

Aus der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie)

**Epidemiologische Untersuchung der spezifischen
T-Zell-Immunantwort in Familien nach Infektion mit
SARS-CoV-2**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Müller, Julia Sabine

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Vogel

Tag der Disputation: 24.01.2025

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Immunologische Grundlagen	6
1.1.1 T-Zell-vermittelte Immunität	6
1.1.2 CD4+ und CD8+ T-Zellen	7
1.1.3 HLA-Typisierung	8
1.1.4 Immunologisches Gedächtnis	9
1.1.5 Kreuzreaktivität von T-Zellen	10
1.2 SARS-CoV-2	11
1.2.1 Allgemeines	11
1.2.2 Immunantwort bei SARS-CoV-2	12
1.3 Fragestellung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Laborgeräte	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.4 Zytokine	17
2.1.5 HLA:Peptide	17
2.1.6 Medien	20
2.1.7 ELISPOT-Assay Materialien	20
2.1.8 Durchflusszytometrie Materialien	20
2.1.9 Software	21
2.2 Methodik	22
2.2.1 Studiendesign	22
2.2.2 PBMC-Isolierung	23
2.2.2.1 Prinzip	23

2.2.2.2	Durchführung	23
2.2.3	Kryokonservierung	24
2.2.4	Ansetzen der Zellkultur	24
2.2.5	Präsensitivierung	25
2.2.6	ELISPOT	26
2.2.6.1	Prinzip	26
2.2.6.2	Positivkontrollen	28
2.2.6.3	Vorbereitung und Beladen des ELISPOTs	28
2.2.7	Immunfärbung	30
2.2.7.1	Prinzip	30
2.2.7.2	Durchführung	31
2.2.8	Auslesen und Qualitätskontrolle	32
2.2.9	Statistische Analyse	32
2.2.10	Durchflusszytometrie	33
2.2.10.1	Prinzip	33
2.2.10.2	Durchführung	34
3	Ergebnisse	35
3.1.1	Begriffsdefinition	35
3.1.2	Ergebnisse der Durchflusszytometrie	35
3.1.3	Ergebnisse des ELISPOTs	36
3.1.3.1	Studienpopulation	37
3.1.3.2	SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort in den Subgruppen	38
3.1.3.3	SI und SII Peptidstimulationen im Vergleich	40
3.1.3.4	SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort und spezifischer Serostatus	42
3.1.3.5	SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort im zeitlichen Verlauf	48
3.1.3.6	SI Antwort im zeitlichen Verlauf	50
3.1.3.7	SII Antwort im zeitlichen Verlauf	53
3.1.3.8	SARS-CoV-2 spezifische und kreuzreaktive T-Zell-Antwort	56
3.1.3.9	Korrelation der Stimulationsantworten SI, SII, CI und CII	58
3.1.3.10	Intensitäten von SI +, SII+, CI+ und CII+ Probanden im Vergleich	59
3.1.3.11	Durchseuchung in den Familien	60

4	Diskussion	61
4.1	Studiendesign	61
4.2	Material und Methodik	63
4.2.1	HLA:Peptide	63
4.2.2	PBMC Isolation und Krykonservierung	65
4.2.3	Präsensitivierung	65
4.2.4	ELISPOT	65
4.3	Ergebnisse	69
4.3.1	SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort in den Subgruppen	69
4.3.2	SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort im zeitlichen Verlauf	73
4.3.3	Unterschiede in der SARS-CoV-2 spezifischen Immunantwort zwischen Kindern und Erwachsenen	75
4.3.3.1	Allgemeine Unterschiede	75
4.3.3.2	Angeborene Immunantwort	76
4.3.3.3	SARS-CoV-2 Eintrittspforten	78
4.3.4	SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort und spezifischer Serostatus	79
4.3.4.1	SARS-CoV-2 spezifischer Serostatus im zeitlichen Verlauf im Vergleich zur spezifischen T-Zell-Antwort	80
4.3.5	Spezifische und kreuzreaktive T-Zell-Antwort im Vergleich	83
4.3.1	Durchseuchung in den Familien	85
4.3.2	Ausblick	87
	Datentabelle	88
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	93
7	Erklärung zum Eigenanteil	111
	Danksagung	112

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht über die Studienpopulation</i>	38
<i>Tabelle 2: SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort</i>	38
<i>Tabelle 3: Mediane der SI und SII Intensitäten</i>	39
<i>Tabelle 4: SI+, SII+, SI+ und SII+ Probanden im Vergleich</i>	41
<i>Tabelle 5: SARS-CoV-2 spezifischer Serostatus</i>	43
<i>Tabelle 6: Vergleich der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort mit dem Serostatus</i>	44
<i>Tabelle 7: SARS-CoV-2 spezifische adaptive Immunantwort in der Gesamtpopulation</i>	45
<i>Tabelle 8: Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen SI und SII Antwort mit dem Serostatus</i>	45
<i>Tabelle 9: Vergleich der spezifische T-Zell-Antwort im zeitlichen Verlauf</i>	49
<i>Tabelle 10: SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort in der Peptidstimulation SI im zeitlichen Verlauf</i>	50
<i>Tabelle 11: Mediane der Intensitäten der Peptidstimulation SI in T1 und T2</i>	52
<i>Tabelle 12: SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort in der Peptidstimulation SII im zeitlichen Verlauf</i>	53
<i>Tabelle 13: Mediane der Intensitäten der Peptidstimulation SII in T1 und T2</i>	55
<i>Tabelle 14: Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen und kreuzreaktiven T-Zell-Antwort</i>	57
<i>Tabelle 15: Durchseuchung der Familien</i>	60
<i>Tabelle 16: Zusammenfassende Datentabelle</i>	88

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: SARS-CoV-2-spezifische und kreuzreaktive HLA:Peptide</i>	19
<i>Abbildung 2: HLA:Peptide für die Negativkontrollen im ELISPOT</i>	19
<i>Abbildung 3: Schema zur Präsensitivierung von Tag 0 bis 12</i>	26
<i>Abbildung 4: Prinzip des ELISPOTs in dieser Arbeit</i>	27
<i>Abbildung 5: Beispiel eines Pipettierschemas einer Familie mit 4 Mitgliedern</i>	30
<i>Abbildung 6: Beispiel- FACS einer präpandemischen Probe zur Sicherung der T-Zellpopulation</i>	36
<i>Abbildung 7: ELISPOT-Ergebnisse der Familie 14</i>	37
<i>Abbildung 8: Kreisdiagramme: Übersicht über die Studienpopulation</i>	39
<i>Abbildung 9: Vergleich der Intensitäten von positiv und negativ gewerteten Probanden</i>	40
<i>Abbildung 10: Kreisdiagramme: SI+, SII+, SI+ und SII+ Antworten</i>	41
<i>Abbildung 11: Vergleich der Intensitäten der SI+ und der SII+ Antworten</i>	42
<i>Abbildung 12: Kreisdiagramme: Serostatus der Probanden</i>	43
<i>Abbildung 13: Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort mit dem Serostatus</i>	44
<i>Abbildung 14: Vergleich der Intensitäten der SI+/SII+ Probanden in Bezug auf den positiven (Ak+) und negativen (Ak-) SARS-CoV-2-spezifischen Serostatus</i>	46

<i>Abbildung 15: Vergleich der SI/SII+ Probanden mit positivem Serostatus zwischen der Kinder- und Erwachsenenengruppe</i>	47
<i>Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der SI Antwort</i>	51
<i>Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der SII Antwort</i>	54
<i>Abbildung 18: Vergleich der spezifischen T-Zell-Antwort mit/ohne kreuzreaktive T-Zell-Antwort</i>	56
<i>Abbildung 19: Kreisdiagramme: Positive spezifische T-Zellantwort mit/ohne kreuzreaktive Antwort</i>	57
<i>Abbildung 20: Spearmankorrelation der SI, SII, CI und CII Intensitäten</i>	58
<i>Abbildung 21: Vergleich der Intensitäten der SI +, SII +, CI+ und CII + Probanden.</i>	59
<i>Abbildung 22: Durchseuchungsgrad in 72 Familien</i>	61

Abkürzungsverzeichnis

BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
CD	Cluster of Differentiation
CI/II	Kreuzreaktiver Peptidmix für HLA I/II
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay
FCS	Fetal calf serum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
HCoV	Humane Coronaviren
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IFN- γ	Interferon- γ
IgG/A	Immunglobulin G/A
MERS-CoV	Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus
MIS-C	Multisystem Inflammatory Syndrome in Children
MSC	Mean Spot Count
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
RPMI (Medium)	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonucleic acid
SARS-CoV-1/2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1/2
SI/SII	Spezifischer Peptidmix für HLA I/II
TH	T-Helferzelle
T1	Zeitpunkt 1 der Studie
T2	Zeitpunkt 2 der Studie
TCM	T-Zell-Medium

1 Einleitung

1.1 Immunologische Grundlagen

1.1.1 T-Zell-vermittelte Immunität

Die T-Zell-vermittelte Immunität, ein Teil des adaptiven Immunsystems, durchläuft im Laufe des Lebens einen bemerkenswerten Wandel. Während sie sich von der Kindheit über die Pubertät kontinuierlich entwickelt und reift, hat das Immunsystem eines Erwachsenen bereits vielfältige Interaktionen mit verschiedenen Krankheitserregern erlebt und somit eine Entwicklung des T-Zellrepertoires durchlaufen [1]. In der Komplexität des menschlichen Immunsystems spielen die T-Zellen eine herausragende Rolle, da sie nicht nur innerhalb ihrer eigenen Zellpopulation agieren, sondern auch mit Zellen des humoralen und auch angeborenen Immunsystems eng verknüpft sind [2]. So nimmt der enge Kontakt der T-Zellen mit Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen eine zentrale Rolle in der Orchestrierung einer Immunantwort ein [3]. Dabei sind T-Zellen für die Erkennung von gebundenen Antigenen und eine entsprechende Reaktion darauf zuständig. Diese können dann unterschiedlich ausfallen, also zytotoxisch (hauptsächlich CD8+), aber auch stimulierend oder inhibierend (hauptsächlich CD4+), je nachdem, welche Zytokine ausgeschüttet werden [4].

Im Folgenden werden die wesentlichen Aspekte der T-Zell-Immunität in Bezug auf diese Arbeit näher erläutert. Dazu gehören die Differenzierung der T-Zellen in CD4+ und CD8+ Effektorzellen, sowie das „Humane Leukozyten-Antigen“, nachfolgend „HLA“ abgekürzt und dessen Bedeutung in der Antigenerkennung. Darauf folgend werden die T-Gedächtniszellen, sowie im Speziellen, die T-Zell-Immunantwort bei der „*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*“, nachfolgend als „SARS-CoV-2“ abgekürzt, näher begutachtet. Allgemeine Informationen zum pandemischen Geschehen seit 2019 werden im Anschluss erläutert.

1.1.2 CD4+ und CD8+ T-Zellen

Die Differenzierung der T-Zellen in CD4+ und CD8+ wird anhand ihrer Corezeptoren vorgenommen, die mit dem Antigenrezeptor maßgeblich für die Immunreaktion verantwortlich sind [5, 6]. Cytotoxische CD8+ T-Effektorzellen, die auf intrazelluläre Erreger, beispielsweise Viren spezialisiert sind, erkennen an HLA-I gebundene Antigenfragmente an der Zelloberfläche. Besitzen diese T-Zellen den kognaten T-Zell-Rezeptor, können diese durch die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und HLA-Molekül aktiviert werden. Das Priming dieser vorerst naiven T-Zellen erfolgt durch eine korrekt aktivierte antigenpräsentierende Zelle. Diese Aufgabe wird hauptsächlich durch konventionelle dendritische Zelle übernommen, kann aber auch durch B-Zellen und Makrophagen erfolgen. Die dendritischen Zellen nehmen die Antigene am Infektionsherd auf und können sie dann über HLA II oder HLA I in den peripher lymphatischen Organen den T-Zellen präsentieren [2]. Die durch das Priming entstandenen cytotoxische CD8+ T-Zellen benötigen beispielsweise bei Virusinfektionen eine stärkere Costimulation, um sich aus naiven T-Zellen zu differenzieren. Diese Verstärkung kann durch eine CD4+ T-Zelle erfolgen, die über eine dendritische Zelle das gleiche Antigen im Kontext von HLA-II erkennt und als Mediator zwischen antigenpräsentierender Zelle und naiver CD8+ T-Zelle fungiert [7, 8]. Nach dieser Prägung kann eine cytotoxische T-Zelle infizierte Zielzellen erkennen und direkt abtöten. Bei naiven CD4+ T-Zellen sorgen die beim Priming erhaltenen Signale für eine Differenzierung in unterschiedliche Subpopulationen. Diese Effektorzellen unterscheiden sich vor allem durch unterschiedliche Muster der Zytokinfreisetzung. Th1-, Th2, Th17 und die regulatorischen T-Zellen sind die bisher bekanntesten Vertreter [9]. Th1-Zellen führen über Zytokine zu einer Aktivierung von Makrophagen und ermöglichen ihnen dadurch intrazelluläre Erreger wie zum Beispiel Mycoplasmen effektiver zu eliminieren. Makrophagen und Th1-Zellen bilden die zellvermittelte Immunität. Zudem können Th1-Zellen B-Zellen zur opsonierenden Antikörperbildung anregen. Th2-Zellen sorgen mit ihrer Zytokinproduktion für eine Differenzierung von B-Zellen und veränderter Antikörperproduktion in den Bereichen IgM, IgA und besonders IgE. Sie führen zu einer humoralen Antwort. Beide T-Zelltypen sind bei einer akuten

Immunreaktion vertreten [10, 11]. In der Bekämpfung von Pathogenen und der Polarisierung der Immunantwort sind Zytokine und deren Zusammenspiel wichtige Modulatoren. Sie sorgen beispielsweise für die unterschiedliche Differenzierung der naiven T-Zellen, aber auch als Anregung für Expansion der Subgruppen. Gleichzeitig werden sie von den T-Effektorzellen selbst gebildet und sorgen somit für eine Reaktion in der Zielzelle [12, 13]. Gerade Interferon- γ , welches ein entscheidendes T-Zell-Zytokin dieser Arbeit ist, wird von Th1-Zellen und CD8+ T-Zellen gebildet und besitzt zudem ein hohes antivirales und zytotoxisches Potential [14]. IL-2 hingegen steuert die Proliferation und Differenzierung von aktivierten T-Zellen, welches von ihnen selbst synthetisiert wird [15].

1.1.3 HLA-Typisierung

Die im vorherigen Abschnitt erwähnte Antigenerkennung erfolgt über gebundene Peptide an HLA-I und HLA-II-Molekülen. Dieses Transmembranglykoprotein kann Aminosäuresequenzen binden und fungiert so als stabiler Ligand für den T-Zell-Rezeptor [16]. T-Zellen agieren somit, anders als die humorale Immunantwort, nicht direkt mit Pathogenen oder Proteinen [17]. Für die Klasse I der HLA werden die drei Gene der alpha-Kette des Moleküls HLA-A,-B und C und für die Klasse II die Gene der alpha- und beta-Kette HLA-DR,-DP und -DQ und ein zusätzliches Gen exprimiert [5, 18, 19]. Diese Polygenie vergrößert die Bandbreite der möglichen Peptidpräsentationen dieser Moleküle in jedem Individuum [20]. Zudem sind diese Gene polymorph, das heißt es gibt verschiedene Allotypen dieser Gene. Jeder Mensch erbt eine Hälfte seiner Allele vom Vater und die andere Hälfte von der Mutter. Diese beiden Haplotypen werden codominant exprimiert. Somit exprimiert der Mensch sechs HLA-Moleküle pro Klasse und durch zusätzliche Allelvariationen in der menschlichen Population, ergibt sich ein heterozygoten codominantes Expressionsmuster der HLA-Moleküle und dadurch eine stark individualisierte Immunantwort auf Pathogene [21, 22]. Während HLA-I auf fast allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert wird, sind HLA-II-Moleküle gesondert auf antigenpräsentierenden Zellen angelegt [23]. Die beiden Moleküle unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrer Spannweite der Peptidbindungsstelle und den Verankerungsresten, die bei

HLA-II-Molekülen, im Gegensatz zu HLA-I, die Peptidenden frei zugänglich lässt [24-26]. Während die Länge der HLA-I-Molekülsequenzen 8 bis 10 Aminosäuren umfasst [27], ist die Länge an HLA-II-Molekülen nicht in dem Maße eingeschränkt [22]. Durch die für ein HLA-Molekül spezifisch bindenden Verankerungsreste, auch als Sequenzmotiv bezeichnet, lassen sich die potenziell bindenden Peptide identifizieren [5]. Die Bindungsdiversität der HLA-Moleküle betrifft vor allem die Bereiche, die für die Peptidbindung verantwortlich sind. Dadurch ergibt sich für jeden Allotyp ein eigenes Spektrum an potenziellen Peptidbindungen [16, 28]. Heutzutage können mit Hilfe von Algorithmen und Datenbanken (wie zum Beispiel SYFPEITHI) die Peptide, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eine Bindung mit einem HLA-Molekül eingehen können, identifiziert werden [29]. Die in dieser Arbeit verwendeten HLA:Peptide wurden auf diese Weise ausgewählt und in der Studie „*SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition*“ von Nelde et al. genauer analysiert und zur Stimulation der T-Zellen herangezogen (s. Abb. 1) [30].

1.1.4 Immunologisches Gedächtnis

Es können sich sowohl aus B-Zellen als auch aus T-Zellen langlebige Gedächtniszellen bilden, die bis zum erneuten Eintreffen des Krankheitserregers in einem streng regulierten Ruhestadium verweilen [31, 32]. Dieses immunologische Gedächtnis kann man sich zu Nutzen machen, indem man Memory T-Zellen, wie in dieser Arbeit, mit an HLA gebundenen Peptiden stimuliert und die daraus resultierende Immunantwort misst. Anders als bei den B-Zellen kommt es bei T-Zellen mit erneutem Kontakt mit einem Pathogen oder im Laufe einer Infektion nicht zu einer Affinitätsreifung oder Klassenwechsel des Antigenrezeptors. Dies bedeutet aber auch, dass die Charakterisierung einer Memory T-Zelle im Vergleich zur B-Zelle schwieriger ist [33]. Memory T-Zellen können anhand verschiedener Oberflächenmarker erkannt werden, die sie von anderen, beispielsweise naiven T-Zellen unterscheiden. Diese Unterschiede beziehen sich auch auf Teilungsrate, Apoptose und Reaktion auf externe Reize. Sie können auch länger in der Peripherie überleben als naive T-Zellen oder T-Effektorzellen [34]. Es gibt drei Arten von Memory T-Zellen jeweils für CD4+ und CD8+ T-Zellen. Zentrale Memory T-Zellen und Memory Effektorzellen können im

Blut vorhanden sein, während geweberesidente Memory T-Zellen in verschiedenen Epithelien anzutreffen sind [35-37]. Zudem bilden zum Beispiel CD8+ Memory T-Zellen bei erneutem Antigenkontakt deutlich mehr und schneller INF- γ . Des Weiteren sind CD4+ T-Zellen, IL2- und CD40- Signale maßgeblich an der Entstehung von solchen CD8+ Memory T-Zellen beteiligt [38-40]. Außerdem können Memory T-Zellen die Proliferation von naiven T-Zellen bei gleichem Antigenkontakt beziehungsweise gleichen Epitopen unterdrücken und somit eine zielgerichtete und schnellere Immunantwort auslösen [41]. Gerade nach Exposition mit hochpotenten, schnell replizierenden und immunausweichenden Viren werden CD4+ Memory T-Zellen aktiv und sorgen meistens für eine Abmilderung von, oder sogar für einen Schutz vor Reinfektionen [42, 43]. SARS-CoV-2-spezifische Memory CD4+ und CD8+ T-Zellen persistieren nach aktuellem Forschungsstand mindestens ein Jahr und sind noch heute Gegenstand intensiver Forschungen [44].

1.1.5 Kreuzreaktivität von T-Zellen

In diesem Zusammenhang ist auch die Kreuzreaktivität von T-Zellen zu nennen, die eine Erkennung ähnlicher Epitope von verschiedenen Virusarten oder sogar verschiedener Pathogene erlaubt und auch bei der Abwehr von SARS-Cov-2 eine wichtige Rolle spielen könnte [41],[45]. Dadurch könnte eine heterologe Immunität gegen einen Krankheitserreger nach der Exposition gegenüber einem nichtidentischen Krankheitserreger ermöglicht werden [46-48]. Diese Kreuzreaktivität der T-Zellen kann zu einer Abmilderung oder auch zu einem Aggravieren der Symptome führen [49]. Diese Beobachtung konnte beispielsweise bei einer Epstein-Barr-Virus-Infektion und bestehender Influenza-Immunität gezeigt werden [50, 51]. Nelde et al. haben die in dieser Studie verwendeten kreuzreaktiven T-Zell-Epitope für SARS-CoV-2, die Ähnlichkeit mit humanen Coronaviren haben, identifiziert und charakterisiert [30].

1.2 SARS-CoV-2

1.2.1 Allgemeines

Das seit 2019 persistierende Coronavirus SARS-CoV-2 wurde erstmals in Wuhan, China beschrieben. Der Wildtyp des Virus persistierte lange in der Bevölkerung. Ende 2020 traten dann die ersten Mutationen und damit auch Veränderungen auf [52]. Die weltweite Pandemie ist bis heute Gegenstand zahlreicher Forschungen, konnte aber vielerorts durch die rapide RNA-Impfstoffentwicklung und Isolationsmaßnahmen im Jahr 2023 langsam eingedämmt werden. Das zur Gattung der Betacoronaviren gehörende, behüllte RNA+ Virus gelangt über sein Spikeprotein in die Wirtszelle. Spikeprotein, Hüllprotein, Membranprotein und Nukleokapsidprotein des SARS-CoV-2 dienen als Antigene für das menschliche Immunsystem und Peptide dieser Proteine können im Kontext von HLA zur T-Zell-Stimulation präsentiert werden. Die Infektion hat heterogene Merkmale. Sie besitzt von asymptomatisch bis zu letal eine große Bandbreite an möglichen Krankheitsverläufen. Der Krankheitsverlauf und die Schwere einer Infektion ist nach aktuellem Forschungsstand multifaktoriell durch den Virus selbst, die Genetik des Wirtes, die Wirtreaktion und Umweltfaktoren bedingt. Das Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE 2) und die Transmembranserinprotease 2 (TMPRSS) ermöglichen dem Virus den Eintritt in die Wirtszelle. Diese sind an vielen Organsystemen beispielsweise Alveolarepithel, Darmmukosa und Riechepithel exprimiert. Diese Vielfalt an möglichen Eintrittspforten könnte ein Beweis für die Symptomvielfalt von SARS-CoV-2 sein [53]. Sowohl individuelle Immunprozesse der angeborenen und adaptiven Immunabwehr aber auch die direkte Pathogenität des Virus könnten für die unterschiedliche Verläufe verantwortlich sein. Manche Risikofaktoren für einen schweren Krankheitsverlauf wie höheres Alter oder Vorerkrankungen wie Diabetes und Herz-Kreislauferkrankungen wurden jedoch mehrfach belegt [54]. Die Schwere der Infektion korreliert mit dem Alter, so steigt beispielsweise die Fallsterblichkeitsrate ab 60 Jahren an [55]. Die Hospitalisierungsrate ist stark abhängig von Alter, sowie Vorerkrankungen und Risikofaktoren. Bei Kindern beträgt sie etwa 4%, wobei vor allem Kinder <1 Jahre und mit Vorerkrankungen

ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende Verläufe aufweisen. Trotzdem ist diese Rate weit unter der von Erwachsenen [56]. Trotz aller Maßnahmen steigen die Infektionsraten seit dem Wildtyp über die Omicronvarianten (BA.1-BA.5) bei Kindern an, wobei es weiterhin bei eher mildereren Verläufen bleibt [57]. Zusätzlich ist die Vakzinierungsrate unter 12 Jahren deutlich unter 50 % (USA, Stand 2023) [58] und aufgrund der milden Verläufe wird eine hohe Dunkelziffer der Infektionen bei Kindern angenommen [59]. Die Unterschiede in der Krankheitsschwere und den Infektionsverläufen der Kinder zu den Erwachsenen könnten durch eine andere adaptive zelluläre oder/und humorale Antwort bei Kindern erklärt werden [60]. Darunter fällt auch das seltene Multisystem-Entzündungssyndrom (MIS-C) das hauptsächlich bei Kindern auftritt und im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 nachgewiesen wurde [61].

1.2.2 Immunantwort bei SARS-CoV-2

Nach aktuellem Forschungsstand sorgen frühzeitig induzierte SARS-CoV-2 spezifische T-Zellen für einen milderen Verlauf und schnellere virale Eliminierung [62]. Dieses Muster zeigte sich auch bei verwandten Viren wie zum Beispiel dem Middle Eastern Respiratory Syndrome Virus (MERS) und bei SARS-CoV-1. Hierbei stellte sich heraus, dass die zelluläre Immunantwort gegen diese viralen Pathogene länger persistiert als die humorale Antwort [30, 63]. Die wichtige Rolle der zellulären Immunantwort wird zudem durch die quantitativ hohe CD4+ Antwort (100%) und CD8+ Antwort (70%) bei Infizierten untermauert [64]. Die Frage nach der Heterogenität der Viruserkrankung bleibt bis heute bestehen und ist immer noch Gegenstand aktueller Forschungen. Begrenzte experimentelle Beweise zeugen von einer Pathogenität des Virus an sich. Die meisten Forschungen deuten auf die Immunreaktion des Wirtes als wesentlicher Faktor für die Schwere des Krankheitsverlaufes hin [53, 65]. Der wichtigste klinische Risikofaktor für einen schweren Verlauf bei Ungeimpften ist das Alter und die dadurch veränderte angeborene und adaptive Immunantwort. So wurde festgestellt, dass Ältere weniger plasmacytoide dendritische Zellen besitzen. Dieser Mangel geht mit einer verringerten Interferonproduktion vom Typ I einher und könnte somit zum Fortschreiten der Virusexpansion führen [65]. Diese plasmacytoiden dendritischen Zellen sind Teil der angeborenen Immunantwort

und bilden bis zu 1000-fach mehr Interferon bei Virusinfektionen, als andere Körperzellen [66]. Zudem besitzen ältere Menschen einen geringeren Pool an naiven T-Zellen und haben somit ein verringertes Repertoire an T-Zellen, die auf ein spezifisches und neues Antigen reagieren können. Dies wurde als weiterer Risikofaktor für einen schweren Krankheitsverlauf beschrieben [54]. Auch eine Immundysregulation, die mit einer verzögerten angeborenen Interferonreaktion, verzögerter adaptiver Immunität und überschwänglicher Entzündungsreaktion einhergeht, könnte eine zentrale Rolle in der Immunantwort gegen SARS-CoV-2 spielen [67, 68]. Manche dieser Effekte sind bis zu der Rekonvaleszenzphase anhaltend und könnten für die Spätsymptomatik bei den Post- und Long-Covid-Syndromen verantwortlich sein [69-71]. Eine mangelnde Koordination der adaptiven Immunantwort wurde ebenfalls mit dem Schweregrad der Erkrankung in Zusammenhang gebracht. Neueste Erkenntnisse sprechen generell dafür, dass eine funktionierende T-Zell-Antwort für die Beseitigung des Virus, eine Infektion ohne Serokonversion, eine robuste Gedächtnisreaktion und die Erkennungen von Virusvarianten eine maßgebliche Rolle spielen könnte [69].

Die momentan zirkulierenden Omicronvarianten sorgen für eine höhere Inzidenz, auch bei bereits Geimpften und sie befallen vor allem die oberen Atemwege. Eine bereits bestehende T-Zell-Antwort nach erfolgter Impfung oder vorheriger Infektion wäre eine zusätzliche Erklärung für die Abschwächung der Symptomatik bei einer Infektion mit Omicron [72, 73]. Eine Metaanalyse zeigt jedoch, dass der Schutz durch eine vorherige Infektion bei dieser Variante (BA.1) geringer ausfällt als bei den vorherigen Varianten. Der Schutz vor schweren Krankheitsverläufen blieb jedoch weiterhin hoch [74]. Deswegen ist eine Überwachung der Virusevolution wichtig, um Epidemien und auch Impfstrategien besser einschätzen zu können [75]. Die in dieser Arbeit untersuchte Population konnte sich Mitte 2020 mit der weltweiten dominanten und lang persistierenden Variante D614G infizieren. Besorgniserregende Varianten (VOCs) Alpha, Beta, Delta und Gamma wurden erstmals Ende 2020 bis Anfang 2021 beschrieben [76].

Zu Beginn der Pandemie wurden milde und asymptomatische Infektionen in Familien nur teilweise untersucht. Die Forschungsschwerpunkte konzentrieren

sich vor allem auf Erwachsene und schwere Verläufe. Diese Arbeit verknüpft obengenannte Inhalte, um mögliche Antworten auf nachfolgende Thesen zu finden.

1.3 Fragestellung der Arbeit

Diese Arbeit beinhaltet die Untersuchung der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Immunantwort anhand von Peptidstimulation in Familien, in denen mindestens ein Mitglied nachweislich mit SARS-CoV-2 infiziert war. Außerdem wurden die Daten mit dem Serostatus und mit zu einem früheren Zeitpunkt post infektionem aufgenommenen T-Zell-Daten verglichen. Folgende Themen werden nachfolgend experimentell und statistisch analysiert:

- 1) Gibt es erkennbare Unterschiede in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort zwischen den beiden Subgruppen „Kinder“ und „Erwachsene“ und ist die experimentelle Methodik geeignet, diese Unterschiede aufzuzeigen?
- 2) Gibt es eine Korrelation der spezifischen T-Zell-Antwort zur humoralen B-Zell-Antwort?
- 3) Wie verhalten sich die T-Zell-Daten im zeitlichen Verlauf innerhalb der obengenannten Subgruppen?
- 4) Ist ein Zusammenhang von spezifischer und kreuzreaktiver T-Zell-Antwort erkennbar und gibt es einen Unterschied in den Subgruppen?
- 5) Kann über die Durchseuchung in den Familien auf das pandemische Geschehen im Jahre 2020 rückgeschlossen werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Sterilbänke	HERAsafe HS18 Safety Bench, Heraeus, Hanau, Deutschland Biowizard Silver SL-170 Class II, Kojair, Vilpulla, Norwegen
Wasserbad	WB 7, Memmert, Schwabach, Deutschland
37°C-Inkubator	CO ² -Inkubator BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifugen	Rotina 420 R (1), Hettich, Vlotho, Deutschland Eppendorf Centrifuge 5810, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschränke	
4 °C	Sanyo Freeze, Sanyo, Japan
-20 °C	Liebherr Premium, Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
-80 °C	HERAFreeze HFU T Series, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Stickstofftank	MVE HECO Series 1500-900, Frankfurt, Deutschland
Vortex	Neolab 7-2020, Neolab, Heidelberg, Deutschland
Minizentrifuge	Neolab 7-0040, Neolab, Heidelberg, Deutschland
Pipetboy	Pipetboy Thermo Scientific Inetgra, Waltham, USA
Pipetten	
1,10,100,200,1000 µl	Eppendorf Research Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multikanal 100 µl	Discovery Comfort, HTL, Warszawa, Polen
Einfrierhilfe	Mr. Frosty, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
ImmunoSpot Series 6	
Ultra-V-Analyzer	CTL Europe GMBH, Bonn, Deutschland
FACS	BD Canto II, BD BioSciences, Franklin Lakes, USA
Hämatologische Analyse bzw. Zählung	Hematology analyzer advia 2120, Siemens, Berlin, Deutschland
Mikroskop	Olympus IX50, Olympus, Tokio, Japan

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Kulturplatten	
48-Well	Corning, New York, USA
96-Well	Greiner-Bio, Kremsmünster, Österreich

Stripetten 5,10,25,50 ml	Corning, New York, USA
Falcons 15, 50 ml	Corning, New York, USA
Cryovials	Greiner-Bio, Kremsmünster, Österreich
Eppendorf Tubes 500,1500,2000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, San Jose, USA
Pipettenspitzen 10,100,1000 µl	Corning, New York, USA
Pipettenspitzen unsteril 200 µl	Corning, New York, USA
Reservoirs 25,100 ml	VWR, West Schester, USA
Ethanol 99%	SAV Liquid Production, Flintsbach, Deutschland
Isopropanol 70%ig	SAV Liquid Production, Flintsbach, Deutschland
Ampuwa Aqua	Fresenius KABI, Bad Homburg, Deutschland
Descosept	Dr.Schumacher, Malsfeld, Deutschland
Deckgläser Zählkammer	Laboroptik, Lancing, United Kingdom

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Phosphate Buffered	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Saline (PBS)	
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium	Gibco/ life technologies, Carlsbad, USA
Iscove's Modified	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Dublbecco's Medium	
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/ life technologies, Carlsbad, USA
Biocoll Separating Solution	Bio&Sell, Feucht, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin (10.000 U/ml) + Streptomycin (10.000µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Tween 20	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Phytohämagglutinin-L (PHA-L)	Roche, Karlsruhe, Deutschland
Staphylococcal Enterotoxin B (SEB)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
AB-Humanserum	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Ionomycin von Streptomyces conglobatus	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Phorbol 12-myristate 13- acetate (PMA)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
DNase I	Roche, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, St.Louis, USA

2.1.4 Zytokine

Humanes Interleukin 2	Novartis Ag, Basel, Schweiz
Humanes Interleukin 7	PeptoTech, Cranbury, USA

2.1.5 HLA:Peptide

Die verwendeten Peptide stammen aus der Studie „SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition“ von Nelde et al. [30] und wurden im Rahmen einer Kooperation vom Autor der Studie bereitgestellt. In der Studie wurden zunächst algorithmusbasiert HLA-Klasse-I und -DR bindende Peptide identifiziert und für die häufigsten HLA-Allele ausgewählt, die die Weltbevölkerung zu 91,7 % (I) bzw. 70,6 % (DR) abdecken. Diese HLA:Peptide wurden dann an PBMC-Proben von nicht exponierten und SARS-CoV-2 rekonvaleszenten Erwachsenen unter anderem mittels ELISPOT weiter charakterisiert. Untenstehende Abbildung spiegelt das Ergebnis dieser Studie wider. Die untersuchten Peptide wurden anhand der gemessenen

Immunantworten in verschiedenen Kohorten (pre- und post pandemisch / Infektion) in Gruppen unterteilt. Sowohl für HLA Klasse I als auch für HLA-DR wurden jeweils SARS-CoV-2 spezifische und kreuzreaktive Epitopgruppen identifiziert. Die kreuzspezifischen Epitope stimmen strukturell mit anderen humanen Coronaviren (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1) überein. Die Peptide wurden einzeln bereitgestellt und anschließend für die Stimulation der PBMCs in vier Peptidmische zusammengefügt. Im Nachfolgenden wird für die spezifischen HLA-Klasse-I-Peptide der laborinterne Begriff „SI“, für die kreuzreaktiven HLA-Klasse-I-Peptide „CI“, für die spezifischen HLA-Klasse-II/DR-Peptide „SII“ und für die kreuzreaktiven HLA-Klasse-II/DR-Peptide „CII“ verwendet. Die Aminosäuresequenzen stammen jeweils aus viralen Bestandteilen von Spike-, Hüll-, Membran- und Nucleokapsidprotein, alles Ansatzpunkte für eine zielgerichtete T-Zell-Immunantwort. Die HLA:Peptide der Negativkontrollen wurden aus dem Antigenrepertoire von Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) und menschlichen Proteinen zusammengestellt. (s. Abb. 2)

HLA class I T cell epitope compositions							
SARS-CoV-2-specific EC				Cross-reactive EC			
Peptide ID	Sequence	ORF	HLA restriction	Peptide ID	Sequence	ORF	HLA restriction
A01_P02	LTDEMIAQY	ORF2 spi	A*01	A01_P01	TTDPSFLGRY	ORF1	A*01
A02_P03	ALSKGVHFV	ORF3	A*02	A01_P05	RTFKVSIWNLDY	ORF6	A*01
A02_P09	LLLLDRLNQL	ORF9 nuc	A*02	A03_P01	KLFAAETLK	ORF1	A*03
A03_P07	QLRARSVSPK	ORF7	A*03	A24_P02	QYIKWPWYI	ORF2 spi	A*24
A03_P08	KTFPPTPEPKK	ORF9 nuc	A*03	B08_P05	TPKYKFVRI	ORF1	B*08
A11_P01	ASMPPTIAK	ORF1	A*11	B08_P08	DLKGGKYVQI	ORF1	B*08
A11_P08	ATEGALNTPK	ORF9 nuc	A*11	B08_P10	EAFKEMVSL	ORF1	B*08
A24_P01	VYIGDPAQL	ORF1	A*24	B40_P04	YEGNSPFHPL	ORF7	B*40
A24_P03	VYFLQSINF	ORF3	A*24	B40_P09	IEYPIIGDEL	ORF1	B*40
B07_P08	FPRGQGVPI	ORF9 nuc	B*07				
B07_P10	NPANNAIVL	ORF9 nuc	B*07				
B08_P07	FVKHKHAFI	ORF1	B*08				
B40_P03	SELVIGAVIL	ORF5 mem	B*40				
B40_P06	MEVTPSGTWL	ORF9 nuc	B*40				
C07_P03	YYQLYSTQL	ORF3	C*07				
C07_P04	NRFLYIIKL	ORF5 mem	C*07				

HLA-DR T cell epitope compositions							
SARS-CoV-2-specific EC				Cross-reactive EC			
Peptide ID	Sequence	ORF	HLA restriction	Peptide ID	Sequence	ORF	HLA restriction
DR_P06	IGYYRRATRRIRGGD	ORF9 nuc	DR	DR_P01	KDGIWVATEGALNT	ORF9 nuc	DR
DR_P09	AIVLQLPQGTTLPKG	ORF9 nuc	DR	DR_P02	GTWLTGTGAIKLDDK	ORF9 nuc	DR
DR_P10	YKHWPIAQFAPSAS	ORF9 nuc	DR	DR_P03	RWYFYLLGTGPEAGL	ORF9 nuc	DR
DR_P16	LSYYKLGASQRVAGD	ORF5 mem	DR	DR_P04	ASWFTALTQHGKEDL	ORF9 nuc	DR
DR_P20	INVFAFPFTIYSLLL	ORF10	DR	DR_P05	ASAFFGMSRIGMEVT	ORF9 nuc	DR
				DR_P07	LLLLDRLNQLQESKMS	ORF9 nuc	DR
				DR_P15	FYVYSRVKNLNSSRV	ORF4 env	DR
				DR_P17	IWNLDYIINLIKNL	ORF6	DR
				DR_P18	QEEVQELYSPIFLIV	ORF7	DR
				DR_P19	SKWYIRVGARKSAPL	ORF8	DR

Abbildung 1: SARS-CoV-2-spezifische und kreuzreaktive HLA-Klasse I und HLA-Klasse DR T-Zell-Epitope. ID = Identifikationsnummer, ORF = Open Reading Frame, Sequence = Aminosäuresequenz, spi = spike protein, env = envelope protein, mem = membrane protein, nuc = nucleocapsid protein von Nelde et al.:[30]

Sequence	HLA restriction	Source protein	Organism
GSEELRSLY	A*01	POL_HV1BR	Human immunodeficiency virus
YLLPAIVHI	A*02	DDX5_HUMAN	Homo sapiens
RLRPGGKKK	A*03	GAG_HV1BR	Human immunodeficiency virus
ASEDYVAPPK	A*11	MKX_HUMAN	Homo sapiens
AYVHMVTHF	A*24	BI1_HUMAN	Homo sapiens
TPGPGVRYPL	B*07	NEF_HV1BR	Human immunodeficiency virus
DIAARNVL	B*08	FAK1_HUMAN	Homo sapiens
RLRPGGKKKY	B*15	GAG_HV1BR	Human immunodeficiency virus
GELDRWEKI	B*40	GAG_HV1BR	Human immunodeficiency virus
KYFDEHYEY	C*07	CKS2_HUMAN	Homo sapiens
ETVITVDTKAAGKGG	DR	FLNA_HUMAN	Homo sapiens

Negative control peptides with their respective HLA restrictions used for IFN- γ ELISPOT assays and intracellular cytokine stainings. HV1BR, human immunodeficiency virus type 1 group M subtype B; POL, Gag-Pol polyprotein; DDX5, Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5; GAG, Gag polyprotein; MKX, Homeobox protein Mohawk; BI1, Bax inhibitor 1; NEF, Protein Nef; FAK1, Focal adhesion kinase 1; CKS2, Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2; FLNA, Filamin-A.

