fusion und den Eintritt durch einen von zwei Mechanismen. Einige Viren, wie z. B. HIV, infizieren hauptsächlich über einen pH-unabhängigen Eintrittsprozess (die Fusion findet an der Plasmamembran statt), während andere Viren, wie z. B. Influenza, einen pH-abhängigen endozytischen Weg nutzen ([31](#)). Es konnte gezeigt werden, dass der Eintritt von SARS-CoV in empfängliche Zellen nach Bindung an seinen ACE2-Rezeptor über pH-abhängige Endozytose erfolgt ([24](#), [71](#)), obwohl das Spike-Protein auch bei neutralem pH-Wert die Zellfusion induzieren kann ([40](#), [57](#)). In jüngerer Zeit wurde eine entscheidende Aktivität der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin L für eine effiziente Infektion durch SARS-CoV aufgedeckt ([26](#), [56](#)). Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse, dass die Fc-Rezeptor-vermittelte Infektion weder vom sauren endosomalen pH-Wert noch von der Aktivität der Cysteinproteasen abhängig ist.

Eine auffällige Beobachtung war das entgegengesetzte Ergebnis der ACE2- versus FcγR-vermittelten Infektion nach Neutralisierung des endosomalen sauren pH-Wertes. Während die Infektion von VeroE6-Zellen, wie zuvor beschrieben ([24](#), [71](#)), durch NH₄Cl vollständig gehemmt wurde, löste die gleiche Behandlung eine etwa 2- bis 4-fache Steigerung der ADE-Infektion aus. Die Verschlimmerung der Antikörper-vermittelten Infektion in Gegenwart von NH₄Cl ist nicht auf eine höhere Zelloberflächenexpression des FcγRII zurückzuführen, die sogar leicht vermindert war. Eine wahrscheinliche Erklärung für unsere Ergebnisse wäre, dass die meisten viralen Partikel, die über den ADE-Weg in die Zellen gelangen, in einem sauren Kompartiment gefangen

bleiben und schließlich abgebaut werden. Die Hemmung der endosomalen Ansäuerung verhindert ihren Abbau und gibt ihnen die Möglichkeit, sich zu akkumulieren und die Zellen nach Entfernung des Medikaments um 7 h postinfektiös effizienter zu infizieren. Alternativ könnte die Fähigkeit von Spike, die Zellmembranfusion bei neutralem pH-Wert zu vermitteln ([40](#), [57](#)), dazu führen, dass mehr Antikörper-opsonisierte SARS-CoVpp mit den endosomalen Membranen fusionieren. Ein solcher Mechanismus wurde bereits bei einem wenig infektiösen HIV-Stamm beobachtet, der unter Bedingungen, bei denen der endosomale pH-Wert neutralisiert war, eine stark erhöhte Infektiosität aufwies ([16](#), [67](#)). Zusammengenommen zeigen unsere Ergebnisse, dass sich die biochemischen Anforderungen der FcγR-vermittelten Infektion deutlich von denen unterscheiden, die dem ACE2-abhängigen Eintritt zugrunde liegen, und veranschaulichen einen neuartigen Mechanismus, durch den SARS-CoV in Zielzellen eindringen kann.

Das Auftreten von SARS Ende 2002, das zu erheblichen menschlichen und wirtschaftlichen Verlusten führte, machte den Mangel an antiviralen Strategien zur Kontrolle von Coronavirus-Infektionen deutlich. Angesichts der kontinuierlichen Präsenz von SARS-CoV-varianten Erregern im Umweltreservoir bleibt die Impfung eine wichtige Option zur Verhinderung eines erneuten Auftretens von SARS beim Menschen, insbesondere bei Personen, die im Falle eines Ausbruchs am stärksten gefährdet sind (d. h. Mitarbeiter im Gesundheitswesen). Einige Impfstoffe gegen tierische Coronaviren wurden bereits erfolgreich hergestellt, ihre Entwicklung hat sich jedoch aufgrund der Immunverstärkung der Krankheit bei geimpften Empfängern als sehr schwierig erwiesen ([28](#), [53](#), [65](#)).

