

Aus der Klinik für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss genetischer Faktoren auf einen schweren Verlauf einer
SARS-CoV-2 Infektion

Identification of genetic factors which lead to a severe clinical course
during infection with SARS-CoV-2

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Phillip Suwalski

aus Berlin

Datum der Promotion: 29. November 2024

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

January Weiner 3rd, **Phillip Suwalski**, Manuel Holtgrewe, Alexander Rakitko, Charlotte Thibeault, Melina Müller, Dimitri Patriki, Claudia Quedenau, Ulrike Krüger, Valery Ilinsky Iaroslav Popov, Joseph Balnis, Ariel Jaitovich, Elisa T Helbig, Lena J Lippert, Paula Stubbemann, Luis M Real, Juan Macías, Juan A Pineda, Marta Fernandez-Fuertes, Xiaomin Wang, Zehra Karadeniz, Jacopo Saccomanno, Jan-Moritz Doehn, Ralf-Harto Hübner, Bernd Hinzmann, Mauricio Salvo, Anja Blueher, Sandra Siemann, Stjepan Jurisic, Juerg H. Beer, Jonas Rutishauser, Benedikt Wiggli, Hansruedi Schmid, Kathrin Danninger, Ronald Binder, Victor M Corman, Barbara Mühlemann, Rao Arjun Arkal, Gabriela K. Fragiadakis, Eran Mick, Consortium COMET, Carolyn S. Calfee, David J. Erle, Carolyn M. Hendrickson, Kirsten N. Kangelaris, Matthew F. Krummel, Prescott G. Woodruff, Charles R. Langelier, Urmila Venkataramani, Federico García, Joanna Zyla, Christian Drosten, Braun Alice, Terry C Jones, Norbert Suttorp, Martin Witzernath, Stefan Hippenstiel, Tomasz Zemojtel, Carsten Skurk, Wolfgang Poller, Tatiana Borodina, Study Group Pa-COVID, Stephan Ripke, Leif E Sander, Dieter Beule, Ulf Landmesser, Toumy Guettouche, Florian Kurth and Bettina Heidecker
Increased risk of severe clinical course of COVID-19 in carriers of HLA-C*04:01
E-Clinical Medicine 01.10.2021; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101099>

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract.....	7
2. Einleitung.....	10
2.1 Aktualität	10
2.2 Aufbau, Nachweis und Übertragung	11
2.3 Herkunft.....	14
2.4 Klinische Problematik.....	17
2.5 Fragestellung und Thesen	22
2.6 HLA-System – Grundlagen und Bedeutung.....	23
2.7 Exomuntersuchung – Bedeutung und Möglichkeiten.....	24
3. Material und Methodik	25
3.1 Patienteneinschluss und „Baseline“ Parameter.....	25
3.2 Ethik und Datenschutz.....	27
3.3 Probengewinnung und DNA-Isolation	28
3.4 Analysen	30
3.4.1 HLA-Sequenzierung	30
3.4.2 Exomsequenzierung.....	32
3.5 Statistische Datenanalysen.....	35
3.5.1 HLA-Daten Analyse	35
3.5.2 Exomdaten Analyse	37
3.6 Vergleich der Datensätze	39
3.7 Datenvalidierung in Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS).....	40
3.8 Literatursuche für Diskussion.....	42
4. Ergebnisse.....	43
4.1 Populationsbeschreibung	43
4.2 Identifikation von HLA-Risiko-Allelen.....	45
4.3 Assoziation mit klinischem Verlauf und Vergleich.....	47
4.4 Vergleich der Kohorten unter Einbeziehung von Exomdaten	52
4.5 Vergleich der Kohorten mithilfe von Herkunft/Ethnizität.....	55
4.6 Assoziationen von HLA-Allelen, klinischem Verlauf und Viruskonzentration.....	57
4.7 Vergleich der Daten mit genomweiten Assoziationsstudien (GWAS).....	58
5. Diskussion.....	60
5.1 HLA-Typisierung & KIR2DS4	60
5.2 Diskussion von HLA-Allelen und GWAS-Studien.....	66
5.3 Fazit und Einordnung der Arbeit	68
5.4 Stärken und Limitationen der Arbeit	68
6. Anhang.....	70
7. Literaturverzeichnis	71

Eidesstattliche Versicherung.....	85
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....	86
Lebenslauf.....	87
Publikationsliste.....	87
Danksagung	92
Bescheinigung Statistik.....	93

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1 Am Patienteneinschluss beteiligte Zentren und Anteile an der Studienkohorte.....	26
Abbildung 2 Ablauf HLA-Sequenzierung.....	32
Abbildung 3 Ablauf Exomsequenzierung.....	34
Abbildung 4 Zusammensetzung der Datensätze und ihre jeweiligen Einschlussorte	43
Abbildung 5 Geschlechts- und Altersverteilung und Body-Mass-Index in den Datensätzen	44
Abbildung 6 Allelfrequenzvergleich innerhalb der Datensätze.....	45
Abbildung 7 Behandlung auf Intensivstation und Notwendigkeit einer Intubation.....	47
Abbildung 8 Darstellung der Assoziationsanalyse der HLA-Allele.....	49
Abbildung 9 Vorkommen und Verteilung vom HLA-Allel-C*04:01 in den Datensätzen.....	49
Abbildung 10 Verteilung von HLA-C*04:01 in der Gesamtpopulation und den Datensätzen....	50
Abbildung 11 CRP und hs-TnT in Abhängigkeit des HLA-Trägerstatus Datensätzen.....	51
Abbildung 12 Hauptkomponentenanalyse mit Einzelnukleotidpolymorphismen mit Outliern. ..	53
Abbildung 13 Hauptkomponentenanalyse mit Einzelnukleotidpolymorphismen ohne Outlier...	54
Abbildung 14 Odds-Ratio zwischen der Metaanalyse mit und ohne „Outlier“.....	55
Abbildung 15 Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie abhängig von der Herkunft in Datensatz 1	56
Abbildung 16 Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie abhängig von der Herkunft in Datensatz 3	56
Abbildung 17 Viruskonzentration in Abhängigkeit vom HLA-Trägerstatus	57
Abbildung 18 Odds Ratio in Bezug auf die Schwere der Erkrankung bei HLA-C*04:01 positiven Patient*innen aus externen Datensätzen.....	59
Abbildung 19 Odds Ratio in Bezug auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei HLA-C*04:01 positiven Patient*innen aus externen Datensätzen	60

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1 „The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2

Infections“	17
Tabelle 2 Probenart und Probenherkunft	29
Tabelle 3 Metaanalyse der überlappenden SNPs von GenOMICC, HGI und 23andMe Studien	41
Tabelle 4 Patienteneigenschaften der verschiedenen Datensätze	45
Tabelle 5 HLA-Allele HLA-Klasse I in allen drei Datensätzen (DS)	46
Tabelle 6 HLA-Allele HLA-Klasse II in allen drei Datensätzen (DS).....	46
Tabelle 7 HLA-Allele Gesamtsumme Klasse I und II in allen drei Datensätzen (DS)	47
Tabelle 8 Assoziation von HLA-Allelen mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie	48
Tabelle 9 Assoziation von HLA-Allelen mit der Notwendigkeit einer Intubation	48
Tabelle 10 Bindungsaffinitäten der einzelnen HLA-Allele mit Peptiden von SARS-CoV-2	52
Tabelle 11 HLA-Allele welche eine signifikante Korrelation mit der Viruskonzentration aufwiesen	58

1. Abstract

Abstract in deutscher Sprache

Einleitung:

Die SARS-CoV-2 Pandemie ist bisher eines der herausforderndsten Ereignisse des 21. Jahrhunderts und stellt Wirtschaft, Politik und vor allem das Gesundheitswesen vor enorme Herausforderungen. Eine verlässliche und möglichst frühzeitige Risikoeinschätzung für einen schweren klinischen Verlauf könnten entscheidend sein für die wirksame Verteilung von personellen und materiellen Ressourcen zur Bewältigung der Pandemie. Zahlreiche Risikofaktoren z.B. Alter, BMI, Vorerkrankungen wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes Mellitus und Asthma bronchiale ⁽¹⁾ sind bereits bekannt. Dennoch gibt es unterschiedliche klinische Verläufe bei Patient*innen mit ähnlichen bekannten klinischen Risikofaktoren.

Hypothesen:

Neben den klinischen und erworbenen Risikofaktoren gibt es genetische Risikofaktoren, die das Risiko für einen schweren klinischen Verlauf, d.h. eine intensivmedizinische Versorgung mit invasiver künstlicher Beatmung, erhöhen.

Methoden:

Es wurden 288 Patient*innen aus 4 Krankenhäusern in Spanien, Deutschland und der Schweiz rekrutiert. Zusätzlich konnten Datensätze der University of California, San Francisco und der Gene Expression Omnibus Datenbank mit insgesamt 147 Patient*innen eingeschlossen werden. Schlussendlich wurden bei 435 Patientenproben eine HLA-Typisierung (A, B und C Loci), sowie eine Exomsequenzierung nach dem „targeted gene approach“ Prinzip durchgeführt. Die Daten wurden auf Assoziationen mit den Ereignissen Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie untersucht. Eine Affinitätsanalyse der HLA-Allele, eine Hauptkomponentenanalyse, sowie Analyse nach ethnischen Subgruppen wurde ebenfalls durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse dieser Arbeit mit verfügbaren genomweiten Assoziationsstudien verglichen und auf eine haplotypische Vererbung hin untersucht.

Ergebnisse:

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HLA-Allel-C*04:01 einen Risikofaktor für die Notwendigkeit einer invasiven Ventilation darstellt und somit einen schweren klinischen Verlauf begünstigt. Eine äußerst niedrige Affinität von HLA-C*04:01 zu Proteinen von SARS-CoV-2 unterstützt das Ergebnis, da eine niedrige Bindungsaffinität mit einer schlechteren Immunantwort einhergeht.

Somit trägt diese Arbeit dazu bei, potenzielle Risikofaktoren bei Patient*innen mit COVID-19 zu identifizieren und könnte zukünftig helfen, Ressourcen entsprechend zu planen. Zudem fügt sie einen weiteren Baustein zum Verständnis der Pathogenese von COVID-19 Infektionen hinzu.

Abstract in englischer Sprache

Introduction:

The SARS-CoV-2 pandemic has been one of the most challenging events of the 21st century and poses enormous challenges to the economy, politics and, above all, the healthcare sector. Health care systems had not been designed to supply a large part of the country's population simultaneously. A reliable, efficient risk assessment for a severe clinical course could be decisive for the most effective distribution of resources to cope with the pandemic. Numerous risk factors e.g. age, BMI, previous illnesses such as coronary heart disease, diabetes mellitus and bronchial asthma¹ have already been described in the literature. However, even patients with similar clinical risk factors, may have a strikingly different clinical course.

Hypotheses:

In addition to the clinical and acquired risk factors, there are genetic risk factors for a severe clinical course, defined as necessity of admission to the intensive care unit and/or invasive ventilation.

Methods:

In total 288 patients from 4 hospitals in 3 countries (Spain, Germany and Switzerland) were recruited. In addition, records from the University of California, San Francisco and the Gene Expression Omnibus database with a total of 147 patients were included. Finally, HLA typing (A, B and C loci) and exome sequencing according to the “targeted gene approach” principle were performed on 435 samples. The data were examined for associations with the events intubation and the need for intensive care therapy. An affinity analysis of the HLA alleles, principal component analysis and analysis according to ethnic subgroups was also performed. The results of this work were then compared with available genome-wide association studies and examined for haplotypic inheritance.

Results:

The HLA allele C*04:01 represents a risk factor for the necessity of invasive ventilation and a severe clinical course. An extremely low affinity for SARS-CoV-2 proteins supports the result, since a low binding affinity is associated with a poorer immune response.

Therefore, this work helps to estimate the risk of patients with COVID-19 together with other clinical risk factors, so that resources can be distributed accordingly in the event of illness. It also adds another building block to the understanding of COVID-19 pathogenesis.

2. Einleitung

2.1 Aktualität

SARS-CoV-2 ist ein aus der Familie der Coronaviren stammendes Virus welches erstmals im Dezember 2019 in Hubei in Wuhan, China als humanpathogen beschrieben wurde. Es löst die Erkrankung COVID-19 aus ⁽²⁾. Der Fischmarkt in Hubei gilt dabei als Ausgangspunkt für die Infektion, da dort neben Meeresbewohnern auch zahlreiche andere Tiere wie Vögel und Fledermäuse zum Verzehr angeboten wurden, was einen günstigen Ausgangspunkt für einen Artensprung darstellt.

Bereits im Dezember 2019 machte der Arzt Li Wenliang auf eine erhöhte Anzahl von Patient*innen mit einer Pneumonie unklarer Ursache aufmerksam. Zum damaligen Zeitpunkt sah selbst die WHO kein besonderes Gefahrenpotenzial und empfahl keine speziellen Maßnahmen ⁽²⁾. Innerhalb von wenigen Wochen breitete sich das Virus rasant aus, vor allen niedrigsymptomatische Fälle und asymptomatische Verläufe, welche nicht als solche identifiziert wurden, trugen maßgeblich zur Verbreitung des Virus bei ⁽³⁾.

Seit der Entdeckung im Dezember 2019 bis zum heutigen Tag (26.06.2022) wurden 539.893.858 bestätigte Infektionen und 6.324.112 Todesfälle an die WHO gemeldet. Innerhalb von weniger als einem Jahr wurden in beinahe jedem Land SARS-CoV-2 Fälle berichtet. Die Fallzahlen, wie auch die Mortalität sind stark abhängig von der betroffenen Region ⁽⁴⁾. Sowohl die verschiedenen Gesundheitssysteme, sozialökonomische Faktoren, wie auch eine unterschiedliche politische Herangehensweise schaffen dabei bedeutende Unterschiede.

Am 11.März 2020 erfolgte durch Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesu, den Generaldirektor der WHO, die offizielle Erklärung als Pandemie. Zu diesem Zeitpunkt war ein Stopp der Ausbreitung des Virus nicht mehr möglich.

Monate später wurde weiterhin intensiv an SARS-CoV-2 geforscht, während die Infektionszahlen weiterhin stiegen. Vor allem die Zuordnung von personellen und technischen Ressourcen war und ist weiterhin ein Problem, da zurzeit der Verlauf und somit die Notwendigkeit von jenen Ressourcen nicht klar vorhergesagt werden können. Zwar sind zahlreiche Risikofaktoren ⁽⁵⁾, wie z.B. männliches Geschlecht, Alter über 65 Lebensjahren, Tabakkonsum oder Vorerkrankungen wie arterieller Hypertonus, Diabetes oder Koronare-Herzkrankheit als Risikofaktoren bekannt, jedoch ist eine sichere Stratifizierung weiterhin nicht möglich. Trotz ähnlicher Komorbiditäten

sind klinisch unterschiedliche Verläufe zu beobachten, weshalb es scheint, dass bisher nicht beschriebene Einflussfaktoren existieren.

Der Einfluss von genetischen Faktoren wie Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) auf die Schwere, die Komplikationszahl und die Dauer der Erkrankung ist bei vielen viralen Infektionen wie HIV, Hepatitis B und C Viren, Dengue Fieber bekannt ⁽⁶⁾. Diese gelten auch bei SARS-CoV-2 als möglicher Einflussfaktor.

Ziel dieser Arbeit war es genetische Risikofaktoren zu finden, welche eine Erklärung und Einordnung des Verlaufs von SARS-CoV-2 ermöglichen.

2.2 Aufbau, Nachweis und Übertragung

SARS-CoV-2 ist ein 80-140 nm großes ⁽⁷⁾ behülltes einzelsträngiges positive-sense RNA Virus mit einer Länge von 26 bis 32 Kilobasen ^(8, 9). Es wird als Beta-Coronavirus zur Familie der Coronaviren gezählt und zur Ordnung der Nidovirales. Ihren Namen erhalten die Viren durch Ihre zirkuläre Membranproteinstruktur, welche kronenartig (lateinisch: „corona“) angeordnet ist ⁽¹⁰⁾.

Von besonderer Bedeutung sind neben der Codierung für die RNA Replikation, die Strukturproteine S und N. Dabei stellt das N-Protein zusammen das Nukleotidkapsid dar, in welche die übrigen Proteine eingelagert sind. Das S-Protein ist dabei von entscheidender Bedeutung, da es die Fusion zwischen Wirtszellrezeptor und der Virushülle induziert ⁽¹¹⁾ und somit über die Wirtsspezifität entscheidet.

Als Wirtszellrezeptor dient hauptsächlich das Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2), der Vorgang der Infektion wird unterstützt durch die Transmembrane Protease Serine Subtype 2 (TMPRSS2) ⁽⁵⁾. Diese Kombination kommt dabei in zahlreichen Organen und Geweben wie Herz, Lunge, Leber, Niere, und Gehirn vor, weshalb eine direkte Infektion dieser Gewebe durch das Virus möglich ist. Aus diesem Zusammenhang werden auch die Symptome von SARS-CoV-2 Erkrankungen größtenteils vermutet. Wie Dong et. al⁽¹²⁾ in Ihren Untersuchungen festgestellt haben, scheinen bereits vorgeschädigte Gewebe z.B. bei koronarer Herzkrankheit (KHK) und Neoplasien eine höhere ACE2 und TMPRSS2 Expression zu zeigen, wodurch diese Komorbiditäten auf einen stärkeren Befall und somit eine stärkere Schädigung durch das Virus prädisponieren.

Insgesamt scheint jedoch eine verminderte Expression von ACE2 aufgrund der hohen Affinität zwischen Virus und Wirtszellrezeptor nicht vor einer Infektion zu schützen ⁽¹³⁾.

Der ACE2 Rezeptor ist möglicherweise nicht der einzige Eintrittsweg nach intrazellulär, wie Untersuchungen von Walls et al. ⁽¹⁴⁾ andeuten. In der Untersuchung wird angenommen, dass Rezeptoren wie CD147 (BGS) und FURIN ebenfalls als Wirtszellrezeptor dienen. Die genaue Infektionsroute und Pathogenese von SARS-CoV-2 ist aktuell Gegenstand der Forschung.

Zurzeit gibt es über 200 verschiedene Testverfahren um SARS-CoV-2 nachzuweisen. Die meisten dieser Testverfahren sind jedoch nur mit dem Research Use Only (ROU) Zertifikat versehen, weshalb eine klinische Anwendung nicht möglich ist. Den aktuellen Goldstandard stellt die Echtzeit reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (Real-Time RT-qPCR) dar. Die verschiedenen Testprotokolle weisen dabei den Replikationskomplex ORF1ab und die großen Virusproteine S, N oder E in verschiedenen Kombinationen nach⁽¹⁵⁾. Ein negatives RT-qPCR Ergebnis schließt allerdings eine Infektion nicht sicher aus. Mögliche Fehlerquellen für ein falsch negatives Ergebnis sind die inkorrekte Abnahme des Nasen-Rachen-Abstriches, sowie technische Limitationen bei der manuellen Verarbeitung im Labor, wie der Test von Abdollahi et. al ⁽¹⁶⁾ zeigte. Hierbei wurde bei 50 SARS-CoV-2 Infizierten ein Nasen- und ein Rachenabstrich vorgenommen, jeweils durch den/die Patient*in und eine Fachkraft (Laborassistent*in). Es zeigte sich, dass die Fachkraft deutlich höhere positive Testraten erzielte als der Patient im „Selbsttest“. Eine Übereinstimmung im Testergebnis zwischen Fachkraft und Selbsttest wurde in nur 76% der Fälle festgestellt. Es besteht ein signifikanter Unterschied für das Ergebnis abhängig von der Abstrichlokalisation (nasopharyngealer oder oropharyngealer Abstrich) und der Erfahrung der probenabnehmenden Person (Patient*in oder geschulte Fachkraft). Bei nasopharyngealen Abstrichen wurde der signifikante Unterschied mit $p < 0,001$ und bei oropharyngealen Abstrichen mit $p = 0,001$ angegeben bei dem Vergleich von Fachkraft versus Patient*in.

Neben der RT-qPCR existieren noch serologische Tests für SARS-CoV-2-IgM und IgG Antikörper. Hierbei ist vor allem die zeitliche Latenz bis zur jeweiligen Antikörperbildung eine Limitation, da in dieser Phase, die bereits infektiös sein kann, falsch negative Ergebnisse vorkommen können. Trotzdem werden diese Tests bereits als Screening-Schnelltest angewandt und erzielen je nach Anbieter und gescreentem Antikörper eine Sensitivität über 60%, bei einer Testdauer von Minuten bis Stunden⁽¹⁵⁾. Als Nachfolger der Antikörpertests kamen die Antigentests auf den Markt welche eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität besaßen und vor allem innerhalb von Minuten Ergebnisse liefern. Eine PCR Qualität konnte damit nicht erreicht werden, jedoch eine einfachere Umsetzung der schnellen Testung^(17, 18).

Eine problematische Eigenschaft des SARS-CoV-2 Virus ist die Infektiosität während einer asymptomatischen Inkubationsphase. Diese beträgt im Durchschnitt 6 Tage, habe aber eine mögliche Spannweite von 0 bis 24 Tagen⁽¹⁹⁾. Die Infektiosität steigt dabei vor allem in späteren Inkubationsphasen⁽²⁰⁾. Die Patient*innen sind jedoch noch vor Auftritt der ersten Symptome infektiös. Abhängig von der Studienlage finden 48-66% der Infektionen in der asymptomatischen Phase statt. Der asymptomatische infektiöse Zeitraum beträgt dabei ca. 5,8-11 Tage vor Symptombeginn. Die höchste Ansteckungsgefahr besteht dabei 2 Tage vor bis zu einem Tag nach Symptombeginn, wie eine retrospektive Analyse von He et al. zeigte⁽²¹⁾. Trotz dieser eindeutigen Zahlen bleibt die Nachvollziehbarkeit der Infektionswege schwierig, da die Symptomatik (siehe Abschnitt 2.4) häufig unspezifisch und von der subjektiven Wahrnehmung abhängig ist, sodass häufig von den Patient*innen kein konkreter Zeitpunkt des Symptombeginns genannt werden kann. Der Symptombeginn kann zudem unterschiedlich definiert werden. Retrospektiv kann bereits leichtes Unwohlsein oder aber mehr zuordenbare Symptome wie z.B. Husten, Fieber, Belastungsdyspnoe als Symptombeginn festgelegt werden.

Für die Einschätzung des Pandemieverlaufs ist ein weiterer komplizierender Faktor das Phänomen der „Super-Spreader“. Als solche werden Patient*innen beschrieben, welche eine deutlich höhere Zahl an Menschen infizieren, als durch den Reproduktions-Wert (R-Wert), angenommen wird. Die hohe Infektionsgefahr welche von diesen Menschen ausgeht, scheint dabei sowohl pathophysiologische als auch soziale Ursachen zu haben⁽²²⁾.

Die Infektionswege sind dabei zahlreich. In ihrer Übersichtsarbeit beschreiben Rahman et. al⁽²³⁾, dass als Eintrittspforte in den Körper meist das Epithel des Respirationstraktes dient. Die Übertragung als Tröpfcheninfektion (Tröpfchen größer als 5 µm) gilt dabei als gesichert. Vor allem die Entfernung zum Erkrankten sei dabei entscheidend für die Infektionsgefahr. In einer retrospektiven Untersuchung mit 7 782 Patient*innen zeigten Chu et. al⁽²⁴⁾, dass das Infektionsrisiko bei Abständen unter 1m bei 12,8% und bei über einem Meter bei 2,6% liegt.

Ebenfalls ist die Kontaktinfektion durch Kontakt von infizierten Oberflächen und anschließenden Kontakt mit Schleimhäuten (welche ACE2 Rezeptoren besitzen) bereits bestätigt. Das Virus könne hierbei auf Edelstahloberflächen und Plastikoberflächen bis zu 72h und auf Papieroberflächen (Karton) 24h stabil bleiben und somit potenziell infektiös sein⁽²⁵⁾.

Obwohl SARS-CoV-2 kein rein über die Luft übertragenes Virus ist, wird der wichtigste Übertragungsweg durch Aerosole vermutet. Vor allem im nosokomialen Bereich könnten Aerosole, welche beispielsweise bei der Intubation entstehen, potenziell infektiös sein. Smither et al. ⁽²⁶⁾ zeigten in Ihren Versuchen, dass sogar noch nach 90 Minuten nach einer Aerosolfreisetzung in einer Testkammer infektiöse Virusdosen messbar waren, unabhängig ob die Aerosole in offenen (simuliertes Lüften) oder geschlossenen Versuchsanordnungen erzeugt wurden. Die Halbwertszeit variierte dabei abhängig von den Versuchsbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit, von 30 bis 177 Minuten. Die Untersuchungen von Smither et al. ⁽²⁶⁾ implizieren, dass kurzes Lüften als Infektionsprophylaxe nicht ausreicht.

Die Rolle einer Übertragung über den Gastrointestinaltrakt ist zurzeit nicht sicher belegt. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt ^(23, 27), dass der Virusnachweis über Fäkalien, sowie den Analabstrich deutlich länger gelingt als über den Rachenabstrich. Während die Nachweisbarkeit des Virus meist innerhalb von 2 Wochen im Rachenabstrich nicht mehr gegeben sei, wäre eine Nachweisbarkeit im Analabstrich für 30 Tage möglich, so Yongjjan et. al ⁽²⁸⁾. Hieraus ergebe sich möglicherweise eine Infektionsgefahr trotz „negativem Abstrich“ und somit vermeintlich gesunden Patient*innen.

Aufgrund dieser längeren Persistenz wurde die Möglichkeit einer Reinfektion anfangs kritisch betrachtet, da hier, ähnlich wie beispielsweise bei Herpesviren eine Persistenz des Virus vermutet wurde. Mittlerweile sind auch Infektion bekannt mit unterschiedlichen SARS-CoV-2 Varianten, weshalb die Möglichkeit einer Reinfektion, als gesichert gilt^(29, 30). Ebenfalls zeigte sich, dass die Reinfektion sich mindestens genauso stark manifestieren kann wie die Primärinfektion⁽²⁹⁾.

Eine Übertragung während der Schwangerschaft von der an SARS-CoV-2 erkrankten Mutter auf das ungeborene Kind ist umstritten und nicht sicher belegt⁽³¹⁾.

2.3 Herkunft

Die Familie der humanen Coronaviren ist schon seit 1964 bekannt ⁽³²⁾. Sie werden vor allem mit Erkältungen assoziiert⁽³³⁾.

Insgesamt sind sechs humanpathogene Coronaviren für den Menschen relevant. Dabei wird unterschieden in endemische Viren HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 und in epidemische Viren⁽³⁴⁾. Die endemischen Viren sind Schätzungen zufolge für bis zu 20% der ambulant erworbenen respiratorischen Infekte verantwortlich, wenn auch asymptomatische Infektionen, bei bestehender Infektiosität beschrieben wurden⁽³⁵⁾.

Lediglich bei besonders vulnerablen Gruppen wie immunsupprimierten Patient*innen und Patient*innen mit pulmonaler Erkrankung können endemische Coronaviren schwerere Verläufe auslösen⁽³⁶⁾.

Typische Symptome für die Erkrankungen sind Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Halsschmerzen, Husten und subfebrile bis hin zu febrilen Temperaturen. Ihre Übertragung erfolgt über Tröpfcheninfektion, Kontaktinfektion und aerogene Infektion.

Nicht primär humane Coronaviren, sogenannte Zoonosen, sind selten, rückten aber in der Vergangenheit immer wieder in den medizinischen Focus, wobei auch schwerere Verläufe beobachtet wurden⁽³⁷⁾. Sie gehören zu den Coronaviren welche epidemisch verlaufen.

Erstmalig zeigte sich das Risiko der Coronaviren als Zoonosen im Jahr 2002. Hierbei kam es innerhalb vom November 2002 bis April 2003 zu einer Ausbreitung vom Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1(SARS-CoV-1) aus China in 29 Länder, mit insgesamt 8 096 bestätigten Infektionen und 774 Toten⁽³⁸⁾.

2012 kam es zu dem Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Ausbruch mit dem Ursprung in Saudi Arabien⁽³⁹⁾. Hier erfolgte eine Ausbreitung in 27 Länder mit 2 494 bestätigten Infektionen und 858 Toten seit der Entdeckung im April 2012⁽⁴⁰⁾.

In beiden Fällen konnte der Ursprung aus dem Tierreich bestätigt werden. Hierbei dienten Fledermäuse als primärer Wirt. Der Speziessprung auf den Menschen fand nicht direkt statt, sondern in beiden Fällen über ein Säugetier - 2002 bei SARS-CoV-1 durch Zibetkatzen und 2012 bei MERS-CoV über Kamele.

Bei dem neuen SARS-CoV-2 Virus scheint sich Ähnliches ereignet zu haben. In Ergebnissen von Next Generation Sequencing (NGS) Experimenten zeigte sich eine 88% Übereinstimmung zu bat-SL-CoVZC45 und bat-SL-CoVZXC21. Beides sind Coronaviren welche Fledermäuse in der Region Wuhan, China befallen. Die Übereinstimmung zu bereits früher bekannten humanpathogenen Coronaviren wie SARS-CoV und MERS-CoV beträgt lediglich 79% und 50%. Aufgrund dieser phylogenetischen Analysen durch Roujian et. al⁽⁴¹⁾ wird angenommen, dass in Wuhan ein Interspeziessprung von SARS-CoV-2 auf den Menschen stattgefunden hat. Ebenfalls in diesem Szenario wird angenommen, dass Fledermäuse der primäre Wirt und das Reservoir für SARS-CoV-2 sind. Die genetische Übereinstimmung mit den o.g. Viren liegt jedoch unter 90%, weswegen ein weiterer bisher noch unbekannter Zwischenwirt, wie bei MERS-CoV und SARS-

CoV-1, vermutet wird. Diese Theorie wird unterstützt durch die Tatsache, dass Fledermäuse im Dezember Winterschlaf halten und nicht auf dem Wuhan Markt verkauft wurden. Der Interspeziesprung wurde durch phylogenetische Analysen durch Volz et al. ⁽⁴²⁾ auf den 13. Dezember 2019 mit einem Konfidenzintervall von 95% geschätzt.

Die Übereinstimmung zwischen den verwandten Coronaviren SL-CoVZC45 und bat-SL-CoVZXC21 auf Ebene der Nukleotidsequenz, sowie der Aminosäuresequenz betrug über 90% in den großen strukturellen Virusproteinen ^(41, 43) E (Envelope), M (Membran) und N (Nukleokapsid). Diese Bereiche blieben weitgehend konserviert. Die Übereinstimmung zu den beiden Bat-Coronaviren im S-Bereich (Spike-Bereich) lag bei nur 75%. Dieser Bereich ist verantwortlich für die Membranfusion und somit für die Wirtsspezifität. In dieser niedrigen Übereinstimmung für diese „wichtige“ Region sehen Roujian et. al ⁽⁴¹⁾ weiterhin ein Indiz für einen längeren Übertragungsweg über einen Zwischenwirt.

Untersuchungen durch Liangjun et. al ⁽⁸⁾ an den Abschnitten ORF1a/1b (Replikationskomplex), S und N unterstützen die Theorie, dass SARS-CoV-2 unabhängig entstanden ist und nicht als Nachfolger von SARS-CoV-1 oder MERS-CoV betrachtet werden kann, weil hier deutliche Unterschiede bestehen.

Durch die hohen weltweiten Infektionszahlen sind bereits wenige Monate nach Entdeckung des Virus zahlreiche Mutationen in verschiedenen Regionen des Virus beschrieben worden. Unter anderem auch Mutationen im S-Protein, welches nicht nur wirtsbestimmend ist, sondern auch primärer Angriffspunkt von neutralisierenden Antikörpern. Es sind bereits deutliche Unterschiede im SARS-CoV-2 Genom, abhängig von der Region zu finden⁽⁴⁴⁾.

Vor allem die viralen Mutationen D614 und G614 erregten Aufmerksamkeit, da hierbei höhere Viruskonzentrationen im Respirationstrakt gemessen und eine höhere Infektiosität vermutet wurden. Schlussendlich konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen Mutation und Krankheitsverlauf oder Hospitalisierung gemacht werden. Die höhere Infektiosität wurde jedoch bestätigt ⁽⁴⁵⁾.

Die kontinuierliche Mutation stellt ebenfalls ein maßgebliches Problem für die Entwicklung einer Therapie und eines Impfstoffes dar.

2.4 Klinische Problematik

Die Klinik des neuen Coronavirus SARS-CoV-2 ist sehr weitläufig, weshalb eine eindeutige klinische Diagnose ohne Labornachweis schwierig ist. Die Symptome reichen vom Gefühl der Abgeschlagenheit, Fieber und Husten, Geruchs-Geschmacksveränderungen bis hin zum Acute-Respiratory-Distress-Syndrom (ARDS) und Multiorganversagen ⁽⁴⁶⁾. Außerdem zeigen sich weniger charakteristische Symptome wie Durchfall, Erbrechen, Hautausschlag. Machhi et. al ⁽⁹⁾ unterteilen dabei in Ihrer Arbeit den Krankheitsverlauf in drei Schweregrade (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Auszug aus der Arbeit von Machhi et. al „The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections“⁽⁹⁾, Table 1 „Clinical manifestation of SARS-CoV-2 Infection“ formatiert und übersetzt durch Autor.

Betroffenes Organsystem	Krankheitsverlauf (Milde Erkrankung)	Moderate Erkrankung	Schwere Erkrankung
Lunge/ Respiratorisch- Pulmonal-	<ul style="list-style-type: none"> • Husten • Halsschmerzen • Rhinorrhö, Niesen • Trockener Husten 	<ul style="list-style-type: none"> • Pneumonie • Dyspnoe • Moderate Hypoxie 	<ul style="list-style-type: none"> • Schwere Hypoxie • Acute respiratory distress syndrome (ARDS) • Respiratorisches Versagen und Tod (ohne Therapie)
Gehirn/ Neurologisch	<ul style="list-style-type: none"> • Hyposmie-Anosmie • Hypogeusie-Ageusie • Sehstörungen • Fatigue, Somnolenz 	<ul style="list-style-type: none"> • Kopfschmerzen • Übelkeit/Erbrechen • Schwindel • Myalgie • Ataxie • Enzephalopathie 	<ul style="list-style-type: none"> • Schlaganfälle (von großen Gefäßen) • Epilepsie und Koma • Meningoenzephalitis • Neuropathie • Guillain Barré Syndrom • Neurologisches ARDS
Gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Übelkeit/Erbrechen • Diarrhö • Sodbrennen 	<ul style="list-style-type: none"> • Appetitverlust • Abdominelle Schmerzen und Blähungen 	<ul style="list-style-type: none"> • Gastrointestinale Blutungen • GI virale Infektionen
Herz/Kardial	<ul style="list-style-type: none"> • Brustschmerz • Arrhythmie, Tachykardie 	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiale Inflammation, Immuninfiltrate 	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiomyopathie • Akute Herzinsuffizienz
Nieren	<ul style="list-style-type: none"> • Proteinurie • Hämaturie 	<ul style="list-style-type: none"> • Akutes Nierenversagen 	<ul style="list-style-type: none"> • Nierenversagen
Blutgefäße/ Vaskulär	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Koagulationsneigung 	<ul style="list-style-type: none"> • Arterielle oder venöse Thrombosen • „Cytokine Storm“ 	<ul style="list-style-type: none"> • Lungenembolien • Gefäßverschlüsse (groß) • Disseminierte Intravasale Koagulation
Mental/ Psychiatrisch	<ul style="list-style-type: none"> • Depressionen • Ängstlichkeit • Schlafstörungen • Wut • Angst 	<ul style="list-style-type: none"> • Depression • Posttraumatische Belastungs-Störung 	<ul style="list-style-type: none"> • Exazerbation von psychischen und mentalen Störungen (z.B. Alzheimer oder Abhängigkeit)

In einer chinesischen Studie ⁽⁴⁷⁾ beschrieben von 106 Patient*innen, 88 Patient*innen Fieber (83%), 60 trockenen Husten (57%), 31 Auswurf (29%), 23 Fatigue (22%) und 16 Myalgien (15%).