Abbildung 2: Peptide für die Negativkontrollen, Sequence = Aminosäuresequenz, source protein = Quelle des Antigens, organism = Organismus von Nelde et al.:[30]

2.1.6 Medien

Medium	Zusammensetzung
Auftaumedium	500 ml IMDM 150 µl DNase 5 ml Penicillin/Streptomycin
T-Zell-Medium (TCM)	500 ml IMDM oder RPMI mit 5 ml L-Glutamin 50 ml AB Humanserum 5 ml Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	FCS 90 % DMSO 10 %

2.1.7 ELISPOT-Assay Materialien

Anti-human IFN- γ mAb 1-D1K	Mabtech, Stockholm, Schweden
MultiScreenHTS-HA, 0,45 µm, opak, steril	Merck, Darmstadt, Deutschland
Anti-human IFN- γ mAb 7-B6-1, biotinylated	Mabtech, Stockholm, Schweden
BCIP/ NBT Tabletten	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
ExtrAvidin® – Alkalische Phosphatase	Sigma Aldrich, St.Louis, USA

2.1.8 Durchflusszytometrie Materialien

Medium	Zusammensetzung
PBS + EDTA	500 ml PBS 2mM EDTA
FACS Puffer (Pefa)	500 ml PBS 2 % FCS 2mM EDTA 0,02% NaAzid
FACS Puffer + Privigen	500 ml PBS 1 % FCS 2 mM EDTA 0,02% NaAzid 50 µg/ml Flebo-g

FACS-Antikörper					
Spezifität	Bezeichnung	Klon	Isotyp	Herkunft	Firma
CD 3	PB (Pacific Blue)	UCHT1	IgG1, κ	Maus	Biolegend, Koblenz, Deutschland
CD 4	PerCP	OKT4	IgG1, κ	Maus	
CD 8	FITC	SK1	IgG1, κ	Maus	
CD 14	Pe-Cy7	HCD14	IgG1, κ	Maus	
CD 45	BV510	HI30	IgG1, κ	Maus	
CD 19	APC	HIB19	IgG1, κ	Maus	BD, Franklin Lakes, USA
Andere Antikörper und Beads					
Vitalitätsfarbstoff eFluor780™		ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA			
Negative Beads		ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA			
ArC™ negative Beads		Life Technologies, Eugene, USA			
AbC™ Total Compensation Capture Beads		ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA			
ArC™ reactive Beads					

2.1.9 Software

ImmunoSpot Analysis

C.T.L. Europe GmbH, Bonn, Deutschland

Software 5.1

Office 2019

Microsoft, Redmond, Washington USA

GraphPad Prism 8

Dotmatics, San Diego, Kalifornien, USA

FlowJo

FlowJo™ Software and BD®, Ashland, Oregon, USA

2.2 Methodik

2.2.1 Studiendesign

Die epidemiologische Studie wurde im Rahmen der SARS-Cov2-Infektions- und Seroprävalenzerhebung bei betroffenen Familien in Baden-Württemberg in Kooperation mit den Universitätskliniken Ulm, Freiburg und Heidelberg erhoben. Außerdem handelte es sich um eine kooperative Studie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen unter der Studienleitung von Prof. Dr. med. Peter Lang, Dr.med. Hanna Renk, Prof. Thomas Iftner und Dr. biol. hum. Corinna Engel. In zwei Abschnitten wurden die spezifischen und kreuzreaktiven Immunantworten der T-Zellen bei betroffenen Familien in Tübingen untersucht. Es wurden diejenigen Familien eingeschlossen, in denen vorab entweder mindestens ein positiv getestetes Familienmitglied mittels PCR oder/und nach Symptomatik eine positive Serologie vorhanden war. Zusätzlich wurde der Antikörperstatus der Probanden mittels MULTICOV-AB IgG oder IgA, Roche pan-Ig, EuroImmuno IgG oder IgA und Siemens IgG untersucht. Zudem wurden Alter, Geschlecht, Symptome, eingenommene Medikamente und Hospitalisierungsrate mittels Fragebögen erfasst. Außerdem wurde, wenn möglich, ein PCR-Abstrich nach Infektion bei den Familienmitgliedern abgenommen. Der erste Abschnitt der Rekrutierung erfolgte im Zeitraum von 11.07.2020-09.08.2020, circa 3-4 Monate nach Infektion (Median: 109 Tage), im Folgenden als T1 abgekürzt. Insgesamt nahmen 487 Probanden an der Studie teil. Hierbei wurden 286 Probanden für die ersten T-Zell-Untersuchungen rekrutiert. Zur Folgestudie wurden die gleichen Familien zwischen 06.02.21-14.03.2021, circa 11-12 Monate nach Infektion (Median: 340 Tage), im Folgenden als T2 abgekürzt, erneut eingeladen. Es nahmen 103 Familien mit jeweils 1-7 Mitgliedern an der Studie teil. Schlussendlich konnte im zweiten Abschnitt bei 385 Probanden die T-Zell-Antwort untersucht werden. Zudem wurden 35 PBMC-Proben aus laborinternem Bestand von den Jahren 2013-2019 als Negativkontrollen zur Studienpopulation mit den SARS-CoV-2-Peptidmischen stimuliert.

Abhängig vom Körpergewicht wurde den Kindern Blut abgenommen (<10 kg: 10 ml, 10-30 kg: 20 ml, >30 kg: 30 ml). Bei den Erwachsenen waren es im Durchschnitt 30 ml Blut in EDTA-Röhrchen. Im Zuge der Blutentnahme wurden die Röhrchen pseudonymisiert und mit einer internen Codierung beschriftet. Die Probanden wurden im Sinne des „Informed Consent“ über die Studie und Risiken der Blutentnahme informiert. Die Ethikgenehmigung wurde von der unabhängigen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen erteilt (293/2020BO2). Die schriftliche Einwilligung der erwachsenen Teilnehmer sowie der Eltern oder Erziehungsberechtigten im Namen ihrer Kinder wurde zu beiden Entnahmezeitpunkten eingeholt. Die Entscheidung der Kinder, ob sie eine Blutprobe abgeben wollten oder nicht, wurde durchgehend respektiert. Diese Studie wurde beim Deutschen Register für Klinische Studien (DRKS) unter der Studien-ID 00021521 registriert, gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt und gemäß den STROBE-Richtlinien (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) konzipiert, analysiert und berichtet. Das vollständige Studienprotokoll ist zu finden unter: (https://www.drks.de/drks_web/navigate.do?navigationId=trial.HTML&TRIAL_ID=DRKS00021521).

2.2.2 PBMC-Isolierung

2.2.2.1 Prinzip

Um PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) vom peripheren Blut zu trennen, findet eine Dichtegradientenzentrifugation mit einer Biocoll-Trennlösung statt. Diese Lösung, welche auf eine Dichte von 1,077g/ml eingestellt ist, ermöglicht eine Separation von PBMCs zu anderen Blutbestandteilen. Die weißliche Schicht der PBMCs liegt nach der Zentrifugation (800 g, 30 min, 21°C) auf der Trennlösung unter dem Plasma und kann mit einer Pipette zur weiteren Verarbeitung abgenommen werden. Die Waschungen dienen zur Aufreinigung und Entfernung der Thrombozyten aus dem PBMC-Gemisch.

2.2.2.2 Durchführung

Das Blut der Studienteilnehmer wurde steril in 50 ml Falcons transferiert und mit PBS gespült, um auch Restbestände in die Falcons zu überführen. Anschließend

wurde bei 1950 g für 7 Minuten Plasma abzentrifugiert und davon 1 ml in Cryovials eingefroren. Danach wurde das restliche Blut mit PBS auf 50 ml im Falcon aufgefüllt. In zwei Falcons wurden jeweils 15 ml Ficoll-Trennlösung vorgelegt. Nun folgte das Schichten von jeweils 25-30 ml des Blutgemisches auf die Trennlösung mittels Pipettierhilfen. Danach folgten die oben beschriebene Dichtegradzentrifugation und Abnahme der PBMCs. Diese wurden in einem Falcon gesammelt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Danach erfolgte die erste Waschung in der Zentrifuge mit 500 g für 10 Minuten. Bei den nachfolgenden drei Waschungen wurde der Überstand verworfen, wiederum mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, resuspendiert und bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde, nach dem Verwerfen des Überstandes und Befüllung mit PBS, eine Zählprobe entnommen und diese mit einem hämatologischen Analyser gemessen. Darauffolgend wurde ein letztes Mal 10 Minuten mit 300 g zentrifugiert.

2.2.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurde nach der letzten Zentrifugation der Überstand verworfen und das Zellpellet in 700 µl Einfriermedium aufgenommen. Diese Suspension wurde in ein Cryovial überführt. Nun wurde das Falcon mit 700 µl Einfriermedium erneut gespült und die Suspension in das Cryovial überführt. Die Cryovials wurden zuerst in Einfrierhilfen bei -80°C gelagert, um ein optimales Herunterkühlen zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Proben, meist 4 Tage später, im Stickstofftank eingelagert

2.2.4 Ansetzen der Zellkultur

Pro Auftauzyklus wurden 16 Proben bearbeitet. Jede Probe wurde einzeln bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, bis nur noch in der Mitte des Vials ein Eiskern vorhanden war. Daraufhin wurde tröpfchenweise 1 ml Auftaumedium zugegeben und danach der gesamte Inhalt nach Resuspension in ein Falcon mit 10 ml Auftaumedium überführt. Für einen zellschonenden Auftauprozess wurden die Falcons mit dem Medium vor und nach dem Auftauen der PBMCs bei 4°C gelagert und auch zentrifugiert. Nach der ersten Zentrifugation (350 g, 7 Minuten) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 10 ml kaltem Auftaumedium

resuspendiert. Danach wurde 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Tripanblau gemischt und 10 µl dieser Suspension unter dem Mikroskop in einer Neubauer Zählkammer genutzt, um die genaue Zellzahl zu bestimmen. Nach der zweiten Zentrifugation (350 g, 7 Minuten) wurden die Zellen auf eine Konzentration von 10 Millionen Zellen pro Milliliter im warmen Kultivierungsmedium (TCM) verdünnt. Anschließend wurden 2,5 Millionen Zellen in 250 µl auf einer 48-Wellplatte kultiviert. Hierbei wurden pro Probe fünf Wells angesetzt. Davon wurden vier für die Peptidstimulationen (SI, SII, CI, CII) und das letzte wurde als „Kontrollwell“ angesetzt. Wenn die gesamte Probe mehr als 10 Millionen Zellen enthielt, wurden 375 µl Zellsuspension für die Kontrolle verwendet. Dadurch konnte später im ELISPOT-Verfahren ein Sechserpaar aus dem „Kontrollwell“ erstellt werden. Bei einer niedrigeren Zellzahl wurden die Zellen in einer 96-Wellplatte mit U-förmigen Vertiefungen kultiviert, wobei jeweils 100 µl pro Well verwendet wurden. Die Zellkonzentration wurde auf 500.000 bis 800.000 Zellen pro 100 µl eingestellt. Um Austrocknung zu verhindern, wurden die übrigen ungenutzten Vertiefungen der Platten mit PBS gefüllt. Die Platten wurden bei 37 °C im Inkubator gelagert, wobei sie leicht geneigt wurden, um einen besseren Kontakt zwischen den Zellen zu gewährleisten.

2.2.5 Präsensitivierung

Die Präsensitivierung erfolgte als 12-tägige in vitro Stimulation der vorher isolierten PBMC-Proben. Die erste Peptidstimulation zur Expansion antigenspezifischer T-Zellen wurde am Tag nach dem Auftauprozess durchgeführt. Dabei wurde bei einer Zugabe von 250 µl TCM und damit einem Endvolumen von 500 µl pro Well eine Endkonzentration von 1 µg/ml für die HLA-I-Peptide und 5 µg/ml für die HLA-DR-Peptide angestrebt (s. Abb. 1). Bei der Kontrolle wurde 125 µl TCM hinzugegeben und mittels synthetischem HIV-Peptid mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml stimuliert. Die Zellen im „Kontrollwell“ wurden später im ELISPOT jeweils für Negativ-, als auch für Positivkontrollen verwendet.

Am Tag 2 wurde bei einem Endvolumen von 750 µl IL-2 (Endkonzentration: 10 U/ml, Stock: 20.000 U/ml) und IL-7 (Endkonzentration: 10 ng/ml, Stock: 10000

ng/ml) zugegeben. An Tag 5 wurde bei einem Endvolumen von 1000 µl erneut IL-2 (Endkonzentration: 10 U/ml, Stock: 20.000 U/ml) und IL-7 (Endkonzentration: 10 ng/ml, Stock: 10000 ng/ml) zugegeben. Abhängig vom Farbumschlag des Mediums wurde an Tag 7 und Tag 9 250 µl oder 500 µl Medium mit Interleukinen in obengenannter Endkonzentration ausgetauscht.

Bei der 96-Wellplatte wurden bei gleichbleibenden Peptid- und Interleukinkonzentrationen, die Volumina angepasst. An Tag 1 wurde mit einem Endvolumen von 150 µl pro Well die Peptidstimulation durchgeführt. Am Tag 2 mit einem Endvolumen von 200 µl wurden die Interleukine hinzugefügt. An Tag 5, 7 und 9 wurden 100 µl Medium pro Well abgenommen und 100 µl mit Interleukinen in obengenannten Endkonzentrationen hinzugegeben. Nach 12 Tagen wurde die Präsensitivierung mit Ansetzen des ELISPOTs beendet.



Abbildung 3: Schema zur Präsensitivierung von Tag 0 bis 12

2.2.6 ELISPOT

2.2.6.1 Prinzip

Der ELISPOT (enzyme-linked Immunosorbent Spot Assay) ist eine 1983 entwickelte Modifikation des ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent aAssay) und hat sich als Standard für das immuntherapeutische T-Zellmonitoring etabliert [77]. Durch die Detektion der Zytokinsekretion von Immunzellen auf einen Stimulus durch ein definiertes Antigen kann ein Rückschluss auf die Frequenz spezifischer Effektorzellen gemacht werden. Die Interferon- γ -Sekretion korreliert mit der antigen-spezifischen Zytotoxizität von T-Zellen [78]. Deswegen wird diese Methode in vielen immunologischen Studien genutzt, um antigen-spezifische T-Zellen zu detektieren. Die inerte Zusammensetzung aus Nitratzellulose und

Acetatzellulose der Membran auf der ELISPOT-Platte immobilisiert den ersten humanen IFN- γ -Antikörper. Nach darauffolgender Zugabe der PBMCs und dem Antigen kommt es zu einer antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen und somit zur Sezernierung von Interferon- γ (①). Der zugegebene Antikörper bindet an IFN- γ (②). Nach einer Inkubationszeit bei 37 °C wird ein zweiter, biotinylierter, IFN- γ -Antikörper genutzt, der ein anderes Epitop des IFN- γ erkennt und bindet (③). Die Zugabe eines Avidin-Enzym-Konjugats führt zu einer Bindung an diesem Antikörper (④). Die Spaltung des Substrats BCIP/NBT durch das Enzym führt zu einem Farbstoffausfall im IFN- γ -sezernierenden Areal der T-Zellen aus (⑤). Je nachdem welche Farbstoffreaktion und Enzymsubstrate genutzt werden, erscheinen die Areale in unterschiedlichen Färbungen. Diese gefärbten Areale („Spots“) können nun zur Analyse mittels eines automatisierten Lesegerätes herangezogen werden.

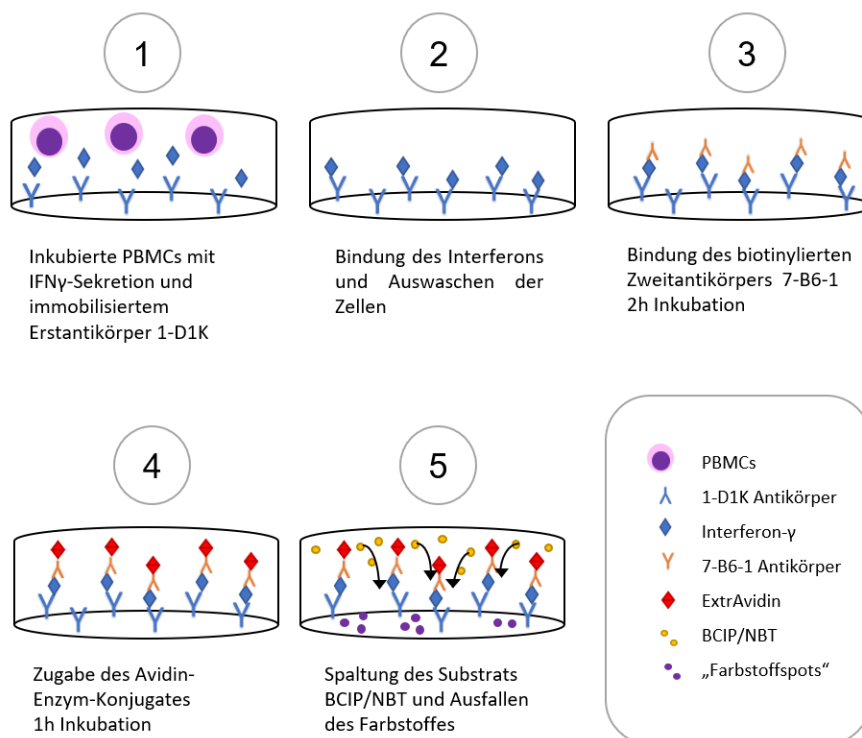


Abbildung 4: Prinzip des ELISPOTs in dieser Arbeit mit den in Material aufgeführten Reagenzien und Antikörper

2.2.6.2 Positivkontrollen

Positivkontrollen werden beim ELISPOT verwendet, um zu bestätigen, dass das oben beschriebene Prinzip korrekt funktioniert hat und um die Stimulierbarkeit der T-Zellen zu bestätigen. Bei Wells in den Stimulationen ohne Spots aber mit einem positiven Kontrollwell, konnte man davon ausgehen, dass die T-Zellen in der Lage sind, IFN- γ auszuschütten. Es fand jedoch keine Stimulation der PBMCs durch die HLA:Peptide statt und somit kann von einer negativen spezifischen oder kreuzreaktiven T-Zell-Antwort ausgegangen werden.

Aufgrund pandemiebedingter Lieferengpässe mussten wir auf alle drei der unten genannten Kontrollreagenzien bei der Beladung des ELISPOTs zurückgreifen. Phytohämagglutinin-L (PHA-L) bindet an den T-Zell-Rezeptor und löst eine Signalkaskade aus, die zu einer erhöhten T-Zell-Aktivierung und daraus resultierend zu einer erhöhten Ausschüttung von Interferon-gamma führt. „Phorbol 12-myristate 13-acetat“ (PMA) plus Ionomycin lösen als Gemisch durch direktes Eindringen in die T-Zelle über die Proteinkinase C und über den NFAT Signalweg eine Zytokinausschüttung aus. Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) führt als Superantigen von Staphylococcus aureus mit der Quervernetzung von T-Zell-Rezeptor und HLA II zu einer Aktivierung der Zelle und ebenfalls zu einer Interferonausschüttung. Da PMA bei einer Inkubationszeit von über 24 h die Zelllebensfähigkeit stört, ist es empfehlenswert PHA-L für längere Inkubationszeiten zu nutzen [73].

2.2.6.3 Vorbereitung und Beladen des ELISPOTs

Am 9. Tag der Präsensitivierung wurden pro Well 100 μ l mit dem Erstantikörper 1-D1K mit 4 μ g/ml Konzentration in die 96-Well-Mikrotiterplatten von Millipore gegeben. Die Platten wurden zum Schutz vor Austrocknung in Frischhaltefolie im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Anschließend mussten die Platten für mindestens 24 h im Kühlschrank verbleiben, damit die Bindung des Antikörpers an die Membran vollständig erfolgen konnte. Am Tag 12 wurden die Platten zuerst abgeflickt und dann jeweils zweimalig mit 200 μ l PBS gewaschen. Daraufhin wurde je Well 50 μ l TCM hinzugefügt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Dann folgte eine Inkubation der Platten für mindestens eine Stunde im

Inkubator bei 37°C. Währenddessen wurden die Zellen und Antigene vorbereitet. Die angesetzten Zellkulturen der vorherigen Präsensitivierung wurden resuspendiert und in 15 ml Falcons oder 1500 µl Eppendorf Röhren transferiert. Danach wurden alle Zellsuspensionen wie zuvor beschrieben unter dem Mikroskop gezählt (s. Präsensitivierung). Pro Probanden wurde ein Well mit spezifischer Peptidstimulation (SI oder SII), ein Well mit kreuzreaktiver Peptidstimulation (CI oder CII) und die Kontrolle ausgezählt. Nach 7 min Zentrifugation bei 350 g wurde der Überstand verworfen und die PBMCs in neues T-Zell-Medium überführt. Hierbei wurde die Mediummenge an die gewünschte Zellzahl pro Well im ELISPOT angepasst. Die Zellzahl wurde auf 200.000-500.000 PBMCs pro Well in 100 µl eingestellt. Falls die Zellen vorher in einer 96 Wellplatte kultiviert wurden, wurden die Zählproben nach vorheriger Resuspension direkt den Wells entnommen. Die gesamte Platte wurde daraufhin mit 350 g 7 Minuten zentrifugiert. Die Zellzahl wurde auf 200.000-500.000 PBMCs pro Well in 100 µl eingestellt.

Die Peptidverdünnungen wurden bei einem Endvolumen von 200 µl im ELISPOT mit den Endkonzentration 1 µg/ml pro HLA-Klasse-I Peptid (Stockkonzentration 1 mg/ml) und 5 µg/ml pro HLA-Klasse-II Peptid (Stockkonzentration 1mg/ml) in 50 µl TCM vorbereitet. Auf die schon vorher hinzugefügten 50 µl TCM auf der ELISPOT-Platte, wurden nun 50 µl der Peptid-TCM-Mischung und darauffolgend die 100 µl Zellsuspensionen pro Well hinzugefügt.

Als Negativkontrollen wurde für HLA I 10% DMSO / 90% H₂O und für HLA II synthetische HLA:Peptidmixe (Endkonzentration 5 µg/ml) verwendet (s. HLA:Peptide, Material). Als Positivkontrollen wurde neben PHA-L in der Endkonzentration 10 µg/ml, (Stockkonzentration 1 mg/ml) auch PMA in der Endkonzentration: 0,1 µl/Well (Stockkonzentration 100 µg/ml) + Ionomycin in der Endkonzentration: 0,2 µl/Well (Stockkonzentration 709 g/mol; 1mg/1,41 ml) und/oder SEB in der Endkonzentration: 2 µl/Well (Stockkonzentration 1 mg/ml) verwendet. Nach der Ausplattierung von TCM, Peptidmixture und Zellsuspension wurden die Platten 24-26 h erschütterungsfrei gelagert.

Es wurden bei ausreichender Zellzahl jeweils vier Replikate von jeder Peptidstimulation (SI, SII, CI, CII) hergestellt. Zudem wurden vier Negativkontrollen, je zwei für HLA I und HLA II und zwei Positivkontrollen angelegt. Untenstehendes Pipettierschema verdeutlicht die Anordnung der Replikate auf der ELISPOT-Platte.

SI 500k	SI 500k	SI 500k	SI 500k	CI 500k	CI 500k	CI 500k	CI 500k	NK I 500k	NK II 500k	PK 500k	
SII 500k	SII 500k	SII 500k	SII 500k	CII 500k	CII 500k	CII 500k	CII 500k	NK I 500k	NK II 500k	PK 500k	
SI 500k	SI 500k	SI 500k	SI 500k	CI 500k	CI 500k	CI 500k	CII 500k	NK I 500k	NK II 500k	PK 500k	
SII 500k	SII 500k	SII 500k	SII 500k	CII 500k	CII 500k	CII 500k	CII 500k	NK I 500k	NK II 500k	PK 500k	
SI 500k	SI 500k	SI 500k	SI 500k	CI 500k	CI 500k	CI 500k	CI 500k	NK I 500k	NK II 500k	PK 500k	
SII 500k	SII 500k	SII 500k	SII 500k	CII 500k	CII 500k	CII 500k	CII 500k	NK I 500k	NK II 500k	PK 500k	
SI 500k	SI 500k	SI 500k	SI 500k	CI 500k	CI 500k	CI 500k	CI 500k	NK I 500k	NK II 500k	PK 500k	
SII 500k	SII 500k	SII 500k	SII 500k	CII 500k	CII 500k	CII 500k	CII 500k	NK I 500k	NK II 500k	PK 500k	

Abbildung 5: Beispiel eines Pipettierschemas einer Familie mit 4 Mitgliedern auf einer ELISPOT-Platte (rot= Mitglied 1, orange = Mitglied 2, gelb = Mitglied 3, grün = Mitglied 4. NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle, grau= freie Wells, SI,SII,CI,CII = obengenannte Stimulationen, 500k = 500.000 Zellen/Well)

2.2.7 Immunfärbung

2.2.7.1 Prinzip

Vor den weiteren Schritten müssen die ELISPOT-Platten gut ausgewaschen und für die nächsten Schritte vorbereitet werden. Aufgrund des gebundenen Interferons an dem immobilisierten Erstantikörper können die Zellen entfernt werden. Nach der Entfernung der Zellen werden die nächsten Arbeitsschritte unter unsterilen Bedingungen weitergeführt.

Die seifige Lösung PBS mit 0,05% Tween 20 sorgt für das Auswaschen von Rückständen sowie das Platzen von restlichen Zellen. Bovines Serumalbumin wird genutzt, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen und somit die Sensitivität des ELISPOTs zu steigern [74]. Das Konjugat aus Streptavidin

und alkaliner Phosphatase mit dem verwendeten BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt) und NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) trägt zu starken blauschwarzen Spots bei. In Studien zeigte sich außerdem eine hohe Stabilität dieser Mischung und somit eine lange Haltbarkeit der Spotzahl [75]. Die Inkubation der Platte muss erschütterungsfrei erfolgen, da schon leichte Störungen ausreichen, um die nicht-adhärenenten Zellen zu bewegen und so eine fälschlicherweise erhöhte oder verwaschene Spotzahl hervorzurufen [73].

2.2.7.2 Durchführung

Nach der Inkubation wurden die Platten im Waschbecken abgeflickt. Zunächst wurden die Platten mit jeweils 200 µl PBS mit 0,05% Tween20 pro Well gewaschen. Daraufhin wurde zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wiederum dreimal mit PBS Tween20. Der Zweitantikörper 7-B6-1 wurde mit einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml in 100 µl PBS mit 0,5% bovinem Serumalbumin pro Well auf die Platte gegeben. Daraufhin inkubierten die Platten zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Anschließend erfolgte eine sechsmalige Waschung mit PBS Tween 0,05%. Danach wurde 0,5 % ExtrAvidin Alkalinphosphatase 1:1000 verdünnt und 100 µl pro Well in die Platte pipettiert. Die Platten wurden dann eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das BCIP/NBT liegt in Tablettenform vor. Es wurde eine Tablette pro 10 ml destilliertem Wasser etwa 20 Minute vor Ablauf der Inkubationszeit aufgelöst. Währenddessen wurden die Platten erneut dreimalig mit PBS Tween 0,05% und dreimalig mit PBS gewaschen. Darauffolgend wurde 50 µl pro Well des nun gelösten BCIP/NBT auf die Platten gegeben. Die Platten wurden 7 Minuten lichtgeschützt inkubiert und danach wurde die Reaktion unter laufendem Wasser abgestoppt. Die Platten wurden auf Zellstoff abgetrocknet und der hintere Plastikrücken vorsichtig entfernt. Es folgte eine trockene und lichtgeschützte Lagerung. Nach Trocknung der Mikrotiterplatten konnten diese in der Abteilung Immunologie der Universität Tübingen mittels ImmunoSpot Series 6 Ultra-V Analyzer ELISPOT Reader von C.T.L. ausgelesen werden.

2.2.8 Auslesen und Qualitätskontrolle

Die Platten wurden nach dem Protokoll der Immunologie („Anleitung zur Nutzung des ImmunoSpot“) unter Standardeinstellungen gescannt und ausgezählt. Zusätzlich wurden die Platten einer zweimaligen Qualitätskontrolle unterzogen, um die Ergebnisse der Zählung zu überprüfen und gegebenenfalls Fehler zu korrigieren.

2.2.9 Statistische Analyse

Zur Analyse der Spotzahlen wurden die empirischen Kriterien aus der immunologischen Studie von Nelde et al. [30] verwendet. Der Mean Spot Count (MSC) wurde als Mittelwert der Spotzahlen in den Wells pro Peptidstimulation auf eine Gesamtzellzahl von 5×10^5 Zellen pro Well normalisiert.

$$\text{MSC} = (\text{Mittelwert der Spotzahl}) \times \left(\frac{500000}{\text{reelle Zellzahl im Well}} \right)$$

Um die Intensitäten (I) der jeweiligen Peptidstimulationen zu berechnen, wurde dieser normalisierte Mean Count mit dem normalisierten Mean Count der entsprechenden Negativkontrolle subtrahiert.

$$I = (\text{MSC SI} \vee \text{SII} \vee \text{CI} \vee \text{CII}) - (\text{MSC NKI} \vee \text{NKII})$$

War die Intensität in der jeweiligen Stimulation größer als 10 und der MSC der Peptidstimulation 3-mal größer als die entsprechende Negativkontrolle, so wurde dies als positive SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Immunantwort gewertet. Es wurden nur solche Datensätze von Probanden in die Auswertung eingeschlossen, deren Positivkontrollen einen MSC von über 100 hatten. Alle anderen Datensätze wurden verworfen. Um eine spezifische T-Zell-Immunantwort gegen SARS-CoV-2 festzustellen, war es ausreichend, wenn entweder eine oder beide Stimulationen (SI und SII) den zuvor genannten Grenzwert überschritten hatten. Somit wurde dieser Proband als SARS-CoV-2 infiziert gewertet. Um eine kreuzreaktive T-Zell-Antwort festzustellen, reichte auch eine der beiden Stimulationen (CI oder CII) über dem Grenzwert aus, um als positiv gewertet zu werden.

48 Probanden wurden aus der statistischen Analyse am zweiten Zeitpunkt der Studie ausgeschlossen. Darunter diejenigen, deren Zellzahl für die Durchführung des Assays nicht ausgereicht haben und/oder die Positivkontrolle unter 100 war. Insgesamt wurden von 337 Probanden die Ergebnisse mittels GraphPad Prism 8 und Excel statistisch und graphisch ausgewertet. In Graphpad wurden für nicht parametrische Daten der Exakte Fisher-Test und der Chi-Quadrat-Test angewendet. Für die Intensitäten wurde für ungepaarte Variablen der Mann-Whitney-U-Test bei zwei Variablen und bei mehreren Variablen der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Für gepaarte Variablen wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Für die Korrelation der Peptidstimulationen wurde die Spearman-Korrelation angewendet.

2.2.10 Durchflusszytometrie

2.2.10.1 Prinzip

Die auch als FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) bezeichnete Durchflusszytometrie ist ein gängiges Verfahren zur Zelltypisierung und Analyse. Mittels Laser können Zellpopulationen anhand ihrer fluoreszierenden oder lichtstreuenden Eigenschaften charakterisiert werden. Diese Signale werden mit speziellen Detektoren eingefangen, als elektrisches Signal übersetzt und können dann mit spezieller Software ausgewertet werden. Fluoreszierende Reagenzien wie beispielsweise spezifische Antikörper können auch bei Zellmixturen eine konkrete Populationsanalyse ermöglichen, ohne die Zelllinien zuvor voneinander zu trennen [79]. Diese Antikörper binden spezifisch verschiedene CD (Cluster of Differentiation) Marker und ermöglichen eine gezielte Phänotypisierung von Immunzellen. Anhand der Durchflusszytometrie konnte bei der Negativkontrollgruppe aus laborinternen präpandemischen Proben analysiert werden, ob genug T-Zellen für die Peptidstimulation vorhanden sind. Da von Kindern keine PBMCs präpandemisch eingefroren wurden, wurde versucht T-Zellen aus präpandemischen Knochenmarkspunktionen zu stimulieren.

2.2.10.2 Durchführung

Die spezifischen Antikörper wurden für das Erkennen von CD4+ und CD8+ T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, der Gesamtleukozytenzahl und Gesamtzellpopulation in der Probe herausgesucht (s. Materialien für Durchflusszytometrie, Material). Nach dem Auftauen der Proben wurde ca. 1 Million Zellen für die Durchflusszytometrie entnommen. Zu Beginn wurde die Zentrifuge auf 4°C eingestellt und die Lebend-Tot-Farbstofflösung hergestellt. Diese wird benötigt, um den vitalen Anteil der detektierten Zellen zu bestimmen. Für die Färbelösung wurden 100 µl PBSE und 0,2 µl eFluor780 in einem 5 ml FACS-Röhrchen vorgelegt.

PBMC-Proben, die sich nach dem Auftauen in TCM befanden, wurden mit PBSE verdünnt und bei 1800 rpm 2 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde das Medium abgeflickt und erneut mit 500 µl PBSE gewaschen, gevortext und wiederum zentrifugiert. Nach dem zweiten Abflicken wurde dann pro Röhrchen 100 µl Lebend-Tot-Farblösung hinzugefügt. Die Suspension inkubierte danach für 20 Minuten im Dunkeln.

