

[Zum Hauptinhalt springen](#)[Alle Zeitschriften von Nature Research anzeigen](#)
[SucheMein Konto](#)

[Erforschen Sie unseren Inhalt](#)
[Informationen zur Zeitschrift](#)

[natur](#)
[Naturimmunologie](#)
[Artikel](#)
Artikel

Artikel
[Veröffentlicht: 30. September 2020](#)

Von SARS-CoV-2 abgeleitete Peptide definieren die Erkennung heterologer und COVID-19-induzierter T-Zellen

- [Annika Nelde](#) [ORCID:orcid.org/0000-0001-8504-84811](https://orcid.org/0000-0001-8504-84811)^{2,3 na1,}
- [Tatjana Bilich](#) [ORCID:orcid.org/0000-0000-0002-8107-04191](https://orcid.org/0000-0000-0002-8107-04191)^{2,3 na1,}
- [Jonas S. Heitmann](#)^{1,3 na1,}
- [Yacine Maringer](#)^{1,2,3,}
- [Helmut R. Salih](#)^{1,3,4,}
- [Malte Roerden](#) [ORCID:orcid.org/0000-0000-0001-7283-97782](https://orcid.org/0000-0000-0001-7283-97782)^{3,5,}
- [Maren Lübke](#)^{2,}
- [Jens Bauer](#) [ORCID:orcid.org/0000-0000-0003-3731-23851](https://orcid.org/0000-0000-0003-3731-23851)^{2,}
- [Jonas Rieth](#)^{1,2,}

- [Marcel Wacker](#)^{1,2},
- [Andreas Peter](#)⁶,
- [Sebastian Hörber](#) ORCID:orcid.org/0000-0000-0002-5718-15306,
- [Björn Traenkle](#)⁷,
- [Philipp D. Kaiser](#)⁷,
- [Ulrich Rothbauer](#) ORCID:orcid.org/0000-0001-5923-89867⁸,
- [Matthias Becker](#) ORCID:orcid.org/0000-0000-0002-9243-42577,
- [Daniel Junker](#)⁷,
- [Gérard Krause](#) ORCID:orcid.org/0000-0000-0003-3328-88089^{10,11},
- [Monika Strengert](#)^{9,10},
- [Nicole Schneiderhan-Marra](#) ORCID:orcid.org/0000-0000-0001-6785-181X7,
- [Markus F. Templin](#) ORCID:orcid.org/0000-0000-0002-6569-64897,
- [Thomas O. Joos](#)⁷,
- [Daniel J. Kowalewski](#) ORCID:orcid.org/0000-0000-0003-0482-992712,
- [Vlatka Stos-Zweifel](#)¹²,
- [Michael Fehr](#)²,
- [Armin Rabsteyn](#)^{3,13},
- [Valbona Mirakaj](#)¹⁴,
- [Julia Karbach](#)¹⁵,
- [Elke Jäger](#)¹⁵,
- [Michael Graf](#)¹⁶,
- [Lena-Christin Gruber](#)¹,
- [David Rachfalski](#)¹,
- [Beate Preuß](#)⁵,
- [Ilona Hagelstein](#)^{1,3},
- [Melanie Märklin](#) ORCID:orcid.org/0000-0000-0002-2920-38941³,
- [Tamam Bakchoul](#) ORCID:orcid.org/0000-0000-0002-6797-681217,
- [Cécile Gouttefangeas](#)^{2,3,4},
- [Oliver Kohlbacher](#) ORCID:orcid.org/0000-0000-0003-1739-459816^{18,19,20},
- [Reinhild Klein](#)⁵,
- [Stefan](#) ^{Stevanović}^{2,4},

- [Hans-Georg Rammensee^{2,3,4}](#) &
- [Juliane S. Walz ORCID:\[orcid.org/0000-0000-0001-6404-73911\]\(https://orcid.org/0000-0000-0001-6404-73911\)](#)^{2,3}

[Nature Immunology](#) (2020) [Diesen Artikel zitieren](#)

42k Zugriffe

1 Zitate

2583 Altmetrisch

[Metrik-Details](#)

Fächer

[Virusinfektion](#)

Kurzfassung

Die T-Zell-Immunität ist zentral für die Kontrolle von Virusinfektionen. Für die Charakterisierung der T-Zell-Immunität, aber auch für die Entwicklung von Impfstoffen ist die Identifizierung der genauen viralen T-Zell-Epitope von grundlegender Bedeutung. Hier identifizieren und charakterisieren wir multiple dominante und subdominante SARS-CoV-2 HLA Klasse I und HLA-DR Peptide als potentielle T-Zell-Epitope in COVID-19 rekonvaleszenten und nicht exponierten Individuen. SARS-CoV-2-spezifische Peptide ermöglichten den Nachweis von postinfektiöser T-Zell-Immunität, selbst bei seronegativen Rekonvaleszenten. Kreuzreaktive SARS-CoV-2-Peptide deckten bei 81% der nicht-exponierten Personen bereits vorhandene T-Zell-Reaktionen auf und bestätigten die Ähnlichkeit mit Erkältungs-Coronaviren, was eine funktionelle Grundlage für eine heterologe Immunität bei SARS-CoV-2-Infektionen darstellt. Die Diversität der SARS-CoV-2-T-Zellantworten war mit milden Symptomen von COVID-19 assoziiert, was den Nachweis erbrachte, dass die Immunität die Erkennung mehrerer Epitope erfordert. Zusammen ermöglichen die vorgeschlagenen SARS-CoV-2 T-Zell-Epitope die Identifizierung heterologer und postinfektiöser T-Zell-Immunität und erleichtern die Entwicklung diagnostischer, präventiver und therapeutischer Maßnahmen für COVID-19.

Hauptseite

T-Zellen kontrollieren virale Infektionen und liefern ein immunologisches Gedächtnis, das einen lang anhaltenden Schutz ermöglicht^{1,2,3}. Während CD4⁺-Helfer-T-Zellen die Immunantwort orchestrieren und B-Zellen in die Lage versetzen, Antikörper zu produzieren, eliminieren zytotoxische CD8⁺-T-Zellen virusinfizierte Zellen. Für beide ist die Erkennung von Virusantigenen in Form von kurzen Peptiden, die auf HLAs präsentiert werden, von grundlegender Bedeutung. Folglich ist die Charakterisierung solcher viraler T-Zell-

Epitope^{4,5,6} entscheidend für das Verständnis der Immunabwehrmechanismen, aber auch eine Voraussetzung für die Entwicklung von Impfstoffen und Immuntherapien^{3,7,8,9}.

Das SARS-CoV-2-Coronavirus verursacht COVID-19, das sich zu einer weltweiten Pandemie mit dramatischen sozioökonomischen Folgen entwickelt hat^{10,11}. Die verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten sind begrenzt, und trotz intensiver Bemühungen steht bisher kein Impfstoff zur Verfügung. Die Erkenntnisse aus den beiden anderen zoonotischen Coronaviren SARS-CoV-1 und MERS-CoV deuten darauf hin, dass die coronavirusspezifische T-Zell-Immunität eine wichtige Determinante für die Genesung und den langfristigen Schutz ist^{12,13,14,15}. Diese T-Zell-vermittelte Immunantwort ist umso wichtiger, als Studien zur humoralen Immunität gegen SARS-CoV-1 den Nachweis erbracht haben, dass Antikörperantworten kurzlebig sind und sogar virusassoziierte Lungenpathologie verursachen oder verschlimmern können^{16,17}. In Bezug auf SARS-CoV-2 beschrieben neuere Studien^{18,19,20} CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Reaktionen auf virale Peptid-Megapools bei Spendern, die sich von COVID-19 erholt hatten, und bei Personen, die SARS-CoV-2 nicht ausgesetzt waren, wobei letztere auf eine potenzielle T-Zell-Kreuzreaktivität hinwiesen^{21,22}. Die genauen viralen Epitope, die diese T-Zell-Antworten gegen SARS-CoV-2 vermitteln, wurden in diesen Studien jedoch nicht im Detail identifiziert und charakterisiert, sind jedoch Voraussetzung (1) für die Abgrenzung der Rolle der postinfektiösen und heterologen T-Zell-Immunität bei COVID-19, (2) für die Etablierung diagnostischer Instrumente zur Identifizierung der SARS-CoV-2-Immunität und, was am wichtigsten ist, (3) für die Definition von Zielstrukturen für die Entwicklung SARS-CoV-2-spezifischer Impfstoffe und Immuntherapien. In dieser Studie definieren wir SARS-CoV-2-spezifische und kreuzreaktive CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Epitope in einer grossen Sammlung von SARS-CoV-2-Rekonvaleszenten sowie nicht exponierten Individuen und ihre Bedeutung für die Immunität und den Verlauf der COVID-19-Krankheit.

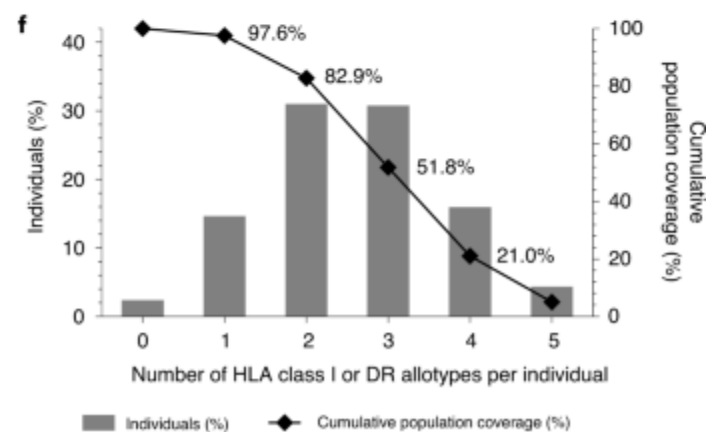
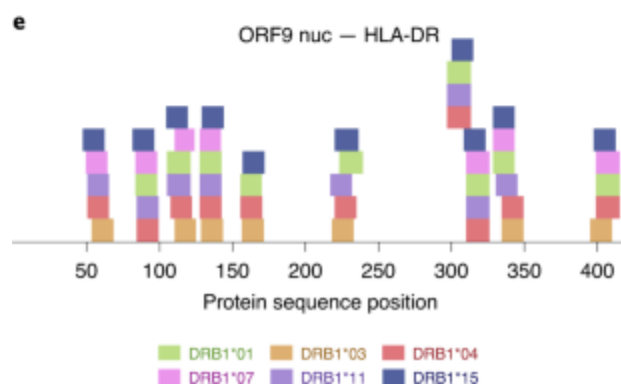
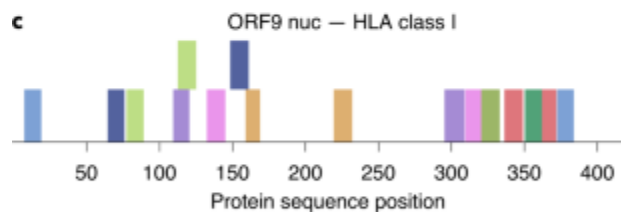
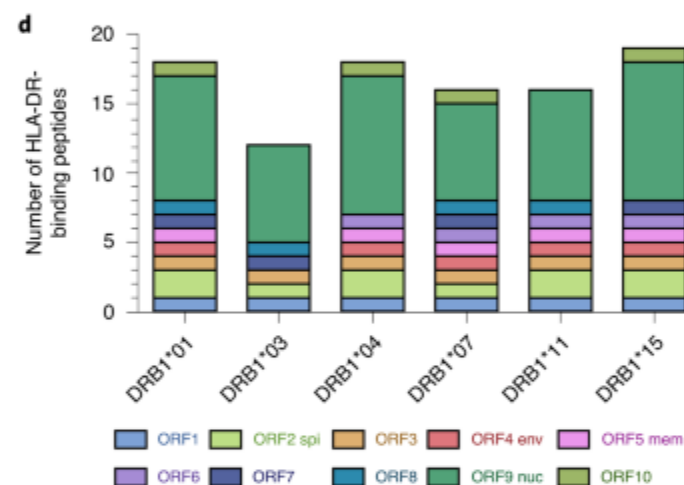
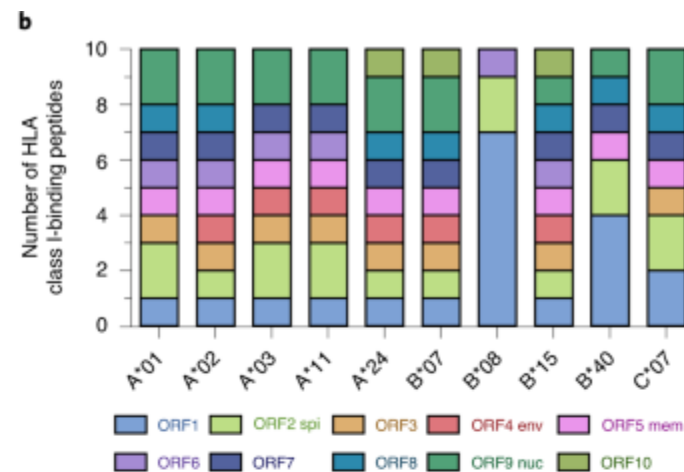
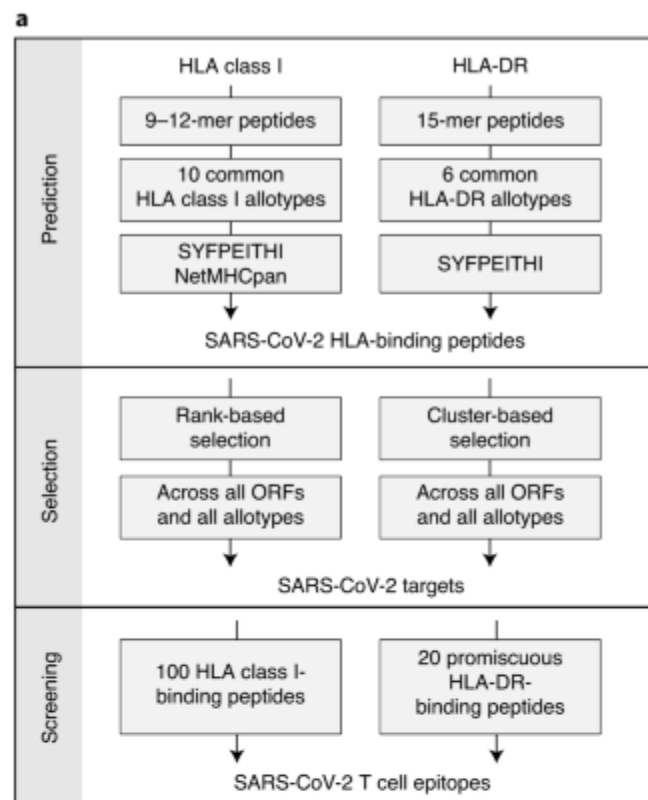
Ergebnisse

Identifizierung von SARS-CoV-2-abgeleiteten Peptiden

Ein neuer Vorhersage- und Auswahlworkflow, basierend auf der Integration der Algorithmen SYFPEITHI und NetMHCpan, identifizierte 1.739 und 1.591 vielversprechende, von SARS-CoV-2 abgeleitete HLA-Klasse I- und HLA-DR-bindende Peptide über alle zehn viralen Open-Reading Frames (ORFs) (Abb. [1a](#) und erweiterte Daten Abb. [1a,b](#)). Vorhersagen wurden für die zehn und sechs häufigsten HLA-Klasse I durchgeführt (HLA-A*01:01, -A*02:01, -A*03:01, -A*11:01, -A*24:02, -B*07:02, -B*08:01, -B*15:01, -B*40:01 und -C*07:02) und HLA-DR (HLA-DRB1*01:01, -DRB1*03:01, -DRB1*04:01, -DRB1*07:01, -DRB1*11:01 und -DRB1*15:01) alle Typen, die 91 abdecken.7% bzw. 70,6% der Weltbevölkerung mit mindestens einem Allotyp^{23,24} (Erweiterte Daten Abb. [1c](#) und [2a](#)). Um breit anwendbare SARS-CoV-2-abgeleitete T-Zell-Epitope zu identifizieren, wählten wir 100 SARS-CoV-2-abgeleitete HLA-Klasse I-bindende Peptide aus, die zehn Peptide pro HLA-Klasse I-Allotyp über alle zehn viralen ORFs für das Immunogenitäts-Screening umfassen (Bereich 3-20 Peptide pro ORF, Mittelwert 10; Abb. [1b,c](#), Erweiterte Daten Abb. [1d-m](#) und ergänzende Tabelle [1](#)). Zusätzlich wurden 20 von SARS-CoV-2 abgeleitete promiskuitive HLA-DR-bindende Peptide über alle ORFs aus Peptidclustern verschiedener HLA-DR-Allotyp-Restriktionen, die 99

verschiedene Peptid-Allotyp-Kombinationen repräsentieren, einbezogen (Abb. [1d,e](#), Erweiterte Daten Abb. [2b-k](#) und ergänzende Tabellen [2](#) und [3](#)). Von diesen HLA-DR-bindenden Peptiden enthielten 14 von 20 (70%) eingebettete SARS-CoV-2-abgeleitete HLA-Klasse I-bindende Peptide für 7 von 10 HLA-Klasse I-Allotypen. Das vollständige Panel von 120 von SARS-CoV-2 abgeleiteten Peptiden umfasste 10% des gesamten SARS-CoV-2-Proteoms (57% bzw. 12% des Nukleokapsid- und Spike-Proteins; Erweiterte Daten Abb. [2l](#)) und zeigte einen gleichmäßig verteilten Ursprung von strukturellen ORF-Proteinen (61 von 120 (51%)), die Spike-, Hüll-, Membran- und Nukleokapsid-Proteine sowie nicht-strukturelle oder akzessorische ORFs (59 von 120 (49%)) umfassten. Die breite HLA-Klasse-I- und HLA-DR-Allotyp-Restriktion der ausgewählten SARS-CoV-2-abgeleiteten Peptide, die zehn übliche HLA-Klasse-I- und sechs übliche HLA-DR-Allotypen abdeckt, ermöglichte eine Gesamtabdeckung von mindestens einem HLA-Allotyp bei 97,6% der Individuen der Weltbevölkerung (Abb. [1f](#)). Wiederkehrende Mutationen von SARS-CoV-2 (Ref. [25,26](#)) betrafen nur eine Minderheit ausgewählter von SARS-CoV-2 abgeleiteter Peptide mit 14 von 120 (12%) Sequenzen (1,7% an der Ankerposition), einschließlich der berichteten Mutationsstellen (Ergänzende Abb. [1](#) und ergänzende Tabellen [4](#) und [5](#)). Zusammengefasst prognostizierten wir für die häufigsten HLA-Allotypen SARS-CoV-2-abgeleitete Peptide für alle zehn viralen ORFs und wählten 100 HLA-Klasse-I- und 20 HLA-DR-restringierte Epitopkandidaten für die weitere immunologische Charakterisierung aus.