Weitere Symptome wie Dyspnoe, Diarrhö, Kopfschmerzen und Kurzatmigkeit wurden in weniger als 20% der Fälle angegeben. Somit ist kein eindeutiges Leitsymptom auszumachen.

Bei Hinzuziehen der asymptomatischen Infektionen^(3, 48) erweist sich das Spektrum der klinischen Präsentation als sehr variabel. Dies erschwert die korrekte Diagnosestellung der COVID-19 Erkrankung.

Der ACE2 Rezeptor ist ein Transmembranprotein über welchen SARS-CoV 2 Zellen infiziert, insbesondere Gewebe mit hoher ACE2 Rezeptor Dichte. Aufgrund des beinahe ubiquitären Vorkommens des ACE2 Rezeptors, ist es erklärbar, dass zahlreiche Organsysteme wie Herz, Leber, Pankreas, Niere und Gastrointestinaltrakt durch SARS-CoV-2 infiziert werden⁽¹²⁾. Autopsieergebnisse zeigen, dass auch immunprivilegierte Gewebe wie Ovarien, Testikel und Gehirn mit dem Virus infiziert sein können^(9, 49).

Die Lunge ist eines der ACE2-rezeptorreichsten Geweben des Menschen, womit es zu besonders hoher Viruslast kommt⁽⁸⁾. Oft gefolgt vom „Cytokin Storm“ kommt es über Endothelschäden und interstitielle Lungenödeme zunehmend zu einem Pneumozyten Typ I Schaden und somit zum Alveolarschaden. Der daraus resultierende Proliferationsreiz für Typ II Pneumozyten mündet in einer Defektheilung mit erhöhter Kollagenproduktion und daraus resultierender Lungenfibrose⁽⁵⁰⁾. Aus diesem Grund dominieren vor allem respiratorische Symptome wie Husten und Dyspnoe das schwere Verlaufsbild von SARS-CoV-2 Infektionen. Diese Symptome können bis hin zum Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) reichen. Dies geschah in China in 5% der Fälle, wobei in 40% davon ein letaler Verlauf nicht abgewendet werden konnte⁽⁵¹⁾.

Die Metaanalyse von Kumar et al.⁽⁵²⁾ beschreiben Risikofaktoren für einen schweren Krankheitsverlauf (intensivtherapeutische Behandlung). Männliches Geschlecht, Lebensalter über 60 Jahren und Vorerkrankungen wie Diabetes Mellitus, arterielle Hypertonie, chronische obstruktive Lungenerkrankung oder koronare Herzkrankheit sind Eigenschaften welche mit einem schweren klinischen Verlauf korrelieren. Klinische Symptome wie Fieber über 39 °C, progredienter Auswurf, Kurzatmigkeit und Diarrhö seien auch bei kurzem Auftreten zu Beginn der Erkrankung bereits ein Indikator für einen potenziell schweren Verlauf⁽⁵²⁾.

In Bezug auf asymptomatische Verläufe zeigte eine retrospektive Analyse von Yu et. al.,⁽⁴⁸⁾ dass von 1 568 positiv getesteten Patient*innen 79 Patient*innen (5%) keine Symptome entwickelten. Hierbei handelt es sich primär um Patient*innen unter dem 45. Lebensjahr.

Neben klinischer Symptomatik gibt es auch Unterschiede in den Laborergebnissen bei Patient*innen, je nachdem welche Organe primär befallen sind. Malik et al. ⁽⁵³⁾ zeigten bei einer Untersuchung von 10 491 bestätigten SARS-CoV-2 Fällen, dass Lymphopenie, Thrombozytopenie, sowie erhöhtes C-Reaktives-Protein (CRP), Procalcitonin (PCT), Laktatdehydrogenase (LDH), Aspartat- (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), D-Dimer, Kreatinkinase (CK) und Kreatinin, mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert sind. Ein schwerer Verlauf war definiert als Notwendigkeit einer intensivstationären Beatmung mit einer Sauerstoffsättigung unter 90%. PCT sei dabei ein möglicher Hinweis auf eine bakterielle Koinfektion im Verlauf eines ARDS oder der SARS-CoV-2 Pneumonie ⁽⁵³⁾.

Die Assoziationen der Laborwerte konnten in den Studien von Danwang et al. ⁽⁵⁴⁾ sowie Kumar et al. ⁽⁵²⁾ reproduziert werden. Zusätzlich wurden kardiales Troponin I, Albumin und Bilirubin als mögliche Biomarker für eine Risikostratifizierung genannt ⁽⁵²⁾.

Kumar et al. ⁽⁵²⁾ klassifiziert dabei die Laborparameter in zwei Gruppen - die Gruppe mit Risiko für einen schwereren Verlauf und die Gruppe mit dringendem Bedarf für eine intensivmedizinische Behandlung. So sei vor allem ein erhöhter CRP, PCT, LDH, D-Dimer und Kreatinkinase Spiegel hinweisend auf einen möglichen späteren Bedarf einer intensivmedizinischen Therapie.

Die Autoren beider Metaanalysen weisen jedoch auf die Tatsache hin, dass die genannten Werte hauptsächlich als Folge des Zytokinsturms gesehen werden können. Sie sind nicht COVID-19 spezifisch. Direkte Verlaufparameter wie beispielsweise RNA oder spezifische Proteine (im Rahmen von Proteomanalysen) seien notwendig, um krankheitsspezifische Aussagen machen zu können.

Die Sterblichkeit lag dabei in Deutschland zeitweise bei ca. 2,4% ⁽⁵⁵⁾. In einigen Weltregionen liegt die Sterblichkeit über 9% ⁽⁴⁾. Faktoren wie medizinische Infrastruktur, Mutationen von SARS-CoV-2, wie auch die intensivmedizinischen Kapazitäten des Gesundheitssystems haben sicherlich einen entscheidenden Einfluss auf die Sterblichkeitsrate.

Die Immunantwort und mögliche Immunität nach bereits durchgemachter SARS-CoV-2 Infektion ist zurzeit ein Hauptgegenstand der Forschung. Insbesondere, da wiederholt von Reinfektionen berichtet wird. Mögling et al. ⁽⁵⁶⁾ zeigten, dass vor allem bei einem milden Krankheitsverlauf (ohne Hospitalisierung) die Möglichkeit bestehe, dass keine immunisierenden Antikörper gegen SARS-CoV-2 gebildet werden. Sie bestätigen außerdem die hohe Prävalenz von Antikörpern gegen

häufige bereits bekannte humanpathogene Coronaviren wie z.B. HCoV-229E und HCoV63. Das Vorhandensein von Kreuzimmunitäten müsse noch weiter untersucht werden.

Wie die Studie von Liu et al. ⁽⁵⁷⁾ zeigte waren IgM Antikörper erst ab dem 4. Tag nach der Infektion und IgG Antikörper erst nach dem 7. Tag nachweisbar. Dies sei vor allem für IgM/IgG-Schnelltests relevant. Die Konzentration an IgM Antikörpern fiel nach 4 Wochen deutlich, während hohe Titer von IgG Antikörpern über die 4. Woche hinaus nachweisbar waren. Dies ist zu vereinbaren mit einer normalen Serokonversion von IgM zu IgG im Laufe eines Immunisierungsprozesses.

Ebenfalls zeigte die Untersuchung, dass ein schwerer Krankheitsverlauf (Tachypnoe, Sauerstoffsättigung unter 93%, Sauerstoffgabe) mit höheren IgM und IgG Antikörperspiegeln, sowie mit einem früheren Peak assoziiert ist. Das Vorhandensein von IgM oder IgG Antikörpern lässt jedoch keine Aussage über eine mögliche Immunität zu. Für eine erfolgreiche Virusabwehr sind neutralisierende Antikörper nötig. In Ihrer Studie haben sich Wang et al. ⁽⁵⁸⁾ damit beschäftigt eben jene Antikörper zu messen. Sie bestätigten die Aussage von Liu et al. ⁽⁵⁷⁾, dass die Antikörperspiegel bei schwerem durchgemachtem Krankheitsverlauf höher seien, auch die von neutralisierende Antikörpern. Somit sei bei schwerem Krankheitsverlauf zumindest kurzzeitig von einer Immunität auszugehen. Inwiefern diese langfristig bestünde und somit einen suffizienten Schutz bietet ist umstritten. Ein eindeutiger Grenzwert-Titer für einen sicheren Schutz ist zudem aktuell nicht bekannt. Lediglich die Infektionswahrscheinlichkeit sinkt.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass in den meisten klinisch bekannten Fällen Antikörper gebildet werden, wobei die Ausprägung, wie auch der zeitliche Verlauf von patientenindividuellen Faktoren, wie auch vom Krankheitsverlauf abhängig sein können. Weitere Untersuchungen sind notwendig in Bezug auf die Neutralisationsfähigkeit von SARS-CoV-2 Viren und den zeitlichen Verlauf der Antikörperkonzentration.

Neben der Immunität gegenüber SARS-CoV-2 sind die Langzeitfolgen von großer Bedeutung, da angesichts der Zahl an Infizierten, die weitere Betreuung und Behandlung der Überlebenden das Gesundheitssystem in den nächsten Jahren und möglicherweise Jahrzehnten belasten wird. Die Spätfolgen werden nach Infektion mit SARS-CoV-2 im allgemeinen als Post-COVID-19 oder Long-COVID-19 Syndrom bezeichnet ^(59, 60).

In Ihrem Review beschreiben Leung et al. ⁽⁶¹⁾ unter anderem mögliche Langzeitkomplikationen von SARS-CoV-2 Erkrankungen. Diese bestätigen die Vermutung, dass bei SARS-CoV-2 ebenfalls Langzeitfolgen auftreten können, wie sie bereits von verwandten Coronaviren wie MERS und

SARS-CoV-1 berichtet wurden. In diesen wurde gezeigt dass z.B. Lungenfibrose, kardiovaskuläre Erkrankungen und Nierenversagen potenzielle Folgeerkrankungen sind. In Folge des Zytokinsturm und der besonders hohen Belastung des Immunsystem besteht über den Mechanismus von „Molecular Mimicry“ ein erhöhtes Risiko für Autoimmunerkrankungen ⁽⁶¹⁾. Eine Korrelation zwischen dem Auftreten des Guillan-Barre Syndroms (GBS) oder demyelinisierenden Erkrankungen wird vermutet^(61, 62). Außerdem werden thrombozytopänische Purpura und das Antiphospholipid-Syndrom als Ursachen für eine erhöhte Thromboseneigung beschrieben. Vor allem die Lunge sei als Hauptmanifestationsort von Langzeitfolgen wie Lungenembolien, Lungenfibrose und funktionellen Störungen betroffen. Mögliche Folgen einer SARS-CoV-2 Infektion wie Myokarditis, chronische Leberschäden, sowie die Entwicklung einer Post Traumatic Stress Disorder (PTSD) oder ein möglicher langfristiger Nierenschaden sind Gegenstände der Forschung ^(61, 63). Eine sichere Aussage über den Verlauf verschiedenster Organbeteiligung werden langfristig erst Verlaufsstudien ermöglichen.

Obwohl Kinder meist einen milderen klinischen Verlauf aufweisen (ohne Sauerstoffbedarf), sind sie nicht von Langzeitfolgen ausgeschlossen. Hierbei sind vor allem Folgen nach dem Paediatric Inflammatory Multisystem Syndrom (PIMS) (Synonym: Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C)) möglich, welche Myokarditiden, Vaskulitiden und das toxische Schock Syndrom (TSS) mit einschließen^(63, 64).

Die Auswirkungen einer SARS-CoV-2 Infektion während der Schwangerschaft sind ebenfalls intensiver Gegenstand der Forschung. Es gab keinen Anhalt für die Übertragung von der Mutter auf den Fetus in einer Metaanalyse der bisherigen Literatur ⁽³¹⁾. Die Autoren erklären dies durch eine niedrige ACE2 Expressionsrate in mütterlich-kindlichen Zellen. Trotzdem beeinflusst die Infektion die Entwicklung des Kindes und erhöht die Wahrscheinlichkeit für Komplikationen wie Frühgeburt, Fehlgeburt, Asphyxie und Wachstumsstörungen ⁽³¹⁾. Mütter wie Kinder benötigen häufiger eine intensivmedizinische Betreuung und die Geburt erfolgt häufiger mithilfe eines Kaiserschnittes. Ob und wenn ja welche Auswirkungen die Infektion auf die psychische und physische kindliche Entwicklung hat, kann erst im Verlauf der Zeit evaluiert werden. Eine Abhängigkeit vom Abschnitt der Schwangerschaft und der Schwere der Infektion für die kindlichen Komplikationen wird von Experten vermutet (Konzept der vulnerablen Entwicklungsphasen).

2.5 Fragestellung und Thesen

Das Immunsystem ist ein hochindividuell geprägtes System, welches sowohl durch genetische Eigenschaften wie z.B. Humane Leukozyten Antigene (HLA), als auch durch umweltspezifische Einflüsse lebenslang beeinflusst, modelliert und trainiert wird. Eine Immunreaktion ist das Ergebnis der angeborenen und erworbenen Immunantwort auf die jeweilige Form des Antigens. Es sind bereits zahlreiche erworbene Risikofaktoren wie z.B. Nikotinkonsum⁽⁶⁵⁾, Adipositas⁽⁶⁶⁾ etc. bekannt, welche mit einem schweren SARS-CoV-2 Verlauf einhergehen, angeborene Risiken sind jedoch noch wenig erforscht.

Es gibt zahlreiche virale Erkrankungen wie z.B. HIV⁽⁶⁷⁾ und Hepatitis⁽⁶⁾ bei welchen ein genetischer Einfluss auf den klinischen Verlauf bekannt ist. Die Pathogenese von SARS-CoV-2 Infektionen wird maßgeblich durch die eigene Immunreaktion beeinflusst, welche bis zur Autoimmunreaktion reichen kann^(59, 68). Im Zuge dieses Aspektes soll diese Arbeit dazu dienen den genetischen Einfluss auf einen schweren klinischen Verlauf einer SARS-CoV-2 Infektion zu erforschen. Als schwerer Verlauf wird hierbei die Notwendigkeit einer intensivstationären Behandlung sowie einer invasiven Beatmung definiert.

Um die Funktion des Immunsystems zu erfassen, wurde das Humane Leukozyten Antigen (HLA) System untersucht, welches ein Schlüsselement im Immunsystem darstellt⁽⁶⁹⁾. Von RNA Viren wie z.B. SARS-CoV-1⁽⁷⁰⁾ ist bereits bekannt, dass HLA-Polymorphismen einen Einfluss auf den Infektionsverlauf haben.

Generelle These welche überprüft werden sollte:

H0: Es gibt keine genetischen Faktoren welche schwere SARS-CoV-2 Verläufe begünstigen.

H1: Es gibt genetischen Faktoren welche schwere SARS-CoV-2 Verläufe begünstigen

Spezifizierung der generellen These in Bezug auf genetische Risikofaktoren in Humanen Leukozyten Antigenen (HLA) Klasse I und wichtigen Klasse II Loci.

H0: Es gibt keine HLA-Polymorphismen welche schwere SARS-CoV-2 Verläufe begünstigen.

H1: Es gibt HLA-Polymorphismen welche schwere SARS-CoV-2 Verläufe begünstigen.

2.6 HLA-System – Grundlagen und Bedeutung

Das HLA-System ist ein zentraler Bestandteil des Immunsystems⁽⁶⁹⁾. Seine Aufgabe ist es in Form der Major Histocompatibility Complex (MHC) Rezeptoren, Antigene zu präsentieren und die Immunantwort zu koordinieren. Diese Rezeptoren sind nur auf Leukozyten, nicht aber auf Erythrozyten zu finden, weshalb Sie als Humanes Leukozyten Antigen bezeichnet werden (HLA). Sie sind größtenteils auf dem Chromosom 6 (wenige auf 5 und 15) codiert und können in HLA-Klasse 1 und HLA-Klasse 2 unterschieden werden. Diese Unterscheidung basiert auf dem MHC-Komplex, welcher durch die jeweilige Klasse kodiert wird.

HLA-Klasse 1 Gene sind für den MHC Komplex 1 zuständig. Dieser spielt vor allem bei der Präsentation von intrazellulären Bestandteilen eine Rolle und kommt auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers vor. Somit ist es die MHC Klasse 1 welche die Präsentation von potenziellen Virusantigenen ermöglicht. In Zusammenhang mit dieser Präsentationsform sind vor allem die zytotoxischen T-Zellen (Synonym: T-Killerzellen, CD8-positive-T-Zellen) in Verbindung zu bringen⁽⁷¹⁾.

HLA-Klasse 2 Gene sind für den MHC-Komplex 2 zuständig. Dieser spielt vor allem bei der Präsentation von Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, Monozyten, und dendritische Zellen) eine Rolle und kommt ausschließlich auf diesen vor. Dieser Rezeptor stellt somit eine der essenziellen Brücken zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar⁽⁶⁹⁾.

Mithilfe der HLA-Sequenzierung, d.h. der Untersuchung der Genabschnitte welche die Grundlage für die MHC-Rezeptoren legen, können Polymorphismen bzw. Konstellationen erörtert werden, welche die Präsentation von SARS-CoV-2 spezifischen Antigenen fördern bzw. eine Immunreaktion verstärkt triggern.

Die Nomenklatur von HLA-Genen und Allelen ist standardisiert und wird durch das Nomenklatur Komitee der Welt-Gesundheits-Organisation (World Health Organization, WHO) definiert und in regelmäßigen Berichten publiziert. Der Name setzt sich aus einzelnen Komponenten zusammen, welche eine immer präzisere Information über den Locus bieten. Nachfolgend ist ein Beispiel gezeigt, wie nach aktuellem Stand (Juni 2022) die HLA-Nomenklatur vom o.g. Gremium empfohlen wird^(72, 73).

Beispiel: HLA-C*04:01

HLA	Humanes Leukozyten Antigen
-C*	Lokusbezeichnung, Bindestrich separiert zum Präfix und Stern zur nächsten Position
04:	Nummer des Allels in der genannten Gruppe, Doppelpunkt separiert
01	Spezifische definierte HLA-Proteinnummer

2.7 Exomuntersuchung – Bedeutung und Möglichkeiten

Die Gesamtheit aller menschlichen Gene wird als Genom bezeichnet. Ein einzelnes Gen ist dabei ein Sequenzabschnitt der Desoxyribonukleinsäure (DNA).

Innerhalb dieses Genabschnittes kann jedoch noch in Exons und Introns unterschieden werden. Als Exon wird ein Bereich der DNA bezeichnet, welcher in der reifen messenger-RNA (mRNA) wieder gefunden werden kann; man spricht auch von dem codierenden Bereich. Diese DNA-Bereiche werden direkt in eine Aminosäuresequenz (Peptid, Protein) umgewandelt. Bereiche welche nicht in mRNA abgebildet werden, werden als nicht-codierende Bereiche oder Introns bezeichnet. Diese Bereiche sind nicht unmittelbar an der Bildung der Aminosäuresequenz eines Proteins/Peptides beteiligt. Die Gesamtheit aller Exone wird als Exom bezeichnet⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾.

Eine Form der Exomsequenzierung, welche zeitgleich alle Exone (das Exom) sequenziert, wird als Whole-Exome-Sequencing (WES) bezeichnet⁽⁷⁷⁾. Die dafür genutzte Methode ist das Next-Generation-Sequencing (NGS)⁽⁷⁸⁾. Ziel dieser Methode ist es unterschiedliche Basenpaare in Exonbereichen zu identifizieren, indem ein Vergleich zu einem Referenzgenom vorgenommen wird.

In der Art und Form des Vergleichs bzw. der Analyse kann zwischen genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) und Candidate Gene Studien (CGS)⁽⁷⁹⁾ unterschieden werden.

Bei GWAS wird das gesamte Exom betrachtet und in Bezug auf bestimmte Ausgangsfaktoren ausgewertet. Aufgrund der umfassenden Datenmenge und Menge an Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) ist ein großer Datensatz (mehrere tausend Patient*innen) und eine hohe Signifikanz notwendig. Das Signifikanzniveau liegt meist weit unter 1%, um stichhaltige Ergebnisse zu sichern.

Bei CGS wird ein vordefinierter Teil des Genoms (Gesamtheit aller Gene) betrachtet. Aufgrund dieser fokussierten Auswahl ist eine kleinere Patientenpopulation akzeptabel, um ausreichend „statistical power“ zu erreichen. In dieser Studie wurde die Candidate Gene Methode genutzt, da schon vor Studienbeginn durch „power calculations“ die Erkenntnis vorlag, dass die für eine GWAS notwendige Patientenzahl nicht erreicht werden kann. Infolgedessen wurde nach der

Identifizierung des HLA-C*04:01 Allels als Risikoallel für einen schweren COVID-19 Verlauf, das killerzellenimmunglobulinähnliche Rezeptor Gene näher betrachtet. Der killerzellenimmunglobulinähnliche Rezeptor (KIR) ist einer der wichtigsten Liganden für Rezeptoren der Klasse MHC1, d.h. die Genprodukte von HLA-C Genen. Die KIR Gene befinden sich in einem Netzwerk aus verschiedenen Genloci⁽⁸⁰⁾ v.a. auf Chromosom 19 und werden mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen z.B. Vaskulitiden⁽⁸¹⁾ in Verbindung gebracht. Aus der Gruppe der KIR Gene wurde letztlich der Polymorphismus KIR2DS4 betrachtet, da dieser mit dem gefundenem HLA-Risikoallel C*04:01, welches im ersten Teil dieses Projektes identifiziert wurde, in einem „linkage disequilibrium“ steht. Der Begriff „linkage disequilibrium“ (Kopplungsungleichgewicht) bezeichnet eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass zwei Allele trotz unterschiedlicher Genorte zusammen vererbt werden, als dies durch eine zufällige Verteilung zu erwarten wäre ⁽⁸²⁾. Der Grund für eine solche gemeinsame Vererbung liegt in potenziellen „Crossing over“ Stellen während der Meiose von Keimzellen. Die durch das „Crossing over“ entstehenden Fragmente führen zur gemeinsamen Vererbung von mehreren Allelen auf einem Fragment. Je höher der Wert ist, desto wahrscheinlicher eine gemeinsame Vererbung der Allele. Ein Wert von 0 entspricht einer zufälligen und unabhängigen Vererbung. Dieser Fall wird als „linkage equilibrium“ bezeichnet ⁽⁸²⁾.

KIR2DS ist ein Polymorphismus welcher bei HIV-Infektionen mit einer erhöhten Viruslast assoziiert ist und somit ein Risikofaktor für einen schlechteren klinischen Verlauf darstellt⁽⁸³⁾. Somit wäre auch ein gemeinsamer Einfluss von HLA-C*04:01 und KIR2DS4 Polymorphismen auf einen SARS-CoV-2 Verlauf möglich, wie er bereits bei HIV bekannt ist⁽⁸³⁾.

3.Material und Methodik

3.1 Patienteneinschluss und „Baseline“ Parameter

Der Studieneinschluss erfolgte im Rahmen der Projektarbeit COVID-19 (PaCOVID19) an der Charité Universitätsmedizin Berlin. Es wurden Patient*innen aus sämtlichen klinischen Bereichen, einschließlich Rettungsstelle, ambulante Patient*innen und stationäre Patient*innen in die Studie aufgenommen. Verschiedene Versorgungsstufen von Normalstation über Überwachungsstationen bis hin zu Intensivstationen sind im Patientenkollektiv abgebildet. Dies ermöglichte die Erfassung der vollen Bandbreite des klinischen Erscheinungsbildes einer SARS-CoV-2 Infektion von subklinischen Verläufen, bis hin zu Patient*innen welche eine Sauerstofftherapie, Intubation oder Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) benötigten.

Insgesamt konnten für die Studie 135 Patient*innen (31% der gesamten Studienpopulation) an der Charité Universitätsmedizin Berlin eingeschlossen werden. Hinzu wurden 20 (5 %) Proben von Patient*innen aus dem Schweizer Kantonsspital Baden eingeschlossen. Mithilfe einer Kooperation zwischen der Charité und dem Hospital Universitario de Valme in Sevilla, Spanien, und dem Universitätsklinikum San Cecilio Granada, Spanien, konnten ebenfalls 133 Proben (30%) in die Kohorte aufgenommen werden [Grenada 18 (4 %), Sevilla 115 (26 %)].

Zur Vergrößerung der Studienpopulation wurden öffentlich zugängliche Daten aus der Gene Expression Omnibus Datenbank genutzt (GEO Datenbank Identifikationsnummer: GSE157103⁽⁸⁴⁾, GSE174818⁽⁸⁵⁾). Diese setzen sich zusammen aus 48 Patient*innen (11% des Gesamtdatensatzes) der University of California, San Francisco, USA (UCSF, COMET-Consortium) und 99 Patient*innen (23% des Gesamtdatensatzes) aus dem Albany Medical Center, New York, USA. Damit betrug die Gesamtzahl der Patient*innen 435. Der Einschlussanteil der einzelnen Zentren ist in Abbildung 1 dargestellt.

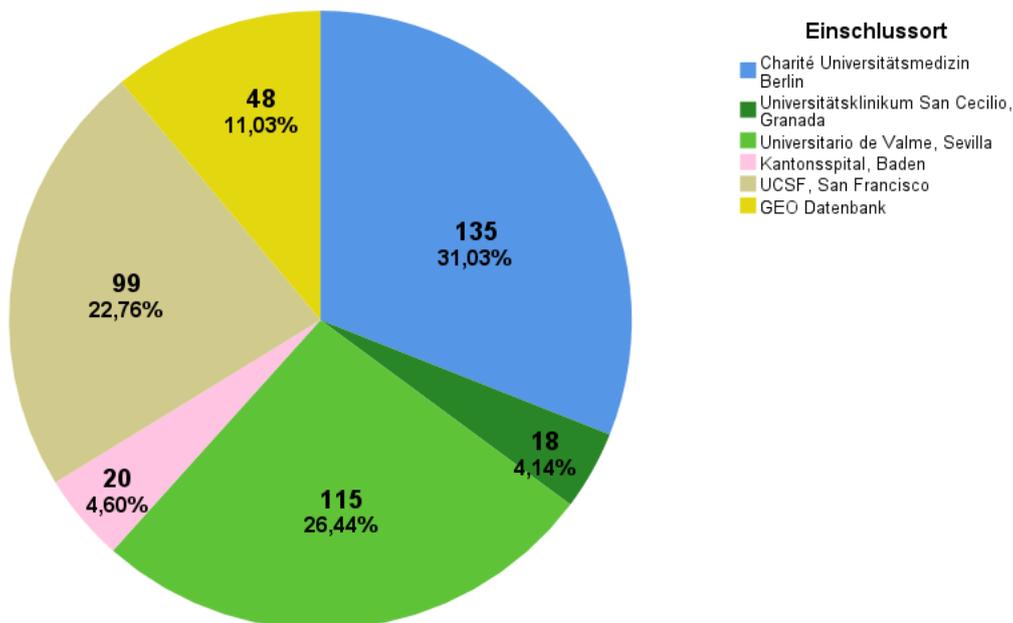


Abbildung 1 Am Patienteneinschluss beteiligte Zentren und Anteile an der Studienkohorte

Das SARS-CoV-2 Virus wurde bei allen Patient*innen vor Einschluss in die Studie in einem nasopharyngealen Abstrich nachgewiesen. Als Nachweismethode diente die real-time quantitative Polymerase Ketten Reaktion (RT-qPCR). Dieses Verfahren erlaubt nicht nur den sicheren positiven Nachweis einer Infektion, sondern ermöglicht auch die Quantifizierung der Viruslast der gewonnenen Probe. Für die Kohorte der Charité wurden diese Daten mit freundlicher Genehmigung

von Prof. Dr. med. Christian Drosten, Direktor des Instituts für Virologie der Charité, zur Verfügung gestellt und in die Analysen miteinbezogen.

In wenigen Fällen, in denen die akute Infektionsphase bereits abgelaufen war und eine RT-qPCR einen negativen Befund erwies, konnte mittels SARS-CoV-2 spezifischen Antikörpern eine abgelaufene Infektion bestätigt werden. Hierbei wurde venöses Blut isoliert und mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) auf die jeweiligen Antikörper untersucht. Keine/r der Patient*innen waren zu diesem Zeitpunkt geimpft, da Impfungen erst etwa ein halbes Jahr nach Einschluss der Probanden zur Verfügung standen.

Sowohl an der Charité, als auch an den Kooperationskliniken in der Schweiz, Österreich, Spanien und den Vereinigten Staaten, stand die medizinische Versorgung der Patient*innen zu jedem Zeitpunkt an erster Stelle. Aus personellem Ressourcenmangel war ein reguläres Biobanking und eine vollständige „Baseline“-Datenerhebung nicht jederzeit möglich. Hierdurch fehlt z.B. die Variable „Body Mass Index“ für die Studienpopulation aus Sevilla und unterschiedliche Bioproben (Vollblut, Buffy Coat und PBMC) mussten für die DNA Isolation genutzt werden. Die Datensätze unterscheiden sich ebenfalls durch unterschiedliche lokale Richtlinien für Therapieabläufe, z.B. die Aufnahmekriterien auf die Intensivstation. Dieses Problem umgingen wir, indem wir als Endpunkt für schweren Verlauf „Intubation“ verwendeten, für welchen es international einheitlichere Kriterien gibt. ^(37, 86, 87)

Neben der venösen Blutentnahme wurden Routineparameter im Rahmen der Behandlung miteinbezogen (siehe Anhang für vollständige Parameterliste). Gängige laborchemische Parameter wie zum Beispiel: Routineblutbild, Differenzialblutbild, C-Reaktives Protein (CRP), Herzenzyme (Hochsensitives Troponin T, Kreatinkinase und Untertypen), „N-terminal pro-brain natriuretic peptide“ (NT-proBNP) und SARS-CoV-2 spezifische Untersuchungen (PCR und Antikörpertests) wurden erhoben. Außerdem wurden Parameter über den Infektionsverlauf wie Beginn, Dauer, Vorstellungsdatum und Symptome miteinbezogen, sowie die individuellen medizinischen Vorbefunde der Patient*innen.

3.2 Ethik und Datenschutz

An der Charité Universitätsmedizin Berlin wurde der Studieneinschluss im Rahmen des Pa-COVID19 Studienprotokolls durchgeführt⁽⁸⁸⁾. Die Ethikkommissionen aller beteiligten Kliniken haben dem Vorgehen der Studie zugestimmt: Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin, Deutschland (EA2/066/20), Ethikkommission der Nordwest- und Zentralschweiz, Basel,

Schweiz (2020-00952), Ethikkommission des Hospital Universitario de Valme, Sevilla Spanien (1346-N-16), Ethikkommission des Universitätskrankenhauses Grenada, Spanien (2577-N-20).

Die Einverständniserklärung lag, nach ausführlicher Aufklärung, zum Zeitpunkt der Blutabnahme vor oder wurde schnellstmöglich nachgeholt, wenn sie aufgrund von Therapiemaßnahmen z.B. Beatmung auf der Intensivstation, nicht unmittelbar eingeholt werden konnte.

Nicht für alle Proben konnten alle Untersuchungen durchgeführt werden, da nicht immer die Zustimmung zur vollständigen genetischen Untersuchung vorlag. Eine nachträgliche Kontaktierung der Patient*innen für die Zustimmung zu erweiterten Untersuchungen gelang nicht in allen Fällen.

Zusätzlich zu den Proben wurde aus Datenschutzgründen ein reduzierter klinischer Datensatz für die Patient*innen erhoben und untersucht. Gemäß §25 LKG, vom 18.09.2011 wurden alle verarbeiteten Daten pseudonymisiert und im Rahmen der Krankenhausbehandlung innerhalb der jeweiligen Fachrichtungen erhoben. Für die gesamte Studie gilt das Bundesdatenschutzgesetz, sowie das Landesdatenschutzgesetz des Landes Berlin in zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie gültiger Fassung. Die Studie wurde im Deutschen Register für klinische Studien registriert (DRKS-ID: DRKS00021688). Es bestehen keine Widersprüche zu schutzwürdigen Belangen der Patient*innen und ein gewerblicher Nutzen ist ausgeschlossen.

3.3 Probengewinnung und DNA-Isolation

Das venöse Blut wurde in EDTA Röhrchen im Rahmen von klinischen Routineblutabnahmen mit abgenommen. Der Zeitpunkt der Abnahme variierte, da die Rekrutierungsphase abhängig von lokaler Organisation wie z.B. der Zustimmung der Ethikkommission zentrumsabhängig war.

Insgesamt wurden 288 Proben für genetische Analyse verarbeitet. Die Daten für die Proben aus der GEO Datenbank und der University of California, San Francisco wurden zur Verfügung gestellt. Aufgrund von unterschiedlicher Verfügbarkeit von Bioproben in den jeweiligen Zentren konnte nicht immer Vollblut für die Analyse genutzt werden, sodass insgesamt 3 Probentypen in die Studie einfließen:

- Vollblutproben,
- „Buffy Coat“,
- „Peripheral Blood Mononuclear Cells“ (PBMCs).

Die Verteilung ist in Tabelle 2 dargestellt.

Die unverarbeiteten Proben wurden bei -80°C gelagert. Die isolierte DNA wurde in Temperaturen zwischen -80°C und -20°C gelagert. Proben wurden nur auf Trockeneis transportiert.