In der Zwischenzeit wurden die Antikörper vorbereitet. Diese wurden nach Herstellerangaben in FACS-Puffer verdünnt. Pro Röhrchen wurde 100 µl Färbelösung hergestellt. Nach der Inkubationszeit wurden die Röhrchen mit 150 µl FACS-Puffer aufgefüllt und wiederum zentrifugiert. Danach erfolgte ein Abflicken und ein Auswaschen mit 500 µl PBSE wie oben beschrieben. Darauffolgend wurden die 100 µl FACS-Puffer mit Antikörpern hinzugefügt und 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nun wurden die Röhrchen mit 150 µl FACS-Puffer aufgefüllt und wieder bei 1800 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Danach folgte ein Abflicken im Waschbecken. Je nach Zellzahl wurde mit FACS-Puffer ohne Privigen verdünnt und die Röhrchen bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

Zur sicheren Kalibrierung des FACS-Gerätes wurden Kompensationsproben erstellt. Diese sind zur Kontrolle und Einstellung der Detektoren für die unterschiedlichen Emissionsspektren von Nöten. Zudem werden überlappende Signale zwischen den Farbstoffen bzw. Detektoren neutralisiert. Es wurden Beads für Antikörper, Lebend-Tot-Farbstoff mit Negativ- und Positivkontrolle,

sowie eine normale Negativkontrolle hergestellt. Die FACS-Analyse wurde zur Bestimmung von T-Zellen in präpandemischen PBMC-Proben herangezogen. Zusätzlich wurden drei präpandemische Knochenmarkspalten von gesunden Kindern auf die T-Zellpopulation analysiert. Die präpandemischen PBMC-Proben wurden als Negativpopulation (Negativkontrolle, um die Spezifität des Assays zu beweisen, hier sollte es keine Antworten in den Peptidstimulationen SI und SII geben) zur Studienpopulation eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1.1 Begriffsdefinition

Im Nachfolgenden bezieht sich die Nennung der Abkürzungen von „SI,SII,CI,CII“ immer auf die gemessene SARS-CoV-2 spezifische oder kreuzreaktive T-Zell-Immunantwort in dieser Peptidstimulation im Assay. Das „+“ nach SI/SII/CI/CII steht in nachfolgenden Tabellen oder Graphiken für die als positiv gewerteten SARS-CoV-2 spezifischen oder kreuzreaktiven Probanden in diesen Peptidstimulationen im Assay. Das „-“ steht dementsprechend für die negativ gewerteten Probanden. SI+ meint somit alle Probanden, die in SI anhand der statistischen Analysen eine positive SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort in dieser Stimulation gezeigt haben. Eine positive oder negative Stimulationsantwort in SI,SII,CI oder CII wird zur Vereinfachung auch als SI ,SII ,CI oder CII Antwort bezeichnet. Die SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Immunantwort wird in untenstehenden Tabellen und Graphiken als „spez. T-Zell-Antwort“ oder „Gesamtantwort“ abgekürzt. Alle angegebenen Prozentwerte wurden auf die erste Nachkommastelle abgerundet.

3.1.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Nach der Analyse der präpandemischen Proben konnten diese nach Plan stimuliert werden. In allen Proben waren CD4+ und CD8+ T-Zellen vorhanden. Bei den präpandemischen Knochenmarkspunkten reichte die Anzahl an T-Zellen bei zwei Proben nicht für ein auswertbares Ergebnis in der

Peptidstimulation, da die Positivkontrollen unter 100 waren. Die Proben wurden am BD FACS Canto II gemessen und mit der Software FlowJo analysiert. Die Gates wurden so gewählt, dass ein Überblick über die Zellpopulation gewonnen werden konnte. In der nachfolgenden Abbildung ist beispielhaft eine Analyse dargestellt. Fiel die Analyse wie in diesem Fall positiv aus, konnte die Probe für die weitere Peptidstimulation und den ELISPOT herangezogen werden.

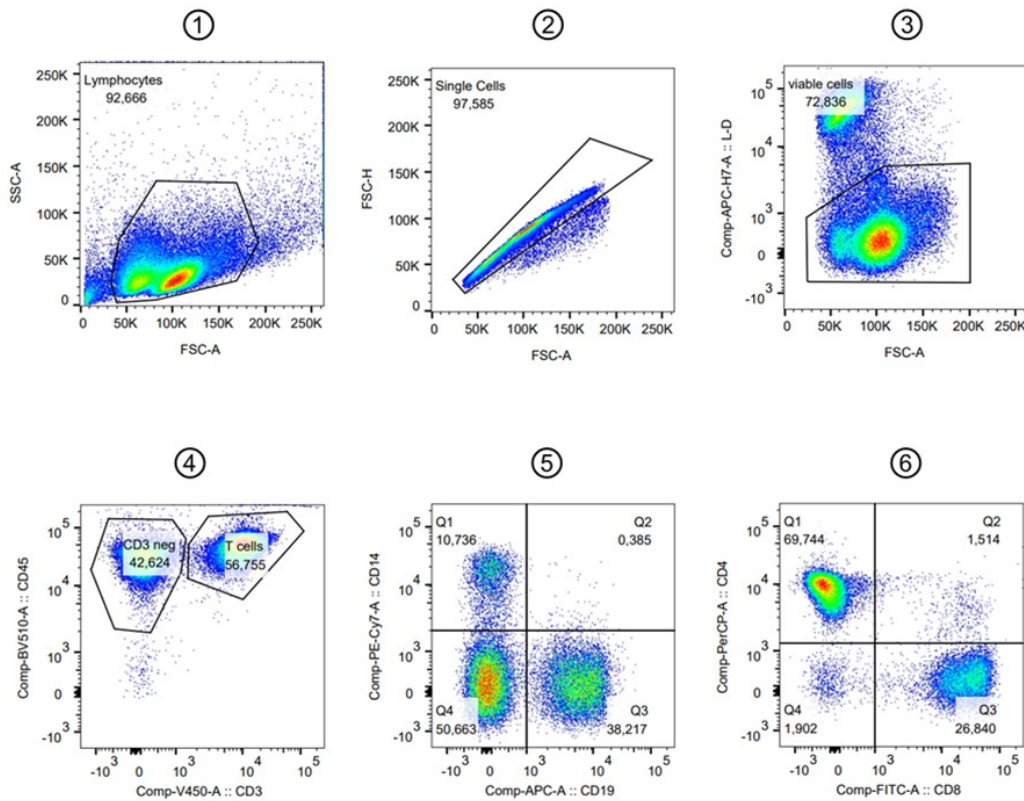


Abbildung 6: Beispiel- FACS einer präpandemischen Probe zur Sicherung der T-Zell-Population. Gate ① zeigt die Gesamtpopulation der Lymphozyten mit CD45- Antigen (BV510). In ② wurde diese eingegrenzt, um nur Einzelzellen zu analysieren und Dubletten zu entfernen. Von diesen wurde in ③ nur die noch vitalen Zellen (eFluor780) zur weiteren Analyse herangezogen. In ④ wurden CD3+ (Pacific Blue) von CD3- getrennt, somit die T-Zellen von übrigen Leukozyten. Die CD3- Population wurde wiederum in CD19 für B-Zellen (APC) und CD14 für Monozyten und Makrophagen (Pe-Cy7) gesplittet ⑤. Die CD3+ Population in ⑥ zeigt in Quadrant Q1 die CD4+ T-Zell-Population (PerCp) und in Q3 die CD8+ T-Zellpopulation (FITC).

3.1.3 Ergebnisse des ELISPOTs

Je nach Zellzahl konnten unterschiedliche viele Replikate erstellt werden. Das Ziel waren mindestens 3 Replikate pro Kondition und je 2 Replikate für die Positiv- und Negativkontrollen. Das Auftauen nach der Kryokonservierung im

Stickstofftank (s. PBMC-Isolierung, Methodik) brachte gute Ergebnisse in der Zellzahl. In den meisten Fällen konnte die angestrebte Zahl von 500.000 PBMCs pro Well im ELISPOT erreicht werden. Die Menge an Probandenblut reichte auch bei den Kinderproben aus, um mindestens drei Replikate pro Kondition zu stimulieren. Bei den präpandemischen Proben, die weitestgehend über Jahre kryokonserviert waren, gab es einen höheren Verlust von Zellen nach dem Auftauen. Ein Bild der ELISPOT-Auslesung ist beispielhaft an Familie 14 in nachfolgender Abbildung dargestellt.

Stimulationen Proband	Oben SI-Stimulation	Oben CI-Stimulation	NK I	NK II	PK
	Unten SII-Stimulation	Unten CII-Stimulation			
14-01					
14-02					
14-03					
14-04					

Abbildung 7: ELISPOT-Ergebnisse der Familie 14, ausplattiert nach Pipettierschema (s. Abb. 5). Jeweils 4 Replikate in den Peptidstimulationen SI (1. Reihe je Proband, links), SII (2. Reihe je Proband, links), CI (1. Reihe je Proband, mittig) und CII (2. Reihe je Proband, mittig). Jeweils 2 Replikate pro Negativkontrolle (NK), von links nach rechts in der Spalte: NK I (für HLA-Klasse-I Negativkontrolle), NK II (für HLA-Klasse-II/DR Negativkontrolle), 2 Replikate Positivkontrollen (PK) rechts außen.

3.1.3.1 Studienpopulation

Die Studiengruppe von 337 Probanden wurde in die Subgruppen „Kinder“ (K) von 0-17 Jahre im Median 10 Jahre (Interquartilsabstand 6-14) und in „Erwachsene“ (E) von 18-80 Jahre im Median 44 Jahre (Interquartilsabstand 37- 50) eingeteilt.

Die Population wurde in zwei Gruppen aufgeteilt, um potenzielle Unterschiede oder Zusammenhänge zu untersuchen. Zudem ist immer die Gesamtpopulation in den Tabellen mit angegeben. Im Vergleich der Geschlechter zeigte sich keine signifikante Differenz in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort. Zur Übersicht sind nachfolgend alle relevanten Ergebnisse der Studienpopulation numerisch aufgelistet.

Tabelle 1: Übersicht über die Studienpopulation mit Probandenanzahl, Altersdurchschnitt, Anzahl weiblicher Probanden und weibliche Probanden mit einer positiven SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort.

Populationsübersicht			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
Probandenanzahl	337	127 (38%)	210 (62%)
Altersdurchschnitt	36	10	44
Weibliche Probanden	170	61 (48%)	109 (51,9%)
Weibliche Probanden mit spez. T-Zell-Antwort	123	33 (47,8%)	90 (53,3%)

3.1.3.2 SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort in den Subgruppen

In der Kohorte mit 127 Kindern und 210 Erwachsenen waren 69 Kinder (54,3 %) und 169 Erwachsene (80,48%) in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort positiv. Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die ausgewerteten T-Zell-Antworten.

Tabelle 2: SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort in den Probandengruppen Gesamt, Kinder und Erwachsene

SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
positiv	238	69 (54,3%)	169 (80,5%)
negativ	99	58 (45,6%)	41 (19,5%)

Prozentual sind weniger Kinder in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort positiv als Erwachsene. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einem p-Wert von <0,0001 im exakten Fisher-Test festgestellt. Nachfolgende Kreisdiagramme zeigen einen Überblick über die spezifische T-Zell-Antwort in den Subgruppen.

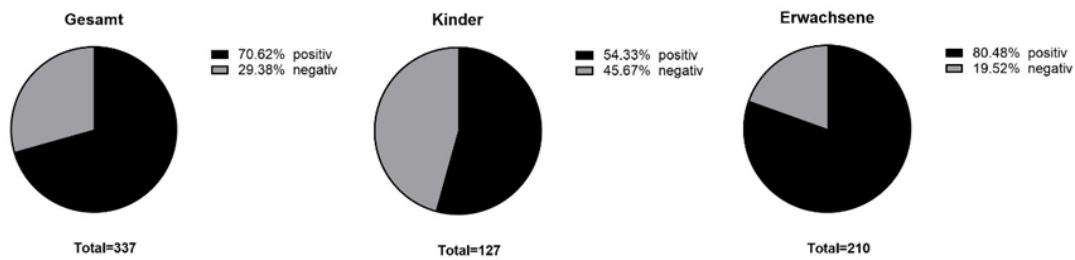


Abbildung 8: Kreisdiagramme: Übersicht über die Studienpopulation für SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort mit grau=positive, schwarz= negative SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort. Von links nach rechts: Gesamtpopulation, Kinder- und Erwachsenengruppe.

Im Folgenden wurden die parametrischen Daten der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort anhand der Intensitäten in den Peptidstimulationen SI und SII näher untersucht. Untenstehende Tabelle zeigt die Mediane der Intensitäten der als positiv und negativ gewerteten Probanden in den jeweiligen Peptidstimulationen SI und SII. Im Mann-Whitney-U-Test wurde ein Vergleich zwischen den Intensitäten der als positiv gewerteten und der negativ gewerteten Probanden in den jeweiligen SARS-CoV spezifischen Peptidstimulationen SI und SII durchgeführt. In allen drei Gruppen (Gesamt, Erwachsene und Kinder) ergab sich jeweils ein p-Wert von weniger als 0,001 und somit ein signifikanter Unterschied.

Tabelle 3: Mediane der SI und SII Intensitäten der Gesamtpopulation (Gesamt), der Erwachsenen und der Kinder. Das „+“ steht für die als positiv gewerteten SARS-CoV-2 spezifischen Probanden in dieser Peptidstimultaion, Das „-“ steht dementsprechend für die als negativ gewerteten Probanden.

Mediane der Intensitäten in SI und SII			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
SI +	100,10	76,96	115,30
SI -	1,00	0,75	1,00
SII +	202,30	98,75	273,10
SII -	1,21	1,08	1,25

Die Ergebnisse sind unten graphisch dargestellt. Zu Anschauungszwecken wurde hier und in allen nachfolgenden Scatter Dot Plots, aufgrund der logarithmisch transformierten Skala, Intensitätswerte die kleiner als 0,01 sind, manuell auf 0,01 gesetzt.

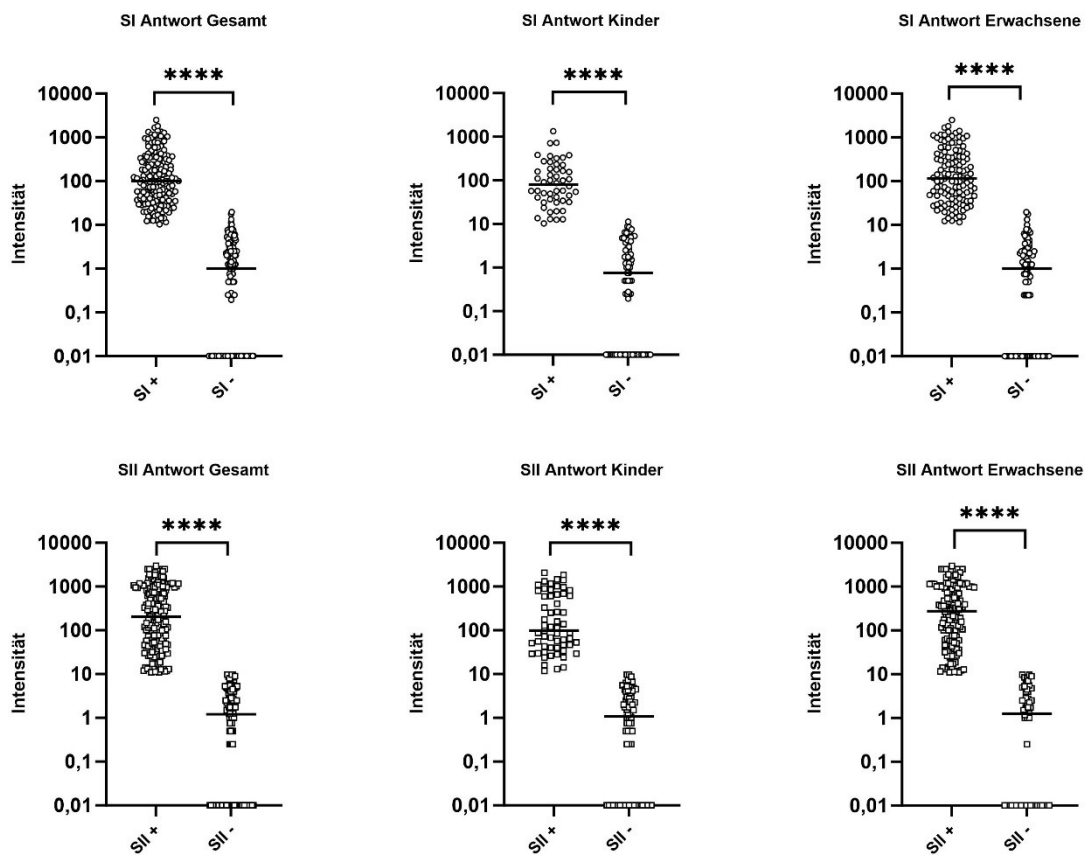


Abbildung 9: Vergleich der Intensitäten von positiv (+) und negativ (-) gewerteten Probanden in den jeweiligen Peptidstimulationen SI (oben) und SII (unten), jeweils von links nach rechts Gesamtpopulation (Gesamt), Kinder und Erwachsene, **** p-Wert < 0,001, Mann-Whitney-U-Test.

3.1.3.3 SI und SII Peptidstimulationen im Vergleich

Um ein besseres Verständnis für die durch SARS-CoV-2-Infektion induzierte spezifische T-Zell-Antwort bei Kindern und Erwachsenen zu erlangen, ist es von wesentlicher Bedeutung, die Häufigkeiten der Peptidstimulationen SI und SII in den beiden Gruppen miteinander zu vergleichen. Dabei zeigte sich in beiden Gruppen auch eine kombinierte Antwort aus SI und SII. Die nachfolgende Datentabelle gibt einen Überblick.

Tabelle 4: SI +, SII+, SI und SII+ Probanden im Vergleich. Gesamt= Gesamtstudienpopulation, + = als positiv gewertet in dieser Peptidstimulation bzw. Stimulationen.

Stimulationsantworten SI und/oder SII im Vergleich			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
SI +	55 (8,8%)	10 (14,5%)	11 (6,5%)
SII +	30 (26,9 %)	19 (27,5%)	45 (26,6%)
SI und SII +	172(64,3%)	40 (58%)	113 (66,9%)

Beim Vergleich der Häufigkeiten der Stimulationsantworten (nur „SI“ oder nur „SII“ oder beide „SI und SII“) der Kinder- und der Erwachsenenengruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied bei einem p-Wert von 0,1251 im Chi Quadrat Test. Die Mehrheit der Kinder aber auch der Erwachsenen reagierten mit einer Kombination aus SI und SII+ Antwort im Assay. Danach folgte die alleinige SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort in der SII+ Antwort und als letztes die alleinige SI+ Antwort. Obenstehende Tabelle ist nachfolgend graphisch dargestellt.

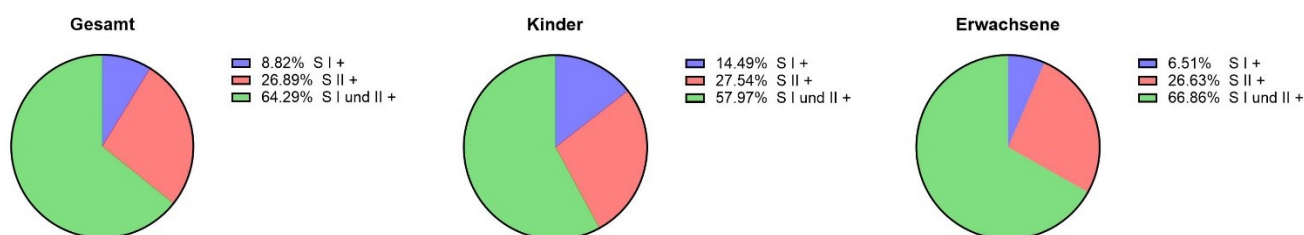


Abbildung 10: Kreisdiagramme mit SI+ (blau) , SII+ (rot) und SI und SII + Antwort (grün) im Vergleich; von links nach rechts: Gesamtpopulation, Kindern und Erwachsenen

Die Antworten SI + und SII + können noch genauer auf Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen untersucht werden. Dazu wurden die Intensitäten der in SI und SII positiv gewerteten Kindern mit der, der Erwachsenen verglichen. Das Ergebnis ist gerade so signifikant und es zeigt sich hier deutlich, dass die Kinder generell niedrigere Intensitäten als Erwachsene aufweisen. Diesen Unterschied erkennt man auch in den aufgezeigten Daten (s. Tab. 3).

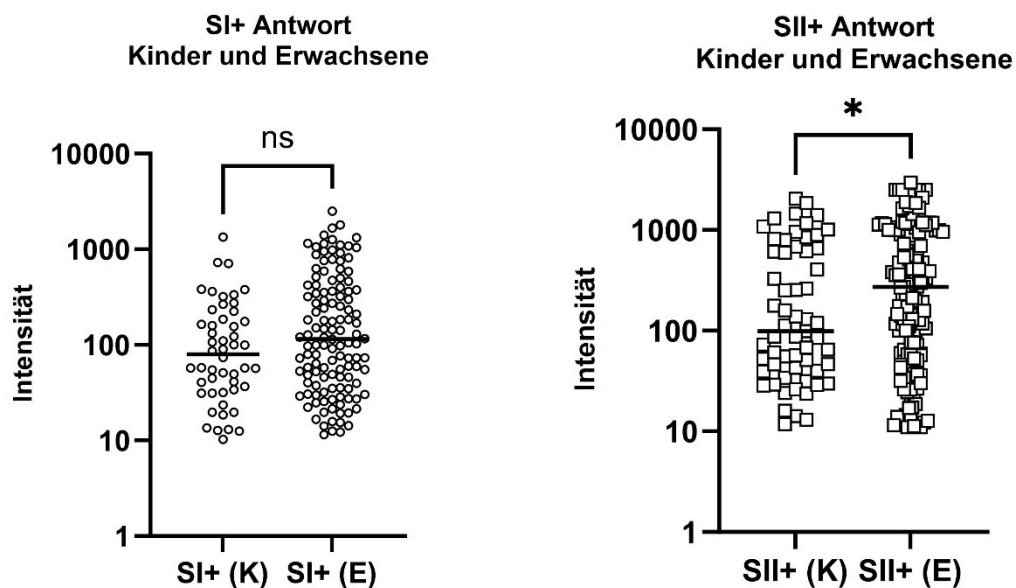


Abbildung 11: Vergleich der Intensitäten der SI+ (links) und der SII+ Antwort (rechts) zwischen Erwachsenen (E) und Kindern (K), SI: ns (= nicht signifikant) p-Wert = 0,07; SII: * p-Wert = 0,0496, Mann-Whitney-U-Test.

3.1.3.4 SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort und spezifischer Serostatus im Vergleich

Ein weiteres Ziel der Studie war es die adaptive Immunantwort bei SARS-CoV-2 besser zu verstehen und zu untersuchen. In diesem Sinne war es besonders wichtig den Serostatus der Probanden mit der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort zu vergleichen. Für alle 337 Probanden konnten Ergebnisse des Multicov IgA- und IgG-Tests mit den T-Zell-Daten verglichen werden. Es reichte eine SARS-CoV-2 spezifische Antwort in einem der Antikörpertest für einen positiv gewerteten Serostatus gegen SARS-CoV-2 aus. Die untenstehende Tabelle schafft einen Überblick über die Daten. Kein Kind besaß eine positive SARS-CoV-2 spezifische IgA-Antwort. In nachfolgenden Tabellen und Graphiken wird ein positiv gewerteter SARS-CoV-2 spezifischer Serostatus mit „Ak“ (für Antikörper) und „+“ für positiv abgekürzt. Ein negativ gewerteter Serostatus wird mit „Ak -“ abgekürzt.

Tabelle 5: Serostatus in den drei Gruppen (Gesamt, Kinder, Erwachsene), IgA = Immunglobulin A, IgG = Immunglobulin G, in den oberen drei Reihen sind die einzelnen Antworten im Multicov IgA und IgG, in den letzten zwei Zeilen findet sich die Gesamtantwort des Serostatus.

Serostatus im Multicov IgA und IgG (Gesamtanzahl: 337 Probanden)			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
IgA positiv	6	0	6
IgG positiv	74	18	56
IgA + IgG positiv	110	34	76
Gesamt-Ak +	190	52 (40,9%)	138 (65,7%)
Gesamt-Ak -	147	75 (59,1%)	72 (34,3%)

In nachfolgenden Kreisdiagrammen ist die Verteilung von seropositiven und seronegativen Probanden graphisch dargestellt. Wie bei der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort zeigte sich auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen der Kinder- und Erwachsenenengruppe im Exakten Fishertest mit einem p-Wert <0,0001. Dabei waren 40,9 % der Kinder und 65,7 % der Erwachsenen seropositiv.

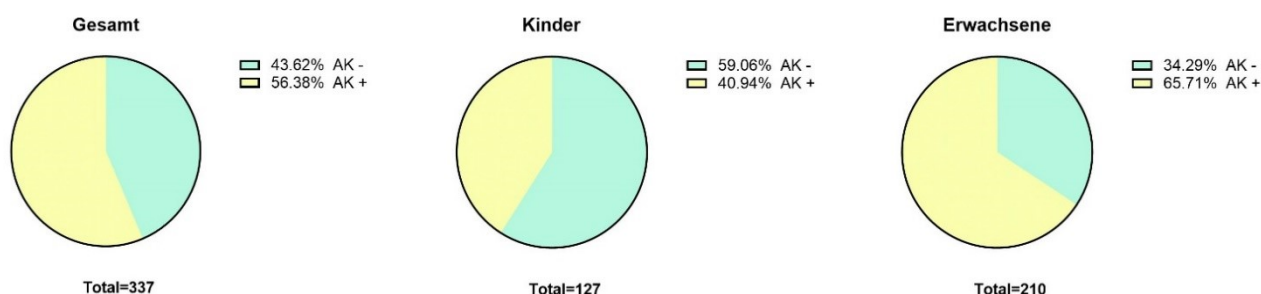


Abbildung 12: Kreisdiagramme: Serostatus der Probanden mit grün = positiver Serostatus und gelb = negativer Serostatus (IgG+IgA); von links nach rechts: Gesamtpopulation, Kinder und Erwachsene.

Des Weiteren wird in der nachfolgenden Tabelle und Graphik genauer auf den Zusammenhang zwischen spezifischer T-Zell-Antwort und den Serostatus gegen SARS-CoV-2 eingegangen. Der Vergleich der nicht parametrischen Daten ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der spezifisch SARS-CoV-2 positiven T-Zell-Antwort zur negativen in Bezug auf den Serostatus im Exakten Fishertest mit einem p-Wert von <0,001. So haben 76,9% der Probanden mit einer positiven spezifischen T-Zell-Antwort, auch einen positiven Serostatus. Dahingegen haben

93 % mit einer negativen spezifischen T-Zell-Antwort auch eine negative serologische Antwort.

Tabelle 6: Vergleich der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort mit dem Serostatus; „+“ = positiv gewertete Probanden in den jeweiligen Testverfahren, „-“ = negativ gewertete Probanden in den jeweiligen Testverfahren, Ak = Serostatus, spez. = spezifisch

Vergleich der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort mit dem Serostatus			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
Spez. T-Zell-Antwort positiv	238	69	169
Ak +	183 (76,9%)	50 (72,5%)	133 (78,7%)
Ak -	55 (23,1%)	19 (27,5%)	36 (21,3%)
Spez. T-Zell-Antwort negativ	99	58	41
Ak +	7 (7%)	2 (3,4%)	5 (12,2 %)
Ak -	92 (93%)	56 (96,6%)	36 (87,8%)

Zwischen Kinder und Erwachsenen gab es keinen signifikanten Unterschied. Dies legt nahe, dass der Anteil negativ getesteter Kinder in beiden Testverfahren höher ist als in der Erwachsenenengruppe. Eine Beobachtung, die bereits bei der spezifischen T-Zell-Antwort erkennbar war.

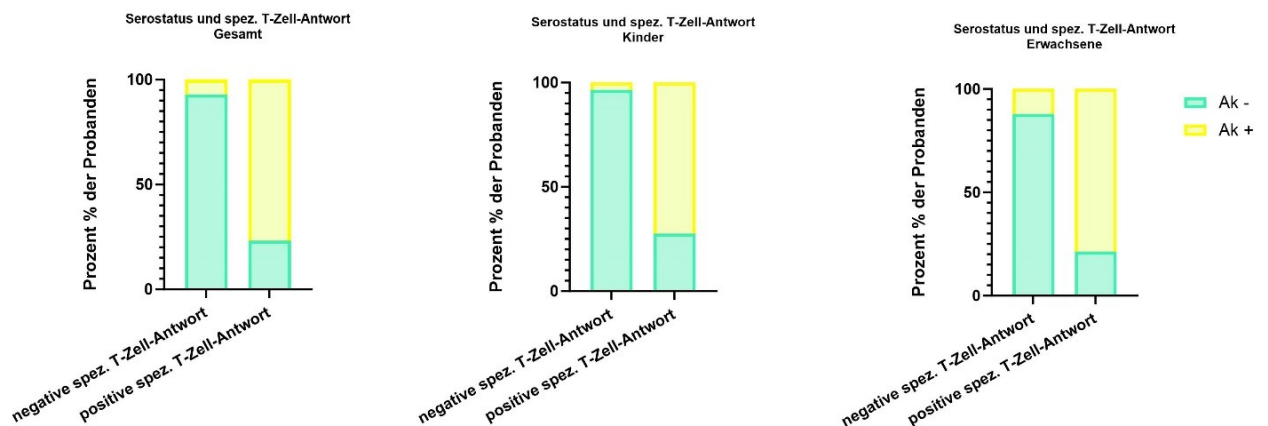


Abbildung 13: Balkendiagramme: Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort mit dem Serostatus in den drei Gruppen (Gesamt, Kinder, Erwachsene), grün = negativer Serostatus (Ak-), gelb=positiver Serostatus (Ak+)

Bei 245 Probanden wurde entweder eine spezifische T-Zell-Antwort, eine spezifischer Serostatus (=positiver Antikörpertest) oder beides detektiert. Die Ergebnisse sind in untenstehender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 7: SARS-CoV-2 spezifische adaptive Immunantwort in der Gesamtpopulation, Ak = Serostatus, „+“ = in dieser spezifischen Antwort als positiv gewertet, spez. = spezifisch

SARS-CoV-2 spezifische adaptive Immunantwort		
Spez. T-Zell-Antwort +	Spez. T-Zell-Antwort + und Ak +	Ak +
55 (22,4%)	183 (74,7%)	7 (2,9%)

In unserer Studienpopulation tritt die ausschließliche SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort nach 11-12 Monaten häufiger als ein alleiniger spezifischer Serostatus auf. Dennoch ist die gemeinsame Reaktion auf SARS-CoV-2 die am häufigsten beobachtete. Zudem wurden die Intensitäten der SI und SII Antwort genauer auf einen Zusammenhang mit der serologischen Antwort analysiert. Vor allem der Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen positiven CD4+ T-Zell-Antwort in der Peptidstimulation SII mit dem Serostatus ist hierbei von Interesse. Da bekanntlich die CD4+ T-Zellen mit der humoralen Immunantwort verknüpft sind (s. CD4+ und CD8+ T-Zellen, Einleitung). Die folgende Datentabelle gibt einen Überblick über die untersuchten Daten.

Tabelle 8: Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen SI und SII Antwort mit dem Serostatus und Vergleich der Medianwerte der SARS-CoV-2 spezifischen Intensitäten (SI+ und SII+) mit dem Serostatus in den drei Gruppen (Gesamt, Kinder, Erwachsene)

Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen SI und SII Antwort mit dem Serostatus			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
SI +	174	50	124
Ak +	145 (83,3 %)	40 (80%)	105 (84,7%)
Ak -	29 (16,7%)	10 (20%)	19 (15,3%)
SII +	211	59	158
Ak +	169 (80%)	44 (74,6%)	125 (79,1%)
Ak -	48 (20%)	15 (25,4%)	33 (20,9%)
Vergleich der Mediane der SI+ und SII+ Intensitäten mit dem Serostatus			
SI+ und Ak +	275,2	164,7	348,5
SI+ und Ak -	136,7	155,6	126,7
SII + und Ak +	607,9	457,2	661
SII + und Ak -	244,8	159,9	283,4

In der nachfolgenden Graphik sind die Daten visualisiert. In allen drei Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Intensitäten der SII+ Probanden zwischen einem positiven (Ak+) und negativen (Ak-) Serostatus. Der Vergleich der SI+ Probanden mit dem Serostatus zeigte eine geringere Signifikanz. In der Kindergruppe war bei einer positiven SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort in SI (SI+) kein Unterschied in den Intensitäten zwischen einem positiven (Ak+) und einem negativen (Ak-) Serostatus erkennbar.

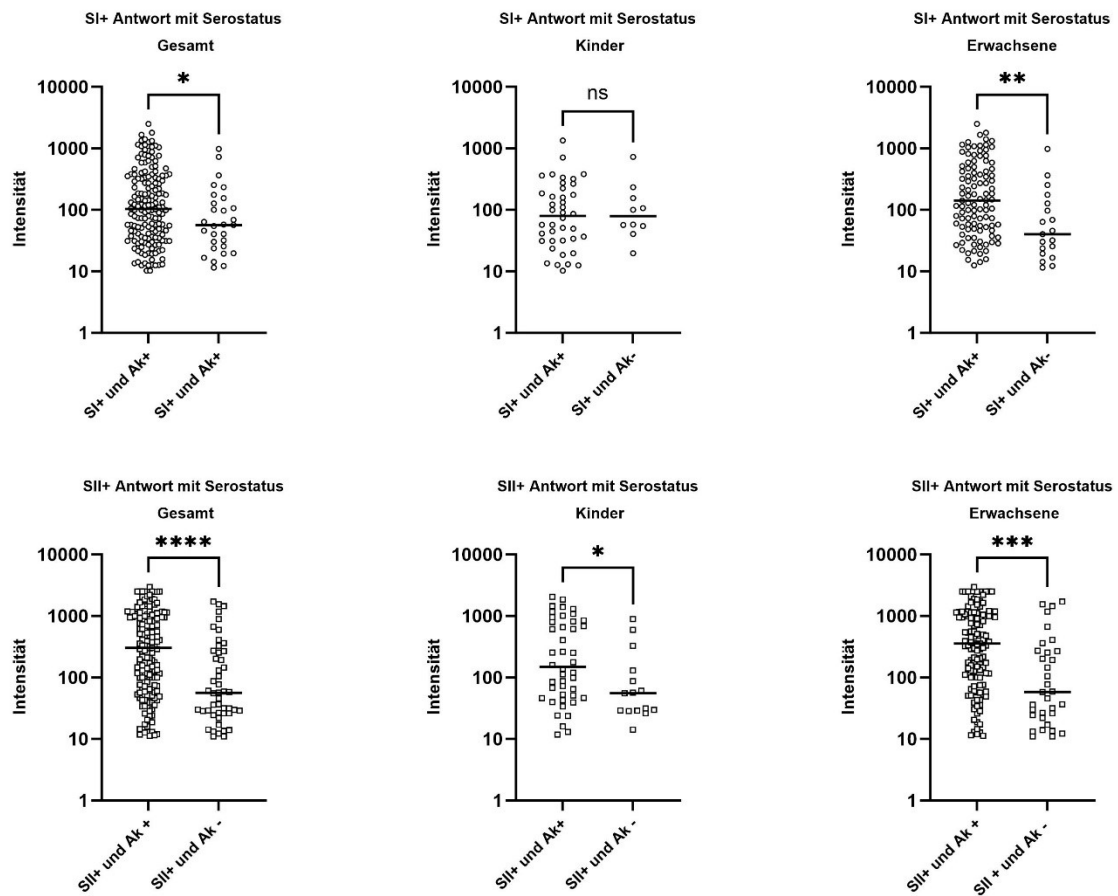


Abbildung 14: Vergleich der Intensitäten der SI+/SII+ Probanden in Bezug auf den positiven (Ak+) und negativen (Ak-) SARS-CoV-2-spezifischen Serostatus in den Gruppen Gesamtpopulation (Gesamt), Kinder und Erwachsene. P-Werte im Vergleich SI+ Intensitäten mit Serostatus: Gesamt * p-Wert: 0,031, Kinder ns p-Wert: 0,743, Erwachsene: **p-Wert: 0,0019. P-Werte im Vergleich SII+-Intensitäten und Serostatus: Gesamt ****p-Wert: <0,0001, Kinder * p-Wert: 0,022, Erwachsene: ***p-Wert: 0,0001. Mann-Whitney-U-Test.

In der nachfolgenden Grafik wurden die Intensitäten der SI+ und SII+ Kinder mit einem positiven Serostatus mit den Intensitäten der SI+ und SII+ Erwachsenen

mit positivem Serostatus verglichen. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war bei SI+ und positivem Serostatus gerade noch signifikant, während bei SII+ und positivem Serostatus kein Unterschied festzustellen war.

