

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Kinderheilkunde 1
Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie

**Haushalts-epidemiologische Untersuchung der
zellulären Immunantwort 3-4 Monate 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
Gentzcke, Irene Katharina Elisabeth**

2026

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Vogel

Tag der Disputation: 18.12.2025

Widmung

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2)	10
1.2 Coronavirus disease 2019 (COVID-19)	11
1.3 Die adaptive Immunantwort	13
1.3.1 T-Zellen	13
1.3.2 HLA-Klassen	14
1.3.3 B-Zellen	16
1.4 SARS-CoV-2 und die adaptive Immunantwort	17
1.5 Endemische Coronaviren	17
1.6 Hypothesen	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Laborgeräte	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.4 Zytokine	22
2.1.5 Peptide	23
2.1.6 Medien	25
2.1.7 ELISpot- Material	25
2.1.8 Software	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Studiendesign	26
2.2.2 Rekrutierung	26
2.2.3 Probenakquise	27
2.2.4 PBMC-Isolierung	28
2.2.5 Auftauen	29

2.2.6	Präsensitivierung und Epitopmixe _____	30
2.2.7	Präsensitivierung und Zellkultur _____	31
2.2.8	IFN γ -ELISpot-Assay _____	32
2.2.9	Auslesen und Qualitätskontrolle _____	35
2.2.10	Statistische Analyse _____	36
2.2.11	Serologie _____	37
2.2.12	Analysierte Daten _____	38
3	Ergebnisse _____	39
3.1	Zelluläre Immunantwort nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen _____	40
3.2	Zelluläre und serologische SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort im Vergleich _____	44
3.3	Intensität der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort _____	49
3.4	Zelluläre Immunantwort nach Stimulation mit HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmischen _____	52
3.5	Intensität der kreuzreaktiven T-Zell-Antwort _____	56
3.6	Familiäre Durchseuchung _____	60
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse _____	62
4	Diskussion _____	64
4.1	Erwachsene vs. Kinder und Jugendliche: Häufigkeit der Infektion__	64
4.2	Erwachsene vs. Kinder und Jugendliche: Breite der Immunantwort	64
4.3	Zelluläre Immunantwort ist sensitiver als Antikörpernachweis _____	65
4.4	Kinder und Jugendliche zeigen seltener Serokonversion _____	66
4.5	Zelluläre Kreuzreaktivität unterscheidet sich bei Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen nicht _____	69
4.6	Spezifische T-Zell-Antwort in einzelnen Haushalten _____	70
4.7	Praktische Implikationen _____	71
4.8	Methodologische Überlegungen und Limitationen _____	73
4.8.1	Studiendesign _____	73
4.8.2	Epitopmixe und ELISpot-Assay _____	74
4.8.3	Serologie _____	75
5	Zusammenfassung _____	77

6	Literaturverzeichnis	79
7	Erklärung zum Eigenanteil	104
8	Veröffentlichung	105
9	Danksagung	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der <i>in vitro</i> Präsensitivierung.	32
Abbildung 2: Schema des ELISpot-Assays.	33
Abbildung 3: Flowchart Datenanalyse	38
Abbildung 4: Stimulationsschema und Beispiel-IFN γ -ELISpot-Assay	39
Abbildung 5: Prozentuale Verteilung der als positiv und negativ gewerteten Probanden nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen.	43
Abbildung 6: Einteilung in Gruppen anhand der SARS-CoV-2-spezifischen B- und T-Zell-Antwort.	45
Abbildung 7: SARS-CoV-2-spezifische B- und T-Zell-Antwort eingeteilt nach Alter.	45
Abbildung 8: Prozentualer Anteil der SARS-CoV-2-spezifischen B- und T-Zell-Antwort bei Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen.	46
Abbildung 9: Erkennungsraten der SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmische.	48
Abbildung 10: Intensität der T-Zell-Antwort nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen.	51
Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der als positiv und negativ gewerteten Proben nach Stimulation mit HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmischen.	52
Abbildung 12: Kreuzreaktive T-Zell-Antwort abhängig von der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort.	54
Abbildung 13: Erkennungsraten der HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmische CI und CII eingeteilt nach SARS-CoV-2-spezifischer Immunantwort.	55
Abbildung 14: Intensität der T-Zell-Antwort nach Stimulation mit HCoV- und SARS-CoV-2 kreuzreaktiven Peptidmischen.	59

Abbildung 15: Familiäre Durchseuchung mit SARS-CoV-2-spezifischen T- und B-Zellen.	61
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung des Verlaufs von COVID-19 anhand der Symptomatik	11
Tabelle 2: SARS-CoV-2-spezifische und HCoV-/SARS-CoV-2-kreuzreaktive HLA-Klasse-I und HLA-DR restringierte T-Zell-Epitopmixe.	24
Tabelle 3: Peptide der HLA-gepaarten Negativkontrolle.	24
Tabelle 4: Parameter beim Auslesen der ELISpot-Platten.	35
Tabelle 5: Zusammenfassung der analysierten Spenderdaten zur SARS-CoV-2-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort.	42
Tabelle 6: Zusammenfassung der analysierten Spenderdaten zur HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven T-zellulären Immunantwort.....	53

Abkürzungsverzeichnis

ACE-2	Angiotensin-converting enzyme 2
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Serumalbumin
CI	HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiver HLA-Klasse-I-restringierter Epitopmix
CII	HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiver HLA-DR-restringierter Epitopmix
COVID-19	Coronavirus disease 2019
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Envelope, Erwachsene
FCS	Fetales Kälberserum
HCoV	humanpathogene Coronaviren
HLA	Humanes Leukozytenantigen
I	Intensität