Tabelle 2 Probenart und Probenherkunft

Land	Deutschland	Schweiz	Spanien		Gesamt
Klinik	Charité Universitätsmedizin Berlin	Kantons- spital Baden	Universitäts- klinik Sevilla	Universitäts- klinik Granada	
Vollblut			115		115
PBMCS	135			18	153
Buffy Coat		20			20

Die DNA wurde mithilfe des Quick-DNA™ Miniprep Kit, der Marke Zymo-Research Kooperation (Katalognummer: D3024) isoliert, wie in den Herstelleranweisungen empfohlen. Für den Elutionsschritt wurde anstatt des Zymo-Research Elution-Puffers, der Elution Puffer der Firma Quiagen verwendet. Die Verwendung des Quiagen Elution-Puffers war für die nachfolgende Sequenzierung notwendig, da Elutions-Puffer welche EDTA (Ethyldiamintetraacetat) enthalten zusätzliche Aufreinigungs- oder Waschschrte vor der Sequenzierung erfordern. Der Zymo-Research Elutions-Puffer enthält EDTA, um eine längere Haltbarkeit der Proben zu gewährleisten. Die Erhöhung der Haltbarkeit basiert auf einer Bindung von Magnesiumionen, welche für die ordnungsgemäße Funktion von bakteriellen Enzymen benötigt werden. EDTA kann enzymatische Reaktionen der Sequenzierung stören, indem Magnesiumionen der für die Sequenzierung genutzten Enzyme ebenfalls gebunden werden. Vor einer weiteren Verarbeitung wäre ein Verdünnungsschritt notwendig gewesen, um die EDTA Konzentration unter einen kritischen Wert zu senken.

Der Quiagen Elutions-Puffer enthält kein EDTA und ist somit geeigneter. Die Proben wurden direkt nach der Isolation eingefroren, sodass keine Notwendigkeit der Zugabe eines Konservierungsstoffes wie EDTA bestand. Ein Teil der DNA-Isolation wurde automatisch auf einem Roche LC2 Roboter gemäß den Herstelleranweisungen mit dem TheMagNA Pure LC DNA Isolation Kit™ – Large Volume (Roche, Katalognummer: 03310515001) durchgeführt.

Im Anschluss an die DNA-Isolation wurden die manuell extrahierten Probenchargen am Photometer auf Ihre DNA-Konzentration kontrolliert (Photometer Nanodrop 2000 oder Nano View, beide Thermo Fisher Scientific) und anschließend bei -80°C gelagert. Die Kontrolle der automatisch isolierten Probenchargen erfolgte mit dem Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, Katalognummer: Q32851).

3.4 Analysen

Um die Frage zu beantworten, ob es genetische Risikofaktoren gibt, welche einen schweren SARS-CoV-2 Verlauf begünstigen, wurde das genetische Material für insgesamt zwei Analysen verwendet (HLA-Typisierung und Exomsequenzierung). Hierfür wurden die Proben bereits während der DNA-Isolation in zwei Probenportionen aufgeteilt, um Schädigung der DNA durch Wiederauftauen der Proben für die folgenden Analysen zu vermeiden. Die für dieses Projekt verwendeten DNA-Proben wurden nur ein einziges Mal aufgetaut. Aufgrund bestimmter Mindestmengen an DNA welche die technischen Verfahren voraussetzten, konnten nicht alle Proben beide Analysen durchlaufen. Klinische Daten von Patienten, von welchen zu geringe Mengen an DNA für genetische Analysen vorhanden waren, wurden ebenfalls statistisch erfasst und auf gemeinsame klinische Merkmale hin ausgewertet.

3.4.1 HLA-Sequenzierung

Methode der HLA-Typisierung und Amplifikation:

Die HLA-Typisierung wurde mithilfe des Single-molecule real-time sequencing (SMRT) Verfahrens von Pacific Biosciences (PacBio) durchgeführt. Durch die hohe Probenzahl wurden die meisten Pipettierschritte mit einer Mehrkanalpipette oder dem Pipettierroboter epMotion 5075 (Eppendorf) durchgeführt. Die Amplifizierung der 11 HLA-Gene erfolgte mithilfe des NGSgo®-AmpX v2 HLAGeneSuite kit (#7371662, GenDx), gemäß den Anleitungen des Herstellers.

Es wurden alle HLA-Gene der Klasse 1 (HLA-A, HLA-B und HLA-C), sowie relevante Gene der HLA-Klasse 2 (HLA-DRB* 1, HLA -DRB* 3/4/5, HLA -DQB* 1, HLA -DPA* 1, HLA -DPB* 1, HLA -DQA* 1) untersucht.

Um die Coverage für HLA-Klasse 2 Gene zu steigern wurde die PCR Reaktion angepasst. Dies geschah auf Empfehlung der sequenzierenden Spezialabteilung (Charité Core Unit Genomics). Die minimale DNA-Konzentration wurde von 45ng auf 80ng für die Loci HLA-DRB*1, HLA -DQB* 1, HLA -DPA* 1, HLA -DPB* 1 und HLA -DQA*1 festgelegt. Für letztgenannten Locus wurde zusätzlich die Elongationszeit auf 5 Minuten verlängert.

Die Aufreinigung wurde mithilfe der Agencourt AMPure XP beads (#A63881, Beckman Coulter) durchgeführt und die Ergebnisse mittels D5000 Screen Tape Assay (#5067-5593, Agilent) mithilfe der TapeStation (Agilent) und des Qubit dsDNA Assay Kits (#33120, Thermofisher) auf dem

FLUOStar Omega Mikroplatten Reader (BMG Labtech) überprüft. Im Anschluss fand für jede/n Patient*in eine äquimolare Mischung der amplifizierten Proben von HLA-Klasse 1 und 2 statt.

HLA-Probenvorbereitung

Die Vorbereitung der amplifizierten Patientenproben erfolgte gemäß den Herstelleranweisungen (Procedure & Checklist -Preparing SMRTbell™ Libraries using PacBio® Barcoded Adapters for Multiplex SMRT® Sequencing PacBio®). Es wurden Adapter mit Barcode verwendet, sodass jedes Molekül einem/r Patient*in zugeordnet werden kann. Bis zu 72 Proben wurden kombiniert pro HLA-Bibliothek.

Mithilfe des 12000 DNA-Kits (#50697-1508, Agilent) wurden die Bibliotheken auf einem Agilent Bioanalyzer validiert und auf einem Qubit Fluorometer mit dem Qubit dsDNA Kit quantifiziert.

HLA-Typisierung:

Die HLA-Typisierung wurde auf SMRT 1M Zellen von PacBio mit dem Sequenziergerät von PacBio und einer Zyklusdauer von 10h im zirkulären Sequenzierverfahren vorgenommen. Als Bedienungssoftware und Planungstool diente die vom Hersteller empfohlene Software SMRTLink v9.0. Als Demultiplexer und Analysesoftware diente das Programm SMRT Link 9.0.0.92188 GUI. Der Ablauf der HLA-Analyse ist in Abbildung 2 dargestellt.

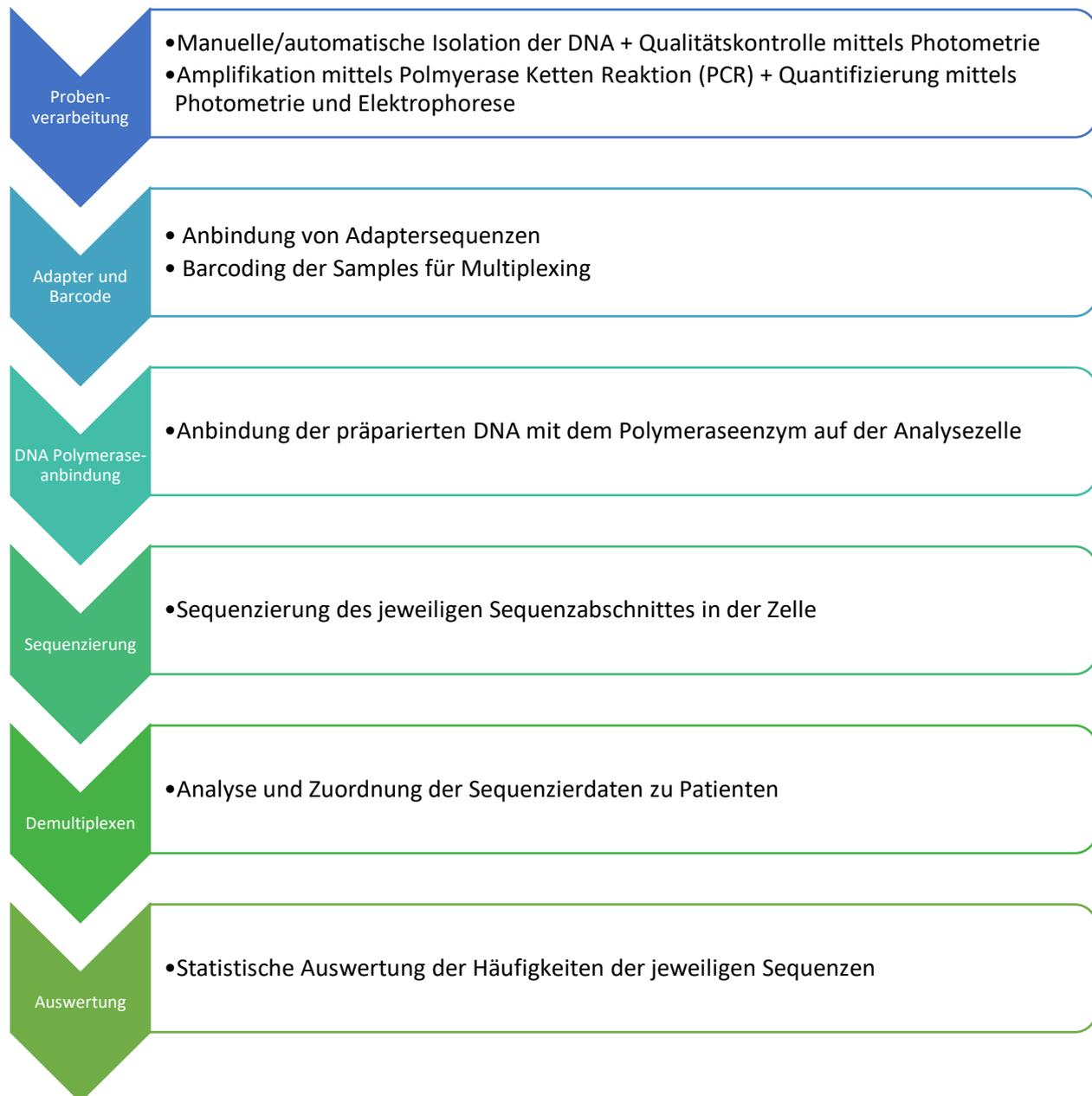


Abbildung 2 Ablauf HLA-Sequenzierung

3.4.2 Exomsequenzierung

Exomsequenzierung Probenvorbereitung

Für die Bibliotheksvorbereitung wurde die Bravo NGS Workstation mit der Option B gemäß den Herstelleranweisungen mit dem KAPA HyperPrep und KAPA HyperPlus Kit (jeweils von Roche Sequencing) verwendet. Die empfohlene Methodik wurde für den automatisierten Arbeitsvorgang gemäß dem KAPA HyperPrep und KAPA HyperPlus Schritten im KAPA HyperCapWorkflow Version 3.0 (Roche Sequencing) genutzt.

Die isolierte und vorportionierte DNA wurde quantifiziert mittels des Quant-iT™ dsDNA Assay Kits (ThermoFischer Scientific: Q33120) und des FLUOStar Omega Mikroplatten Readers (BMG

Labtech). Im Anschluss wurden 100ng der DNA in einem Mastercycler Plus S (Eppendorf) 25 Minuten lang fragmentiert mit anschließender Enden-Reparatur. Die Markierung der Fragmente erfolgte mithilfe vom KAPA Universal Adapter (Roche Sequencing). Zu kleine Fragmente wurden anschließend mittels KAPA HyperPure Beads (Roche Sequencing) aussortiert.

Die Amplifikation der Proben erfolgte mit den passenden KAPA UDI Primer Mix (Roche Sequencing) und KAPA HyperPure Beads (Roche Sequencing) in 6 Zyklen der Polymerase Ketten Reaktion (PCR). Mit diesem Schritt war die Bibliotheksvorbereitung abgeschlossen.

Acht Patientenprobenbibliotheken wurden vor der Anreicherung „gepooled“ indem 187,5ng pro Bibliothek in eine Vertiefung (Well) pipettiert und im Anschluss auf 45 µl Gesamtvolumen, mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt wurden.

Im Zuge der Anreicherung wurde die Hybridisierung mit KAPA HyperExome Probes (Roche Sequencing) durchgeführt. Es folgte im Anschluss eine erneute Aussortierung von kleinen Fragmenten mittels KAPA Capture Beads (Roche Sequencing) und ein Waschschrift. Schlussendlich erfolgte eine erneute Amplifikation der angereicherten gemultiplexten Probenbibliothek mittels PCR und anschließende Aufreinigung des Amplifikats. Hierbei wurden die Reagenzien aus dem KAPA HyperCapture Reagent Kit verwendet.

Die Ergebnisse der ersten und zweiten PCR Reaktion wurden mithilfe des Qubit dsDNA HS Assay Kits (ThermoFischer Scientific) mit einem Qubit™ 3 Fluorometer (ThermoFisher Scientific) und dem D5000 ScreenTape assay (Agilent Technologies) auf der 4200 TapeStation (Agilent Technologies) quantifiziert und die Größenverteilung festgelegt.

Gemäß dem KAPA HyperCap Pooling Guide (Roche Sequencing) und dem dazugehörigen Berechnungstool wurden jeweils 12 gemultiplexte angereicherte Bibliotheken äquimolar miteinander vermischt und auf 1,3 nM verdünnt, sodass eine Sequenzierung möglich war.

Anmerkung: Einige der in diesem Verfahren genutzten Substanzen sind ausschließlich für Forschungszwecke geeignet (Label „Research only“) und dürfen nicht in diagnostischen Verfahren eingesetzt werden, da die hierfür notwendigen Zertifizierungen nicht vorliegen.

Exomsequenzierung:

Die finalen Mischbibliotheken wurden auf jeweils 2 Bahnen einer S4 Flow Cell (Illumina, Inc) in 2x 151 Zyklen mit einem NovaSeq 6000 System sequenziert.

Der Ablauf der Exomanalyse ist in Abbildung 3 dargestellt.

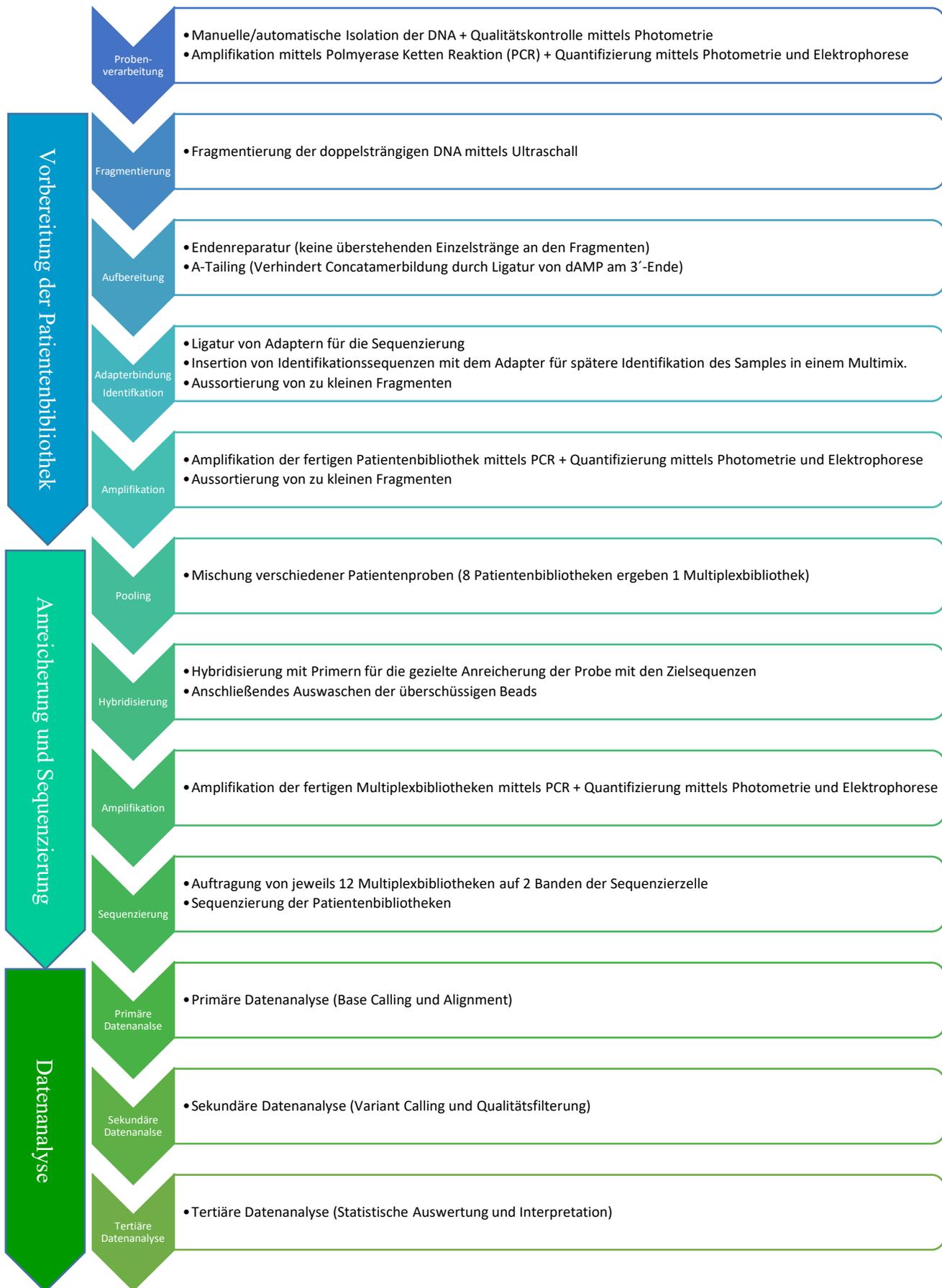


Abbildung 3 Ablauf Exomsequenzierung

3.5 Statistische Datenanalysen

Um vermengende Effekte zu vermeiden, welche durch unterschiedliche geografische Probenherkunft denkbar wären, wurde die Studienpopulation in drei Datensätze aufgeteilt.

Folgende Datensätze (Abkürzung DS) enthalten o.g. Patientengruppen:

- Datensatz 1 (DS1): Patient*innen der Charité Universitätsmedizin Berlin
- Datensatz 2 (DS2): Patient*innen aus dem Universitätskrankenhaus de Valme in Sevilla, und San Cecilio in Granada, Spanien und dem Kantonsspital Baden AG, Schweiz
- Datensatz 3 (DS3): Zwei öffentlich zugängliche Datensätze der Vereinigten Staaten (siehe Abschnitt 3.7)

Die Analyse der Daten fand in Form einer Metaanalyse aller drei Datensätze statt. Die statistische Datenanalyse wurde mithilfe der Software R 3.6.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Wien) und den verschiedenen Erweiterungen (siehe jeweilige Methodik-Abschnitte) durchgeführt. Außerdem wurden Excel 2016 (MSC, Redmond, WA) und SPSS Version 25.0 (IDM Corporation, Armonk, NY) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf unter 5% ($p < 0,05$) festgelegt. P-Werte < 0.001 wurden als hochsignifikant bezeichnet.

3.5.1 HLA-Daten Analyse

Software:

Die Analyse der HLA-Typisierungsdaten erfolgte, wie vom Hersteller empfohlen, mit der Software von PacBio SMRT Link 9.0.0.92188 GUI. Die Analyse im Zusammenhang mit den Exomdaten wurde mittels OptiType Version 1.3.5 durchgeführt, wie es in der Arbeit von Szolek et. al beschrieben wurde⁽⁸⁹⁾. Für R wurden die Erweiterung für eine multiple Korrespondenzanalyse FactoMineR Version 2.3⁽⁹⁰⁾ genutzt. Die Testung mit einem linearen Modell fand mit der Erweiterung HIBAG statt, wie in der Arbeit von Zheng et. al empfohlen⁽⁹¹⁾. Mithilfe der Erweiterung rstatix für R Version 0.6.0⁽⁹²⁾ konnte die Effektstärke ermittelt werden. Für die Analyse und Verarbeitung dieser Daten wurde zudem die Erweiterung arcasHLA Version 0.2.0⁽⁹³⁾ verwendet.

Kohortenverteilung und Einschlusskriterien:

Um ausreichend statistische „Power“ zu erreichen, wurde die Zahl der potenziellen HLA-Typen reduziert auf Allele, welche mit einer Frequenz von 5% in allen 3 Datensätzen vorkamen und in mindestens 5 Patient*innen nachweisbar waren. Dies ist ein allgemein akzeptiertes Standardvorgehen bei HLA-Analysen. Allele welche diese Kriterien nicht erfüllten, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Schweregradeinteilung:

Um eine Unterscheidung zwischen den klinischen Verläufen in Datensatz 1 zu ermöglichen, wurde eine 5-stufige Klassifikation für den klinischen Verlauf entwickelt. In den Score sind die Ereignisse Tod, Notwendigkeit einer intensivstationären Therapie, Intubation, sowie die pathologische Erhöhung des hochsensitiven Troponin T Spiegels (>14 ng/L) eingeflossen. Im Anschluss wurde eine multiple Korrespondenzanalyse durchgeführt.

Tests in den einzelnen Datensätzen:

Im Anschluss an die Identifikation der HLA-Allele welche die o.g. Einschlussbedingungen erfüllen wurde eine Assoziationstestung in Form eines linearen Modells durchgeführt. Hierbei wurde die Assoziation von Patientenparametern bzw. klinischen Parametern (Antwortvariablen) mit dem dominanten Allel untersucht. Somit fand ein Vergleich zwischen allelnegativer Gruppe und allelpositiver Gruppe (heterozygote Träger und homozygote Variantenträger) statt.

Genutzte Kovariablen:

- DS1: Geschlecht, Alter und Herkunftsregion
- DS2: Geschlecht und Alter
- DS3: Geschlecht, Alter und Herkunftsregion

Als Ereignisvariablen konnten folgende Variablen identifiziert werden:

- DS1: Hochsensitives Troponin T zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie und sein Maximalwert während des Therapiezeitraums, Virenkonzentration, Intubation, intensivstationäre Behandlung und der WHO Score⁽⁹⁴⁾,
- DS2: Notwendigkeit einer intensivstationären Behandlung und einer Intubation
- DS3: Notwendigkeit einer intensivstationären Behandlung und einer Intubation.

Für die Ereignisse Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie wurden zuerst die Datensätze einzeln untersucht und anschließend miteinander verglichen. Die Parameter hochsensitives Troponin T und der WHO-Score konnten aus Verfügbarkeitsgründen nur in Datensatz 1 untersucht werden. Es fand eine Korrektur für multiple Testung mittels Bonferroni Methode statt. Kategorische Variablen wurden einer logistischen Regression unterzogen.

Die Tests wurden in einer Metaanalyse miteinander verglichen. Die Berechnung der Effektstärke fand mittels Cohens D für den Vergleich von zwei Parametern und mittels Cramers V Kreuztabellen für mehrere Parameter statt. Um die Wahrscheinlichkeit einer Alphafehler-

Kumulierung durch wiederholte Testung, d.h. die falsche Zurückweisung der Nullhypothese (Fehler 1.Art) zu reduzieren, wurden die Ergebnisse der Testung ebenfalls mittels Bonferroni Korrektur angegeben.

Affinitätsanalyse:

Die Fähigkeit von HLA-Allelen Peptide zu binden ist essenziell, um sie zellulären Bestandteilen des Immunsystems zu präsentieren. Eine niedrige Affinität zu Peptiden eines Pathogens könnte maßgeblich zur unterschweligen Immunantwort beitragen und somit zu einem schwereren klinischen Bild führen. Um diesen Einflussfaktor zu untersuchen wurde eine Affinitätsanalyse des durch o.g. Methodik identifizierten HLA-Allels durchgeführt. Dabei fand das Vorgehen wie in der Arbeit von Iturrieta-Zuzazo et al.⁽⁹⁵⁾ beschrieben Anwendung. Hierbei wurden alle Peptide welche durch die jeweiligen HLA 1 Loci gebunden werden aufgeführt und repetitive Peptidsequenzen (bestehend aus mehr als einem Allel) entfernt. Anschließend wurde die Aufteilung in starke und schwache Bindungen (unter 50 mM und über 500Mm) angewendet. Es wurde für die Testung ein bereits publizierter⁽⁹⁶⁾ in silico erstellter Datensatz von Bindungsaffinitäten genutzt.

Korrelation mit SARS-CoV-2 Konzentration

In einer weiteren Untersuchung wurde die These überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Viruslast eines nasopharyngealen Abstrichs und potenziellen Risiko-HLA-Allelen besteht. Die Viruslastbestimmung fand dabei mittels PCR statt⁽⁹⁷⁾. Ebenfalls wird überprüft, ob eine erhöhte Virenlast mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert ist. Die Ergebnisse der Assoziationsanalyse wurden mittels Bonferroni Methode auf multiple Testung korrigiert.

3.5.2 Exomdaten Analyse

Allgemeine Voraussetzungen für die Exomdaten Analyse:

Das Sequenzalignment, d.h. die Zuordnung der sequenzierten Fragmente zu Patient und Referenzsequenz wurden mithilfe des Burrows-Wheeler Aligners (BWA) in der Programmausführung BWA-MEM Version 0.7.15⁽⁹⁸⁾ durchgeführt. Der Modus MEM wurde gewählt da er am genauesten eine Zuordnung erlaubt und Fragmentlängen von bis zu 1 Mbp verarbeiten kann. Vor dem Alignment musste eine Konvertierung der Rohdaten zum Format FASTQ erfolgen, welche mithilfe des Tools bcl2fastq v2.20 durchgeführt und mittels FastQC⁽⁹⁹⁾ überprüft wurde. Als Referenzgenom diente der Build 37 des humanen Genoms, welcher am 27.02.2009 vom Genome Reference Consortium publiziert wurde (Abkürzung GRCh37). Die Zuordnung von Duplikaten und Identifizierung von Varianten wurde mit dem Tool Samblaster Version 0.1.24⁽¹⁰⁰⁾ durchgeführt.

Die Identifikation der einzelnen Proben wurde mittels GATK HaplotypeCaller Version 3.7 durchgeführt.

Subgruppenanalyse:

Die Datenauswertung fand innerhalb vom Statistikprogramm R mithilfe der Erweiterung SNPreRelative Version 1.24 statt⁽¹⁰⁰⁾. Eine Hauptkomponentenanalyse wurde durchgeführt, um Subpopulationen zu identifizieren und anschließend die ersten vier Hauptkomponenten zu testen. Ziel war es herauszufinden, ob Single Nukleotide Polymorphismen (SNPs) der externen Exomdaten (siehe Datenvalidierung in genomweiten Assoziationsstudien) oder des KI-Rezeptors mit den in Abschnitt 3.5.1 ermittelten HLA-Allelen assoziiert sind. Als Testmethode wurde ein T-Test durchgeführt.

In der ersten Hauptkomponentenanalyse wurde hierbei die vom/n der Patient*in angegebene ethnische Herkunft als Kofaktor miteinbezogen, um statistische „Outlier“ (außerhalb der 25. und 75. Perzentile) zu identifizieren. Die Herkunft wurde als Faktor miteinbezogen, da die Häufigkeit von HLA-Polymorphismen geografisch stark variieren kann. Anschließend wurde der Test ohne die statistischen „Outlier“ und mit den ersten zwei Hauptkomponenten anstatt der selbstberichteten Herkunft wiederholt.

Untersuchung von KIR-Genen

Eine Haplotypisierung der Gene der killerzellimmunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIR) aus HLA-Daten ist mit hoher Genauigkeit bis jetzt mit keinem bioinformatischen fertigen Tool zu bewältigen. Bisher gibt es lediglich die Methode von Roe et. al⁽¹⁰¹⁾ welche als KIR Proben Interpretation (KIP) bezeichnet wird. Diese wurde angewandt, um Informationen über den KI-Rezeptor zu gewinnen.

Der KIR Polymorphismus KIR2DS4 wurde hierbei betrachtet, weil bekannt ist, dass dieser z.B. bei HIV-Infektionen und positivem HLA-C*04:01 Trägerstatus mit einem hohen Virustiter einhergeht. Hierdurch ergibt sich ein schlechterer klinischer Verlauf, gegenüber KIR2DS4 negativen HIV-Infizierten⁽⁸³⁾. Dieser Polymorphismus wurde mithilfe einer Literaturrecherche gefunden, als das Risiko-HLA-Allel HLA-C*04:01 bereits identifiziert war. Mithilfe der statistischen Analyse sollte geprüft werden, ob bei HLA-C*04:01 und KIR2DS4 Trägern, ebenfalls ein schwerer klinischer Verlauf bei COVID-19 assoziiert werden kann.

Funktionelle Varianten von KIR2DS4 sind über eine Insertion (Sequenz: CCCGGAGCTCCTATGACATGTA, dbSNP rs138504928) in Exon 4 des Killer cell immunoglobulin-like Rezeptors 2DS4 identifizierbar. Sie werden als KIR2DS4f+ bezeichnet. Im

Folgenden wurden die Varianten, welche durch GATK HaplotypeCaller vorgeschlagen wurden, auf das KIR2DS4f+ Merkmal hin überprüft, woraufhin eine Subpopulationsanalyse durchgeführt werden konnte. Mit dieser Analyse kann ebenfalls unterschieden werden, ob es sich um eine homozygote oder heterozygote Variante handelt.

3.6 Vergleich der Datensätze

Die Ergebnisse der HLA- und Exomanalyse aus den Datensätzen 1 bis 3 wurden in einer Metaanalyse verglichen.

Aufgrund der unterschiedlichen Verfügbarkeit von klinischen Daten in den vorliegenden Datensätze waren nur die Ereignisse Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie in allen Datensätzen vorhanden. Um keine Patienten aus der Studie zu verlieren, wurden die Ereignisse Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie als Indikatoren für einen schweren klinischen Verlauf untersucht.

Mithilfe eines zweiseitigen gewichteten Gauß-Tests⁽¹⁰²⁾ wurden p-Werte für jedes Allel errechnet, welche mit logarithmischen Odds Ratios kombiniert werden konnten. Die logarithmischen Odds Ratios wurden aus dem Beta-Koeffizienten des logarithmischen Regressionsmodells berechnet. Erneut wurde um eine Kumulation der Alpha Fehler zu vermeiden die Bonferroni Korrektur in allen Analysen angewandt.

Exomdaten waren nicht immer verfügbar, weil ein Teil der Patienten keinem Whole Genome Sequencing zugestimmt hat. Aus diesem Grund wurden im Datensatz 1 die angegebene Familienherkunft (Eigenaussage) und in Datensatz 3 die Ethnizität als Kovarianten in die lineare Regressionsanalyse einbezogen. Die Patient*innen wurden in die Herkunftskategorien Asien, Afrika, Amerika, Kaukasien oder Hispano eingeteilt. Mithilfe der Exomdaten konnten ebenfalls statistische „Outlier“ identifiziert werden. Um den Einfluss dieser „Outlier“ auf die Ergebnisse der Metaanalyse zu erfassen wurden Patient*innen welche außerhalb der 25.-75. Perzentile lagen in einem zweiten Analysedurchgang ausgeschlossen. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Individuen von welchen keine Information zur Ethnizität oder Familienherkunft vorlag. Die anschließend durchgeführte Hauptkomponentenanalyse erlaubte es mithilfe der dort errechneten Hauptkomponenten die Assoziationstests zu wiederholen. Schlussendlich wurden beide Metaanalysen (vollständiger Datensatz vs. Familienherkunfts/Ethnizitäts-Datensatz) miteinander verglichen, um den Einfluss der ausgeschlossenen Individuen und neu genutzten Variablen zu erfassen.

3.7 Datenvalidierung in Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS)

Eine Validierung der Ergebnisse der in den vorherigen Abschnitten ermittelten Allele wurde mithilfe von GWAS-Daten durchgeführt. Die Datensätze wurden anhand der Größe, der größtmöglichen Ähnlichkeit zu Datensatz 1 und 2, sowie der Zugänglichkeit der Daten ausgewählt. Die Auswertung fand mittels R und der Erweiterung „genetics“ statt. Als Referenzdaten für die GWAS Auswertung und gleichzeitig ersten Validierungsdatensatz wurden die Daten des 1000 Genom (1KG) Projekt Konsortiums⁽¹⁰³⁾ verwendet. Die HLA-Allele für dieses Genom stammen aus der Arbeit von Abi-Rached et. al⁽¹⁰⁴⁾.

Weitere GWAS Datensätze wurden von Forschungsgruppen, welche Ihre Daten und Ergebnisse in Preprint Artikeln veröffentlicht haben, angefordert. In den meisten Fällen wurden keine HLA-Allele sequenziert. Zum Nachweis eines möglichen Zusammenhangs zwischen HLA-Genen und den in den GWAS identifizierten Risikoallelen wurden in der Literatur Polymorphismen gesucht, welche zusammen mit den in 3.5.1 identifizierten HLA-Allelvarianten im Sinne einer haplotypischen Vererbung vererbt werden. Sobald diese „Partnerpolymorphismen“ identifiziert waren, wurde das Kopplungsungleichgewicht berechnet. Dieses gibt an, ob bestimmte Allele häufiger oder seltener zusammen vererbt werden, als es bei einer unabhängigen Vererbung erwartet würde⁽⁸²⁾. Um die Anpassungsgüte dieser Berechnung anzugeben wurde hierzu der Determinationskoeffizient berechnet.

In der Literatursuche wurde die Arbeit von Pairo-Catineira et al. ⁽¹⁰⁵⁾ als Ausgangsarbeit genutzt. Hierbei wurden über 2 244 kritisch kranke Patient*innen mit einer SARS-CoV-2 Infektion mittels GWAS untersucht. Die Patientenrekrutierung fand im Rahmen der GenOMICC (Genectis of Mortality in Critical Care) Studie auf 208 Intensivstationen im Vereinten Königreich statt. Als Kontrollen wurden dabei SARS-CoV-2 Fälle und gesunde Proband*innen aus dem 100 000 Genomes Projekt, dem Generation Scotland Projekt und der Biobank des Vereinten Königreiches eingeschlossen.

Anschließend wurden die Ergebnisse der GWAS Studie in einer Metaanalyse mit Daten aus der COVID-19 Host Genetics Initiative (HGI, Patient*innen aus dem Vereinigten Königreich wurden dabei ausgeschlossen) und der „broad respiratory phenotype“ Studie von 23andMe Inc.⁽¹⁰⁵⁾ ausgewertet.