Abb. 1: Identifizierung und Auswahl von SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA-Klasse I- und HLA-DR-bindenden Peptiden.



a, Schematischer Überblick über unseren Vorhersage- und Selektionsansatz und Arbeitsablauf zur Identifizierung und abschließenden Auswahl von 120 breit anwendbaren SARS-CoV-2 HLA Klasse I- und HLA-DR-bindenden Peptiden für das weitere Screening und die Validierung als T-Zell-Epitope. **b**, Ausgewählte HLA Klasse I-bindende Peptide für die zehn häufigsten HLA Klasse I-Allotypen. Jede Farbe steht für einen bestimmten ORF. spi, Spike-Protein; env, Hüllprotein; mem, Membranprotein; nuc, Nukleokapsidprotein. **c**, HLA-Klasse-I-Peptidverteilung innerhalb des ORF9-Nukleokapsidproteins (für ORF1-ORF8 und ORF10 siehe Erweiterte Daten Abb. [1e-m](#)). Jede Farbe repräsentiert einen bestimmten HLA-Klasse-I-Allotyp. **d**, Ausgewählte HLA-DR-bindende Peptide für die sechs häufigsten HLA-DR-Allotypen. Jede Farbe repräsentiert einen bestimmten ORF. **e**, HLA-DR-Peptidcluster-Verteilung innerhalb des ORF9-Nukleokapsidproteins (für ORF1-ORF8 und ORF10 siehe Erweiterte Daten Abb. [2c-k](#)). Jede Farbe repräsentiert einen bestimmten HLA-DR-Allotyp. **f**, Populationsabdeckung, die mit der Auswahl von zehn gemeinsamen HLA-Klasse-I- und sechs gemeinsamen HLA-DR-Allotypen für das SARS-CoV-2 T-Zell-Epitop-Screening im Vergleich zur Weltbevölkerung erreicht wurde. Der Prozentsatz der Individuen innerhalb der Weltbevölkerung, die bis zu fünf HLA-Klasse-I- oder HLA-DR-Allotypen (x-Achse) tragen, wird als graue Balken auf der linken y-Achse angezeigt. Der kumulative Prozentsatz der Bevölkerungsabdeckung wird als schwarze Punkte auf der rechten y-Achse dargestellt.

[Quelldaten](#)

[Bild in voller Größe](#)

Charakterisierung von SARS-CoV-2-abgeleiteten T-Zell-Epitopen

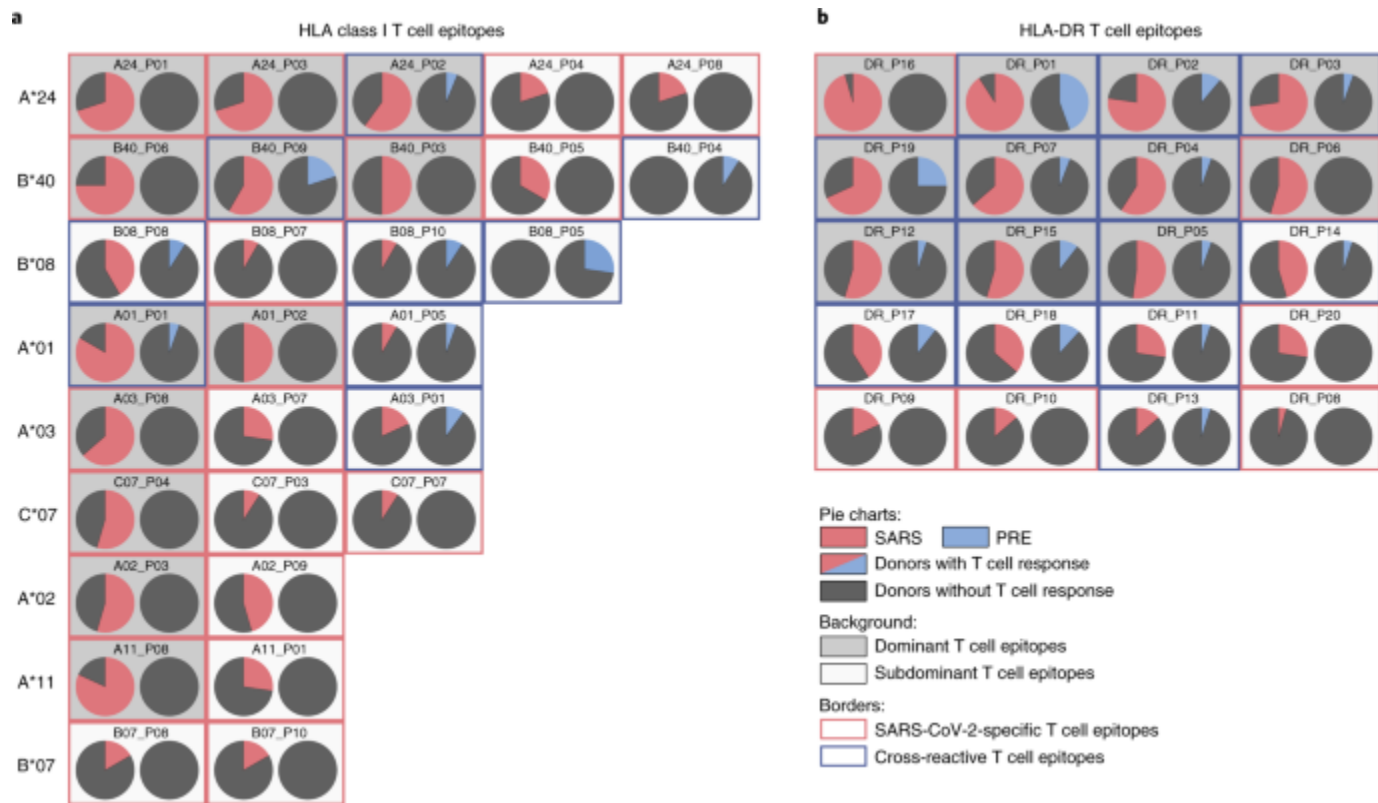
Interferon (IFN)- γ ELISPOT-Screening von in vitro-amplifizierten T-Zellen von Patienten, die von SARS-CoV-2 rekonvalesziert werden (SARS-Gruppe 1, n = 116, Tabelle [1](#) und ergänzende Tabelle [6](#)) und von Spendern, die nie SARS-CoV-2 ausgesetzt waren (PRE-Gruppe A, n = 104, Proben, die vor der SARS-CoV-2-Pandemie entnommen wurden; Tabelle [1](#) und Ergänzungstabelle [7](#)) validierten 29 von 100 (29%) von SARS-CoV-2 abgeleiteten HLA-Klasse I-bindenden Peptiden (3 von 10 HLA-A*01; 2 von 10 HLA-A*02; 3 von 10 HLA-A*03; 2 von 10 HLA-A*11; 5 von 10 HLA-A*24; 2 von 10 HLA-B*07; 4 von 10 HLA-B*08; 0 von 10 HLA-B*15; 5 von 10 HLA-B*40; und 3 von 10 HLA-C*07) und 20 von 20 (100%) HLA-DR-bindenden Peptiden als natürlich vorkommende T-Zell-Epitope (Abb. [2a,b](#), [3a,b](#), Tabellen [2](#) und [3](#), ergänzende Abb. [2](#) und [3](#) und ergänzende Tabelle [8](#)). Zusätzliche, auf Durchflusszytometrie basierende Analysen für ausgewählte, von SARS-CoV-2 abgeleitete T-Zell-Epitope zeigten, dass T-Zell-Antworten, die gegen HLA-Klasse I-bindende Peptide gerichtet waren, hauptsächlich von CD8⁺ T-Zellen angetrieben wurden und dass HLA-DR-bindende Peptide von CD4⁺ T-Zellen erkannt wurden, insbesondere bei einem einzelnen Spender auch von CD8⁺ T-Zellen (Abb. [3c,d](#) und Ergänzungstabelle [9](#)). Amplifizierte CD4⁺ T-Zellen zeigten oft Multifunktionalität (Expression von IFN- γ , Tumornekrosefaktor (TNF) und CD107a), während CD8⁺ T-Zellen bei Peptidstimulation hauptsächlich nur IFN- γ produzierten (Abb. [3e](#) und Ergänzungstabelle [9](#)). Zwölf von 29 (41%) und 11 von 20 (55%) SARS-CoV-2-abgeleiteten CD8⁺- und CD4⁺-T-Zell-Epitopen waren dominante Epitope (von $\geq 50\%$ der SARS-Spender erkannt) mit Erkennungshäufigkeiten von bis zu 83% (A01_P01) bzw. 95% (DR_P16) (Abb. [2a,b](#) und Tabellen [2](#) und [3](#)). Die T-Zell-Antworten zeigten

eine hohe interindividuelle sowie interpeptidische Intensitätsvariation (in Form von Spot-Zahlen pro 5×10^5 Zellen). Insgesamt war die Intensität der HLA-DR-spezifischen T-Zell-Antworten in der SARS-Gruppe im Vergleich zu denen, die gegen T-Zell-Epitope der HLA-Klasse I gerichtet waren, ausgeprägter (Abb. [4a,b](#)). Alle von SARS-CoV-2 abgeleiteten HLA-DR-bindenden Peptide erwiesen sich als immunogen, unabhängig von der Quelle ORF. SARS-CoV-2-abgeleitete HLA Klasse I T-Zell-Epitope zeigten eine gleichmäßig verteilte Herkunft aus strukturellen (13 von 29 (45%)) und nicht-strukturellen oder akzessorischen (16 von 29 (55%)) ORFs (Tabelle [2](#)). Allerdings wurden ORF-spezifische Unterschiede hinsichtlich des Anteils validierter HLA Klasse I T-Zell-Epitope beobachtet, wobei die höchsten Frequenzen für ORF9 (50%, Nukleokapsid-Protein), ORF1 (45%) und ORF3 (38%; Abb. [4c](#)) festgestellt wurden. Die höchste Anerkennung bei SARS-Spendern wurde für HLA Klasse I T-Zell-Epitope beobachtet, die von ORF2 (55%, Spike-Protein), ORF5 (52%, Membranprotein) und ORF3 (45%) stammen, sowie für HLA-DR T-Zell-Epitope, die von ORF5 (95%, Membranprotein), ORF8 (68%) und ORF4 (55%, Hüllprotein; Abb. [4d](#)) stammen. Zusammenfassend identifizierten und charakterisierten wir mehrere dominante und subdominante, von SARS-CoV-2 abgeleitete HLA-Klasse-I- und HLA-DR-T-Zell-Epitope bei Patienten, die von COVID-19 rekonvalesziert wurden.

Tabelle 1 Spendermerkmale

[Tabelle in voller Größe](#)

Abb. 2: Validierung von SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA Klasse I und HLA-DR T-Zell-Epitopen.

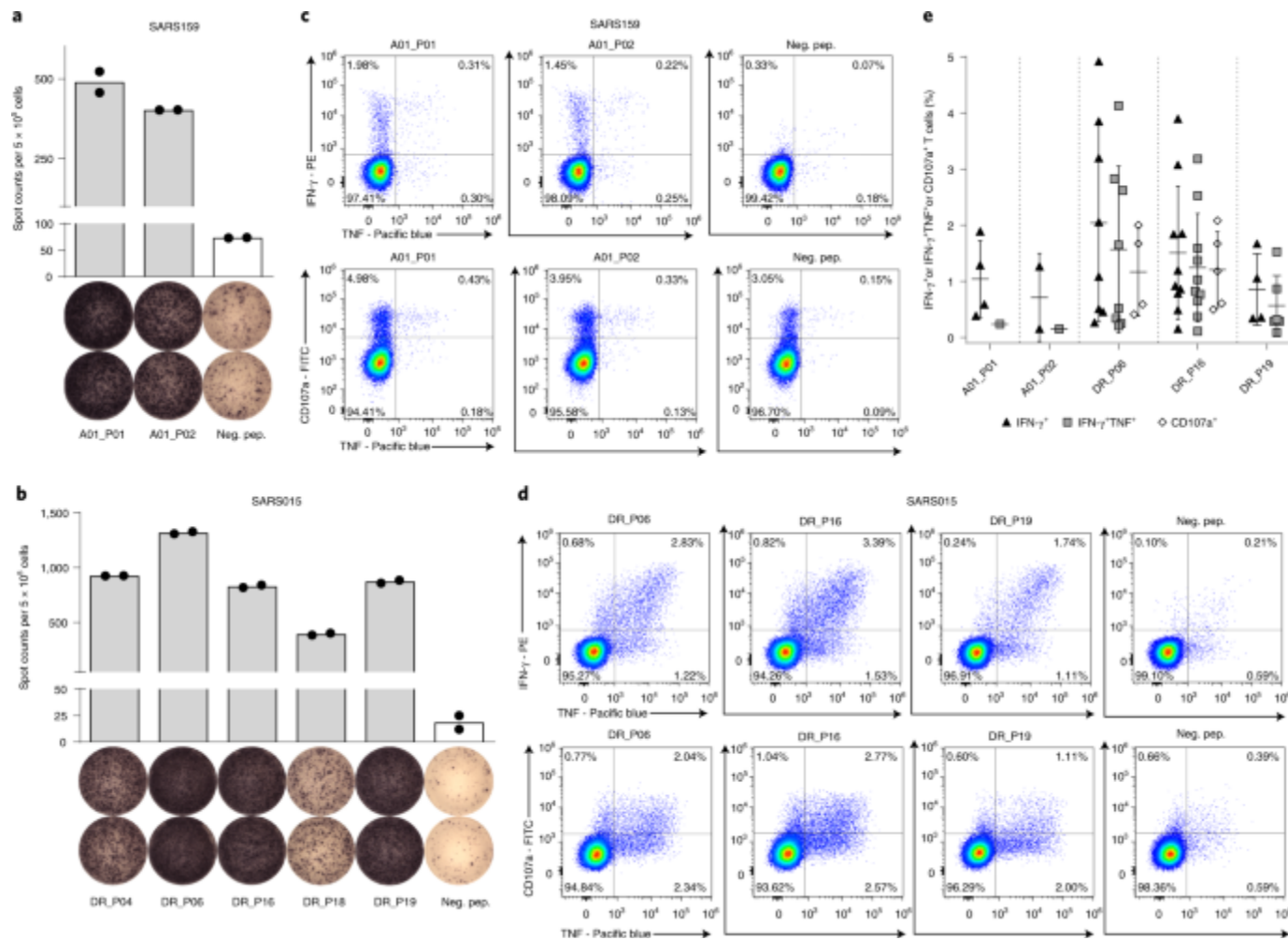


a,b, Erkennungshäufigkeits- und Allotyp-sortierte Tortendiagramme von SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA-Klasse I (**a**) und HLA-DR (**b**) T-Zell-Epitopen. Die Erkennungshäufigkeit von T-Zell-Epitopen (Spender mit T-Zell-Antworten/getestete Spender) in Gruppen von HLA-Klasse-I-konjugierten rekonvaleszenten Spendern einer SARS-CoV-2-Infektion (SARS-Gruppe 1, insgesamt n = 116, linkes Tortendiagramm, rot) und Spendern, die nie SARS-CoV-2 ausgesetzt waren (PRE-Gruppe A, insgesamt n = 104, rechtes Tortendiagramm, blau), wurden mit ELISPOT-Assays nach 12-d In-vitro-Pre-Stimulation bewertet. Dominante (Immunreaktionen bei $\geq 50\%$ der SARS-Spender) und subdominante T-Zell-Epitope sind mit dunkelgrauem bzw. hellgrauem Hintergrund markiert. SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Epitope mit ausschließlich in der SARS-Gruppe nachgewiesenen Reaktionen sind rot umrandet, kreuzreaktive Epitope mit in der PRE-Gruppe nachgewiesenen Immunantworten sind blau umrandet.

[Quelldaten](#)

[Bild in voller Größe](#)

Abb. 3: Immunologische Charakterisierung von SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA Klasse I und HLA-DR T-Zell-Epitopen.



a-d, IFN- γ ELISPOT-Assay (**a,b**) und Durchflusszytometrie-basierte Charakterisierung (**c,d**) von peptidspezifischen T-Zellen von rekonvaleszenten SARS-Spendern nach 12-d In-vitro-Pre-Stimulation mit SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA-Klasse I- (**a,c**) und HLA-DR-bindenden (**b,d**) Peptiden. Durchflusszytometriedaten von indizierten Zytokinen und Oberflächenmarkern werden für CD8+ (**c**) und CD4+ (**d**) T-Zellen gezeigt. T-Zell-Antworten wurden als positiv betrachtet, wenn die mittleren Spotzahlen in ELISPOT-Assays oder die nachgewiesene Häufigkeit der intrazellulären Zytokinfärbung mindestens dreimal höher war als bei der Negativkontrolle. Die ELISPOT-Daten werden als Streupunktdiagramm mit Mittelwert dargestellt. Neg. pep., Negativkontrolle unter Verwendung eines irrelevanten HLA-kompatiblen Peptids. **e**, Prozentsatz von IFN- γ +, IFN- γ +TNF+ oder CD107a+CD8+ (für HLA-Klasse-I-Peptide) oder CD4+ T-Zellen (für HLA-DR-Peptide) bei mehreren Spendern. Der angegebene Prozentsatz gibt die Frequenz in der mit dem Testpeptid stimulierten Probe abzüglich der Frequenz der mit einem irrelevanten Kontrollpeptid stimulierten Negativkontrolle an. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen einzelnen Spender, der innerhalb eines einzigen Experiments analysiert wurde. Horizontale Linien zeigen den

Mittelwert mit s.d. (Fehlerbalken) an. Die in dieser Abbildung dargestellte Gating-Strategie, die für die Auswertung der mit der Durchflusszytometrie erfassten Daten angewendet wurde, ist in der ergänzenden Abbildung [5 dargestellt](#).