Wir haben daher die neutralisierenden gegenüber den verstärkenden Fähigkeiten von 5 verschiedenen SARS-Impfstoff-Formulierungen untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass ADE von der Immunisierungsstrategie abhängig war, wobei zwei der fünf Impfstoffkandidaten offensichtliche neutralisierende Fähigkeiten zeigten, ohne den Eintritt von SARS-CoVpp in Immunzellen auszulösen. Es ist nicht klar, warum die anderen drei Formulierungen ADE induzierten, obwohl sie ähnliche neutralisierende Potenzen zeigten. Eine fehlende Erkennung/Bindung an SARS-CoVpp können wir ausschließen, da alle getesteten Seren eine deutliche dosisabhängige Neutralisation der viralen Partikel über mindestens vier Verdünnungsreihen zeigten. Darüber hinaus war der Gesamt-IgG-Gehalt zwischen den immunisierten Kohorten vergleichbar, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, die erwartungsgemäß eine geringere Menge aufwies (Daten nicht gezeigt).

Im FCoV-Modell wurde die ADE sowohl mit neutralisierenden als auch mit nicht-neutralisierenden Antikörpern in Verbindung gebracht ([8](#)). In unseren Experimenten haben wir beobachtet, dass unter den Seren, die ADE verursachen, eine direkte Korrelation zwischen dem Neutralisationstiter und der Verstärkungsfähigkeit bestand. Da Anti-SARS-CoV-Spike-Seren in der Lage waren, sowohl die SARS-CoVpp-Infektion zu neutralisieren als auch das native rekombinante Spike-Protein in voller Länge mit ähnlicher Potenz zu binden (d. h. $S_{sol} \approx WKV \gg S_1 > S \geq S.ECD$), spekulieren wir, dass die Impfung mit einem bestimmten Immunogen keine ausgeprägte Verzerrung bei der Hervorrufung von nicht-neutralisierenden Anti-Spike-IgGs bewirkt hat. Wir können jedoch nicht ausschließen, dass Variationen im Verhältnis von neutralisierenden zu nicht-neutralisierenden Epitopen zwischen den Impfstoffpräparaten einen Einfluss auf das Auftreten von ADE haben könnten.

Da eine einzelne Klasse von Anti-FCoV-Spike-Antikörpern (d. h. IgG2a) nachweislich eine entscheidende Rolle bei der Auslösung von ADE spielt ([8](#), [25](#)), haben wir die relative Menge von Anti-Spike-IgG1 und IgG2a in unseren Mäuseseren untersucht. Interessanterweise enthielt keines der ADE-auslösenden Seren Anti-Spike-IgG2a-Antikörper, während die beiden neutralisierenden/nicht-auslösenden Seren dies taten. Weitere Experimente sind erforderlich, um zu verstehen, warum eine deutlich unterschiedliche Polarisierung der Immunantwort mit hochverwandten SARS-CoV-Spike-Immunogenen erreicht wurde und ob das Fehlen von IgG2a kausal mit dem Auftreten einer ADE-Infektion zusammenhängt.

Vor kurzem wurde ein allelischer Polymorphismus des menschlichen FcγRIIA als Risikofaktor für die Entwicklung einer schweren SARS-Pathologie inkriminiert ([75](#)). Die Autoren dieser Studie fanden heraus, dass Personen mit dem Genotyp R/R131 eine höhere Wahrscheinlichkeit hatten, eine schwere SARS-Pathologie zu entwickeln, als ihre H/H131-Pendants. Die R/R131-Form von FcγRIIA kann sowohl an IgG1 als auch an IgG2a binden, während H/H131 nur an IgG2a binden kann ([48](#), [54](#)). In unseren Transduktionsexperimenten mit B-Zellklonen, die ein einzelnes polymorphes FcγRIIA stabil exprimieren, waren jedoch beide allelischen Varianten in der Lage, ADE von SARS-CoVpp auszulösen.

Es besteht in der Regel Einigkeit darüber, dass eine Infektion durch SARS-CoV nicht nur auf den Respirationstrakt beschränkt ist, sondern auch den Gastrointestinaltrakt und andere Organsysteme mit einbezieht. Mehrere Berichte haben die direkte Infektion hämatopoetischer Zellen durch SARS-CoV