IFN- γ	Interferon gamma
IL-2	Humanes Interleukin 2
IL-7	Humanes Interleukin 7
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
K/J	Kinder/ Jugendliche
M	Membrane
mAb	monoclonal antibody
MIS-C	Multisystem Inflammatory Syndrom in Children
MSC	Mean Spot Count
N	Nucleocapsid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NKI	Negativkontrolle mit DMSO
NKII	Negativkontrolle mit HLA-gepaartem Peptidmix
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PHA-L	Phytohämagglutinin-L
PK	Positivkontrolle
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RBD	Receptor binding domain
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S	Spike
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SI	SARS-CoV-2-spezifischer HLA-Klasse-I-restringierter Epitopmix
SII	SARS-CoV-2-spezifischer HLA-DR-restringierter Epitopmix
TCM	T-Zell-Medium
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th1	Typ-1-T-Helferzellen
Th2	Typ-2-T-Helferzellen

1 Einleitung

Seit 2020 verbreitet sich das Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) weltweit und verursachte eine Pandemie, die viele Menschenleben forderte (Adil et al. 2021). Präventionsmaßnahmen wie Quarantäne-Empfehlungen wurden als geeignete Mittel gegen die Ausbreitung des Virus eingesetzt (Auranen et al. 2023; Girum et al. 2020), zeigten jedoch auch einen großen Einfluss auf die psychische Gesundheit vieler Menschen (Bonati et al. 2022) und verhinderten den Zugang zu wichtigen unterstützenden Strukturen des Alltags (Chu et al. 2020). Zudem beeinträchtigen Folgeerkrankungen nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 das Leben vieler Menschen nachhaltig (Kim et al. 2023; Sanchez-Ramirez et al. 2021).

In kurzer Zeit konnte bereits viel Wissen darüber gesammelt werden, auf welche Art und Weise unser Körper SARS-CoV-2 bekämpft. Es wurde gezeigt, dass eine gut koordinierte Immunantwort durch T-Zellen und neutralisierende Antikörper wesentlich zur Bekämpfung einer Infektion mit SARS-CoV-2 beitragen (Sette und Crotty 2021). Dabei kommt der T-Zell-Immunität eine zentrale Rolle zu (Moss 2022).

Während Kinder und Jugendliche sich zu Beginn der Pandemie 2020 eher selten infizierten (Shen et al. 2020) und häufig milde oder asymptomatische Verläufe zeigten (Liguoro et al. 2020), kam es bei Erwachsenen mit zunehmenden Alter häufiger zur Hospitalisierung und zu einem tödlichen Krankheitsverlauf (Felsenstein und Hedrich 2020). Bekannterweise geht die physiologische Alterung mit einer Abnahme der Funktionalität des Immunsystems einher, was zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führt (Valiathan et al. 2016). Auch Kleinkinder infizieren sich häufiger mit saisonalen Virusinfektionen als Erwachsene (Heikkinen und Järvinen 2003). Dennoch scheinen Kinder und Jugendliche weniger suszeptibel für SARS-CoV-2 zu sein (Viner et al. 2021). Eine mögliche Erklärung könnte der Schutz gegenüber einer Infektion mit SARS-CoV-2 nach einer kürzlich stattgehabten Infektion mit anderen saisonalen Coronaviren bieten (Loyal et al. 2021).

Seit der raschen Ausbreitung der neuen SARS-CoV-2-Omikron-Variante (Araf et al. 2022) ist auch die jüngere Bevölkerung vermehrt von Infektionen betroffen (Gupta et al. 2023). Die Hospitalisierungsraten und die klinischen Manifestationen scheinen vergleichbar mit Erwachsenen zu sein (Khemiri et al. 2022). Die Unterschiede in der kindlichen und adulten Immunantwort sind aus mehreren Gründen von wesentlichem medizinisch-wissenschaftlichem Interesse:

- I) Durch niedrige Impfraten sind Kinder und Jugendliche besonders durch eine Infektion innerhalb der Familie oder Bildungs-/Betreuungseinrichtung und deren mögliche Komplikationen und Langzeitfolgen gefährdet (Nathanielsz et al. 2023; European Centre for Disease Prevention and Control 2024).
- II) Als Virusinfektion wird SARS-CoV-2 vor allem symptomatisch behandelt, während eine kausale Therapie nur eingeschränkt möglich ist (DGIIN, DIVI, DGP, DGI, AWMF-Leitlinie 2025). Deswegen spielen Präventionsmaßnahmen eine besonders wichtige Rolle zum Schutz vor der Erkrankung. Das Verständnis unterschiedlicher Funktionsweisen der Immunantwort ist wichtig, um Präventionsmaßnahmen altersgerecht durchführen zu können.
- III) Das immunologische Gedächtnis kann potentiell einen Schutz gegenüber einer SARS-CoV-2-Infektion vermitteln (Coulon et al. 2024) und ist bei Kindern und Erwachsenen unterschiedlich ausgeprägt (Lam et al. 2024). Es ist wichtig, diese unterschiedlichen Ausprägungen des immunologischen Gedächtnisses zu erforschen und zu verstehen, um das Infektionsgeschehen besser einschätzen und vorhersagen zu können.