In dieser GWAS konnten insgesamt 7 Loci/SNPs identifiziert werden, welche ein signifikantes Ergebnis ($p < 10^{-8}$) aufwiesen. In der anschließenden Metaanalyse blieben 7 Loci/SNPs bestehen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Metaanalyse der überlappenden SNPs zwischen GenOMICC, HGI und 23andMe Studien [Auszug aus der Arbeit von „Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19“, Tabelle 2 „Meta-analysis of overlapping SNPs between GenOMICC, HGI and 23andMe studies“ von Pairo-Castineira et al.⁽¹⁰⁵⁾]

SNP	OR _{gcc}	CI _{gcc}	P _{gcc}	OR _{meta}	CI _{meta}	P _{meta}	Locus
rs71325088	2.1	1.87– 2.43	9.3×10^{-30}	1.9	1.73–2	2.5×10^{-54}	<i>LZTFL1</i>
rs143334143	1.8	1.61– 2.13	8.8×10^{-18}	1.3	1.27–1.48	1.5×10^{-10}	<i>CCHCR1</i>
rs6489867	1.3	1.15– 1.37	6.9×10^{-7}	1.2	1.14–1.25	9.7×10^{-10}	<i>OAS1– OAS3</i>
rs2109069	1.4	1.25– 1.48	4×10^{-12}	1.2	1.19–1.31	7×10^{-13}	<i>DPP9</i>
rs11085727	1.3	1.17– 1.4	1.3×10^{-7}	1.2	1.18–1.31	1.2×10^{-13}	<i>TYK2</i>
rs13050728	1.3	1.15– 1.38	3×10^{-7}	1.2	1.16–1.28	5.1×10^{-12}	<i>IFNAR2</i>

Die in der Tabelle 3 genannten Allele wurden im Anschluss von Pairo-Catineira et al.⁽¹⁰⁵⁾ in der 23andMe und COVID-19 Host Genetics Initiative validiert. Bis auf CCGCR1 konnten alle Loci reproduziert werden. In dieser Arbeit wurde trotzdem beschlossen alle 7 vorgeschlagenen Loci/SNPs auf mögliche Assoziation mit den mit der Methodik aus Abschnitt 3.5.1 gefundenen HLA-Allelen im Datensatz des 1000 Genom Projekt Konsortiums zu vergleichen, um potenzielle Haplotypen zu identifizieren. Es wurde explizit dieser Datensatz gewählt, da sowohl Exomdaten, als auch HLA-Daten verfügbar waren. Gleichzeitig war dies der größte zum Zeitpunkt der Analyse verfügbare Datensatz, was eine höhere statistische Power gewährleistete. Das Koppelungsgleichgewicht wurde für alle SNPs 500 Kilobasenpaare vor und nach der Sequenz von signifikanten HLA-Risikoallelen (aus Abschnitt 3.5.1) berechnet.

Außerdem konnte an einer Kohorte von 12 139 Teilnehmern des Unternehmens Genotek Ltd. (Moskau, Russland) HLA-C*04:01 im Hinblick auf ein erhöhtes Infektionsrisiko getestet werden. Hierbei waren 2 113 SARS-CoV-2 Fälle und 10 026 Kontrollen enthalten.

Die gewonnenen Daten (Zeitraum November 2020 – April 2021) stammen von volljährigen Patient*innen welche nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung zugestimmt haben Ihre DNA für wissenschaftliche Fragestellungen sequenzieren zu lassen. Die Sequenzierung fand mittels Illumina Infinium Global Screening Arrays statt. Genotek Ltd. sammelt und verwaltet genetische Datenbanken, um sie für Forschungsfragen zur Verfügung zu stellen. Es erfolgte eine Nachkontaktierung, um zu erfassen, ob eine COVID-19 Erkrankung vor oder nach der

Blutentnahme bestanden hat. Die Patient*innen bei welchen Daten zur COVID-19 Erkrankung erhoben wurden, bilden die hier untersuchte Kohorte.

Mit den durch Genotek Ltd. zur Verfügung gestellten Daten fand eine Assoziationstestung von HLA-Allelen in Bezug auf das Erkrankungsrisiko statt. Als Kovarianten wurden hierfür die Parameter Geschlecht, Alter und BMI miteinbezogen. Eine Analyse hinsichtlich des klinischen Verlaufes ist nicht möglich, da die dafür notwendigen Parameter nicht vom Datensatz erfasst wurden. Es wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt angepasst an das Geschlecht, Alter und BMI.

Zusätzlich wurden noch die Datensätze von Littera et. al. ⁽¹⁰⁶⁾, der Severe COVID-19 GWAS Group, dem Ancestry EUR Register und der UK-Biobank, sowie der Host Genetics Initiative (HGI) miteinbezogen und in einer Metaanalyse miteinander verglichen.

3.8 Literatursuche für Diskussion

Für die Identifikation von relevanten Veröffentlichungen für die Diskussion wurden mehrere Plattformen mit unterschiedlichen Suchwörtern durchsucht. Alle frei verfügbaren Artikel in deutscher oder englischer Sprache kamen in Betracht. Folgende Suchbegriffe wurden in der PubMed Datenbank und Google Scholar in verschiedenen Kombinationen verwendet:

- (SARS-CoV-2) AND (HLA)
- (SARS-CoV-2) AND (GWAS)
- (SARS-CoV-2[MeSH Terms]) AND (Humane Leukocyte antigen [MeSH Terms])
- HLA-C*04:01
- (SARS-CoV-2) AND (Sex)
- CCHCR1
- (SARS-CoV-2) AND (CCHRC1).

Zusätzlich wurden auch Referenzen der gefundenen Artikel und als „Similar“ in PubMed angezeigte Publikationen durchsucht.

Ziel der Literatursuche ist es die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zu validieren und in den aktuellen Forschungskontext zu setzen.

4. Ergebnisse

4.1 Populationsbeschreibung

Insgesamt konnten 435 an SARS-CoV-2 erkrankte Patient*innen eingeschlossen werden. Die Anteile der Patient*innen im Gesamtdatensatz sind in Abbildung 4 dargestellt. Im Datensatz waren Frauen mit 41% (n=179) und Männer mit 59% (n=256) repräsentiert, welche im Median ein Alter von 58 Jahren und einen BMI von 29 kg/m² aufwiesen (Abbildung 5). 40% (n=175) der Kohorte wurden auf einer Intensivstation versorgt, 29% (n=127) wurden intubiert. Die Patient*innen hatten in ca. 1/4 der Fälle Diabetes Mellitus (Typ 1 oder 2) und/oder eine arterielle Hypertonie als Vorerkrankung. Insgesamt sind im direkten Zusammenhang mit COVID-19 6% (n=25) der Patient*innen verstorben.

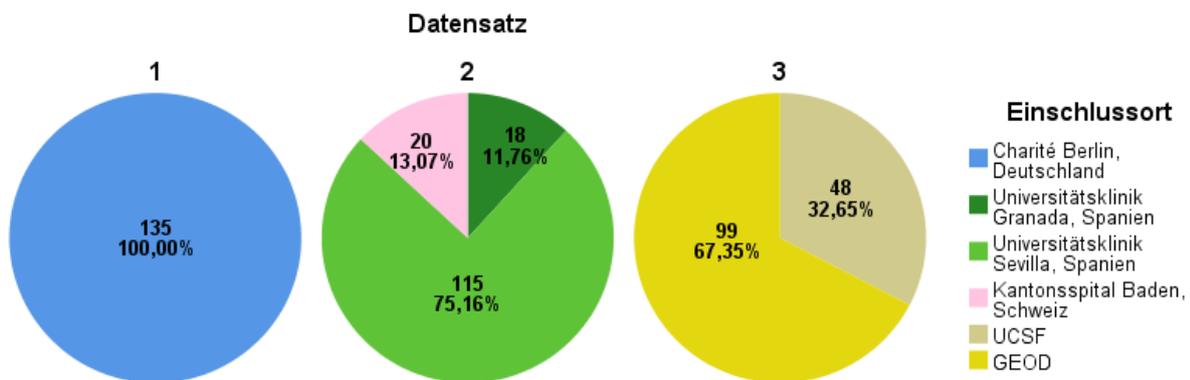


Abbildung 4 Zusammensetzung der Datensätze und ihre jeweiligen Einschlussorte

Datensatz 1 setzte sich aus 135 Patient*innen zusammen, wobei auch hier Männer einen höheren Anteil beitrugen 67% (n=90). Sie waren im Median 60 Jahre alt und an übergewichtig (Median des BMI = 27 kg/m²). 53% der Patient*innen (n=72) litten an arteriellem Hypertonus und 27% (n=36) an Diabetes Mellitus Typ 1 oder 2. Die Aufnahme auf Intensivstation betrug 57% (n=77) mit einer Intubationsrate von 41% (n=56). Die Mortalität lag mit 13% (n=17) am höchsten von allen drei Datensätzen.

Datensatz 2 enthält 153 Patient*innen in einem medianen Alter von 57 Jahren ähnlich den anderen beiden Datensätzen (siehe Tabelle 4). Der Anteil an Frauen liegt deutlich höher mit 54% (n=82). 8% der Patient*innen wurden intensivmedizinisch versorgt (n=13) und intubiert 6% (n=10). Die Rate an Vorerkrankungen lag niedriger als in Datensatz 1 und 3. 15% (n=23) der Patient*innen hatten arterielle Hypertonie und 8% (n=13) Diabetes Mellitus Typ 1 oder 2. Der mediane BMI war

mit 28 kg/m² in allen Datensätzen ähnlich (siehe Tabelle 4). Die Mortalität lag mit 2% (n=3) im Datensatz 2 am niedrigsten.

Datensatz 3 besteht aus 147 Patient*innen mit einem medianen Alter von 60 Jahren und überwiegend männlichem Geschlecht 65% (n=95). Der BMI entspricht ebenfalls einem Übergewicht mit einem Median von 29 kg/m². Ähnlich wie in Datensatz 1 (siehe Tabelle 4) war auch hier Diabetes Mellitus Typ 1 oder 2 (n=54, 37 %) häufig. Daten zur arteriellen Hypertonie lagen nicht vor. Mit einer Intensivstationären-Aufnahmerate von 58% (n=85) und einer Intubationsrate von 41% (n=61) ähnelt der Datensatz 3 in seiner klinischen Präsentation Datensatz 1 (siehe Tabelle 4), wobei die Mortalitätsrate mit 3% (n=5) deutlich niedriger liegt.

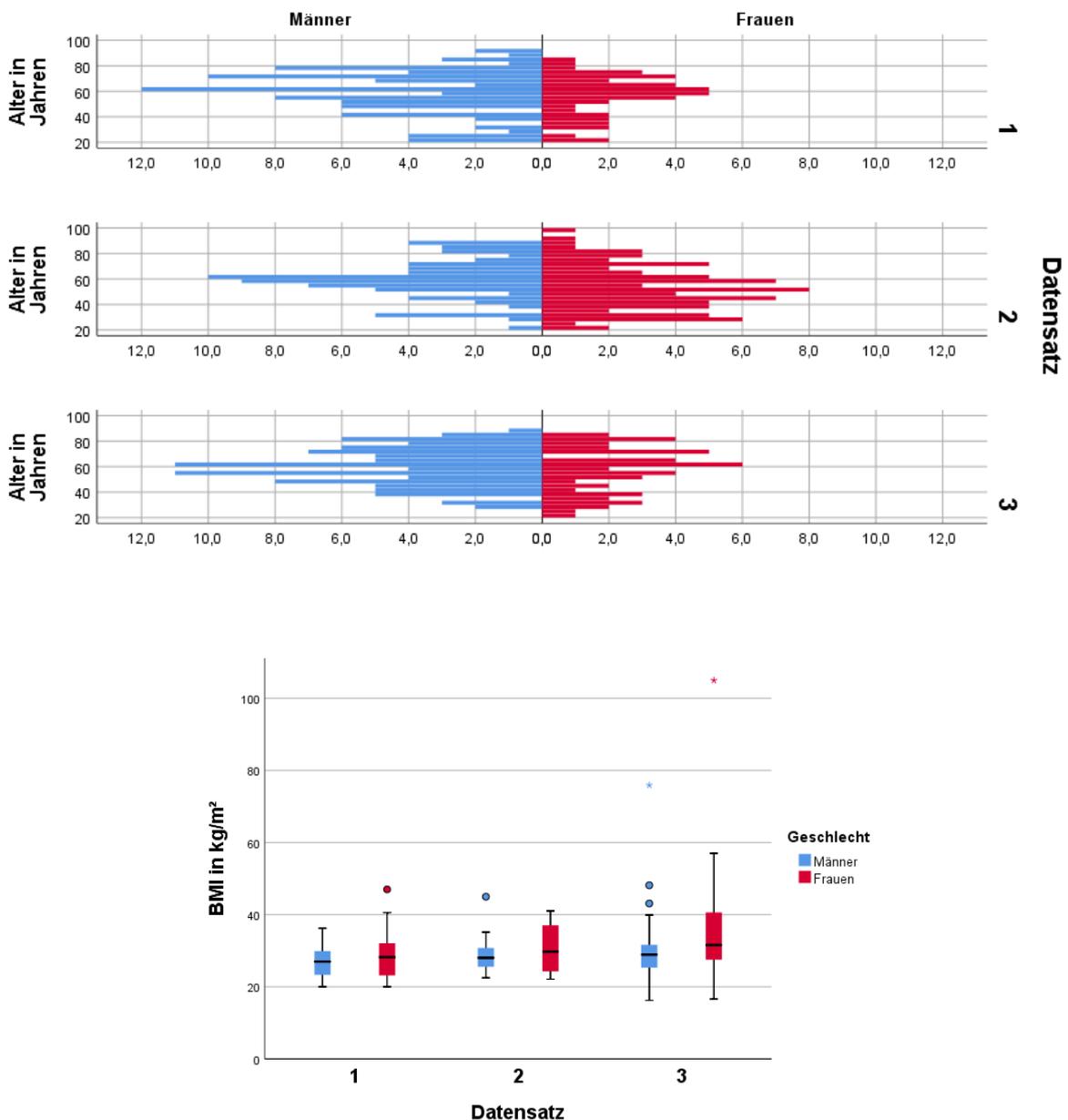


Abbildung 5 Geschlechts- und Altersverteilung und Body-Mass-Index in den verschiedenen Datensätzen

Tabelle 4 Patienteneigenschaften der verschiedenen Datensätze

Besondere Aspekte sind dick hervorgehoben. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Gesamtheit des jeweiligen Datensatzes. Ergibt die Summe der Kategorie nicht 100% so waren die Werte nicht von allen Patienten verfügbar.

		Datensatz 1	Datensatz 2	Datensatz 3	Total n (%)
Geschlecht n (%)	Männer	90 (66,7 %)	71 (46,4 %)	95 (64,6 %)	256 (58,8 %)
	Frauen	45 (33,3 %)	82 (53,6 %)	52 (35,4 %)	179 (41,2 %)
Alter in Jahren Median (IQR)		60 (24)	57 (23)	60,5 (23,9)	58 (28,1)
Body Mass Index Median (IQR)		27,3 (7,55)	28 (6,23) *	29,5 (7,79)	28,8 (8,0) *
Diabetes Mellitus 1&2 n (%)	Nein	98 (72,6 %)	122 (79,7 %)	88 (59,8 %)	308 (70,8 %)
	Ja	36 (26,8 %)	13 (8,5 %)	54 (36,7 %)	103 (23,7 %)
Arterieller Hypertonus n (%)	Nein	62 (45,9 %)	112 (73,2 %)	Keine Daten	174 (40 %)
	Ja	72 (53,3 %)	23 (15,0 %)	Keine Daten	95 (21,8 %)
Koronare Herzkrankheit n (%)	Nein	118 (87,4 %)	142 (92,8 %)	42 (28,6 %)	302 (69,4 %)
	Ja	17 (12,6 %)	11 (7,2 %)	6 (4,08 %)	34 (7,8 %)
Behandlung auf Intensivstation n (%)	Nein	58 (43,0 %)	140 (91,5 %)	62 (42,2 %)	260 (59,7 %)
	Ja	77 (57,0 %)	13 (8,5 %)	85 (57,8 %)	175 (40,2 %)
Intubation n (%)	Nein	79 (58,5 %)	143 (93,5 %)	86 (58,5 %)	308 (70,8 %)
	Ja	56 (41,5 %)	10 (6,5 %)	61 (41,4 %)	127 (29,2 %)
Verstorben n (%)	Nein	117 (86,7 %)	132 (86,3 %)	142 (96,5 %)	391 (89,9 %)
	Ja	17 (12,6 %)	3 (2,0 %)	5 (3,40 %)	25 (5,7 %)

* Der BMI-Wert war für die Kohorte in Sevilla (Teil von Datensatz 2) nicht verfügbar und wurde somit in der Berechnung nicht berücksichtigt

4.2 Identifikation von HLA-Risiko-Allelen

HLA-Allele der Population:

Die Allelfrequenzen zeigten keinen deutlichen Unterschied zwischen den einzelnen Datensätzen. Die Voraussetzung der Vergleichbarkeit ist somit durch ähnliche Allelfrequenzen gegeben. Die Übereinstimmung der Allelfrequenzen ist in Abbildung 6 dargestellt.

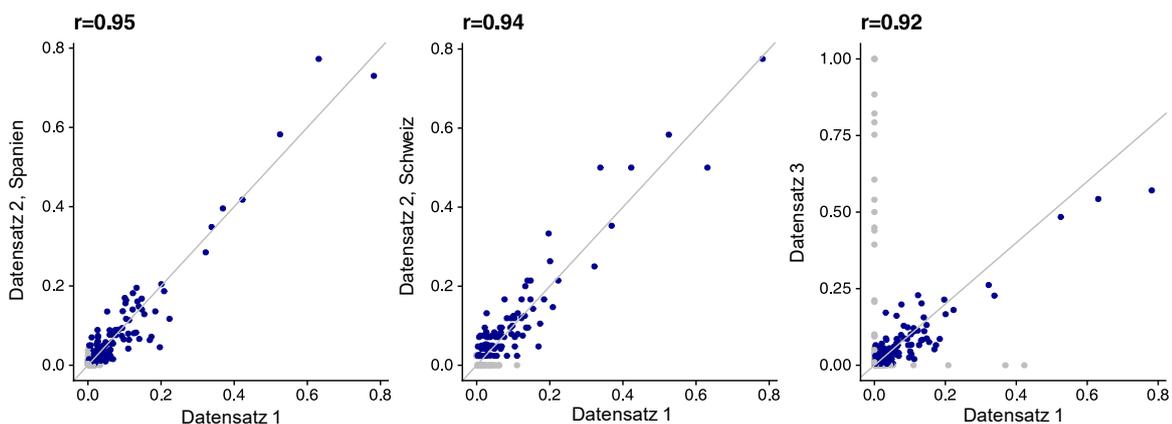


Abbildung 6 Allelfrequenzvergleich innerhalb der Datensätze

Blaue Punkte zeigen eine Übereinstimmung mit beiden Datensätzen, graue Punkte ein alleiniges Vorkommen im jeweiligen Datensatz. (Abbildung publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Supplement Figure 1, übersetzt durch Autor)

Ergebnisse der einzelnen Datensätze:

In den jeweiligen Datensätzen konnten insgesamt 804 unterschiedliche HLA-Allele identifiziert werden, welche in unterschiedlicher Allelfrequenz und Patientenzahl vorkamen. Die anschließende Einschränkung der Allele auf Varianten welche eine Frequenz von mindestens 5% haben und in mindestens 5 Patient*innen vertreten sind ergab 35 ausgewählte HLA-Allele. Der Auswahlprozess ist in den Tabellen 5-7 dargestellt.

Tabelle 5 HLA-Allele HLA-Klasse I in allen drei Datensätzen (DS)

In Tabelle 5 ist keine Alpha-/Betakette für den Genort angegeben, da dies in der Nomenklatur von HLA-Klasse I Allelen nicht vorgesehen ist. (Zur einfacheren Vergleichbarkeit beider Tabellen wurde die Spalte beibehalten.)

HLA-Klasse	Lokus	Alpha/Betakette Genort	DS1	DS2	DS3	Ausgewählt
HLA-Gene der Klasse 1	E		–	–	7	0
	F		–	–	5	0
	A		30	27	43	4
	B		48	43	81	2
	C		30	30	44	4
HLA-Gene der Klasse 1 Pseudogene	H		–	–	13	0
	J		–	–	2	0
	K		–	–	4	0
	L		–	–	3	0
Total			108	100	202	10

Tabelle 6 HLA-Allele HLA-Klasse II in allen drei Datensätzen (DS)

HLA-Klasse	Lokus	Alpha/Betakette Genort	DS1	DS2	DS3	Ausgewählt
HLA-Gene der Klasse 2	DM	A	–	–	3	0
	DM	B	–	–	4	0
	DO	A	–	–	3	0
	DO	B	–	–	6	0
	DP	A1	8	6	12	2
	DP	B1	23	26	33	4
	DQ	A1	15	15	20	6
	DQ	B1	20	19	29	5
	DR	A	–	–	3	0
	DR	B1	36	32	43	5
	DR	B3	7	6	6	2
	DR	B4	3	3	–	0
	DR	B5	5	3	5	1
Total			117	110	167	25

Tabelle 7 HLA-Allele Gesamtsumme Klasse I und II in allen drei Datensätzen (DS)

Gesamtsumation	DS1	DS2	DS3	Ausgewählt
Total	225	210	369	35

4.3 Assoziation mit klinischem Verlauf und Vergleich

Im Anschluss an die Identifizierung der 35 HLA-Allele (insgesamt 10 Loci) welche die Einschlussbedingungen erfüllen fand die statistische Analyse statt. Hierbei wurde eine Assoziationstestung in Form eines linearen Modells durchgeführt.

Für kategoriale Variablen wie die Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie und die Ereignisse Tod und Intubation wurde eine logistische Regression durchgeführt.

Aufgrund der bereits in 3.1 beschriebenen unterschiedlichen Datenlage konnten im weiteren Verlauf nur die Ereignisse Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie als „Surrogat“-Parameter für einen schweren klinischen Verlauf genutzt werden. Die Verteilung dieser Parameter innerhalb der jeweiligen Datensätze ist in Abbildung 7 dargestellt.

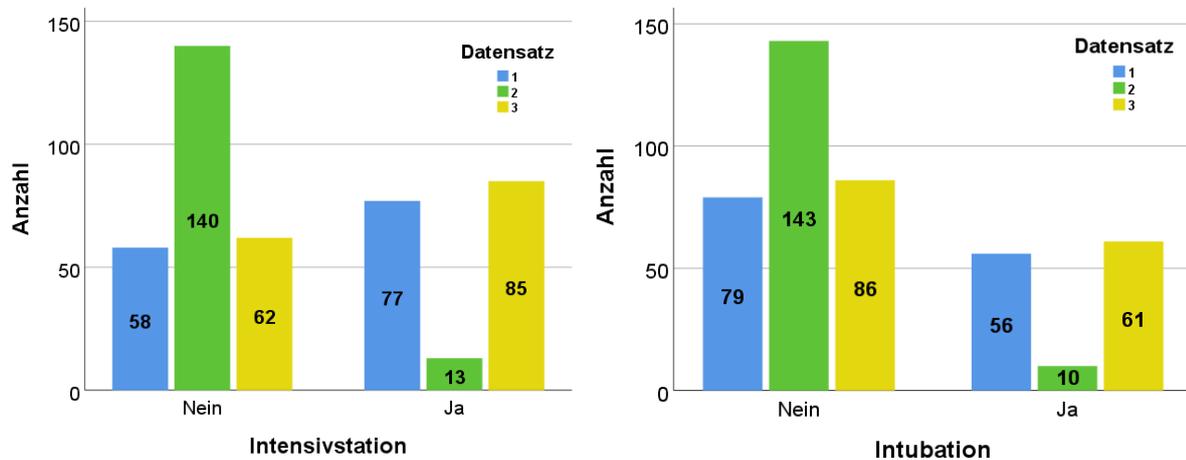


Abbildung 7 Behandlung auf Intensivstation (links) und Notwendigkeit einer Intubation (rechts), Vergleich der Datensätze

In Tabelle 8 und 9 sind die Ergebnisse der Testung der 5 HLA-Allelvarianten mit den niedrigsten p-Werten in Bezug auf die Ereignisse Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie dargestellt. Der p-Wert wurde mittels Bonferroni Methode bei multipler Testung korrigiert.

Tabelle 8 Assoziation von HLA-Allelen mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie (Tabelle verändert⁽¹⁰⁷⁾)
 Die Odds Ratio wurde immer mit einem 95% Konfidenzintervall angegeben. Ebenfalls galt für das relative Risiko ein 95% Konfidenzintervall. Die korrigierten p-Werte wurden mittels Bonferroni Korrektur berechnet. (Tabelle publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Tabelle 2, übersetzt durch Autor).

Allele	Odds Ratio DS 1	Odds Ratio DS 2	Odds Ratio DS 3	Odds Ratio Meta-analyse	Relatives Risiko	p-Wert	p-Wert* korrigiert
HLA-C*04:01	3.4 [1.2 - 9.8]	0.9 [0.2 - 3.6]	3.2 [1.1 - 8.8]	2.5 [1.3 - 4.8]	1.2 [0.9 - 1.5]	0.0038	0.26
DQA1*01:02	0.8 [0.3 - 1.7]	5.2 [1.5 - 18.4]	0.6 [0.3 - 1.3]	0.9 [0.6 - 1.6]	1.1 [0.8 - 1.4]	0.021	1
HLA-C*06:02	0.5 [0.2 - 1.3]	4.9 [1.1 - 21.5]	1.5 [0.6 - 4.1]	1.2 [0.6 - 2.2]	1.0 [0.8 - 1.4]	0.022	1
DRB1*15:01	0.6 [0.2 - 1.6]	18.7 [2.6- 135.9]	0.7 [0.2 - 2.1]	1.0 [0.5 - 1.9]	1.1 [0.8 - 1.5]	0.032	1
HLA-C*07:02	1.0 [0.4 - 2.2]	2.3 [0.5 - 10.1]	0.4 [0.2 - 0.9]	0.7 [0.4 - 1.3]	1.1 [0.8 - 1.4]	0.063	1

Tabelle 9 Assoziation von HLA-Allelen mit der Notwendigkeit einer Intubation (Tabelle verändert⁽¹⁰⁷⁾)
 Die Odds Ratio wurde immer mit einem 95% Konfidenzintervall angegeben. Ebenfalls galt für das relative Risiko ein 95% Konfidenzintervall. Die korrigierten p-Werte wurden mittels Bonferroni Korrektur berechnet. (Tabelle publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Tabelle 2, übersetzt durch Autor).

Allele	Odds Ratio DS 1	Odds Ratio DS 2	Odds Ratio DS 3	Odds Ratio Meta-analyse	Relatives Risiko	p-Wert	p-Wert* korrigiert
HLA-C*04:01	5.4 [1.9-15.1]	1.5 [0.3 - 6.9]	3.3 [1.3 - 8.5]	3.5 [1.9-6.6]	1.5 [1.1 - 2.1]	0.00011	0.0074
DQA1*01:02	0.7 [0.3 - 1.5]	3.8 [1.0 - 15.0]	0.5 [0.2 - 1.2]	0.8 [0.5-1.3]	1.0 [0.7 - 1.4]	0.018	1
DQA1*01:01	2.7 [1.0 - 7.1]	0.0 [0.0 - Inf]	1.6 [0.5 - 4.7]	2.1 [1.0- 4.4]	1.1 [0.8 - 1.6]	0.039	1
DQA1*03:01	2.0 [0.7 - 6.2]	0.7 [0.1 - 6.1]	2.1 [0.9 - 5.0]	1.9 [1.0- 3.6]	1.5 [1.1 - 2.1]	0.039	1
HLA-A*03:01	0.7 [0.3 - 1.8]	1.6 [0.4 - 6.9]	4.3 [1.2- 14.9]	1.4 [0.7- 2.7]	0.9 [0.6 - 1.4]	0.046	1

Einzig das HLA-Allel HLA-C*04:01 blieb nach der Korrektur auf multiple Testung in Bezug auf das Ereignis einer Intubation signifikant bestehen (p-Wert adjustiert auf multiple Testung p=0,0074). Eine signifikante Assoziation mit der Notwendigkeit einer intensivstationären Therapie konnte nicht nachgewiesen werden (p=0,26).

Wird nur die Assoziation zwischen dem Ereignis Intubation und dem HLA-C*04:01 Status verglichen so beträgt die Odds Ratio 2,9 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 1,5-5,2 bei einem weiterhin signifikanten Ergebnis (p=0,02). Bei einer Durchführung der Metaanalyse ohne DS 2

betrug der p-Wert 0,025. Anhand der Population dieser Studie ergibt sich ein doppeltes Risiko für einen schweren Verlauf (Notwendigkeit einer Intubation) bei HLA-C*04:01 Trägern. In der Abbildung 8 sind alle Allele dargestellt mit ihrer jeweiligen Effektstärke.

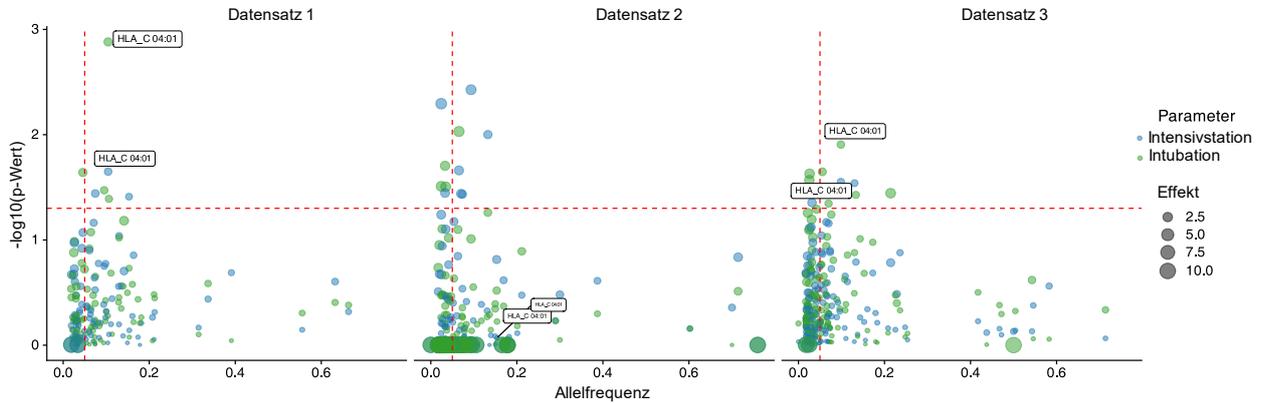


Abbildung 8 Darstellung der Assoziationsanalyse der HLA-Allele in Bezug auf die Parameter intensivstationäre Aufnahme und Intubationsnotwendigkeit.⁽¹⁰⁷⁾
 Die vertikale rote Linie zeigt eine 5% Allelfrequenz und die horizontale rote Linie das Signifikanzniveau von 5% (nicht adjustiert auf multiple Testung). Die roten Linien symbolisieren somit die Einschlusskriterien, welche Allele erfüllen müssten, um in der statistischen Analyse betrachtet zu werden. Die Y-Achse gibt den negativen Logarithmus des p-Wertes des logistischen Regressionstests an und die X-Achse die Allelfrequenz. Die Punktgröße korreliert mit der Effektgröße der Log-Odds Ratios. (Abbildung publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Figure 1, übersetzt durch Autor)

Das HLA-Allel*C-04:01 kommt insgesamt bei 94 (21,6%) der Patient*innen in der Studie vor. Die Verteilung auf die Datensätze ist in Abbildung 9 dargestellt. Für jeweils 1 Patienten in DS1 und 6 Patient*innen in DS2 war eine Bestimmung aufgrund einer zu geringen DNA-Menge in der Probe nicht möglich. Insgesamt entspricht dies einem Dropout von 1,6%.

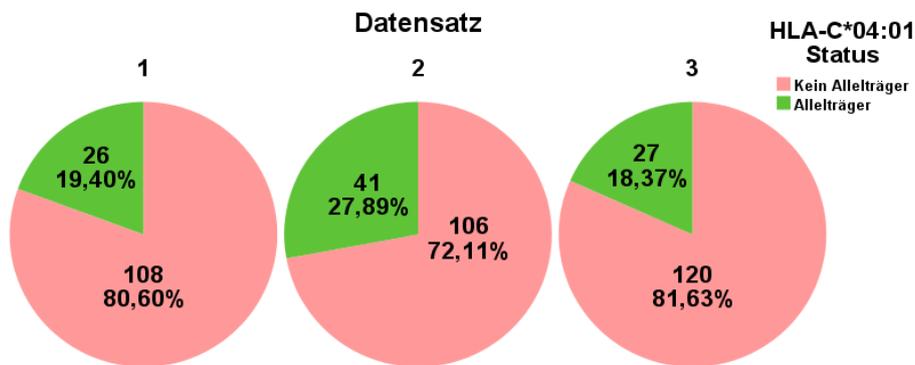


Abbildung 9 Vorkommen und Verteilung vom HLA-Allel-C*04:01 in den einzelnen Datensätzen

Dreißig Prozent (n=38) der intubierten Patient*innen in dieser Studie sind Träger des Allels HLA-C*04:01, von insgesamt 126 intubierten Studienteilnehmern. Dies entspricht einer Intubationsrate von 40% (n=38) bei Betrachtung aller HLA-C*04:01 Allelträger (Darstellung Abbildung 10).

Das HLA-C*04:01 Allel zeigte bei isolierter Betrachtung von Datensatz 1 und 3 ebenfalls eine signifikante Assoziation, wohingegen die isolierte Betrachtung von Datensatz 2 kein signifikantes Ergebnis ergab (Darstellung in Abbildung 10).

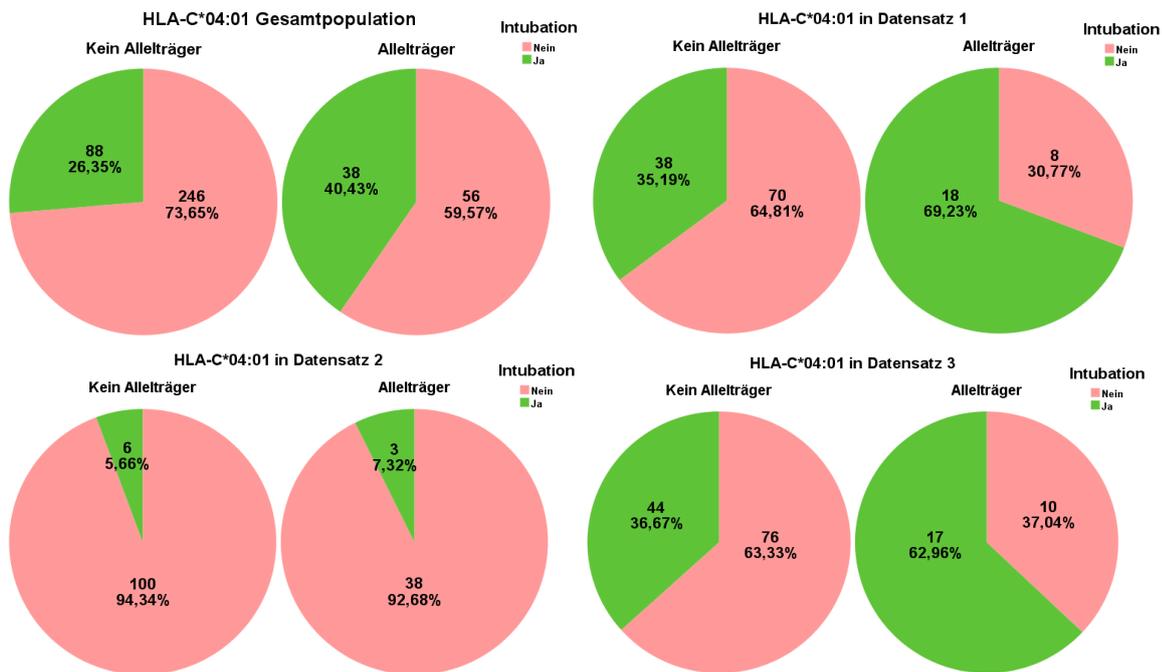


Abbildung 10 Verteilung von HLA-C*04:01 in der Gesamtpopulation und den einzelnen Datensätzen

Weitere Assoziationstestungen wurden mit den erhobenen Laborparametern (hochsensitives Troponin T (hs Troponin T) und C-reaktives Protein (CRP)) für Datensatz 1 und 2 (Verteilung in Abbildung 11 dargestellt) durchgeführt. Der Laborparameter CRP ist signifikant mit HLA-C*04:01 assoziiert ($p=0,021$ im Wilcoxon Test), jedoch mit einer kleinen Effektstärke ($r=0,2$). Die Assoziationsanalyse von hochsensitivem Troponin T ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Allelträgern und Nicht-Allelträgern.