[Quelldaten](#)

[Bild in voller Größe](#)

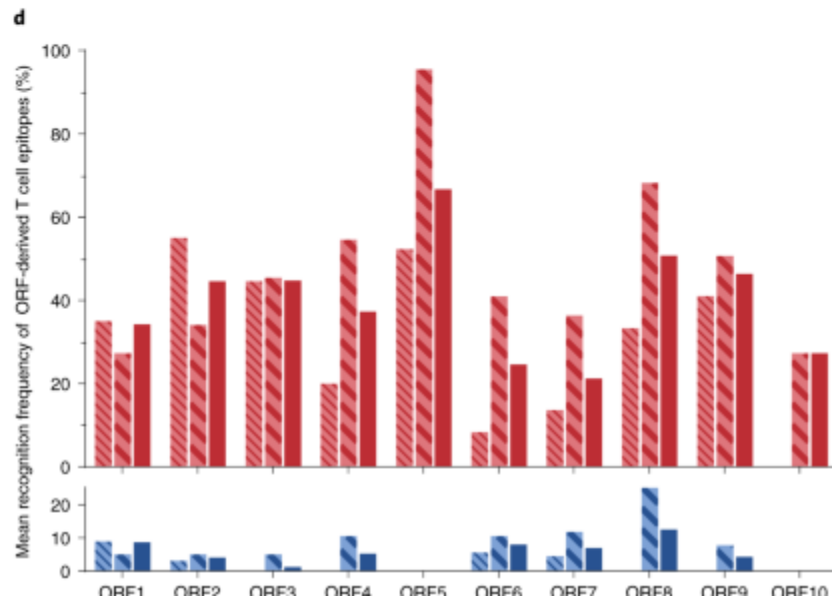
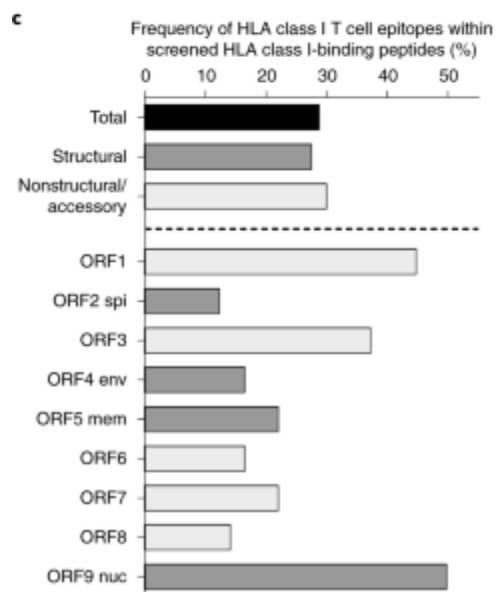
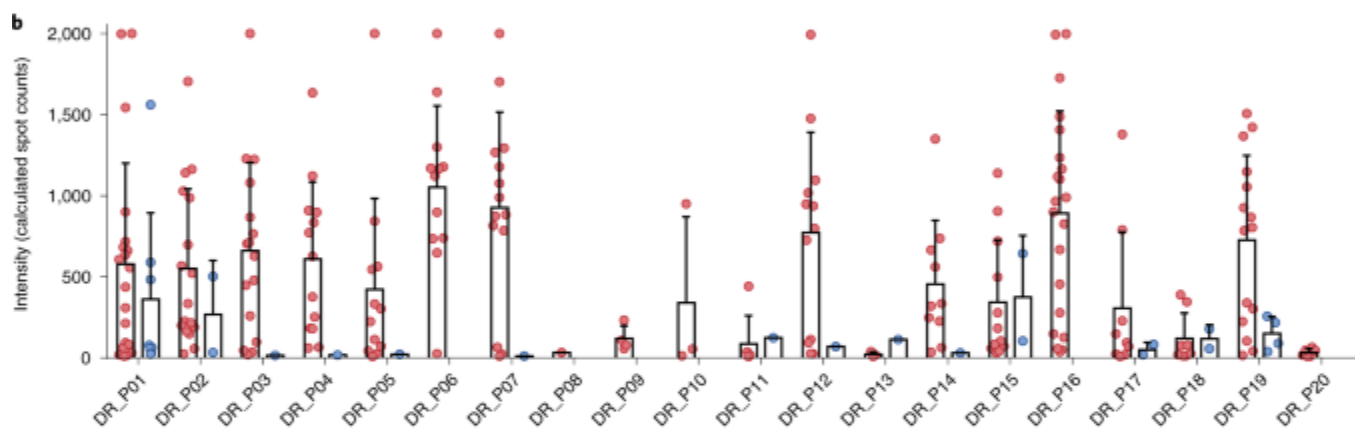
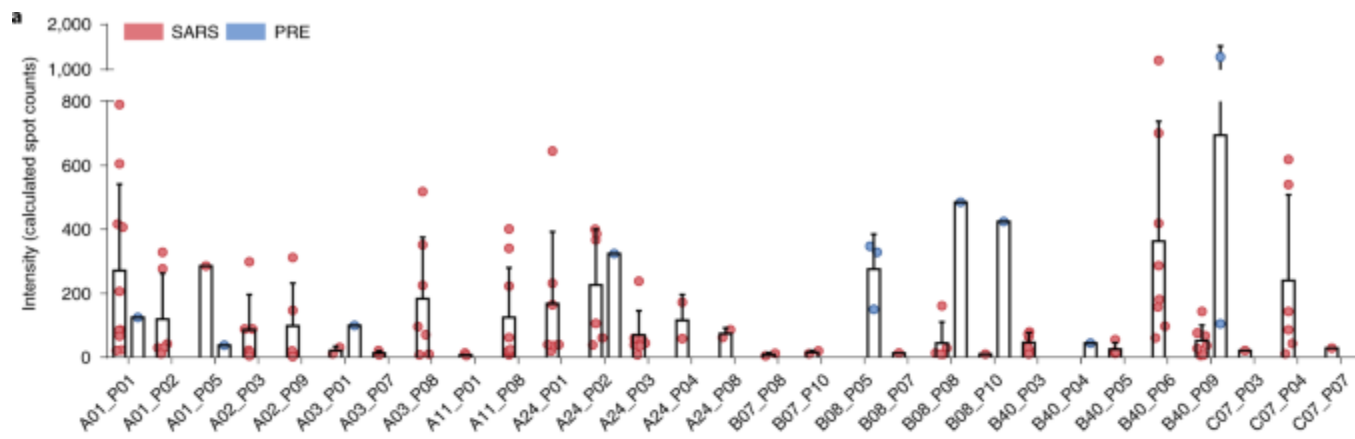
Tabelle 2 Immunogene SARS-CoV-2-abgeleitete HLA-Klasse I T-Zell-Epitope

[Tabelle in voller Größe](#)

Tabelle 3 Immunogene SARS-CoV-2-abgeleitete HLA-DR T-Zell-Epitope

[Tabelle in voller Größe](#)

Abb. 4: Intensität der T-Zell-Antworten gegen SARS-CoV-2 HLA Klasse I und HLA-DR T-Zell-Epitope und Immunogenität verschiedener SARS-CoV-2 ORFs.



a,b, Intensität der T-Zell-Antworten in Form von berechneten Spot-Zahlen in IFN- γ ELISPOT-Assays nach 12-d-Pre-Stimulation gegen die jeweiligen SARS-CoV-2 HLA-Klasse I (**a**) und HLA-DR (**b**) T-Zell-Epitope unter Verwendung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von rekonvaleszenten SARS-CoV-2-infizierten Spendern (SARS) sowie von nicht exponierten Spendern (PRE). Die Dots stellen Daten von einzelnen Spendern dar. Balken stellen den Mittelwert mit s.d. (Fehlerbalken) dar. **c**, Häufigkeit der validierten HLA-Klasse I T-Zell-Epitope für strukturelle (dunkelgrau) und nicht-strukturelle/zusätzliche (hellgrau) ORFs. **d**, Mittlere Erkennungshäufigkeit der HLA-Klasse I und HLA-DR T-Zell-Epitope von SARS- (rot) und PRE-Spendern (blau) innerhalb der verschiedenen ORFs.

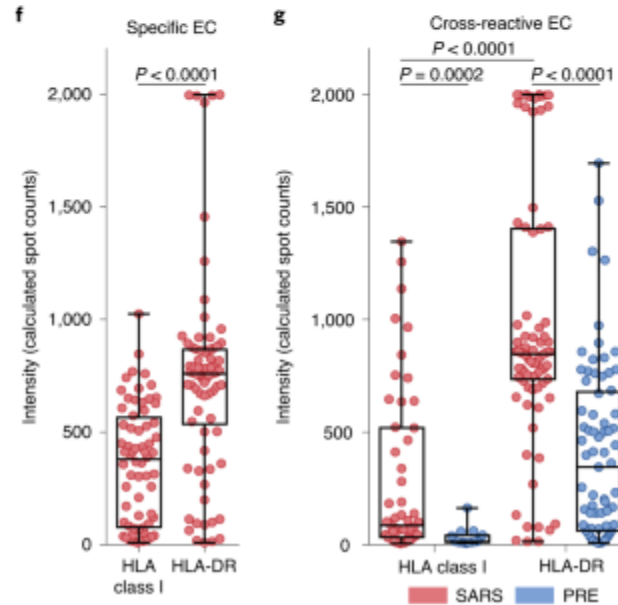
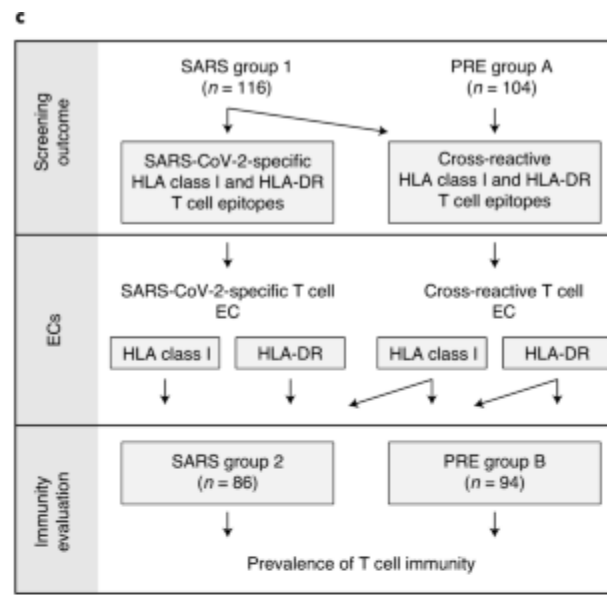
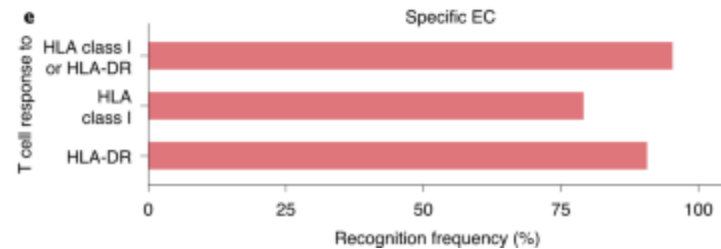
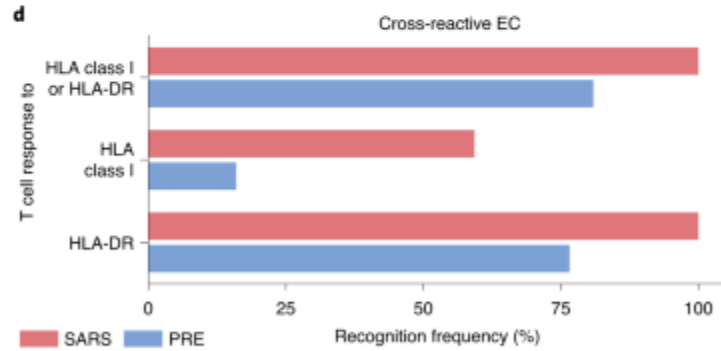
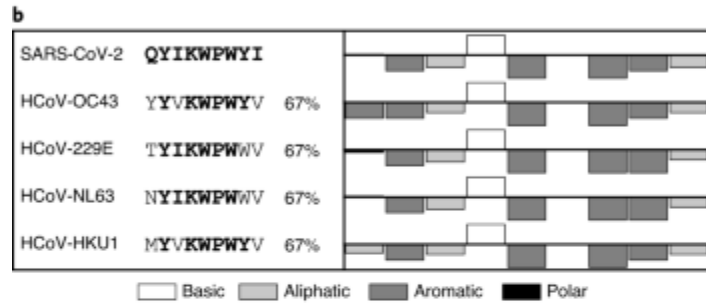
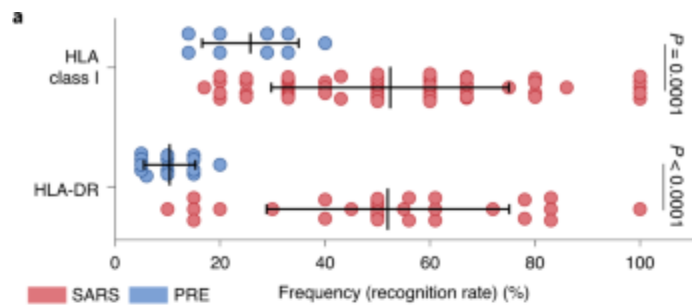
[Quelldaten](#)

[Bild in voller Größe](#)

Kreuzreaktive T-Zell-Reaktionen bei nicht exponierten Personen

Beim Screening der PRE-Gruppe A wurden kreuzreaktive T-Zell-Antworten auf 9 von 29 (31%) der validierten HLA-Klasse I und auf 14 von 20 (70%) HLA-DR T-Zell-Epitope nachgewiesen. Die Erkennungshäufigkeiten (Spender mit auf alle getesteten Spender normalisierten T-Zell-Antworten) einzelner SARS-CoV-2 HLA-Klasse I und HLA-DR T-Zell-Epitope in der PRE-Gruppe A waren im Vergleich zu denen der SARS-Gruppe 1 niedriger (bis zu 27% für B08_P05 und 44% für DR_P01; Abb. [2a,b](#), Tabellen [2](#) und [3](#) und ergänzend Abb. [4](#)). Die Erkennungshäufigkeit von HLA-Klasse I- und HLA-DR-T-Zell-Epitopen bei einzelnen Spendern unterschied sich innerhalb der verschiedenen ORFs stark zwischen der PRE- und der SARS-Gruppe. ORF1-abgeleitete HLA-Klasse I (9%) und ORF8-abgeleitete HLA-DR (25%) T-Zell-Epitope zeigten die höchsten Erkennungshäufigkeiten in der PRE-Gruppe, während keines der T-Zell-Epitope von ORF5 (Membranprotein) und ORF10, die bei SARS-Spendern häufig erkannt wurden, von T-Zellen bei PRE-Spendern erkannt wurde (Abb. [4d](#)). Spenderspezifische Erkennungsraten (erkannte Peptide/getestete Peptide) der HLA-Klasse I und HLA-DR SARS-CoV-2 T-Zell-Epitope waren in der PRE-Gruppe (HLA-Klasse I, Mittelwert 26 ± 9 ; HLA-DR, Mittelwert 10 ± 5) signifikant niedriger als in der SARS-Gruppe (HLA-Klasse I, Mittelwert 52 ± 23 ; HLA-DR, Mittelwert 52 ± 23 ; Abb. [5a](#)). Alignments der SARS-CoV-2 T-Zell-Epitope, die von nicht-exponierten Individuen erkannt wurden, zeigten Ähnlichkeiten mit den vier saisonalen humanen Erkältungs-Coronaviren (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1) in Bezug auf Aminosäuresequenzen, physiochemische und/oder HLA-bindende Eigenschaften für 14 von 20 (70%) der Epitope und lieferten damit einen klaren Beweis für die Kreuzreaktivität von SARS-CoV-2 T-Zellen (Abb. 5). [5b](#), ergänzende Tabellen [10](#) und [11](#) und ergänzende Daten [1](#)). Zusammen wurden kreuzreaktive T-Zell-Antworten auf SARS-CoV-2 HLA-Klasse I- und HLA-DR-T-Zell-Epitope in nicht exponierten Individuen identifiziert. Diese kreuzreaktiven Peptide zeigten Ähnlichkeit mit gewöhnlichen Erkältungs-Coronaviren und bildeten die funktionelle Grundlage für eine heterologe Immunität bei einer SARS-CoV-2-Infektion.