hervorgehoben ([19](#), [39](#), [74](#)); es ist jedoch noch nicht klar, wie SARS-CoV in Immunzellen, die den SARS-CoV-Rezeptor ACE2 nicht exprimieren, Fuß fassen kann ([20](#), [21](#)). Die Antikörper-vermittelte Infektion, zusätzlich zu anderen alternativen Eintrittswegen, wie L-SIGN oder DC-SIGN ([29](#), [71](#)), könnte SARS-CoV eine Möglichkeit bieten, seine Zieloptionen zu erweitern. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass die Antikörper-vermittelte Infektion deutlich andere Reaktionen hervorruft als der Viruseintritt über den natürlichen Wirtsrezeptor ([23](#), [45](#), [58](#), [62](#)). Tatsächlich erhöht eine Antikörper-vermittelte Infektion des feline Coronavirus nicht nur die virale Nachkommenschaft, sondern auch die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor alpha durch infizierte Zellen dramatisch. Es wird angenommen, dass die Hyperinduktion des proinflammatorischen Zytokins für die verstärkte Apoptose der benachbarten Leukozyten verantwortlich ist ([61](#), [62](#)). In ähnlicher Weise wurde gezeigt, dass ADE des Ross-Fluss-Virus die virale Replikation durch Störung der Transkription von antiviralen Typ-I-Interferonen erleichtert ([58](#)). Da die Hypothese aufgestellt wurde, dass die Deregulierung der Zytokin-/Chemokin-Reaktionen des Wirts ein Kennzeichen von SARS ist ([7](#), [27](#), [35](#), [43](#), [70](#)), wäre es interessant zu untersuchen, wie ADE der SARS-CoV-Infektion zur Pathogenese der Krankheit beitragen kann.

Insgesamt berichten unsere Ergebnisse über einen neuartigen Mechanismus, durch den SARS-CoV in Zielzellen eindringen kann, die den herkömmlichen Virusrezeptor nicht exprimieren und ansonsten refraktär gegenüber dem Virus sind. Dies könnte Auswirkungen auf das Verständnis des Tropismus und der Pathogenese des Virus haben und mögliche Fallstricke bei der Immunisierung gegen dieses Coronavirus aufzeigen. Diese Befunde sollten Anlass für weitere Untersuchungen zum besseren Verständnis der molekularen und zellulären Mechanismen sein, die der ADE einer SARS-CoV-Infektion zugrunde liegen. Die Konsequenzen dieses alternativen Infektionsweges auf die Funktionalität und/oder Homöostase der Zielzellen müssen ebenfalls geklärt werden.

DANKSAGUNGEN

Wir danken Rik Gijbers und Zeger Debyser (Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgien) für die Bereitstellung des bicistronischen retroviralen Vektors, der zur Etablierung der FcγR-exprimierenden stabilen Zelllinien verwendet wurde. Wir danken auch Clark L. Anderson (Ohio State University, Columbus, OH), Jacob J. Schlesinger (University of Rochester Medical Center, Rochester, NY), Jean-Pierre Kinet (Harvard Medical School, Boston, MA) und Lewis L. Lanier (University of California, San Francisco, CA) für die großzügige Bereitstellung von Original-cDNAs für humanes FcγRIIA (CD64a), FcεRγ-Kette bzw. FcγRIIIA (CD16a). Wir danken auch Kwok Hung Chan (Queen Mary Hospital, Pokfulam, Hongkong, Volksrepublik China) für die Bereitstellung des monoklonalen Maus-Antikörpers (4D11), der spezifisch für das SARS-CoV-Nukleoprotein ist, und Valérie Lorin (Institut Pasteur, Paris, Frankreich) für die fachliche technische Unterstützung. Schließlich danken wir den Mitgliedern des HKU-Pasteur-Forschungszentrums für fachliche Beratung und hilfreiche Diskussionen.

Diese Studie wurde durch den Research Fund for the Control of Infectious Disease (Projekte 05050182 und 09080872) der Regierung von Hongkong, durch das RESPARI-Projekt des Institut Pasteur International Network und zum Teil durch Zuschüsse von GlaxoSmithKline Biologicals unterstützt. B.C. wurde durch ein Stipendium von GlaxoSmithKline Biologicals unterstützt.

FOTNOTEN

- Empfangen am 4. April 2011.
- Angenommen am 5. Juli 2011.

- Akzeptiertes Manuskript online veröffentlicht am 20. Juli 2011.
 - Copyright © 2011, Amerikanische Gesellschaft für Mikrobiologie. Alle Rechte vorbehalten.
-

REFERENZEN

1. [1](#)

1. Bisht H. ,
2. und andere
. 2004. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus immunisiert schützend Mäuse. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**: 6641-6646.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

2. [2](#)

1. Brennan K. ,
2. Bowie A. G.
. 2010. Aktivierung von Wirtsmustererkennungsrezeptoren durch Viren. Curr. Opin. Microbiol. **13**: 503–507.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

3. [3](#)

1. Buchholz U. J. ,
2. und andere
. 2004. Beiträge der Strukturproteine des schweren akuten respiratorischen Syndroms Coronavirus zur schützenden Immunität. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**: 9804-9809.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

4. [4](#)