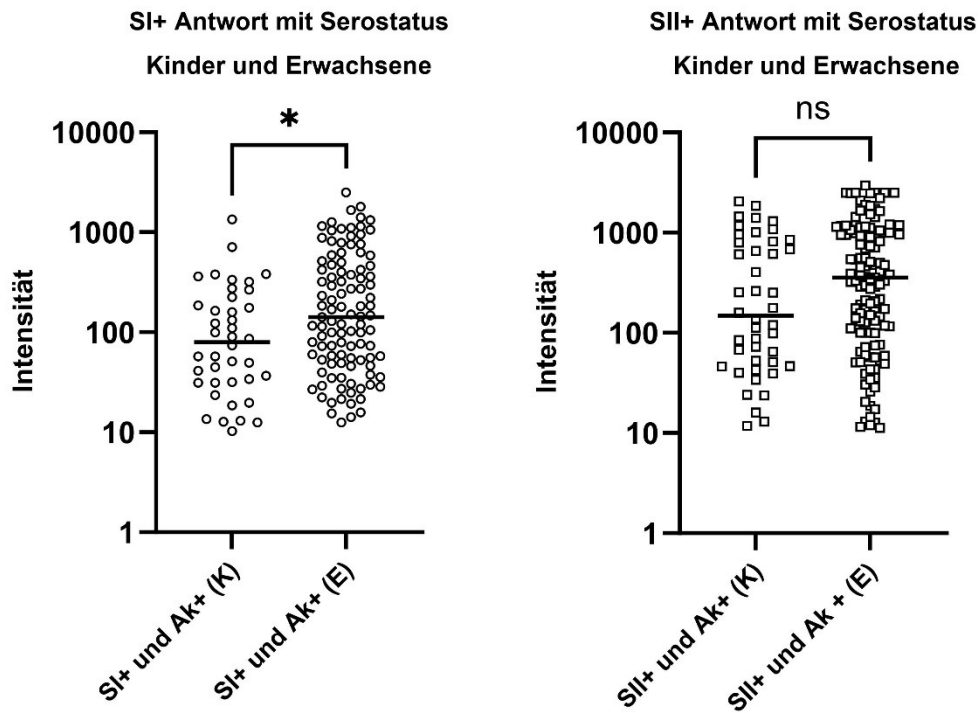


Abbildung 15: Vergleich der SI/SII+ Probanden mit positivem Serostatus (Ak+) zwischen der Kinder- (K) und Erwachsenengruppe (E), In SI+ Antwort mit Serostatus: *p-Wert: =0,016, In SII+ Antwort mit Serostatus ns, p-Wert: 0,0727. Mann-Whitney-U-Test. (Mediane s. Tab. 8.)

3.1.3.5 SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort im zeitlichen Verlauf

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der zeitliche Verlauf der Immunantwort, die Veränderung dieser, sowie die Bildung von spezifischen Memory T-Zellen nach Infektion. Deswegen wurden gezielt die gleichen Probanden zur Probenentnahme zu zwei Zeitpunkten eingeladen. Insgesamt konnte bei 173 Probanden, darunter 61 Kinder und 112 Erwachsene, an beiden Studienzeitpunkten Probenmaterial und auswertbare Daten gewonnen werden (s. Studiendesign, Methodik).

In dieser Subpopulation aus 173 Probanden zeigten sich 38 Kinder (62,9%) und 102 Erwachsene (91,1%) in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort in T1 positiv. Im Exakten Fisher-Test zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen mit einem p-Wert $<0,0001$. Die in T1 (=3-4 Monate nach Infektion) als positiv in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort gewertet wurden, wurden nicht alle in T2 (=11-12 Monate nach Infektion) als positiv gewertet.

18 % der in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort positiv gewerteten Kinder und 11,6% der positiv gewerteten Erwachsenen in T1 zeigten in T2 eine signifikante Abschwächung ihrer Immunantwort, sodass sie insgesamt als negativ in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort gewertet wurden. Nur ein geringer Teil der Probanden, 3,3 % der Kinder und 3,6 % der Erwachsenen, wurde in T1 als negativ in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort gewertet und wurde in T2 als positiv gewertet. Untenstehende Tabelle zeigt einen Überblick über die verändernden oder gleichgebliebenen SARS-CoV-2 spezifischen positiven und negativen gewerteten Probanden in der Gesamtantwort. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen zeigte sich signifikant im Chi-Quadrat-Test mit einem p-Wert $<0,0001$.

Sechs der erwachsenen Probanden bekamen zwischen den Zeiträumen eine bzw. zwei Impfdosen, diese brachten aber keine erkennbare Intensitätserhöhung. Alle Geimpften blieben in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort in T2 positiv.

Tabelle 9: Vergleich der spez. T-Zell-Antwort im zeitlichen Verlauf von T1 zu T2, T1 = erster Zeitpunkt der Probenentnahme (3-4 Monaten nach Infektion), T2 = zweiter Zeitpunkt der Probenentnahme (11-12 Monate nach der Infektion), „+“ in der spez. T-Zell-Antwort positiv, „-“ in der spez. T-Zell-Antwort negativ.

Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort im zeitlichen Verlauf von T1 zu T2			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
In T1 in der spez. T-Zell-Antwort +	140	38 (62,3%)	102 (91,1%)
In T1 in der spez. T-Zell-Antwort -	33	23 (37,7%)	10 (8,9%)
Zeitlicher Verlauf der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort			
In T1 + und T2 - in der spez. T-Zell-Antwort	24	11 (18%)	13 (11,6%)
In T1 - und in T2+ in der spez. T-Zell-Antwort	6	2 (3,3%)	4 (3,6%)
In T1 und T2 + in der spez. T-Zell-Antwort	116	27 (44,3%)	89 (79,4%)
In T1 und T2 – in der spez. T-Zell-Antwort	27	21 (34,4%)	6 (5,4%)
Gesamtanzahl	173	61	112

3.1.3.6 SI Antwort im zeitlichen Verlauf

Anschließend werden die Intensitätsunterschiede der Probanden in T1 und T2 in der Peptidstimulation SI genauer vorgestellt. Auffallend war, dass jeweils 15 Probanden in beiden Gruppen in T2 durch eine Abnahme der Intensität, als negativ in der SI-Antwort gewertet wurden. Untenstehende Tabelle gibt einen Überblick über die gesammelten Daten.

Tabelle 10: Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort in der Peptidstimulation SI im zeitlichen Verlauf von T1 zu T2, T1 = erster Zeitpunkt der Probenentnahme (3-4 Monaten nach Infektion), T2 = zweiter Zeitpunkt der Probenentnahme (11-12 Monate nach der Infektion), „+“ in der Peptidstimulation SI als positiv gewertet, „-“ in der Peptidstimulation als negativ gewertet

Vergleich der SI Antwort im zeitlichen Verlauf von T1 zu T2			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
SI Antwort			
In T1 SI+	119	36 (59%)	83 (74,1%)
In T1 SI-	54	25 (41%)	29 (25,9%)
Zeitlicher Verlauf der SI Antwort			
In T1 SI + und T2 SI -	30	15 (24,6%)	15 (13,4%)
In T1 SI – und T2 SI+	11	2 (3,3%)	9 (8%)
In T1 SI+ und T2 SI+	89	21 (34,4%)	68 (60,7%)
In T1 SI- und T2 SI-	43	23 (37,7%)	20 (17,9%)
Gesamtanzahl	173	61	112

In untenstehender Abbildung wurden die SI Intensitäten an den Zeitpunkten T1 und T2 miteinander verglichen. Hierbei wurden nur die Probanden ausgewählt die in T1 in dieser Peptidstimulation als positiv gewertet wurden. Dies waren in SI 36 Kinder und 83 Erwachsene.

Für eine bessere Vergleichbarkeit von T1 und T2 wurden in Graphik E und F diejenigen Probanden ausgeschlossen, die in T2 als negativ in der Peptidstimulation SI gewertet wurden. Generell wurde bei den Kindern, als auch bei den Erwachsenen eine signifikante Abnahme der Intensitäten in SI von T1 zu T2 beobachtet. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Mediane der SI-Intensitäten der Probanden zu den beiden Studienzeitpunkten T1 und T2.

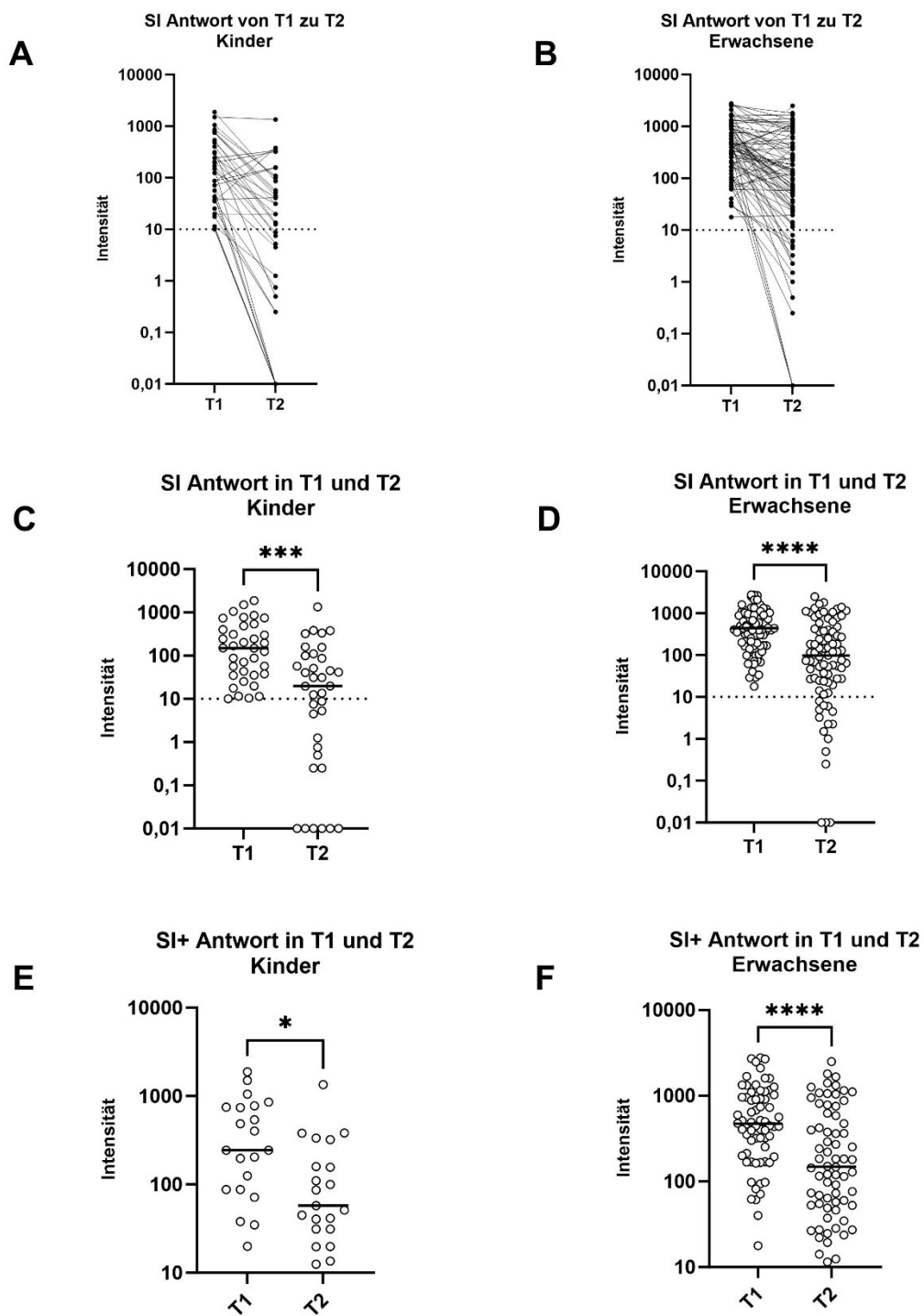


Abbildung 16: Graphik A: Zeitlicher Verlauf der Intensitäten der Kindergruppe von T1 zu T2 in der SI Antwort, Graphik B: Zeitlicher Verlauf der Intensitäten der Erwachsenen von T1 zu T2 in der SI Antwort. Graphik C: Vergleich der SI Intensitäten der Kindergruppe von T1 und T2, ***p-Wert: 0,0003 Graphik D: Vergleich der SI Intensitäten der Erwachsenen von T1 und T2. **** p-Wert <0,0001. Graphik E: Vergleich der SI+ Intensitäten der Kinder von T1 und T2, *p-Wert: 0,0113 Graphik F: Vergleich der SI+ Intensitäten der Erwachsenen von T1 und T2, ****p-Wert <0,0001. Wilcoxon test bei gepaarten Variablen. Die gestrichelte Linie bei 10 zeigt den Grenzwert, der negativ gewertete von positiv gewerteten Probanden trennt.

Tabelle 11: Mediane der Intensitäten der Peptidstimulation SI in T1 und T2 in den Gruppen „Kinder“ und „Erwachsene“. Oben: positiv gewertete Probanden in der SI Antwort in T1 (nur SI+), die in T2 entweder positiv oder negativ gewertet wurde (SI +/-). Unten: positiv gewertete Probanden in der SI Antwort (SI+), die in T2 positiv geblieben sind.

Mediane der SI Intensitäten in T1 und T2		
	Kinder	Erwachsene
Vergleich SI Intensitäten von T1 und T2		
T1 (nur SI+)	149,2	438,4
T2 (SI +/-)	19,74	98
Vergleich der SI+ Intensitäten von T1 und T2		
T1	243,3	471,6
T2	57,25	148,9

3.1.3.7 SII Antwort im zeitlichen Verlauf

Im nachfolgenden werden die Intensitätsunterschiede der Probanden in T1 und T2 in der Peptidstimulation SII genauer vorgestellt. Auffallend war, dass 10 Kinder und 21 Erwachsene in T2 durch eine Abnahme der Intensität als negativ in der Stimulation SII gewertet wurden.

Tabelle 12: Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen Antwort in der Peptidstimulation SII im zeitlichen Verlauf von T1 zu T2, T1 = erster Zeitpunkt der Probenentnahme (3-4 Monaten nach Infektion), T2 = zweiter Zeitpunkt der Probenentnahme (11-12 Monate nach der Infektion), „+“ in der Peptidstimulation SII als positiv gewertet, „-“ in der Peptidstimulation als negativ gewertet

Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort im zeitlichen Verlauf von T1 zu T2			
SII Antwort			
In T1 SII+	132	33 (54,1%)	99 (88,4%)
In T1 SII-	41	28 (45,9%)	13 (11,6%)
Zeitlicher Verlauf der SII Antwort			
In T1 SII + und T2 SII -	31	10 (16,4 %)	21 (18,8%)
In T1 SII – und T2 SII+	8	2 (3,3%)	6 (5,4%)
In T1 SII+ und T2 SII+	101	23 (37,7%)	78 (69,6%)
In T1 SII- und T2 SII-	33	26 (42,6%)	7 (6,3%)
Gesamtanzahl	173	61	112

In untenstehender Abbildung wurden die SII Intensitäten an den Zeitpunkten T1 und T2 miteinander verglichen. Hierbei wurden nur die Probanden ausgewählt die in T1 in dieser Peptidstimulation als positiv gewertet wurden. Dies waren 33 Kinder und 99 Erwachsene in SII. Für eine bessere Vergleichbarkeit von T1 und T2 wurden in Graphik E und F diejenigen Probanden, die in T2 als negativ in der Peptidstimulation SII gewertet wurden, ausgeschlossen. Generell gab es bei den Kindern, als auch bei den Erwachsenen eine signifikante Abnahme der Intensitäten in SII von T1 zu T2. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Mediane der SII-Intensitäten der Probanden zu den beiden Studienzeitpunkten T1 und T2.

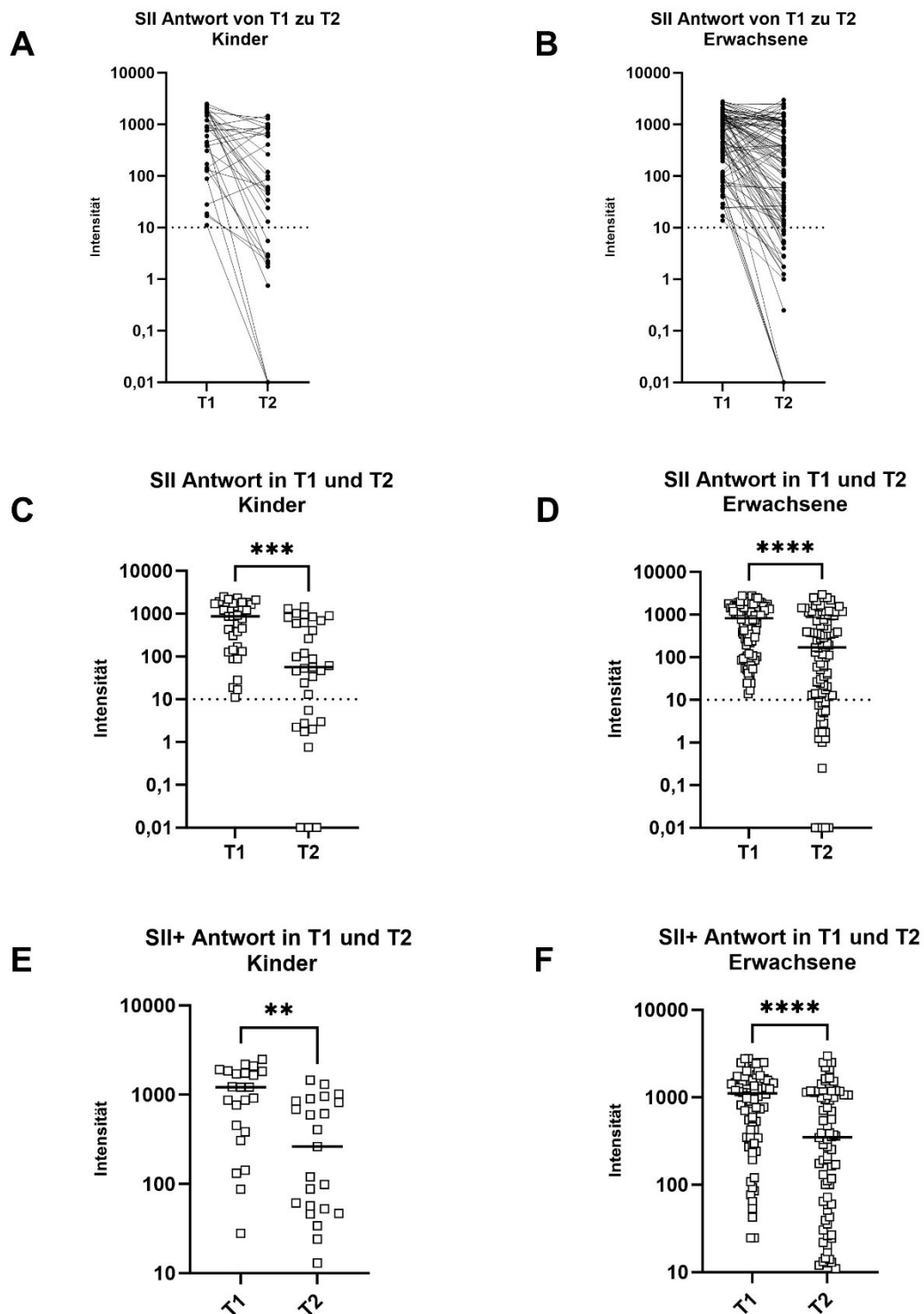


Abbildung 17: Graphik A: Zeitlicher Verlauf der Intensitäten der Kindergruppe von T1 zu T2 in der SII Antwort, Graphik B: Zeitlicher Verlauf der Intensitäten der Erwachsenen von T1 zu T2 in der SII Antwort. Graphik C: Vergleich der SII Intensitäten der Kindergruppe von T1 und T2, ***p-Wert: 0,0003. Graphik D: Vergleich der SII Intensitäten der Erwachsenen von T1 und T2, ****p-Wert <0,0001. Graphik E: Vergleich der SII+ Intensitäten der Kinder von T1 und T2, **p-Wert: 0,0049. Graphik F: Vergleich der SII+ Intensitäten der Erwachsenen von T1 und T2, ****p-Wert <0,0001. Wilcoxon-Test bei gepaarten Variablen. Die gestrichelte Linie bei 10 zeigt den Grenzwert, der negativ gewertete von positiv gewerteten Probanden trennt.

Tabelle 13: Mediane der Intensitäten der Peptidstimulation SII in T1 und T2 in den Gruppen „Kinder“ und „Erwachsene“. Oben: positiv gewertete Probanden in der SII Antwort in T1 (nur SII+), die in T2 entweder positiv oder negativ gewertet wurde (SII +/-). Unten: positiv gewertete Probanden in der SII-Antwort (SI+), die in T2 positiv geblieben sind.

Mediane der SII Intensitäten in T1 und T2		
	Kinder	Erwachsene
Vergleich SII Intensitäten von T1 und T2		
T1 (nur SII+)	867,3	818
T2 (SII +/-)	56,75	170,3
Vergleich der SII+ Intensitäten von T1 und T2		
T1	1209	1114
T2	262	350

3.1.3.8 SARS-CoV-2 spezifische und kreuzreaktive T-Zell-Antwort im Vergleich

Die in der Einleitung erwähnte Kreuzreaktivität der T-Zellen in unserer Studie wurde mit Hilfe der Peptidstimulationen CI und CII (s. HLA:Peptide, Material) untersucht. Eine positive Stimulationsantwort in CI oder CII war ausreichend, um als positiv für die SARS-CoV-2 kreuzreaktive T-Zell-Antwort gewertet zu werden. Im Folgenden wird für die SARS-CoV-2 kreuzreaktive T-Zell-Antwort der Begriff „kreuzreaktive T-Zell-Antwort“ verwendet oder als „kreuzreaktive Gesamtantwort“ abgekürzt. Im Folgenden wird der Zusammenhang zwischen spezifischer und kreuzreaktiver T-Zell-Antwort näher untersucht. In nachfolgenden Balkendiagramm wurde das Auftreten der unterschiedlichen T-Zell-Antworten verglichen.

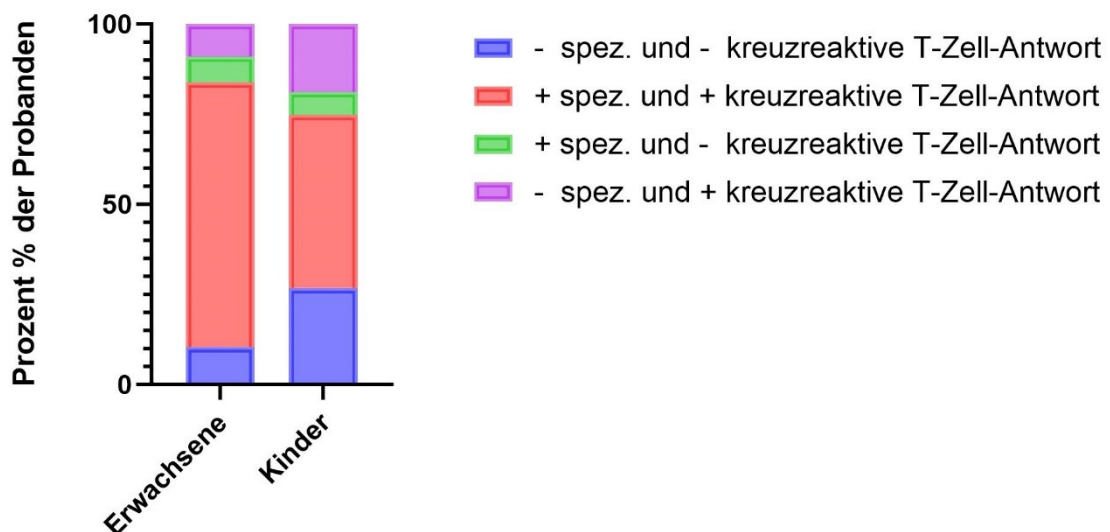


Abbildung 18: Vergleich der spezifischen T-Zell-Antwort mit/ohne die kreuzreaktive T-Zell-Antwort in den beiden Gruppen „Kinder“ und „Erwachsene“, „+“ = in der Gesamtantwort (spezifisch und/oder kreuzreaktiv) als positiv gewertet, „-“ = in der Gesamtantwort als negativ gewertet.

Die Graphik veranschaulicht, dass die meisten Probanden mit einer SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort auch kreuzreaktiv mitreagiert haben. Bei den Erwachsenen sind 73% aller Getesteten in der spezifischen und kreuzreaktiven T-Zell-Antwort positiv. Umgekehrt zeigt sich bei einer negativ gewerteten spezifischen Gesamtantwort, dass sowohl eine negative als auch eine positive

kreuzreaktive T-Zell-Antwort möglich ist. Die Kindergruppe zeigte sich erneut mit einem höheren Anteil an negativen Probanden in beiden Gesamtantworten als die Erwachsenengruppe. Der Anteil der Kinder, die eine negative spezifische T-Zell-Antwort, aber eine positive kreuzreaktive T-Zell-Antwort aufwiesen, lag mit 18,9 % höher als der Anteil bei Erwachsenen, der bei 9,1 % lag. Im Chi-Quadrat-Test und im Exakten Fisher-Test wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Kindern und Erwachsenen in den verschiedenen Kombinationen aus spezifischen und kreuzreaktiven T-Zell-Antworten festgestellt. Die untenstehende Tabelle zeigt einen Überblick über die Daten.

Tabelle 14: Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen und kreuzreaktiven T-Zell-Antwort von allen Probanden (Gesamt), Kindern und Erwachsenen; „+“ = in der Gesamtantwort als positiv gewertet, „-“ = in der Gesamtantwort als negativ gewertet.

Vergleich der SARS-CoV spezifischen und kreuzreaktiven T-Zell-Antwort			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
- spez. und - kreuzreaktive T-Zell-Antwort	66	34 (26,8%)	22 (10,5%)
+ spez. und + kreuzreaktive T-Zell-Antwort	205	61 (48%)	154 (73,3%)
+ spez. und - kreuzreaktive T-Zell-Antwort	23	8 (6,3%)	15 (7,1%)
- spez. und + kreuzreaktive T-Zell-Antwort	43	24 (18,9%)	19 (9,1%)
Gesamtanzahl	337	127	210

Die untenstehenden Kreisdiagramme zeigen deutlich, dass bei Probanden mit einer positiv gewerteten SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort eine Beteiligung einer positiven kreuzreaktiven T-Zell-Antwort in beiden Gruppen häufiger ist als eine negative kreuzreaktive T-Zell-Antwort.

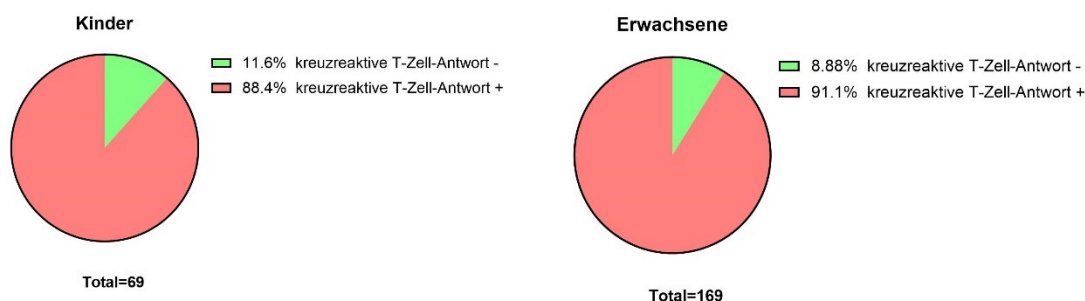


Abbildung 19: Kinder (links) und Erwachsene (rechts) mit einer positiv gewerteten SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort und einer positiven (=rot) oder negativen (=grün) kreuzreaktiven T-Zell-Antwort.

3.1.3.9 Korrelation der Stimulationsantworten SI, SII, CI und CII

Die Immunantwort des Körpers auf ein Virus, wie SARS-CoV-2, ist nicht nur auf ein bestimmtes Antigen beschränkt, sondern auf eine Vielzahl von verschiedenen Antigenen. Dabei wird die Immunantwort von verschiedenen T-Zellen vermittelt, die jeweils auf unterschiedliche Antigene reagieren können (s. T-Zell-vermittelte Immunität, Einleitung). Die SARS-CoV-2 spezifischen T-Zellen entstehen erst bei einer SARS-CoV-2 Infektion und die spezifischen Memory T-Zellen können durch die Peptidstimulationen SI und SII nachgewiesen werden. Die kreuzreaktive T-Zell-Antwort soll jedoch Memory T-Zellen ansprechen, die vor SARS-CoV-2 gebildet und bei einer Infektion mit SARS-CoV-2 reaktiviert werden können. Um das Zusammenspiel der unterschiedlichen T-Zellen besser zu verstehen, ist es interessant die Korrelation der Stimulationsantworten SI, SII, CI und CII anhand der gemessenen Intensitäten genauer zu untersuchen.

In untenstehender Matrix zeigen sich die verschiedenen Korrelationskoeffizienten (r) der unterschiedlichen Peptidstimulationen. Man erkennt, dass alle Variablen dazu tendieren gemeinsam zu zunehmen. Vor allem SI- und SII-Antwort mit $r = 0,59$, sowie SII und CII-Antwort mit $r = 0,64$ zeigen einen starken positiven Zusammenhang in der Kindergruppe. Die Matrix der Erwachsenengruppe zeigt auch eine positive lineare Beziehung der Werte zueinander. Hervorstechend ist die SII und CII Korrelation mit $r = 0,65$. Alle anderen stehen in schwächerem Zusammenhang als bei der Vergleichsgruppe.

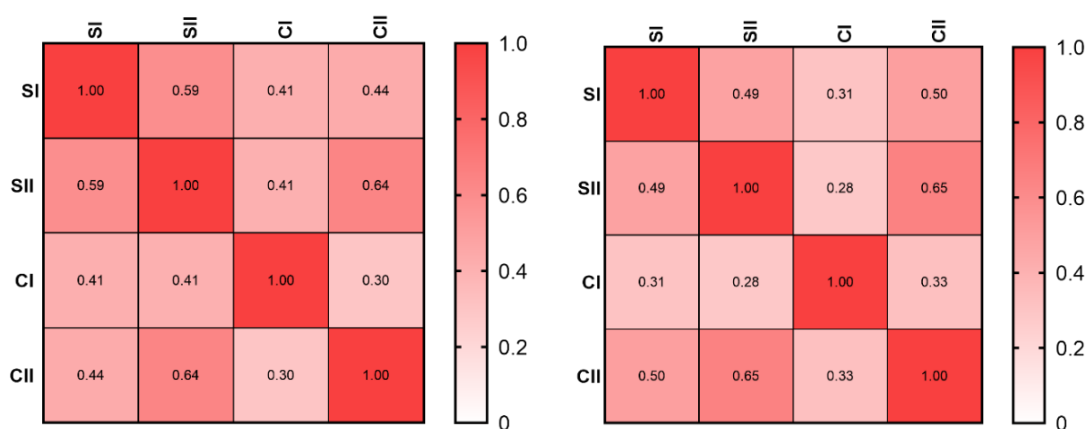


Abbildung 20: Spearmankorrelation der SI, SII, CI und CII Intensitäten; links Kinder und rechts Erwachsene, 0 = kein linearer Zusammenhang

3.1.3.10 Intensitäten von SI +, SII+, CI+ und CII+ Probanden

Um die Korrelation oder eventuelle Unterschiede der Peptidstimulationen und die darauffolgenden T-Zell-Antworten im Assay besser aufzeigen zu können, zeigt folgende Graphik die Intensitäten in allen vier Peptidstimulationen in einer Gesamtübersicht. Es wurden nur Probanden in die statistische Analyse eingeschlossen, die in allen 4 Peptidstimulationen positiv gewertet wurden (s. Tab. 14). Die Mediane betragen in SI 115,3, SII 409,4, CI 275,3 und CII 264,9. Ein signifikanter Unterschied zwischen den vier Stimulationsantworten ergab sich im Kruskal-Wallis-Test mit einem ***p-Wert von 0.0004. Mit den Mann-Whitney-U-Test wurden signifikante Unterschiede zwischen der SI Antwort und den anderen drei Peptidstimulationen aufgezeigt. Zwischen den anderen Peptidstimulationen ergab sich kein signifikanter Unterschied. SI zeigt somit zu den anderen drei Stimulationen die niedrigste durchschnittliche Intensität.

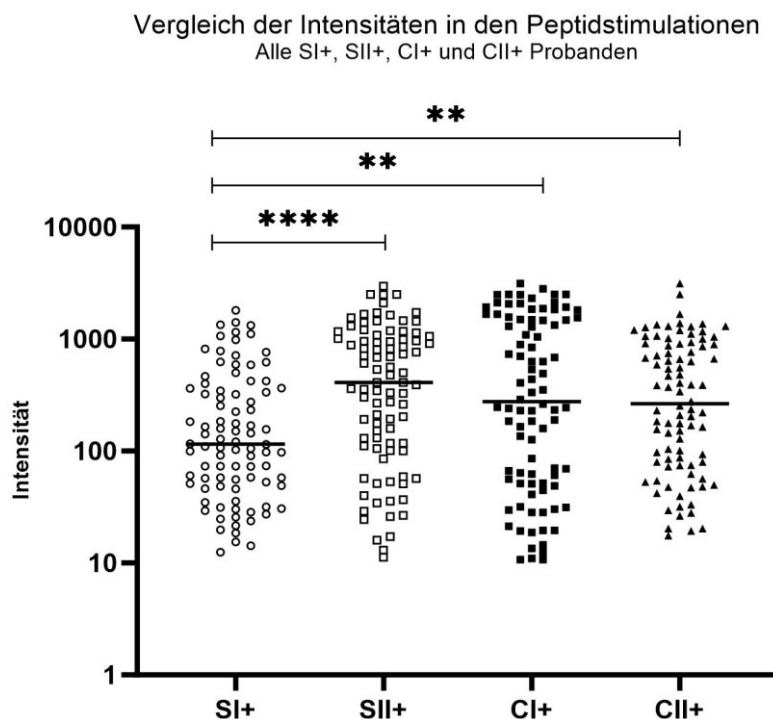


Abbildung 21: Vergleich der SI +, SII +, CI+ und CII+ Probanden; SI vs SII: ****p-Wert: 0,0001; CI vs SI: **p-Wert 0,004 und CII vs SI **p-Wert: 0,0021. Alle anderen Stimulationen miteinander ns p-Werte. Mann-Whitney-U-Test.

3.1.3.11 Durchseuchung in den Familien

Da in allen Familien durch positiven PCR-Test oder positive Antikörper der hochgradige Verdacht auf eine vorangegangene SARS-CoV-2-Infektion bestand, ist es interessant die Verbreitung der Infektion innerhalb einzelner Familien zu analysieren. Dementsprechend zeigt anschließende Graphik den prozentualen Durchseuchungsgrad, d.h. den prozentualen Anteil an Familienmitgliedern mit einer positiven SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort. Die Daten sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 15: Durchseuchung (in Prozent) der Familien, links: Durchseuchung = wie viele Familienmitglieder hatten eine spezifische positiv gewertete T-Zell-Antwort, rechts: Anzahl der Familien mit dieser Durchseuchungsrate.

Durchseuchung der Familien (Gesamtzahl: 72 Familien)	
Prozent	Anzahl der Familien
100%	32
83,3%	2
80%	3
75%	8
66%	6
60%	2
50%	7
40%	1
33%	3
25%	3
20%	1
0%	4

Es wurden nur die Familien analysiert, bei denen für alle Familienmitglieder Daten zur SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort vorlagen. Dies waren 72 von 103 Familien mit jeweils 2-7 Mitgliedern. Der Median der Durchseuchung lag bei 80 %. 32 Familien (=44% der Familien) hatten eine 100% Durchseuchung erreicht. Die vier Familien mit einer 100 % negativen Antwort hatten in T1 mindestens ein positives Mitglied und wurden in T2 in der T-Zell-Antwort als negativ gewertet (s. Tab. 9).