Diese Studie soll dazu dienen, Unterschiede in der zellulären und humoralen Immunantwort auf SARS-CoV-2 und andere saisonale Coronaviren zwischen Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen zu erforschen. Die Ergebnisse könnten dazu beitragen, die erfolgten Quarantäne- und Schutzmaßnahmen gegen SARS-CoV-2 zu bewerten und wissenschaftlich fundierte

Empfehlungen zu Präventionsmaßnahmen wie beispielsweise Impfungen auch im Hinblick auf mögliche zukünftige Pandemien durchzuführen.

1.1 Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2)

SARS-CoV-2 ist ein membranumhülltes RNA-Virus, das die Fähigkeit besitzt, Virionen mit Oberflächenproteinen, sogenannten Spike-Proteinen, zu bilden (Laue et al. 2021). Es gehört zur Familie der Coronaviren. Insgesamt sind sieben Spezies der humanpathogenen Coronaviren (HCoV) bekannt. Sie werden in

- **Alpha-HCoV** (HCoV-229E, HCoV-NL63) und
- **Beta-HCoV** (HCoV-HKU1, HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2)

unterteilt (Kesheh et al. 2022). Weltweit zirkulieren vier dieser Spezies endemisch (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 und HCoV-OC43) und verursachen vor allem milde Erkältungskrankheiten, sind aber auch in der Lage im frühen Kindesalter und bei alten und immunsupprimierten Menschen schwere Pneumonien zu verursachen (Fehr und Perlman 2015).

Coronaviren besitzen die Fähigkeit zur homologen Rekombination und können auf andere Wirtspezies überspringen (Graham und Baric 2010). So konnten SARS-CoV, MERS-CoV und SARS-CoV-2 auch Menschen infizieren und teilweise schwere Atemwegserkrankungen mit letalem Verlauf verursachen (Cui et al. 2019; Zhou et al. 2020).

Das Genom der Coronaviren kodiert für die vier Strukturproteine Spike (S), Envelope (E), Membrane (M) und Nucleocapsid (N), aber auch für nicht-strukturelle Proteine, die für die RNA-Replikation zuständig sind, sowie für akzessorische Proteine (Cui et al. 2019). An verschiedenen Open reading frames werden die kodierenden Genomregionen zuerst transkribiert und schließlich zu Proteinen translatiert (Hu et al. 2021).

Die Genome von SARS-CoV und SARS-CoV-2 stimmen zu 79% überein, zeigen allerdings deutliche Unterschiede im kodierenden Gen für das Spike-Protein (Chan et al. 2020; Hu et al. 2021). Das Spike-Protein ermöglicht den Eintritt in die Wirtszellen und besteht aus den zwei Untereinheiten S1 und S2 (Jackson et

al. 2022). Um eine Wirtszelle zu befallen, bindet SARS-CoV-2 über die Receptor binding domain (RBD) der S1-Untereinheit an das Membranprotein Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) der Wirtszelle. Daraufhin vermittelt die S2-Untereinheit die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran (Jackson et al. 2022). Das Nucleocapsid-Protein stabilisiert die Virus-RNA, indem es die RNA zu einer langen Helixstruktur wickelt (Gorkhali et al. 2021), während sich die Spike-, Envelope- und Membrane-Proteine in die Virusmembran einlagern (Fehr und Perlman 2015).

Oft fungiert das Spike-Protein als Zielprotein für die Immunantwort und neutralisierende Antikörper (Duan et al. 2020; Walls et al. 2020), sodass viele wirksame Impfstoffe das Spike-Protein als Antigen nutzen (Baden et al. 2021; Heath et al. 2021; Polack et al. 2020).

1.2 Coronavirus disease 2019 (COVID-19)

Eine Infektion mit SARS-CoV-2 verursacht eine COVID-19-Erkrankung. Die Symptomatik und Infektiosität variiert zwischen den verschiedenen SARS-CoV-2-Varianten. Anhand der klinischen Symptome teilt man den Verlauf der Krankheit in Schweregrade ein (National Institutes of Health (NIH) 2024):

Asymptomatisch	Positiver Test ohne Symptomatik
Milde	Mindestens eines der folgenden Symptome: Fieber, Husten, Halsschmerzen, Unwohlsein, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall oder Verlust von Geschmack und Geruch, keine Dyspnoe
Moderat	Beteiligung der unteren Atemwege in der klinischen Untersuchung oder Bildgebung, SpO ₂ bei Raumluft ≥ 94%
Schwer	SpO ₂ bei Raumluft < 94%, Horowitz-Index PaO ₂ /FiO ₂ < 300mmHg, Atemfrequenz >30/min oder >50% der Lunge zeigen Infiltrate
Kritisch	Atemversagen, septischer Schock oder Multiples Organversagen

Tabelle 1: Klassifizierung des Verlaufs von COVID-19 anhand der Symptomatik (National Institutes of Health (NIH) 2024).

Zu Beginn der COVID-19-Pandemie 2020 zeigte die SARS-CoV-2-Alpha-Variante einerseits bei einem Großteil der Infizierten einen asymptomatischen, milden oder moderaten Verlauf, andererseits führten etwa 14% der Infektionen zu einem schweren und 5% zu einem kritischen Verlauf (Hu et al. 2021).

Epidemiologische Untersuchungen bis Ende 2020 legen nahe, dass die gemessenen Fallzahlen von COVID-19 bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen niedriger sind (Mehta et al. 2020). Allerdings wird vermutet, dass die Infektionsrate mit SARS-CoV-2 bei Kindern mit der von Erwachsenen vergleichbar ist, da Kinder häufiger einen asymptomatischen oder milden Verlauf zeigen als Erwachsene und deswegen seltener auf SARS-CoV-2 getestet wurden (Mehta et al. 2020; Zimmermann und Curtis 2020).