1. Callendret B. ,
2. und andere
. 2007. Heterologe virale RNA-Exportelemente verbessern die Expression des Coronavirus-Spike-Proteins des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS) und die schützende Wirksamkeit von DNA-Impfstoffen gegen SARS. Virologie **363**: 288-302.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

5. [5](#)

1. Chan C. M. ,
2. und andere

. 2009. Die Ionenkanal-Aktivität des SARS-Coronavirus 3a-Proteins ist mit seiner pro-apoptotischen Funktion verbunden. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**: 2232-2239.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

6. [6, ↗](#)

1. Chen J. ,
2. Subbarao K.

. 2007. Die Immunbiologie von SARS*. *Annu. Rev. Immunol.* **25**: 443–472.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

7. [7, ↗](#)

1. Cheung C. Y. ,
2. und andere

. 2005. Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *J. Virol.* **79**: 7819–7826.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

8. [8, ↗](#)

1. Corapi W. V. ,
2. Olsen C. W. ,
3. Scott F. W.

. 1992. Monoklonale Antikörper-Analyse der Neutralisierung und Antikörper-abhängigen Verstärkung des felines infektiösen Peritonitis-Virus. *J. Virol.* **66**: 6695–6705.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

9. [9, ↗](#)

1. Daëron M.

. 1997. Fc-Rezeptor-Biologie. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 203–234.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

10. [10, ↗](#)

1. Daëron M.

. 1999. Fc-Rezeptoren, S. 43-121. *In* Zanetti M., Capra J. D. (ed.), *The antibodies*, vol. 5. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Niederlande.

[Google Scholar](#)

11. [11, ↗](#)

1. Daniel C. ,
2. Talbot P. J.

. 1990. Schutz vor tödlicher Coronavirus-Infektion durch affinitätsgereinigtes Spike-Glykoprotein des murinen Hepatitis-Virus, Stamm A59. *Virology* **174**: 87–94.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

12. [12](#)

1. David A. ,

2. und andere

. 2006. Das Engagement von aktivierenden FcγRs hemmt die Replikation von Primaten-Lentiviren in menschlichen Makrophagen. *J. Immunol.* **177**: 6291–6300.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

13. [13](#)

1. Drosten C. ,

2. und andere

. 2003. Identifizierung eines neuartigen Coronavirus bei Patienten mit schwerem akutem respiratorischem Syndrom. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1967–1976.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

14. [14](#)

1. Du L. ,

2. und andere

. 2009. Das Spike-Protein von SARS-CoV: ein Ziel für die Entwicklung von Impfstoffen und Therapien. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 226–236.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

15. [15](#)

1. Enjuanes L. ,

2. und andere

. 2008. Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease. *Virus Res.* **133**: 45-62.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

16. [16](#)

1. Fredericksen B. L. ,

2. Wei B. L. ,

3. Yao J. ,

4. Luo T. ,

5. Garcia J. V.

. 2002. Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **76**: 11440–11446.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

17. [17](#)

1. Fridman W. H. ,

2. und andere

. 1993. Lösliche Fcγ-Rezeptoren. J. Leukoc. Biol. **54**: 504-512.

[PubMedWeb der Wissenschaft](#)[Google Scholar](#)

18. [18](#)

1. Gillim-Ross L. ,

2. und andere

. 2004. Entdeckung neuer menschlicher und tierischer Zellen, die mit dem Coronavirus des schweren akuten respiratorischen Syndroms infiziert sind, durch replikationsspezifische Multiplex-Reverse-Transkriptions-PCR. J. Clin. Microbiol. **42**: 3196–3206.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

19. [19](#)

1. Gu J. ,

2. und andere

. 2005. Multiple Organinfektion und die Pathogenese von SARS. J. Exp. Med. **202**: 415–424.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

20. [20](#)

1. Hamming I. ,

2. und andere

. 2004. Gewebeverteilung des ACE2-Proteins, des funktionellen Rezeptors für das SARS-Coronavirus: ein erster Schritt zum Verständnis der SARS-Pathogenese. J. Pathol. **203**: 631–637.

[CrossRefPubMedWeb der Wissenschaft](#)[Google Scholar](#)

21. [21](#)

1. Harmer D. ,

2. Gilbert M. ,

3. Borman R. ,

4. Clark K. L.

. 2002. Quantitative mRNA-Expressionsprofile von ACE 2, einem neuen Homolog des Angiotensin Converting Enzyms. FEBS Lett. **532**: 107–110.