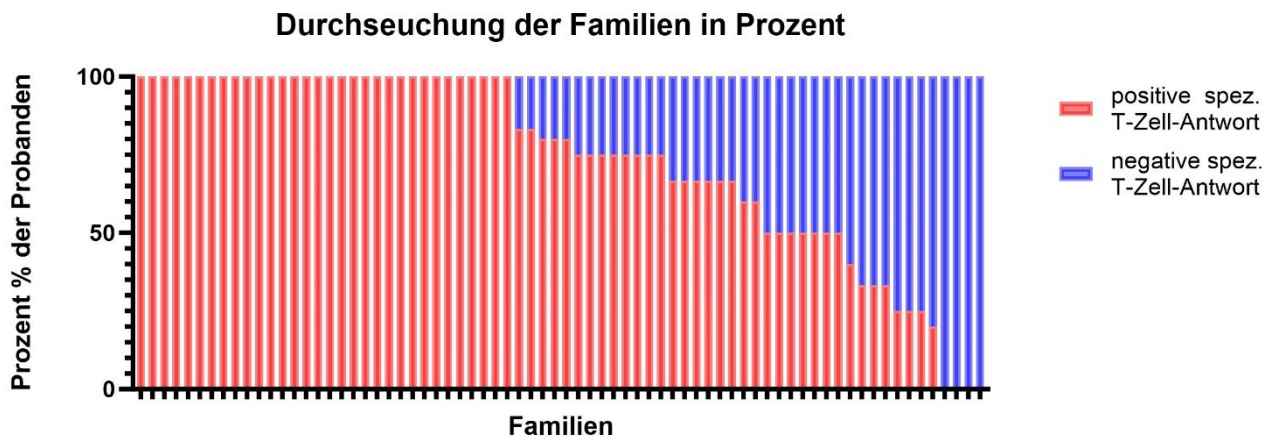


Abbildung 22: Durchseuchungsgrad in 72 Familien in Prozent%; rot = SARS-CoV-2 spezifische positive T-Zell-Antworten in dieser Familie, blau = SARS-CoV-2 spezifisch negative T-Zell-Antworten in dieser Familie, spez. = spezifisch

4 Diskussion

4.1 Studiendesign

Unser Hauptinteresse lag auf dem Infektionsgeschehen innerhalb von Familien, in denen vorwiegend milde oder asymptomatische Verläufe auftraten. Die Auswahl der Studienpopulation sollte repräsentativ für die Gesamtbevölkerung sein. Im Folgenden sind Limitierungen des Studiendesigns aufgeführt. Trotz strenger Lockdown-Maßnahmen könnten sich Studienteilnehmer auch außerhalb ihrer Familien und unabhängig vom familiären (PCR-) Indexfall infiziert haben. In Deutschland wurden ab Mitte März 2020 die ersten Einschränkungen für das öffentliche Leben eingeführt. Bis Mai 2020 waren Kontakte außerhalb des Haushaltes auf ein Minimum begrenzt [80]. Trotzdem gingen Menschen in „systemrelevanten Berufen“ wie Pflegekräfte, Ärzte, Polizei usw. weiterhin arbeiten. Dies hätte eine Ansteckung außerhalb des Familienumfeldes ermöglichen können. Zudem kann eine weitere asymptomatische Infektion zwischen den zwei Zeitpunkten T1 und T2 nicht sicher ausgeschlossen werden. Die 7-Tage-Inzidenz (=Zahl der Covid-19 Fälle in 7 Tagen je 100.000 Einwohner) betrug zu Beginn der Pandemieentwicklung und Datenerhebung in Deutschland 2020 im März/April bis zu 44 Fälle in 7 Tage/100.000 Einwohner. In diesem

Zeitpunkt (=T1) haben sich die Indexfälle der Familien unserer Studie infiziert. Das restliche Jahr 2020 war die 7-Tagesinzidenz relativ stabil bis zu 10 Fällen/100.000 Einwohnern. Ende September stiegen die Fallzahlen erneut und am 23.12.2020 mit einer 7-Tagesinzidenz von 214 wurde ein neuer Höhepunkt erreicht. Dieser Ausbruch wurde als „zweite Infektionswelle“ beschrieben und führte zu einem weiteren Lockdown am 14.12.20 [81], [82]. Außerdem starteten Ende Dezember 2020 vor allem im Gesundheitssektor die ersten Impfungen gegen SARS-CoV-2 [82]. Davon waren sechs erwachsene Probanden in T2 betroffen. Diese obengenannten Faktoren machen Aussagen über die Durchseuchung innerhalb der Familien weniger aussagekräftig, können aber durch die Größe der Kohorte gut ausgeglichen werden. Zu Beginn der Studie wurden bei vielen der, in die Gesamtstudie eingeschlossenen Familien keine Proben zur Erfassung von T-Zell-Daten entnommen. Bei diesen Familien war es jedoch in der zweiten Probensammlung möglich, T-Zell-Daten zu erheben. Dies verkleinerte die Größe der Vergleichskohorte von T1 zu T2 und beeinflusste damit die statistische Auswertung.

Aufgrund der berechtigten strengen Richtlinien zur Blutentnahme bei Kindern, sind vor allem jüngere Kinder in dieser Studienanalyse unterrepräsentiert. Leider waren aufgrund dieser Problematik auch nur wenige präpandemische Blutproben von Kindern für die allgemeinen präpandemischen Negativkontrollen verfügbar. Die Knochenmarksproben von gesunden Spenderkindern aus der onkologischen Abteilung der Kinderklinik Tübingen mussten deswegen erst auf eine ausreichende T-Zell-Population mittels FACS analysiert werden und wurden dann bei ausreichender T-Zell-Population zur Stimulation herangezogen. Leider konnte nur eine „Kinderprobe“ aus den obengenannten Knochenmarksproben zu den präpandemischen Negativkontrollen hinzugefügt werden. Zudem sind Zeit, Dynamik und Verlauf nach der Infektion zwischen einzelnen Probanden sehr variierend, was bei Verallgemeinerungen und Vergleichen mit anderen Kohorten erwähnt werden sollte.

4.2 Material und Methodik

4.2.1 HLA:Peptide

In den Peptidmischen SI, SII, CI und CII sind zahlreiche verschiedene HLA:Peptide enthalten, um eine möglichst breite Abdeckung der gesamten Population zu gewährleisten. Trotz dieser Peptidmische kann es sein, dass aufgrund der genetischen Vielfalt und Polymorphie der HLA-Moleküle eine SARS-CoV-2 spezifische oder kreuzreaktive T-Zell-Antwort in einer oder mehreren Peptidstimulationen durch unsere verwendeten Peptidmische nicht ausgelöst wurde. Die Peptidmische decken nicht alle vorhandenen HLAs ab und dies gilt insbesondere nicht für alle Probanden in der gleichen Tiefe. Beispielsweise könnten für einen Probanden in einer Peptidstimulation drei HLA:Peptide passend sein, während für einen anderen Probanden nur ein HLA:Peptid passend ist. Dieses Phänomen kann sich wiederum auf die Intensität im Assay auswirken. Die SI/CI Antwort hängt stark vom individuellen HLA-Typ ab. Diese Problematik besteht aufgrund der höheren Promiskuität der HLA-DR-bindenden Proteine bei der SII/CII Antwort und somit CD4+ T-Zell-Antwort weniger. Die oben genannten Effekte verringern sich, je größer die Testpopulation ist.

Billich et al. untersuchten die SARS-CoV-2 spezifischen und kreuzreaktiven T-Zell-Antworten mit den gleichen Peptidmischen und der gleichen Methodik 2021 in einer Folgestudie zu Nelde et al. [83]. Die Folgestudie, die 51 Probanden umfasste berichtet, dass die Peptidmische SI und CI nicht nur CD8+ T-Zellen, sondern auch CD4+ T-Zellen stimulieren können. Dieses Phänomen wurde auch bei anderen Virusinfektionen beobachtet [84, 85]. In dem Peptidmix SI (HLA-I-Peptiden) war die gemeinsame Reaktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen häufiger als in den anderen Peptidstimulationen. Außerdem können die HLA:Peptide in SII und CII in kürzere Peptide prozessiert werden und so als Epitope für CD8+ T-Zellen dienen [83]. Deswegen wird in dieser Arbeit von SI und SII Antwort oder CI und CII Antwort gesprochen und eine Stimulation mit diesen Peptidmischen kann nicht exakt einer CD4+ T-Zell-Antwort oder einer CD8+ T-Zell-Antwort zu geordnet werden. Im Vergleich der Intensitäten von Probanden, die in allen 4 Peptidstimulationen als positiv gewertet wurden, zeigt sich das die SI+ Antwort

geringer ausfällt als alle anderen Peptidstimulationen (SII+,CI+ und CII+). Nelde et al. beobachtete in der rekonvaleszenten Probandengruppe in den kreuzreaktiven HLA-Klasse-I Epitopmischen (in dieser Arbeit SI und CI) eine signifikante geringere durchschnittliche Intensität im Vergleich zu den Intensitäten der kreuzreaktiven und spezifischen HLA-Klasse-DR/II Epitopmische (in dieser Arbeit SII und CII). Hier hätte eine Charakterisierung dieser Zellen durch eine Durchflusszytometrie mit Oberflächenmarkern und intrazellulärer Zytokinfärbung wie bei Bilich et al. weitere Kenntnisse über die Häufigkeit der verschiedenen T-Zell-Populationen (CD4+ und/oder CD8+ T-Zellen) in den jeweiligen Stimulationen gebracht. Gründe für die durchschnittlich höheren Intensitäten in den anderen Stimulationen könnten in der oben erwähnten individuellen HLA-Ausstattung oder der erwähnten höheren Promiskuität der HLA-DR-bindenden Peptide liegen.

Grifoni et al betonen in einer Studie 2020 die starke CD4+ T-Zell-Antwort auf Epitope des viralen Nucleokapsids, der Membran, der Nichtstrukturproteine und auf das immundominante Spikeprotein. Im Gegensatz zu vielen anderen Viren, bei denen die T-Zell-Antwort überwiegend gegen nichtstrukturelle Proteine und interne Viruspartikel gerichtet ist [86]. Das Spikeprotein induziert vor allem die humorale Immunantwort. Aufgrund der Fähigkeit, auch die zelluläre Immunantwort mit Epitopen aus dem Spikeprotein auszulösen, lag der Fokus der Impfforschung auf diesem Protein, um eine breite Immunantwort gegen SARS-CoV-2 zu ermöglichen [64]. Im Jahr 2021 verglichen Grifoni et al. 25 Studien, darunter auch Nelde et al., die SARS-CoV-2 spezifische CD4+ und CD8+ T-Zell-Epitope untersuchten. Sie bestätigten die dominanten Epitope von CD4+ und CD8+ T-Zellen der Strukturproteine S (=Spikeprotein), M (=Membranprotein) und N (=Nucleokapsidprotein), sowie ORF3, ORF8, nsp3, nsp4 und nsp12 (ORF = Open-Reading-Frame, nsp = Nicht-strukturelle Proteine) [87]. Aufgrund der HLA-Diversität und der Vielzahl an Epitopen ist es unwahrscheinlich, dass das Virus mit einer Mutation einer T-Zell-Immunantwort vollständig entfliehen könnte. Außerdem legen die Daten nahe, dass die meisten Kombinationen aus HLA-Allelen eine erfolgreiche T-Zell-Antwort erzeugen können [86].

4.2.2 PBMC Isolation und Kryokonservierung

Eine Veröffentlichung von 2007 legt nahe, die Zeit zwischen Entnahme und Einfrieren der PBMCs möglich kurz zu halten, um die Viabilität der Zellen zu erhalten. Unsere Proben wurden am Tag der Isolation bei -80°C eingelagert [88]. Die einzelnen Arbeitsschritte lagen für jeweils eine Familie unter 8 h. Außerdem wurde in einer Studie von Kreher et al. analysiert, inwiefern sich die Frequenz und das Zytokinprofil der Zellen durch eine Kryokonservierung beeinflussen lassen. Diese Studie fand keinen Unterschied zwischen eingefrorenen und frisch isolierten Zellen, so dass eine Kryokonservierung bestens geeignet ist, um mit PBMCs zu forschen [89].

4.2.3 Präsensitivierung

Aufgrund der unterschiedlichen Infektionszeitpunkte der Probanden und des Zeitintervalls bis zu T2 würden bei einer Ex-vivo-Analyse viele T-Zell-Antworten aufgrund einer zu niedrigen Frequenz spezifischer T-Zellen unter die messbare Nachweisgrenze fallen. Es wurde deswegen eine 12-tägige Präsensitivierung basierend auf der Studie von Nelde et al. durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit unserer T-Zell-Daten innerhalb der Probandenproben zu ermöglichen. Das Verfahren der Präsensitivierung wird durch eine im Jahre 2020 veröffentlichte Studie, die humane Cytomegalievirus (CMV) T-Zell-Epitope untersuchte, unterstützt. Dabei fielen CMV spezifische T-Zellen ex vivo unter die Nachweisgrenze, wenn zuvor keine Vorkultivierung stattgefunden hatte [90]. Ein Nachteil der Präsensitivierung ist eine eventuelle Stimulation von naiven T-Zellen und somit ein falsch positives Ergebnis [91].

4.2.4 ELISPOT

Das Ziel unserer Studie war ein epidemiologisches Screening einer großen Kohorte auf SARS-CoV-2 an zwei Zeitpunkten. Der ELISPOT, als früherer Goldstandard im T-Zell-Monitoring, eignet sich gut, um solche großen Screenings durchzuführen. Auch heute in Konkurrenz zu neueren T-Zell-Assays wie der Durchflusszytometrie mittels Zytokinfärbung oder der Tetramerfärbung bietet er

eine quantitative Methode mit einer hohen Sensitivität für das T-Zell-Monitoring [92].

Das Screenen einer großen Kohorte ermöglicht beispielsweise die ELISPOT-Platte auf die 96 Proben auf einmal entwickelt und detektiert werden können. Da sich auf einer Platte Proben von meistens 4 Probanden befanden, konnten wir innerhalb von 3 Monaten die gesamte Kohorte in T2 auf SARS-CoV-2 spezifische und kreuzreaktive T-Zell-Antworten screenen. Außerdem wurde die ELISPOT-Methode mit den dazugehörigen HLA:Peptiden in der Studie von Nelde et al. im Voraus etabliert. Die Probanden wurden in T1 auf dieselbe Weise gescreent. Dabei erwies sich die ELISPOT-Methodik bereits als gut geeignet und zuverlässig. Daher wurde sie auch in T2 in gleicher Weise angewandt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Von der Variabilität der Ergebnisse im ELISPOT wird in mehreren Studien berichtet [93, 94],[95]. In einer Studie von Zhang et al. aus dem Jahr 2009 wird betont, wie wichtig es ist, einheitliche Arbeitsschritte zur Standardisierung und Vergleichbarkeit von T-Zell-Assays wie dem ELISPOT sicherzustellen, da die Ergebnisse durch verschiedene Faktoren wie die Verwendung unterschiedlicher Reagenzien, Protokolle oder einer benutzerabhängigen statistischen Analyse stark variieren können [94]. Deswegen wurde in T1 und T2 das gleiche Protokoll angewandt und die Daten am Immunospot mit den gleichen Grundeinstellungen erfasst.

Bei einigen Personen, ohne positive spezifische T-Zell-Antwort gegen SARS-CoV-2 im Blut wurde eine positive Antwort von im Gewebe persistierenden T-Zellen in der Lunge detektiert. Trotzdem zeigte eine dieser Studien eine signifikante Korrelation zwischen im Gewebe persistierenden T- und B-Zellen mit zirkulierenden T-Zellen im Blut und somit eine gute, aber nicht perfekte Validität von Bluttestverfahren von SARS-CoV-2 spezifischen T-Zellen [107, 108]. Mehrere andere Studien, darunter Lin et. al, untersuchten die ELISPOT-Methodik und andere IFN- γ -Freisetzungstests für die T-Zell-Detektion im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 [96-98]. Lin et al. evaluierten einen angepassten ELISPOT-Assay an 175 rekonvaleszenten und gesunden Probanden mit vorherigen SARS-CoV-2 spezifischen positiven Nukleinsäure-Testergebnissen. Sie stellten eine maximale Sensitivität von 93 % und eine maximale Spezifität von 100% in ihrem

Assay fest. Diese Sensitivität und Spezifität im Testverfahren sind jedoch abhängig von den verwendeten unterschiedliche Peptidmischen und müssen je nach klinischer Fragestellung ausgewählt werden. Außerdem waren Kinder in dieser Studie unterrepräsentiert. Im Verlauf entwickelten auch andere Forschungsinstitutionen auf der ELISPOT-Methodik beruhende IFN- γ -Freisetzungstests zur SARS-CoV-2 spezifischen Detektion von T-Zellen für die eventuelle klinische Anwendung [99, 100]. Die Idee hinter diesen Verfahren bei SARS-CoV-2 ist der bereits stattfindende klinische Einsatz solcher Testverfahren bei Erregern wie Mycobacterium tuberculosis [101]. Diese Anwendung könnte im klinischen Setting den serologischen Nachweis einer Infektion mit SARS-CoV-2 oder Impfung ergänzen und darüber hinaus bei der Überwachung der Immunantwort, Impfforschung oder Therapie helfen [102]. Angesichts der Impfungen, Durchbruchinfektionen und Neuinfektionen könnte ein etabliertes und standardisiertes Testverfahren zur Analyse der T-Zell-Antwort einen zusätzlichen Nutzen neben der serologischen Diagnostik im Hinblick auf die Immunität gegen SARS-CoV-2 bieten [106]. Dies ist gerade in der postpandemischen Zeit von Interesse, um Impfempfehlungen wie beispielsweise Auffrischimpfungen zu reevaluieren.

Ein paar Kritikpunkte sollten noch erwähnt werden. In unserem Assay konnte man zwar die SARS-CoV-2 spezifische oder kreuzreaktive T-Zell-Antwort nachweisen, eine Subklassifizierung der T-Zellen in CD4+/CD8+ Phänotyp, beispielsweise durch Durchflusszytometrie hingegen wurde nicht durchgeführt, hätte aber einen noch besseren Aufschluss über die spezifische Immunreaktion bei SARS-CoV-2 gebracht. Die Sortierung in CD4+ und CD8+ T-Zellen hätte bereits vor der Kultivierung in Betracht gezogen werden können, da, wie oben erwähnt, die HLA:Peptide sich nicht eindeutig einem T-Zell-Typ zuordnen lassen. Da das Hauptziel unserer Studie jedoch auf dem epidemiologischen Screening von SARS-CoV-2 in den Familien lag, haben wir uns gegen eine vorherige Sortierung der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie entschieden.

Der schon im Methodenteil beschriebene Wechsel der Medien für die Positivkontrollen aufgrund pandemiebedingter Lieferengpässe führte zu einer leicht eingeschränkten Vergleichbarkeit dieser Kontrollen. Außerdem musste

aufgrund der Software am ImmunoSpot und der statistischen Analyse eine maximale gezählte Spotzahl von 2700 ausgewählt werden und somit wurden die maximalen Intensitäten nach oben abgegrenzt. Zudem wird nur die Aktivierung durch IFN- γ detektiert, über zytolytische Funktionen von beispielsweise Granzym und Perforin von CD8⁺ T-Zellen konnte keine Aussage gemacht werden [103]. Die ELISPOT-Methode lässt sich jedoch auch mit Granzym oder Perforin anwenden und hätte sicherlich einen genaueren Einblick in die spezifische oder kreuzreaktive CD8⁺ T-Zell-Reaktion gegen SARS-CoV-2 geben können. Heutzutage können auch zweifarbige ELISPOT-Platten mit beispielsweise Tumornekrosefaktor- und IFN γ -Detektion eingesetzt werden [92]. Diese hätten einen besseren Einblick in die T-Zell-Populationen innerhalb der Peptidstimulationen bieten können.

Nelde et al. untersuchten 104 präpandemische Probanden für die Charakterisierung der kreuzreaktiven und spezifischen T-Zell-Epitope [30]. Zur Validierung führten wir Negativkontrollen von 35 präpandemischen laborinternen PBMC-Proben mit allen 4 Peptidmischen durch. Es zeigte sich bei allen eine negative SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort und teilweise eine kreuzreaktive T-Zell-Antwort.

Zusammenfassend war die ELISPOT-Methode für das Screening einer großen Kohorte gut geeignet. Leider ist sie immer noch zeitintensiver als serologische Testverfahren. Für noch mehr qualitative Unterschiede in der T-Zell-Antwort gegen SARS-CoV-2 hätte man jedoch zusätzliche Testverfahren wie beispielsweise die Durchflusszytometrie anknüpfen können. Außerdem war bei den Kindern ein stärkerer Rückgang der positiven Antworten von T1 zu T2 festzustellen, begleitet von durchschnittlich niedrigeren Intensitäten in SI und SII. Diese Beobachtungen könnten die Notwendigkeit einer erneuten Validierung des ELISPOT-Verfahrens für diese spezifische Subgruppe nahelegen.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort in den Subgruppen

Genau wie Dan et al. in einer großen longitudinalen Studie beschreiben, ergab sich im Vergleich der Geschlechter in der Gesamtpopulation kein signifikanter Unterschied in der spezifischen T-Zell-Antwort [104]. Es zeigte sich eine höhere Rate von negativ getesteten Kindern (46,7% versus 19,52%) in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort im ELISPOT. Durch Schul- und Kindertageseinrichtungsschließungen mit Beginn im März 2020 bis Mitte Mai im zeitlichen Rahmen der Erstinfektionen (T1) waren es vor allem die Erwachsenen, die eine Infektion in den Haushalt trugen. Außerdem konnten sich diese leichter infizieren, wenn sie beispielsweise in systemrelevanten Berufen arbeiteten. Zudem gestaltet sich die Isolation eines Erwachsenen im Krankheitsfall einfacher als die Isolation eines Kindes, welches im Krankheitsfall je nach Alter auf die Hilfe der Eltern angewiesen ist. Zudem sorgten die Haushaltsrichtlinien, Einzelpersonen- und Kontaktpersonenquarantäne und Maßnahmen gegen die Übertragung im Jahr 2020 für eine langsamere Verbreitung des Virus in Deutschland und es kam zu Abschottungen innerhalb des Haushaltes [82].

Diese Präventionsmaßnahmen könnten dafür gesorgt haben, dass sich weniger Kinder mit SARS-CoV-2 in diesem Zeitraum infiziert haben. Dies könnte den höheren Anteil an negativ getesteten Kindern in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort in unserem Assay erklären. In der Zeit zwischen T1 und T2 bestand das Risiko, dass sich die Kinder aufgrund von Lockerungen im öffentlichen Leben und steigenden Infektionszahlen zum Ende des Jahres 2020 mit dem Virus infizieren konnten. Dennoch war die Anzahl der Kinder, die von einer negativen in T1 zu einer positiven SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort wechselten, in T2 gering (3,3%). Diese Beobachtung spricht gegen eine Infektion in der Zeitspanne von T1 zu T2. Die Ergebnisse zeigten zu der höheren Anzahl an negativ gewerteten Kindern in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort und eine geringere SII+ Antwort. In der SI Antwort zeigte sich auch eine durchschnittlich niedrigere Intensität als bei den Erwachsenen. Zudem zeigte sich in unseren Ergebnissen kein Unterschied in den parametrischen Daten der

SI und/oder SII Antwort bei Kindern und Erwachsenen. Die kombinierte Antwort von SI und SII war in beiden Gruppen am häufigsten und unterstreicht die Induktion von spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen bei SARS-CoV-2-Infektion in beiden Gruppen. Es lassen sich jedoch SI und SII Antworten nicht hundertprozentig CD8+ T-Zellen und CD4+ T-Zellen zuordnen (s. HLA:Peptide, Diskussion).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es auch biologische Gründe für die erhöhte Anzahl von Kindern geben könnte, die in der spezifischen T-Zell-Antwort negativ auf SARS-CoV-2 getestet wurden. Einer dieser Gründe könnte durch eine andere angeborene oder adaptive Immunabwehr gegen SARS-CoV-2 und dadurch eine eventuell geringere Memory T-Zell-Bildung bei Kindern erklärt werden.

Im Allgemeinen wird die Abwehr einer Virusinfektion zum größten Teil von cytotoxischen CD8+ T-Zellen übernommen, da Viren, wenn sie einmal in die Zelle eingedrungen sind, nicht mehr von Antikörpern erreicht werden [105]. Im Gegensatz dazu zeigen andere Studien in Bezug auf SARS-CoV-2, dass gerade frühe spezifische CD4+ T-Zellen den stärksten Zusammenhang mit einer verringerten Schwere der Infektion aufweisen (im Vergleich zu CD8+ T-Zellen und Antikörperreaktionen) [54, 106]. Cohen et al. untersuchten in einer Studie im Jahre 2021 SARS-CoV-2 spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen von rekonvaleszenten Kindern und Erwachsenen in einer ex-vivo-Analyse mit vorheriger Peptidstimulation mittels Durchflusszytometrie. Sie stellten geringere CD4+ und CD8+ T-Zell-Reaktionen und ein reduziertes CD4+ T-Zell-Effektorgedächtnis bei SARS-CoV-2 infizierten Kinder im Vergleich zu Erwachsenen fest [107]. Weitere Unterschiede waren ein geringerer Antikörperspiegel gegen Beta-Coronaviren. Außerdem beschreiben sie eine geringere Anzahl der Monozyten und eine Erhöhung der SARS-CoV-2 spezifischen Antworten der folliculären T-Helferzellen. Cohen et al. vermuten deswegen, eine bessere Koordination der B- und T-Zell-Antwort gegen SARS-CoV-2 der Kinder im Vergleich zu den Erwachsenen und mildere Infektionen durch eine reduzierte T-Zell-Aktivität und ein niedrigeres Entzündungsmilieu. Ein niedrigeres Entzündungsniveau bei Kindern wurde auch von Jia et al.

beschrieben, die eine vergleichbare Zytokinproduktion bei Kindern mit asymptomatischer oder milder SARS-CoV-2 Infektion im Vergleich zu gesunden nicht infizierten Kindern feststellten [108]. Die Qualität der SARS-CoV-2 gerichteten T-Zell-Antworten, die anhand der Produktion von Zytokinen und Expression von Erschöpfungsmarker analysiert wurde, wurde in Erwachsenen und Kindern vergleichbar gewertet [107]. Die Aussage, dass eine gute Koordination der einzelnen Komponenten der adaptiven Immunabwehr protektiv für einen schweren SARS-CoV-2 Verlauf sind und diese Koordination mit zunehmendem Alter (>65 Jahren) gestört ist, wird von Rydzynski Moderbacher et al. ebenfalls beschrieben [54].

Eine 2018 veröffentlichte Studie hat die Unterschiede zwischen pädiatrischer und erwachsener T-Zell-Reaktion mittels SEB-Stimulation (s. Positivkontrollen, Methodik) als Superantigen im Rahmen des toxischen Schocksyndroms, untersucht. Die Studie zeigte eine verringerte T-Zell-Aktivierung nach SEB-Stimulation bis zur Adoleszenz. Zudem bestätigten Rudolph et al. in ihrer Studie die Beobachtung von Thome et al., dass Kinder eine höhere Anzahl an naiven T-Zellen und eine niedrigere Anzahl an Effektor Memory T-Zellen im Blut und im lymphatischen Gewebe aufweisen [109],[110]. Die Produktion von naiven T-Zellen im Thymus hat mit einem Lebensjahr ihren Höhepunkt erreicht und nimmt danach im Laufe des Lebens ab [120]. Somit ist das Potential der naiven T-Zellen auf ein neues Antigen wie SARS-CoV-2 oder auch Tumorerkrankungen zu reagieren, bei Älteren ab 65 durch die verminderte Anzahl an naiven T-Zellen eingeschränkt.

Zudem ist das T-Zell-Rezeptor Repertoire der naiven T-Zellen im Kindesalter breiter als im Erwachsenenalter. Dies reduziert wiederum das Potential, um auf ein neues Antigen adäquat zu reagieren [110]. Bei Untersuchung der T-Zell-Rezeptor Spezifität fiel auf das CD4+ T-Zellen von Kindern eher auf nichtstrukturelle Proteine von SARS-CoV-2 reagieren. Einige dieser nichtstrukturellen Proteine sind laut Xia et al. für die Blockierung der Interferonreaktion des Wirtes auf SARS-CoV-2 verantwortlich und könnten bei Erwachsenen, deren CD4+ T-Zell-Rezeptor hauptsächlich auf Strukturproteine reagiert, für schwerwiegendere Infektionen verantwortlich sein [107, 111] .

Außerdem sind überwiegend Erwachsene bei chronischen Infektionen, einschließlich CMV und Herpesviren, sowie bei Tumorerkrankungen von einer T-Zell-Erschöpfung betroffen. Diese Erschöpfung führt zu einer T-Zell-Dysfunktion und somit zu einer schlechteren Kontrolle von Infektionen und Tumoren [112]. Diese Beobachtungen zwischen einem Zusammenhang verminderter naiver T-Zellen, der veränderten Spezifität des T-Zell-Rezeptors im Alter und ihrer Funktion und dementsprechend einem Risiko für einen schwerwiegenden Verlauf werden durch die Zunahme der Mortalität mit zunehmendem Alter bei SARS-CoV-2 gestützt [122, 123]. Außerdem wurden bei Immundefizienzerkrankungen, die mit einem Mangel an T-Zellen oder T-Zell-Funktion einhergehen, schwerwiegendere Verläufe von SARS-CoV-2 beobachtet als bei anderen Immundefekten beispielsweise Antikörperdefizite oder Autoimmunerkrankungen [113].

Ein weiterer Unterschied zwischen Kinder und Erwachsenen ist eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Kindesalter. Diese sind entscheidend für die Toleranzentwicklung gegenüber harmlosen Antigenen und schützen gleichzeitig vor einer Immundysregulation. Da das immunologische Gedächtnis sich im Laufe der Kindheit mit dem Kontakt von Antigenen erst entwickelt, besitzen Kinder im Allgemeinen auch weniger Memory T-Zellen als Erwachsene [121]. Die oben erwähnten Punkte könnten eine Erklärung für die niedrigen Intensitäten in den Peptidstimulationen in SI und SII der Kinder im Vergleich zu den Erwachsenen in unserem Assay bieten. Durch eine effiziente gut koordinierte spezifische T-Zell-Antwort bei Kindern könnte SARS-CoV-2 schneller mit weniger Zellen der adaptiven Immunantwort eliminiert werden. Deswegen könnten anteilig weniger Memory T-Zellen in Kindern gebildet werden und diese verminderte Anzahl sorgen im ELISPOT für eine geringere Intensität. Die dadurch resultierenden geringeren Intensitäten in den Peptidstimulationen SI und SII könnten dafür sorgen, dass Kinder vermehrt negativ in der SARS-CoV-2 spezifischen Antwort gewertet wurden.

Ein weiterer Grund für eine geringere Intensität in den Peptidstimulationen der Kinder in der spezifischen T-Zell-Antwort könnte eine niedrigere Viruslast von SARS-CoV-2 in Kindern sein und dementsprechend eine verringerte adaptive

Immunantwort und Memory T-Zellbildung. Bei Studien mit Gelbfieberimpfungen als Modell für akute Virusinfektionen fanden Akondy et al. heraus, dass das Ausmaß der Effektor-CD8+-T-Zell-Reaktion mit der anfänglichen Viruslast korreliert [114]. De Witt et al. fanden heraus, dass bei einer Reaktion auf Gelbfieberimpfstoff etwa 5-6 % der CD8+ Effektor-T-Zellen zu Memory T-Zellen rekrutiert werden [115]. Eine verringerte Viruslast bei SARS-CoV-2 könnte somit auch zu einer geringeren Memory T-Zell-Bildung führen. Drei Studien zeigten eine vergleichbare Viruslast [116] oder eine leicht geringere Viruslast von Kindern mit milden und asymptomatischen SARS-CoV-2 Infektionen im Vergleich zu Erwachsenen [117, 118]. Eine vorherige Messung der Viruslast unserer Probanden und ein Vergleich der Viruslast mit der spezifischen T-Zell-Antwort unserer Probanden hätte die obengenannte Hypothese weiter stützen können. Ein Messen der Viruslast ist jedoch mit Schwierigkeiten verbunden, beispielsweise, wenn der genaue Zeitpunkt des Infektionsbeginns nicht bekannt ist oder zu weit zurückliegt. In unserer Kohorte konnte keine Messung erfolgen, da die Probanden erst 3-4 Monate nach Infektion rekrutiert wurden.

4.3.2 SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort im zeitlichen Verlauf

Ein weiterer Grund für die erhöhte negative Anzahl der Kinder in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort in T2 könnte eine verminderte Persistenz von SARS-CoV-2 Memory T-Zellen bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen sein. Die Vergleichsgruppe zwischen T1 und T2 umfasste 61 Kinder und 112 Erwachsene, während in T2 insgesamt 127 Kinder und 210 Erwachsene untersucht wurden. In der Vergleichsgruppe von T1 zu T2 zeigte sich, dass ein höherer Anteil an Kinder (18%) im Vergleich zu Erwachsenen (11,3%), die in T1 eine positive SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort aufwiesen, in T2 negativ in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort gewertet wurden. Das entspricht wiederum 44,3 % der Kinder und 79,4 % der Erwachsenen mit einer SARS-CoV-2 spezifisch positiven T-Zell-Antwort in T1, bei denen in T2 ebenfalls eine SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort festgestellt wurde. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Persistenz von SARS-CoV-2 spezifischen Memory T-

Zellen bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen unterschiedlich und bei Kindern verringert sein könnte.

Unsere Daten zeigen, dass bei der Mehrzahl der Probanden in beiden Gruppen Memory T-Zellen nach 11-12 Monaten nach Infektion mit SARS-CoV-2 nachweisbar sind. Eine längere Persistenz der Memory T-Zellen von mindestens 8 Monaten zeigen auch andere Studien [109, 110],[119, 120]. Weitere Hinweise auf eine lange Persistenz von Memory T-Zellen von bis zu 17 Jahren wurde auch in Zusammenhang mit SARS-CoV-1 gefunden [139, 140]. Leider sind in diesen obengenannten Studien Kinder nicht eingeschlossen und machen so einen Vergleich mit unseren Daten schwieriger. Dowell et al. fanden bei 84 % der Kinder und 79 % der Erwachsenen in ihrer Kohorte, die nachweislich mit SARS-CoV-2 infiziert waren, nachweisbare zelluläre Immunantworten nach 6 Monaten. Auch nach 12 Monaten war die gemessene T-Zell-Antwort gegen SARS-CoV-2 bei 15 Kindern zwar etwas geringer, aber vorhanden. Die Kohorte bestand aus 91 Kindern und 154 erwachsenen Probanden mit asymptomatischen und milden Infektionen. Im Widerspruch zu Cohen et al. die eine verringerte CD4+ und CD8+ T-Zell-Reaktion in ihrer Studie beschrieben [121], stellten Dowell et al. eine höhere Spike-spezifische T-Zell-Antwort der Kinder im Vergleich zu den Erwachsenen mittels ELISPOT-Assay fest [122].

Die Kinder der Vergleichsgruppe zwischen T1 und T2 unserer Kohorte zeigten durchschnittlich niedrigere Intensitäten in den Peptidstimulationen SI und SII im Vergleich zu den Erwachsenen. Ein Widerspruch zu den oben genannten Ergebnissen von Dowell et al. und zu den Ergebnissen von Cohen et al. passender. Außerdem zeigen unsere Daten ein signifikantes Absinken der Intensitäten der Peptidstimulationen SI und SII von T1 zu T2 bei den Kindern und Erwachsenen. Billich et al. beschrieben eine robuste T-Zell-Antwort gegen SARS-CoV-2 mit den gleichen HLA:Peptiden nach 6 Monaten. Sie stellten sogar eine Zunahme der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Reaktion auf HLA-DR-Peptidmixe mittels ELISPOT fest. Die untersuchte Kohorte umfasste 51 Erwachsenen mit leichten und mittelschweren Infektionen und 27 % der Probanden berichteten über anhaltende oder neu aufgetretene postinfektiöse Symptome [83]. Ein nicht zu vernachlässigender Unterschied zu unseren

Probanden, die vor allem milde und asymptomatische Infektionen ohne postinfektiöse Symptomatik hatten. Dan et al. zeigten in einer großen Längsschnittstudie mit 188 erwachsenen Probanden eine Abnahme der CD8+ und CD4+ Memory T-Zellen mit der Zeit. Im 1. Monat waren bei 70 % der Probanden CD8+ Memory T-Zellen nachweisbar. Im 6. Monat waren nur noch bei 50% der Probanden CD8+ Memory T-Zellen nachweisbar. Im Gegensatz dazu, waren bei 93% der Probanden nach einem Monat und 92 % der Probanden nach 6 Monaten CD4+ Memory T-Zellen nachweisbar [104].

Dan et al. und Bilich et al. berichten über eine große interindividuelle Heterogenität im Immungedächtnis bei SARS-CoV-2 [83, 104]. Diese Heterogenität macht es schwierig Kohorten übergreifende Aussagen über das T-Zell-Gedächtnis gegen SARS-CoV-2 zu generieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Kinder und Erwachsene, dazu in der Lage sind ein SARS-CoV-2 spezifisches T-Zell-Gedächtnis aufzubauen, welches auch noch 11-12 Monate nach der Infektion bei der Mehrzahl der Probanden nachweisbar ist, aber in der Intensität abnimmt. Und in der Zusammenschau mit anderen obengenannten Studienergebnissen könnten Memory T-Zellen gegen SARS-CoV-2 im Zeitverlauf nicht mehr nachweisbar sein.