Eine Berechnung für Datensatz 3 war nicht möglich, da keine Laborparameter verfügbar waren. Insgesamt war der Parameter hochsensitives Troponin T für 105 Patient*innen verfügbar und C-reaktives Protein für 167 Patient*innen.

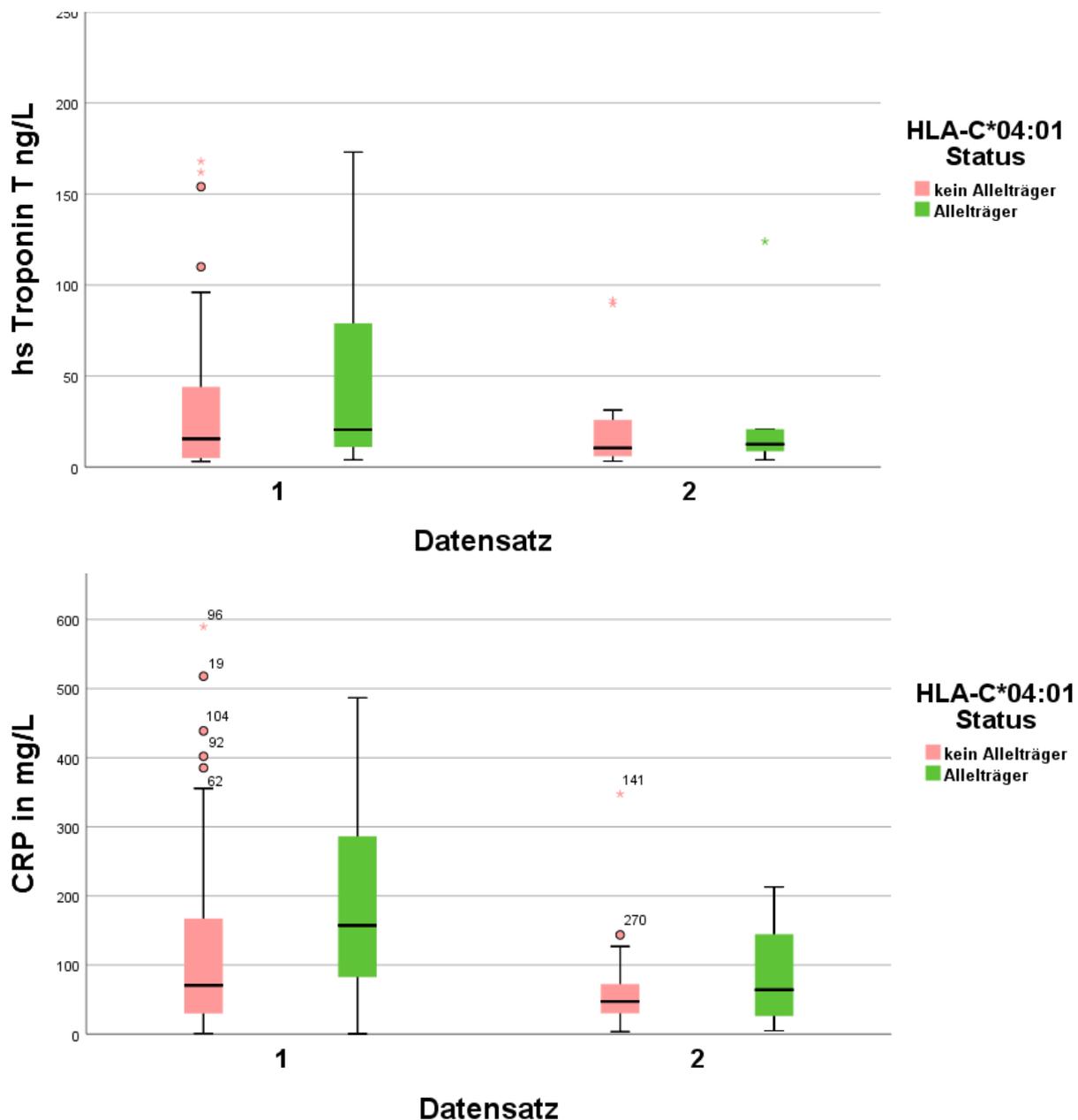


Abbildung 11 C-reaktives Protein (unten) und hochsensitives Troponin T (oben) in Abhängigkeit des HLA-Trägerstatus in den verschiedenen Datensätzen. ○ und * symbolisieren statistische "Outlier". Ein ○ zeigt eine Lage von 1,5-3,0x des Interquartilabstandes (IQR). Ein * zeigt eine Lage von >3,0x des Interquartilabstandes.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Patientengeschlecht und einem HLA-Allel konnte nicht festgestellt werden. Das weibliche Geschlecht wurde jedoch signifikant assoziiert mit besserem Outcome (weniger Intubationen).

Affinitätsanalyse

Die Affinitätsanalyse von HLA-Allel-C*04:01 ergab keine erhöhte Affinität zu Peptiden von SARS-CoV-2. HLA-C*04:01 war unter den Top 10 Allelen mit der niedrigsten Bindungsaffinität

in Bezug auf SARS-CoV-2 (Tabelle 10). Die Effektstärke der Affinitätsanalyse war mit keiner getesteten Variable (Intubation, Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Betreuung) assoziiert.

Tabelle 10 Bindungsaffinitäten der einzelnen HLA-Allele mit Peptiden von SARS-CoV-2 in aufsteigender Reihenfolge. (Tabelle publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Supplemental Table 7, Auszug übersetzt durch Autor).

HLA-Allel	Gebundene Peptide <50 mM (starke Bindung)	Gebundene Peptide <500 mM (schwache Bindung)
HLA-B*46:01	0	3
HLA-B*52:01	0	4
HLA-C*01:02	0	4
HLA-B*14:03	0	5
HLA-B*27:03	0	5
HLA-B*82:01	0	5
HLA-C*04:01	0	6
HLA-B*58:02	0	7
HLA-B*15:10	0	9
HLA-B*51:08	0	11

4.4 Vergleich der Kohorten unter Einbeziehung von Exomdaten

Wie im Methodikteil (Abschnitt 3.6) beschrieben wurden die Analysen (Abschnitt 4.3) unter Einbeziehung der Exomdaten wiederholt. Für 53% (n=153) der Gruppenkohorte aus Datensatz 1 und 2 waren Exomdaten verfügbar. Patient*innen für welche keine Daten verfügbar waren, wurden aus dieser Analyse ausgeschlossen.

In der Hauptkomponentenanalyse für den Datensatz 1 und 2 wurde überprüft, ob Subpopulationen (s.g. Cluster) in der Population vorhanden sind.

Die Hauptkomponentenanalyse der Einzelnukleotidpolymorphismen (Abbildung 12) und der anschließende T-Test (auf die ersten 2 Hauptkomponenten in Zusammenhang mit dem Ereignis Intubation oder der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie) ergaben kein signifikantes Ergebnis. Es besteht somit keine Assoziationen zwischen genetischen Substrukturen bei HLA-C*04:01 Träger*innen und den Ereignissen Intubation oder der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie.

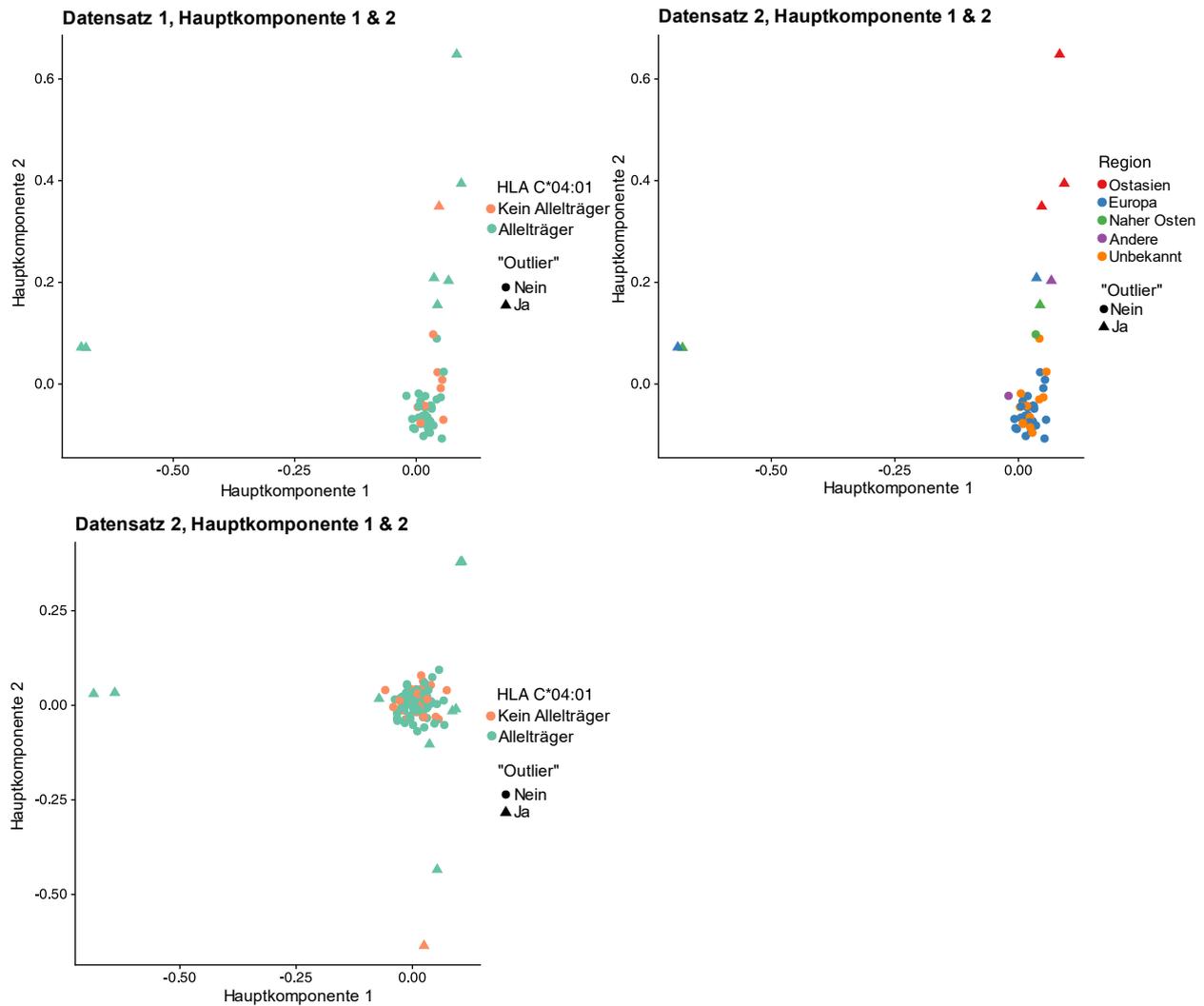


Abbildung 12 Hauptkomponentenanalyse mit Einzelnukleotidpolymorphismen.
 Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse für Datensatz 1 und Datensatz 2. Jeder Datenpunkt entspricht einem/einer Patient*in.
 Eine Clusterbildung konnte nicht nachgewiesen werden. (Abbildung publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾,
 Supplemental Figure 3, übersetzt durch Autor).

Um das Ergebnis zu überprüfen, wurde die Analyse ohne statistische „Outlier“ aus der Hauptkomponentenanalyse wiederholt (13%, n=18). Der p-Wert war ohne besagte Patient*innen nicht signifikant. Die hierzu durchgeführte Hauptkomponentenanalyse ist in Abbildung 13 dargestellt.

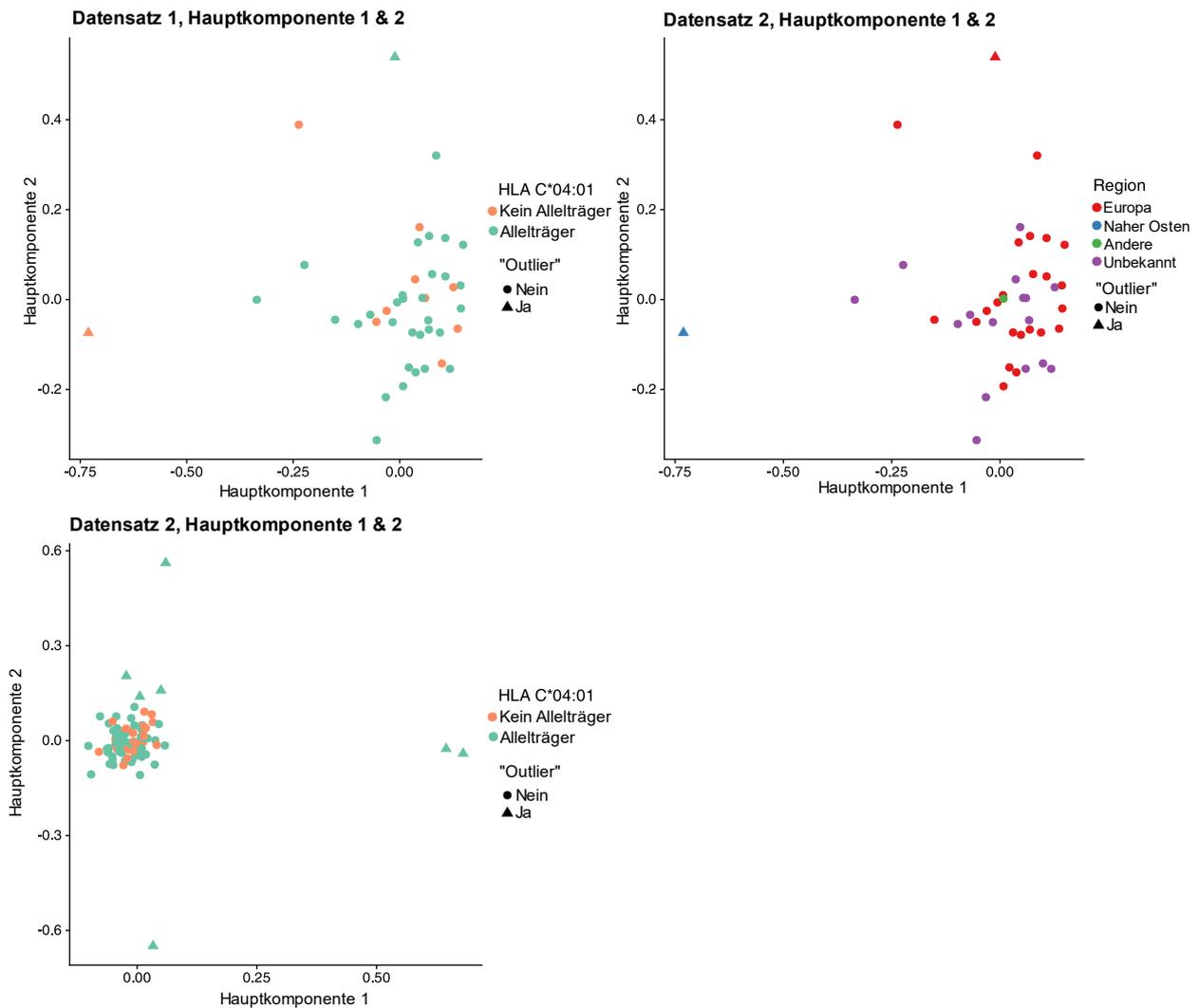


Abbildung 13 Hauptkomponentenanalyse mit Einzelnukleotidpolymorphismen.
 Die oberen Abbildungen zeigen die Ergebnisse für Datensatz 1 und die untere Abbildung zeigt die Ergebnisse für Datensatz 2. Jeder Datenpunkt entspricht einem/einer Patient*in. Eine Clusterbildung konnte nicht nachgewiesen werden. (Abbildung publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Supplemental Figure 4, übersetzt durch Autor).

Die in Abschnitt 4.3 durchgeführte Metaanalyse zwischen den Datensätzen wurde ebenfalls wiederholt. Es wurden ausschließlich Patient*innen mit verfügbaren Exomdaten betrachtet, die keine statistischen „Outlier“ (Hauptkomponente 1 und 2) waren. HLA-C*04-01 war das einzige Allel mit signifikantem p-Wert.

Die als Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizient berechnete Effektstärke blieb vergleichbar mit der Effektstärke der primären Metaanalyse. In der Metaanalyse konnte mit den eingegrenzten Auswahlkriterien die Effektstärke mit $r^2=0.90$ für das Ereignis Intubation und $r^2=0.87$ für die Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie ermittelt werden. Diese Werte sind nahe an den Effektstärken der Metaanalyse aller Patient*innen. Dieses Resultat stützt die Annahme, dass keine unerkannten genetischen Subpopulationen vorhanden sind. Die Trendveränderung durch die eingeschränkten Auswahlkriterien ist in Abbildung 14 dargestellt.

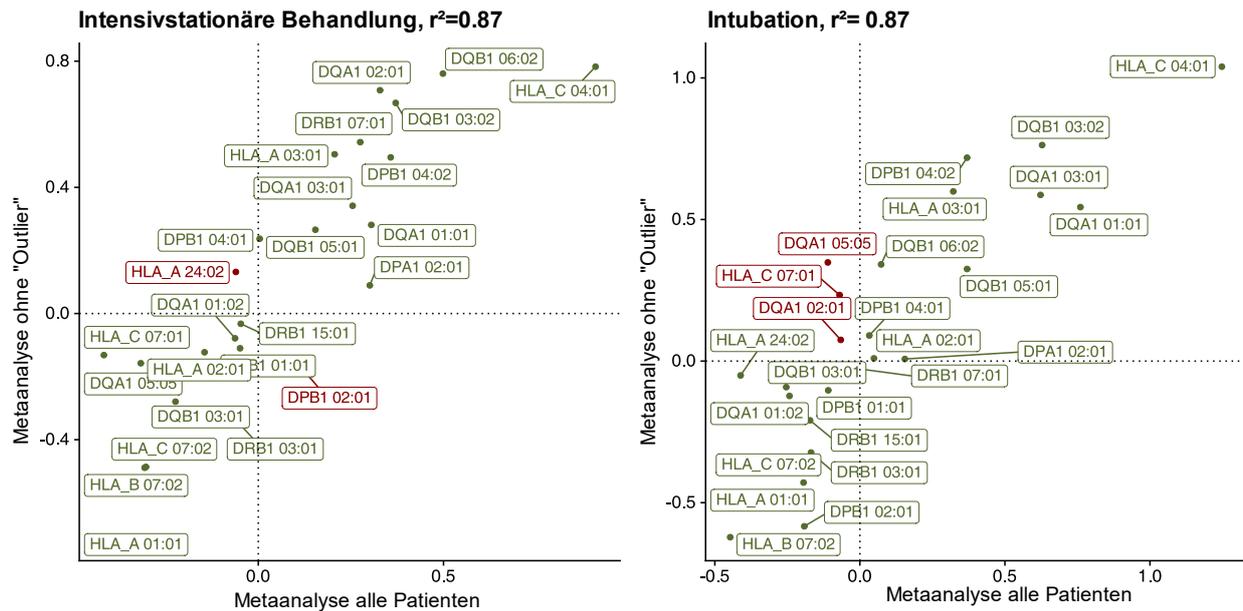


Abbildung 14 Vergleich der Odds-Ratio zwischen der Metaanalyse von allen Patient*innen und der Metaanalyse ohne statistische „Outlier“.

Ein grüner Rahmen bedeutet den gleichen Trend in beiden Analysen. Ein roter Rahmen zeigt eine Unterscheidung des Trends. HLA-C*04:01 bleibt als einziges Allel in beiden Analysen signifikant. (Abbildung publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Supplemental Figure 5, übersetzt durch Autor).

KIR2DS4

Die Assoziationstestung in Bezug auf das Vorhandensein vom KIR Polymorphismus KIR2DS4f und gleichzeitig der HLA-Variante HLA-C*04:01 war nicht durchführbar. Die Kombination war insgesamt nur bei 3 Patient*innen heterozygot und 1 Patient*innen homozygot zu finden. Aufgrund der niedrigen Patientenzahl konnte kein Zusammenhang zwischen KIR2DS4f und der Schwere des klinischen Verlaufs und HLA-C*04:01 untersucht werden.

4.5 Vergleich der Kohorten mithilfe von Herkunft/Ethnizität

Die Inzidenz der Erkrankung mit SARS-CoV-2 und die Allelfrequenzen unterscheiden sich abhängig von der Weltregion. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen wurden, wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, die Herkunft und Ethnizität als Kofaktoren miteingeschlossen.

In den Datensätzen waren unterschiedliche Herkunftsregionen und Ethnizitäten vertreten. Im Datensatz 1 war vor allem die kaukasische Herkunft vertreten. Die Assoziation von HLA-C*04:01 mit dem Ereignis der Notwendigkeit intensivmedizinischer Therapie blieb ebenfalls nach der Hinzunahme des Kofaktors Ethnizität/Herkunft konstant. Die Verbindung zum Schweregrad der Erkrankung bestand in allen Subgruppen fort, wenn auch nur in der kaukasischen Herkunft ein signifikantes Ergebnis bestehen blieb. Dies ist vermutlich den stark unterschiedlichen Patientenzahlen in den jeweiligen Subgruppen geschuldet.

Insgesamt wurden alle HLA-C*04:01 Träger*innen (afroamerikanischer, spanischer oder kaukasischer Herkunft) auf einer Intensivstation behandelt. Es wurden alle afroamerikanischen, spanischen und 66% der kaukasischen HLA-C*04:01 Träger intubiert.

Die mit HLA-C*04:01-Trägerstatus assoziierten Ereignisse Intubation und intensivmedizinische Therapie sind in Abbildung 15 für Datensatz 1 und Abbildung 16 für Datensatz 3 dargestellt. Für Datensatz 2 konnten keine ethnischen Daten ermittelt werden, sodass diese Kohorte von der Analyse ausgeschlossen wurde.

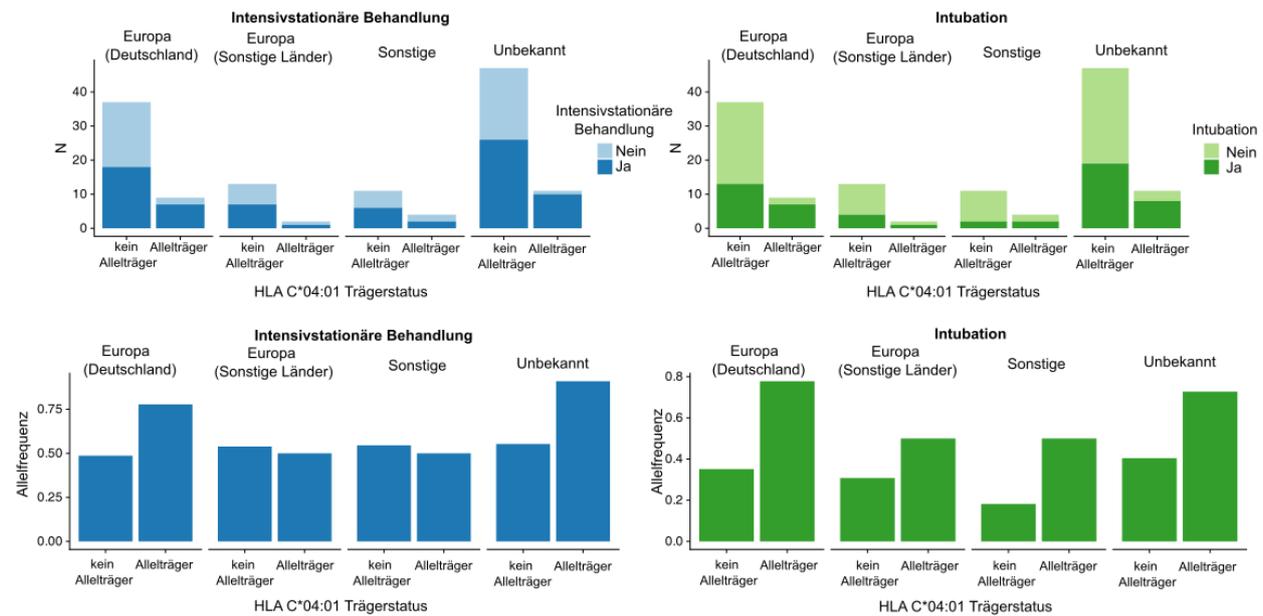


Abbildung 15 Darstellung der Ereignisse Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie abhängig von der Herkunft in Datensatz 1. In der oberen Zeile ist die absolute Zahl in der unteren Zeile die Allelfrequenz angegeben. (Abbildung publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Supplemental Figure 6, übersetzt durch Autor).

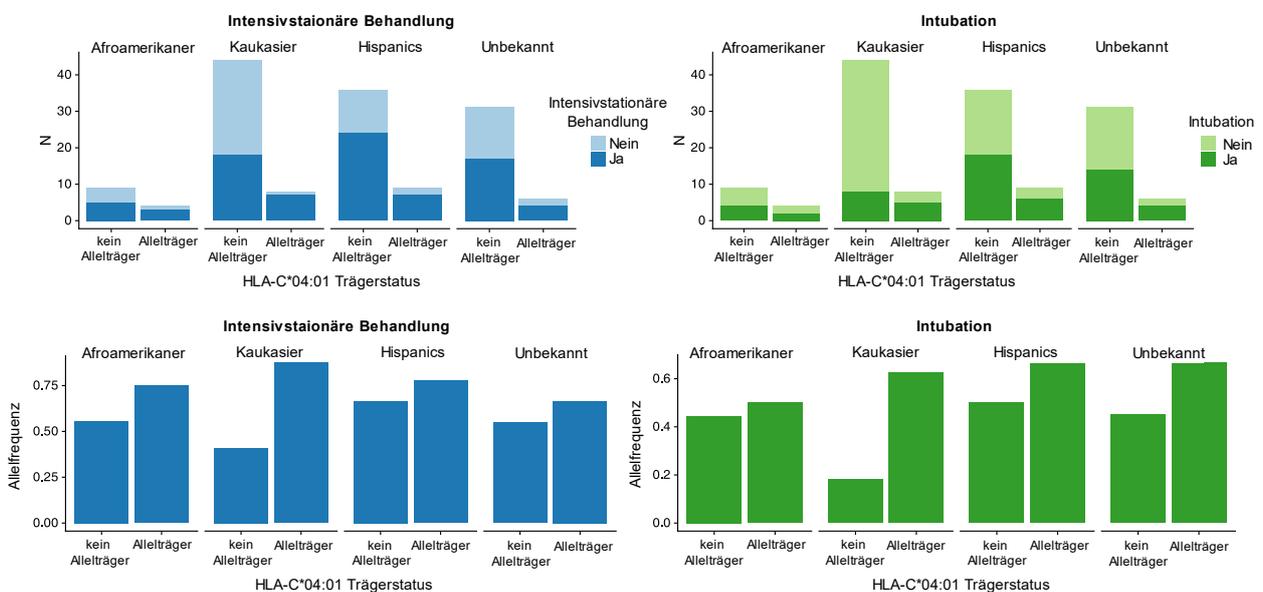


Abbildung 16 Darstellung der Ereignisse Intubation und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie abhängig von der Herkunft in Datensatz 3. In der oberen Zeile ist die absolute Zahl in der unteren Zeile die Allelfrequenz angegeben. (Abbildung publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Supplemental Figure 7, übersetzt durch Autor).

4.6 Assoziationen von HLA-Allelen, klinischem Verlauf und Viruskonzentration

Für die Testung einer Assoziation zwischen HLA-Molekül und Viruskonzentration im nasopharyngealen Abstrich waren Daten von 65% (n=88) der Patient*innen aus Datensatz 1 verfügbar. Die Assoziationsanalyse des Datensatzes 1 mit der Viruskonzentration eines nasopharyngealen Abstrichs (siehe Methodik 3.5.1) ergab keine Assoziation mit den Ereignissen Intubation oder Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie.

Ebenfalls wurde keine signifikante Assoziation mit einem anderen HLA-Allel gefunden, welches die Einschlusskriterien von 5% Allelfrequenz, ≥ 5 Allelträgern und Vorkommen in allen Datensätzen erfüllte. In der initialen Analyse zeigten 5 HLA-Allele eine Assoziation mit der Viruskonzentration. Diese war allerdings nach Korrektur für multiple Testung mittels Bonferroni Methode nicht signifikant (Tabelle 11). Das HLA-C*04:01 zeigte ebenfalls keine signifikante Assoziation (siehe Abbildung 17).

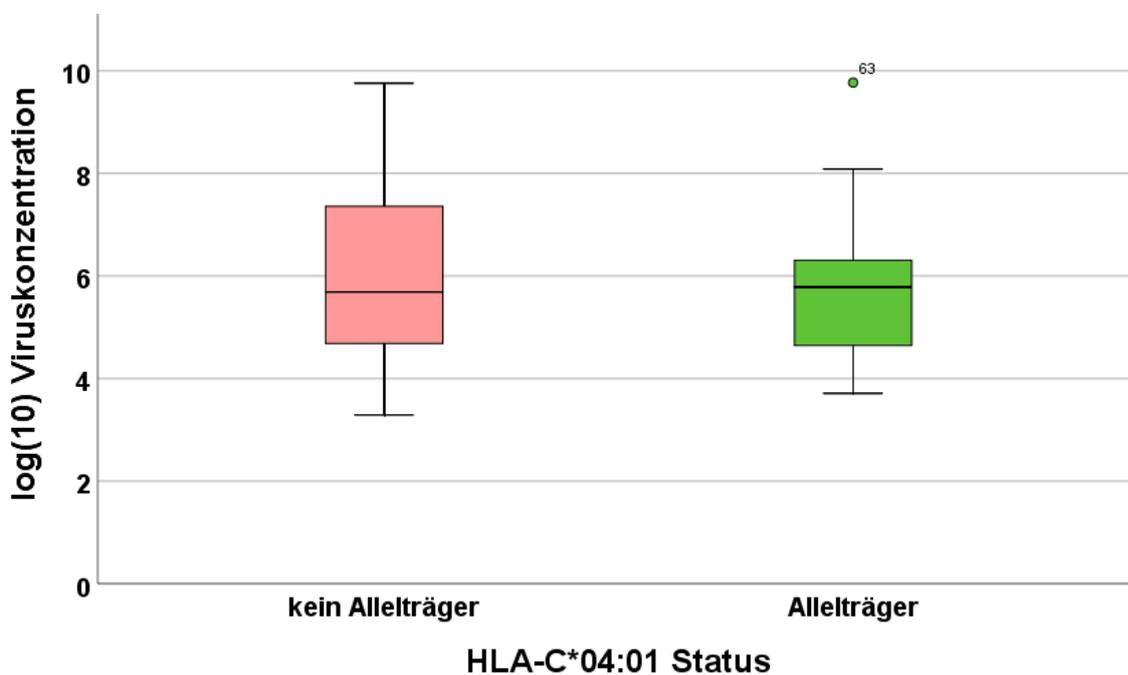


Abbildung 17 Viruskonzentration (Anzahl an RNA Kopien im Abstrich) in Abhängigkeit vom HLA-Trägerstatus
Ein nasopharyngealer Abstrich diente als Probenmittel und wurde mittels PCR ausgewertet.

Tabelle 11 HLA-Allele welche eine signifikante Korrelation mit der Viruskonzentration aufwiesen (ohne Korrektur für multiple Testung). (Tabelle publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Supplemental Table 6, übersetzt durch Autor).

HLA-Allel	Allelfrequenz	Trägeranzahl	p-Wert unkorrigiert	p-Wert korrigiert
A*01:01	0.21	22	0.0062	0.73
C*03:03	0.058	7	0.016	1
B*15:01	0.086	10	0.018	1
A*01:01	0.21	22	0.022	1
DPB1*04:02	0.14	13	0.024	1
DPB1*01:01	0.1	10	0.025	1
A*11:01	0.083	10	0.03	1
DRB5*02:02	0.26	6	0.042	1

4.7 Vergleich der Daten mit genomweiten Assoziationsstudien

Zusammenfassend wurde HLA-C*04:01 als Risikoallel für das Ereignis Intubation identifiziert. Es konnte keine Verbindung zu bestimmten Herkunftsregionen/Ethnizitäten oder der Viruslast aus einem Nasopharyngealabstrich ermittelt werden.

Einzelnukleotidpolymorphismen als Indikator für HLA-C*04:01

Um einen Zusammenhang zwischen dem Singlenucleotidpolymorphismen (SNPs) und der HLA-C*04:01 Variante zu identifizieren wurde der Datensatz des 1000 Genom (1KG) Projekt Konsortiums⁽¹⁰³⁾ verwendet. Hierbei wurden die in Abschnitt 3.7 (Tabelle 3) genannten SNPs im Hinblick auf eine gemeinsame haplotypische Vererbung getestet.

Eine haplotypische Vererbung mit HLA-C*04:01 lag nur für den Einzelnukleotidpolymorphismus rs143334143 (CCHCR1) vor, welcher in der GWAS von Pairo-Castineira et al.⁽¹⁰⁵⁾ identifiziert wurde ($p = 8.8 \cdot 10^{-18}$). Das Koppelungsungleichgewicht wurde hierbei mit einem $D' = 0.97$ und einer Effektstärke von $r^2 = 0.77$ charakterisiert. Dies erlaubt den Schluss das rs143334143 (CCHCR1) als Indikator für das Vorhandensein von HLA-C*04:01 genutzt werden kann, da eine haplotypische Vererbung wahrscheinlich ist.