Eine Infektion mit SARS-CoV-2 kann jedoch auch bei Kindern und Jugendlichen einen schweren Verlauf mit überschießender systemischer Inflammation zeigen, auch als Multisystem Inflammatory Syndrom in Children (MIS-C) bezeichnet (Patel 2022). Zusätzlich können infolge einer SARS-CoV-2-Infektion sowohl Erwachsene als auch Kinder an einem Post-COVID-Syndrom erkranken, bei dem die Symptome der Erkrankung länger als 12 Wochen persistieren und das alltägliche Leben einschränken (Funk et al. 2022; Nalbandian et al. 2023). Vor allem die Unterschiede in der individuellen Immunantwort scheinen einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf während und nach einer SARS-CoV-2-Infektion bei Kindern zu haben (Rotulo und Palma 2023).

Die aktuell kursierenden Omikron-Varianten zeigen eine verstärkte Infektiosität (Yang et al. 2024), jedoch seltener schwere Verläufe (Esper et al. 2023; Guo et al. 2022). Dennoch mussten insbesondere Säuglinge und Kleinkinder häufiger im Krankenhaus behandelt werden (Setiabudi et al. 2022; Torjesen 2022). Dieser Umstand könnte durch Unterschiede in der vorbestehenden Immunität entweder infolge einer Infektion oder Impfung, oder durch eine Kombination beider Faktoren, der sogenannten hybriden Immunität, zu erklären sein (Bobrovitz et al. 2023; Reynolds et al. 2022).

1.3 Die adaptive Immunantwort

Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems entfalten ihre Wirkung etwa 5-7 Tage nach Infektion und lassen sich anhand ihrer Oberflächenrezeptoren und Funktionen in T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen) einteilen (Murphy und Weaver 2018). Nach Kontakt mit einem Antigen proliferieren die beiden Zellreihen, werden dadurch gegen eben jenes Antigen „bewaffnet“ und können somit eine zielgerichtete Immunabwehr vermitteln (Haan et al. 2014). Nach Antigenkontakt können sich B-Zellen zu Plasmazellen entwickeln und das Pathogen durch Bildung von Antikörpern bekämpfen, während T-Zellen direkt infizierte Zellen vernichten und als Helferzellen andere Zellreihen aktivieren können (Murphy und Weaver 2018).

1.3.1 T-Zellen

Naive T-Zellen entwickeln sich im Thymus und durchlaufen einen komplexen Reifungs- und Selektionsprozess, um sicherzustellen, dass sie korrekt zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen unterscheiden können (Garcia und Adams 2005; Sebзда et al. 1999). Dadurch nehmen sie eine Schlüsselrolle im adaptiven Immunsystem ein (Murphy und Weaver 2018).

T-Zellen können mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (TCR) Antigene erkennen, die über Humane Leukozytenantigen (HLA)-Moleküle präsentiert werden (Rossjohn et al. 2015; Stone et al. 2009). Sie können sowohl intrazelluläre Antigene über HLA-Klasse-I-Moleküle auf infizierten Zellen als auch extrazelluläre Antigene über HLA-Klasse-II-Moleküle auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC) erkennen (Neefjes et al. 2011; Rudolph et al. 2006). Eine Peptidsequenz, die auf einem HLA-Molekül präsentiert wird und von einer T-Zelle mit Hilfe des TCR erkannt wird, wird auch als Epitop bezeichnet (Peters et al. 2020).

Bindet eine naive T-Zelle, die einen für sie spezifischen TCR besitzt, das für sie spezifische Peptid auf den HLA-Molekülen, wird sie aktiviert (Krummel et al. 2016). Für die vollständige Aktivierung sind zudem kostimulatorische Moleküle sowie die Produktion von Zytokinen notwendig (Schuijs et al. 2019; Smith-Garvin et al. 2009). Daraufhin durchlaufen die T-Zellen zunächst eine klonale Expansion (Adams et al. 2020). Dabei werden T-Zell-Klone gebildet, deren TCR sich

spezifisch gegen das erkannte Antigen richtet (Adams et al. 2020). Im Anschluss differenzieren sich die T-Zellen zu T-Effektorzellen mit zytotoxischer oder Helferzell-Funktion (Murphy und Weaver 2018; Seder und Ahmed 2003). Eine detailliertere Beschreibung der Funktionen erfolgt im nächsten Abschnitt.

Ein Teil der naiven T-Zellen differenziert sich zu Gedächtnis-T-Zellen, die im Körper persistieren und bei Re-Exposition gegenüber dem Pathogen eine protektive Immunantwort koordinieren können (Farber et al. 2014). Bei Geburt sind alle T-Zellen naiv und insbesondere in den ersten zwei Lebensdekaden werden viele Gedächtnis-T-Zellen gebildet, sodass der Anteil an den zirkulierenden T-Zellen auf 35% steigt (Farber et al. 2014).