[CrossRefPubMedWeb der Wissenschaft](#)[Google Scholar](#)

22. [22](#)

1. Ho M. S. ,
2. und andere

. 2005. Neutralisierende Antikörperreaktion und Schweregrad von SARS. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 1730–1737.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

23. [23](#)

1. Hober D. ,
2. Chehadeh W. ,
3. Bouzidi A. ,
4. Watre P.

. 2001. Antikörper-abhängige Verstärkung der Coxsackievirus B4-Infektiosität von humanen peripheren mononukleären Blutzellen führt zu erhöhter Interferon-alpha-Synthese. *J. Infect. Dis.* **184**: 1098–1108.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

24. [24](#)

1. Hofmann H. ,
2. und andere

. 2004. Das S-Protein des schweren akuten respiratorischen Syndroms-assozierten Coronavirus vermittelt den Eintritt in Hepatomzelllinien und wird von neutralisierenden Antikörpern in infizierten Patienten angegriffen. *J. Virol.* **78**: 6134–6142.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

25. [25](#)

1. Hohdatsu T. ,
2. und andere

. 1998. Antikörper-abhängige Verstärkung der Infektion mit dem felines infektiösen Peritonitis-Virus in felines alveolären Makrophagen und der menschlichen Monozyten-Zelllinie U937 durch Serum von Katzen, die experimentell oder natürlich mit dem felines Coronavirus infiziert sind. *J. Vet. Med. Sci.* **60**: 49-55.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

26. [26](#)

1. Huang I. C. ,
2. und andere

. 2006. Das SARS-Coronavirus, aber nicht das humane Coronavirus NL63, nutzt Cathepsin L, um ACE2-exprimierende Zellen zu infizieren. *J. Biol. Chem.* **281**: 3198–3203.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

27. [27](#)

1. Huang K. J. ,
 2. und andere
- . 2005. Ein Interferon-gamma-bezogener Zytokinsturm bei SARS-Patienten. J. Med. Virol. **75**: 185–194.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

28. [28](#)

1. Huisman W. ,
 2. Martina B. E. ,
 3. Rimmelzwaan G. F. ,
 4. Gruters R. A. ,
 5. Osterhaus A. D.
- . 2009. Impfstoff-induzierte Verstärkung von viralen Infektionen. Vaccine **27**: 505–512.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

29. [29](#)

1. Jeffers S. A. ,
 2. und andere
- . 2004. CD209L (L-SIGN) ist ein Rezeptor für das schwere akute respiratorische Syndrom Coronavirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**: 15748-15753.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

30. [30](#)

1. Kam Y. W. ,
 2. und andere
- . 2007. Antikörper gegen trimeres S-Glykoprotein schützen Hamster vor einer SARS-CoV-Herausforderung trotz ihrer Fähigkeit, FcγRII-abhängigen Eintritt in B-Zellen in vitro zu vermitteln. Vaccine **25**: 729-740.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

31. [31](#)

1. Kielian M. ,
 2. Rey F. A.
- . 2006. Virusmembran-Fusionsproteine: mehr als ein Weg, eine Haarnadel zu machen. Nat. Rev. Microbiol. **4**: 67–76.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

32. [32](#)
1. Kuiken T. ,
 2. und andere
- . 2003. Neu entdecktes Coronavirus als Hauptursache des schweren akuten respiratorischen Syndroms. Lancet **362**: 263-270.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

33. [33](#)
1. Lanier L. L. ,
 2. Yu G. ,
 3. Phillips J. H.
- . 1989. Co-Assoziation von CD3 ζ mit einem Rezeptor (CD16) für IgG Fc auf menschlichen natürlichen Killerzellen. Nature **342**: 803-805.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

34. [34](#)
1. Lau S. K. ,
 2. und andere
- . 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102**: 14040-14045.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

35. [35](#)
1. Gesetz H. K. ,
 2. und andere
- . 2005. Chemokin-Hochregulation in SARS-Coronavirus-infizierten, von Monozyten abgeleiteten menschlichen dendritischen Zellen. Blood **106**: 2366-2374.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

36. [36](#)
1. Gesetz P. T. ,
 2. und andere
- . 2005. Das 3a-Protein des schweren akuten respiratorischen Syndroms-assoziierten Coronavirus induziert Apoptose in Vero E6-Zellen. J. Gen. Virol. **86**: 1921–1930.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

37. [37](#)
1. Lee N. ,

2. und andere

. 2006. Anti-SARS-CoV-IgG-Antwort in Relation zur Krankheitsschwere des schweren akuten respiratorischen Syndroms. *J. Clin. Virol.* **35**: 179–184.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