4.3.3 Unterschiede in der SARS-CoV-2 spezifischen Immunantwort zwischen Kindern und Erwachsenen

4.3.3.1 Allgemeine Unterschiede

Der hohe Anteil an milden Infektionen und die daraus resultierende Immunreaktion bei Kindern kann verschiedene Ursachen haben. Kinder haben tendenziell weniger Komorbiditäten als Erwachsene beispielsweise chronische Lungenerkrankungen oder Diabetes, sowie Alkohol- und Tabak-Konsum und Adipositas. Diese können immunmodulatorisch wirken und stellen einen Risikofaktor für schwere Verläufe dar [117]. Kinder mit schweren Krankheitsverläufen mit Intensivbetreuung hatten in den meisten Fällen pulmonologische, immunologische oder neurologische Komorbiditäten [123]. Die

verhältnismäßig wenigen schweren Krankheitsverläufe bei der Mehrzahl von Kindern im Vergleich zu den Erwachsenen spiegeln auch andere Studien wider [112-114]. Im Großen und Ganzen kommen die meisten Studien aber zum Ergebnis, dass bei leichten bis milden Covid-19-Infektionen das Immunsystem von Kindern und Erwachsenen ähnlich reagiert. Das heißt, dass Kinder und Erwachsene mehrheitlich in der Lage sind eine robuste adaptive Immunantwort mit spezifischen T-Zellen und Serostatus gegen SARS-CoV-2 zu bilden. Erst bei Entwicklung von schweren Krankheitsverläufen und Komplikationen, wie das bei Kindern erstmals unter SARS-CoV-2 aufgetretene multiinflammatorische Syndrom (MIS-C oder PIMS), werden Unterschiede zwischen Kindern und Erwachsenen deutlich erkennbar [61].

MIS-C wurde erstmals im April 2020 im Zuge der globalen Pandemie beschrieben und daraufhin mit SARS-CoV-2 assoziiert [123-126]. Es ist charakterisiert durch 48 h anhaltendes Fieber und die entzündliche Beteiligung mehrerer Organsysteme und ähnelt dem Kawasaki-Syndrom. Es betrifft vor allem Kinder von 8-11 Jahren [127]. Von 2020 bis 2023 wurden in Deutschland circa 930 Fälle gemeldet [128]. Im Vergleich zu schweren Covid-Verläufen bei Erwachsenen, kommt es bei MIS-C zu einer stärkeren multilinearen Aktivierung von Immunzellen, die über eine normale Aktivierung des Immunsystems bei SARS-CoV-2 hinausgeht. So wurden erhöhte Zytokinlevel, erhöhte Spiegel des Komplementfaktors C5b9, Lymphopenie, erhöhte Antikörpertiter gegen Spike und RBD, sowie erhöhte Antikörper gegen andere Erkrankungen und Autoantikörper gefunden [60,129-131]. Dies deutet auf eine starke Immunsyregulation hin. Im Vergleich haben Erwachsene mit schwerem Krankheitsverlauf häufig eine T-Zell-Lymphopenie, reduzierte zirkulierende folliculäre T-Helferzellen und eine beeinträchtigte Interferon-vermittelte Signalübertragung, verbreiterte T-Zell-Aktivierung und eine breite humorale Antwort [60].

4.3.3.2 Angeborene Immunantwort

Eine schnelle und effiziente angeborene Immunantwort könnte ein Erklärungsansatz für die Vielzahl von asymptomatischen und milden Infektionen

bei Kindern im Vergleich zu den Erwachsenen bieten. Unterschiede in der angeborenen Immunantwort könnten sich auch auf die adaptive Immunantwort auswirken und eine Erklärung für die niedrigeren Intensitäten in den Peptidstimulationen SI und SII der Kinder im Vergleich zu den Erwachsenen in meiner Arbeit bieten. Durch die Aktivierung der Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) durch Virusbestandteilen beispielsweise Hüll- und Spikeprotein können robuste Interferonantworten der angeborenen Immunantwort induziert werden [132, 133]. SARS-CoV-2 besitzt jedoch Gegenregulationsmechanismen, um die Interferonantwort zu hemmen [111, 134]. Bei Erwachsenen mit schweren Verläufen fiel eine geringere Menge an zirkulierenden Typ I Interferonen (Interferon alpha und beta) auf. Ein Zusammenhang dieser geringen Interferonmenge bei schwer erkrankten Erwachsenen mit neutralisierendem Antikörper gegen diese Interferone wurde in mehreren Studien gezeigt [135, 136]. Außerdem korreliert das Alter ab 65 Jahren mit einer Abnahme der plasmacytoiden dendritischen Zellen und der daraus resultierenden schwächeren Interferonproduktion im Körper [137]. Diese interferonproduzierenden Zellen der angeborenen Immunabwehr produzieren bei einer Virusinfektion die 1000-fache Menge an Interferon Typ I als andere Körperzellen. Die Interferone können direkt über den Interferonrezeptor die Virusreplikation hemmen oder erhöhen die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf allen Zelltypen und helfen so cytotoxische T-Zellen zur effizienten Antigenerkennung [66]. Viele Faktoren führen im Alter zu einer geringeren Interferonproduktion. Beispielsweise kann eine chronische Virusinfektion der plasmacytoiden dendritischen Zellen mit CMV zu einer Abnahme der Interferonproduktion beim Erwachsenen führen [138]. Eine schnell induzierte adaptive Immunantwort durch eine höhere Interferon Typ I Reaktion könnte den Kindern helfen, SARS-CoV-2 schneller zu eliminieren und die mehrheitlich asymptomatischen oder milden Verläufe bei Kindern erklären. Zu dieser Beobachtung kamen auch Pierce et al., die die mukosale Immunantwort von 12 hospitalisierten Kindern im Vergleich zu 27 hospitalisierten Erwachsenen mit ähnlicher Viruslast, anhand von Nasensekret untersuchten [139]. Die Interferonreaktion ist bis zum Alter von 2 Jahren reduziert und passen sich im

Alter von 5 Jahren dem Level eines Erwachsenen an [140]. Diese geringe Reaktion im Säuglingsalter könnte eine Erklärung dafür bieten, dass gerade Säuglinge schwerwiegendere Krankheitsverläufe mit einer höheren Hospitalisierungsrate im Vergleich zu älteren Kindern hatten [56].

4.3.3.3 SARS-CoV-2 Eintrittspforten

Ein weiterer Aspekt sind die SARS-CoV-2 Eintrittspforten durch den ACE2-Rezeptor mit Hilfe von der TMPRSS2. Die Spaltung des viralen Spike-Proteins durch körpereigene TMPRSS2 und Cathepsin L ermöglichen die Fusion des Virus mit der Zielzelle. Eine niedrigere Genexpression bei Kindern könnte bedeuten, dass das Virus schlechter ins Epithel gelangt und somit zu milderen und asymptomatischen Verläufen führen könnte. Mehrere Studien zeigen, dass die Expression von TMPRSS2 im Alveolarepithel im Alter zu nimmt [141-143]. Eine Studie von Bunjavanich et al. untersuchte 2015 bis 2018 die nasale Expression von ACE2 bei Kindern und Erwachsenen (unter 60 Jahre) mit und ohne Asthma. Sie fanden bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen eine geringere Expression, die im Alter zunahm [144]. Hasan et al. unterstützen die Hypothese und fanden in ihrer Familienstudie mit 234 Probanden zusätzlich heraus, dass Kinder mit niedrigeren nasalen ACE2- und TMPRSS2-Spiegel wohlmöglich mit größerer Wahrscheinlichkeit SARS-COV-2 negativ bleiben könnten. Diese Negativität könnte, laut Hasan et al., auch bestehen bleiben, wenn sie einem positiven Familienmitglied ausgesetzt sind [145]. Sharif-Askari et al. fanden ebenso eine niedrigere ACE2 und TMPRSS2 Expression bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen. Zudem berichten Sie in ihrer Studie, dass bei Erwachsenen mit Komorbiditäten wie Asthma, COPD oder Hypertension die ACE2 und TMPRSS2 Expression im Vergleich zu gesunden Erwachsenen ansteigt [146]. Es könnte somit auch denkbar sein, dass mehr Kinder als Erwachsene in unserer Kohorte aufgrund einer niedrigeren ACE2- und TMPRSS2-Expression eine negative spezifische T-Zell-Antwort zeigten.

4.3.4 SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort und spezifischer Serostatus im Vergleich

Bei allen 337 Probanden wurde der SARS-CoV-2 spezifische Serostatus untersucht und die Ergebnisse konnten mit den unseren verglichen werden. In unserer Kohorte wurde analog zur spezifischen T-Zell-Antwort, ein höherer Anteil an Kindern (59,1%), die negativ auf den SARS-CoV-2 spezifischen Serostatus getestet wurden, im Vergleich zu Erwachsenen (34,3%) festgestellt. Bei 96,6 % der Kinder, die eine negative SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort aufwiesen, wurde auch ein negativer Serostatus detektiert. Bei den Erwachsenen betrug dieser Anteil 87,8%. Dieser Zusammenhang von SARS-CoV-2 spezifischer negativer T-Zell-Antwort und negativem Serostatus könnte die oben genannte Hypothese unterstützen, dass die landesweiten nicht pharmazeutischen Präventionsmaßnahmen zur Eindämmung der Infektionsausbreitung, wie Lockdowns, das Tragen von Mundschutz, Abschottung innerhalb des Haushaltes, Schließung von öffentlichen Einrichtungen usw. dafür gesorgt haben, dass die Prävalenz von SARS-CoV-2 der Kindergruppe niedriger als der, der Erwachsenengruppe gewesen ist. In anderen epidemiologischen Studien aus verschiedenen Ländern, die die SARS-CoV-2 Prävalenz zwischen Kindern und Erwachsenen zum Zeitpunkt T1 ebenfalls untersuchten, wurde ebenfalls eine niedrigere Prävalenz bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen gezeigt [147-150].

Ein weiteres Phänomen könnte sein, dass Kinder aufgrund eines mechanistischen Grundes nicht in dem Maße zur Ausbreitung beziehungsweise zum Verstärken der Covid-19 Pandemie beigetragen haben, wie anfänglich vermutet wurde. Diese Hypothese könnte einen Anlass geben, Präventionsmaßnahmen wie Schul- und Kindertageseinrichtungsschließungen kritisch zu überdenken. Diese Beobachtung wurde von Tönshoff et al. festgestellt, die in einer multizentrischen Querschnittsstudie mit 4964 Teilnehmern die allgemeine Seroprävalenz der SARS-CoV-2 Infektion bei Kindern zwischen 1 und 10 Jahren und ihren Eltern in Südwestdeutschland untersuchten. Unsere untersuchte Kohorte war in T1 Teil dieser groß angelegten Studie. Hier stellten Sie im ersten

Lockdown bei Kleinkindern, die in der Notbetreuung untergebracht waren im Vergleich zu Kleinkindern, die zuhause betreut wurden, keinen Unterschied in dem SARS-CoV-2 spezifischen Serostatus fest [147].

4.3.4.1 SARS-CoV-2 spezifischer Serostatus im zeitlichen Verlauf im Vergleich zur spezifischen T-Zell-Antwort

Renk et al führten eine multizentrische Längsschnittstudie zur Untersuchung der serologischen Immunantwort auf SARS-CoV-2 in 328 Haushalten (717 Erwachsene und 548 Kinder) durch. Unsere Probanden wurden in diese Studie eingeschlossen. Sie definierten T1 (3-4 Monate nach Infektion) und T2 (11-12 Monate nach Infektion) analog zu meiner Arbeit. In T1 und T2 wurden von Renk et al. insgesamt 569 Erwachsene und 402 Kinder untersucht. In T1 wurden bei 33 % der Kinder und 57,7 % der Erwachsenen ein positiver SARS-CoV-2 spezifischer Serostatus festgestellt. Damit zeigt auch die erweiterte Kohorte von Renk et al. einen deutlich höheren Anteil an negativ getesteten Kindern im SARS-CoV-2 spezifischen Serostatus im Vergleich zu den Erwachsenen. Zudem wurden Symptomdaten verglichen und eine fünfmal häufigere asymptomatische Infektion bei Kindern mit positiven Serostatus gefunden [55, 111]. Eine Seroreversion in T2 fand bei 17,1 % der Erwachsenen und 3,8 % der Kinder statt. Im Unterschied zur SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort scheinen bei Renk et. al mehr Kinder den SARS-CoV-2 spezifischen Serostatus von T1 zu T2 zu behalten. Eine weitere Beobachtung ist ein signifikant höherer Antikörpertiter gegen Spike, RBD, die S1-Domäne und das Nukleokapsid im Vergleich zu den Erwachsenen in T1. Es wurde jedoch kein Unterschied in der Antikörperantwort zwischen symptomatischen und asymptomatischen Infektionen sowohl bei den Kindern als auch bei den Erwachsenen gezeigt. Andere Studien zeigten zudem eine höhere neutralisierende Aktivität von Anti-SARS-CoV-2 Antikörpern bei Kindern unter 10 Jahren im Vergleich zu Jugendlichen und jungen Erwachsenen [151, 152].

Die oben genannten epidemiologischen Studien haben den Nachteil, dass sie nur den Serostatus erfassen. In unseren Ergebnissen zeigt sich jedoch, dass bei 27,5% der Kinder und 21,3% der Erwachsenen mit einer SARS-CoV-2

spezifischen positiven T-Zell-Antwort ein negativer Serostatus festgestellt wurde. Das bedeutet, dass manche Probanden, die eine positive Immunantwort wie eine spezifische T-Zell-Antwort gegen SARS-CoV-2 gezeigt haben, mit rein serologischen Testverfahren nicht erfasst wurden. Nicht destotrotz könnten unsere Daten darauf hindeuten, dass das T-Zell-Gedächtnis länger persistiert als das B-Zell-Gedächtnis bei SARS-CoV-2. Diskrepanzen zwischen zellulärer und humoraler Antwort wurde zudem auch bei anderen Viren, beispielsweise CMV nachgewiesen [165-167]. Nelde et al. fanden in ihrer Studie auch eine Diskrepanz zwischen Serostatus und T-Zell-Antwort heraus [30]. In der Follow up Studie von Bilich et al. wurde ebenfalls über eine Abnahme der Antikörpertiter gegen die S1-Domäne des Spike-Proteins berichtet [83]. Steiner et al. untersuchten bei 206 rekonvaleszenten Probanden den SARS-CoV-2 spezifischen Serostatus etwa 4 Wochen nach Infektion, hier zeigten sich ebenfalls 10 % der Probanden seronegativ. Fernández-Moreno et al. untersuchten bei 119 Probanden, darunter 86 rekonvaleszente (bestätigter positiver PCR-Abstrich) ermittelte Probanden und 33 gesunde Probanden, den SARS-COV-2 spezifischen Serostatus und die T-Zell-Antwort etwa 3 Monate nach Infektion. Sie untersuchten die T-Zell-Antwort mit einem auf die Durchflusszytometrie basierenden Proliferationsassay (Eigenname FASCIA) der von Marits et al. für das perspektivische klinische Screening auf Immundefizienz evaluiert wurde [153]. In der Studie von Fernández-Moreno et al. hatten 68,6 % nachweisbare IgG-Antikörper gegen SARS-CoV-2 und 31,4% der rekonvaleszenten Probanden hatten keine IgG-Antikörper. Bei 80% der rekonvaleszenten Probanden wurde eine SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Reaktion festgestellt. Außerdem berichten sie über eine signifikant geringere T-Zell-Reaktivität bei seronegativen Probanden im Vergleich zu seropositiven Probanden, analog zu meiner Arbeit [154]. Leider wurden bei Steiner et al. und Fernández-Moreno et al. keine Kinder untersucht. Dowell et al. zeigten in ihrer Kohorte mit 91 Kinder und 154 Erwachsenen, dass 60 % der seronegativen Kinder und 34 % der seronegativen Erwachsenen eine T-Zell-Antwort gegen SARS-CoV-2 im ELISPOT zeigten [122]. In der Zusammenschau der veröffentlichten Studien ist eine Dunkelziffer an SARS-CoV-2 Infizierten denkbar, da große Kohorten meist nur serologisch gescreent wurden. In unseren

Daten fällt jedoch eine nicht zu vernachlässigende Anzahl an Kindern und Erwachsenen auf, die nach 11-12 Monaten nach Infektion, keinen SARS-CoV-2 spezifischen Serostatus aber eine spezifische T-Zell-Antwort aufwiesen und somit als infiziert gewertet werden können.

Trotzdem besitzt die Mehrheit der Probanden (74,7%) unserer Kohorte eine SARS-CoV-2 spezifische positive T-Zell-Antwort und zusätzlich einen positiven Serostatus. Sowohl Kinder und Erwachsene sind nach unseren Daten somit mehrheitlich in der Lage ein T- und B-Zellgedächtnis zu bilden. Bei dem Vergleich der Intensitäten der SI+ und SII+ Probanden mit einem negativem oder positivem SARS-CoV-2 spezifischem Serostatus fiel bei den Erwachsenen ein signifikanter Unterschied zwischen den Intensitäten auf. Die Intensitäten der SI+ und SII + Erwachsenen waren deutlich niedriger bei negativem Serostatus im Vergleich zu positivem Serostatus. Bei den Kindern war dieser Unterschied nur bei den Intensitäten der SII+ Kindern im Vergleich mit positivem oder negativem Serostatus erkennbar. Zudem fiel bei dem Vergleich von SI+ Kindern und SI + Erwachsenen mit positivem Serostatus eine niedrigere Durchschnittsintensität der Kindergruppe im Vergleich zu der Erwachsenenengruppe auf. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine hoch frequentierte SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort mit einem positivem Serostatus korreliert. Da man durch unsere SI und SII Peptidstimulationen CD4+ und CD8+ T-Zellen nicht hundertprozentig voneinander trennen kann, kann man nur annehmen, dass vor allem die Frequenz der CD4+ T-Zellen für die Korrelation mit dem Serostatus in unserer Kohorte verantwortlich sind. Ein Vergleich mit den Antikörpertitern hätte eventuell zusätzliche Erkenntnisse gebracht und wurde im Rahmen meiner Analyse nicht durchgeführt. Die oben beschriebene Korrelation von Ausmaß und Qualität der T-Zell-Antwort mit Antikörperstatus wird von der Studie Kroemer et al. untermauert [158]. Zudem wird über eine Dominanz von spezifischen CD4+ T-Zellen gegen SARS-CoV-2 berichtet. Ein Phänomen, welches mit einer vermehrten Antikörperbildung einhergehen könnte und mit der Korrelation zwischen follikulären T-Helferzellen und humoraler Immunantwort unterstützt wird [72]. Darüber hinaus wurde von Balachandran et al. ein Zusammenhang zwischen Frequenz der CD4+-Antwort und der daraus resultierenden Stärke,

Breite und Dauer der Antikörperantworten gefunden [159]. Leider waren in diesen beiden Studien keine Kinder eingeschlossen.

4.3.5 Spezifische und kreuzreaktive T-Zell-Antwort im Vergleich

Eine hohe Korrelation der kreuzreaktiven Antwort mit der spezifischen Antwort in unserer untersuchten Kohorte wurde vor allem zwischen den Peptidstimulationen CII und SII in beiden Gruppen aufgezeigt. Zudem fiel bei 88.4 % der Kinder und 91.1 % der Erwachsenen mit positiver spezifischer T-Zell-Antwort zusätzlich eine positive kreuzreaktive T-Zell-Antwort auf. Eine Kreuzreaktivität mit anderen Viren könnte ebenfalls einen Unterschied in der Immunantwort gegen SARS-CoV-2 zwischen Kindern und Erwachsenen aufzeigen, unterliegt jedoch auch stark interindividuellen Schwankungen. Diese Schwankungen in der Immunantwort gegen SARS-CoV-2 könnten durch die zeitliche Exposition gegenüber diesen Viren erklärbar sein. Die von Nelde et al. kreuzreaktiven und spezifischen Peptide wurden anhand SARS-CoV-2 rekonvaleszenten und nicht exponierter Probanden untersucht. Dabei wurden die Peptide, die bei nicht Exponierten und Rekonvaleszenten eine Reaktion zeigten, als kreuzreaktiv identifiziert. Analog zu unserer Arbeit zeigten Probanden mit SARS-CoV-2 spezifisch negativen T-Zell-Antworten und auch die präpandemischen Proben, die als „Negativkontrollen“ unserer Kohorte dienten, eine kreuzreaktive T-Zell-Antwort. Dabei wurden laut Nelde et al. vor allem HLA-Klasse-I T-Zell-Epitope aus ORF1 und HLA-Klasse-II T-Zell-Epitope aus ORF8 in höheren Frequenzen von nicht exponierten im Vergleich zu rekonvaleszenten Probanden erkannt. Die kreuzreaktiven T-Zell-Epitope zeigen Ähnlichkeit in ihren Aminosäuresequenzen, ihren physikalischen Eigenschaften und ihrer HLA-Bindungskapazität mit den vier saisonal zirkulierenden Coronaviren (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1) [30]. Zu den beiden Beta-Coronaviren HCoV-OC43 und -HKU1 besteht eine 38% bzw. 35 % Aminosäurehomologie. Bei den Alpha-Coronaviren NL73 und 229E besteht eine etwa 31% Homologie [155]. Nelde et al. postulierten, dass eine Kreuzreaktivität bei SARS-CoV-2 für die heterologe Immunität verantwortlich sein könnte. Eine nachgewiesene Kreuzreaktivität von T-Zellen spricht aber nicht direkt für eine bestehende Immunität gegen SARS-CoV-2 [30]. Kreuzreaktive T-Zell-Epitope gegenüber SARS-CoV-2 wurden nicht nur weltweit in Bezug auf

humane Coronaviren, sondern auch auf andere Virusspezies berichtet [156-158]. Eine beschriebene Kreuzreaktivität von SARS-CoV-2 T-Zell-Epitopen im Zusammenhang mit SARS-CoV-1 und MERS ist umstritten [159-161]. Bei Untersuchungen der Immunantwort bei Probanden mit Covid-19 mRNA-Impfstoffen wurde die biologische Relevanz von kreuzreaktiven Memory T-Zellen bestätigt. Hierbei sorgten bereits vorhandene kreuzreaktive T-Zellen für eine schnellere und dauerhaftere T-Zell- und Antikörperreaktion [162] [163] [164]. Zudem scheint der Aspekt der Kreuzaktivität und deren Einfluss auf den Infektionsschutz T-Zell-intrinsisch und unabhängig von kreuzreaktiver Serologie zu sein [165-167]. Benede et al. zeigten eine positive Korrelation von SARS-CoV-2 reaktiven CD4+ T-Zellen mit HCoV-HKU1-Spike spezifischen IgG-Antikörpern von seronegativen Kinder und gehen deswegen von einer schützenden Kreuzreaktivität gegen SARS-CoV-2 von Kindern aus [168]. Ng et al. beschrieben eine höhere Antikörper-Kreuzreaktivität von Kindern und jungen Erwachsenen im Vergleich zu Älteren [169]. Dowell et al. zeigten, dass höhere Konzentrationen an SARS-CoV-2 kreuzreaktiven T-Zellen auf das Spikeprotein bei Kindern im Alter von 3-11 Jahren für die Vielzahl an asymptomatischen und milden Infektionen bei Kindern verantwortlich sein könnte. Zudem zeigten sie, dass hCoV-Spike-2-Domäne-spezifische Antikörper mit SARS-CoV-2 bei Kindern kreuzreagieren können. Die S2-Domäne [122]. In unserer Kohorte zeigten sich kreuzreaktive T-Zell-Antworten bei Kindern und Erwachsenen mit positiver spezifischer T-Zell-Antwort etwa gleich häufig. Tatsächlich zeigten jedoch mehr SARS-CoV-2 spezifisch negativ gewertete Kinder (18,9%) kreuzreaktive T-Zell-Antworten als Erwachsene (9,1%). Der Unterschied in der Kreuzreaktivität bei Kindern und Erwachsenen könnte auf eine stärkere Immunaktivierung durch primäre Infektionen mit saisonalen Coronaviren bei Kindern zurückgehen [72]. Eine andere Hypothese ist eine epigenetische Programmierung der Kinder mehr kreuzreaktive Immunreaktionen zu entwickeln als Erwachsene. Ein Phänomen, welches schon bei der Immunität gegen Influenza beschrieben wurde und eventuell mit MIS-C zusammenhängen könnte [170]. Zudem könnten kreuzreaktive T-Zell-Antworten in unserer Kohorte aber auch beispielsweise in der Kohorte von Dowell et al. durch SARS-CoV-2 induziert sein und nicht von

vorangegangenen Infektionen mit saisonalen humanen Coronaviren herrühren. Dieses Phänomen erschwert eine hundertprozentige Zuordnung von kreuzreaktiven und spezifischen T-Zell-Antworten gegen SARS-CoV-2 und könnte durch weitere Forschung in der strukturellen und funktionellen Kartierung dieser T-Zell-Antworten vorangetrieben werden. Nichts destotrotz ist die klinische Bedeutung von kreuzreaktiven T-Zellen bei SARS-CoV-2 umstritten. Möglicherweise bieten HCoV spezifische T-Zellen einen gewissen Schutz vor einer schweren Infektion [72, 171, 172]. Diese Beobachtung wird durch die geringere Anzahl an SARS-CoV-2 kreuzreaktiven T-Zellen in älteren Menschen, die ein Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf haben, gestützt [173]. Andere Studien zeigen dahingegen keinen klinischen Zusammenhang und begründen dies mit einer geringeren Avidität von HCoV spezifischen T-Zellen zu SARS-CoV-2 Peptiden [174] [157] [175]. Die umstrittenen Meinungen zeigen, dass verstärkte Forschungen im Bereich der Kreuzreaktivität von T-Zellen erforderlich sind, schon allein deswegen, weil saisonale Erkältungscoronaviren und SARS-CoV-2 Varianten seit Beginn der Pandemie in der Bevölkerung zirkulieren.

4.3.1 Durchseuchung in den Familien

Generell war die Hospitalisierungsrate in den hier untersuchten Familien der erweiterten Kohorte von Renk. et al mit 3,6 % Erwachsenen und 0,0 % der Kinder sehr niedrig und der Anteil an asymptomatischen und milden Infektionen in diesen Familien sehr hoch [176]. Die 72 von 103 Familien, die hinsichtlich des Durchseuchungsgrades analysiert werden konnten, zeigten einen hohen Anteil (44%) an völliger Infektionsausbreitung innerhalb der Familie. Aufgrund nicht auswertbarer Proben oder des Nichterscheinens von Probanden in T2, wurden in der „Durchseuchungsanalyse“ auch nur 2-Personenhaushalte selten 1-Personenhaushalte untersucht. Diese 2-Personenhaushalte könnten die Ergebnisse leicht verfälschen. Kinder wurden zu Beginn der Pandemie als eventuelle Treiber der Virusübertragung von SARS-CoV-2 angesehen. Diese Überlegung geht auf die Verbreitung von Influenza oder Pneumokokken durch Kinder [177, 178] und die erhöhten sozialen und Kontakte von Kindern zurück [179, 180]. SARS-CoV-2 wird vor allem über Tröpfcheninfektion übertragen, aber auch Aerosole, fäkal-oral und direkter Kontakt könnten mögliche

Übertragungswege sein [181]. Sorg et al. fanden in einer epidemiologischen serologischen Studie von 2020-2022 heraus, dass sich zu Beginn der Pandemie vor allem Kleinkinder unbemerkt infiziert haben. Kinder unter drei Jahren hatten hierbei 3 ½ - mal häufiger einen serologischen Spiegel als ältere Kinder zu Beginn der Pandemie [182]. Diese Kleinkinder haben meist mehr Kontakt zu Eltern und könnten somit potenzielle Übertragungswege in Familien erklären. In unserer Kohorte sind Kleinkinder stark unterrepräsentiert und dies macht es schwierig eine klare Aussage über die Infektionswege in den Haushalten zu treffen. Gesichert ist nur der familiäre Indexfall, der für den Einschluss zur Studie vorliegen musste. Tönshoff et al. berichten hingegen von einer niedrigeren Seroprävalenz von Kleinkindern in Südwestdeutschland [147]. Eine Studie aus den USA zeigt ein ähnliches Ansteckungsrisiko von Kindern und Erwachsenen anhand der Inzidenzraten von positiven PCR-Tests und Symptomfragebögen. 310 zufällig ausgewählte Haushalte wurden hierbei in den Regionen Utah und New York untersucht, 40 davon waren von Covid betroffen und 7 (18 %) hatten einen kompletten Befall des Haushalts. Das mittlere Haushaltsinfektionsrisiko wurde hier mit 52 % angegeben, wobei in New York das Risiko höher war als in Utah. Diese Daten lassen sich nur schwer mit unserer Kohorte aufgrund lokaler Unterschiede vergleichen. Jedoch geben sie einen Einblick, dass die häusliche Struktur der Familien einen nicht zu vernachlässigenden Übertragungsort darstellt [183]. Obengenannte Studien haben den Nachteil, dass die zelluläre Immunantwort nicht gescreent wurde. Wir zeigen mit unseren Ergebnissen jedoch, dass die Durchseuchung viel höher sein könnte als mit rein serologischen Verfahren oder PCR-Testverfahren gezeigt wurde. In der Zukunft könnten standardisierte Testverfahren der T-Zell-Antwort einen Benefit über die Einschätzung eines Pandemiegeschehens geben. Zudem haben weitere Faktoren, wie individuelle Befolgung der Maßnahmen zur Pandemiebekämpfung, Kontaktverhalten, Länderunterschiede und viele weitere, einen enormen Einfluss auf das Infektionsgeschehen, was Rückschlüsse über die damalige Durchseuchung in den Familien erschwert.

4.3.2 Ausblick

Drei Jahre intensiviert Forschungen und Anstrengungen begleiteten diese Pandemie. Die Immunantwort bei SARS-CoV-2-Infektion unterliegt einer Vielzahl von modulierenden Variablen, darunter die Größe des naiven T-Zell-Gedächtnispools, die Stärke der angeborenen Immunität und zahlreiche weitere Faktoren. Darunter fällt auch die Vielzahl an möglichen virusspezifischen T-Zell-Reaktionen, die deutlich schwieriger zu untersuchen sind als die humorale Immunantwort. Diese Faktoren verleihen der Erforschung von SARS-CoV-2 und insbesondere der spezifischen T-Zell-Antwort einerseits ihre Faszination, andererseits aber auch ihre Herausforderung. Gerade Studien mit Kindern sind unterrepräsentiert, aber enorm wichtig, um Immunprozesse im Laufe des Lebens zu verstehen. Außerdem ist es für die Steuerung eines Pandemiegeschehens unerlässlich, alle Altersgruppen zu analysieren, um eingeleitete Maßnahmen zu reevaluieren. Da es sichtbare klinische Unterschiede in der Immunantwort von Kindern und Erwachsenen gibt, wie beispielsweise das MIS-C bei Kindern, sind weitere Forschungen unerlässlich, um diese Unterschiede genauer aufzuzeigen. Gerade im Hinblick auf postinfektiöse Symptomatik, zukünftige Impfstrategien und zirkulierende Virusvarianten bleiben noch viele Fragen offen.

Datentabelle

Tabelle 16: Zusammenfassende Datentabelle, „+“ als positiv in dieser Antwort gewertet, „-“ als negativ in dieser Antwort gewertet; spez. = spezifisch, Gesamt =Gesamtpopulation, Ak = Antikörper, T1 = erster Zeitraum der Probenentnahme (3-4 Monate nach Infektion), T2 = zweiter Zeitpunkt der Probenentnahme (11-12 Monate nach Infektion)

Populationsübersicht			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
Probandenanzahl	337	127 (38%)	210 (62%)
Altersdurchschnitt	36	10	44
Weibliche Probanden	170	61 (48%)	109 (51,9%)
Weibliche Probanden mit spez. T-Zell-Antwort	123	33 (47,8%)	90 (53,3%)
SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort			
positiv	238	69 (54,3%)	169 (80,5%)
negativ	99	58 (45,6%)	41 (19,5%)
Mediane der SI und SII Intensitäten			
SI +	100,10	76,96	115,30
SI -	1,00	0,75	1,00
SII +	202,30	98,75	273,10
SII -	1,21	1,08	1,25
SI und SII Antworten im Vergleich			
SI +	55 (8,8%)	10 (14,5%)	11 (6,5%)
SII +	30 (26,9 %)	19 (27,5%)	45 (26,6%)
SI und SII +	172(64,3%)	40 (58%)	113 (66,9%)
Serostatus im Multicov IgA und IgG (Gesamtanzahl: 337 Probanden)			
IgA positiv	6	0	6
IgG positiv	74	18	56
IgA + IgG positiv	110	34	76
Gesamt-Ak +	190	52 (40,9%)	138 (65,7%)
Gesamt-Ak -	147	75 (59,1%)	72 (34,3%)
Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort mit dem Serostatus			
Spez. T-Zellantwort positiv	238	69	169
Ak +	183 (76,9%)	50 (72,5%)	133 (78,7%)
Ak -	55 (23,1%)	19 (27,5%)	36 (21,3%)
Spez. T-Zellantwort negativ	99	58	41
Ak +	7(7%)	2 (3,4%)	5 (12,2 %)
Ak -	92 (93%)	56 (96,6%)	36 (87,8%)
Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen SI+ und SII+ Antwort mit dem Serostatus			
SI +	174	50	124
Ak +	145 (83,3 %)	40 (80%)	105 (84,7%)
Ak -	29 (16,7%)	10 (20%)	19 (15,3%)
SII +	211	59	158
Ak +	169 (80%)	44 (74,6%)	125 (79,1%)
Ak -	48 (20%)	15 (25,4%)	33 (20,9%)
Vergleich der Mediane der SI+ und SII+ Intensitäten mit dem Serostatus			
SI+ und Ak +	275,2	164,7	348,5
SI+ und Ak -	136,7	155,6	126,7
SII + und Ak +	607,9	457,2	661
SII + und Ak -	244,8	159,9	283,4

Vergleich der SARS-CoV spezifischen und kreuzreaktiven T-Zell-Antwort			
- spez. und - kreuzreaktive T-Zell-Antwort	66	34 (26,8%)	22 (10,5%)
+ spez. und + kreuzreaktive T-Zell-Antwort	205	61 (48%)	154 (73,3%)
+ spez. und - kreuzreaktive T-Zell-Antwort	23	8 (6,3%)	15 (7,1%)
- spez. und + kreuzreaktive T-Zell-Antwort	43	24 (18,9%)	19 (9,1 %)
SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort im zeitlichen Verlauf			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
Probandenanzahl	173	61	112
In T1 in der spez. T-Zell-Antwort +	140	38 (62,3%)	102 (91,1%)
In T1 in der spez. T-Zell-Antwort -	33	23 (37,7%)	10 (8,9%)
Zeitlicher Verlauf der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort im Vergleich			
In T1 + und T2 - in der spez. T-Zell-Antwort	24	11 (18%)	13 (11,6%)
In T1 - und in T2+ in der spez. T-Zell-Antwort	6	2 (3,3%)	4 (3,6%)
In T1 und T2 + in der spez. T-Zell-Antwort	116	27 (44,3%)	89 (79,4%)
In T1 und T2 – in der spez. T-Zell-Antwort	27	21 (34,4%)	6 (5,4%)
Vergleich der SI Antwort im zeitlichen Verlauf von T1 zu T2			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
SI Antwort			
In T1 SI+	119	36 (59%)	83 (74,1%)
In T1 SI-	54	25 (41%)	29 (25,9%)
Zeitlicher Verlauf der SI Antwort			
In T1 SI + und T2 SI -	30	15 (24,6%)	15 (13,4%)
In T1 SI – und T2 SI+	11	2 (3,3%)	9 (8%)
In T1 SI+ und T2 SI+	89	21 (34,4%)	68 (60,7%)
In T1 SI- und T2 SI-	43	23 (37,7%)	20 (17,9%)
Mediane der SI Intensitäten in T1 und T2			
		Kinder	Erwachsene
Vergleich der SI Intensitäten von T1 und T2			
T1 (nur SI+)		149,2	438,4
T2 (SI +/-)		19,74	98
Vergleich der SI+ Intensitäten von T1 und T2			
T1		243,3	471,6
T2		57,25	148,9
Vergleich der SII Antwort im zeitlichen Verlauf			
	Gesamt	Kinder	Erwachsene
SII Antwort			
In T1 SII+	132	33 (54,1%)	99 (88,4%)
In T1 SII-	41	28 (45,9%)	13 (11,6%)
Zeitlicher Verlauf der SII Antwort			
In T1 SII + und T2 SII -	31	10 (16,4 %)	21 (18,8%)
In T1 SII – und T2 SII+	8	2 (3,3%)	6 (5,4%)
In T1 SII+ und T2 SII+	101	23 (37,7%)	78 (69,6%)
In T1 SII- und T2 SII-	33	26 (42,6%)	7 (6,3%)
Mediane der SII Intensitäten in T1 und T2			
		Kinder	Erwachsene