1.3.2 HLA-Klassen

Das HLA-System nimmt eine Schlüsselrolle in der adaptiven Immunantwort ein, da T-Zellen mithilfe des TCR nur Antigene erkennen können, die auf HLA-Molekülen präsentiert werden (Pishesha et al. 2022). Die Gene, die für HLA-Moleküle kodieren, sind hochgradig polymorph (Jin und Wang 2003). Das bedeutet, dass es viele verschiedene Varianten, sogenannte Allele, gibt, die jeweils unterschiedliche Peptide präsentieren können (Klein und Sato 2000). Jeder Mensch hat eine individuelle Kombination aus HLA-Allelen und besitzt dadurch eine individuelle Fähigkeit für die Antigenpräsentation und -erkennung. Dies kann einen Einfluss auf die Anfälligkeit und den Verlauf bakterieller und viraler Infektionen und die Entstehung von autoimmunen Erkrankungen sowie Abstoßungsreaktionen in der Transplantatmedizin haben (Dendrou et al. 2018; Medhasi und Chantratita 2022).

Die Gene für HLA-A, HLA-B und HLA-C kodieren für HLA-Klasse-I-Moleküle, sind hochgradig polymorph und für die Immunantwort von Relevanz (Dendrou et al. 2018). Für die HLA-Klasse-II-Moleküle sind vor allem die HLA-D-Gene wichtig, die wiederum in verschiedene Familien (M, O, P, Q und R) eingeteilt werden (Klein und Sato 2000). In der Nomenklatur werden zudem die Allelgruppe sowie das spezifische HLA-Protein angegeben (Medhasi und Chantratita 2022).

1.3.2.1 HLA-Klasse-I und CD8+T-Zellen

Pathogene können auf zwei verschiedene Arten prozessiert und den T-Zellen als Antigene präsentiert werden. Hat ein Virus eine Körperzelle befallen, liegt das Antigen intrazellulär vor. Die viralen Proteine im Cytosol werden durch das Proteasom prozessiert (Grommé und Neefjes 2002). Die entstehenden Peptide sind typischerweise 8-10 Aminosäuren lang und werden zum endoplasmatischen Retikulum transportiert, wo sie auf HLA-Klasse-I-Moleküle geladen werden können (Pamer und Cresswell 1998). Die peptidbeladenen HLA-Klasse-I-Moleküle werden an die Zelloberfläche transportiert und präsentieren dort die pathogenen Peptide als Epitop für T-Zellen, die einen CD8-Co-Rezeptor (CD8+T-Zellen) besitzen (Peters et al. 2020). Erkennt eine CD8+T-Zelle ein Epitop mit ihrem T-Zell-Rezeptor, beginnt sie mit der klonalen Expansion und differenziert zur CD8+T-Effektorzelle, die infizierte Zelle durch Zytolyse töten und Cytokine, Chemokine und mikrobizide Moleküle produzieren kann (Harty et al. 2000).

Die CD8+T-Effektorzellen können durch Sekretion von Perforin/ Granzym virusinfizierte und transformierte Zellen lysieren oder durch Interaktion des zelleigenen Fas-Liganden mit dem Fas-Rezeptor auf der Zielzelle die Apoptose von autoreaktiven Immunzellen vermitteln und so zur Homöostase der Immunreaktion beitragen (Trapani und Smyth 2002). HLA-Klasse-I-Moleküle werden von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, sodass CD8+T-Zellen schnell auf intrazelluläre Pathogene reagieren können (Harty et al. 2000).

1.3.2.2 HLA-Klasse-II und CD4+T-Zellen

Bei extrazellulären Pathogenen findet eine andere Art der Antigenprozessierung und -präsentation statt. Dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen, die zusammen die Gruppe der professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (APC) bilden, kommen dabei eine wichtige Rolle als Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort zu (Murphy und Weaver 2018). Die APC nehmen extrazelluläre Pathogene durch Phagozytose, Endozytose oder Makropinozytose auf und prozessieren diese durch endosomale Proteasen (Pishesha et al. 2022). Die entstandenen Peptide sind typischerweise 10-15 Aminosäuren lang und werden in speziellen Zellkompartimenten auf HLA-Klasse-II-Moleküle geladen

(Pishesha et al. 2022). Die HLA-Klasse-II-Moleküle besitzen zudem die Fähigkeit, längere Peptide zu präsentieren (Chicz et al. 1992). Anschließend werden die peptidbeladenen HLA-Klasse-II-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert, wo sie T-Zellen mit einem CD4-Co-Rezeptor (CD4+T-Zellen) präsentiert werden (Neefjes et al. 2011). Die APC wandern zu den sekundären lymphatischen Organen und können dort naive CD4+T-Zellen zu Effektorzellen aktivieren (Itano und Jenkins 2003). Für die vollständige Aktivierung sind außerdem kostimulatorische Moleküle sowie die Produktion von Zytokinen durch die APC notwendig (Schuijs et al. 2019; Smith-Garvin et al. 2009). Nach der Aktivierung betreiben die CD4+T-Zellen klonale Expansion und differenzieren zu CD4+T-Effektorzellen (Haan et al. 2014).

Die CD4+T-Effektorzellen werden in verschiedene Subtypen eingeteilt und erfüllen vielfältige Funktionen. Als Helferzellen können sie durch proinflammatorische Cytokine wie Interferon- γ (IFN γ) andere Zellreihen der Immunabwehr wie T- und B-Zellen oder Makrophagen stimulieren (Klein und Sato 2000; Murphy und Weaver 2018) und als regulatorische Zellen zur Homöostase des Immunsystems beitragen (Shevryev und Tereshchenko 2019). Es existieren zahlreiche Untergruppen der CD4+T-Helferzellen, die sich durch ein spezifisches Profil der Cytokinproduktion auszeichnen und dadurch ein breites Spektrum an immunologischen Funktionen erfüllen (Haan et al. 2014). Ihre genaue Charakterisierung ist Gegenstand aktueller Forschung im Bereich der Immunologie und würde den Rahmen dieser Dissertation überschreiten.