Die im Kapitel 3.7 genannten Datensätze konnten nicht mittels CCHCR1 untersucht werden, da das Allel in DS1, DS2 und DS3 selten vorgekommen ist. In der Analyse des 1000 Genomes Projekt

Konsortiums Datensatzes konnte der Einzelnukleotidpolymorphismus rs5010528 als haplotypischer Indikator für HLA-C*04:01 mit einer Effektstärke von $r^2=0,966$ und $D'=1$ identifiziert werden. Die Metaanalyse für den Schweregrad der Erkrankung wurde daraufhin mit diesem Indikator-SNP oder direkt mit HLA-C*04:01 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

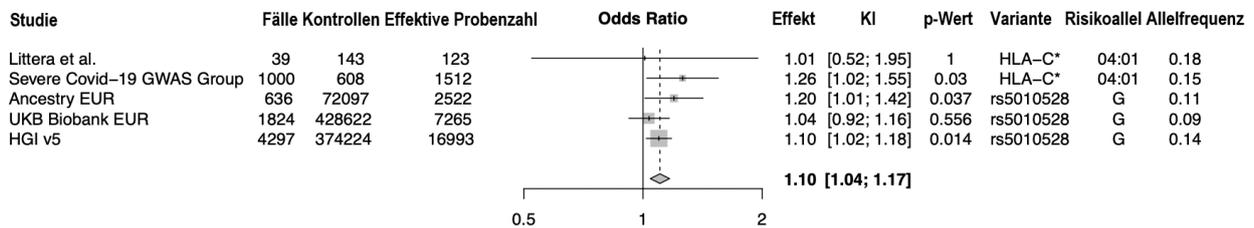


Abbildung 18 Darstellung der Odds Ratio in Bezug auf die Schwere der Erkrankung bei HLA-C*04:01 positiven Patient*innen aus externen Datensätzen⁽¹⁰⁷⁾

Es wurde entweder HLA-C*04:01 oder der haplotypisch vererbte SNP rs5010528 untersucht. Das 95-Konfidenzintervall ist angegeben als Rechteck, die Größe ist proportional zum Anteil der Gesamtkohorte. Die Einschlussgrenze ist als vertikale Linie eingezeichnet; für die darunterliegenden Kohorten wurden die HLA-Allele nicht untersucht. (KI = Konfidenzintervall). (Abbildung publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Figure 3a, übersetzt durch Autor).

Das erstellte lineare Paneldatenmodell zeigte kein signifikantes Ergebnis ($p=0,458$) in der Quantifizierung der Heterogenität $I^2=0\%$. Die Effektstärke beträgt $z=3,44$ und ist hochsignifikant ($p<0,001$). Hieraus ist eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Studienergebnisse gegeben. Zusammenfassend bestätigt die Metaanalyse die Daten dieser Studie, wenn auch der Einfluss von HLA-C*04:01 in der Metaanalyse mit einer Odds Ratio von 1,1 (95%-Konfidenzintervall von 1,04-1,17) geringer scheint, als in der vorliegenden Studienkohorte ermittelt.

Risikosteigerung einer SARS-CoV-2 Infektion durch HLA-C*04:01

Im Folgenden wurde an 12 139 Teilnehmern (2 113 COVID-19 Fälle und 10 026 gesunde Kontrollen) des Unternehmens Genotek Ltd. (Moskau, Russland) eine Assoziation zwischen HLA-C*04:01 und dem Infektionsrisiko untersucht.

Die Untersuchungskohorte bestand insgesamt aus 12 139 Teilnehmern, wovon 17% ($n=2 113$) eine SARS-CoV-2 Infektion durchgemacht hatten. Die Kohorte bestand dabei zu 52% ($n=6 258$) aus Frauen und wies ein medianes Alter von 34 Jahren auf. Der BMI lag bei 23,5 kg/m^2 (Median). Das HLA-Allel C*04:01 konnte in 13% ($n=1 578$) detektiert werden.

Mithilfe einer logarithmischen Regression durchgeführte Assoziationsanalyse ergab einen signifikanten Zusammenhang ($p\text{-Wert}=0,005$) zwischen dem HLA-C*04:01 und dem Risiko einer

Infektion mit SARS-CoV-2. Die Odds Ratio ergab einen Wert von 1,16. Somit ist HLA- C*04:01 ein Risikofaktor für eine Infektion mit SARS-CoV-2.

Im weiteren Verlauf wurde ebenfalls eine Metaanalyse mit den in 3.7 genannten Datensätzen durchgeführt. Hierbei wurde wieder der SNP rs5010528 oder direkt das HLA-Allel-C*04:01 in Bezug auf das Erkrankungsrisiko untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

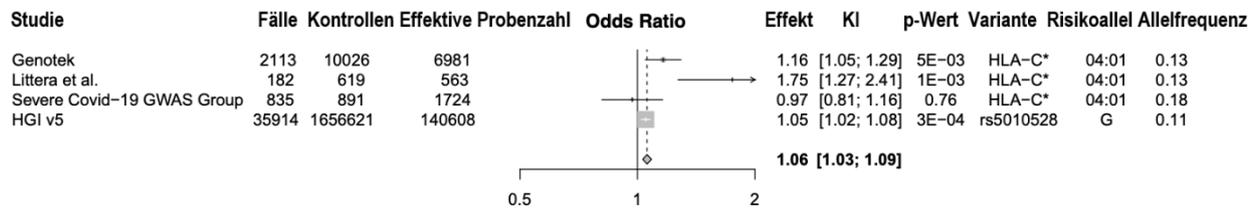


Abbildung 19 Darstellung der Odds Ratio in Bezug auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei HLA-C*04:01 positiven Patient*innen aus externen Datensätzen⁽¹⁰⁷⁾

Es wurde entweder HLA-C*04:01 oder der haplotypisch vererbte SNP rs5010528 untersucht. Das 95-Konfidenzintervall ist angegeben als Rechteck; die Größe ist proportional zum Anteil der Gesamtkohorte. Die Einschlussgrenze ist als vertikale Linie eingezeichnet, für die darunterliegenden Kohorten wurden die HLA-Allele nicht untersucht. (KI = Konfidenzintervall). (Abbildung publiziert in der Publikation zu diesen Daten⁽¹⁰⁷⁾, Figure 3b, übersetzt durch Autor).

Das erstellte lineare Paneldatenmodell zeigte ein signifikantes Ergebnis ($p=0,003$) in der Quantifizierung der Heterogenität, $I^2=78\%$. Somit besteht ein beträchtliches Maß an Heterogenität zwischen den einzelnen Studien. Die Effektstärke beträgt $z=4,34$ und ist hochsignifikant ($p<0,001$). Ein erhöhtes Risiko von HLA-C*04:01 in Bezug auf das Erkrankungsrisiko blieb signifikant mit einer Odds Ratio von 1,06 (95%-Konfidenzintervall 1,04-1,09 und $p<0,001$) ebenfalls bestehen. Die Risikoerhöhung fällt hier jedoch geringer aus als in der vorliegenden Studienpopulation.

5. Diskussion

5.1 HLA-Typisierung & KIR2DS4

Mithilfe der HLA-Typisierung konnte das HLA-Allel-C*04:01 als signifikanter Risikofaktor für die Notwendigkeit einer Intubation während einer SARS-CoV-2 Infektion identifiziert werden. In der vorliegenden Studienpopulation war eine Risikoerhöhung für einen schweren Verlauf mit Intubation vervielfacht für Allelträger mit einem OR von 3,5. Das breite 95%-Konfidenzintervall von 1,9-6,6 mahnt jedoch zur vorsichtigen Interpretation. Es ergibt sich wahrscheinlich aus einer großen Zahl an Kovarianten (Alter, Geschlecht, Ethnizität) in Bezug auf eine dafür relativ niedrige Patientenzahl. Außerdem stellt HLA-C*04:01 ebenfalls einen Risikofaktor für eine Infektion mit SARS-CoV-2 dar. Der Einzelnukleotidpolymorphismus rs143334143 (CCHCR1) und rs5010528 ist ein Indikator für das Vorhandensein des HLA-Allels-C*04:01. Die Resultate der analysierten

Studien haben ähnliche Allelfrequenzen (Abschnitt 4.2, Abbildung 6), sodass diese als gleichwertige genetische Populationen betrachtet werden können.

HLA-C*04:01 konnte als Risikofaktor in der Mehrheit der Datensätze reproduziert werden. In Datensatz 1 und 3 konnte eine Assoziation zur Intubation festgestellt werden, in Datensatz 2 hingegen nicht. Obwohl der Datensatz 2 mit 153 Patient*innen eine vergleichbare Größe zu den anderen beiden Datensätzen hatte (DS2 35,2% vs. DS1 31,0% vs. DS3 33,8%) wurden nur 10 Patient*innen intubiert (8% aller intubierten Patienten) und 13 Patient*innen intensivmedizinisch behandelt (7% der Gesamtzahl an intensivmedizinisch behandelten Patient*innen). Die Allelfrequenz von HLA-C*04:01 betrug zwar 27,9% in Datensatz 2 (DS1 19,4% und DS3 18,4%), jedoch waren 54% der Gruppe weiblich (DS1 33% und DS3 35%). Der höhere Anteil an Frauen ist ein möglicher Faktor welcher den weniger schweren klinischen Verlauf mitbeeinflussen könnte. In der Arbeit von Peckham et. al. wurde das männliche Geschlecht als Risikofaktor für einen schweren klinischen Verlauf und Aufnahme auf Intensivstation identifiziert⁽¹⁰⁸⁾.

Wie Takahashi et al. ⁽¹⁰⁹⁾ in ihrer Arbeit „Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes“ zeigten, besteht ein erheblicher Unterschied in der Immunantwort und deren prädiktiver Bedeutung zwischen Männern und Frauen bei Infektionen mit SARS-CoV-2. Beispielsweise findet man bei Männern eine höhere Konzentration an Zytokinen (Interleukin-8 und -18) sowie Monozyten, während Frauen eine höhere Rate an aktivierten T-Zellen aufweisen. Eine hohe Zytokinkonzentration ist vor allem bei Frauen mit einem schlechteren Outcome assoziiert. Bei Männern konnte keine Assoziation zwischen Zytokinkonzentration und Outcome identifiziert werden. Eine niedrige Konzentration an aktivierten T-Zellen ist vor allem bei Männern mit einem erhöhten Risiko für ein schlechtes Outcome verbunden. Bei Frauen ist jedoch keine solche Assoziation zu finden. Eine geschlechtsspezifische Betrachtung ist somit notwendig, um die unterschiedlichen immunologischen Mechanismen zu identifizieren.

Der genaue Mechanismus der unterschiedlichen Immunantwort ist noch Gegenstand der Forschung. Allein das Vorhandensein von verschiedenen immunologischen Reaktionen abhängig vom Geschlecht ist eine mögliche Erklärung für einen Unterschied im klinischen Verlauf. Zahlreiche weitere Studien ⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾ beschreiben beobachtete geschlechtsassoziierte Unterschiede wie z.B. hormonregulierte Genexpression des ACE-Rezeptors bei COVID-19. Risikofaktoren wie z.B. Vorerkrankungsraten an kardiovaskulären Erkrankungen unterscheiden sich ebenfalls zwischen den Geschlechtern und bekräftigen die Bedeutung der Betrachtung von Geschlechtsanteilen bei Aussagen zu klinischen Verläufen⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾.

Neben dem Geschlecht, den klinischen Umständen und Vorerkrankungen muss die Testpopulation an sich als Einflussfaktor betrachtet werden. Es konnten nur HLA-Allele untersucht werden, welche bei der untersuchten Gruppe mit einer Allelfrequenz von Mindestens 5% vorkommen. Die Allelfrequenz von dem HLA-Allel-C*04:01 liegt in Deutschland bei ca. 13%, der Schweiz ca. 16% und Spanien ca. 15%. In Teilen von China liegt die Allelfrequenz bei 6%. Für Einwohner in Deutschland türkischer Ethnizität, wurde die Allelfrequenz mit bis zu 19% beschrieben⁽¹¹³⁾. Die Allelfrequenz ist ein entscheidendes Maß, da diese eine Gewichtung für die Relevanz der hier beschriebenen Aussagen darstellt.

Bisherige Studien haben unterschiedliche HLA-Risikoallele identifiziert, während manche Studien keine Assoziation von HLA-Allelen mit klinischem Verlauf identifizieren konnten⁽¹¹⁴⁻¹¹⁸⁾. Für die Erfassung der Fragestellung wurden dabei unterschiedliche Methoden wie Genome Wide Association Studies (GWAS) und HLA-Typisierungen genutzt. Die unterschiedliche Methodik könnte zu heterogenen Ergebnissen beitragen. Das hier beschriebene HLA-Allel C*04:01 wurde wenige Monate nach der Publikation der Daten⁽¹⁰⁷⁾ in weiteren Studien als potenzieller Risikofaktor reproduziert^(117, 119). Die Vermutung über eine Risikoveränderung durch den Trägerstatus von HLA-C*04:01 war hierbei bereits in einer sardinischen randomisiert kontrollierten Studie (RCT) Ende 2020 geäußert worden. Eine höhere Frequenz von HLA-C*04:01 in COVID-19 Fällen wurde beschrieben. Eine Bezugnahme zur Schwere des klinischen Verlaufes erfolgte hierbei nicht⁽¹¹⁸⁾.

Hovhannisyan et al.⁽¹¹⁷⁾ reproduzierten an einer Kohorte aus armenischen Patient*innen HLA-C*04:01 als Risikoallel für einen schweren COVID-19 Verlauf. Als schwerer COVID-19 Verlauf wurde hierbei die Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Behandlung und/oder Sauerstoffgabe und/oder Ventilation definiert. Es wurden 299 COVID-19 Patient*innen mit 2 781 Kontrollen verglichen. 122 Patient*innen gehörten zur Gruppe mit schwerem klinischem Verlauf. Es konnte eine zur vorliegenden Arbeit vergleichbare signifikante ($p < 0.021$) Odds Ratio von 1.73 (95% Konfidenzintervall 1.20-2.39) ermittelt werden. Zudem wurde in der gesunden Kohorte HLA-C*04:01 signifikant seltener detektiert. Die in Abschnitt 4.7 beschriebene Risikoerhöhung für eine Infektion mit SARS-CoV-2 bei HLA-C*04:01 Trägern fand sich in der Studie von Hovhannisyan et al. wieder. Das genaueste Modell zur Unterscheidung von symptomatischen und asymptomatischen COVID-19 Infektionen enthielt die Variablen: Alter, Geschlecht, Alter-Geschlecht Interaktion und HLA-C*04:01 Status. Vor allem weibliches Geschlecht und hohes

Alter (>65 Jahre) in Kombination mit HLA-C*04:01 schien einen schwereren klinischen Verlauf zu begünstigen. Bei Männern war der Effekt schwächer ausgeprägt. Zusätzlich konnte in dieser Studie HLA-B*51:01 als protektiver Faktor gegen einen schweren COVID-19 Verlauf identifiziert werden.

Diese Daten stehen im Kontrast zu Datensatz 2 welcher einen höheren Frauenanteil hatte und gleichzeitig einen besseren klinischen Verlauf (niedrige Mortalität, Intubations- und Intensivaufnahmerate). In DS2 waren HLA-C*04:01 positive Frauen deutlich jünger mit 51 Lebensjahren (Median), wohingegen HLA-C*04:01 positive Männer mit 60 Lebensjahren (Median) älter waren. Die Risikokonstellation von HLA-C*04:01 positivem Trägerstatus, hohem Alter (>65 Jahre) und weiblichem Geschlecht war somit nicht mehr gegeben, weswegen die Risikoerhöhung ausgeblieben sein könnte.

Ellinghaus et. al.⁽¹¹⁶⁾ hat in seiner Untersuchung von 1 610 SARS-CoV-2 Infizierten in Italien und Spanien eine genomweite Assoziationsstudie durchgeführt und dabei keine signifikanten ($P < 1 \times 10^{-5}$) Einzelnukleotidpolymorphismen gefunden. Diese Publikation steht im Gegensatz zu anderen Publikationen^(114, 116, 117, 119), welche unterschiedliche HLA-Risikoallele z.B. HLA-DRB1*15:01, HLA-DQB1*06:02, HLA-B*27:07 aufführten. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz ist die unterschiedliche Definition des Signifikanzniveaus. Aufgrund der Anzahl der getesteten Variablen bei der Methode von genomweiten Assoziationsstudien ist das Signifikanzniveau deutlich niedriger gewählt als bei Datensätzen mit deutlich kleinerer Menge an getesteten Variablen. Unter Umständen ist eine HLA-Assoziation, welche Einfluss auf eine SARS-CoV-2 Infektion hat, nicht häufig genug in einer Population vertreten, sodass diese in einer GWAS nicht als signifikant erkannt wird. Trotzdem liefert GWAS Studien wie die von Ellinghaus et. al.⁽¹¹⁶⁾ einen Hinweis, dass einzelne HLA-Allele nicht die einzigen bzw. führenden Einflüsse im klinischen Verlauf von SARS-CoV-2 darstellen könnten.

In der Arbeit von Novelli et al.⁽¹¹⁶⁾ wurde ein Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit für eine SARS-CoV-2 Infektion in Italien an einer Kohorte von 99 Infizierten und 1 017 Kontrollen beschrieben. Hierbei wurde festgestellt, dass bestimmte Haplotypen mit den HLA-Allelen HLA-DRB1*15:01, HLA-DQB1*06:02 und HLA-B*27:07 ein erhöhtes Risiko für einen schweren SARS-CoV-2 Verlauf haben. Das häufigere Vorkommen dieser Haplotypen in bestimmten geografischen Gebieten liefert mögliche Erklärungen für lokale Hotspots mit schweren klinischen Verläufen.

Das HLA-Allel-C*04:01 ist hierbei mit einer Frequenz von 19,70% vorgekommen und ergab keine signifikante Assoziation. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Einteilung der Testgruppen. Es wurden Patient*innen betrachtet welche einen schweren Verlauf, d.h. Notwendigkeit einer nichtinvasiven Ventilation (Beatmung mit continuous positive airway pressure) und einem sehr schweren Verlauf, d.h. Notwendigkeit einer invasiven Beatmung (Intubation, Tracheotomie) zeigten. Hierbei ist anzumerken, dass die Wahl der Beatmungsmethode sowohl von unterschiedlichen Verfahrensanweisungen/Leitlinien wie auch der individuellen klinischen Situation des/der Patient*in und Erfahrung des behandelnden Arztes abhängt. Neben der kleinen Studienkohorte ist dies ein möglicher Grund für unterschiedliche Ergebnisse.

Eine weitere Arbeit aus China von Wang und Kollegen⁽¹¹⁴⁾ verglich 82 Infizierte mit 3 548 HLA-typisierten Kontrollen. Ziel der Arbeit war es ein HLA-Risikoallele für eine SARS-CoV-2 Infektion zu identifizieren. In der Arbeit kommen die Autoren zu dem Ergebnis, dass HLA-C*07:29 und HLA-B*15:27 mit COVID-19 assoziiert sein könnten. Das Allel HLA-C*07:2 war jedoch nur 1-mal in der Kohorte vertreten und ist somit vorsichtig zu interpretieren, darauf wird in der Publikation hingewiesen. HLA-B*15:27 kam insgesamt 8-mal in der Kohorte vor und stellt mit einer Frequenz von 4,8% und einem p-Wert $< 0,001$ ein belastbares Ergebnis dar. Das HLA-Allel-C*04:01 kam mit einer Frequenz von 8,54% in der COVID-19 Gruppe vor und 5,49% in der Kontrollgruppe und ergab kein signifikantes Ergebnis ($p=0,132$).

Zusammenfassend kann berichtet werden, dass die Datenlage zur Rolle von HLA-Allelen bei der Infektion und dem Einfluss auf den klinischen Verlauf sehr heterogen ist. Eine große Kohorte mit homogener ethnischer Struktur wäre notwendig, um belastbare Ergebnisse zu erzielen. Somit ähnelt SARS-CoV-2 seinem Vorgänger SARS-CoV-1 bei welchem ebenfalls in einigen Studien potenzielle Risikoallele identifiziert werden konnten, die Studienergebnisse jedoch sehr heterogen waren wie die Übersichtsarbeit von Yuan et. al.⁽¹²⁰⁾ gezeigt hat.

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen HLA-C*04:01 und dem Ereignis Intubation gefunden werden, jedoch kann das HLA-Allel nicht alleinig für einen derart schweren klinischen Verlauf verantwortlich gemacht werden. Obwohl der Anteil an intubierten Patient*innen in der Gruppe von HLA-C*04:01 positiven Patient*innen deutlich größer war als in der Gruppe ohne betreffendes HLA-Gen (40,4% und 26,4%) sind 59,6% der Patient*innen welche das HLA-C*04:01 Allel trugen nicht intubiert worden. Trotzdem scheint das Ergebnis zumindest teilweise Relevanz zu besitzen da es in mehreren GWAS validiert werden konnte, welche mit der Methodik dieser Arbeit vergleichbar sind ($I^2=0\%$ für Schwere des klinischen Verlaufes). Die

signifikante Korrelation mit der steigenden Höhe des Laborparameters C-reaktives Protein ist ebenfalls ein Hinweis für einen schweren Verlauf bei Allelträgern. Ob die Anzahl an Allelen eine Rolle für den klinischen Verlauf spielt (heterozygote vs. homozygote Träger) konnte aufgrund der sehr kleinen Anzahl an homozygoten Allelträgern nicht untersucht werden.

Die Daten weisen darauf hin, dass das HLA-System eine wichtige Rolle im klinischen Verlauf spielt oder ein direkter Surrogatparameter für einen bis dato unbekanntem Einflussfaktor ist.

Das HLA-Allel-C*04:01 ist bereits bekannt für seine Rolle beim Humanen Immundefizienz Virus (HIV). Hierbei wird das Vorliegen von HLA-C*04:01 mit einer hohen Viruslast und einer schlechten Krankheitskontrolle (therapieresistente Suppression der Viruslast) assoziiert. Das Allel ist mit einer beschleunigten Entwicklung von AIDS definierenden Erkrankungen in der kaukasischen Bevölkerung verbunden ⁽¹²¹⁾. Dieser Effekt wird bei dem Vorliegen des dazugehörigen Killerzellliganden KIR2DS4f zusätzlich noch verstärkt wie in der Arbeit von Olvera et al.⁽⁸³⁾ gezeigt werden konnte. Wobei dieser Effekt bei der Vererbung im Sinne eines Haplotypen mit anderen HLA-Allelen zunimmt, welche ebenfalls ein additives Risiko für eine schwer verlaufende HIV-Infektion darstellen. Der Effekt der Risikoerhöhung durch das Vorliegen des Killerzellliganden KIR2DS4f konnte bei SARS-CoV-2 nicht untersucht werden. Die Zahl an Patient*innen welche KIR2DS4f aufwiesen (n=4) war zu gering, sodass keine statistische Testung möglich war.

In dieser Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen der Viruslast im Nasopharyngealabstrich und klinischen Parametern nicht bestätigt werden. Dieser Aspekt ist jedoch nicht eindeutig belastbar, da sowohl technische Einflussfaktoren wie Genauigkeit der Abstrichentnahme und Entnahmemedium z.B. Tupferart, wie auch patientenindividuelle Faktoren wie die Krankheitsphase unbekannte Einflüsse auf das Ergebnis haben könnten.

Wie in der Arbeit von Singanayagam et al. ⁽¹²²⁾gezeigt, verändert sich die Konzentration von SARS-CoV-2 Viren im Nasopharyngealabstrich abhängig von der Dauer der Erkrankung. Die in Datensatz 1 gemessenen Viruskonzentrationen waren möglicherweise von Patient*innen zu einem Zeitpunkt entnommen, zu welchem nicht mehr das Maximum ihrer Viruskonzentration vorlag, da der Zeitpunkt der Probenentnahme nicht standardisiert war. Die Immunantwort könnte bereits eingesetzt haben, wodurch ein Abfall der Viruslast begann. Der Entnahmezeitpunkt war nicht in allen Fällen klar zuzuordnen. Prinzipiell konnte in der Literatur eine höhere Viruslast mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert werden. Das Team von Liu et al. ⁽¹²³⁾ beschrieb in ihrer Arbeit von 76 COVID-19 Patient*innen aus Nanchang, China, eine 60-fach höhere Viruslast bei

schweren klinischen Verläufen (respiratorische Erschöpfung, periphere Sauerstoffsättigung unter 93%, Horowitz Index unter 300 mmHg) im Vergleich zu milden Verläufen. Die Viruslast scheint nach den Analysen aus Abschnitt 4.6 ein unabhängiger Faktor für einen schlechten Verlauf zu sein, der nicht primär im HLA-Typ des/der Patient*innen begründet ist, sofern die Abstrichdaten als belastbar angesehen werden. Zu einer möglichen höheren maximalen Viruskonzentration bei HLA-C*04:01 Trägern kann im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden.

In der Affinitätsanalyse zeigte sich, dass HLA-C*04:01 eine der niedrigsten Bindungsaffinitäten unter den HLA-Allelen zu SARS-CoV-2 Peptiden hatte. Dies könnte einen möglichen Hinweis auf einen pathologischen Zusammenhang liefern. Der HLA-Lokus-C ist Bestandteil der HLA-Gen Klasse 1, welche für die MHC Typ 1 Moleküle codiert. Diese fast ubiquitär vorkommenden Rezeptoren sind eine essenzielle Verbindungsstelle für die erworbene Immunantwort, v.a. für die T-Killerzellen (CD-8 positive T-Zellen). T-Killerzellen sind maßgeblich an der Abwehr intrazellulärer, d.h. auch viraler Erreger wie SARS-CoV-2, beteiligt. Sie sind in der Lage befallene Zellen direkt zu lysieren und somit potenzielle Pathogene zu eliminieren ⁽⁷¹⁾. Eine niedrige Bindungsaffinität könnte mit einer niedrigen Präsentationsfähigkeit für das betroffene Antigen zusammenhängen, wodurch eine adäquate Immunantwort ausbleiben würde.

In der Arbeit von Iturrieta-Zuazo et al.⁽¹²⁴⁾ wurden 66 verschiedene HLA-Klasse 1 Allele auf ihre Affinität zu Peptiden von SARS-CoV-2 und deren Assoziation mit der Schwere des klinischen Verlaufes untersucht. Insgesamt wurden in der spanischen Studie 45 Patient*innen in die Kohorte eingeschlossen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen einem milden klinischen Verlauf und einer hohen Anzahl durch HLA-Rezeptoren gebundener SARS-CoV-2 Peptide. Die Assoziation mit spezifischen Loci und Genotypen zeigte keine signifikanten Ergebnisse, dennoch postulieren die Autoren einen möglichen Trend in ihren Daten. Das in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehende HLA-Allel-C*04:01 war in der Studie mit n=7 vertreten und zeigte ebenfalls eine niedrige Bindungsaffinität zu SARS-CoV-2 Peptiden. Weitere Studien in Bezug auf die prognostische Bedeutung der Fähigkeit Peptide von SARS-CoV-2 durch HLA-Allele zu binden sind notwendig. Ein Zusammenhang kann vermutet werden, da bereits bei anderen Viren z.B. Gelbfieber und dem Dengue Virus bekannt ist, dass die HLA-Bindungsaffinität eine Relevanz für den klinischen Verlauf hat⁽¹²⁵⁾.

5.2 Diskussion von HLA-Allelen und GWAS-Studien

Die signifikante Assoziation zwischen dem HLA-Allel-C*04:01 und einem erhöhten Infektionsrisiko stellt einen wichtigen Anhaltspunkt für die Bedeutung der HLA-Allele dar. Eine erfolgreiche Infektion und Ausbreitung des Virus stellt die obligatorische Grundlage für einen

schweren klinischen Verlauf dar. Es ist unklar, welcher Pathomechanismus hinter den in der Literatur sehr unterschiedlich beschriebenen HLA-Risikoallelen für eine Sars-CoV-2 Infektion steckt. Ein Einfluss von HLA-Allelen auf das Risikoprofil und die Immunabwehr bei SARS-CoV-2 Infektionen als eine der zentralen genetischen Instanzen des Immunsystems wird jedoch angenommen^(126, 127).

Mithilfe der Arbeit von Pairo-Cataneira et al. ⁽¹⁰⁵⁾ und den in seiner Arbeit gefundenen Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) konnte mit dem SNP im CCHCR1-Gen (SNP: rs143334143) ein Indikator für das Vorliegen des HLA-C*04:01 Allels gefunden werden. Das SNP wurde hierbei durch Pairo-Cataneira et al. als zweitschwerstes SNP identifiziert, welches mit einem schweren COVID-19 Verlauf assoziiert ist. Das Gen „Coiled-Coil alpha-Helical Rod protein 1“ (CCHCR1) befindet sich auf dem Chromosom 6, wie auch die meisten HLA-Gene und ist ein codierendes Gen⁽¹²⁸⁾.

In vergangenen Arbeiten konnten mit dem CCHCR1 Gen zahlreiche Funktionen assoziiert werden. Es ist an der Regulation des Zytoskeletts, von „Adherens“- und „Tight-Junctions“ beteiligt und steht in enger Beziehung zur Differenzierung der Keratinozyten. Es befindet sich innerhalb des Major Psoriasis Susceptibility Locus (PSORS1) und stellt einen Einflussfaktor auf den Krankheitsverlauf und die Krankheitsentwicklung der Psoriasis dar ^(129, 130).

In der Arbeit von Gandhi et al. „Psoriasis-associated genetic polymorphism in North Indian population in the CCHCR1 gene and in a genomic segment flanking the HLA-C region“ ⁽¹³¹⁾ wird außerdem eine enge Beziehung zwischen Polymorphismen des CCHCR1 Gens und Genen/Allelen des HLA-C Locus beschrieben. Diese bereits bekannte Beziehung bei dem Krankheitsbild der Psoriasis bestätigt die tatsächliche Existenz der Möglichkeit einer haplotypischen Vererbung des HLA-C*04:01 Allels mit einem Polymorphismus des CCHCR1 Genes und einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei SARS-CoV-2.

In diesem Fall stellt sich jedoch die Frage welches Gen bzw. Allel die pathomechanistische Ursache darstellt und welches Gen nur ein Indikator oder „Bystander“ hiervon ist. Das HLA-System steht in direkter Beziehung zum Immunsystem und legt somit die Vermutung nahe, dass es sich bei den identifizierten HLA-Risikoallelen eher um den ursächlichen genetischen Faktor handelt, und der CCHCR1 Polymorphismus am ehesten ein assoziierter „Bystander“ ist.

Das als Indikator für HLA-C*04:01 identifizierte SNP rs5010528 ist in der Literatur wenig vorbeschrieben und steht bis dato in keinem Zusammenhang zu COVID-19. Das SNP wird in

Zusammenhang mit toxischer epidermaler Nekrolyse oder Nepavirin-Hypersensitivität bei HIV-Patient*innen in Zusammenhang gebracht. Es scheint im engen Zusammenhang zum HLA-System v.a. zum Isotyp C zu stehen.

5.3 Fazit und Einordnung der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigte sich mit genetischen Risikofaktoren für einen schweren klinischen Verlauf, d.h. Notwendigkeit einer invasiven Beatmung (Intubation) oder einer intensivmedizinischen Therapie bei SARS-CoV-2 Infektionen. Der Bearbeitungszeitraum dieses Projektes begann im März 2020 als noch keine genauen Daten über genetische Risikokonstellationen bekannt waren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für das HLA-Klasse I Allel im Locus C*04:01 auf Chromosom 6 ein signifikanter Zusammenhang zum schweren klinischen Verlauf, d.h. Notwendigkeit einer invasiven Beatmung (Intubation), nachgewiesen werden. Es wurden insgesamt 435 Patient*innen eingeschlossen.

Mit Abschluss dieser Arbeit (Mitte 2021) reihen sich die hier dargestellten Ergebnisse in einen größeren Zusammenhang mit bereits publizierten großen GWAS Studien (siehe Abschnitt 5, Diskussion) ein und tragen somit bei den Pathomechanismus und die Entstehung von individuellen Risikokonstellationen besser zu verstehen.

Ein direkter Zusammenhang des HLA-Systems mit der Viruskonzentration eines nasopharyngealen Abstriches, der Herkunft/Ethnizität der Patient*innen oder der Bindungsaffinität und dem klinischen Verlauf konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

5.4 Stärken und Limitationen der Arbeit

Diese Arbeit analysierte mehrere hundert Patient*innen und stellt somit ein breites Spektrum an klinischen Verläufen bei COVID-19 in einer breiten Patientenpopulation dar. Die unterschiedliche Herkunft der Proben in der initialen Analyse (Deutschland, Spanien, Schweiz) ermöglichte auch ein breites genetisches Spektrum. Durch die Unterrepräsentation von spezifischen HLA-Allelen konnte deren Einfluss nicht untersucht werden. Um die für eine Allelanalyse geringe Patientenzahl zu kompensieren, wurde die Bedingung gesetzt, dass die Allelfrequenz mindestens 5% betragen muss und 5 Allelträger in der Gesamtkohorte vorhanden sein müssen. Diese Grenzsetzung, sowie das festgelegte Signifikanzlevel von 5% stellen selbstverständlich potenzielle Einschränkungen dar. Vor allem sehr selten vertretene Allele könnten in ihrer Bedeutung unterschätzt werden.

Die Studie für dieses Projekt begann im März 2020 zu einem Zeitpunkt zu welchem medizinische und personelle Ressourcen sich weltweit auf die akute Patientenversorgung oder deren Vorbereitung konzentrierten. Um Daten zu gewinnen und Erkenntnisse zu ermöglichen musste zeitnah ein Studienkonzept aufgestellt und umgesetzt werden. Aufgrund der dynamischen Lage war es nicht überall möglich alle wünschenswerten Daten zu erheben, sodass die Analysen schlussendlich auf den tatsächlich vorhandenen Datensatz angepasst werden mussten.

Durch die multizentrische Rekrutierung waren die biologischen Proben unterschiedlichen Bedingungen und Transportwegen ausgesetzt. Verschiedene Probentypen (Vollblut, Buffy Coats und PBMCs) ermöglichten einerseits eine sicherere genetische Grundlage, da ein „Escapephänomen“ durch die Wahl des Mediums unwahrscheinlicher wurde, gleichzeitig trugen sie zu einer möglichen heterogenen Variable bei. Eine Vorbestimmung des Probentyps hätte gleichzeitig den Verlust von zahlreichen Patient*innen bedeutet, da die Partnerzentren vor Initiierung dieser Studie bereits mit der Probensammlung begonnen hatten⁽¹³²⁾.

Die notwendigen Mindestvolumina für die HLA-Typisierung und Exomsequenzierung bewirkte eine geringe Reduktion der Patientenzahl (7 Patient*innen). Eine bei diesen 7 Patient*innen vorliegende schwere Leukozytopenie erklärt am ehesten die niedrige Konzentration der extrahierten DNA.

Nicht zuletzt stellen die teilnehmenden Kliniken einen relevanten Einflussfaktor dar. Abhängig von dem Versorgungslevel der Klinik (periphere Klinik vs. Maximalversorger) sind unterschiedliche Anteile an klinischen Verläufen in den jeweiligen Zentren vertreten.