Abb. 5: Nachweis und Charakterisierung von T-Zell-Antworten auf SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA-Klasse I- und HLA-DR-T-Zell-Epitopen in nicht exponierten Individuen.



a, Erkennungsrate von HLA-Klasse I und HLA-DR SARS-CoV-2 T-Zell-Epitopen (anerkannte Peptide/getestete Peptide) in Proben von Spendern der SARS-Gruppe 1 (n = 116) bzw. PRE-Gruppe A (n = 104) (Daten für Spender mit T-Zell-Antworten, Mittelwert mit s.d. (Fehlerbalken), zweiseitiger Mann-Whitney *U*-Test). **b**, Repräsentative Sequenz- und physiochemische Eigenschaftsausrichtungen des kreuzreaktiven SARS-CoV-2 T-Zell-Epitops A24_P02 mit den vier saisonalen humanen Erkältungs-Coronaviren der Saison (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1; zu anderen kreuzreaktiven Peptiden siehe die Ergänzenden Tabellen [10](#) und [11](#) und die

Ergänzenden Daten [1](#)). Die physikochemischen Eigenschaften wurden mit der PepCalc-Software berechnet. Die Säulenrichtungen (aufwärts versus abwärts) zeigen die Hydrophilie gemäß der Hopp-Woods-Skala an. **c**, Schematischer Überblick über die Definition von SARS-CoV-2-spezifischen und kreuzreaktiven ECs zur standardisierten Auswertung der SARS-CoV-2-T-Zellreaktionen in einer Gruppe von Rekonvaleszenten nach einer SARS-CoV-2-Infektion (SARS-Gruppe 2, n = 86) und einer Gruppe von nicht exponierten Individuen (PRE-Gruppe B, n = 94). **d,e**, Erkennungshäufigkeit (Spender mit T-Zell-Reaktionen/getestete Spender) von kreuzreaktiven (**d**) und SARS-CoV-2-spezifischen (**e**) ECs durch T-Zellen in der SARS-Gruppe 2 und PRE-Gruppe B. **f,g**, Berechnete Spitzzahlen für SARS-CoV-2-spezifische (HLA-Klasse I, n = 68; HLA-DR, n = 78) (**f**) und kreuzreaktive EKs (**g**) in der SARS-Gruppe 2 (HLA-Klasse I, n = 51; HLA-DR, n = 86) und in der PRE-Gruppe B (HLA-Klasse I, n = 15; HLA-DR, n = 73) (die Kästchen stellen den Median und das 25. bis 75. Perzentil dar, die Schnurrhaare sind minimal bis maximal, zweiseitiger Mann-Whitney *U*-Test).

[Quelldaten](#)

[Bild in voller Größe](#)

T-Zell-Reaktionen bei rekonvaleszenten und nicht exponierten Personen

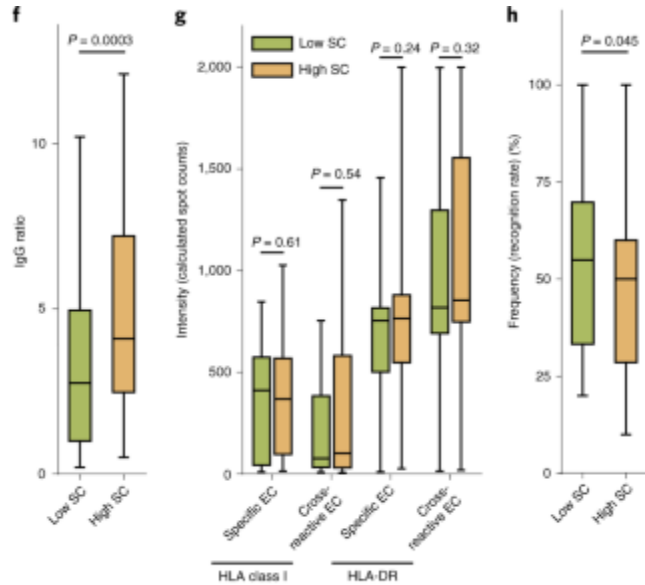
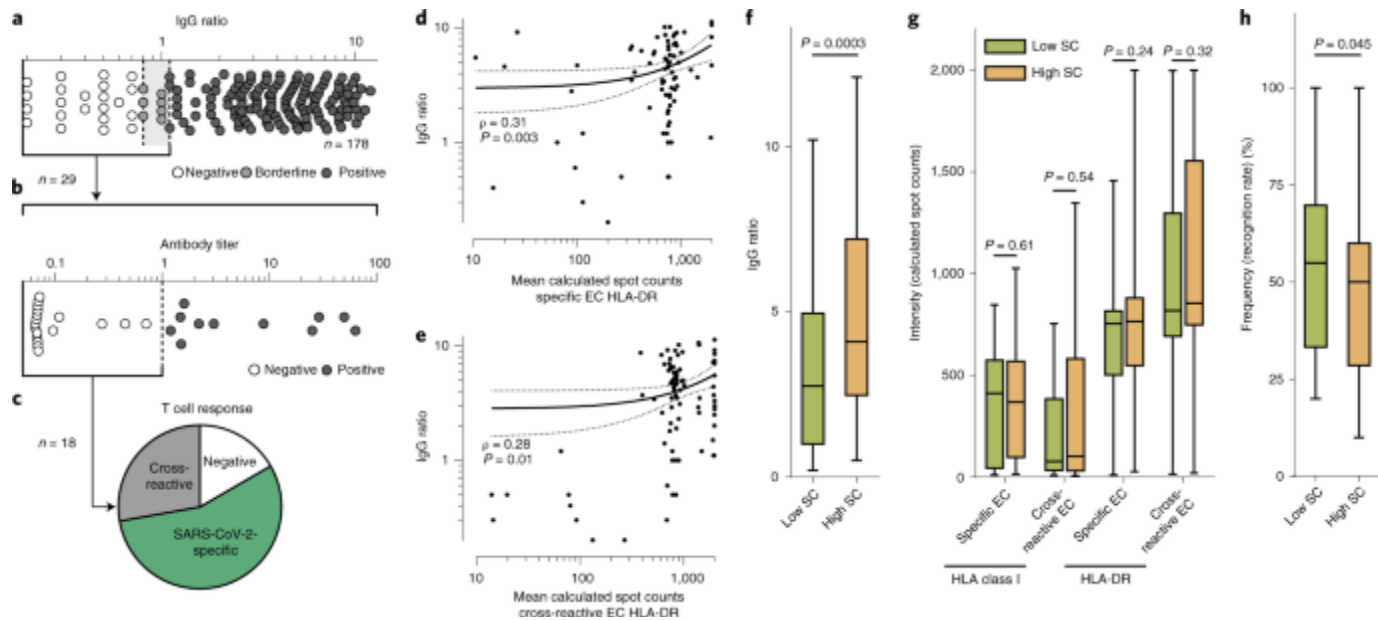
Epitop-Screening bei SARS- und PRE-Spendern ermöglichte die Identifizierung von SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Epitopen, die ausschließlich bei Rekonvaleszenten nach einer SARS-CoV-2-Infektion erkannt wurden, sowie von kreuzreaktiven T-Zell-Epitopen, die sowohl von Rekonvaleszenten als auch von SARS-CoV-2-Unexponierten erkannt wurden. Um eine standardisierte Auswertung und Bestimmung der T-Zell-Antwortfrequenzen auf SARS-CoV-2 zu ermöglichen, haben wir breit anwendbare HLA-Klasse I- und HLA-DR SARS-CoV-2-spezifische und kreuzreaktive T-Zell-Epitop-Zusammensetzungen (ECs) entworfen (Abb. [5c](#) und erweiterte Daten Abb. [6](#)). Diese ECs wurden für IFN- γ ELISPOT-Assays nach 12-d In-vitro-Pre-Stimulation in Gruppen von rekonvaleszenten Patienten (SARS-Gruppe 2, n = 86; Tabelle [1](#) und ergänzende Tabelle [6](#)) und nicht exponierten Spendern (PRE-Gruppe B, n = 94; Tabelle [1](#) und ergänzende Tabelle [7](#)) verwendet. Von den SARS-Spendern zeigten 100% T-Zell-Reaktionen auf kreuzreaktive und/oder spezifische EKs (HLA-Klasse I 86%, HLA-DR 100%; Abb. [5d,e](#)), während 81% der PRE-Spender T-Zell-Reaktionen auf kreuzreaktive EKs der HLA-Klasse I (16%) und/oder HLA-DR (77%) zeigten (Abb. [5d](#)). In Übereinstimmung mit den mit der Screeninggruppe (SARS-Gruppe 1) gewonnenen Befunden war die Intensität (in Form von Spitzzahlen pro 5×10^5 Zellen) der T-Zell-Antworten der HLA-Klasse I im Vergleich zu den T-Zell-Antworten der HLA-DR signifikant niedriger, sowohl für spezifische (Median der berechneten Spitzzahl HLA-Klasse I 379, HLA-DR 760) als auch für kreuzreaktive EKs (Median der berechneten Spitzzahl HLA-Klasse I 86, HLA-DR 846; Abb. [5f,g](#)). In Übereinstimmung mit den Unterschieden in den Erkennungsraten, die zwischen SARS-Gruppe 1 und PRE-Gruppe A beobachtet wurden, war die Intensität der T-Zell-Reaktionen auf kreuzreaktive EKs in der PRE-Gruppe signifikant niedriger (Median der berechneten Punktzahl HLA-Klasse I 14, HLA-DR 346) als in der SARS-Gruppe (Abb. [5g](#)).

Darüber hinaus haben wir SARS-CoV-2 T-Zell-Antworten auf unsere EKs ex vivo ohne 12-d-Prästimulation evaluiert. Während die niederfrequenten, bereits vorhandenen SARS-CoV-2 T-Zellen, die die kreuzreaktiven EKs nachweisen, ohne Vorstimulation bei PRE-Spendern nicht abgegrenzt werden konnten (0 von 42), wurden ex vivo T-Zell-Reaktionen auf SARS-CoV-2 kreuzreaktive und/oder spezifische EKs bei 96% (45 von 47) der SARS-Spender beobachtet (58% HLA-Klasse I, 96% HLA-DR; Erweiterte Daten Abb. [3a,b](#)). Die Intensität der T-Zell-Antworten (in Form von Spot-Zählungen pro 5×10^5 Zellen) war in Ex-vivo-Analysen niedriger, was eine signifikante Ausdehnung der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen nach Vorstimulation zeigte (Erweiterte Daten Abb. [3c-f](#)). Zusätzlich zu unserer Sammlung von rekonvaleszenten SARS-Spendern, zu denen hauptsächlich Spender mit einem milden Verlauf von COVID-19 gehörten, haben wir die SARS-CoV-2-T-Zell-Immunität in einer Gruppe von hospitalisierten SARS-Spendern weiter untersucht (n = 21; Erweiterte Daten Abb. [3g](#)). Bei 81% (17 von 21) der schwerkranken Patienten konnten T-Zell-Reaktionen, die auf unsere spezifischen (71%) oder kreuzreaktiven (76%) EKs abzielten, ex vivo nachgewiesen werden (Erweiterte Daten Abb. [3h](#)). Im Vergleich zu den ex vivo analysierten Spendern der SARS-Gruppe 2 unterschied sich die Erkennungshäufigkeit in der stationär behandelten Gruppe am stärksten bei der kreuzreaktiven EK HLA-DR (94% nicht stationär behandelte versus 71% stationär behandelte). Zusammengenommen ermöglichten die T-Zell-Epitope von SARS-CoV-2 den Nachweis einer postinfektiösen T-Zell-Immunität bei 100% der Personen, die von COVID-19 genesen sind, und deckten bei 81% der nicht exponierten Personen bereits vorhandene T-Zell-Reaktionen auf.

Beziehung zwischen SARS-CoV-2 T-Zell- und Antikörperreaktionen

Die Anti-SARS-CoV-2 IgG-Reaktionen bei SARS-Spendern wurden in zwei unabhängigen Tests analysiert. Der gegen die S1-Domäne des viralen Spike-Proteins, einschließlich der immunologisch relevanten Rezeptorbindungsdomäne, gerichtete Anti-SARS-CoV-2-S1-IgG-ELISA-Assay zeigte bei 149 von 178 (84%), 7 von 178 (4%) und 22 von 178 (12%) Spendern eine positive, grenzwertige bzw. keine Anti-S1-Antwort (Abb. [6a](#)). Von den Borderline-/Nonresponder-Spendern waren 18 von 29 (62%) auch in einem zweiten, unabhängigen Anti-Nukleokapsid-Immunoassay negativ (Abb. [6b](#)). Allerdings wurden SARS-CoV-2-spezifische CD8+ und/oder CD4+ T-Zell-Antworten nach einer 12-d In-vitro-Pre-Stimulation bei 10 von 18 (56%) der "Antikörper-Doppel-negativen" Spendern nachgewiesen (Abb. [6c](#)). Die Intensität der SARS-CoV-2-spezifischen und kreuzreaktiven HLA-DR T-Zell-Antworten korrelierte mit Antikörpertitern (Abb. [6d,e](#)), während keine Korrelation mit HLA-Klasse I T-Zell-Antworten beobachtet wurde (Erweiterte Daten Abb. [4a,b](#)). Es wurde keine Korrelation zwischen Antikörpertitern, die gegen das Nukleokapsid von humanen Erkältungs-Coronaviren (HCoV-229E, HCoV-NL63 und HCoV-OC43) gerichtet sind, wie durch Bead-basierte serologische Multiplex-Assays bestimmt, und der Intensität der kreuzreaktiven CD4+- und CD8+-T-Zell-Antworten in der SARS-Gruppe festgestellt (Erweiterte Daten Abb. [4c-h](#)). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SARS-CoV-2-spezifische Peptide den Nachweis postinfektiöser T-Zell-Reaktionen auch bei seronegativen Rekonvaleszenten ermöglichen.

Abb. 6: SARS-CoV-2-gerichtete Antikörper- und T-Zell-Antworten im Verlauf von COVID-19.



a,b, SARS-CoV-2-Serum-IgG-S1-Verhältnis (EUROIMMUN) bei SARS-Spendern ($n = 178$) (**a**) und Anti-Nukleokapsid-Antikörper-Titer (Elecsys-Immunoassay) von SARS-Spendern mit grenzwertigen/negativen Antworten im EUROIMMUN-Test ($n = 29$) (**b**). Spender mit negativer und Borderline-Antwort sind weiß bzw. grau markiert. **c**, Das Tortendiagramm zeigt T-Zell-Antworten (positiv, $n = 15$; negativ, $n = 3$) auf SARS-CoV-2-spezifische ($n = 10$) und kreuzreaktive ($n = 5$) T-Zell-Epitope bei Spendern ohne Antikörper-Antwort ($n = 18$, bewertet in zwei unabhängigen Assays). **d,e**, Korrelationsanalyse der IgG-Verhältnisse (EUROIMMUN) zu SARS-CoV-2 mit Spot-Zählungen, die mit ELISPOT-Assays für HLA-DR SARS-CoV-2-spezifisch ($n = 78$) (**d**) und kreuzreaktiv ($n = 86$) (**e**) ECs in SARS-Gruppe 2 (gestrichelte Linien, 95% Konfidenzniveau, Spearman's rho (ρ) und P-Wert) bewertet wurden. **f,g**, IgG-Antikörperantwort (EUROIMMUN) auf SARS-CoV-2 ($n = 178$) (**f**) und T-Zell-Antwort auf SARS-CoV-2-spezifische (HLA-Klasse I, $n = 68$; HLA-DR, $n = 78$) (**g**) und kreuzreaktive EKs (HLA-Klasse I, $n = 51$; HLA-DR, $n = 86$) bzw. bei SARS-Spendern mit niedriger und hoher SC (Kombination objektiver (fever $\geq 38^\circ\text{C}$) und subjektiver Krankheitssymptome) im Verlauf von COVID-19. **h**, Erkennungsrate von T-Zell-Epitopen (erkannte Peptide/getestete Peptide) bei SARS-Spendern (Gruppe 1) mit niedriger und hoher SZ im Verlauf von COVID-19 ($n = 84$). Die Kästchen stellen den Median und die 25. bis 75. Perzentile dar, die Schnurrhaare sind minimal bis maximal, zweiseitiger Mann-Whitney *U*-Test (**f,g**); die Kästchen stellen den Median und die 25. bis 75. Perzentile dar, die Schnurrhaare sind minimal bis maximal, einseitiger Student's *t*-Test (**h**).

[Quelldaten](#)

[Bild in voller Größe](#)

Assoziation von Antikörper- und T-Zell-Antworten mit COVID-19

Schließlich wurde die Assoziation von anti-SARS-CoV-2-Antikörper und T-Zell-Antworten nach einer 12-d in vitro-Prästimulation mit dem Schweregrad der Erkrankung, bewertet durch einen kombinatorischen Symptomscore (SC) von objektiven (fever ≥ 38.0 °C) und patienten-subjektiven Krankheitssymptomen bestimmt (Tabelle [1](#)). Ähnlich wie bei kritisch kranken Patienten²⁷, unabhängig vom Alter: In unserer Sammlung von rekonvaleszenten SARS-Spendern (n = 180, Gruppe 1 und 2), die sich im Allgemeinen in gutem Gesundheitszustand befanden und nicht ins Krankenhaus eingewiesen worden waren (Abb. [6f](#) und erweiterte Daten Abb. [5a](#)), waren hohe Antikörperquotienten signifikant mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert. Weder die Intensität der SARS-CoV-2-spezifischen noch der kreuzreaktiven T-Zell-Reaktionen auf HLA-Klasse-I- oder HLA-DR-EKs korrelierte mit der Demographie (Geschlecht, Alter oder Body-Mass-Index; Ergänzende Tabellen [12](#) und [13](#)) oder dem Schweregrad der Erkrankung (Abb. [6g](#)). Vielmehr war die Diversität der T-Zell-Antworten in Bezug auf die Erkennungsrate der SARS-CoV-2 T-Zell-Epitope (Anzahl der erkannten Epitope normalisiert auf die Gesamtzahl der getesteten Epitope des jeweiligen Spenders) bei Patienten mit schwereren COVID-19-Symptomen vermindert (Abb. [6h](#) und Erweiterte Daten Abb. [5b](#)), was den Nachweis liefert, dass die Entwicklung einer protektiven Immunität die Erkennung mehrerer SARS-CoV-2-Epitope erfordert.