38. [38](#)

1. Letourneur O. ,

2. und andere

. 1991. Charakterisierung der Familie der mit Fc-Rezeptoren assoziierten Dimere (Fc epsilon RI und Fc gamma RIII). *J. Immunol.* **147**: 2652–2656.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

39. [39](#)

1. Li L. ,

2. und andere

. 2003. Das SARS-Koronavirus repliziert in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von SARS-Patienten. *J. Clin. Virol.* **28**: 239–244.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

40. [40](#)

1. Li W. ,

2. und andere

. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**: 450-454.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

41. [41](#)

1. Miller K. L. ,

2. Duchemin A. M. ,

3. Anderson C. L.

. 1996. Eine neue Rolle für die Fc-Rezeptor-Gamma-Untereinheit: Verstärkung der Fc-Gamma-R-Ligandenaffinität. *J. Exp. Med.* **183**: 2227–2233.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

42. [42](#)

1. Nefkens I. ,

2. und andere

. 2007. Hämagglutinin-pseudotypisierte lentivirale Partikel: Charakterisierung einer neuen Methode zur Serodiagnose der aviären H5N1-Influenza. *J. Clin. Virol.* **39**: 27–33.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

43. [43](#)

1. Nicholls J. M. ,
2. und andere

. 2003. Lungenpathologie des tödlichen schweren akuten respiratorischen Syndroms. Lancet **361**: 1773-1778.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

44. [44](#)

1. Olsen C. W. ,
2. Corapi W. V. ,
3. Ngichabe C. K. ,
4. Baines J. D. ,
5. Scott F. W.

. 1992. Monoklonale Antikörper gegen das Spike-Protein des feline infektiösen Peritonitis-Virus vermitteln eine Antikörper-abhängige Verstärkung der Infektion von feline Makrophagen. J. Virol. **66**: 956–965.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

45. [45](#)

1. Palmer P. ,
2. Charley B. ,
3. Rombaut B. ,
4. Daëron M. ,
5. Lebon P.

. 2000. Antikörper-abhängige Induktion von Typ-I-Interferonen durch Poliovirus in humanen mononukleären Blutzellen erfordert den Typ-II-Fcγ-Rezeptor (CD32). Virologie **278**: 86-94.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

46. [46](#)

1. Park S. ,
2. und andere

. 1998. Immunantwort von Sauen, die mit abgeschwächten transmissiblen Gastroenteritis-Viren (TGEV) und rekombinanten TGEV-Spike-Protein-Impfstoffen geimpft wurden, und Schutz ihrer Saugferkel vor virulenter TGEV-Exposition. Am. J. Vet. Res. **59**: 1002-1008.

[PubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

47. [47](#)

1. Peiris J. S. ,
2. Cheung C. Y. ,
3. Leung C. Y. ,
4. Nicholls J. M.
. 2009. Angeborene Immunantworten auf Influenza A H5N1: Freund oder Feind? Trends Immunol. **30**: 574–584.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

48. [48](#)
1. Rascu A. ,
 2. Repp R. ,
 3. Westerdaal N. A. ,
 4. Kalden J. R. ,
 5. van de Winkel J. G.
. 1997. Klinische Relevanz von Fc-Gamma-Rezeptor-Polymorphismen. Ann. N. Y. Acad. Sci. **815**: 282-295.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

49. [49](#)
1. Ravetch J. V. ,
 2. Bolland S.
. 2001. IgG Fc-Rezeptoren. Annu. Rev. Immunol. **19**: 275–290.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

50. [50](#)
1. Rockx B. ,
 2. und andere
. 2008. Strukturelle Grundlage für potenten kreuzneutralisierenden humanen monoklonalen Antikörperschutz gegen tödliche humane und zoonotische schwere akute respiratorische Syndrom-Coronavirus-Herausforderung. J. Virol. **82**: 3220–3235.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

51. [51](#)
1. Roper R. L. ,
 2. Rehm K. E.
. 2009. SARS vaccines: where are we? Expert Rev. Vaccines **8**: 887-898.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

52. [52](#)

1. Rottier P. J. ,
2. Nakamura K. ,
3. Schellen P. ,
4. Volders H. ,
5. Haijema B. J.

. 2005. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J. Virol.* **79**: 14122–14130.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

53. [53](#)

1. Saif L. J.

. 2004. Tierische Coronavirus-Impfstoffe: Lehren für SARS. *Dev. Biol. (Basel)* **119**: 129-140.