Vergleich SII Intensitäten von T1 und T2		
T1 (nur SII+)	867,3	818
T2 (SII +/-)	56,75	170,3
Vergleich der SII+ Intensitäten von T1 und T2		
T1	1209	1114
T2	262	350
Durchseuchung der Familien (Gesamtzahl: 72 Familien)		
Prozent	Anzahl der Familien	
100%	32	
83,3%	2	
80%	3	
75%	8	
66%	6	
60%	2	
50%	7	
40%	1	
33%	3	
25%	3	
20%	1	
0%	4	
SARS-CoV-2 spezifischer positiver Serostatus und spezifische T-Zellantwort (n=337)		
Spez. T-Zell-Antwort + 55 (22,4%)	Spez. T-Zell-Antwort + und Ak +	Ak +
55 (22,4%)	183 (74,7%)	7 (2,9%)

5 Zusammenfassung

Die epidemiologische Untersuchung der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort umfasste initial 103 Familien mit einem nachweislich infizierten familiären Indexfall, bei denen nach 11-12 Monate (06.02.21-14.03.2021) mittels 12-tägiger Präsensitivierung und nachfolgendem Interferon- γ -ELISPOT-Assay die SARS-CoV-2 spezifische und kreuzreaktive T-Zell-Antwort analysiert wurde. Die Familienmitglieder hatten mehrheitlich asymptomatische oder milde Infektionen. Der erste Zeitpunkt der T-Zell-Analyse fand 3-4 Monate (11.07.2020-09.08.2020) nach Infektion statt. Die HLA:Peptide, die von dem Institut für Immunologie in Tübingen charakterisiert und uns zur Verfügung gestellt wurden, wurden zur Stimulation der T-Zellen in SARS-CoV-2 spezifische und kreuzreaktive HLA-Klasse-I-Peptidmixe (SI und CI) und HLA-Klasse-II/DR-Peptidmixe (SII und CII) eingeteilt. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit den T-Zell-Daten der ersten Probenaufnahme und mit den, von Renk et al erfassten, serologischen Daten verglichen. Im Rahmen der SARS-CoV-2 Pandemie zeigten Kinder ein geringeres Risiko für schwere Krankheitsverläufe als Erwachsene. In meiner untersuchten Kohorte zeigten sich signifikant weniger Kinder in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort positiv als Erwachsene. Es zeigte sich bei dem Vergleich der gemessenen Intensitäten in den Peptidstimulationen der SARS-CoV-2 spezifischen HLA-Klasse-I (SI) und HLA-Klasse-II/DR (SII) niedrigere Intensitäten in der Kindergruppe im Vergleich zu den Erwachsenen. In der serologischen Immunantwort zeigten sich ebenso wie in der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort signifikant weniger Kinder positiv als Erwachsene. Außerdem wurde eine starke Korrelation zwischen SARS-CoV-2 negativer serologischer Antwort und negativer T-Zell-Antwort festgestellt. Jedoch hatten 27,5 % der Kinder und 21 % der Erwachsenen mit einer negativen serologischen Immunantwort eine positive SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort. Diese Diskrepanz zwischen T-Zell-Antwort und Serostatus könnte bedeuten, dass nicht alle SARS-CoV-2 Infizierten durch rein serologische Testverfahren erkannt werden. Die Intensitäten der doppelt positiven Probanden, d.h. SARS-CoV-2 spezifischer Serostatus und T-Zell-Antwort positiv, waren mehrheitlich höher als bei den Probanden, die zwar eine positive T-Zell-Antwort aber keinen positiven

Serostatus aufwiesen. Im Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort zwischen dem ersten Zeitpunkt und dem zweiten Zeitpunkt der Probenaufnahme zeigten sich mehr Kinder als Erwachsene an beiden Zeitpunkten negativ. Zudem wurden mehr zuvor positiv getestete Kinder nach 11-12 Monaten negativ in der spezifischen T-Zell-Antwort getestet als Erwachsene. In den spezifischen Peptidstimulationen zeigte sich bei beiden Gruppen über die Zeit eine signifikante Abnahme der Intensitäten. Im Vergleich zwischen kreuzreaktiver und spezifischer T-Zell-Antwort zeigte sich, dass eine gemeinsame positive kreuzreaktive und spezifische T-Zell-Antwort in beiden Gruppen am häufigsten vorkam. Zudem war die Anzahl der Kinder mit negativer kreuzreaktiver und negativer spezifischer T-Zell-Antwort gegen SARS-CoV-2 höher. Die große Anzahl an negativ getesteten Kindern in der spezifischen T-Zell-Antwort zu beiden Zeitpunkten, zusätzlich zu negativem Serostatus, legt die Vermutung nahe, dass weniger Kinder zu Beginn der Pandemie 2020 in Baden-Württemberg infiziert waren. Dieses Phänomen könnte mit den Präventionsmaßnahmen zur Vermeidung der Virusverbreitung zum Infektionszeitpunkt zusammenhängen. Da jedoch eine Infektion im Laufe des Jahres 2020 mit steigenden Infektionszahlen auch bei Kindern immer wahrscheinlicher wurde, könnten auch biologische Faktoren hinter der hohen Anzahl an SARS-CoV-2-negativen Kindern ursächlich sein. Diese Faktoren könnten nach aktuellem Forschungsstand auf eine effizientere angeborene Immunantwort, eine gut koordinierte adaptive Immunantwort und somit eine schnelle Eliminierung des Virus bei Kindern zurückzuführen sein. Diese Mechanismen könnten zu einer geringeren Bildung von Memory T-Zellen führen, die mit unserem Testverfahren nicht nachweisbar sind. Ein klinisch sichtbarer Unterschied in der Immunantwort zwischen Kindern und Erwachsenen ist das multisystemische inflammatorische Syndrom bei Kindern (MIS-C), das intensivere Forschung erfordert.

6 Literaturverzeichnis

1. Rodewald, H.R., *Thymus organogenesis*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 355-88.
2. Itano, A.A. and M.K. Jenkins, *Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node*. Nat Immunol, 2003. **4**(8): p. 733-9.
3. Barker, R.N., L.P. Erwig, K.S. Hill, A. Devine, W.P. Pearce and A.J. Rees, *Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells*. Clin Exp Immunol, 2002. **127**(2): p. 220-5.
4. Underhill, D.M., M. Bassetti, A. Rudenski and A. Aderem, *Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1909-14.
5. Wang, J.H. and E.L. Reinherz, *Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules*. Mol Immunol, 2002. **38**(14): p. 1039-49.
6. Kim, P.W., Z.Y. Sun, S.C. Blacklow, G. Wagner and M.J. Eck, *A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8*. Science, 2003. **301**(5640): p. 1725-8.
7. Abbas, A.K., K.M. Murphy and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
8. Seder, R.A. and R. Ahmed, *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation*. Nat Immunol, 2003. **4**(9): p. 835-42.
9. Santana, M.A. and Y. Rosenstein, *What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms*. J Cell Physiol, 2003. **195**(3): p. 392-401.
10. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 933-44.
11. Ansel, K.M., D.U. Lee and A. Rao, *An epigenetic view of helper T cell differentiation*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 616-23.
12. Szabo, S.J., B.M. Sullivan, S.L. Peng and L.H. Glimcher, *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 713-58.
13. Janeway, C.A., Jr. and K. Bottomly, *Signals and signs for lymphocyte responses*. Cell, 1994. **76**(2): p. 275-85.
14. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Cytokine-mediated control of viral infections*. Virology, 2000. **273**(2): p. 221-7.
15. Gaffen, S.L., *Signaling domains of the interleukin 2 receptor*. Cytokine, 2001. **14**(2): p. 63-77.
16. Garcia, K.C. and E.J. Adams, *How the T cell receptor sees antigen--a structural view*. Cell, 2005. **122**(3): p. 333-6.
17. Al-Lazikani, B., A.M. Lesk and C. Chothia, *Canonical structures for the hypervariable regions of T cell alpha beta receptors*. J Mol Biol, 2000. **295**(4): p. 979-95.
18. Gaur, L.K. and G.T. Nepom, *Ancestral major histocompatibility complex DRB genes beget conserved patterns of localized polymorphisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5380-3.

19. Marsh, S.G. and W.H.O.N.C.f.F.o.t.H. System, *Nomenclature for factors of the HLA system, update, April 2003*. Hum Immunol, 2003. **64**(8): p. 835-6.
20. Kumanovics, A., T. Takada and K.F. Lindahl, *Genomic organization of the mammalian MHC*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 629-57.
21. Potts, W.K. and P.R. Slev, *Pathogen-based models favoring MHC genetic diversity*. Immunol Rev, 1995. **143**: p. 181-97.
22. Guan, P., I.A. Doytchinova, C. Zygouridis and D.R. Flower, *MHCPred: A server for quantitative prediction of peptide-MHC binding*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3621-4.
23. Germain, R.N., *MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation*. Cell, 1994. **76**(2): p. 287-99.
24. Fremont, D.H., W.A. Hendrickson, P. Marrack and J. Kappler, *Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides*. Science, 1996. **272**(5264): p. 1001-4.
25. Dessen, A., C.M. Lawrence, S. Cupo, D.M. Zaller and D.C. Wiley, *X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II*. Immunity, 1997. **7**(4): p. 473-81.
26. Bouvier, M., *Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective*. Mol Immunol, 2003. **39**(12): p. 697-706.
27. Govindarajan, K.R., P. Kanguane, T.W. Tan and S. Ranganathan, *MPID: MHC-Peptide Interaction Database for sequence-structure-function information on peptides binding to MHC molecules*. Bioinformatics, 2003. **19**(2): p. 309-10.
28. Messaoudi, I., J.A. Guevara Patino, R. Dylla, J. LeMaout and J. Nikolich-Zugich, *Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1797-800.
29. Schuler, M.M., M.D. Nastke and S. Stevanovic, *SYFPEITHI: database for searching and T-cell epitope prediction*. Methods Mol Biol, 2007. **409**: p. 75-93.
30. Nelde, A., T. Bilich, J.S. Heitmann, Y. Maringer, H.R. Salih, M. Roerden, M. Lübke, J. Bauer, J. Rieth, M. Wacker, A. Peter, S. Hörber, B. Traenkle, P.D. Kaiser, U. Rothbauer, M. Becker, D. Junker, G. Krause, M. Strengert, N. Schneiderhan-Marra, M.F. Templin, T.O. Joos, D.J. Kowalewski, V. Stos-Zweifel, M. Fehr, A. Rabsteyn, V. Mirakaj, J. Karbach, E. Jäger, M. Graf, L.-C. Gruber, D. Rachfalski, B. Preuß, I. Hagelstein, M. Märklin, T. Bakchoul, C. Gouttefangeas, O. Kohlbacher, R. Klein, S. Stevanović, H.-G. Rammensee and J.S. Walz, *SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition*. Nature Immunology, 2021. **22**(1): p. 74-85.
31. Ku, C.C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler and P. Marrack, *Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines*. Science, 2000. **288**(5466): p. 675-8.
32. Slifka, M.K. and R. Ahmed, *Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(3): p. 252-8.

33. Slifka, M.K. and R. Ahmed, *B cell responses and immune memory*. Dev Biol Stand, 1998. **95**: p. 105-15.
34. Seddon, B., P. Tomlinson and R. Zamoyska, *Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 680-6.
35. Akondy, R.S., N.D. Monson, J.D. Miller, S. Edupuganti, D. Teuwen, H. Wu, F. Quyyumi, S. Garg, J.D. Altman, C. Del Rio, H.L. Keyserling, A. Ploss, C.M. Rice, W.A. Orenstein, M.J. Mulligan and R. Ahmed, *The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7919-30.
36. Mueller, S.N., T. Gebhardt, F.R. Carbone and W.R. Heath, *Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 137-61.
37. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Understanding the generation and function of memory T cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 326-32.
38. Kaech, S.M., E.J. Wherry and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 251-62.
39. Kaech, S.M., S. Hemby, E. Kersh and R. Ahmed, *Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation*. Cell, 2002. **111**(6): p. 837-51.
40. Shedlock, D.J. and H. Shen, *Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory*. Science, 2003. **300**(5617): p. 337-9.
41. Klenerman, P. and R.M. Zinkernagel, *Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes*. Nature, 1998. **394**(6692): p. 482-5.
42. Strutt, T.M., K.K. McKinstry, J.P. Dibble, C. Winchell, Y. Kuang, J.D. Curtis, G. Huston, R.W. Dutton and S.L. Swain, *Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen*. Nat Med, 2010. **16**(5): p. 558-64, 1p following 564.
43. Swain, S.L., K.K. McKinstry and T.M. Strutt, *Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 136-48.
44. Feng, C., J. Shi, Q. Fan, Y. Wang, H. Huang, F. Chen, G. Tang, Y. Li, P. Li, J. Li, J. Cui, L. Guo, S. Chen, M. Jiang, L. Feng, L. Chen, C. Lei, C. Ke, X. Deng, F. Hu, X. Tang and F. Li, *Protective humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 persist up to 1 year after recovery*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 4984.
45. Vali, B., R. Tohn, M.J. Cohen, A. Sakhdari, P.M. Sheth, F.Y. Yue, D. Wong, C. Kovacs, R. Kaul and M.A. Ostrowski, *Characterization of cross-reactive CD8+ T-cell recognition of HLA-A2-restricted HIV-Gag (SLYNTVATL) and HCV-NS5b (ALYDVVSKL) epitopes in individuals infected with human immunodeficiency and hepatitis C viruses*. J Virol, 2011. **85**(1): p. 254-63.
46. Petrova, G., A. Ferrante and J. Gorski, *Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(4): p. 349-72.

47. Su, L.F., B.A. Kidd, A. Han, J.J. Kotzin and M.M. Davis, *Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults*. *Immunity*, 2013. **38**(2): p. 373-83.
48. Bui, H.H., J. Sidney, K. Dinh, S. Southwood, M.J. Newman and A. Sette, *Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines*. *BMC Bioinformatics*, 2006. **7**: p. 153.
49. Welsh, R.M., J.W. Che, M.A. Brehmand L.K. Selin, *Heterologous immunity between viruses*. *Immunol Rev*, 2010. **235**(1): p. 244-66.
50. Watkin, L.B., R. Mishra, A. Gil, N. Aslan, D. Gherzi, K. Luzuriaga and L.K. Selin, *Unique influenza A cross-reactive memory CD8 T-cell receptor repertoire has a potential to protect against EBV seroconversion*. *J Allergy Clin Immunol*, 2017. **140**(4): p. 1206-1210.
51. Aslan, N., L.B. Watkin, A. Gil, R. Mishra, F.G. Clark, R.M. Welsh, D. Gherzi, K. Luzuriaga and L.K. Selin, *Severity of Acute Infectious Mononucleosis Correlates with Cross-Reactive Influenza CD8 T-Cell Receptor Repertoires*. *mBio*, 2017. **8**(6).
52. Harvey, W.T., A.M. Carabelli, B. Jackson, R.K. Gupta, E.C. Thomson, E.M. Harrison, C. Ludden, R. Reeve, A. Rambaut, C.-G.U. Consortium, S.J. Peacock and D.L. Robertson, *SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape*. *Nat Rev Microbiol*, 2021. **19**(7): p. 409-424.
53. Sumi, T. and K. Harada, *Immune response to SARS-CoV-2 in severe disease and long COVID-19*. *iScience*, 2022. **25**(8): p. 104723.
54. Rydyznski Moderbacher, C., S.I. Ramirez, J.M. Dan, A. Grifoni, K.M. Hastie, D. Weiskopf, S. Belanger, R.K. Abbott, C. Kim, J. Choi, Y. Kato, E.G. Crotty, C. Kim, S.A. Rawlings, J. Mateus, L.P.V. Tse, A. Frazier, R. Baric, B. Peters, J. Greenbaum, E. Ollmann Saphire, D.M. Smith, A. Sette and S. Crotty, *Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity*. *Cell*, 2020. **183**(4): p. 996-1012 e19.
55. STIKO, *Beschluss der STIKO für die Empfehlung der COVID-19-Impfung und die dazugehörige wissenschaftliche Begründung*. 2023.
56. Bundle, N., N. Dave, A. Pharris, G. Spiteri, C. Deogan, J.E. Sukand m. Study group, *COVID-19 trends and severity among symptomatic children aged 0-17 years in 10 European Union countries, 3 August 2020 to 3 October 2021*. *Euro Surveill*, 2021. **26**(50).
57. E.CoVariants, H., *Hodcroft E*. 2022.
58. AAP. *Children and Covid-19 Vaccination Trends: Summary of data publicly reported by the Centers of Disease Control and Prevention*. 2023.
59. Du, Z., C. Nugent, B.J. Cowling and L.A. Meyers, *Hundreds of severe pediatric COVID-19 infections in Wuhan prior to the lockdown*. *medRxiv*, 2020.
60. Chou, J., P.G. Thomas and A.G. Randolph, *Immunology of SARS-CoV-2 infection in children*. *Nat Immunol*, 2022. **23**(2): p. 177-185.
61. Poddighe, D., V. Ziaee and O. Kasapcopur, *Editorial: COVID-19 and hyper inflammation syndrome: Different presentation and management*. *Front Pediatr*, 2022. **10**: p. 1022701.

62. Tan, A.T., M. Linster, C.W. Tan, N. Le Bert, W.N. Chia, K. Kunasegaran, Y. Zhuang, C.Y.L. Tham, A. Chia, G.J.D. Smith, B. Young, S. Kalimuddin, J.G.H. Low, D. Lye, L.F. Wang and A. Bertolotti, *Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients*. Cell Rep, 2021. **34**(6): p. 108728.
63. Zhao, J., A.N. Alshukairi, S.A. Baharoon, W.A. Ahmed, A.A. Bokhari, A.M. Nehdi, L.A. Layqah, M.G. Alghamdi, M.M. Al Gethamy, A.M. Dada, I. Khalid, M. Boujelal, S.M. Al Johani, L. Vogel, K. Subbarao, A. Mangalam, C. Wu, P. Ten Eyck, S. Perlman and J. Zhao, *Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T-cell responses*. Sci Immunol, 2017. **2**(14).
64. Grifoni, A., D. Weiskopf, S.I. Ramirez, J. Mateus, J.M. Dan, C.R. Moderbacher, S.A. Rawlings, A. Sutherland, L. Premkumar, R.S. Jadi, D. Marrama, A.M. de Silva, A. Frazier, A.F. Carlin, J.A. Greenbaum, B. Peters, F. Krammer, D.M. Smith, S. Crotty and A. Sette, *Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals*. Cell, 2020. **181**(7): p. 1489-1501 e15.
65. Schultze, J.L. and A.C. Aschenbrenner, *COVID-19 and the human innate immune system*. Cell, 2021. **184**(7): p. 1671-1692.
66. Kawai, T. and S. Akira, *Innate immune recognition of viral infection*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 131-7.
67. Arunachalam, P.S., F. Wimmers, C.K.P. Mok, R. Perera, M. Scott, T. Hagan, N. Sigal, Y. Feng, L. Bristow, O. Tak-Yin Tsang, D. Wagh, J. Coller, K.L. Pellegrini, D. Kazmin, G. Alaaeddine, W.S. Leung, J.M.C. Chan, T.S.H. Chik, C.Y.C. Choi, C. Huerta, M. Paine McCullough, H. Lv, E. Anderson, S. Edupuganti, A.A. Upadhyay, S.E. Bosinger, H.T. Maecker, P. Khatri, N. Roupahel, M. Peiris and B. Pulendran, *Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans*. Science, 2020. **369**(6508): p. 1210-1220.
68. Zhou, R., K.K. To, Y.C. Wong, L. Liu, B. Zhou, X. Li, H. Huang, Y. Mo, T.Y. Luk, T.T. Lau, P. Yeung, W.M. Chan, A.K. Wu, K.C. Lung, O.T. Tsang, W.S. Leung, I.F. Hung, K.Y. Yuen and Z. Chen, *Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses*. Immunity, 2020. **53**(4): p. 864-877 e5.
69. Cheon, I.S., C. Li, Y.M. Son, N.P. Goplen, Y. Wu, T. Cassmann, Z. Wang, X. Wei, J. Tang, Y. Li, H. Marlow, S. Hughes, L. Hammel, T.M. Cox, E. Goddery, K. Ayasoufi, D. Weiskopf, J. Boonyaratankornkit, H. Dong, H. Li, R. Chakraborty, A.J. Johnson, E. Edell, J.J. Taylor, M.H. Kaplan, A. Sette, B.J. Bartholmai, R. Kern, R. Vassallo and J. Sun, *Immune signatures underlying post-acute COVID-19 lung sequelae*. Sci Immunol, 2021. **6**(65): p. eabk1741.
70. Phetsouphanh, C., D.R. Darley, D.B. Wilson, A. Howe, C.M.L. Munier, S.K. Patel, J.A. Juno, L.M. Burrell, S.J. Kent, G.J. Dore, A.D. Kelleher and G.V. Matthews, *Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection*. Nat Immunol, 2022. **23**(2): p. 210-216.

71. Vijayakumar, B., K. Boustani, P.P. Ogger, A. Papadaki, J. Tonkin, C.M. Orton, P. Ghai, K. Suveizdyte, R.J. Hewitt, S.R. Desai, A. Devaraj, R.J. Snelgrove, P.L. Molyneaux, J.L. Garner, J.E. Peters, P.L. Shah, C.M. Lloyd and J.A. Harker, *Immuno-proteomic profiling reveals aberrant immune cell regulation in the airways of individuals with ongoing post-COVID-19 respiratory disease*. *Immunity*, 2022. **55**(3): p. 542-556 e5.
72. Moss, P., *The T cell immune response against SARS-CoV-2*. *Nat Immunol*, 2022. **23**(2): p. 186-193.
73. Zou, Y., D. Huang, Q. Jiang, Y. Guo and C. Chen, *The Vaccine Efficacy Against the SARS-CoV-2 Omicron: A Systemic Review and Meta-Analysis*. *Front Public Health*, 2022. **10**: p. 940956.
74. Team, C.-F., *Past SARS-CoV-2 infection protection against re-infection: a systematic review and meta-analysis*. *Lancet*, 2023. **401**(10379): p. 833-842.
75. WHO, World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/groups/who-coronavirus-network>.
76. Aleem, A., A.B. Akbar Samad and S. Vaqar, *Emerging Variants of SARS-CoV-2 and Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19)*, in *StatPearls*. 2024: Treasure Island (FL).
77. Czerkinsky, C.C., L.-Å. Nilsson, H. Nygren, Ö. Ouchterlony and A. Tarkowski, *A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells*. *Journal of Immunological Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 109-121.
78. Scheibenbogen, C., K.H. Lee, S. Mayer, S. Stevanovic, U. Moebius, W. Herr, H.G. Rammensee and U. Keilholz, *A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors and melanoma patients*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(2): p. 221-6.
79. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. *Current Protocols in Immunology*, 2018. **120**(1).
80. *Besprechung der Bundeskanzlerin mit den Regierungschefinnen und Regierungschefs der Länder vom 22.03.2020*. [Webpage] 2020.
81. *Telefonkonferenz der Bundeskanzlerin mit den Regierungschefinnen und Regierungschefs der Länder am 13. Dezember 2020*, Bundesregierung, Editor. 2020 Available from: <https://www.bundesregierung.de/resource/blob/997532/1827366/69441fb68435a7199b3d3a89bff2c0e6/2020-12-13-beschluss-mpk-data.pdf?download=1>.
82. Institut, R.K. *Infektionsradar - 7-Tage-Inzidenz Covid-19. 2020-2024*; Available from: <https://infektionsradar.gesund.bund.de/de/covid/inzidenz>.
83. Bilich, T., A. Nelde, J.S. Heitmann, Y. Maringer, M. Roerden, J. Bauer, J. Rieth, M. Wacker, A. Peter, S. Horber, D. Rachfalski, M. Marklin, S. Stevanovic, H.G. Rammensee, H.R. Salih and J.S. Walz, *T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals*. *Sci Transl Med*, 2021. **13**(590).
84. Wang, M., S.T. Tang, O. Lund, M.H. Dziegiel, S. Buus and M.H. Claesson, *High-affinity human leucocyte antigen class I binding variola-*

- derived peptides induce CD4+ T cell responses more than 30 years post-vaccinia virus vaccination.* Clin Exp Immunol, 2009. **155**(3): p. 441-6.
85. Boyle, L.H., J.C. Goodall and J.S. Gaston, *Major histocompatibility complex class I-restricted alloreactive CD4+ T cells.* Immunology, 2004. **112**(1): p. 54-63.
 86. Sette, A., J. Sidney and S. Crotty, *T Cell Responses to SARS-CoV-2.* Annu Rev Immunol, 2023. **41**: p. 343-373.
 87. Grifoni, A., J. Sidney, R. Vita, B. Peters, S. Crotty, D. Weiskopf and A. Sette, *SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19.* Cell Host Microbe, 2021. **29**(7): p. 1076-1092.
 88. Bull, M., D. Lee, J. Stucky, Y.L. Chiu, A. Rubin, H. Horton and M.J. McElrath, *Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials.* J Immunol Methods, 2007. **322**(1-2): p. 57-69.
 89. Kreher, C.R., M.T. Dittrich, R. Guerkov, B.O. Boehm and M. Tary-Lehmann, *CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays.* J Immunol Methods, 2003. **278**(1-2): p. 79-93.
 90. Lubke, M., S. Spalt, D.J. Kowalewski, C. Zimmermann, L. Bauersfeld, A. Nelde, L. Bichmann, A. Marcu, J.K. Peper, O. Kohlbacher, J.S. Walz, V.T.K. Le-Trilling, H. Hengel, H.G. Rammensee, S. Stevanovic and A. Halenius, *Identification of HCMV-derived T cell epitopes in seropositive individuals through viral deletion models.* J Exp Med, 2020. **217**(3).
 91. Tarke, A., J. Sidney, C.K. Kidd, J.M. Dan, S.I. Ramirez, E.D. Yu, J. Mateus, R. da Silva Antunes, E. Moore, P. Rubiro, N. Methot, E. Phillips, S. Mallal, A. Frazier, S.A. Rawlings, J.A. Greenbaum, B. Peters, D.M. Smith, S. Crotty, D. Weiskopf, A. Grifoni and A. Sette, *Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases.* Cell Rep Med, 2021. **2**(2): p. 100204.
 92. Ranieri, E., G.S. Netti and M. Gigante, *CTL ELISPOT Assay and T Cell Detection.* Methods Mol Biol, 2021. **2325**: p. 65-77.
 93. Janetzki, S., C.M. Britten, M. Kalos, H.I. Levitsky, H.T. Maecker, C.J. Melief, L.J. Old, P. Romero, A. Hoos and M.M. Davis, *"MIATA"-minimal information about T cell assays.* Immunity, 2009. **31**(4): p. 527-8.
 94. Zhang, W., R. Caspell, A.Y. Karulin, M. Ahmad, N. Haicheur, A. Abdelsalam, K. Johannesen, V. Vignard, P. Dudzik, K. Georgakopoulou, A. Mihaylova, K. Silina, N. Aptsiauri, V. Adams, P.V. Lehmann and S. McArdle, *ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring--even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators.* J Immunotoxicol, 2009. **6**(4): p. 227-34.
 95. Rountree, W., M. Berrong, A.M. Sanchez, T.N. Denny and G. Ferrari, *Variability of the IFN-gamma ELISpot assay in the context of proficiency testing and bridging studies.* J Immunol Methods, 2016. **433**: p. 69-76.
 96. Murugesan, K., P. Jagannathan, T.D. Pham, S. Pandey, H.F. Bonilla, K. Jacobson, J. Parsonnet, J.R. Andrews, D. Weiskopf, A. Sette, B.A. Pinsky, U. Singhand N. Banaei, *Interferon-gamma Release Assay for*

- Accurate Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 T-Cell Response.* Clin Infect Dis, 2021. **73**(9): p. e3130-e3132.
97. Ogbe, A., B. Kronsteiner, D.T. Skelly, M. Pace, A. Brown, E. Adland, K. Adair, H.D. Akhter, M. Ali, S.E. Ali, A. Angyal, M.A. Ansari, C.V. Arancibia-Carcamo, H. Brown, S. Chinnakannan, C. Conlon, C. de Lara, T. de Silva, C. Dold, T. Dong, T. Donnison, D. Eyre, A. Flaxman, H. Fletcher, J. Gardner, J.T. Grist, C.P. Hackstein, K. Jaruthamsophon, K. Jeffery, T. Lambe, L. Lee, W. Li, N. Lim, P.C. Matthews, A.J. Mentzer, S.C. Moore, D.J. Naisbitt, M. Ogese, G. Ogg, P. Openshaw, M. Pirmohamed, A.J. Pollard, N. Ramamurthy, P. Rongkard, S. Rowland-Jones, O. Sampson, G. Sreaton, A. Sette, L. Stafford, C. Thompson, P.J. Thomson, R. Thwaites, V. Vieira, D. Weiskopf, P. Zacharopoulou, T.C.C. Oxford Immunology Network Covid-19 Response, T.C.I.f.C.-C.T. Oxford Protective, L. Turtle, P. Klenerman, P. Goulder, J. Frater, E. Barnes and S. Dunachie, *T cell assays differentiate clinical and subclinical SARS-CoV-2 infections from cross-reactive antiviral responses.* Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 2055.
98. Lin, H., J. Zhang, S. Dong, Y. Liu, P. Liu, G.F. Gao, W.J. Liu and G. Wu, *An adjusted ELISpot-based immunoassay for evaluation of SARS-CoV-2-specific T-cell responses.* Biosaf Health, 2022. **4**(3): p. 179-185.
99. Mangsbo, S.M., S. Havervall, I. Lauren, R. Lindsay, A. Jernbom Falk, U. Marking, M. Lord, M. Buggert, P. Donnes, G. Christoffersson, P. Nilsson, S. Hober, M. Phillipson, J. Klingstrom and C. Thalin, *An evaluation of a FluoroSpot assay as a diagnostic tool to determine SARS-CoV-2 specific T cell responses.* PLoS One, 2021. **16**(9): p. e0258041.
100. Kruse, M., C. Dark, M. Aspden, D. Cochrane, R. Competiello, M. Peltz, L. Torres, P. Wrighton-Smith and M. Dudek, *Performance of the T-SPOT® COVID test for detecting SARS-CoV-2-responsive T cells.* Int J Infect Dis, 2021. **113**: p. 155-161.
101. Laurenti, P., M. Raponi, C. de Waure, M. Marino, W. Ricciardi and G. Damiani, *Performance of interferon-gamma release assays in the diagnosis of confirmed active tuberculosis in immunocompetent children: a new systematic review and meta-analysis.* BMC Infect Dis, 2016. **16**: p. 131.
102. Petrone, L., E. Petruccioli, V. Vanini, G. Cuzzi, S. Najafi Fard, T. Alonzi, C. Castilletti, F. Palmieri, G. Gualano, P. Vittozzi, E. Nicastrì, L. Lepore, A. Antinori, A. Vergori, N. Caccamo, F. Cantini, E. Girardi, G. Ippolito, A. Grifoni and D. Goletti, *A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients.* Clin Microbiol Infect, 2021. **27**(2): p. 286 e7-286 e13.
103. Malyguine, A., S. Strobl, L. Zaritskaya, M. Baseler and K. Shafer-Weaver, *New approaches for monitoring CTL activity in clinical trials.* Adv Exp Med Biol, 2007. **601**: p. 273-84.
104. Dan, J.M., J. Mateus, Y. Kato, K.M. Hastie, E.D. Yu, C.E. Faliti, A. Grifoni, S.I. Ramirez, S. Haupt, A. Frazier, C. Nakao, V. Rayaprolu, S.A. Rawlings, B. Peters, F. Krammer, V. Simon, E.O. Saphire, D.M. Smith, D. Weiskopf, A. Sette and S. Crotty, *Immunological memory to SARS-*

- CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 2021. **371**(6529).
105. Mosmann, T.R., L. Li, H. Hengartner, D. Kagi, W. Fuand S. Sad, *Differentiation and functions of T cell subsets*. Ciba Found Symp, 1997. **204**: p. 148-54; discussion 154-8.
 106. Tarke, A., M. Potesta, S. Varchetta, D. Fenoglio, M. Iannetta, L. Sarmati, D. Mele, C. Dentone, M. Bassetti, C. Montesano, M.U. Mondelli, G. Filaci, A. Grifoniand A. Sette, *Early and Polyantigenic CD4 T Cell Responses Correlate with Mild Disease in Acute COVID-19 Donors*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(13).
 107. Cohen, C.A., A.P.Y. Li, A. Hachim, D.S.C. Hui, M.Y.W. Kwan, O.T.Y. Tsang, S.S. Chiu, W.H. Chan, Y.S. Yau, N. Kavian, F.N.L. Ma, E.H.Y. Lau, S.M.S. Cheng, L.L.M. Poon, M. Peirisand S.A. Valkenburg, *SARS-CoV-2 specific T cell responses are lower in children and increase with age and time after infection*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 4678.
 108. Jia, R., X. Wang, P. Liu, X. Liang, Y. Ge, H. Tian, H. Chang, H. Zhou, M. Zengand J. Xu, *Mild Cytokine Elevation, Moderate CD4(+) T Cell Response and Abundant Antibody Production in Children with COVID-19*. *Virology*, 2020. **35**(6): p. 734-743.
 109. Rudolph, M.E., M.A. McArthur, R.S. Barnes, L.S. Magder, W.H. Chenand M.B. Sztein, *Differences Between Pediatric and Adult T Cell Responses to In Vitro Staphylococcal Enterotoxin B Stimulation*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 498.
 110. Thome, J.J., N. Yudanin, Y. Ohmura, M. Kubota, B. Grinshpun, T. Sathaliyawala, T. Kato, H. Lerner, Y. Shenand D.L. Farber, *Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life*. *Cell*, 2014. **159**(4): p. 814-28.
 111. Xia, H. and P.Y. Shi, *Antagonism of Type I Interferon by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*. *J Interferon Cytokine Res*, 2020. **40**(12): p. 543-548.
 112. Kahan, S.M., E.J. Wherryand A.J. Zajac, *T cell exhaustion during persistent viral infections*. *Virology*, 2015. **479-480**: p. 180-93.
 113. Karakoc Aydiner, E., S. Bilgic Eltan, R. Babayeva, O. Aydiner, E. Kepenekli, B. Kolukisa, A.P. Sefer, E. Yalcin Gungoren, E. Karabiber, E.O. Yucel, O. Ozdemir, A. Kiykim, H. Artac, N. Yakici, K. Yalcin, H. Cokugras, T.T. Celkan, F. Orhan, M.A. Yesilipek, S. Barisand A. Ozen, *Adverse COVID-19 outcomes in immune deficiencies: Inequality exists between subclasses*. *Allergy*, 2022. **77**(1): p. 282-295.
 114. Akondy, R.S., P.L. Johnson, H.I. Nakaya, S. Edupuganti, M.J. Mulligan, B. Lawson, J.D. Miller, B. Pulendran, R. Antiaand R. Ahmed, *Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(10): p. 3050-5.
 115. DeWitt, W.S., R.O. Emerson, P. Lindau, M. Vignali, T.M. Snyder, C. Desmarais, C. Sanders, H. Utsugi, E.H. Warren, J. McElrath, K.W. Makar, A. Waldand H.S. Robins, *Dynamics of the cytotoxic T cell response to a model of acute viral infection*. *J Virol*, 2015. **89**(8): p. 4517-26.