Diskussion

Diese Studie berichtet über die Charakterisierung mehrerer breit anwendbarer SARS-CoV-2-spezifischer und kreuzreaktiver T-Zell-Epitope verschiedener HLA-Allotyp-Restriktionen in allen viralen ORFs, die in zwei großen Sammlungen von Spendern, die von einer SARS-CoV-2-Infektion genesen sind, sowie von nicht exponierten Individuen identifiziert wurden. Unsere Ergebnisse helfen der SARS-CoV-2-Forschung im Hinblick auf das Verständnis der postinfektiösen und heterologen T-Zell-Reaktionen von SARS-CoV-2, aber auch im Hinblick auf die Entwicklung prophylaktischer und therapeutischer Massnahmen.

Um den Nachweis selbst sehr kleiner SARS-CoV-2-Epitop-erkennender T-Zell-Populationen zu ermöglichen, insbesondere bei nicht exponierten Spendern, bei denen SARS-CoV-2-kreuzreaktive T-Zellen in Ex-vivo-Analysen unterhalb der Nachweisgrenze lagen, basierte die Epitopdefinition auf einem 12-d-Pre-Stimulationsprotokoll vor einem routinemäßigen 18-24-h-ELISPOT-Test. Die Anforderung dieses Prä-Stimulationsprotokolls wird durch eine kürzlich durchgeführte Arbeit zur Charakterisierung von Epitopen von humanen Zytomegalievirus-abgeleiteten T-Zellen weiter untermauert, die einen Verlust selbst dominanter Epitope von humanen Zytomegalievirus-abgeleiteten T-Zellen zeigt, wenn T-Zell-Antworten ex vivo ohne vorherige Amplifikation analysiert werden⁵. Da jedoch die In-vitro-Kultur die Zytokinproduktion oder die Anteile spezifischer T-Zell-Untermengen verzerren könnte, müssen weitere Studien das physiologische Zytokinprofil und den Phänotyp der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen in umfangreicheren Ex-vivo-Studien evaluieren. Eine weitere Validierung der vorgeschlagenen T-Zell-Epitope erfordert die Bestätigung der MHC-Bindung der entsprechenden Peptide, was durch Rückfaltungsexperimente zur Bildung von Monomeren (MHC-Peptid-Komplexe) mit anschließender

Tetramerfärbung der T-Zellen oder durch Zytotoxizitätsexperimente unter Verwendung von z.B. SARS-CoV-2-infizierten Zelllinien erreicht werden könnte.

Gegenwärtig stützt sich die Bestimmung der Immunität gegen SARS-CoV-2 auf den Nachweis von SARS-CoV-2-Antikörperreaktionen. Trotz der hohen Sensitivität, die für mehrere Tests berichtet wurde, gibt es jedoch immer noch einen erheblichen Prozentsatz von Patienten mit negativen oder grenzwertigen Antikörperreaktionen und damit unklaren Immunitätsstatus nach einer SARS-CoV-2-Infektion²⁸. Unsere SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Epitope, die von T-Zellen nicht exponierter Spender nicht erkannt werden, ermöglichten den Nachweis spezifischer T-Zell-Antworten auch bei Spendern ohne Antikörperreaktionen und lieferten damit den Nachweis für T-Zell-Immunität nach Infektion. In zusätzlichen Analysen der T-Zell-Immunität bei hospitalisierten Spendern konnten wir SARS-CoV-2 T-Zell-Antworten auch bei schwerkranken Patienten mit COVID-19 nachweisen.

In Übereinstimmung mit früheren Daten über akute und chronische Virusinfektionen^{29,30} weisen unsere Daten auf eine wichtige Rolle der SARS-CoV-2 CD4+ T-Zellreaktionen im natürlichen Verlauf der Infektion hin, wobei mehrere dominante HLA-DR T-Zell-Epitope identifiziert wurden, die bei SARS-Spendern im Vergleich zu den HLA-Klasse I T-Zell-Epitopen eine häufigere und intensivere Immunantwort hervorrufen. Dies leitet die Auswahl von T-Zell-Epitopen für das Impfstoffdesign, auch im Hinblick auf die CD4+ T-Zell-abhängige Stimulation einer schützenden Antikörperantwort.

Kreuzreaktivität von T-Zellen für verschiedene Virusspezies oder sogar zwischen verschiedenen Erregern ist ein bekanntes Phänomen^{31,32} das postuliert wird, um eine heterologe Immunität gegen einen Erreger nach Exposition gegenüber einem nicht identischen Erreger zu ermöglichen^{21,22,33}. Diese heterologe Immunität, die durch kreuzreaktive T-Zell-Reaktionen erleichtert wird, kann entweder vorteilhafte oder nachteilige Wirkungen^{34,35} vermitteln, wie z.B. bei einer Epstein-Barr-Virusinfektion, wo die Influenza-Immunität und das Repertoire an kreuzreaktiven T-Zell-Antigenrezeptoren zu einer protektiven Immunität gegen eine Epstein-Barr-Virusinfektion³⁶ oder zu schweren Symptomen der infektiösen Mononukleose³⁷ führen können. Unter Verwendung vorhergesagter oder zufälliger, von SARS-CoV-2 abgeleiteter Peptid-Pools berichteten neuere Studien über bereits bestehende SARS-CoV-2-gerichtete T-Zell-Reaktionen in kleinen Gruppen von nicht exponierten sowie seronegativen Individuen, was auf eine Kreuzreaktivität zwischen menschlichen Erkältungs-Coronaviren und SARS-CoV-2 hindeutet (Ref. [18-19-20](#)). In unserer Studie identifizierten und charakterisierten wir die genauen T-Zell-Epitope, die die Kreuzreaktivität von SARS-CoV-2 steuern, und wiesen Ähnlichkeit mit menschlichen Erkältungskoronaviren hinsichtlich individueller Peptidsequenzen, physiochemischer und HLA-bindender Eigenschaften nach^{38,39}. Bemerkenswert ist, dass wir SARS-CoV-2 kreuzreaktive T-Zellen in 81% der nicht exponierten Individuen nach einer 12-d-Pre-Stimulation nachweisen konnten. Darüber hinaus gab es Hinweise auf eine geringere Erkennungshäufigkeit von kreuzreaktiven HLA-DR EC bei hospitalisierten Patienten im Vergleich zu Spendern mit mildem COVID-19-Verlauf, was auf einen Mangel an bereits vorhandenen SARS-

CoV-2 T-Zellen bei schwerkranken Patienten hindeuten könnte. Um festzustellen, ob expandierbare, kreuzreaktive T-Zellen tatsächlich eine günstige heterologe Immunität vermitteln und ob dies den relativ geringen Anteil schwerkranker oder sogar allgemein infizierter Patienten während dieser Pandemie erklärt^{40,41}, wäre eine spezielle Studie erforderlich, die beispielsweise eine abgestimmte Fallkontrolle oder ein retrospektives Kohortendesign unter Verwendung unserer kreuzreaktiven SARS-CoV-2 T-Zell-Epitope verwendet. Darüber hinaus muss betont werden, dass der Ansatz der Sequenzausrichtung unter Verwendung von BLAST^{42,43} des National Center for Biotechnology Information (NCBI) hauptsächlich den Nachweis kreuzreaktiver Epitope mit hoher Sequenzähnlichkeit ermöglicht, während kreuzreaktive Epitope mit Ähnlichkeiten in den physiochemischen Eigenschaften innerhalb anderer ORFs von menschlichen Erkältungs-Coronaviren sowie in anderen menschlichen Viren wie Influenza⁴⁴ möglicherweise nicht identifiziert werden können.

Unsere Beobachtung, dass die Intensität der T-Zell-Antworten und die Erkennungsrate der T-Zell-Epitope bei rekonvaleszenten Patienten im Vergleich zu nicht exponierten Individuen signifikant höher war, deutet darauf hin, dass bei einer aktiven Infektion nicht nur eine Expansion, sondern auch eine Ausbreitung der T-Zell-Antwortvielfalt von SARS-CoV-2 auftritt.

Die pathophysiologische Beteiligung der Immunantwort im Verlauf von COVID-19 ist Gegenstand intensiver Diskussionen. Wir zeigten eine Korrelation zwischen hohen Antikörpertitern und verstärkten COVID-19-Symptomen in unserer Kohorte von nicht hospitalisierten Patienten. Dieser Befund deckt sich mit neueren Daten, die eine Korrelation zwischen hohen Antikörpertitern und der Schwere der Erkrankung bei hospitalisierten Patienten beschreiben²⁷. Unsere Daten zusammen mit einer kürzlich veröffentlichten Studie²⁰ liefern Hinweise darauf, dass andererseits die Intensität der T-Zell-Reaktionen nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert. Diese Erkenntnis ist für die Entwicklung von Impfstoffen von hoher Relevanz, da sie Hinweise darauf liefert, dass krankheitsverschärfende Effekte die Entwicklung prophylaktischer und therapeutischer Impfansätze, die darauf abzielen, SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antworten zu induzieren, nicht behindern könnten. Im Gegensatz zur Intensität der T-Zell-Antwort zeigten wir, dass die Erkennungsraten der SARS-CoV-2-T-Zell-Epitope von einzelnen Spendern bei Personen mit schwereren COVID-19-Symptomen niedriger waren. Diese Beobachtung liefert zusammen mit unseren Daten über erhöhte Erkennungsraten von T-Zell-Epitopen nach einer SARS-CoV-2-Infektion im Vergleich zu bereits bestehenden T-Zell-Reaktionen bei nicht exponierten Personen und Berichten über andere aktive oder chronische Virusinfektionen, die eine Vielfalt von T-Zell-Reaktionen mit antiviraler Abwehr assoziieren^{45,46,47}, den Beweis, dass die natürliche Entwicklung und die impfstoffbasierte Induktion von Immunität gegen SARS-CoV-2 die Erkennung mehrerer SARS-CoV-2-Epitope erfordert. Die Bestätigung dieser Beobachtung in einer größeren SARS-Kohorte, einschließlich mehr hospitalisierter Patienten, ist gerechtfertigt und erfordert auf einem einzigen Epitop basierende Methoden zur Bestimmung der Erkennungsraten von T-Zell-Epitopen, wie sie durch unsere SARS-CoV-2 T-Zell-Epitope ermöglicht werden. Darüber hinaus unterstreichen unsere Daten die hohe Bedeutung der identifizierten T-Zell-Epitope für weitere Studien der SARS-CoV-2-Immunität, aber auch für die Entwicklung von präventiven und therapeutischen COVID-19-Maßnahmen. Anhand der T-Zell-Epitope von SARS-CoV-2 bereiten wir derzeit zwei klinische Studien vor

(EudraCT 2020-002502-75; EudraCT 2020-002519-23), um einen Multi-Peptid-Impfstoff zur Induktion einer breiten T-Zell-Immunität gegen SARS-CoV-2 zur Bekämpfung von COVID-19 zu evaluieren.

Methoden

Patienten und Blutproben

Blut- und Serumproben sowie die fragebogenbasierte Beurteilung von Spendermerkmalen und Krankheitssymptomen rekonvaleszenter Freiwilliger nach SARS-CoV-2-Infektion wurden von April bis Juli 2020 am Universitätsklinikum Tübingen und der Krebsforschungsabteilung Rhein-Main (Klinikum Nordwest) gesammelt (SARS-Sammlung, n = 180). Die Sammlung nicht exponierter Personen (PRE-Sammlung, n = 185) umfasst Proben gesunder Blutspender (Blutspenden zu Forschungszwecken aus der Abteilung Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen), die nie mit SARS-CoV-2 exponiert waren, da die PBMCs dieser Spender vor der SARS-CoV-2-Pandemie (Juni 2007 bis November 2019) isoliert und behauptet wurden (Abteilung Immunologie, Tübingen). Die informierte Zustimmung wurde in Übereinstimmung mit der Erklärung des Helsinki-Protokolls eingeholt. Die Studie wurde von den lokalen Ethikkommissionen genehmigt und nach deren Richtlinien durchgeführt (179/2020/BO2, MC 288/2015). Aus den SARS- (n = 180) und PRE- (n = 185) Sammlungen wurden zwei Gruppen gebildet für (1) Einzelpeptid-basiertes T-Zell-Epitop-Screening (SARS-Gruppe 1 und PRE-Gruppe A) und (2) standardisierte Immunitätsbewertung von ECs mittels IFN- γ ELISPOT-Assays nach in vitro-Expansion sowie direkt ex vivo (SARS-Gruppe 2 und PRE-Gruppe B). Die Spender wurden den Gruppen nach dem Zeitpunkt der Probenahme und der verfügbaren Probenzellzahl zugeordnet. Einige Spender wurden in beiden Gruppen analysiert (1 und 2 oder A und B für SARS bzw. PRE). Darüber hinaus wurden Proben von hospitalisierten schwerkranken SARS-Spendern zur ex-vivo-Bewertung der T-Zell-Immunität gesammelt. Die SARS-CoV-2-Infektion wurde durch einen PCR-Test nach einem Nasen-Rachen-Abstrich bestätigt. Die Rekrutierung von SARS-Spendern erfolgte durch Online- und papiergestützte Anrufe. Die Probenentnahme für SARS-Spender der Gruppen 1 und 2 erfolgte etwa 3-8 Wochen nach dem Ende der Symptome und/oder einem negativen Virusabstrich. Die Probenentnahme für hospitalisierte SARS-Spender wurde 5-112 d nach positiver SARS-CoV-2-PCR durchgeführt. PBMCs wurden durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Serum wurde durch Zentrifugation für 10 min abgetrennt und der Überstand bei -80 °C gelagert. Die HLA-Typisierung wurde von der Immatics Biotechnology GmbH und der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die SZ wurde durch die Kombination objektiver (Fieber ≥ 38.0 °C) und subjektiver Krankheitssymptome (keine/schlechte/schwere versus schwere, die per Fragebogen gemeldet wurden) der einzelnen Spender bestimmt. Spender mit schweren Krankheitssymptomen und/oder Fieber wurden als 'hohe SC' und alle anderen als 'niedrige SC' klassifiziert. Detaillierte SARS- und PRE-Spendermerkmale sowie Informationen über die Zuordnung der Spender zu den Versuchsgruppen sind in Tabelle [1](#), ergänzende Tabellen [6](#) und [7](#) und erweiterte Daten Abb. [3g enthalten](#).

Die komplette hochkonservierte und repräsentative annotierte Proteomsequenz des SARS-CoV-2-Isolats Wuhan-Hu-1 mit zehn verschiedenen ORFs wurde aus der NCBI-Datenbank mit der Zugangsnummer [MN908947](#) (Ref. [48](#)) abgerufen. Die Aminosäuresequenz ist identisch mit der Referenzsequenz (EPI_ISL_412026), die von Wang et al. definiert wurde, die multiple Sequenzalignierungen und phylogenetische Analysen von 95 genomischen Sequenzen in voller Länge durchführten²⁵.

Vorhersage von SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA-Klasse I-bindenden Peptiden

Die Proteinsequenzen aller zehn ORFs wurden in 9-12 Aminosäuren lange Peptide aufgespalten, die das komplette Proteom des Virus abdecken. Die Prädiktionsalgorithmen NetMHCpan 4.0 (Ref. [49:50:51](#)) und SYFPEITHI 1.0 (Ref. [52](#)) wurden verwendet, um die Bindung der Peptide an HLA-A*01:01, -A*02:01, -A*03:01, -A*11:01, -A*24:02, -B*07:02, -B*08:01, -B*15:01, -B*40:01 und -C*07:02 vorherzusagen. Nur Peptide, die von beiden Algorithmen für den jeweiligen Allotyp als HLA-bindende Peptide vorhergesagt wurden (SYFPEITHI-Score $\geq 60\%$, NetMHCpan-Rang ≤ 2), wurden weiter untersucht. Cysteinhaltige Peptide wurden ausgeschlossen, um eine Dimerisierung in einem möglichen späteren Impfstoffherstellungsprozess zu vermeiden. Peptide, die von dem ORF1-Polyprotein abgeleitet sind, das die Spaltstellen der verschiedenen Proteinketten überspannt, wurden ausgeschlossen. Ein gemittelter Rang, der NetMHCpan- und SYFPEITHI-abgeleitete Vorhersagewerte kombinierte, wurde berechnet, und die Peptide wurden für jeden Allotyp und ORF separat gereiht. Durch eine rangbasierte Auswahl wurde jeweils ein Peptid für jeden ORF und jeden Allotyp ausgewählt. Für Peptide mit gleichen gemittelten Rängen wurden Peptide mit höheren SYFPEITHI-Scores nominiert. Bei einigen HLA-Allotypen gab nicht jeder ORF ein geeignetes HLA-bindendes Peptid ab. Um zehn Peptide pro HLA-Allotyp und ORF zu erhalten, wurden die verbleibenden Plätze mit zusätzlichen Peptiden aus dem ORF9-Nukleokapsid-Protein, dem ORF2-Spike-Protein und ORF1 aufgefüllt.

Vorhersage von SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA-DR-bindenden Peptiden

Für die HLA-DR-Vorhersagen wurden alle zehn ORFs in Peptide von 15 Aminosäuren aufgespalten, so dass sich insgesamt 9.561 Peptide ergaben. Der Prädiktionsalgorithmus SYFPEITHI 1.0 wurde verwendet, um die Bindung an HLA-DRB1*01:01, -DRB1*03:01, -DRB1*04:01, -DRB1*07:01, -DRB1*11:01 und -DRB1*15:01 vorherzusagen. Die 5% (2% für ORF1) Peptide mit der höchsten Punktzahl jedes ORFs (basierend auf der Gesamtlänge jedes ORFs) und jedes HLA-DR-Allotyps wurden ausgewählt. Die positionsbasierte Sortierung der Peptide innerhalb jedes ORFs ergab Peptidcluster aus promiscuen Peptiden, die an mehrere HLA-DR-Allotypen binden. Durch Clusterbasierte Selektion wurden Peptidcluster aus promiscuen Peptiden mit einer gemeinsamen Kernsequenz von neun Aminosäuren ausgewählt. Dabei wurden zehn und zwei Cluster für das ORF9-Nukleokapsid und das ORF2-Spike-Protein sowie je ein Cluster für die übrigen ORFs ausgewählt. Von jedem ausgewählten Cluster wurde ein repräsentatives Peptid für die Immunogenitätsanalyse ausgewählt, wobei cysteinhaltige Peptide ausgeschlossen wurden.