1.3.3 B-Zellen

B-Zellen können mit Hilfe des B-Zell-Rezeptors sowohl extrazelluläre, native Antigene als auch von follikulären Helferzellen präsentierte Antigene erkennen (Heesters et al. 2016). Nach Antigenkontakt proliferieren sie und differenzieren zu Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen aus (Haan et al. 2014). Die Plasmazellen produzieren Antikörper, die spezifisch an das erkannte Antigen binden (Lu et al. 2018). Diese Antikörper bilden den humoralen Teil der Immunantwort und können das Pathogen neutralisieren und dessen Zerstörung durch Phagozyten oder Aktivierung des Komplementsystems erleichtern können

(Lu et al. 2018). Gedächtnis-B-Zellen persistieren im Körper und können bei Reinfektion eine schnelle und starke Immunantwort auslösen (Kurosaki et al. 2015). B-Zellen können zwar unabhängig von T-Zellen ein extrazelluläres freies Antigen erkennen, benötigen aber meistens die Hilfe von aktivierten CD4+-T-Helferzellen (Haan et al. 2014; Vinuesa et al. 2005). Deswegen ist die T-Zell-Aktivierung essenziell für die gesamte adaptive Immunantwort (Murphy und Weaver 2018).

1.4 SARS-CoV-2 und die adaptive Immunantwort

Man konnte Unterschiede in der adaptiven Immunantwort auf SARS-CoV-2 zwischen milden und schweren COVID-19-Verläufen feststellen, die darauf hindeuten, dass eine immunologische Dysregulation einen entscheidenden Risikofaktor für die Krankheitschwere darstellt (Sette und Crotty 2021; Silva et al. 2022). Bei milden Verläufen kommt es zu einer erhöhten Bildung von antigenspezifischen CD8+ T-Zellen und B-Zellen (Rydzynski Moderbacher et al. 2020). Im Gegensatz dazu wurde bei schweren Verläufen eine gestörte Aktivierung von antigenspezifischen CD4+-T-Helferzellen (Kalfaoglu et al. 2021), eine gesteigerte Bildung von proinflammatorischen regulatorischen CD4+-T-Zellen (Silva et al. 2022) und eine vermehrte Bildung von neutralisierenden Antikörpern (Trinité et al. 2021) beobachtet.

1.5 Endemische Coronaviren

Die vier endemischen Coronaviren-Spezies HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 und HCoV-OC43 verursachen etwa 10,7% aller respiratorischen Virusinfekte (Nickbakhsh et al. 2020). Ein Kontakt mit einem Virus in der Vergangenheit kann bei Infektion mit einem ähnlichen, neuartigen Virus bereits vorhandene Zellen des Immungedächtnisses reaktivieren und so eine schnellere Bildung von Abwehrzellen und Antikörpern und dadurch eine schnellere Eliminierung des neuartigen Virus bewirken (Agrawal 2019; Lam et al. 2024; Welsh et al. 2010). Dies wird auch als heterologe Immunität oder Kreuzreaktivität bezeichnet (Agrawal 2019). Es gibt Hinweise, dass Kreuzreaktivität zu den endemischen HCoV bei einer Infektion mit SARS-CoV-2 einen Einfluss auf den

Krankheitsverlauf oder ein Protektion vor Infektion bewirken kann (Coulon et al. 2024).

Das Immunsystem von Kleinkindern und insbesondere Neugeborenen ist häufig naiv für Pathogene wie saisonale respiratorische Viren (Pieren et al. 2022). Erwachsene dagegen hatten meistens bereits Kontakt mit respiratorischen Viren und zeigen häufiger eine Gedächtniszell-vermittelte Immunantwort (Lam et al. 2024), die schneller agiert, aber potentiell weniger vielseitig ist (Verhoeven et al. 2008). Im Rahmen der SARS-CoV-2-Infektion wurde allerdings auch eine altersabhängige Abnahme HCoV-kreuzreaktiver T-Zellen beschrieben, die eine erhöhte Vulnerabilität älterer Individuen für Infektion mit SARS-CoV-2 vermitteln könnte (Loyal et al. 2021; Saletti et al. 2020). Ein Nachweis von HCoV- und SARS-CoV-2 kreuzreaktiven T-Zellen könnte eine mögliche Erklärung für die altersbezogenen Unterschiede bei Krankheitsverläufen und Infektionsraten bieten (Gil et al. 2015; Zimmermann und Curtis 2022).

1.6 Hypothesen

Ziel dieser Studie ist es eventuell vorhandene Unterschiede der Infektionsraten von COVID-19 zwischen Kindern und Erwachsenen in Haushalten mit COVID-19-Indexfall zu untersuchen. Dafür werden die beteiligten T-Zell-Subpopulationen mit Hilfe von SARS-CoV-2-spezifischen und HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Epitopen untersucht und die humorale und zelluläre Immunantwort auf SARS-CoV-2 verglichen. Der Fokus liegt auf asymptomatischen, milden und moderaten Krankheitsverläufen innerhalb von Familien in Baden-Württemberg.