116. Jones, T.C., G. Biele, B. Muhlemann, T. Veith, J. Schneider, J. Beheim-Schwarzbach, T. Bleicker, J. Tesch, M.L. Schmidt, L.E. Sander, F. Kurth, P. Menzel, R. Schwarzer, M. Zuchowski, J. Hofmann, A. Krumbholz, A. Stein, A. Edelmann, V.M. Corman and C. Drosten, *Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course*. Science, 2021. **373**(6551).
117. Madera, S., E. Crawford, C. Langelier, N.K. Tran, E. Thornborrow, S. Miller and J.L. DeRisi, *Nasopharyngeal SARS-CoV-2 viral loads in young children do not differ significantly from those in older children and adults*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 3044.
118. Chung, E., E.J. Chow, N.C. Wilcox, R. Burstein, E. Brandstetter, P.D. Han, K. Fay, B. Pfau, A. Adler, K. Lacombe, C.M. Lockwood, T.M. Uyeki, J. Shendure, J.S. Duchin, M.J. Rieder, D.A. Nickerson, M. Boeckh, M. Famulare, J.P. Hughes, L.M. Starita, T. Bedford, J.A. Englund and H.Y. Chu, *Comparison of Symptoms and RNA Levels in Children and Adults With SARS-CoV-2 Infection in the Community Setting*. JAMA Pediatr, 2021. **175**(10): p. e212025.
119. Breton, G., P. Mendoza, T. Hagglof, T.Y. Oliveira, D. Schaefer-Babajew, C. Gaebler, M. Turroja, A. Hurley, M. Caskey and M.C. Nussenzweig, *Persistent cellular immunity to SARS-CoV-2 infection*. J Exp Med, 2021. **218**(4).
120. Jung, J.H., M.S. Rha, M. Sa, H.K. Choi, J.H. Jeon, H. Seok, D.W. Park, S.H. Park, H.W. Jeong, W.S. Choi and E.C. Shin, *SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 4043.
121. Cohen, K.W., S.L. Linderman, Z. Moodie, J. Czartoski, L. Lai, G. Mantus, C. Norwood, L.E. Nyhoff, V.V. Edara, K. Floyd, S.C. De Rosa, H. Ahmed, R. Whaley, S.N. Patel, B. Prigmore, M.P. Lemos, C.W. Davis, S. Furth, J.B. O'Keefe, M.P. Gharpure, S. Gunisetty, K. Stephens, R. Antia, V.I. Zarnitsyna, D.S. Stephens, S. Edupuganti, N. Roupheal, E.J. Anderson, A.K. Mehta, J. Wrammert, M.S. Suthar, R. Ahmed and M.J. McElrath, *Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells*. Cell Rep Med, 2021. **2**(7): p. 100354.
122. Dowell, A.C., M.S. Butler, E. Jinks, G. Tut, T. Lancaster, P. Sylla, J. Begum, R. Bruton, H. Pearce, K. Verma, N. Logan, G. Tyson, E. Spalkova, S. Margielewska-Davies, G.S. Taylor, E. Syrimi, F. Baawuah, J. Beckmann, I.O. Okike, S. Ahmad, J. Garstang, A.J. Brent, B. Brent, G. Ireland, F. Aiano, Z. Amin-Chowdhury, S. Jones, R. Borrow, E. Linley, J. Wright, R. Azad, D. Waiblinger, C. Davis, E.C. Thomson, M. Palmarini, B.J. Willett, W.S. Barclay, J. Poh, G. Amirthalingam, K.E. Brown, M.E. Ramsay, J. Zuo, P. Moss and S. Ladhani, *Children develop robust and sustained cross-reactive spike-specific immune responses to SARS-CoV-2 infection*. Nat Immunol, 2022. **23**(1): p. 40-49.
123. Shekerdemian, L.S., N.R. Mahmood, K.K. Wolfe, B.J. Riggs, C.E. Ross, C.A. McKiernan, S.M. Heidemann, L.C. Kleinman, A.I. Sen, M.W. Hall, M.A. Priestley, J.K. McGuire, K. Boukas, M.P. Sharron, J.P. Burns and

- C.-P.C. International, *Characteristics and Outcomes of Children With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection Admitted to US and Canadian Pediatric Intensive Care Units*. *JAMA Pediatr*, 2020. **174**(9): p. 868-873.
124. Whittaker, E., A. Bamford, J. Kenny, M. Kaforou, C.E. Jones, P. Shah, P. Ramnarayan, A. Fraisse, O. Miller, P. Davies, F. Kucera, J. Brierley, M. McDougall, M. Carter, A. Tremoulet, C. Shimizu, J. Herberg, J.C. Burns, H. Lyall, M. Levin, P.-T.S. Group, Euclidsand P. Consortia, *Clinical Characteristics of 58 Children With a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CoV-2*. *JAMA*, 2020. **324**(3): p. 259-269.
 125. Viner, R.M. and E. Whittaker, *Kawasaki-like disease: emerging complication during the COVID-19 pandemic*. *Lancet*, 2020. **395**(10239): p. 1741-1743.
 126. Riphagen, S., X. Gomez, C. Gonzalez-Martinez, N. Wilkinson and P. Theocharis, *Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic*. *Lancet*, 2020. **395**(10237): p. 1607-1608.
 127. Feldstein, L.R., M.W. Tenforde, K.G. Friedman, M. Newhams, E.B. Rose, H. Dapul, V.L. Soma, A.B. Maddux, P.M. Mourani, C. Bowens, M. Maamari, M.W. Hall, B.J. Riggs, J.S. Giuliano, Jr., A.R. Singh, S. Li, M. Kong, J.E. Schuster, G.E. McLaughlin, S.P. Schwartz, T.C. Walker, L.L. Loftis, C.V. Hobbs, N.B. Halasa, S. Doymaz, C.J. Babbitt, J.R. Hume, S.J. Gertz, K. Irby, K.N. Clouser, N.Z. Cvijanovich, T.T. Bradford, L.S. Smith, S.M. Heidemann, S.P. Zackai, K. Wellnitz, R.A. Nofziger, S.M. Horwitz, R.W. Carroll, C.M. Rowan, K.M. Tarquinio, E.H. Mack, J.C. Fitzgerald, B.M. Coates, A.M. Jackson, C.C. Young, M.B.F. Son, M.M. Patel, J.W. Newburger, A.G. Randolph and C.-I. Overcoming, *Characteristics and Outcomes of US Children and Adolescents With Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Compared With Severe Acute COVID-19*. *JAMA*, 2021. **325**(11): p. 1074-1087.
 128. Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie, e.V. *PIMS-Survey von 2020 bis 2023*. 2023.
 129. Carter, M.J., M. Fish, A. Jennings, K.J. Doores, P. Wellman, J. Seow, S. Acors, C. Graham, E. Timms, J. Kenny, S. Neil, M.H. Malim, S.M. Tibby and M. Shankar-Hari, *Peripheral immunophenotypes in children with multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection*. *Nat Med*, 2020. **26**(11): p. 1701-1707.
 130. Lee, P.Y., M. Day-Lewis, L.A. Henderson, K.G. Friedman, J. Lo, J.E. Roberts, M.S. Lo, C.D. Platt, J. Chou, K.J. Hoyt, A.L. Baker, T.M. Banzon, M.H. Chang, E. Cohen, S.D. de Ferranti, A. Dionne, S. Habiballah, O. Halyabar, J.S. Hausmann, M.M. Hazen, E. Janssen, E. Meidan, R.W. Nelson, A.A. Nguyen, R.P. Sundel, F. Dedeoglu, P.A. Nigrovic, J.W. Newburger and M.B.F. Son, *Distinct clinical and immunological features of SARS-CoV-2-induced multisystem inflammatory syndrome in children*. *J Clin Invest*, 2020. **130**(11): p. 5942-5950.
 131. Consiglio, C.R., N. Cotugno, F. Sardh, C. Pou, D. Amodio, L. Rodriguez, Z. Tan, S. Zicari, A. Ruggiero, G.R. Pascucci, V. Santilli, T. Campbell, Y.

- Bryceson, D. Eriksson, J. Wang, A. Marchesi, T. Lakshmikanth, A. Campana, A. Villani, P. Rossi, C.S. Team, N. Landegren, P. Palma and P. Brodin, *The Immunology of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children with COVID-19*. Cell, 2020. **183**(4): p. 968-981 e7.
132. Zhao, Y., M. Kuang, J. Li, L. Zhu, Z. Jia, X. Guo, Y. Hu, J. Kong, H. Yin, X. Wang and F. You, *Publisher Correction: SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR4*. Cell Res, 2021. **31**(7): p. 825.
133. Zheng, M., R. Karki, E.P. Williams, D. Yang, E. Fitzpatrick, P. Vogel, C.B. Jonsson and T.D. Kanneganti, *TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines*. Nat Immunol, 2021. **22**(7): p. 829-838.
134. Anaeigoudari, A., H.R. Mollaei, M.K. Arababadi and R. Nosratabadi, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: The Role of the Main Components of the Innate Immune System*. Inflammation, 2021. **44**(6): p. 2151-2169.
135. Bastard, P., L.B. Rosen, Q. Zhang, E. Michailidis, H.H. Hoffmann, Y. Zhang, K. Dorgham, Q. Philippot, J. Rosain, V. Beziat, J. Manry, E. Shaw, L. Haljasmagi, P. Peterson, L. Lorenzo, L. Bizien, S. Trouillet-Assant, K. Dobbs, A.A. de Jesus, A. Belot, A. Kallaste, E. Catherinot, Y. Tandjaoui-Lambiotte, J. Le Pen, G. Kerner, B. Bigio, Y. Seeleuthner, R. Yang, A. Bolze, A.N. Spaan, O.M. Delmonte, M.S. Abers, A. Aiuti, G. Casari, V. Lampasona, L. Piemonti, F. Ciceri, K. Bilguvar, R.P. Lifton, M. Vasse, D.M. Smadja, M. Migaud, J. Hadjadj, B. Terrier, D. Duffy, L. Quintana-Murci, D. van de Beek, L. Roussel, D.C. Vinh, S.G. Tangye, F. Haerynck, D. Dalmau, J. Martinez-Picado, P. Brodin, M.C. Nussenzweig, S. Boisson-Dupuis, C. Rodriguez-Gallego, G. Vogt, T.H. Mogensen, A.J. Oler, J. Gu, P.D. Burbelo, J.I. Cohen, A. Biondi, L.R. Bettini, M. D'Angio, P. Bonfanti, P. Rossignol, J. Mayaux, F. Rieux-Laucat, E.S. Husebye, F. Fusco, M.V. Ursini, L. Imberti, A. Sottini, S. Paghera, E. Quiros-Roldan, C. Rossi, R. Castagnoli, D. Montagna, A. Licari, G.L. Marseglia, X. Duval, J. Ghosn, H. Lab, N.-U.I.R.t.C. Group, C. Clinicians, C.-S. Clinicians, C.G. Imagine, C.C.S.G. French, C. Milieu Interieur, V.C.C. Co, U.M.C.C.-B. Amsterdam, C.H.G. Effort, J.S. Tsang, R. Goldbach-Mansky, K. Kisand, M.S. Lionakis, A. Puel, S.Y. Zhang, S.M. Holland, G. Gorochov, E. Jouanguy, C.M. Rice, A. Cobat, L.D. Notarangelo, L. Abel, H.C. Su and J.L. Casanova, *Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19*. Science, 2020. **370**(6515).
136. Lemarquis, A., T. Campbell, M. Aranda-Guillen, V. Hennings, P. Brodin, O. Kampe, K. Blennow, H. Zetterberg, C. Wenneras, K. Eriksson, N. Landegren, Y. Bryceson, S. Bergand O. Ekwall, *Severe COVID-19 in an APS1 patient with interferon autoantibodies treated with plasmapheresis*. J Allergy Clin Immunol, 2021. **148**(1): p. 96-98.
137. Hadjadj, J., N. Yatim, L. Barnabei, A. Corneau, J. Boussier, N. Smith, H. Pere, B. Charbit, V. Bondet, C. Chenevier-Gobeaux, P. Breillat, N. Carlier, R. Gauzit, C. Morbieu, F. Pene, N. Marin, N. Roche, T.A. Szwebel, S.H. Merkling, J.M. Treluyer, D. Veyer, L. Mouthon, C. Blanc, P.L. Tharaux, F. Rozenberg, A. Fischer, D. Duffy, F. Rieux-Laucat, S. Kerneis and B. Terrier, *Impaired type I interferon activity and*

- inflammatory responses in severe COVID-19 patients*. Science, 2020. **369**(6504): p. 718-724.
138. Zuniga, E.I., L.Y. Liou, L. Mack, M. Mendoza and M.B. Oldstone, *Persistent virus infection inhibits type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells to facilitate opportunistic infections*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(4): p. 374-86.
 139. Pierce, C.A., S. Sy, B. Galen, D.Y. Goldstein, E. Orner, M.J. Keller, K.C. Herold and B.C. Herold, *Natural mucosal barriers and COVID-19 in children*. JCI Insight, 2021. **6**(9).
 140. Holt, P.G., D. Mok, D. Panda, L. Renn, G. Fabozzi, N.H. deKlerk, M.M.H. Kusel, M. Serralha, E.M. Hollams, B.J. Holt, P.D. Sly and R.L. Rabin, *Developmental regulation of type 1 and type 3 interferon production and risk for infant infections and asthma development*. J Allergy Clin Immunol, 2019. **143**(3): p. 1176-1182 e5.
 141. Letko, M., A. Marziani and V. Munster, *Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses*. Nat Microbiol, 2020. **5**(4): p. 562-569.
 142. Wang, A., J. Chiou, O.B. Poirion, J. Buchanan, M.J. Valdez, J.M. Verheyden, X. Hou, P. Kudtarkar, S. Narendra, J.M. Newsome, M. Guo, D.A. Faddah, K. Zhang, R.E. Young, J. Barr, E. Sajti, R. Misra, H. Huyck, L. Rogers, C. Poole, J.A. Whitsett, G. Pryhuber, Y. Xu, K.J. Gaulton, S. Preissl, X. Sun and N.L. Consortium, *Single-cell multiomic profiling of human lungs reveals cell-type-specific and age-dynamic control of SARS-CoV2 host genes*. Elife, 2020. **9**.
 143. Schuler, B.A., A.C. Habermann, E.J. Plosa, C.J. Taylor, C. Jetter, N.M. Negretti, M.E. Kapp, J.T. Benjamin, P. Gulleman, D.S. Nichols, L.Z. Braunstein, A. Hackett, M. Koval, S.H. Guttentag, T.S. Blackwell, S.A. Webber, N.E. Banovich, C.-C.C. Vanderbilt, N. Human Cell Atlas Biological, J.A. Kropski and J.M. Sucre, *Age-determined expression of priming protease TMPRSS2 and localization of SARS-CoV-2 in lung epithelium*. J Clin Invest, 2021. **131**(1).
 144. Bunyavanich, S., A. Doan and A. Vicencio, *Nasal Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Children and Adults*. JAMA, 2020. **323**(23): p. 2427-2429.
 145. Hasan, M.R., M.N. Ahmad, S.R. Dargham, H. Zayed, A.A. Hashemi, N. Ngwabi, A.P. Lopez, S. Dobson, L.J.A. Raddad and P. Tang, *Nasopharyngeal Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Transmembrane Serine Protease 2 in Children within SARS-CoV-2-Infected Family Clusters*. Microbiology Spectrum, 2021. **9**(3): p. e00783-21.
 146. Saheb Sharif-Askari, N., F. Saheb Sharif-Askari, M. Alabed, M.H. Tamsah, S. Al Heialy, Q. Hamid and R. Halwani, *Airways Expression of SARS-CoV-2 Receptor, ACE2, and TMPRSS2 Is Lower in Children Than Adults and Increases with Smoking and COPD*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020. **18**: p. 1-6.
 147. Tonshoff, B., B. Muller, R. Elling, H. Renk, P. Meissner, H. Hengel, S.F. Garbade, M. Kieser, K. Jeltsch, J. Grulich-Henn, J. Euler, M. Stich, K. Chobanyan-Jurgens, M. Zernickel, A. Janda, L. Wolfle, T. Stamminger,

- T. Iftner, T. Ganzenmueller, C. Schmitt, T. Gorne, V. Laketa, S. Olberg, A. Plaszczyca, M. Cortese, R. Bartenschlager, C. Pape, R. Remme, D. Huzly, M. Panning, S. Weigang, S. Giese, K. Ciminski, J. Ankerhold, G. Kochs, M. Schwemmler, R. Handgretinger, C.M. Niemeyer, C. Engel, W.V. Kern, G.F. Hoffmann, A.R. Franz, P. Henneke, K.M. Debatinand H.G. Krausslich, *Prevalence of SARS-CoV-2 Infection in Children and Their Parents in Southwest Germany*. JAMA Pediatr, 2021. **175**(6): p. 586-593.
148. Stringhini, S., A. Wisniak, G. Piumatti, A.S. Azman, S.A. Lauer, H. Baysson, D. De Ridder, D. Petrovic, S. Schrempft, K. Marcus, S. Yerly, I. Arm Vernez, O. Keiser, S. Hurst, K.M. Posfay-Barbe, D. Trono, D. Pittet, L. Getaz, F. Chappuis, I. Eckerle, N. Vuilleumier, B. Meyer, A. Flahault, L. Kaiserand I. Guessous, *Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study*. Lancet, 2020. **396**(10247): p. 313-319.
149. Pollan, M., B. Perez-Gomez, R. Pastor-Barriuso, J. Oteo, M.A. Hernan, M. Perez-Olmeda, J.L. Sanmartin, A. Fernandez-Garcia, I. Cruz, N. Fernandez de Larrea, M. Molina, F. Rodriguez-Cabrera, M. Martin, P. Merino-Amador, J. Leon Paniagua, J.F. Munoz-Montalvo, F. Blanco, R. Yottian and E.-C.S. Group, *Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study*. Lancet, 2020. **396**(10250): p. 535-544.
150. Gudbjartsson, D.F., A. Helgason, H. Jonsson, O.T. Magnusson, P. Melsted, G.L. Norddahl, J. Saemundsdottir, A. Sigurdsson, P. Sulem, A.B. Agustsdottir, B. Eiriksdottir, R. Fridriksdottir, E.E. Gardarsdottir, G. Georgsson, O.S. Gretarsdottir, K.R. Gudmundsson, T.R. Gunnarsdottir, A. Gylfason, H. Holm, B.O. Jensson, A. Jonasdottir, F. Jonsson, K.S. Josefsdottir, T. Kristjansson, D.N. Magnusdottir, L. le Roux, G. Sigmundsdottir, G. Sveinbjornsson, K.E. Sveinsdottir, M. Sveinsdottir, E.A. Thorarensen, B. Thorbjornsson, A. Love, G. Masson, I. Jonsdottir, A.D. Moller, T. Gudnason, K.G. Kristinsson, U. Thorsteinsdottir and K. Stefansson, *Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic Population*. N Engl J Med, 2020. **382**(24): p. 2302-2315.
151. Garrido, C., J.H. Hurst, C.G. Lorang, J.N. Aquino, J. Rodriguez, T.S. Pfeiffer, T. Singh, E.C. Semmes, D.J. Lugo, A.T. Rotta, N.A. Turner, T.W. Burke, M.T. McClain, E.A. Petzold, S.R. Permar, M.A. Moody, C.W. Woods, M.S. Kelly and G.G. Fouda, *Asymptomatic or mild symptomatic SARS-CoV-2 infection elicits durable neutralizing antibody responses in children and adolescents*. JCI Insight, 2021. **6**(17).
152. Zhao, J., Q. Yuan, H. Wang, W. Liu, X. Liao, Y. Su, X. Wang, J. Yuan, T. Li, J. Li, S. Qian, C. Hong, F. Wang, Y. Liu, Z. Wang, Q. He, Z. Li, B. He, T. Zhang, Y. Fu, S. Ge, L. Liu, J. Zhang, N. Xia and Z. Zhang, *Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019*. Clinical Infectious Diseases, 2020. **71**(16): p. 2027-2034.
153. Marits, P., A.C. Wikstrom, D. Popadic, O. Winqvist and S. Thunberg, *Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay*. Clin Immunol, 2014. **153**(2): p. 332-42.

154. Fernandez-Moreno, R., J. Valle-Arroyo, A. Paez-Vega, A. Salinas, A. Cano, A.B. Perez, J. Torre-Cisneros and S. Cantisan, *Memory SARS-CoV-2 T-cell response in convalescent COVID-19 patients with undetectable specific IgG antibodies: a comparative study*. *Front Immunol*, 2023. **14**: p. 1142918.
155. *Protein BLAST (Nationales Zentrum für Biotechnologie-Informationen)*. 2021, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.
156. Le Bert, N., H.E. Clapham, A.T. Tan, W.N. Chia, C.Y.L. Tham, J.M. Lim, K. Kunasegaran, L.W.L. Tan, C.A. Dutertre, N. Shankar, J.M.E. Lim, L.J. Sun, M. Zahari, Z.M. Tun, V. Kumar, B.L. Lim, S.H. Lim, A. Chia, Y.J. Tan, P.A. Tambyah, S. Kalimuddin, D. Lye, J.G.H. Low, L.F. Wang, W.Y. Wan, L.Y. Hsu, A. Bertoletti and C.C. Tam, *Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection*. *J Exp Med*, 2021. **218**(5).
157. Bacher, P., E. Rosati, D. Esser, G.R. Martini, C. Saggau, E. Schiminsky, J. Dargvainiene, I. Schroder, I. Wieters, Y. Khodamoradi, F. Eberhardt, M. Vehreschild, H. Neb, M. Sonntagbauer, C. Conrad, F. Tran, P. Rosenstiel, R. Markewitz, K.P. Wandinger, M. Augustin, J. Rybniker, M. Kochanek, F. Leyoldt, O.A. Cornely, P. Koehler, A. Franke and A. Scheffold, *Low-Avidity CD4(+) T Cell Responses to SARS-CoV-2 in Unexposed Individuals and Humans with Severe COVID-19*. *Immunity*, 2020. **53**(6): p. 1258-1271 e5.
158. Ahmadi, E., M.R. Zabihi, R. Hosseinzadeh, L. Mohamed Khosroshahi and F. Noorbakhsh, *SARS-CoV-2 spike protein displays sequence similarities with paramyxovirus surface proteins; a bioinformatics study*. *PLoS One*, 2021. **16**(12): p. e0260360.
159. Johansson, A.M., U. Malhotra, Y.G. Kim, R. Gomez, M.P. Krist, A. Wald, D.M. Koelle and W.W. Kwok, *Cross-reactive and mono-reactive SARS-CoV-2 CD4+ T cells in prepandemic and COVID-19 convalescent individuals*. *PLoS Pathog*, 2021. **17**(12): p. e1010203.
160. Prakash, S., R. Srivastava, P.G. Coulon, N.R. Dhanushkodi, A.A. Chentoufi, D.F. Tifrea, R.A. Edwards, C.J. Figueroa, S.D. Schubl, L. Hsieh, M.J. Buchmeier, M. Bouziane, A.B. Nesburn, B.D. Kuppermann and L. BenMohamed, *Genome-Wide B Cell, CD4(+), and CD8(+) T Cell Epitopes That Are Highly Conserved between Human and Animal Coronaviruses, Identified from SARS-CoV-2 as Targets for Preemptive Pan-Coronavirus Vaccines*. *J Immunol*, 2021. **206**(11): p. 2566-2582.
161. Tarke, A., C.H. Coelho, Z. Zhang, J.M. Dan, E.D. Yu, N. Methot, N.I. Bloom, B. Goodwin, E. Phillips, S. Mallal, J. Sidney, G. Filaci, D. Weiskopf, R. da Silva Antunes, S. Crotty, A. Grifoni and A. Sette, *SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron*. *Cell*, 2022. **185**(5): p. 847-859 e11.
162. Mateus, J., J.M. Dan, Z. Zhang, C. Rydyznski Moderbacher, M. Lammers, B. Goodwin, A. Sette, S. Crotty and D. Weiskopf, *Low-dose*

- mRNA-1273 COVID-19 vaccine generates durable memory enhanced by cross-reactive T cells.* Science, 2021. **374**(6566): p. eabj9853.
163. Loyal, L., J. Braun, L. Henze, B. Kruse, M. Dingeldey, U. Reimer, F. Kern, T. Schwarz, M. Mangold, C. Unger, F. Dörfler, S. Kadler, J. Rosowski, K. Gürcan, Z. Uyar-Aydin, M. Frentsch, F. Kurth, K. Schnatbaum, M. Eckey, S. Hippenstiel, A. Hocke, M.A. Müller, B. Sawitzki, S. Miltenyi, F. Paul, M.A. Mall, H. Wenschuh, S. Voigt, C. Drosten, R. Lauster, N. Lachman, L.-E. Sander, V.M. Corman, J. Röhmel, L. Meyer-Arndt, A. Thieland C. Giesecke-Thiel, *Cross-reactive CD4+ T cells enhance SARS-CoV-2 immune responses upon infection and vaccination.* Science, 2021. **374**(6564): p. eabh1823.
164. Meyer-Arndt, L., T. Schwarz, L. Loyal, L. Henze, B. Kruse, M. Dingeldey, K. Gurcan, Z. Uyar-Aydin, M.A. Muller, C. Drosten, F. Paul, L.E. Sander, I. Demuth, R. Lauster, C. Giesecke-Thiel, J. Braun, V.M. Corman and A. Thiel, *Cutting Edge: Serum but Not Mucosal Antibody Responses Are Associated with Pre-Existing SARS-CoV-2 Spike Cross-Reactive CD4(+) T Cells following BNT162b2 Vaccination in the Elderly.* J Immunol, 2022. **208**(5): p. 1001-1005.
165. Gouma, S., M.E. Weirick, M.J. Bolton, C.P. Arevalo, E.C. Goodwin, E.M. Anderson, C.M. McAllister, S.R. Christensen, D. Dunbar, D. Fiore, A. Brock, J. Weaver, J. Millar, S. DerOhannessian, T. Unit, I. Frank, D.J. Rader, E.J. Wherry and S.E. Hensley, *Health care worker seromonitoring reveals complex relationships between common coronavirus antibodies and COVID-19 symptom duration.* JCI Insight, 2021. **6**(16).
166. Aydillo, T., A. Rombauts, D. Stadlbauer, S. Aslam, G. Abelenda-Alonso, A. Escalera, F. Amanat, K. Jiang, F. Krammer, J. Carratala and A. Garcia-Sastre, *Immunological imprinting of the antibody response in COVID-19 patients.* Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 3781.
167. Anderson, E.M., E.C. Goodwin, A. Verma, C.P. Arevalo, M.J. Bolton, M.E. Weirick, S. Gouma, C.M. McAllister, S.R. Christensen, J. Weaver, P. Hicks, T.B. Manzoni, O. Oniyide, H. Ramage, D. Mathew, A.E. Baxter, D.A. Oldridge, A.R. Greenplate, J.E. Wu, C. Alanio, K. D'Andrea, O. Kuthuru, J. Dougherty, A. Pattekar, J. Kim, N. Han, S.A. Apostolidis, A.C. Huang, L.A. Vella, L. Kuri-Cervantes, M.B. Pampena, U.P.C.P. Unit, M.R. Betts, E.J. Wherry, N.J. Meyer, S. Cherry, P. Bates, D.J. Rader and S.E. Hensley, *Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection.* Cell, 2021. **184**(7): p. 1858-1864 e10.
168. Benede, N., M.B. Tincho, A. Walters, V. Subbiah, A. Ngomti, R. Baguma, C. Butters, L. Hahnle, M. Mennen, S. Skelem, M. Adriaanse, H. Facey-Thomas, C. Scott, J. Day, T.F. Spracklen, S. van Graan, S.R. Balla, T. Moyo-Gwete, P.L. Moore, R. MacGinty, M. Botha, L. Workman, M. Johnson, D. Goldblatt, H.J. Zar, N.A.B. Ntusi, L. Zuhlke, K. Webb, C. Riou, W.A. Burgers and R.S. Keeton, *Distinct T cell polyfunctional profile in SARS-CoV-2 seronegative children associated with endemic human coronavirus cross-reactivity.* iScience, 2024. **27**(1): p. 108728.
169. Ng, K.W., N. Faulkner, G.H. Cornish, A. Rosa, R. Harvey, S. Hussain, R. Ulferts, C. Earl, A.G. Wrobel, D.J. Benton, C. Roustan, W. Bolland, R.

- Thompson, A. Agua-Doce, P. Hobson, J. Heaney, H. Rickman, S. Paraskevopoulou, C.F. Houlihan, K. Thomson, E. Sanchez, G.Y. Shin, M.J. Spyer, D. Joshi, N. O'Reilly, P.A. Walker, S. Kjaer, A. Riddell, C. Moore, B.R. Jebson, M. Wilkinson, L.R. Marshall, E.C. Rosser, A. Radziszewska, H. Peckham, C. Ciurtin, L.R. Wedderburn, R. Beale, C. Swanton, S. Gandhi, B. Stockinger, J. McCauley, S.J. Gamblin, L.E. McCoy, P. Cherepanov, E. Nastouliand G. Kassiotis, *Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans*. Science, 2020. **370**(6522): p. 1339-1343.
170. Meade, P., G. Kuan, S. Strohmeier, H.E. Maier, F. Amanat, A. Balmaseda, K. Ito, E. Kirkpatrick, A. Javier, L. Gresh, R. Nachbagauer, A. Gordonand F. Krammer, *Influenza Virus Infection Induces a Narrow Antibody Response in Children but a Broad Recall Response in Adults*. mBio, 2020. **11**(1).
171. Sette, A. and S. Crotty, *Author Correction: Pre-existing immunity to SARS-CoV-2: the knowns and unknowns*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(10): p. 644.
172. Sagar, M., K. Reifler, M. Rossi, N.S. Miller, P. Sinha, L.F. Whiteand J.P. Mizgerd, *Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19*. J Clin Invest, 2021. **131**(1).
173. Saletti, G., T. Gerlach, J.M. Jansen, A. Molle, H. Elbahesh, M. Ludlow, W. Li, B.J. Bosch, A. Osterhausand G.F. Rimmelzwaan, *Older adults lack SARS CoV-2 cross-reactive T lymphocytes directed to human coronaviruses OC43 and NL63*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 21447.
174. Mateus, J., A. Grifoni, A. Tarke, J. Sidney, S.I. Ramirez, J.M. Dan, Z.C. Burger, S.A. Rawlings, D.M. Smith, E. Phillips, S. Mallal, M. Lammers, P. Rubiro, L. Quiambao, A. Sutherland, E.D. Yu, R. da Silva Antunes, J. Greenbaum, A. Frazier, A.J. Markmann, L. Premkumar, A. de Silva, B. Peters, S. Crotty, A. Setteand D. Weiskopf, *Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans*. Science, 2020. **370**(6512): p. 89-94.
175. Dykema, A.G., B. Zhang, B.A. Woldemeskel, C.C. Garliss, L.S. Cheung, D. Choudhury, J. Zhang, L. Aparicio, S. Bom, R. Rashid, J.X. Caushi, E.H. Hsiue, K. Cascino, E.A. Thompson, A.K. Kwaa, D. Singh, S. Thapa, A.A. Ordonez, A. Pekosz, F.R. D'Alessio, J.D. Powell, S. Yegnasubramanian, S. Zhou, D.M. Pardoll, H. Ji, A.L. Cox, J.N. Blanksonand K.N. Smith, *Functional characterization of CD4+ T cell receptors crossreactive for SARS-CoV-2 and endemic coronaviruses*. J Clin Invest, 2021. **131**(10).
176. Renk, H., A. Dulovic, A. Seidel, M. Becker, D. Fabricius, M. Zernickel, D. Junker, R. Gross, J. Muller, A. Hilger, S.F.N. Bode, L. Fritsch, P. Frieh, A. Haddad, T. Gorne, J. Remppis, T. Ganzemueller, A. Dietz, D. Huzly, H. Hengel, K. Kaier, S. Weber, E.M. Jacobsen, P.D. Kaiser, B. Traenkle, U. Rothbauer, M. Stich, B. Tonshoff, G.F. Hoffmann, B. Muller, C. Ludwig, B. Jahrsdorfer, H. Schrezenmeier, A. Peter, S. Horber, T. Iftner, J. Munch, T. Stamminger, H.J. Gross, M. Wolkewitz, C. Engel, W. Liu, M. Rizzi, B.H. Hahn, P. Henneke, A.R. Franz, K.M. Debatin, N. Schneiderhan-Marra, A. Jandaand R. Elling, *Robust and durable*

- serological response following pediatric SARS-CoV-2 infection. Nat Commun, 2022. 13(1): p. 128.*
177. Piedra, P.A., M.J. Gaglani, C.A. Kozinetz, G. Herschler, M. Riggs, M. Griffith, C. Fewlass, M. Watts, C. Hessel, J. Cordova and W.P. Glezen, *Herd immunity in adults against influenza-related illnesses with use of the trivalent-live attenuated influenza vaccine (CAIV-T) in children. Vaccine, 2005. 23(13): p. 1540-8.*
 178. Viboud, C., P.Y. Boelle, S. Cauchemez, A. Lavenu, A.J. Valleron, A. Flahault and F. Carrat, *Risk factors of influenza transmission in households. Br J Gen Pract, 2004. 54(506): p. 684-9.*
 179. Mossong, J., N. Hens, M. Jit, P. Beutels, K. Auranen, R. Mikolajczyk, M. Massari, S. Salmaso, G.S. Tomba, J. Wallinga, J. Heijne, M. Sadkowska-Todys, M. Rosinska and W.J. Edmunds, *Social contacts and mixing patterns relevant to the spread of infectious diseases. PLoS Med, 2008. 5(3): p. e74.*
 180. Cauchemez, S., A.J. Valleron, P.Y. Boelle, A. Flahault and N.M. Ferguson, *Estimating the impact of school closure on influenza transmission from Sentinel data. Nature, 2008. 452(7188): p. 750-4.*
 181. Sharma, A., I. Ahmad Farouk and S.K. Lal, *COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. Viruses, 2021. 13(2).*
 182. Sorg, A.L., L. Bergfeld, M. Jank, V. Corman, I. Semmler, A. Goertz, A. Beyerlein, E. Verjans, N. Wagner, H. Von Bernuth, F. Lander, K. Weil, M. Hufnagel, U. Spiekerkoetter, C.M. Chao, L. Naehrlich, A.C. Muntau, U. Schulze-Sturm, G. Hansen, M. Wetzke, A.M. Jung, T. Niehues, S. Fricke-Otto, U. Von Both, J. Huebner, U. Behrends, J.G. Liese, C. Schwerk, C. Drosten, R. Von Kries and H. Schroten, *Cross-sectional seroprevalence surveys of SARS-CoV-2 antibodies in children in Germany, June 2020 to May 2021. Nat Commun, 2022. 13(1): p. 3128.*
 183. Dawood, F.S., C.A. Porucznik, V. Veguilla, J.B. Stanford, J. Duque, M.A. Rolfes, A. Dixon, P. Thind, E. Hacker, M.J.E. Castro, Z. Jeddy, M. Daugherty, K. Altunkaynak, D.R. Hunt, U. Kattel, J. Meece and M.S. Stockwell, *Incidence Rates, Household Infection Risk, and Clinical Characteristics of SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adults in Utah and New York City, New York. JAMA Pediatr, 2022. 176(1): p. 59-67.*

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Peter Lang durchgeführt.

Dr. rer. nat Armin Rabsteyn, Dr. rer. nat. Alex Dulovic und Dr. med. Hanna Renk konzipierten die Studie und planten die Experimente. Jonathan Remppis, Dr. biol. hum. Corinna Engel, Dr. med. Hanna Renk, Dr. rer. nat. Armin Rabsteyn, PD Dr. med. Tina Ganzenmueller, Apl. Prof. Dr. Axel R. Franz sammelten die Blutproben und/oder organisierten diese. Die AG Lang, darunter auch ich, war für das Verarbeiten und Einfrieren der Proben verantwortlich. Prof. Dr. med. Juliane S. Walz aus dem immunologischen Institut der Universität Tübingen stellte uns die HLA:Peptide zur Verfügung.

Die Versuche wurden unter Einführung von Irene Gentzke und Armin Rabsteyn von mir in Zusammenarbeit mit Nadja Tücks durchgeführt. Die Versuche von T1 wurden von Irene Gentzke durchgeführt und ausgewertet. Ihre Daten wurden, mit ihrer Zustimmung, mit den Daten dieser Arbeit (T2) verglichen. Die Daten der kreuzreaktiven T-Zellantwort wurden mit der Zustimmung von Nadja Tücks, mit meinen Daten der spezifischen T-Zellantwort verglichen. Die Antikörperdaten wurden von Renk et al. erhoben und freundlicherweise unter der Zustimmung von Hanna Renk zum Vergleich der humoralen Antwort mit der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort genutzt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. Armin Rabsteyn und Prof. Dr. Peter Lang verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

_____, den _____ in _____

Danksagung

An allererster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Lang und Dr. rer. nat. Armin Rabsteyn für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und der erforderlichen Ressourcen danken. Außerdem bedanke ich mich für die sehr gute Betreuung im Rahmen dieser Arbeit und das gute Verhältnis über die Forschungsarbeit hinaus. Zudem danke ich der ganzen Arbeitsgruppe AG Lang, allen voran Irene Gentzke für die Einarbeitung, Florian Heubach für allerlei nützliche Tipps und Nadja Tücks für die gemeinsame Durchführung der Experimente. Ich bedanke mich recht herzlich bei der ganzen Arbeitsgruppe und Prof. Dr. med Peter Lang für die gute Zusammenarbeit und die vielen schönen Erinnerungen auch außerhalb der Laborarbeit in Tübingen.

Ich danke dem Team der Immunologie, allen voran Prof. Dr. Juliane Walz, Dr. Annika Nelde und der AG Walz für das Bereitstellen der HLA:Peptide und die angeleitete Benutzung des Immunospot Analyzers. Außerdem danke ich dem Team von Dr. Hanna Renk für die Bereitstellung der Antikörperdaten und der gesamten Studienleitung für die Organisation des Projektes und der Probenaufnahme.

Selbstverständlich danke ich meiner Familie, Freunden und meinem Partner, allen voran meinen Eltern Willi und Sabine Müller, die mich immer unterstützt haben. Außerdem danke ich aus tiefstem Herzen Hannelore, Josef und Sonja Seer, sowie Alice und Karin Müller, die leider nur einen Teil meines Weges mit mir gegangen sind, meinen Charakter und meine Lebensentscheidungen aber zutiefst geprägt haben. Diese Arbeit ist auch euer Verdienst.