Sequenz- und physiochemische Eigenschaftsanpassungen an humane Schnupfenkoronaviren

Potenzielle kreuzreaktive Epitope der von SARS-CoV-2 abgeleiteten Peptide der vier saisonalen humanen Erkältungs-Coronaviren (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 und HCoV-HKU1) wurden durch Sequenz-Alignierungen der von SARS-CoV-2 abgeleiteten Peptidsequenzen mit den Sequenzen der Erkältungs-Coronaviren unter Verwendung von NCBI BLAST42⁴³ identifiziert. Die HLA-Bindung der von Erkältungs-Coronaviren abgeleiteten Peptide an das HLA-Allel des entsprechenden SARS-CoV-2-Peptids wurde mit den Algorithmen NetMHCpan 4.0 (refs. [49-50-51](#)) und SYFPEITHI 1.0 (refs. [52](#)) vorhergesagt. Physiochemische Eigenschaftsanpassungen der von SARS-CoV-2 abgeleiteten Peptidsequenzen an die menschlichen Schnupfenkoronaviren wurden von PepCalc (<https://pepcalc.com/>) durchgeführt.

IFN- γ ELISPOT-Test nach 12-d In-vitro-Stimulation oder ex vivo ohne Vorstimulation

Synthetische Peptide wurden von EMC Microcollections und INTAVIS Bioanalytical Instruments zur Verfügung gestellt. Für die 12-d In-vitro-Stimulation wurden PBMCs mit HLA-Klasse-I- oder HLA-DR-Peptidpools gepulst ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$ pro Peptid für Klasse I oder $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ für HLA-DR) und für 12 d kultiviert, wobei 20 U ml^{-1} Interleukin-2 (Novartis) an den Tagen 3, 5 und 7 hinzugefügt wurde. Peptid-stimulierte (expandierte/in vitro vorstimulierte) oder frisch aufgetaute (ex vivo) PBMCs wurden mittels Enzym-Immunospot-Test (ELISPOT) in Doppelbestimmung analysiert (falls nicht anders angegeben). Insgesamt $2-8 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung wurden mit $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Klasse I) oder $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (HLA-DR) Einzelpeptiden in 96-well-Platten inkubiert, die mit anti-IFN- γ (Klon 1-D1K, $2 \mu\text{g ml}^{-1}$, MabTech) beschichtet waren. PHA (Sigma-Aldrich) diente als Positivkontrolle, irrelevante HLA-angepasste Kontrollpeptide als Negativkontrolle (Negativkontrollpeptide sind in Ergänzungstabelle [14](#) aufgeführt). Nach 22-24 h Inkubation wurden Spots mit dem biotinylierten Anti-IFN- γ -Nachweisantikörper (Klon 7-B6-1, $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$, MabTech), ExtrAvidin-alkalische Phosphatase (1:1.000 Verdünnung, Sigma-Aldrich) und BCIP/NBT (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat/nitro-blaues Tetrazoliumchlorid, Sigma-Aldrich) nachgewiesen. Die Spots wurden mit einem ImmunoSpot S5-Analysegerät (CTL) gezählt, und T-Zell-Antworten wurden als positiv betrachtet, wenn die mittlere Spotzahl mindestens dreimal höher war als die mittlere Spotzahl der Negativkontrolle. Die Intensität der T-Zell-Antworten wird als berechnete Spotzahlen dargestellt, die als die mittlere Spotzahl der auf 5×10^5 Zellen normalisierten Duplikate abzüglich der normalisierten mittleren Spotzahl der jeweiligen Negativkontrolle berechnet wurden. Im Gegensatz dazu gibt die Erkennungshäufigkeit von T-Zell-Antworten innerhalb einer Spendergruppe die relative Anzahl von Spendern an, die die jeweiligen Peptide oder ECs erkennen können (positive Spender/getestete Spender) (Abb. [2a,b](#), [4d](#) und [5d,e](#)). Die Häufigkeit (Erkennungsrate) für einzelne Spender stellt die Anzahl der anerkannten SARS-CoV-2-abgeleiteten Peptide (positive Peptide/getestete Peptide) dar (Abb. [5a](#) und [6h](#)). Für HLA-C*07-restringierte Peptide wurde das Screening bei PRE-Spendern aufgrund der nicht verfügbaren HLA-C-Typisierung und des bekannten Bindungsungleichgewichts von HLA-B*07 und -C*07 mit Proben von HLA-B*07+ durchgeführt (Ref. [53-54](#)).

Intrazelluläre Zytokin- und Zelloberflächenmarker-Färbung

Peptidspezifische T-Zellen wurden weiter durch intrazelluläre Zytokin- und Zelloberflächenmarker-Färbung charakterisiert. PBMCs wurden mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Peptid, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Brefeldin A (Sigma-Aldrich) und einer 1:500 Verdünnung von GolgiStop (BD) für 12-16 h inkubiert. Die Färbung wurde mit Cytofix/Cytoperm-Lösung (BD), APC/Cy7 anti-human CD4 (1:100-Verdünnung, BioLegend), PE/Cy7 anti-human CD8 (1:400-Verdünnung, Beckman Coulter), Pacific blue anti-human TNF (1:120 Verdünnung, BioLegend), FITC anti-human CD107a (1:100 Verdünnung, BioLegend) und PE anti-human IFN- γ monoklonale Antikörper (1:200 Verdünnung, BioLegend). PMA ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) und Ionomycin ($1 \mu\text{M}$, Sigma-Aldrich) dienten als Positivkontrolle. Lebensfähige Zellen wurden mit Aqua live/dead (1:400 Verdünnung, Invitrogen) bestimmt. Alle Proben wurden auf einem FACS Canto II Zytometer (BD) analysiert und mit der Software FlowJo v.10.0.8 (BD) ausgewertet. Die für die Auswertung der mit der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten angewandte Anschnittstrategie ist in der ergänzenden Abb. [5](#) dargestellt.

SARS-CoV-2 IgG-ELISA

Der 96-Well SARS-CoV-2 IgG ELISA-Assay (EUROIMMUN, 2606A_A_DE_C03, in der Zusammensetzung vom 22. April 2020) wurde auf einem automatisierten BEP 2000 Advance-System (Siemens Healthcare Diagnostics) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der ELISA-Assay weist Anti-SARS-CoV-2 IgG nach, das gegen die S1-Domäne des viralen Spike-Proteins gerichtet ist, und stützt sich auf einen Assay-spezifischen Kalibrator, um ein Verhältnis der Probenabsorption zur Kalibratorabsorption anzugeben. Die endgültige Interpretation der Positivität wird durch das Verhältnis über einem vom Hersteller angegebenen Schwellenwert bestimmt: positiv (Verhältnis $\geq 1,1$), grenzwertig (Verhältnis $0,8-1,0$) oder negativ (Verhältnis $< 0,8$). Die Qualitätskontrolle wurde nach den Anweisungen des Herstellers an jedem Testtag durchgeführt.

Elecsys Anti-SARS-CoV-2-Immunoassay

Der Elecsys anti-SARS-CoV-2-Assay ist ein elektrogenerierter Chemilumineszenz-Immunoassay (Roche Diagnostics) und wurde gemäß den Herstelleranweisungen (v.1.0, Stand Mai 2020) verwendet. Er ist für den Nachweis von hochaffinen Antikörpern (einschließlich IgG) gegen das Nukleokapsidprotein von SARS-CoV-2 in Humanserum bestimmt. Die Auslesung wurde auf einem Cobas e411-Analysegerät durchgeführt. Negative Ergebnisse wurden durch einen Cutoff-Index von $< 1,0$ definiert. Die Qualitätskontrolle wurde nach den Anweisungen des Herstellers an jedem Testtag durchgeführt.

Erzeugung von Expressionskonstrukten für die Produktion viraler Antigene

Die komplementären DNAs, die für die Nukleokapsidproteine von HCoV-OC43, HCoV-NL63 und HCoV-229E kodieren (NCBI-Genbank-Zugangsnummern [YP_009555245.1](#); [YP_003771.1](#); [NP_073556.1](#)) wurden mit einem N-terminalen Hexahistidin (His6)-Tag durch Gensynthese (Thermo Fisher Scientific) hergestellt und mit Standardtechniken in NdeI/HindIII-Stellen des bakteriellen Expressionsvektors pRSET2b (Thermo Fisher Scientific) kloniert.

Proteinexpression und -reinigung

Zur Expression der viralen Nukleokapsidproteine wurden die entsprechenden Expressionskonstrukte in *Escherichia coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Die Proteinexpression wurde in 1 l TB-Medium bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 2,5–3 durch Zugabe von 0,2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid für 16 h bei 20 °C induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (10 min, 6.000 g) und die Pellets wurden in Bindungspuffer (1 × PBS, 0,5 M NaCl, 50 mM Imidazol, 2 mM PMSF, 2 mM MgCl₂, ¹⁵⁰ μg ml⁻¹ Lysozym (Merck) und ⁶²⁵ μg ml⁻¹ DNase I (Applichem)) suspendiert. Zellsuspensionen wurden für 15 min (Bandelin Sonopuls HD70, Leistung MS72/D, Zyklus 50%) auf Eis sonifiziert, für 1 h bei 4 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert und erneut sonifiziert. Nach der Zentrifugation (30 min bei 20.000 g) wurde dem löslichen Proteinextrakt Harnstoff in einer Endkonzentration von 6 M zugesetzt. Der Extrakt wurde durch einen 0,45-μm-Filter filtriert und auf eine voräquilibrierte 1-ml HisTrapFF-Säule (GE Healthcare) geladen. Die gebundenen His-markierten Nukleokapsidproteine wurden mit einem linearen Gradienten (30 ml) von 50 bis 500 mM Imidazol in Elutionspuffer (1 × PBS, pH 7,4, 0,5 M NaCl, 6 M Harnstoff) eluiert. Elutionsfraktionen (0,5 ml), die die His-markierten Nukleokapsidproteine enthielten, wurden gepoolt und dialysiert (D-Tube Dialyzer Mega, Novagen) zu PBS. Alle gereinigten Proteine wurden über die Standard-SDS-PAGE analysiert, gefolgt von einer Färbung mit InstantBlue (Expedeon) und Immunoblotting unter Verwendung eines Anti-His (1:1.000 Verdünnung, QIAGEN) in Kombination mit einem mit AlexaFluor647 markierten Esel-Anti-Maus (1:2.000 Verdünnung, Invitrogen) auf einem Typhoon Trio (GE Healthcare, Anregung 633 nM, Emissionsfiltereinstellungen 670 nM BP 30) zur Bestätigung der Proteinintegrität.

Vorbereitung von Beads für serologische Multiplex-Tests

Die Antigene wurden auf spektral unterschiedlichen Populationen von carboxylierten paramagnetischen Beads (MagPlex Microspheres, Luminex Corporation) unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-Carbodiimid/Sulfo-N-hydroxysuccinimid-Chemie kovalent immobilisiert. Zur Immobilisierung wurde ein Magnetpartikel-Prozessor (KingFisher 96, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Perlenbestände wurden gründlich verwirbelt und für 15 s sonifiziert. Eine Platte mit 96 tiefen Vertiefungen und ein Spitzenkamm wurden mit 1,1 ml 0,5% (v/v) Triton X-100 blockiert für 10 min. Danach wurde 83 μl mit 0,065% (v/v) Triton X-100 und 1 ml Perlenvorrat in jede Vertiefung gegeben. Schließlich enthielt jede Vertiefung 0,005% (v/v) Triton X-100 und 12,5 × 10⁷ Perlen einer einzelnen Perlenpopulation. Die Kügelchen wurden zweimal mit 500 μl Aktivierungspuffer (100 mM Na₂HPO₄, pH 6,2, 0,005% (v/v) Triton X-100) gewaschen und die Kügelchen wurden für 20 min in 300 μl Aktivierungsmischung aktiviert, die ⁵ mg ml⁻¹ 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-

Carbodiimid und 5 mg ml^{-1} Sulfo-N-hydroxysuccinimid in Aktivierungspuffer enthielt. Nach der Aktivierung wurden die Kügelchen zweimal mit $500 \mu\text{l}$ Kupplungspuffer gewaschen (500 mM MES , $\text{pH } 5,0 + 0,005\% \text{ (v/v) Triton X-100}$). Die Antigene wurden in Kupplungspuffer auf $39 \mu\text{g ml}^{-1}$ verdünnt und mit aktivierten Beads für 2 h bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, um die Antigene auf der Oberfläche zu immobilisieren. Antigengekoppelte Beads wurden zweimal mit $800 \mu\text{l}$ Waschpuffer ($1 \times \text{PBS} + 0,005\% \text{ (v/v) Triton X-100}$) gewaschen und schließlich in 1 ml Speicherpuffer ($1 \times \text{PBS} + 1\% \text{ (w/v) BSA} + 0,05\% \text{ (v/v) ProClin}$) resuspendiert. Die Beads wurden bis zur weiteren Verwendung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Bead-basierter serologischer Multiplex-Assay

Zum Nachweis von humanem IgG, das gegen Nukleokapsidproteine von drei verschiedenen Coronavirus-Spezies (HCoV-229E, HCoV-NL63 und HCoV-OC43) gerichtet ist, wurde ein Bead-basierter Multiplex-Assay durchgeführt. Alle Antigene wurden, wie oben beschrieben, auf verschiedenen Bead-Populationen immobilisiert. Die einzelnen Bead-Populationen wurden in einem Bead-Mix kombiniert. Eine Gesamtmenge von $25 \mu\text{l}$ verdünnter Serumprobe wurde zu $25 \mu\text{l}$ des Beadmixes hinzugefügt, was zu einer endgültigen Probenverdünnung von 1:400 führte, und für 2 h bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Beads mit $100 \mu\text{l}$ Waschpuffer ($1 \times \text{PBS} + 0,05\% \text{ (v/v) Tween20}$) pro Well unter Verwendung eines Mikroplattenwaschers (Biotek 405TS, Biotek Instruments) entfernt. Gebundene Antikörper wurden durch Inkubation der Beads mit PE-markierten Ziegen-Anti-Human-IgG-Nachweisantikörpern (Jackson Dianova) bei einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ für 45 min bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ nachgewiesen. Die Messungen wurden mit einem Luminex FlexMap 3D-Gerät unter Verwendung der Luminex xPONENT Software v.4.3 durchgeführt (Probengröße, $80 \mu\text{l}$; 100 Ereignisse; Gate, 7.500-15.000; Reporterverstärkung, Standard-PMT). Die Datenanalyse wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität durchgeführt.

Software und statistische Analyse

Die Bevölkerungserfassung der HLA-Allotypen wurde mit dem IEDB-Bevölkerungserfassungsinstrument berechnet (www.iedb.org). Durchflusszytometrische Daten wurden mit FlowJo v.10.0.8 (BD) analysiert. Die Daten werden als Mittelwert mit s.d., Box-Plots als Median mit 25. oder 75. Quantil und Min/Max-Whiskers dargestellt. Kontinuierliche Daten wurden auf Verteilung getestet, und einzelne Gruppen wurden mit Hilfe eines ungepaarten Student's *t*-Tests, Mann-Whitney *U*-Tests oder Kruskal-Wallis-Tests getestet und wie angegeben für Mehrfachvergleiche korrigiert. Der Spearman's rho (ρ) wurde für die Korrelation zwischen kontinuierlichen Daten berechnet. Ein logistisches Regressionsmodell wurde zur Berechnung von Odds Ratios und 95%-Konfidenzintervallen verwendet. Faktoren vor dem Ergebnis und gemessene kontinuierliche Variablen wurden in das Modell einbezogen. Fehlende Daten wurden in Tabellen und in die deskriptive Analyse aufgenommen. Die Diagramme wurden mit GraphPad Prism v.8.4.0 erstellt. Statistische Analysen wurden mit

GraphPad Prism v.8.4.0 und der Software JMP Pro (SAS Institute, v.14.2) durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Zusammenfassung der Berichterstattung

Weitere Informationen zum Forschungsdesign finden Sie in der mit diesem Artikel verknüpften [Nature Research Reporting Summary](#).

Verfügbarkeit von Daten

Daten zu den Ergebnissen dieser Studie sind beim entsprechenden Autor auf Anfrage erhältlich. [Die Quelldaten](#) werden mit diesem Papier zur Verfügung gestellt.

Literaturhinweise

1. 1.

Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 247–258 (2008).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

2. 2.

Swain, S. L., McKinstry, K. K. & Strutt, T. M. Erweiterung der Rolle von CD4+ T-Zellen bei der Immunität gegen Viren. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 136–148 (2012).

[CAS PubMed PubMed Zentraler Artikel Google Scholar](#)

3. 3.

Rosendahl Huber, S., van Beek, J., de Jonge, J., Luytjes, W. & van Baarle, D. T-Zell-Antworten auf Virusinfektionen - Möglichkeiten der Peptidimpfung. *Vorderseite. Immunol.* **5**, 171 (2014).

4. 4.

Khan, N. et al. T-Zell-Erkennungsmuster von immundominanten Zytomegalievirus-Antigenen bei primärer und persistierender Infektion. *J. Immunol.* **178**, 4455–4465 (2007).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

5. 5.

Lübke, M. et al. Identifizierung von HCMV-abgeleiteten T-Zell-Epitopen in seropositiven Individuen durch virale Deletionsmodelle. *J. Exp. Med.* **217**, e20191164 (2020).

[PubMed-Artikel CAS Google Scholar](#)

6. 6.

Falk, K. et al. Analyse eines natürlich vorkommenden HLA Klasse I-restringierten Virusepitops. *Immunologie* **82**, 337-342 (1994).

[CAS PubMed PubMed Central Google Scholar](#)

7. 7.