Basierend auf den Erkenntnissen zur zellulären und humoralen Immunantwort auf SARS-CoV-2 von 2020 werden folgende Hypothesen untersucht:

- I. Im familiären Umfeld infizieren sich Kinder häufig mit SARS-CoV-2. Dabei bilden Kinder und Jugendliche andere T-Zell-Subpopulationen aus als Erwachsene.

- II. Zelluläre und humorale Immunantwort gehen miteinander einher. Durch Antikörpernachweis kann eine Auseinandersetzung mit SARS-CoV-2 sicher nachgewiesen werden.
- III. Kinder und Erwachsenen zeigen unterschiedliche Raten an T-Zell-Populationen, die zu HCoV kreuzreagieren. HCoV- und SARS-CoV-2 kreuzreaktive T-Zell-Populationen werden durch SARS-CoV-2 Infektion reaktiviert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte (*Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025*)

Einfrierhilfen	Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container – ThermoScientific, Waltham, USA CoolCell Mr. Frostys – Biocision, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Gefrierschrank -20 °C	Premium und Premium No Frost – Liebherr, Kirchdorf
Gefrierschrank -80 °C	Telstar Technologies SL V570 – Azbil Telstar Technologies, Terrassa, Spanien HERAFreeze HFU T Series - ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ImmunoSpot Series 6 Ultra-V Analyzer	Version 5.1, C.T.L. Europe GmbH - Bonn, Deutschland
Inkubator 37 °C	Heraeus CO2-Inkubator BBD 6220 (BS) und HERAcell CO2-Inkubator (BS) – Heraeus, Hanau
Kühlschrank 4 °C	GKv 4310 ProfiLine – Liebherr, Kirchdorf
Lichtmikroskop	Zeiss Mikroskop Axiovert 40 CFL (BS) - Zeiss, Oberkochen Olympus CX40 - Shinjuku, Tokio, Japan
Minizentrifuge	Neolab 7-0040 - Neolab, Heidelberg
Multikanalpipette	HTL Discovery Comfort - HTL, Warszawa, Polen
Pipetboy	Pipetboy Thermo Scientific - Waltham, Massachusetts, USA Pipetboy acu 2 - Integra - Zizers, Schweiz
Pipetten	Eppendorf Research plus - Eppendorf, Hamburg
2,5/10/20/100/ 200/1000 µl	Pipetman Classic - Gilson, Middleton, USA Discovery Comfort - HTL, Warszawa, Polen
Sicherheitswerkbank	Thermo Heraeus HERAsafe HS18 Safety Bench (S2) - Heraeus, Hanau

Sicherheitswerkbank	Biowizard Silver SL-170 Class II - Kojair, Vilppula Norwegen
Vortex	Neolab 7-2020 - Neolab, Heidelberg
Wasserbad	WB7 und WB14 - Memmert, Schwabach
Zählkammer	Neubauer - Laboroptik, Lancing, UK
Zellzähler (automatisiert)	Advia 120 Hematology System – Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
Zentrifugen	Rotina 420 R, Rotanta 46 RSC und Rotixa 50 RS - Hettich, Vlotho Eppendorf Centrifuge 5810 - Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Cryovials	Greiner-Bio – Kremsmünster, Österreich
Deckglas Neubauer- Zählkammer	Laboroptik – Lancing, UK
Decosept	Dr. Schumacher – Maisfeld, Deutschland
Eppendorf Tubes 0,5/ 1/ 2 ml	Eppendorf – Hamburg
Ethanol 99 %	SAV Liquid Production – Flintsbach, Deutschland
Falcons 15/ 50 ml	Corning - USA
Isopropanol 70 %ig	SAV Liquid Production – Flintsbach, Deutschland
Kulturplatten 48-Well	Corning – USA
Kulturplatten 96-Well	Greiner-Bio - Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen steril 20/200/1000 µl	Corning - USA
Pipettenspitzen unsteril 200 µl	Corning - USA
Reservoirs 25/ 50/ 100 ml	VWR – West Chester, USA
Sterile Stripetten 5/ 10/ 25/ 50 ml	Corning - USA

Steriles Wasser Ampuwa Fresenius KABI – Bad Homburg,
Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

AB-Humanserum	Sigma Aldrich – St. Louis, USA
Biocoll Separating Solution	Bio&Sell – Feucht, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich – St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth – Karlsruhe, Deutschland
DNase I	Roche – Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/ life technologies – Carlsbad, USA
Ionomycin	Sigma Aldrich – St. Louis, USA
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Sigma Aldrich – St. Louis, USA
L-Glutamin	Biochrom – St- Albans, UK
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom – St- Albans, UK
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich – St. Louis, USA
Phosphate-buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich – St. Louis, USA
Phytohämagglutinin-L (PHA-L)	Roche – Karlsruhe, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Gibco/ life technologies – Carlsbad, USA
Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)	Sigma Aldrich – St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma Aldrich – St. Louis, USA
Tween 20	Sigma Aldrich – St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Roth – Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Zytokine (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Humanes Interleukin 2 (IL-2)	Novartis Ag - Basel, Schweiz
Humanes Interleukin 7 (IL-7)	PeproTech - Cranbury, USA

2.1.5 Peptide

Für die in-vitro-Stimulation wurden insgesamt vier Peptidmixe verwendet (s. Tabelle 2). Jegliche verwendeten Peptide dienen als T-Zell-Epitope (Nelde et al. 2021). Deswegen wird folgend auch von Epitopmischen gesprochen. Zwei Epitopmische beinhalten Peptide, die spezifisch für SARS-CoV-2 sind. Einer dieser spezifischen Epitopmische besteht aus Peptiden, die durch HLA-Klasse-I-Moleküle, der andere aus Peptiden, die durch HLA-DR-Moleküle präsentiert werden. Zwei weitere Epitopmische setzten sich aus Peptiden zusammen, die kreuzreaktiv zu anderen endemischen HCoV (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1) sind. Auch hier bestand jeweils ein kreuzreaktiver Epitopmix aus Peptiden, die von HLA-Klasse-I-Molekülen respektive HLA-DR-Molekülen präsentiert werden. Als Negativkontrolle dienten HLA-gepaarte Peptide (s. Tabelle 3), die vom Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und von menschlichen Proteinen abstammen.