Der Vergleich mit anderen Studien birgt ebenfalls teilweise Risiken aufgrund von verschiedenen Testkohorten. In vielen Studien wird der Vergleich zwischen COVID-19 Patient*innen und gesunden Proband*innen beschrieben. In dieser Arbeit wurden COVID-19 Patient*innen in Bezug auf klinischen Verlauf miteinander verglichen.

6. Anhang

Folgende Kategorien wurden im Rahmen der Studie erhoben:

- Allgemeine Daten: Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, BMI
- Symptombeginn-Datum, Vorstellungsdatum, Hospitalisierung, Dauer der Hospitalisierung
- Vorerkrankungen und Risikofaktoren (Diabetes, Hypertonie, Koronare Herzkrankheit, Nikotinabusus, chronische Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Immunsuppression)
- Klinischer Verlauf (Intensivmedizinische Therapie, Intubation, Tod)
- Laborparameter (Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten, Lymphozyten, Procalcitonin, CRP, Troponin T/I, Troponin T/I Maximalwert, Myoglobin, Kreatinkinase)
- COVID-19 spezifische Daten (Nachweismethode, Nachweisergebnis, Antikörpertests, WHO-Score).

7. Literaturverzeichnis

1. Jordan Rachel E, Adab Peymane, Cheng K K. Covid-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ*. 2020;368:m1198.
2. (WHO) World-Health-Organization. Pneumonia of unknown cause – China WHO Webseite 05.01.2020 [zitiert 29.09.2020]. Aufrufbar unter URL: <https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unkown-cause-china/en/>.
3. [Expert consensus on preventing nosocomial transmission during respiratory care for critically ill patients infected by 2019 novel coronavirus pneumonia]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*. 2020;17(0):E020.
4. Khafaie M. A., Rahim F. Cross-Country Comparison of Case Fatality Rates of COVID-19/SARS-COV-2. *Osong Public Health Res Perspect*. 2020;11(2):74-80.
5. Zheng Z., Peng F., Xu B., Zhao J., Liu H., Peng J., Li Q., Jiang C., Zhou Y., Liu S., Ye C., Zhang P., Xing Y., Guo H., Tang W. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J Infect*. 2020;81(2):e16-e25.
6. Hossein Teimouri Amirhosein Maali Single-Nucleotide Polymorphisms in Host Pattern-Recognition Receptors Show Association with Antiviral Responses against SARS-CoV-2, in-silico Trial. *JoMMID* 2020.
7. Kaniyala Melanthota S., Banik S., Chakraborty I., Pallen S., Gopal D., Chakrabarti S., Mazumder N. Elucidating the microscopic and computational techniques to study the structure and pathology of SARS-CoVs. *Microsc Res Tech*. 2020.
8. Chen L., Liu W., Zhang Q., Xu K., Ye G., Wu W., Sun Z., Liu F., Wu K., Zhong B., Mei Y., Zhang W., Chen Y., Li Y., Shi M., Lan K., Liu Y. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):313-9.
9. Machhi J., Herskovitz J., Senan A. M., Dutta D., Nath B., Oleynikov M. D., Blomberg W. R., Meigs D. D., Hasan M., Patel M., Kline P., Chang R. C., Chang L., Gendelman H. E., Kevadiya B. D. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2020;15(3):359-86.
10. Zhang Linlin, Lin Daizong, Sun Xinyuanyuan, Curth Ute, Drosten Christian, Sauerhering Lucie, Becker Stephan, Rox Katharina, Hilgenfeld Rolf. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020;368(6489):409-12.
11. Robert Koch-Institut. Virologische Basisdaten, SARS-CoV-2 Robert Koch Institut Webseite2020 [zitiert 29.09.2020]. Aufrufbar unter URL: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virologische_Basisdaten.html.
12. Dong M., Zhang J., Ma X., Tan J., Chen L., Liu S., Xin Y., Zhuang L. ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. *Biomed Pharmacother*. 2020;131:110678.

13. Verdecchia P., Cavallini C., Spanevello A., Angeli F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur J Intern Med.* 2020;76:14-20.
14. Wang Ke, Chen Wei, Zhou Yu-Sen, Lian Jian-Qi, Zhang Zheng, Du Peng, Gong Li, Zhang Yang, Cui Hong-Yong, Geng Jie-Jie. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *BioRxiv.* 2020.
15. Kubina R., Dziedzic A. Molecular and Serological Tests for COVID-19 a Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. *Diagnostics (Basel, Switzerland).* 2020;10(6).
16. Abdollahi A., Shakoory A., Khoshnevis H., Arabzadeh M., Dehghan Manshadi S. A., Mohammadnejad E., Ghasemi D., Safari Aboksari M., Alizadeh S., Mehrtash V., Eftekhari-Javadi A., Safaei M. Comparison of Patient-collected and Lab Technician-collected Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabs for Detection of COVID-19 by RT-PCR. *Iranian journal of pathology.* 2020;15(4):313-9.
17. Lanser Lukas, Bellmann-Weiler Rosa, Öttl Karla-Wanda, Huber Lukas, Griesmacher Andrea, Theurl Igor, Weiss Günter. Evaluating the clinical utility and sensitivity of SARS-CoV-2 antigen testing in relation to RT-PCR Ct values. *Infection.* 2021;49(3):555-7.
18. Mak Gannon C. K., Cheng Peter K. C., Lau Stephen S. Y., Wong Kitty K. Y., Lau C. S., Lam Edman T. K., Chan Rickjason C. W., Tsang Dominic N. C. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *Journal of Clinical Virology.* 2020;129:104500.
19. Wang Y., Wang Y., Chen Y., Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *Journal of medical virology.* 2020;92(6):568-76.
20. Li P., Fu J. B., Li K. F., Liu J. N., Wang H. L., Liu L. J., Chen Y., Zhang Y. L., Liu S. L., Tang A., Tong Z. D., Yan J. B. Transmission of COVID-19 in the terminal stages of the incubation period: A familial cluster. *Int J Infect Dis.* 2020;96:452-3.
21. He X., Lau E. H. Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., Lau Y. C., Wong J. Y., Guan Y., Tan X., Mo X., Chen Y., Liao B., Chen W., Hu F., Zhang Q., Zhong M., Wu Y., Zhao L., Zhang F., Cowling B. J., Li F., Leung G. M. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature medicine.* 2020;26(5):672-5.
22. Hemmer C. J., Geerdes-Fenge H. F., Reisinger E. C. [COVID-19: epidemiology and clinical facts]. *Der Radiologe.* 2020;60(10):893-8.
23. Rahman H. S., Aziz M. S., Hussein R. H., Othman H. H., Salih Omer S. H., Khalid E. S., Abdulrahman N. A., Amin K., Abdullah R. The transmission modes and sources of COVID-19: A systematic review. 2020;26:125-36.
24. Chu Derek K., Akl Elie A., Duda Stephanie, Solo Karla, Yaacoub Sally, Schünemann Holger J., Chu Derek K., Akl Elie A., El-harakeh Amena, Bognanni Antonio, Lotfi Tamara, Loeb Mark, Hajizadeh Anisa, Bak Anna, Izcovich Ariel, Cuello-Garcia Carlos A., Chen Chen, Harris David J., Borowiack Ewa, Chamseddine Fatimah, Schünemann Finn, Morgano Gian Paolo, Muti Schünemann Giovanna E. U., Chen Guang, Zhao Hong, Neumann Ignacio, Chan Jeffrey, Khabsa Joanne, Hneiny Layal, Harrison Leila, Smith Maureen, Rizk Nesrine, Giorgi

Rossi Paolo, AbiHanna Pierre, El-khoury Rayane, Stalteri Rosa, Baldeh Tejan, Piggott Thomas, Zhang Yuan, Saad Zahra, Khamis Assem, Reinap Marge, Duda Stephanie, Solo Karla, Yaacoub Sally, Schünemann Holger J. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2020;395(10242):1973-87.

25. Krishan K., Kanchan T. Aerosol and surface persistence: Novel SARS-CoV-2 versus other coronaviruses. *J Infect Dev Ctries*. 2020;14(7):748-9.

26. Smither S. J., Eastaugh L. S., Findlay J. S., Lever M. S. Experimental aerosol survival of SARS-CoV-2 in artificial saliva and tissue culture media at medium and high humidity. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):1415-7.

27. Stopsack K. H., Mucci L. A., Antonarakis E. S., Nelson P. S., Kantoff P. W. TMPRSS2 and COVID-19: Serendipity or Opportunity for Intervention? *Cancer Discov*. 2020;10(6):779-82.

28. van der Made C. I., Simons A., Schuurs-Hoeijmakers J., van den Heuvel G., Mantere T., Kersten S., van Deuren R. C., Steehouwer M., van Reijmersdal S. V., Jaeger M., Hofste T., Astuti G., Corominas Galbany J., van der Schoot V., van der Hoeven H., Hagmolen Of Ten Have W., Klijn E., van den Meer C., Fiddelaers J., de Mast Q., Bleeker-Rovers C. P., Joosten L. A. B., Yntema H. G., Gilissen C., Nelen M., van der Meer J. W. M., Brunner H. G., Netea M. G., van de Veerdonk F. L., Hoischen A. Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA*. 2020.

29. To Kelvin Kai-Wang, Hung Ivan Fan-Ngai, Chan Kwok-Hung, Yuan Shuofeng, To Wing-Kin, Tsang Dominic Ngai-Chong, Cheng Vincent Chi-Chung, Chen Zhiwei, Kok Kin-Hang, Yuen Kwok-Yung. Serum antibody profile of a patient with COVID-19 reinfection. *Clinical Infectious Diseases*. 2020.

30. Bonifácio L. P., Pereira A. P. S., Araújo Dca, Balbão Vdmp, Fonseca Bald, Passos A. D. C., Bellissimo-Rodrigues F. Are SARS-CoV-2 reinfection and Covid-19 recurrence possible? a case report from Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2020;53:e20200619.

31. Diriba K., Awulachew E., Getu E. The effect of coronavirus infection (SARS-CoV-2, MERS-CoV, and SARS-CoV) during pregnancy and the possibility of vertical maternal-fetal transmission: a systematic review and meta-analysis. *European journal of medical research*. 2020;25(1):39.

32. Bhattacharya Kaushik, Bhattacharya Neela, Bhattacharya Aditya Shikar. The Discovery of Coronavirus – An Interesting Journey. *Galician Medical Journal*. 2021;28(3):E202131.

33. Ziebuhr J. Coronaviren. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2016:479-82.

34. Corman V. M., Lienau J., Witzenthat M. [Coronaviruses as the cause of respiratory infections]. *Der Internist*. 2019;60(11):1136-45.

35. Shaman J., Morita H., Birger R., Boyle M., Comito D., Lane B., Ligon C., Smith H., Desalle R., Planet P. Asymptomatic Summertime Shedding of Respiratory Viruses. *The Journal of infectious diseases*. 2018;217(7):1074-7.

36. Eichenberger E. M., Soave R., Zappetti D., Small C. B., Shore T., van Besien K., Douglass C., Westblade L. F., Satlin M. J. Incidence, significance, and persistence of human coronavirus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone marrow transplantation*. 2019;54(7):1058-66.
37. Hufert F., Spiegel M. [Coronavirus: from common cold to severe pulmonary failure]. *Monatsschrift Kinderheilkunde : Organ der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde*. 2020:1-11.
38. (WHO) World-Health-Organization. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. 29.09.2003.
39. Zaki A. M., van Boheemen S., Bestebroer T. M., Osterhaus A. D., Fouchier R. A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1814-20.
40. (WHO) World-Health-Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) WHO Webseite: WHO 2019 [zitiert 29.09.2020]. Aufrufbar unter URL: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>.
41. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W. J., Wang D., Xu W., Holmes E. C., Gao G. F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-74.
42. Volz Erik, Baguelin Marc, Bhatia Sangeeta, Boonyasiri Adhiratha, Cori Anne, Cucunubá Zulma, Cuomo-Dannenburg Gina, Donnelly Christl A, Dorigatti Ilaria, FitzJohn Rich. Report 5: phylogenetic analysis of SARS-CoV-2. Imperial College London COVID-19 Response Team. 2020.
43. Malik Y. A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*. 2020;42(1):3-11.
44. Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2020;81:104260.
45. Korber B., Fischer W. M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Hengartner N., Giorgi E. E., Bhattacharya T., Foley B., Hastie K. M., Parker M. D., Partridge D. G., Evans C. M., Freeman T. M., de Silva T. I., McDanal C., Perez L. G., Tang H., Moon-Walker A., Whelan S. P., LaBranche C. C., Saphire E. O., Montefiori D. C. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. 2020;182(4):812-27.e19.
46. Du Na, Chen Haiying, Zhang Qing, Che Lihe, Lou Lixin, Li Xiaohua, Zhang Kaiyu, Bao Wanguo. A case series describing the epidemiology and clinical characteristics of COVID-19 infection in Jilin Province. *Virulence*. 2020;11(1):482-5.

47. Gao X., Yang D., Yuan Z., Zhang Y., Li H., Gao P., Liu X., Zhao W., Xiao T., Guan Y., Gao G., Duan X. Improving the early diagnosis of suspected patients with COVID-19: a retrospective study of 106 patients. *J Infect Dev Ctries.* 2020;14(6):547-53.
48. Yu C., Zhou M., Liu Y., Guo T., Ou C., Yang L., Li Y., Li D., Hu X., Shuai L., Wang B., Zou Z. Characteristics of asymptomatic COVID-19 infection and progression: A multicenter, retrospective study. *Virulence.* 2020;11(1):1006-14.
49. Olaniyan O. T., Dare A., Okotie G. E., Adetunji C. O., Ibitoye B. O., Bamidele O. J., Eweoya O. O. Testis and blood-testis barrier in Covid-19 infestation: role of angiotensin-converting enzyme 2 in male infertility. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology.* 2020.
50. Damiani S., Fiorentino M., De Palma A., Foschini M. P., Lazzarotto T., Gabrielli L., Viale P. L., Attard L., Riefolo M., D'Errico A. Pathological Post Mortem Findings in Lungs Infected With Sars-Cov 2. *The Journal of pathology.* 2020.
51. Wu Z., McGoogan J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *Jama.* 2020;323(13):1239-42.
52. Kumar Ashish, Arora Anil, Sharma Praveen, Anikhindi Shrihari Anil, Bansal Naresh, Singla Vikas, Khare Shivam, Srivastava Abhishyant. Clinical Features of COVID-19 and Factors Associated with Severe Clinical Course: A Systematic Review and Meta-Analysis. SSRN. 2020:3566166-.
53. Malik P., Patel U., Mehta D., Patel N., Kelkar R., Akrmah M., Gabrilove J. L., Sacks H. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. *BMJ evidence-based medicine.* 2020.
54. Danwang C., Endomba F. T., Nkeck J. R., Wouna D. L. A., Robert A., Noubiap J. J. A meta-analysis of potential biomarkers associated with severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Biomarker research.* 2020;8:37.
55. Robert Koch-Institut Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring. Täglicher Lagebericht des RKI zur Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) 05.06.2021. Webseite des RKI: Robert Koch-Institut; 2021.
56. van Tol Sophie, Mögling Ramona, Li Wentao, Godeke Gert-Jan, Swart Arno, Bergmans Barbara, Brandenburg Afke, Kremer Kristin, Murk Jean-Luc, van Beek Josine, Wintermans Bas, Reimerink Johan, Bosch Berend-Jan, Reusken Chantal. Accurate serology for SARS-CoV-2 and common human coronaviruses using a multiplex approach. *Emerging Microbes & Infections.* 2020;9(1):1965-73.
57. Liu X., Wang J., Xu X., Liao G., Chen Y., Hu C. H. Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1269-74.
58. Wang Pengfei, Liu Lihong, Nair Manoj S., Yin Michael T., Luo Yang, Wang Qian, Yuan Ting, Mori Kanako, Solis Axel Guzman, Yamashita Masahiro, Garg Ankur, Purpura Lawrence J., Laracy Justin C., Yu Jian, Joshua-Tor Leemor, Sodroski Joseph, Huang Yaoxing, Ho David

D. SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses are more robust in patients with severe disease. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):2091-3.

59. Talotta R., Robertson E. Autoimmunity as the comet tail of COVID-19 pandemic. *World journal of clinical cases*. 2020;8(17):3621-44.

60. Halpin S., O'Connor R., Sivan M. Long COVID and chronic COVID syndromes. *Journal of medical virology*. 2020.

61. Leung T. Y. M., Chan A. Y. L., Chan E. W., Chan V. K. Y., Chui C. S. L., Cowling B. J., Gao L., Ge M. Q., Hung I. F. N., Ip M. S. M., Ip P., Lau K. K., Lau C. S., Lau L. K. W., Leung W. K., Li X., Luo H., Man K. K. C., Ng V. W. S., Siu C. W., Wan E. Y. F., Wing Y. K., Wong C. S. M., Wong K. H. T., Wong I. C. K. Short- and potential long-term adverse health outcomes of COVID-19: a rapid review. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):2190-9.

62. De Sanctis P., Doneddu P. E., Viganò L., Selmi C., Nobile-Orazio E. Guillain-Barré syndrome associated with SARS-CoV-2 infection. A systematic review. *European journal of neurology*. 2020.

63. Galeotti Caroline, Bayry Jagadeesh. Autoimmune and inflammatory diseases following COVID-19. *Nature Reviews Rheumatology*. 2020;16(8):413-4.

64. Ahmed M., Advani S., Moreira A., Zoretic S., Martinez J., Chorath K., Acosta S., Naqvi R., Burmeister-Morton F., Burmeister F., Tarriela A., Petershack M., Evans M., Hoang A., Rajasekaran K., Ahuja S., Moreira A. Multisystem inflammatory syndrome in children: A systematic review. *EClinicalMedicine*. 2020;26:100527.

65. Guo Fei Ran. Smoking links to the severity of COVID-19: An update of a meta-analysis. *Journal of medical virology*. 2020;92(11):2304-5.

66. Banerjee Mithu, Gupta Shruti, Sharma Praveen, Shekhawat Jyoti, Gauba Kavya. Obesity and COVID-19: A Fatal Alliance. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2020;35(4):410-7.

67. Host Determinants in HIV Infection and Disease: Part 1: Cellular and Humoral Immune Responses*. *Annals of Internal Medicine*. 2001;134(9_Part_1):761-76.

68. Yazdanpanah F., Hamblin M. R., Rezaei N. The immune system and COVID-19: Friend or foe? *Life Sci*. 2020;256:117900.

69. Murphy Kenneth M. *Janeway Immunologie / Kenneth Murphy, Casey Weaver mit Beiträgen von Allan Mowat, Leslie Berg und David Chaplin aus dem Englischen übersetzt von Lothar Seidler*. In: Weaver Casey, Janeway Charles, Seidler Lothar, editors. *Janeway Immunologie*. 9. Auflage ed. Berlin, Germany: Berlin, Germany : Springer Spektrum; 2018. p. 3-639.

70. Lin M., Tseng H. K., Trejaut J. A., Lee H. L., Loo J. H., Chu C. C., Chen P. J., Su Y. W., Lim K. H., Tsai Z. U., Lin R. Y., Lin R. S., Huang C. H. Association of HLA class I with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *BMC medical genetics*. 2003;4:9.

71. Murphy Kenneth, Weaver Casey. *Die T-Zell-vermittelte Immunität*. *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 443-515.

72. Anthony-Nolan-Research-Institute HLA Informatics Group. Nomenclature for Factors of the HLA System [zitiert 05.06.2021]. Aufrufbar unter URL: <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>.
73. Marsh S. G. E. Nomenclature for factors of the HLA system, update January, February and March 2021. *International journal of immunogenetics*. 2021.
74. Graw Jochen. Verwertung genetischer Informationen. *Genetik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. p. 67-129.
75. Graw Jochen. Was ist Genetik? *Genetik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 1-20.
76. Graw Jochen. Molekulare Grundlagen der Vererbung. *Genetik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 21-53.
77. Arnemann J. Exom-Sequenzierung. In: Gressner Axel M., Arndt Torsten, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 829-30.
78. Arnemann J. Next-Generation-Sequencing (NGS). In: Gressner Axel M., Arndt Torsten, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 1746-7.
79. Zhu M., Zhao S. Candidate gene identification approach: progress and challenges. *International journal of biological sciences*. 2007;3(7):420-7.
80. Trowsdale J., Barten R., Haude A., Stewart C. A., Beck S., Wilson M. J. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunological reviews*. 2001;181:20-38.
81. Carrington M., Martin M. P. The Impact of Variation at the KIR Gene Cluster on Human Disease. In: Compans R. W., Cooper M. D., Honjo T., Koprowski H., Melchers F., Oldstone M. B. A., Olsnes S., Potter M., Vogt P. K., Wagner H., Vivier Eric, Colonna Marco, editors. *Immunobiology of Natural Killer Cell Receptors*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 225-57.
82. Slatkin M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature reviews Genetics*. 2008;9(6):477-85.
83. Olvera A., Perez-Alvarez S., Ibarrondo J., Ganoza C., Lama J. R., Lucchetti A., Cate S., Hildebrand W., Bernard N., Gomez L., Sanchez J., Brander C. The HLA-C*04: 01/KIR2DS4 gene combination and human leukocyte antigen alleles with high population frequency drive rate of HIV disease progression. *AIDS*. 2015;29(5):507-17.
84. Overmyer K. A., Shishkova E., Miller I. J., Balnis J., Bernstein M. N., Peters-Clarke T. M., Meyer J. G., Quan Q., Muehlbauer L. K., Trujillo E. A., He Y., Chopra A., Chieng H. C., Tiwari A., Judson M. A., Paulson B., Brademan D. R., Zhu Y., Serrano L. R., Linke V., Drake L. A., Adam A. P., Schwartz B. S., Singer H. A., Swanson S., Mosher D. F., Stewart R., Coon J. J.,

Jaitovich A. Large-Scale Multi-omic Analysis of COVID-19 Severity. *Cell systems*. 2021;12(1):23-40.e7.

85. Balnis J., Madrid A., Hogan K. J., Drake L. A., Chieng H. C., Tiwari A., Vincent C. E., Chopra A., Vincent P. A., Robek M. D., Singer H. A., Alisch R. S., Jaitovich A. Blood DNA methylation and COVID-19 outcomes. *Clinical epigenetics*. 2021;13(1):118.

86. Cook T. M., El-Boghdadly K., McGuire B., McNarry A. F., Patel A., Higgs A. Consensus guidelines for managing the airway in patients with COVID-19: Guidelines from the Difficult Airway Society, the Association of Anaesthetists the Intensive Care Society, the Faculty of Intensive Care Medicine and the Royal College of Anaesthetists. *Anaesthesia*. 2020;75(6):785-99.

87. Fichtner Falk, Laudi Sven, Stegemann Miriam, Weibel Stephanie. S3-Leitlinie-Empfehlungen zur stationären Therapie von Patienten mit COVID-19.

88. Kurth F., Roennefarth M., Thibeault C., Corman V. M., Muller-Redetzky H., Mittermaier M., Ruwwe-Glosenkamp C., Heim K. M., Krannich A., Zvorc S., Schmidt S., Kretzler L., Dang-Heine C., Rose M., Hummel M., Hocke A., Hubner R. H., Opitz B., Mall M. A., Rohmel J., Landmesser U., Pieske B., Knauss S., Endres M., Spranger J., Mockenhaupt F. P., Tacke F., Treskatsch S., Angermair S., Siegmund B., Spies C., Weber-Carstens S., Eckardt K. U., Schurmann D., Uhrig A., Stegemann M. S., Zoller T., Drosten C., Suttorp N., Witzernath M., Hippenstiel S., von Kalle C., Sander L. E. Studying the pathophysiology of coronavirus disease 2019: a protocol for the Berlin prospective COVID-19 patient cohort (Pa-COVID-19). *Infection*. 2020;48(4):619-26.

89. Szolek A. HLA Typing from Short-Read Sequencing Data with OptiType. *Methods Mol Biol*. 2018;1802:215-23.

90. Lê Sébastien, Josse Julie, Husson François. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*. 2008;025(i01).

91. Zheng X., Shen J., Cox C., Wakefield J. C., Ehm M. G., Nelson M. R., Weir B. S. HIBAG--HLA genotype imputation with attribute bagging. *Pharmacogenomics J*. 2014;14(2):192-200.

92. A. K. Rstatix. Rstatix: pipe-friendly framework for basic statistical tests. R package version 0.6. 0. 2020. [zitiert.

93. Orenbuch R., Filip I., Comito D., Shaman J., Pe'er I., Rabadan R. arcasHLA: high-resolution HLA typing from RNAseq. *Bioinformatics*. 2020;36(1):33-40.

94. Marshall John C., Murthy Srinivas, Diaz Janet, Adhikari N. K., Angus Derek C., Arabi Yaseen M., Baillie Kenneth, Bauer Michael, Berry Scott, Blackwood Bronagh, Bonten Marc, Bozza Fernando, Brunkhorst Frank, Cheng Allen, Clarke Mike, Dat Vu Quoc, de Jong Menno, Denholm Justin, Derde Lennie, Dunning Jake, Feng Xiaobin, Fletcher Tom, Foster Nadine, Fowler Rob, Gobat Nina, Gomersall Charles, Gordon Anthony, Glueck Thomas, Harhay Michael, Hodgson Carol, Horby Peter, Kim YaeJean, Kojan Richard, Kumar Bharath, Laffey John, Malvey Denis, Martin-Loeches Ignacio, McArthur Colin, McAuley Danny, McBride Stephen, McGuinness Shay, Merson Laura, Morpeth Susan, Needham Dale, Netea Mihai, Oh Myoung-Don, Phyu Sabai, Piva Simone, Qiu Ruijin, Salisu-Kabara Halima, Shi Lei, Shimizu

Naoki, Sinclair Jorge, Tong Steven, Turgeon Alexis, Uyeki Tim, van de Veerdonk Frank, Webb Steve, Williamson Paula, Wolf Timo, Zhang Junhua. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020;20(8):e192-e7.

95. Iturrieta-Zuazo I., Rita C. G., Garcia-Soidan A., de Malet Pintos-Fonseca A., Alonso-Alarcon N., Pariente-Rodriguez R., Tejeda-Velarde A., Serrano-Villar S., Castaner-Alabau J. L., Nieto-Ganan I. Possible role of HLA class-I genotype in SARS-CoV-2 infection and progression: A pilot study in a cohort of Covid-19 Spanish patients. *Clin Immunol*. 2020;219:108572.

96. Nguyen A., David J. K., Maden S. K., Wood M. A., Weeder B. R., Nellore A., Thompson R. F. Human Leukocyte Antigen Susceptibility Map for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J Virol*. 2020;94(13).

97. Wölfel R., Corman V. M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller M. A., Niemeyer D., Jones T. C., Vollmar P., Rothe C., Hoelscher M., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Ehmann R., Zwirgmaier K., Drosten C., Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-9.

98. Li Heng. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM2013 March 01, 2013 [zitiert 2021 20.07.2021]:[arXiv:1303.3997 p.]. Aufrufbar unter URL: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2013arXiv1303.3997L>.

99. Andrews S. FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data 2010 [zitiert 20.07.2021]. Aufrufbar unter URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

100. Zheng X., Levine D., Shen J., Gogarten S. M., Laurie C., Weir B. S. A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics*. 2012;28(24):3326-8.

101. Roe D., Kuang R. Accurate and Efficient KIR Gene and Haplotype Inference From Genome Sequencing Reads With Novel K-mer Signatures. *Front Immunol*. 2020;11:583013.

102. Zaykin D. V. Optimally weighted Z-test is a powerful method for combining probabilities in meta-analysis. *Journal of evolutionary biology*. 2011;24(8):1836-41.

103. Auton Adam, Abecasis Gonçalo R., Altshuler David M., Durbin Richard M., Abecasis Gonçalo R., Bentley David R., Chakravarti Aravinda, Clark Andrew G., Donnelly Peter, Eichler Evan E., Flicek Paul, Gabriel Stacey B., Gibbs Richard A., Green Eric D., Hurler Matthew E., Knoppers Bartha M., Korbel Jan O., Lander Eric S., Lee Charles, Lehrach Hans, Mardis Elaine R., Marth Gabor T., McVean Gil A., Nickerson Deborah A., Schmidt Jeanette P., Sherry Stephen T., Wang Jun, Wilson Richard K., Gibbs Richard A., Boerwinkle Eric, Doddapaneni Harsha, Han Yi, Korchina Viktoriya, Kovar Christie, Lee Sandra, Muzny Donna, Reid Jeffrey G., Zhu Yiming, Wang Jun, Chang Yuqi, Feng Qiang, Fang Xiaodong, Guo Xiaosen, Jian Min, Jiang Hui, Jin Xin, Lan Tianming, Li Guoqing, Li Jingxiang, Li Yingrui, Liu Shengmao, Liu Xiao, Lu Yao, Ma Xuedi, Tang Meifang, Wang Bo, Wang Guangbiao, Wu Honglong, Wu Renhua, Xu Xun, Yin Ye, Zhang Dandan, Zhang Wenwei, Zhao Jiao, Zhao Meiru, Zheng Xiaole, Lander Eric S., Altshuler David M., Gabriel Stacey B., Gupta Namrata, Gharani Neda, Toji Lorraine H., Gerry Norman P., Resch Alissa M., Flicek Paul, Barker Jonathan, Clarke Laura, Gil Laurent, Hunt Sarah E., Kelman Gavin, Kulesha Eugene, Leinonen Rasko, McLaren William M.,

Radhakrishnan Rajesh, Roa Asier, Smirnov Dmitriy, Smith Richard E., Streeter Ian, Thormann Anja, Toneva Iliana, Vaughan Brendan, Zheng-Bradley Xiangqun, Bentley David R., Grocock Russell, Humphray Sean, James Terena, Kingsbury Zoya, Lehrach Hans, Sudbrak Ralf, Albrecht Marcus W., Amstislavskiy Vyacheslav S., Borodina Tatiana A., Lienhard Matthias, Mertes Florian, Sultan Marc, Timmermann Bernd, Yaspo Marie-Laure, Mardis Elaine R., Wilson Richard K., Fulton Lucinda, Fulton Robert, Sherry Stephen T., Ananiev Victor, Belaia Zinaida, Beloslyudtsev Dmitriy, Bouk Nathan, Chen Chao, Church Deanna, Cohen Robert, Cook Charles, Garner John, Hefferon Timothy, Kimelman Mikhail, Liu Chunlei, Lopez John, Meric Peter, O'Sullivan Chris, Ostapchuk Yuri, Phan Lon, Ponomarov Sergiy, Schneider Valerie, Shekhtman Eugene, Sirotkin Karl, Slotta Douglas, Zhang Hua, McVean Gil A., Durbin Richard M., Balasubramaniam Senduran, Burton John, Danecek Petr, Keane Thomas M., Kolb-Kokocinski Anja, McCarthy Shane, Stalker James, Quail Michael, Schmidt Jeanette P., Davies Christopher J., Gollub Jeremy, Webster Teresa, Wong Brant, Zhan Yiping, Auton Adam, Campbell Christopher L., Kong Yu, Mockett Anthony, Gibbs Richard A., Yu Fuli, Antunes Lilian, Bainbridge Matthew, Muzny Donna, Sabo Aniko, Huang Zhuoyi, Wang Jun, Coin Lachlan J. M., Fang Lin, Guo Xiaosen, Jin Xin, Li Guoqing, Li Qibin, Li Yingrui, Li Zhenyu, Lin Haoxiang, Liu Binghang, Luo Ruibang, Shao Haojing, Xie Yinlong, Ye Chen, Yu Chang, Zhang Fan, Zheng Hancheng, Zhu Hongmei, Alkan Can, Dal Elif, Kahveci Fatma, Marth Gabor T., Garrison Erik P., Kural Deniz, Lee Wan-Ping, Fung Leong Wen, Stromberg Michael, Ward Alistair N., Wu Jiantao, Zhang Mengyao, Daly Mark J., DePristo Mark A., Handsaker Robert E., Altshuler David M., Banks Eric, Bhatia Gaurav, del Angel Guillermo, Gabriel Stacey B., Genovese Giulio, Gupta Namrata, Li Heng, Kashin Seva, Lander Eric S., McCarroll Steven A., Nemes James C., Poplin Ryan E., Yoon Seungtae C., Lihm Jayon, Makarov Vladimir, Clark Andrew G., Gottipati Srikanth, Keinan Alon, Rodriguez-Flores Juan L., Korbel Jan O., Rausch Tobias, Fritz Markus H., Stütz Adrian M., Flicek Paul, Beal Kathryn, Clarke Laura, Datta Avik, Herrero Javier, McLaren William M., Ritchie Graham R. S., Smith Richard E., Zerbino Daniel, Zheng-Bradley Xiangqun, Sabeti Pardis C., Shlyakhter Ilya, Schaffner Stephen F., Vitti Joseph, Cooper David N., Ball Edward V., Stenson Peter D., Bentley David R., Barnes Bret, Bauer Markus, Keira Cheetham R., Cox Anthony, Eberle Michael, Humphray Sean, Kahn Scott, Murray Lisa, Peden John, Shaw Richard, Kenny Eimear E., Batzer Mark A., Konkel Miriam K., Walker Jerilyn A., MacArthur Daniel G., Lek Monkol, Sudbrak Ralf, Amstislavskiy Vyacheslav S., Herwig Ralf, Mardis Elaine R., Ding Li, Koboldt Daniel C., Larson David, Ye Kai, Gravel Simon, The Genomes Project Consortium, Corresponding authors, Steering committee, Production group, Baylor College of Medicine, Shenzhen B. G. I., Broad Institute of M. I. T., Harvard, Coriell Institute for Medical Research, European Molecular Biology Laboratory European Bioinformatics Institute, Illumina, Max Planck Institute for Molecular Genetics, McDonnell Genome Institute at Washington University, Health U. S. National Institutes of, University of Oxford, Wellcome Trust Sanger Institute, Analysis group, Affymetrix, Albert Einstein College of Medicine, Bilkent University, Boston College, Cold Spring Harbor Laboratory, Cornell University, European Molecular Biology Laboratory, Harvard University, Human Gene Mutation Database, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Louisiana State University, Massachusetts General Hospital, McGill University, National Eye Institute N. I. H. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.

104. Abi-Rached L., Gouret P., Yeh J. H., Di Cristofaro J., Pontarotti P., Picard C., Paganini J. Immune diversity sheds light on missing variation in worldwide genetic diversity panels. *PLoS One*. 2018;13(10):e0206512.