Einsele, H. et al. Infusion von Zytomegalievirus (CMV)-spezifischen T-Zellen zur Behandlung einer CMV-Infektion, die auf eine antivirale Chemotherapie nicht anspricht. *Blut* **99**, 3916-3922 (2002).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

8. 8.

Tan, A. C. et al. Das Design und der Konzeptbeweis für einen CD8+ T-Zell-basierten Impfstoff, der einen Quersubtypenschutz gegen das Influenza-A-Virus induziert. *Immunol. Zelle Biol.* **91**, 96-104 (2013).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

9. 9.

Mudd, P. A. et al. Impfstoff-induzierte CD8+ T-Zellen kontrollieren die Replikation des AIDS-Virus. *Natur* **491**, 129-133 (2012).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

10.10.

Mo, P. et al. Klinische Merkmale der refraktären COVID-19-Pneumonie in Wuhan, China. *Klin. infizieren. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa270> (2020).

11.11.

Khan, S. et al. Emergenz eines neuartigen Coronavirus, schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus 2: Biologie und therapeutische Optionen. *J. Clin. Mikrobiol.* <https://doi.org/10.1128/JCM.00187-20> (2020); erratum <https://doi.org/10.1128/JCM.01297-20> (2020).

12.12.

Zhao, J. et al. CD4+ T-Zellen des Atemweggedächtnisses vermitteln eine protektive Immunität gegen entstehende respiratorische Koronaviren. *Immunität* **44**, 1379-1391 (2016).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [Google Scholar](#)

13.13.

Zhao, J., Zhao, J. & Perlman, S. T-Zellreaktionen sind für den Schutz vor klinischen Erkrankungen und für die Virus-Clearance bei Coronavirus-infizierten Mäusen mit schwerem akuten respiratorischen Syndrom erforderlich. *J. Virol.* **84**, 9318–9325 (2010).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [Google Scholar](#)

14.14.

Channappanavar, R., Fett, C., Zhao, J., Meyerholz, D. K. & Perlman, S. Virus-spezifische CD8+ T-Gedächtniszellen bieten einen erheblichen Schutz vor einer tödlichen Infektion mit dem Coronavirus des schweren akuten respiratorischen Syndroms. *J. Virol.* **88**, 11034–11044 (2014).

[PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [CAS](#) [Google Scholar](#)

15.15.

Ng, O. W. et al. Memory-T-Zell-Antworten, die gegen das SARS-Coronavirus gerichtet sind, halten bis zu 11 Jahre nach der Infektion an. *Impfstoff* **34**, 2008-2014 (2016).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [Google Scholar](#)

16.16.

Liu, L. et al. Anti-Spike-IgG verursacht während einer akuten SARS-CoV-Infektion eine schwere akute Lungenverletzung durch schiefe Makrophagenreaktionen. *JCI-Einblick* <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123158> (2019).

17.17.

Tang, F. et al. Fehlende periphere Gedächtnis-B-Zell-Reaktionen bei genesenen Patienten mit schwerem akuten respiratorischen Syndrom: eine sechsjährige Folgestudie. *J. Immunol.* **186**, 7264–7268 (2011).

[CAS PubMed Artikel PubMed Central Google Scholar](#)

18.18.

Grifoni, A. et al. Ziele der T-Zell-Reaktionen auf das SARS-CoV-2-Coronavirus bei Menschen mit COVID-19-Erkrankung und bei nicht exponierten Personen. *Zelle* **181**, 1489-1501 (2020).

[CAS PubMed PubMed Zentraler Artikel Google Scholar](#)

19.19.

Braun, J. et al. SARS-CoV-2-reaktive T-Zellen bei gesunden Spendern und Patienten mit COVID-19 *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9> (2020).

20.20.

Le Bert, N. et al. SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Immunität bei COVID-19 und SARS sowie bei nicht infizierten Kontrollen. *Art* **584**, 457-462 (2020).

[PubMed-Artikel CAS Google Scholar](#)

21.21.

Petrova, G., Ferrante, A. & Gorski, J. Kreuzreaktivität von T-Zellen und ihre Rolle im Immunsystem. *Krit. Rev. Immunol.* **32**, 349–372 (2012).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [Google Scholar](#)

22.22.

Su, L. F., Kidd, B. A., Han, A., Kotzin, J. J. & Davis, M. M. Virus-spezifische CD4+-Gedächtnis-Phänotyp-T-Zellen sind in nicht exponierten Erwachsenen reichlich vorhanden. *Immunität* **38**, 373-383 (2013).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [Google Scholar](#)

23.23.

Bui, H. H. et al. Vorhersage der Bevölkerungsabdeckung durch T-Zell-Epitop-basierte Diagnostika und Impfstoffe. *BMC Bioinf.* **7**, 153 (2006).

[Artikel](#) [CAS](#) [Google Scholar](#)

24.24.

Vita, R. et al. Die Immunepitop-Datenbank (IEDB) 3.0. *Nukleinsäuren Res.* **43**, D405-D412 (2014).

[PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [CAS](#) [Google Scholar](#)

25.25.

Wang, C. et al. Die Festlegung der Referenzsequenz für SARS-CoV-2 und Variationsanalyse. *J. Med. Virol.* **92**, 667–674 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [Artikel](#) [Google Scholar](#)

26.26.

Phan, T. Genetische Vielfalt und Entwicklung von SARS-CoV-2. *Infizieren. Ginsterkatze. Evol.* **81**, 104260 (2020).

[CAS PubMed PubMed Zentraler Artikel Google Scholar](#)

27.27.

Lang, Q. X. et al. Antikörperreaktionen auf SARS-CoV-2 bei Patienten mit COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 845–848 (2020).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

28.28.

Kruttgen, A. et al. Vergleich von vier neuen kommerziellen serologischen Assays zur Bestimmung von SARS-CoV-2 IgG. *J. Clin. Virol.* **128**, 104394 (2020).

[PubMed PubMed Zentraler Artikel CAS Google Scholar](#)

29.29.

Wilkinson, T. M. et al. Bereits vorhandene Influenza-spezifische CD4+ T-Zellen korrelieren mit dem Krankheitsschutz gegen die Influenza-Herausforderung beim Menschen. *Nat. Med.* **18**, 274–280 (2012).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

30.30.

Soghoian, D. Z. et al. HIV-spezifische zytolytische CD4+ T-Zell-Reaktionen während einer akuten HIV-Infektion sagen den Krankheitsausgang voraus. *Sci. übersetzen. Med.* **4**, 123ra125 (2012).

[Artikel CAS Google Scholar](#)

31.31.

Vali, B. et al. Charakterisierung der kreuzreaktiven CD8+ T-Zell-Erkennung von HLA-A2-restringierten HIV-Gag (SLYNTVATL) und HCV-NS5b (ALYDVVSKL) Epitopen bei Personen, die mit humanen Immunschwäche- und Hepatitis-C-Viren infiziert sind. *J. Virol.* **85**, 254–263 (2011).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

32.32.

Acierno, P. M. et al. Kreuzreaktivität zwischen HLA-A2-restringierten FLU-M1:58-66 und HIV p17 GAG:77-85 Epitopen bei HIV-infizierten und nicht infizierten Personen. *J. Übersetzen. Med.* **1**, 3 (2003).

[PubMed PubMed Zentraler Artikel Google Scholar](#)

33.33.

Friberg, H. et al. Memory CD8+ T-Zellen aus einer natürlich erworbenen primären Dengue-Virusinfektion sind hochgradig kreuzreaktiv. *Immunol. Zelle Biol.* **89**, 122-129 (2011).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

34.34.

Walisch, R. M., Che, J. W., Brehm, M. A. & Selin, L. K. Heterologe Immunität zwischen Viren. *Immunol. Rev.* **235**, 244-266 (2010).

[CAS PubMed PubMed Zentraler Artikel Google Scholar](#)

35.35.

Benn, C. S., Netea, M. G., Selin, L. K. & Aaby, P. Ein kleiner Stich - große Wirkung: unspezifische Immunmodulation durch Impfstoffe. *Tendenzen Immunol.* **34**, 431–439 (2013).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

36.36.

Watkin, L. B. et al. Einzigartige Influenza A kreuzreaktive Gedächtnis-CD8+ T-Zell-Rezeptor-Repertoire hat das Potenzial, vor EBV-Serokonversion zu schützen. *J. Allergie-Klinik. Immunol.* **140**, 1206–1210 (2017).

[CAS PubMed PubMed Zentraler Artikel Google Scholar](#)

37.37.

Aslan, N. et al. Der Schweregrad der akuten infektiösen Mononukleose korreliert mit kreuzreaktiven Influenza-CD8+-T-Zell-Rezeptor-Repertoires. *MBio* <https://doi.org/10.1128/mBio.01841-17> (2017).

38.38.

Yin, Y. & Mariuzza, R. A. Die vielfältigen Mechanismen der Kreuzreaktivität von T-Zell-Rezeptoren. *Immunität* **31**, 849-851 (2009).

[CAS PubMed Artikel PubMed Central Google Scholar](#)

39.39.

Borbulevych, O. Y. et al. T-Zellrezeptor-Kreuzreaktivität, die durch antigenabhängige Abstimmung der molekularen Peptid-MHC-Flexibilität gesteuert wird. *Immunität* **31**, 885-896 (2009).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [Google Scholar](#)

40.40.

Robert-Koch-Institut. *Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) Täglicher Lagebericht des Robert-Koch-Instituts 29/04/2020*
https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/2020-04-29-en.pdf?_blob=publicationFile
(2020).

41.41.

Dong, E., Du, H. & Gardner, L. Ein interaktives webbasiertes Dashboard zur Verfolgung von COVID-19 in Echtzeit. *Lanzett-Infekt. Dis.* **20**, 533–534 (2020).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [Google Scholar](#)

42.42.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Grundlegendes Suchwerkzeug für die lokale Ausrichtung. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410 (1990).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [Google Scholar](#)

43.43.

Johnson, M. et al. NCBI BLAST: eine bessere Web-Schnittstelle. *Nukleinsäuren Res.* **36**, W5-W9 (2008).

[CAS](#) [PubMed](#) [PubMed](#) [Zentraler Artikel](#) [Google Scholar](#)

44.44.

Sidhom, J.-W. & Baras, A. S. Die Analyse der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Rezeptoren in ImmuneCode zeigt eine Kreuzreaktivität mit dem immunodominanten Influenza M1-Epitop. Vorabdruck bei *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.06.20.160499> (2020).

45.45.

Messaoudi, I., Guevara Patino, J. A., Dyall, R., LeMaout, J. & Nikolich-Zugich, J. Direkte Verbindung zwischen mhc-Polymorphismus, T-Zell-Avidität und Diversität in der Immunabwehr. *Wissenschaft* **298**, 1797-1800 (2002).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

46.46.

Tan, A. C., La Gruta, N. L., Zeng, W. & Jackson, D. C. Vorläuferhäufigkeit und Konkurrenz diktieren die HLA-A2-restringierten CD8+ T-Zell-Reaktionen auf Influenza-A-Infektion und Impfung in transgenen HLA-A2.1-Mäusen. *J. Immunol.* **187**, 1895–1902 (2011).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

47.47.

Kiepiela, P. et al. CD8+ T-Zell-Reaktionen auf verschiedene HIV-Proteine haben disharmonische Assoziationen mit der Viruslast. *Nat. Med.* **13**, 46–53 (2007).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

48.48.

Wu, F. et al. Ein neues Coronavirus, das mit menschlichen Atemwegserkrankungen in China in Verbindung gebracht wird. *Natur* **579**, 265-269 (2020).

[CAS PubMed PubMed Zentraler Artikel Google Scholar](#)

49.49.

Huf, I. et al. NetMHCpan, eine Methode zur Vorhersage der MHC-Klasse I-Bindung über den Menschen hinaus. *Immungenetik* **61**, 1 (2009).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

50.50.

Nielsen, M. & Andreatta, M. NetMHCpan-3.0: Verbesserte Vorhersage der Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle durch Integration von Informationen aus mehreren Rezeptor- und Peptidlängen-Datensätzen. *Genom Med.* **8**, 33 (2016).

[PubMed PubMed Zentraler Artikel CAS Google Scholar](#)

51.51.

Jurtz, V. et al. NetMHCpan-4.0: verbesserte Peptid-MHC-Klasse-I-Interaktionsvorhersagen durch Integration von eluierten Liganden- und Peptidbindungsaffinitätsdaten. *J. Immunol.* **199**, 3360–3368 (2017).

[CAS PubMed PubMed Zentraler Artikel Google Scholar](#)

52.52.

Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanovic, S. SYFPEITHI: Datenbank für MHC-Liganden und Peptidmotive. *Immungenetik* **50**, 213-219 (1999).

53.53.

Schlott, F. et al. Charakterisierung und klinische Anreicherung von HLA-C*07:02-restringierten Zytomegalievirus-spezifischen CD8+ T-Zellen. *PLoS ONE* **13**, e0193554 (2018).

[PubMed PubMed Zentraler Artikel CAS Google Scholar](#)

54.54.

Schmidt, A. H. et al. Abschätzung der hochauflösenden HLA-A, -B, -C, -DRB1-Allel- und Haplotyp-Häufigkeiten auf der Basis von 8.862 deutschen Stammzellspendern und Implikationen für die strategische Planung des Spenderregisters. *Brummen Immunol.* **70**, 895–902 (2009).

[CAS PubMed Artikel Google Scholar](#)

[Referenzen herunterladen](#)

Danksagungen

Wir danken allen Spendern von SARS und PRE für ihre Unterstützung unserer Forschung. Wir danken U. Schmidt, C. Bauer, A. Petz, M. Storz, I. Riedlinger, S. Sauter, S. Augstein, C. Reiß, V. Agrusa, S. Dethling, M. Beller und C. Falkenburger für die technische Unterstützung und Projektkoordination. Diese Arbeit wurde gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (FKZ:01KI20130; J.W.), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Förderung WA 4608/1-2; J.W.), die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen der Exzellenzstrategie Deutschlands (Förderung EXC2180-390900677; J.W., S.S., H.-G.R., C.G. und H.R.S.), das Deutsche Krebsforschungskonsortium (S.S., H.-G.R., C.G. und H.R.S.), die Wilhelm Sander Stiftung (Stipendium 2016.177.2; J.W.), die José Carreras Leukämie-Stiftung (Stipendium DJCLS 05R/2017; J.W.) und das Fortüne-Programm der Universität Tübingen (Fortüne Nr. 2451-0-0 und 2581-0-0; J.W. und M.R.). Der Multiplex-Antikörpernachweis gegen gewöhnliche Erkältungskoronaviren ist Teil eines Projekts, das im Rahmen des Forschungs- und Innovationsprogramms Horizont 2020 der Europäischen Union unter der Förderungsnummer 101003480 - CORESMA (G.K. and M.S.) gefördert wird.

Informationen zum Autor

Anmerkungen des Autors

1. Diese Autoren trugen gleichermaßen dazu bei: Annika Nelde, Tatjana Bilich, Jonas S. Heitmann.

Mitgliedschaften

- 1. Klinische Kooperationseinheit Translationale Immunologie, Deutsches Krebskonsortium (DKTK), Abteilung Innere Medizin, Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Deutschland**

Annika Nelde, Tatjana Bilich, Jonas S. Heitmann, Yacine Maringer, Helmut R. Salih, Jens Bauer, Jonas Rieth, Marcel Wacker, Lena-Christin Gruber, David Rachfalski, Ilona Hagelstein, Melanie Märklin & Juliane S. Walz

- 2. Institut für Zellbiologie, Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland**

Annika Nelde, Tatjana Bilich, Yacine Maringer, Malte Roerden, Maren Lübke, Jens Bauer, Jonas Rieth, Marcel Wacker, Michael Fehr, Cécile Gouttefangeas, Stefan Stevanović, Hans-Georg Rammensee & Juliane S. Walz

- 3. Exzellenzcluster iFIT (EXC2180) 'Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies', Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland**

Annika Nelde, Tatjana Bilich, Jonas S. Heitmann, Yacine Maringer, Helmut R. Salih, Malte Roerden, Armin Rabsteyn, Ilona Hagelstein, Melanie Märklin, Cécile Gouttefangeas, Hans-Georg Rammensee & Juliane S. Walz

- 4. Deutsches Krebskonsortium (DKTK) und Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Partnerstandort Tübingen, Tübingen, Deutschland**

Helmut R. Salih, Cécile Gouttefangeas, Stefan Stevanović & Hans-Georg Rammensee

- 5. Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Deutschland**

Malte Roerden, Beate Preuß & Reinhild Klein

- 6. Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Abteilung für Diagnostische Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Deutschland**

Andreas Peter & Sebastian Hörber

- 7. NMI, Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen, Reutlingen, Deutschland**

Björn Traenkle, Philipp D. Kaiser, Ulrich Rothbauer, Matthias Becker, Daniel Junker, Nicole Schneiderhan-Marra, Markus F. Templin & Thomas O. Joos

8. Pharmazeutische Biotechnologie, Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland

Ulrich Rothbauer

9. Abteilung Epidemiologie, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Deutschland

Gérard Krause & Monika Strengert

10. TWINCORE GmbH, Zentrum für experimentelle und klinische Infektionsforschung, ein Gemeinschaftsunternehmen der Medizinischen Hochschule Hannover und des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, Hannover, Deutschland

Gérard Krause & Monika Strengert

11. Deutsches Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Deutschland

Gérard Krause

12. Immatics Biotechnologies GmbH, Tübingen, Deutschland

Daniel J. Kowalewski & Vlatka Stos-Zweifel

13. Abteilung für Allgemeine Pädiatrie, Onkologie/Hämatologie, Universitätskinderklinik Tübingen, Tübingen, Deutschland

Armin Rabsteyn

14. Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Deutschland

Valbona Mirakaj

15. Abteilung für Onkologie und Hämatologie, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt, Deutschland

Julia Karbach & Elke Jäger

16. Angewandte Bioinformatik, Zentrum für Bioinformatik und Abteilung für Informatik, Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland

Michael Graf & Oliver Kohlbacher

17. Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Deutschland

Tamam Bakchoul

18. Institut für Bioinformatik und Medizinische Informatik, Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland

Oliver Kohlbacher

19. Biomolekulare Interaktionen, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Deutschland

Oliver Kohlbacher

20. Institut für Translationale Bioinformatik, Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Deutschland

Oliver Kohlbacher

Verfasser

Annika Nelde

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Tatjana Bilich

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Jonas S. Heitmann

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Yacine Maringer

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Helmut R. Salih

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Malte Roerden

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Maren Lübke

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Jens Bauer

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Jonas Rieth

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Marcel Wacker

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Andreas Peter

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Sebastian Hörber

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Björn Traenkle

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Philipp D. Kaiser

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Ulrich Rothbauer

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Matthias Becker

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Daniel Junker

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Gérard Krause

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Monika Strengert

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Nicole Schneiderhan-Marra

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Markus F. Templin

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Thomas O. Joos

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Daniel J. Kowalewski

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Vlatka Stos-Zweifel

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Michael Fehr

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Armin Rabsteyn

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Valbona Mirakaj

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Julia Karbach

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Elke Jäger

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Michael Graf

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Lena-Christin Gruber

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

David Rachfalski

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Beate Preuß

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Ilona Hagelstein

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Melanie Märklin

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Tamam Bakchoul

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Cécile Gouttefangeas

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Oliver Kohlbacher

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Reinhild Klein

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Stefan Stevanović

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Hans-Georg Rammensee

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Juliane S. Walz

[Autorenpublikationen anzeigen](#)

Sie können auch inPubMedGoogle [Scholar](#) nach diesem Autor suchen

Beiträge

A.N., H.-G.R., S.S., C.G. und J.S.W. konzipierten die Studie; A.N., S.S. und J.S.W. führten die Vorhersage und Auswahl der Kandidatenpeptide in silico durch; T. Bilich, Y.M., M.L., A.N., J.B., J.R., M.W., M.F., I.H. und M.M. führten in vitro T-Zell-Experimente durch. B.P., R.K., D.J.K. und V.S.-Z. führten HLA-Allotyp-Analysen durch. B.T., P.D.K. und U.R. erzeugten Expressionsplasmide und gereinigte Proteine für den serologischen Multiplex-Luminex-Assay, der von M.B., D.J., G.K., M.S., N.S.-M. entwickelt und durchgeführt wurde, M.F.T. und T.O.J. SARS-CoV-2 IgG wurde von S.H. und A.P. nachgewiesen. J.S.H., M.R., A.R., V.M., J.K., E.J., T. Bakchoul, L.-C.G., D.R., H.R.S. und J.S.W. führten Patientendaten und Probensammlung sowie medizinische Auswertung und Analyse durch. A.N., T. Bilich, J.S.H., M.G., M.G., O.K. und J.S.W. analysierten Daten und führten statistische Analysen durch. A.N., T. Bilich, J.S.H., H.R.S. und J.S.W. entwarfen das Manuskript. H.-G.R., S.S. und J.S.W. überwachten die Studie.

Korrespondierender Autor

Korrespondenz an [Juliane S. Walz](#).

Ethik-Erklärungen

Konkurrierende Interessen

D.J.K. und V.S.-Z. sind Mitarbeiter der Immatics Biotechnologies GmbH. H.-G.R. ist Gesellschafter der Immatics Biotechnologies GmbH und der Curevac AG. A.N., T. Bilich, H.-G.R. und J.S.W. halten Patente auf die in diesem Manuskript beschriebenen Peptide, die unter den Nummern 20_169_047.6 und 20_190_070.1 gesichert sind. Die anderen Autoren erklären keine konkurrierenden Interessen.

Zusätzliche Informationen

Peer-Review-Informationen Peer-Review-Berichte sind verfügbar. Jamie Wilson war der Hauptredakteur dieses Artikels und leitete den Redaktionsprozess und die Peer-Review in Zusammenarbeit mit dem restlichen Redaktionsteam.

Verlagshinweis Springer Nature bleibt neutral in Bezug auf Rechtsprechungsansprüche in veröffentlichten Karten und institutionelle Zugehörigkeiten.

Erweiterte Daten

[Erweiterte Daten Abb. 1 Vorhersage von SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA-Klasse I-bindenden Peptiden.](#)

a, Überblick über die Aminosäurenlängen der SARS-CoV-2 ORFs, Gesamtzahl der 9-12 Aminosäuren langen Peptide und Anzahl der vorhergesagten HLA Klasse I-Bindungspeptide. aa, Aminosäure; spi, Spike-Protein; env, Hüllprotein; mem, Membranprotein; Nuc, Nukleokapsidprotein. **b**, Anzahl der vorhergesagten HLA Klasse I-Bindungspeptide für jeden HLA Klasse I-Allotyp. **c**, Abdeckung der HLA Klasse I-Allotyp-Population durch die Auswahl der HLA Klasse I-Allotypen im Vergleich zur Weltbevölkerung. Die Häufigkeiten von Individuen innerhalb der Weltbevölkerung, die bis zu fünf HLA-Allotypen (x-Achse) tragen, sind als graue Balken auf der linken y-Achse angegeben. Der kumulative Prozentsatz der Abdeckung der Weltbevölkerung ist als schwarze Punkte auf der rechten y-Achse dargestellt. **d**, Verteilung der verschiedenen HLA-Klasse I-restringierten Peptide innerhalb der SARS-CoV-2 ORFs. Jede Farbe repräsentiert einen bestimmten HLA-Klasse-I-Allotyp. **e-m**, Verteilung der HLA-Klasse-I-bindenden Peptide innerhalb der verschiedenen SARS-CoV-2-ORFs. Ketten (grau) und Domänen (rot) von ORF1 und ORF2 sind angegeben. Jede Farbe steht für einen bestimmten HLA-Klasse-I-Allotyp. nsp, Nichtstrukturprotein; p, Proteinase; Poly; Polymerase; Heli; Helikase; G-tra, Guanin-N7-Methyltransferase; Endo; Endoribonuklease; O-tra, 2'-O-Methyltransferase; sig. pep, Signalpeptid; RBD, Rezeptorbindungsdomäne. [Datenquelle](#)

[Erweiterte Daten Abb. 2 Vorhersage von SARS-CoV-2-abgeleiteten HLA-DR-bindenden Peptiden und ORF-Abdeckung mit vorhergesagten HLA-Klasse I- und HLA-DR-bindenden Peptiden.](#)

a, HLA-DR-Allotyp-Populationsabdeckung, die durch die Auswahl der HLA-DR-Allotypen im Vergleich zur Weltbevölkerung erreicht wurde. Die Häufigkeiten von Individuen innerhalb der Weltbevölkerung, die bis zu zwei HLA-DR-Allotypen (x-Achse) tragen, werden als graue Balken auf der linken y-Achse angezeigt. Der kumulative Prozentsatz der Bevölkerungsabdeckung ist als schwarze Punkte auf der rechten y-Achse dargestellt. **b**, Anzahl der vorhergesagten HLA-DR-bindenden Peptide für jeden HLA-DR-Allotyp, der mit den ausgewählten Peptidclustern abgedeckt ist. Jede Farbe repräsentiert einen bestimmten HLA-DR-Allotyp. spi, Spike-Protein; env,

Hüllprotein; mem, Membranprotein; Nuklei, Nukleokapsidprotein. **c-k**, Verteilung der Peptidcluster, die für das Immunogenitäts-Screening innerhalb der verschiedenen SARS-CoV-2-ORFs ausgewählt wurden. Ketten (grau) und Domänen (rot) von ORF1 und ORF2 sind angegeben. Jede Farbe steht für einen bestimmten HLA-DR-Allotyp. nsp, Nichtstrukturprotein; p, Proteinase; Poly, Polymerase; Heli, Helikase; G-tra, Guanin-N7-Methyltransferase; Endo, Endoribonuklease; O-tra., 2'-O-Methyltransferase; sig. pep., Signalpeptid; RBD, Rezeptorbindungsdomäne. **l**, Proteinabdeckung des gesamten SARS-CoV-2 Proteoms und einzelner SARS-CoV-2 ORFs mit ausgewählten HLA Klasse I- und HLA-DR-bindenden Peptiden (linke y-Achse). Gestreifte Balken zeigen den Anteil der einzelnen ORF-Proteinlängen innerhalb des gesamten SARS-CoV-2-Proteoms an (rechte y-Achse). Die Proteinabdeckung von HLA-DR-abgeleiteten Peptiden für ORF1 (mit # markiert) beträgt 0,3%. [Datenquelle](#)

Erweiterte Daten Abb. 3 Ex vivo T-Zell-Antworten auf SARS-CoV-2-abgeleitete HLA-Klasse I- und HLA-DR T-Zell-Epitop-Zusammensetzungen bei SARS-CoV-2-Rekonvaleszenten und hospitalisierten COVID-19-Patienten.

a,b, Ex-vivo-Erkennungshäufigkeit (Spender mit T-Zell-Antworten/getestete Spender) von **(a)** kreuzreaktiven und **(b)** SARS-CoV-2-spezifischen ECs durch nicht expandierte T-Zellen von SARS-Spendern (n = 47) der Gruppe 2, analysiert durch Ex-vivo IFN- γ ELISPOT-Assay. Rote Balken stellen die Erkennungshäufigkeit in Ex-vivo-Analysen dar, während die weißen Balken die Häufigkeit nach einer 12-d-Pre-Stimulation anzeigen. **c-f**, Intensität der T-Zell-Antworten in Form von berechneten Spot-Counts gegen die **(c,d)** kreuzreaktiven und **(e,f)** SARS-CoV-2-spezifischen **(c,e)** HLA-Klasse I- und **(d,f)** HLA-DR-EKs, jeweils direkt ex vivo und nach einer 12-d-Expansion in Proben von SARS-Rekonvaleszenten (n = 47). Jeder Spot repräsentiert einen einzelnen Spender, die gepaarten Proben sind durch durchgehende Linien verbunden, zweiseitiger Wilcoxon-Test. Es werden nur positive Spender dargestellt. T-Zell-Antworten wurden als positiv betrachtet, wenn die mittlere Anzahl der Spots mindestens dreimal so hoch war wie die der Negativkontrolle. **g**, Charakteristika von hospitalisierten Spendern (n = 21), analysiert im ex vivo IFN- γ ELISPOT-Test. ECMO, extrakorporale Membranoxygenierung; n, Anzahl; n.a., nicht verfügbar. **h**, Ex-vivo-Erkennungshäufigkeit (Spender mit T-Zell-Reaktionen/getestete Spender) von SARS-Spendern der Gruppe 2 im Vergleich zu hospitalisierten Spendern, die mit dem ex vivo IFN- γ ELISPOT-Test analysiert wurden. [Datenquelle](#)

Erweiterte Daten Abb. 4 Korrelation der Antikörperantwort mit der gemessenen T-Zell-Intensität.

a,b, Korrelationsanalyse der IgG-Serum-ELISA-Verhältnisse (EUROIMMUN) zu SARS-CoV-2 und berechnete Spotzahlen, bewertet in IFN- γ ELISPOT-Assays nach einer 12-d In-vitro-Pre-stimulation für HLA-Klasse I-restringierte **(a)** SARS-CoV-2-spezifische (n = 68) und **(b)** kreuzreaktive (n = 51) ECs in SARS-Gruppe 2 (gestrichelte Linien: 95% Konfidenzniveau, Spearman'scher rho (ρ) und P-Wert). **c-h**, Korrelationsanalyse von IgG (MFI-Signale) zum Nukleokapsid-Protein von drei gewöhnlichen Erkältungskoronaviren (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63) und berechnete Spot-Zahlen, die in IFN- γ ELISPOT-Assays nach einer 12-d in vitro-Pre-stimulation für **(c-e)** HLA-Klasse I (n = 51) und **(f-h)** HLA-DR (n = 86) kreuzreaktive ECs in SARS-Gruppe 2 (gestrichelte Linien: 95% Konfidenzniveau, Spearman'scher rho (ρ) und P-Wert). MFI, mittlere Fluoreszenzintensität. [Datenquelle](#)

Erweiterte Daten Abb. 5 Prädiktoren für den Schweregrad der Symptome bei der Patientensammlung.

a,b, Odds Ratios (ORs) für Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI)-Gruppen, IgG-Antikörperreaktionen (EUROIMMUN) und **(a)** Intensität der T-Zell-Reaktionen auf HLA-Klasse I- und HLA-DR SARS-CoV-2-spezifische EKs oder **(b)** Erkennungsrate auf der Grundlage eines angepassten Modells von Prädiktoren für niedrige versus hohe Symptom-Scores (SC) bei SARS-Spendern der Gruppe **(a)** 2 bzw. **(b)** 1. * angepasste ODER pro Einheit Anstieg der kontinuierlichen Variablen.

[Erweiterte Daten Abb. 6](#)

SARS-CoV-2-spezifische und kreuzreaktive HLA Klasse I und HLA-DR T-Zell-Epitop-Zusammensetzungen.

Ergänzende Informationen

[Ergänzende Informationen](#)

Ergänzende Abb. 1-5 und ergänzende Tabellen 1-14.

[Zusammenfassung der Berichterstattung](#)

[Peer-Review-Informationen](#)

[Ergänzende Daten 1](#)

Physiochemische Eigenschaften der SARS-CoV-2 T-Zell-Epitope im Vergleich zu humanen Schnupfenkoronaviren. Dieser Datensatz enthält die physiochemischen Eigenschaften von SARS-CoV-2-abgeleiteten kreuzreaktiven HLA-Klasse I- und HLA-DR-T-Zell-Epitopen im Vergleich zu vier humanen Erkältungskoronaviren (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 und HCoV-HKU1).

[Ergänzende Daten 2](#)

Ergänzende Abb. 2 zu den Quelldaten.

[Ergänzende Daten 3](#)

Ergänzung zu den Quelldaten Abb. 3.

[Ergänzende Daten 4](#)

Ergänzende Abb. 4 zu den Quelldaten.

Quelldaten

[Quelldaten Abb. 1](#)

Statistische Quelldaten

[Quelldaten Abb. 2](#)

Statistische Quelldaten

[Quelldaten Abb. 3](#)

Statistische Quelldaten

[Quelldaten Abb. 4](#)

Statistische Quelldaten

[Quelldaten Abb. 5](#)

Statistische Quelldaten

[Quelldaten Abb. 6](#)

Statistische Quelldaten

[Quelldaten Erweiterte Daten Abb. 1](#)

Statistische Quelldaten

[Quelldaten Erweiterte Daten Abb. 2](#)

Statistische Quelldaten

[Quelldaten Erweiterte Daten Abb. 3](#)

Statistische Quelldaten

[Quelldaten Erweiterte Daten Abb. 4](#)

Statistische Quelldaten

Rechte und Genehmigungen

[Nachdrucke und Genehmigungen](#)

Über diesen Artikel

Diesen Artikel zitieren

Von SARS-CoV-2 abgeleitete Peptide von Nelde, A., Bilich, T., Heitmann, J.S. *et al.* definieren heterologe und COVID-19-induzierte T-Zell-Erkennung. *Nat Immunol* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00808-x>

[Zitat herunterladen](#)

Eingegangen 10 Juni 2020

Angenommen 11 September 2020

Veröffentlicht 30. September 2020

DOI <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00808-x>

[PDF herunterladen](#)

Erforschen Sie unseren Inhalt

[Nachrichten & Kommentar](#)

[Forschung](#)

[Aktuelle Ausgabe](#)

[Themen durchsuchen](#)

[Artikel durchsuchen](#)

[Sammlungen durchsuchen](#)

[Für Alerts anmelden](#)

Informationen zur Zeitschrift

[Über die Zeitschrift](#)

[Für Autoren](#)

[Für Gutachter](#)

[Web-Feeds](#)

[Plakate](#)

[Videos](#)

[Manuskript einreichen](#)

Artikel-Suche

Suche

[Erweiterte Suche](#)

Schnelle Links

[Artikel nach Thema erforschen](#)

[Einen Job finden](#)

[Leitfaden für Autoren](#)

[Redaktionelle Richtlinien](#)

[Über uns](#)

[Pressemitteilungen](#)

[Pressestelle](#)

[Kontakt](#)

Inhalte entdecken

[Zeitschriften A-Z](#)

[Artikel nach Thema](#)

[Nano](#)

[Protokoll-Austausch](#)

[Natur-Index](#)

Veröffentlichen Sie bei uns

[Leitfaden für Autoren](#)

[Leitfaden für Schiedsrichter](#)

[Redaktionelle Richtlinien](#)

[Offener Zugang](#)

[Nachdrucke & Genehmigungen](#)

Dienstleistungen für Forscher

[Forschungsdaten](#)

[Sprachliche Bearbeitung](#)

[Wissenschaftliche Redaktion](#)

[Natur-Meisterklassen](#)

[Naturwissenschaftliche Akademien](#)

Bibliotheken & Institutionen

[Bibliotheksdienst & Werkzeuge](#)

[Bibliothekarisches Portal](#)

[Offene Forschung](#)

Werbung & Partnerschaften

[Werbung](#)

[Partnerschaften und Dienstleistungen](#)

[Medien-Kits](#)

[Markenbezogene Inhalte](#)

Berufliche Entwicklung

[Natur-Karrieren](#)

[Natur-Konferenzen](#)

[Naturereignisse](#)

Regionale Websites

[Natur China](#)

[Natur Indien](#)

[Natur Japan](#)

[Natur Korea](#)

[Natur Naher Osten](#)

Rechtliches & Datenschutz

[Datenschutzerklärung](#)

[Verwendung von Cookies](#)

[Cookies verwalten/meine Daten nicht verkaufen](#)

[Rechtlicher Hinweis](#)

[Erklärung zur Barrierefreiheit](#)

[Bedingungen und Konditionen](#)

[Kalifornische Datenschutzerklärung](#)

© 2020 Springer Nature Limited