[PubMedGoogle Gelehrter](#)

54. [54](#)

1. Lachs J. E. ,
2. und andere

. 1996. Fc gamma RIIA-Allele sind vererbare Risikofaktoren für Lupusnephritis bei Afroamerikanern. *J. Clin. Invest.* **97**: 1348–1354.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

55. [55](#)

1. Sawicki S. G. ,
2. Sawicki D. L.

. 1986. Coronavirus-Minus-Strang-RNA-Synthese und Wirkung von Cycloheximid auf die Coronavirus-RNA-Synthese. *J. Virol.* **57**: 328–334.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

56. [56](#)

1. Simmons G. ,
2. und andere

. 2005. Inhibitoren von Cathepsin L verhindern den Eintritt des Coronavirus des schweren akuten respiratorischen Syndroms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 11876-11881.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

57. [57](#)

1. Simmons G. ,
 2. und andere
- . 2004. Charakterisierung des schweren akuten respiratorischen Syndrom-assoziierten Coronavirus (SARS-CoV) Spike-Glykoprotein-vermittelten viralen Eintritts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**: 4240-4245.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

58. [58](#),[↵](#)

1. Suhrbier A. ,
 2. La Linn M.
- . 2003. Unterdrückung der antiviralen Antwort durch Antikörper-abhängige Verstärkung der Makrophageninfektion. Trends Immunol. **24**: 165–168.

[CrossRefPubMedWeb der Wissenschaft](#)[Google Scholar](#)

59. [59](#),[↵](#)

1. Sullivan N. J.
- . 2001. Antikörper-vermittelte Verstärkung von viralen Erkrankungen. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **260**: 145–169.

[PubMedWeb der Wissenschaft](#)[Google Scholar](#)

60. [60](#),[↵](#)

1. Takada A. ,
 2. Kawaoka Y.
- . 2003. Antikörper-abhängige Verstärkung der viralen Infektion: molekulare Mechanismen und in vivo Implikationen. Rev. Med. Virol. **13**: 387–398.

[CrossRefPubMedWeb der Wissenschaft](#)[Google Scholar](#)

61. [61](#),[↵](#)

1. Takano T. ,
 2. und andere
- . 2007. Eine "mögliche" Beteiligung von TNF-alpha an der Apoptoseinduktion in peripheren Blutlymphozyten von Katzen mit feliner infektiöser Peritonitis. Vet. Microbiol. **119**: 121–131.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

62. [62](#),[↵](#)

1. Takano T. ,
2. Hohdatsu T. ,
3. Toda A. ,
4. Tanabe M. ,

5. Koyama H.
. 2007. TNF-alpha, das von mit dem feline infektiösen Peritonitis-Virus (FIPV) infizierten Makrophagen produziert wird, reguliert die Expression des Typ-II-FIPV-Rezeptors feline Aminopeptidase N in feline Makrophagen. *Virologie* **364**: 64-72.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

63. [63](#)

1. Tan J. ,
 2. und andere
- . 2009. Die SARS-unique domain (SUD) des SARS-Coronavirus enthält zwei Makrodomänen, die G-Quadruplexe binden. *PLoS Pathog.* **5**: e1000428.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

64. [64](#).

1. Untergasser A. ,
 2. und andere
- . 2007. Primer3Plus, ein erweitertes Web-Interface zu Primer3. *Nucleic Acids Res.* **35**: W71-W74.

[CrossRefPubMedWeb der WissenschaftGoogle Scholar](#)

65. [65](#)

1. Vennema H. ,
 2. und andere
- . 1990. Früher Tod nach Infektiöser Peritonitis-Virus-Provokation bei Katzen durch rekombinante Vaccinia-Virus-Immunisierung. *J. Virol.* **64**: 1407–1409.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

66. [66](#)

1. Warmerdam P. A. ,
 2. van de Winkel J. G. ,
 3. Gosselin E. J. ,
 4. Kapel P. J.
- . 1990. Molekulare Basis für einen Polymorphismus des menschlichen Fc-Gamma-Rezeptors II (CD32). *J. Exp. Med.* **172**: 19–25.

[Kurzfassung/kostenloser VolltextGoogle Scholar](#)

67. [67](#)

1. Wei B. L. ,
2. und andere

. 2005. Die Hemmung der Lysosom- und Proteasomfunktion verstärkt die Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus Typ 1. J. Virol. **79**: 5705–5712.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

68. [68](#)

1. Weingartl H. ,
2. und andere

. 2004. Immunisierung mit modifiziertem Vaccinia-Virus Ankara-basiertem rekombinantem Impfstoff gegen das schwere akute respiratorische Syndrom ist mit verstärkter Hepatitis bei Frettchen verbunden.