105. Pairo-Castineira Erola, Clohisey Sara, Klaric Lucija, Bretherick Andrew D., Rawlik Konrad, Pasko Dorota, Walker Susan, Parkinson Nick, Fourman Max Head, Russell Clark D., Furniss James, Richmond Anne, Gountouna Elvina, Wrobel Nicola, Harrison David, Wang Bo,

Wu Yang, Meynert Alison, Griffiths Fiona, Oosthuyzen Wilna, Kousathanas Athanasios, Moutsianas Loukas, Yang Zhijian, Zhai Ranran, Zheng Chenqing, Grimes Graeme, Beale Rupert, Millar Jonathan, Shih Barbara, Keating Sean, Zechner Marie, Haley Chris, Porteous David J., Hayward Caroline, Yang Jian, Knight Julian, Summers Charlotte, Shankar-Hari Manu, Klenerman Paul, Turtle Lance, Ho Antonia, Moore Shona C., Hinds Charles, Horby Peter, Nichol Alistair, Maslove David, Ling Lowell, McAuley Danny, Montgomery Hugh, Walsh Timothy, Pereira Alexandre C., Renieri Alessandra, Millar Johnny, Nichol Alistair, Walsh Tim, Shankar-Hari Manu, Ponting Chris, Meikle Jen, Finernan Paul, McMaster Ellie, Law Andy, Baillie J. Kenneth, Paterson Trevor, Wackett Tony, Armstrong Ruth, Clark Richard, Coutts Audrey, Donnelly Lorna, Gilchrist Tammy, Hafezi Katarzyna, Macgillivray Louise, Maclean Alan, McCafferty Sarah, Morrice Kirstie, Weaver Jane, Boz Ceilia, Golightly Ailsa, Ward Mari, Mal Hanning, Szoor-McElhinney Helen, Brown Adam, Hendry Ross, Stenhouse Andrew, Cullum Louise, Law Dawn, Law Sarah, Law Rachel, Swets Maaïke, Day Nicky, Taneski Filip, Duncan Esther, Parkinson Nicholas, Collier D., Wood S., Zak A., Borra C., Matharu M., May P., Alldis Z., Mitchelmore O., Bowles R., Easthope A., Bibi F., Lancoma-Malcolm I., Gurasashvili J., Pheby J., Shiel J., Bolton M., Patel M., Taylor M., Zongo O., Ebano P., Harding P., Astin-Chamberlain R., Choudhury Y., Cox A., Kallon D., Burton M., Hall R., Blowes S., Prime Z., Biddle J., Prysazhna O., Newman T., Tierney C., Kassam J., Shankar-Hari M., Ostermann M., Campos S., Bociek A., Lim R., Grau N., Jones T. O., Whitton C., Marotti M., Arbane G., Bonner S., Huggill K., Reid J., Welters I., Waugh V., Williams K., Shaw D., Roman J. Fernandez, Martinez M. Lopez, Johnson E., Waite A., Johnston B., Hamilton D., Mulla S., McPhail M., Smith J., Baillie J. K., Barclay L., Hope D., McCulloch C., McQuillan L., Clark S., Singleton J., Priestley K., Rea N., Callaghan M., Campbell R., Andrew G., Marshall L., McKechnie S., Hutton P., Bashyal A., Davidson N., Summers C., Polgarova P., Stroud K., Pathan N., Elston K., Agrawal S., Battle C., Newey L., Rees T., Harford R., Brinkworth E., Williams M., Murphy C., White I., Croft M., Bandla N., Gellamucho M., Tomlinson J., Turner H., Davies M., Quinn A., Hussain I., Thompson C., Parker H., Bradley R., Griffiths R., Scriven J., Nilsson A., Bates M., Dasgin J., Gill J., Puxty A., Cathcart S., Salutous D., Turner L., Duffy K., Puxty K., Joseph A., Herdman-Grant R., Simms R., Swain A., Naranjo A., Crowe R., Sollesta K., Loveridge A., Baptista D., Morino E., Davey M., Golden D., Jones J., Moreno Cuesta J., Haldeos A., Bakthavatsalam D., Vincent R., Elhassan M., Xavier K., Ganesan A., Purohit D., Abdelrazik M., Morgan J., Akeroyd L., Bano S., Lawton T., Warren D., Bromley M., Sellick K., Gurr L., Wilkinson B., Nagarajan V., Szedlak P., Cupitt J., Stoddard E., Benham L., Preston S., Laha S., Slawson N., Bradshaw Z., Brown J., Caswell M., Melling S., Bamford P., Faulkner M., Cawley K., Jeffrey H., London E., Sainsbury H., Nagra I., Nasir F., Dunmore C., Jones R., Abraheem A., Al-Moasseb M., Girach R., Padden G., Egan J., Brantwood C., Alexander P., Bradley-Potts J., Allen S., Felton T., Manna S., Farnell-Ward S., Leaver S., Queiroz J., Maccacari E., The Gen Omicc Investigators, Gen Omicc Consortium, Gen Omicc co-investigators, Central management, laboratory team, Data analysis team, Barts Health Nhs Trust London U. K., Guy's, St Thomas' Hospital London U. K., James Cook University Hospital Middlesburgh U. K., The Royal Liverpool University Hospital Liverpool U. K., King's College Hospital London U. K., Royal Infirmary of Edinburgh Edinburgh U. K., John Radcliffe Hospital Oxford U. K., Addenbrooke's Hospital Cambridge U. K., Morrision Hospital Swansea U. K., Ashford, St Peter's Hospital Surrey U. K., Royal Stoke University Hospital Staffordshire U. K., Queen Elizabeth Hospital Birmingham U. K., Glasgow Royal Infirmary Glasgow U. K., Kingston Hospital Surrey U. K., The Tunbridge Wells Hospital, Maidstone Hospital Kent U. K., North Middlesex University Hospital Nhs Trust London U. K., Bradford Royal Infirmary Bradford U. K., Blackpool Victoria Hospital Blackpool U. K., Countess of Chester Hospital Chester U. K., Wythenshawe Hospital Manchester U. K., St George's Hospital London U. K. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature*. 2021;591(7848):92-8.

106. Littera R., Campagna M., Deidda S., Angioni G., Cipri S., Melis M., Firinu D., Santus S., Lai A., Porcella R., Lai S., Rassu S., Scioscia R., Meloni F., Schirru D., Cordeddu W., Kowalik M. A., Serra M., Ragatzu P., Carta M. G., Del Giacco S., Restivo A., Deidda S., Orrù S., Palimodde A., Perra R., Orrù G., Conti M., Balestrieri C., Serra G., Onali S., Marongiu F., Perra A., Chessa L. Human Leukocyte Antigen Complex and Other Immunogenetic and Clinical Factors Influence Susceptibility or Protection to SARS-CoV-2 Infection and Severity of the Disease Course. The Sardinian Experience. *Front Immunol.* 2020;11:605688.
107. Weiner January, Suwalski Phillip, Holtgrewe Manuel, Rakitko Alexander, Thibeault Charlotte, Müller Melina, Patriki Dimitri, Quedenau Claudia, Krüger Ulrike, Ilinsky Valery, Popov Iaroslav, Balnis Joseph, Jaitovich Ariel, Helbig Elisa T., Lippert Lena J., Stubbemann Paula, Real Luis M., Macías Juan, Pineda Juan A., Fernandez-Fuertes Marta, Wang Xiaomin, Karadeniz Zehra, Saccomanno Jacopo, Doehn Jan-Moritz, Hübner Ralf-Harto, Hinzmann Bernd, Salvo Mauricio, Blueher Anja, Siemann Sandra, Jurisic Stjepan, Beer Juerg H., Rutishauser Jonas, Wiggli Benedikt, Schmid Hansruedi, Danninger Kathrin, Binder Ronald, Corman Victor M., Mühlemann Barbara, Arjun Arkal Rao, Fragiadakis Gabriela K., Mick Eran, Comet Consortium, Calfee Carolyn S., Erle David J., Hendrickson Carolyn M., Kangelaris Kirsten N., Krummel Matthew F., Woodruff Prescott G., Langelier Charles R., Venkataramani Urmila, García Federico, Zyla Joanna, Drosten Christian, Alice Braun, Jones Terry C., Suttorp Norbert, Witzenrath Martin, Hippenstiel Stefan, Zemojtel Tomasz, Skurk Carsten, Wolfgang Poller, Borodina Tatiana, Pa-Covid Study Group, Ripke Stephan, Sander Leif E., Beule Dieter, Landmesser Ulf, Guettouche Toumy, Kurth Florian, Heidecker Bettina. Increased risk of severe clinical course of COVID-19 in carriers of HLA-C*04:01. *EClinicalMedicine.* 2021:101099.
108. Peckham Hannah, de Gruijter Nina M., Raine Charles, Radziszewska Anna, Ciurtin Coziana, Wedderburn Lucy R., Rosser Elizabeth C., Webb Kate, Deakin Claire T. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ICU admission. *Nature Communications.* 2020;11(1):6317.
109. Takahashi T., Ellingson M. K., Wong P., Israelow B., Lucas C., Klein J., Silva J., Mao T., Oh J. E., Tokuyama M., Lu P., Venkataraman A., Park A., Liu F., Meir A., Sun J., Wang E. Y., Casanovas-Massana A., Wyllie A. L., Vogels C. B. F., Earnest R., Lapidus S., Ott I. M., Moore A. J., Shaw A., Fournier J. B., Odio C. D., Farhadian S., Dela Cruz C., Grubaugh N. D., Schulz W. L., Ring A. M., Ko A. I., Omer S. B., Iwasaki A. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature.* 2020;588(7837):315-20.
110. Medzikovic L., Cunningham C. M., Li M., Amjadi M., Hong J., Ruffenach G., Eghbali M. Sex differences underlying preexisting cardiovascular disease and cardiovascular injury in COVID-19. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2020;148:25-33.
111. Gebhard C., Regitz-Zagrosek V., Neuhauser H. K., Morgan R., Klein S. L. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biol Sex Differ.* 2020;11(1):29.
112. Bunders M. J., Altfeld M. Implications of Sex Differences in Immunity for SARS-CoV-2 Pathogenesis and Design of Therapeutic Interventions. *Immunity.* 2020;53(3):487-95.
113. Gonzalez-Galarza F. F., McCabe A., Melo Dos Santos E. J., Takeshita L., Ghattaoraya G., Jones A. R., Middleton D. Allele Frequency Net Database. *Methods Mol Biol.* 2018;1802:49-62.

114. Wang Wei, Zhang Wei, Zhang Jingjing, He Ji, Zhu Faming. Distribution of HLA allele frequencies in 82 Chinese individuals with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *HLA*. 2020;96(2):194-6.
115. Group The Severe Covid-19 GWAS. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(16):1522-34.
116. Novelli A., Andreani M., Biancolella M., Liberatoscioli L., Passarelli C., Colona V. L., Rogliani P., Leonardis F., Campana A., Carsetti R., Andreoni M., Bernardini S., Novelli G., Locatelli F. HLA allele frequencies and susceptibility to COVID-19 in a group of 99 Italian patients. *HLA*. 2020;96(5):610-4.
117. Hovhannisyan Anahit, Madelian Vergine, Avagyan Sevak, Nazaretyan Mihran, Hyussyan Armine, Sirunyan Alina, Arakelyan Rubina, Manukyan Zorayr, Yepiskoposyan Levon, Mayilyan Karine R., Jordan Frieda. HLA-C*04:01 Affects HLA Class I Heterozygosity and Predicted Affinity to SARS-CoV-2 Peptides, and in Combination With Age and Sex of Armenian Patients Contributes to COVID-19 Severity. *Frontiers in Immunology*. 2022;13.
118. Warren R. L., Birol I. HLA alleles measured from COVID-19 patient transcriptomes reveal associations with disease prognosis in a New York cohort. *PeerJ*. 2021;9:e12368.
119. Suslova Tatiana A., Vavilov Mikhail N., Belyaeva Svetlana V., Evdokimov Alexander V., Stashkevich Daria S., Galkin Alexander, Kofiadi Ilya A. Distribution of HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 allele frequencies in patients with COVID-19 bilateral pneumonia in Russians, living in the Chelyabinsk region (Russia). *Human Immunology*. 2022.
120. Yuan F. F., Velickovic Z., Ashton L. J., Dyer W. B., Geczy A. F., Dunckley H., Lynch G. W., Sullivan J. S. Influence of HLA gene polymorphisms on susceptibility and outcome post infection with the SARS-CoV virus. *Virologica Sinica*. 2014;29(2):128-30.
121. Carrington Mary, Nelson George W., Martin Maureen P., Kissner Teri, Vlahov David, Goedert James J., Kaslow Richard, Buchbinder Susan, Hoots Keith, Brien Stephen J. HLA and HIV-1: Heterozygote Advantage and B*35-Cw*04 Disadvantage. *Science*. 1999;283(5408):1748.
122. Singanayagam Anika, Patel Monika, Charlett Andre, Lopez Bernal Jamie, Saliba Vanessa, Ellis Joanna, Ladhani Shamez, Zambon Maria, Gopal Robin. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(32):2001483.
123. Liu Yang, Yan Li-Meng, Wan Lagen, Xiang Tian-Xin, Le Aiping, Liu Jia-Ming, Peiris Malik, Poon Leo L. M., Zhang Wei. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020;20(6):656-7.
124. Iturrieta-Zuazo I., Rita C. G., García-Soidán A., de Malet Pintos-Fonseca A., Alonso-Alarcón N., Pariente-Rodríguez R., Tejeda-Velarde A., Serrano-Villar S., Castañer-Alabau J. L., Nieto-Gañán I. Possible role of HLA class-I genotype in SARS-CoV-2 infection and progression: A pilot study in a cohort of Covid-19 Spanish patients. *Clin Immunol*. 2020;219:108572.

125. Lund O., Nascimento E. J., Maciel M., Jr., Nielsen M., Larsen M. V., Lundegaard C., Harndahl M., Lamberth K., Buus S., Salmon J., August T. J., Marques E. T., Jr. Human leukocyte antigen (HLA) class I restricted epitope discovery in yellow fever and dengue viruses: importance of HLA binding strength. *PLoS One*. 2011;6(10):e26494.
126. Yung Yuk-Lin, Cheng Chi-Keung, Chan Hoi-Yun, Xia Jenny T., Lau Kin-Mang, Wong Raymond S. M., Wu Alan K. L., Chu Raymond W., Wong Alice C. C., Chow Eudora Y. D., Yip Sze-Fai, Leung Jennifer N. S., Lee Cheuk-Kwong, Ng Margaret H. L. Association of HLA-B22 serotype with SARS-CoV-2 susceptibility in Hong Kong Chinese patients. *HLA*. 2021;97(2):127-32.
127. Amoroso Antonio, Magistroni Paola, Vespasiano Francesca, Bella Antonino, Bellino Stefania, Puoti Francesca, Alizzi Silvia, Vaisitti Tiziana, Boros Stefano, Grossi Paolo Antonio, Trapani Silvia, Lombardini Letizia, Pezzotti Patrizio, Deaglio Silvia, Brusaferrò Silvio, Cardillo Massimo, Centers on behalf of the Italian Network of Regional Transplant Coordinating. HLA and ABO Polymorphisms May Influence SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Severity. *Transplantation*. 2021;105(1):193-200.
128. Science Weizmann Institute. CCHCR1 Gene [Gene Cards Database] [zitiert 29.05.2021]. Aufrufbar unter URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCHCR1>.
129. Tiala I., Wakkinen J., Suomela S., Puolakkainen P., Tammi R., Forsberg S., Rollman O., Kainu K., Rozell B., Kere J., Saarialho-Kere U., Elomaa O. The PSORS1 locus gene CCHCR1 affects keratinocyte proliferation in transgenic mice. *Human molecular genetics*. 2008;17(7):1043-51.
130. Tervaniemi M. H., Katayama S., Skoog T., Siitonen H. A., Vuola J., Nuutila K., Tamminen K., Suomela S., Kankuri E., Kere J., Elomaa O. Intracellular signalling pathways and cytoskeletal functions converge on the psoriasis candidate gene CCHCR1 expressed at P-bodies and centrosomes. *BMC genomics*. 2018;19(1):432.
131. Gandhi G., Buttar B. S., Albert L., Hasan Q., Aggarwal R. K. Psoriasis-associated genetic polymorphism in North Indian population in the CCHCR1 gene and in a genomic segment flanking the HLA-C region. *Disease markers*. 2011;31(6):361-70.
132. Escandon Rafael, Heidecker Bettina. The need for ethical and pragmatic strategies for sample and data collection during public health emergencies—minimizing missed opportunities. *European Heart Journal*. 2021;42(33):3114-6.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Phillip Suwalski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss genetischer Faktoren auf einen schweren Verlauf einer SARS-CoV-2 Infektion“ - „Identification of genetic factors which lead to a severe clinical course during infection with SARS-CoV-2“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Phillip Suwalski hatte folgenden Anteil an der Publikation zu seinem Dissertationsthema:

January Weiner 3rd, **Phillip Suwalski**, Manuel Holtgrewe, Alexander Rakitko, Charlotte Thibeault, Melina Müller, Dimitri Patriki, Claudia Quedenau, Ulrike Krüger, Valery Ilinsky Iaroslav Popov, Joseph Balnis, Ariel Jaitovich, Elisa T Helbig, Lena J Lippert, Paula Stubbemann, Luis M Real, Juan Macías, Juan A Pineda, Marta Fernandez-Fuertes, Xiaomin Wang, Zehra Karadeniz, Jacopo Saccomanno, Jan-Moritz Doehn, Ralf-Harto Hübner, Bernd Hinzmann, Mauricio Salvo, Anja Blueher, Sandra Siemann, Stjepan Jurisic, Juerg H. Beer, Jonas Rutishauser, Benedikt Wiggli, Hansruedi Schmid, Kathrin Danninger, Ronald Binder, Victor M Corman, Barbara Mühlemann, Rao Arjun Arkal, Gabriela K. Fragiadakis, Eran Mick, Consortium COMET, Carolyn S. Calfee, David J. Erle, Carolyn M. Hendrickson, Kirsten N. Kangelaris, Matthew F. Krummel, Prescott G. Woodruff, Charles R. Langelier, Urmila Venkataramani, Federico García, Joanna Zyla, Christian Drost, Braun Alice, Terry C Jones, Norbert Suttorp, Martin Witzenzath, Stefan Hippenstiel, Tomasz Zemojtel, Carsten Skurk, Wolfgang Poller, Tatiana Borodina, Study Group Pa-COVID, Stephan Ripke, Leif E Sander, Dieter Beule, Ulf Landmesser, Toumy Guettouche, Florian Kurth and Bettina Heidecker

Increased risk of severe clinical course of COVID-19 in carriers of HLA-C*04:01

E-Clinical Medicine 01.10.2021; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101099>

Bei der Publikation wirkte Herr Phillip Suwalski an der Projektplanung (Biobanking, Logistik), dem Patienteneinschluss (Patientenrekrutierung, Aufklärung), der Probenverarbeitung (DNA-Isolation und Qualitätskontrollen) und der statistischen Auswertung (statistische Planung und Populationsstatistik) mit. Bei der Erfassung der o.g. Publikation beteiligte er sich an allen Abschnitten, vor allem an der Einleitung, der Methodik und der Diskussion.

Die Sequenzierung der HLA-Typen und das „Exome Sequencing“ wurden in Zusammenarbeit mit der Core Unit Genomics der Charité und der Firma Roche Sequencing Solutions gemeinsam durchgeführt. Die statistische Aufarbeitung fand in Zusammenarbeit mit der Core Unit Bioinformatics des Berlin Health Institutes der Charité Universitätsmedizin Berlin (Ph.D. Dr. habil. January Weiner) statt.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

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

Publikationsliste

1. *Apical sparing on speckle tracking in Morbus Fabry;*

Phillip Suwalski, Karin Klingel, Ulf Landmesser and Bettina Heidecker
European Heart Journal, Volume 41, Issue 36, 21 September 2020, Page 3486,
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa517>

2. *Increased risk of severe clinical course of COVID-19 in carriers of HLA-C*04:01*

January Weiner 3rd, **Phillip Suwalski**, Manuel Holtgrewe, Alexander Rakitko, Charlotte Thibeault, Melina Müller, Dimitri Patriki, Claudia Quedenau, Ulrike Krüger, Valery Ilinsky Iaroslav Popov, Joseph Balnis, Ariel Jaitovich, Elisa T Helbig, Lena J Lippert, Paula Stubbemann, Luis M Real, Juan Macías, Juan A Pineda, Marta Fernandez-Fuertes, Xiaomin Wang, Zehra Karadeniz, Jacopo Saccomanno, Jan-Moritz Doehn, Ralf-Harto Hübner, Bernd Hinzmann, Mauricio Salvo, Anja Blueher, Sandra Siemann, Stjepan Jurisic, Juerg H. Beer, Jonas Rutishauser, Benedikt Wiggli, Hansruedi Schmid, Kathrin Danninger, Ronald Binder, Victor M Corman, Barbara Mühlemann, Rao Arjun Arkal, Gabriela K. Fragiadakis, Eran Mick, Consortium COMET, Carolyn S. Calfee, David J. Erle, Carolyn M. Hendrickson, Kirsten N. Kangelaris, Matthew F. Krummel, Prescott G. Woodruff, Charles R. Langelier, Urmila Venkataramani, Federico García, Joanna Zyla, Christian Drosten, Braun Alice, Terry C Jones, Norbert Suttorp, Martin Witzgenrath, Stefan Hippenstiel, Tomasz Zemojtel, Carsten Skurk, Wolfgang Poller, Tatiana Borodina, Study Group Pa-COVID, Stephan Ripke, Leif E Sander, Dieter Beule, Ulf Landmesser, Toumy Guettouche, Florian Kurth and Bettina Heidecker

E-Clinical Medicine 01.10.2021; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101099>

3. *New susceptibility loci for severe COVID-19 by detailed GWAS analysis in European populations*

Frauke Degenhardt, David Ellinghaus, Simonas Juzenas, Jon Lerga-Jaso, Mareike Wendorff, Douglas Maya-Miles, Florian Uellendahl-Werth, Hesham ElAbd, Malte C Rühlemann, Jatin Arora, Onur Özer, Ole Bernt Lenning, Ronny Myhre, May Sissel Vadla, Eike M Wacker, Lars Wienbrandt, Aaron Blandino Ortiz, Adolfo de Salazar, Adolfo Garrido Chercoles, Adriana Palom, Agustín Ruiz, Alba-Estela Garcia-Fernandez, Albert Blanco-Grau, Alberto Mantovani, Alberto Zanella, Aleksander Rygh Holten, Alena Mayer, Alessandra Bandera, Alessandro Cherubini, Alessandro Protti, Alessio Aghemo, Alessio Gerussi, Alfredo Ramirez, Alice Braun, Almut Nebel, Ana Barreira, Ana Lleo, Ana Teles, Anders Benjamin Kildal, Andrea Biondi, Andrea Caballero-Garralda, Andrea Ganna, Andrea Gori, Andreas Glück, Andreas Lind, Anja Tanck, Anke Hinney, Anna Carreras Nolla, Anna Ludovica Fracanzani, Anna Peschuck, Annalisa Cavallero, Anne Ma Dyrhol-Riise, Antonella Ruello, Antonio Julià, Antonio Muscatello, Antonio Pesenti, Antonio Voza, Ariadna Rando-Segura, Aurora Solier, Axel Schmidt, Beatriz Cortes, Beatriz Mateos, Beatriz Nafria-Jimenez, Benedikt Schaefer, Björn Jensen, Carla Bellinghausen, Carlo Maj, Carlos Ferrando, Carmen de la Horra, Carmen Quereda, Carsten Skurk, Charlotte Thibeault, Chiara Scollo, Christian Herr, Christoph D Spinner, Christoph Gassner, Christoph Lange, Cinzia Hu, Cinzia Paccapelo, Clara Lehmann, Claudio Angelini, Claudio Cappadona, Clinton Azuure, COVICAT study group, Covid-19 Aachen Study (COVAS), Cristiana Bianco, Cristina Cea, Cristina Sancho, Dag Arne Lihaug Hoff, Daniela Galimberti, Daniele Prati, David Haschka, David Jiménez, David Pestaña, David Toapanta, Eduardo Muñoz-Díaz, Elena Azzolini, Elena Sandoval, Eleonora Binatti, Elio Scarpini, Elisa T Helbig, Elisabetta Casalone, Eloisa Urrechaga, Elvezia Maria Paraboschi, Emanuele Pontali, Enric Reverter, Enrique J Calderón, Enrique Navas, Erik Solligård, Ernesto Contro, Eunáte Arana-Arri, Fátima Aziz, Federico Garcia, Félix García Sánchez, Ferruccio Ceriotti, Filippo Martinelli-Boneschi, Flora Peyvandi, Florian Kurth, Francesco Blasi, Francesco Malvestiti, Francisco J Medrano,

Francisco Mesonero, Francisco Rodriguez-Frias, Frank Hanses, Fredrik Müller, Georg Hemmrich-Stanisak, Giacomo Bellani, Giacomo Grasselli, Gianni Pezzoli, Giorgio Costantino, Giovanni Albano, Giulia Cardamone, Giuseppe Bellelli, Giuseppe Citerio, Giuseppe Foti, Giuseppe Lamorte, Giuseppe Matullo, Guido Baselli, Hayato Kurihara, Holger Neb, Ilaria My, Ingo Kurth, Isabel Hernández, Isabell Pink, Itziar de Rojas, Iván Galván-Femenia, Jan Cato Holter, Jan Egil Afset, Jan Heyckendorf, Jan Kässens, Jan Kristian Damås, Jan Rybniker, Janine Altmüller, Javier Ampuero, Javier Martín, Jeanette Erdmann, Jesus M Banales, Joan Ramon Badia, Joaquin Dopazo, Jochen Schneider, Jonas Bergan, Jordi Barretina, Jörn Walter, Jose Hernández Quero, Josune Goikoetxea, Juan Delgado, Juan M Guerrero, Julia Fazaal, Julia Kraft, Julia Schröder, Kari Risnes, Karina Banasik, Karl Erik Müller, Karoline I Gaede, Koldo Garcia-Etxebarria, Kristian Tonby, Lars Heggelund, Laura Izquierdo-Sanchez, Laura Rachele Bettini, Lauro Sumoy, Leif Erik Sander, Lena J Lippert, Leonardo Terranova, Lindokuhle Nkambule, Lisa Knopp, Lise Tuset Gustad, Lucia Garbarino, Luigi Santoro, Luis Téllez, Luisa Roade, Mahnoosh Ostadreza, Maider Intxausti, Manolis Kogevinas, Mar Riveiro-Barciela, Marc M Berger, Marco Schaefer, Mari EK Niemi, María A Gutiérrez-Stampa, Maria Carrabba, Maria E. Figuera Basso, Maria Grazia Valsecchi, María Hernandez-Tejero, Maria JGT Vehreschild, Maria Manunta, Marialbert Acosta-Herrera, Mariella D'Angiò, Marina Baldini, Marina Cazzaniga, Marit M Grimsrud, Markus Cornberg, Markus M Nöthen, Marta Marquié, Massimo Castoldi, Mattia Cordioli, Maurizio Cecconi, Mauro D'Amato, Max Augustin, Melissa Tomasi, Mercè Boada, Michael Dreher, Michael J Seilmaier, Michael Joannidis, Michael Wittig, Michela Mazzocco, Michele Ciccarelli, Miguel Rodríguez-Gandía, Monica Bocciolone, Monica Miozzo, Natale Imaz Ayo, Natalia Blay, Natalia Chueca, Nicola Montano, Nicole Braun, Nicole Ludwig, Nikolaus Marx, Nilda Martínez, Norwegian SARS-CoV-2 Study group, Oliver A Cornely, Oliver Witzke, Orazio Palmieri, Pa COVID-19 Study Group, Paola Faverio, Paoletta Preatoni, Paolo Bonfanti, Paolo Omodei, Paolo Tentorio, Pedro Castro, Pedro M Rodrigues, Pedro Pablo España, Per Hoffmann, Philip Rosenstiel, Philipp Schommers, **Phillip Suwalski**, Raúl de Pablo, Ricard Ferrer, Robert Bals, Roberta Gualtierotti, Rocío Gallego-Durán, Rosa Nieto, Rossana Carpani, Rubén Morilla, Salvatore Badalamenti, Sammra Haider, Sandra Ciesek, Sandra May, Sara Bombace, Sara Marsal, Sara Pigazzini, Sebastian Klein, Serena Pelusi, Sibylle Wilfling, Silvano Bosari, Sonja Volland, Søren Brunak, Soumya Raychaudhuri, Stefan Schreiber, Stefanie Heilmann-Heimbach, Stefano Aliberti, Stephan Ripke, Susanne Dudman, Tanja Wesse, Tenghao Zheng, The Humanitas COVID-19 Task Force, The Humanitas Gavazzeni COVID-19 Task Force, Thomas Bahmer, Thomas Eggermann, Thomas Illig, Thorsten Brenner, Tomas Pumarola, Torsten Feldt, Trine Folseraas, Trinidad Gonzalez Cejudo, Ulf Landmesser, Ulrike Protzer, Ute Hehr, Valeria Rimoldi, Valter Monzani, Vegard Skogen, Verena Keitel, Verena Kopfnagel, Vicente Friaza, Victor Andrade, Victor Moreno, Wolfgang Albrecht, Wolfgang Peter, Wolfgang Poller, Xavier Farre, Xiaoli Yi, Xiaomin Wang, Yascha Khodamoradi, Zehra Karadeniz, Anna Latiano, Siegfried Goerg, Petra Bacher, Philipp Koehler, Florian Tran, Heinz Zoller, Eva C Schulte, Bettina Heidecker, Kerstin U Ludwig, Javier Fernández, Manuel Romero-Gómez, Agustín Albillos, Pietro Invernizzi, Maria Buti, Stefano Duga, Luis Bujanda, Johannes R Hov, Tobias L Lenz, Rosanna Asselta, Rafael de Cid, Luca Valenti, Tom H Karlsen, Mario Cáceres, Andre Franke

medRxiv 2021.07.21.21260624; DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.07.21.21260624>

4. *Male carriers of HLA-C*04:01 have increased risk of cardiac injury in COVID-19*
Suwalski P, Violano M, Müller M, Patriki D, Thibeault C, Quedenau C, Wang X, Karadeniz Z, Saccomanno J, Doehn JM, Hübner RH, Hinzmänn B, Beer HJ, Wiggli B, Siemann S, Suttorp N, Witzernath M, Hippenstiel S, Skurk C, Poller W, Pa-COVID Study Group, Sander LE, Kurth F, Borodina T, Guettouche T, Landmesser U, Heidecker B.
J Cardiovasc Aging 2022 ; 2:33. DOI: <http://dx.doi.org/10.20517/jca.2022.19>

5. *Highly multiplexed immune repertoire sequencing links multiple lymphocyte classes with severity of response to COVID-19*

Dannebaum Richard, **Suwalski Phillip**, Asgharian Hosseinali, Du Zhipei Gracie, Lin Hai, Weiner January 3rd, Manuel Holtgrewe, Thibeault Charlotte, Müller Melina, Wang Xiaomin, Karadeniz Zehra, Saccomanno Jacopo, Doehn Jan-Moritz, Hübner Ralf-Harto, Hinzmänn Bernd, Blüher Anja, Siemann Sandra, Telman Dilduz, Suttorp Norbert, Witzernath Martin, Hippenstiel Stefan, Skurk Carsten, Poller Wolfgang, Sander Leif E, Beule Dieter, Kurth Florian, Guettouche Toumy, Landmesser Ulf, Berka Jan, Luong Khai, Pa-COVID Study Group, Florian Rubelt and Heidecker Bettina
eClinicalMedicine, Volume 48, 101438

Außerdem wurde ich eingeladen die Arbeit bei folgenden Kongressen zur präsentieren:

- Cardiology Update 2021 in Davos, Zurich Heart House
- Global Virtual User Meeting 2021 Session 3 „Infectious Disease & Microbiology“, Pacific Biosciences of California, Inc (PacBio).
- American College of Cardiology (ACC) conference 2022 in Washington D.C.
- Long-Read-Sequencing Day 02.05.2022, Charité Universitätsmedizin Berlin
- Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Blutgruppenserologie, 18.05.2022 in Mondsee, Österreich
- CHORUS Seoul 2022, CHORUS Konsortium

Danksagung

Während meiner freiwilligen Arbeit auf der kardiologischen Station im März 2020 im Rahmen der COVID-19 Pandemie in der Charité Universitätsmedizin Berlin am Campus Benjamin Franklin hatte ich das große Glück Oberärztin PD Dr. med. Bettina Heidecker kennenzulernen. Hieraus entstand sowohl die konkrete Idee, als auch die Zusammenarbeit welche diese Promotion ermöglichen.

Die große Forschungserfahrung und eine menschlich unglaublich herzliche und freundliche Art von Frau PD Dr. Heidecker haben mir sehr bei der Planung, Erstellung und dem Abschluss dieser Arbeit geholfen. Ich danke Ihr aus ganzem Herzen für einfühlsame Worte in schwierigeren Arbeitsphasen wie auch immer sehr konstruktive und hilfreiche Kritik zur Verbesserung der Arbeit. Ich hoffe, dass diese Arbeit eine von vielen in einer langen Zusammenarbeit sein wird, da Sie die beste Doktormutter war, die ich mir hätte wünschen können.

Ph.D. Dr. habil. January Weiner (Bioinformatiker im Berlin Institute of Health) betreute das Projekt und somit auch meine Doktorarbeit von statistischer Seite aus und half ebenfalls in der korrekten und sinnhaften Darstellung der Daten. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und das offene Ohr, das er jedes Mal bei meinen Problemen hatte.

Natürlich sollen an dieser Stelle auch alle Teamkollegen erwähnt werden, welche an der Publikation, die im Rahmen des Projektes entstanden ist, mitwirkten. Die Publikation⁽¹⁰⁷⁾ mit dem Titel „Increased Risk of Severe Clinical Course of COVID-19 in Carriers of HLA-C*04:01“ (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101099>) wurde am 01.10.2021 in Lancet: E-Clinical Medicine publiziert. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und die bereichernden Meetings, welche unser Projekt kontinuierlich verbesserten.

Selbstverständlich gilt mein Dank auch Herrn Professor Dr. med. Ulf Landmesser welcher als Klinikdirektor der kardiologischen Klinik am Campus Benjamin Franklin die Infrastruktur für dieses Projekt ermöglichte, wertvolles Feedback zur wissenschaftlichen Arbeit gab und so die grundlegenden Weichen für mein Projekt stellte. Gleiches gilt auch für alle Mitarbeiter*innen der Labore und selbstverständlich auch für die Patient*innen, die an unserer Studie teilnahmen und ohne welche diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt danke ich auch meinen liebevollen Eltern für die emotionale Hilfe und Unterstützung in guten wie auch in schlechten Zeiten des Projektes und meines Lebens. Ohne Sie wäre ich nicht der Mensch, der ich heute bin.



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietschke

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietschke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Suwalski, Phillip
Emailadresse: phillip.suwalski@charite.de
Matrikelnummer: 224357
PromotionsbetreuerIn: PD Dr. med. Bettina Heidecker
Promotionsinstitution: Medizinische Klinik für Kardiologie
CC11

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herrn *Phillip Suwalski* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 02.08.2022

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Die Auswahl der Teststatistiken und die deskriptive Auswertung wurden besprochen.
- Adjustierung des P-Werts bei multiplem Testen
- Darstellung der Ergebnisse

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 16.08.2022

Name des Beraters: Lukas Mödl



Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