J. Virol. **78**: 12672–12676.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

69. [69](#)

1. Wilkins C. ,
2. Gale M. Jr.

. 2010. Erkennung von Viren durch zytoplasmatische Sensoren. Curr. Opin. Immunol. **22**: 41–47.

[CrossRefPubMedWeb der Wissenschaft](#)[Google Scholar](#)

70. [70](#)

1. Wong C. K. ,
2. und andere

. 2004. Plasma entzündliche Zytokine und Chemokine in schweren akuten respiratorischen Syndrom. Clin. Exp. Immunol. **136**: 95–103.

[CrossRefPubMedWeb der Wissenschaft](#)[Google Scholar](#)

71. [71](#)

1. Yang Z. Y. ,
2. und andere

. 2004. pH-abhängiger Eintritt des schweren akuten respiratorischen Syndrom-Coronavirus wird durch das Spike-Glykoprotein vermittelt und durch dendritische Zellübertragung durch DC-SIGN verstärkt.

J. Virol. **78**: 5642–5650.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

72. [72](#)

1. Yang Z. Y. ,
2. und andere

. 2004. Ein DNA-Impfstoff induziert die Neutralisierung des SARS-Coronavirus und eine schützende Immunität in Mäusen. Nature **428**: 561-564.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

73. [73](#)

1. Yang Z. Y. ,
2. und andere

. 2005. Evasion of antibody neutralization in emerging severe acute respiratory syndrome coronaviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102**: 797-801.

[Kurzfassung/kostenloser Volltext](#)[Google Scholar](#)

74. [74](#)

1. Yilla M. ,
2. und andere

. 2005. SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages. Virus Res. **107**: 93-101.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

75. [75](#)

1. Yuan F. F. ,
2. und andere

. 2005. Einfluss von FcγRIIA- und MBL-Polymorphismen auf das schwere akute respiratorische Syndrom. Tissue Antigens **66**: 291-296.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

76. [76](#)

1. Zhang L. ,
2. und andere

. 2006. Antikörperantworten gegen das SARS-Coronavirus korrelieren mit dem Krankheitsverlauf infizierter Personen. J. Med. Virol. **78**: 1–8.

[CrossRefPubMedGoogle Gelehrter](#)

[Vorherige](#)[Nächste](#)

[Zurück zum Anfang](#)

[PDF herunterladen](#)

[Zitierwerkzeuge](#)

[Drucken](#)

[Alarme](#)

[E-Mail](#)

[Teilen](#)

- [Top](#)
- [Artikel](#)
- [ABSTRACT](#)
- [EINLEITUNG](#)

- [MATERIALIEN UND METHODEN](#)
- [ERGEBNISSE](#)
- [DISKUSSION](#)
- [DANKSAGUNGEN](#)
- [FUSSNOTEN](#)
- [REFERENZEN](#)
- [Zahlen & Daten](#)
- [Infos & Metriken](#)
- [PDF](#)

Verwandte Artikel

Zitiert von...

Über

- [Über JVI](#)
- [Chefredakteur](#)
- [Redaktion](#)
- [Policen](#)
- [Für Prüfer](#)
- [Für die Medien](#)
- [Für Bibliothekare](#)
- [Für Werbetreibende](#)
- [Alarme](#)
- [RSS](#)
- [FAQ](#)
- [Berechtigungen](#)
- [Journal-Ankündigungen](#)

Autoren

- [ASM Autorenzentrum](#)
- [Manuskript einreichen](#)

- [Artikel-Typen](#)
- [Ethik](#)
- [Kontakt](#)

Folgen Sie #Jvirology

@ASMikrobiologie



JVI in Zusammenarbeit mit



American Society
for Virology

Journals.ASM.org

Die ASM-Zeitschriften sind die bekanntesten Publikationen auf diesem Gebiet und bieten eine aktuelle und maßgebliche Berichterstattung sowohl über die grundlegende als auch die klinische Mikrobiologie.

[Über ASM](#) | [Kontakt](#) | [Presseraum](#)

ASM ist ein Mitglied von



Amerikanische Gesellschaft für Mikrobiologie 1752

N St. NW Washington

, DC 20036 Phone

: (202) 737-3600

[Copyright © 2021 Amerikanische Gesellschaft für Mikrobiologie](#) | [Datenschutzrichtlinien](#) | [Website-Feedback](#)

Print ISSN: 0022-538X; Online ISSN: 1098-5514