Die Epitopmische wurden bereits in anderen Studien erfolgreich verwendet und publiziert (Bilich et al. 2021; Nelde et al. 2021). Freundlicherweise wurden uns die Peptide von Prof. Juliane Walz aus der Abteilung für Immunologie des Interfakultären Instituts für Zellbiologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

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	LTDEMIQY	ORF2 spi	A*01	A01_P01	TTDPSFLGRY	ORF1	A*01
A02_P03	ALSKGVHFV	ORF3	A*02	A01_P05	RTFKVSIWNLDY	ORF6	A*01
A02_P09	LLLLDRNLQL	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	TPKYKQVRI	ORF1	B*08
A11_P01	ASMPPTIAK	ORF1	A*11	B08_P08	DLKGKYVQI	ORF1	B*08
A11_P08	ATEGALNTPK	ORF9 nuc	A*11	B08_P10	EAFEKQVSL	ORF1	B*08
A24_P01	VYIGDPAQL	ORF1	A*24	B40_P04	YEGNSPFHPL	ORF7	B*40
A24_P03	VYFLOSINF	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	MEVTPSGTQWL	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	GTWLTGTGAIKLDK	ORF9 nuc	DR
DR_P10	YKHWPIAQFAPSAS	ORF9 nuc	DR	DR_P03	RWYFYLLGTGPEAGL	ORF9 nuc	DR
DR_P16	LSYYKLGASQRVAGD	ORF5 mem	DR	DR_P04	ASWFTALTOHGKEDL	ORF9 nuc	DR
DR_P20	INVFAFPFTIYSLLL	ORF10	DR	DR_P05	ASAFFGMSRIGMEVT	ORF9 nuc	DR
				DR_P07	LLLLDRLNQLESKMS	ORF9 nuc	DR
				DR_P15	FVYYSRVKLNLSRV	ORF4 env	DR
				DR_P17	IWNLDYIINLIKNL	ORF6	DR
				DR_P18	QEEVQELYSPIFLIV	ORF7	DR
				DR_P19	SKWYIRVGARKSAPL	ORF8	DR

Tabelle 2: SARS-CoV-2-spezifische und HCoV-/SARS-CoV-2-kreuzreaktive HLA-Klasse-I und HLA-DR restringierte T-Zell-Epitopmixe. Tabelle übernommen aus Nelde et al. 2021. ORF = Open reading frame

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
ETVITVDTKAAGKGGK	DR	FLNA_HUMAN	Homo sapiens

Tabelle 3: Peptide der HLA-gepaarten Negativkontrolle. Tabelle übernommen aus Nelde et al. 2021

2.1.6 Medien (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Auftaumedium:

500 ml IMDM

150 µl DNase

5 ml Penicillin/Streptomycin

T-Zell-Medium (TCM):

500 ml IMDM oder RPMI 1640 mit 5 ml L-Glutamin

50 ml AB Humanserum

5 ml Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium:

FCS 90 %

DMSO 10 %

2.1.7 ELISpot- Material (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

- Anti-human Interferon gamma (IFN- γ) monoclonal antibody (mAb) 1-D1K von Mabtech - Stockholm, Schweden
- MultiScreenHTS-HA, 0,45 µm, opak, steril von Merck - Darmstadt, Deutschland
- Anti-human Interferon gamma (IFN- γ) mAb 7-B6-1, biotinylated von Mabtech - Stockholm, Schweden
- 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/ Nitroblautetrazoliumchlorid (BCIP/ NBT) Tabletten von Sigma Aldrich- St.Louis, USA
- ExtrAvidin® Alkaline Phosphatase von Sigma Aldrich - St.Louis, USA

2.1.8 Software (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

- ImmunoSpotUV Image Acquisition software
- ImmunoSpot® Analysis software 5.1
- Microsoft 365
- GraphPad Prism 8

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Diese Studie wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Peter Lang in Zusammenarbeit mit Dr. med. Hanna Renk und Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Thomas Iftner konzipiert und durchgeführt. Sie fand im Rahmen einer nicht-interventionellen, prospektiven, nationalen, multizentrischen Beobachtungsstudie in Südwestdeutschland statt. Thema der Beobachtungsstudie war die serologische Antwort auf SARS-CoV-2 eines gesamten Haushalts bei Infektion eines oder mehrerer Haushaltsmitglieder. Die serologische Antwort wurde an zwei Zeitpunkten etwa 3-4 und 11-12 Monate nach Infektion untersucht. Entsprechende Daten wurden publiziert (Renk et al. 2022; Tönshoff et al. 2021).

Bei der Beobachtungsstudie wurden Haushalte untersucht, in denen sich mindestens ein Haushaltsmitglied im Frühjahr 2020 mit SARS-CoV-2 infiziert hatte. Eine Infektion galt als bestätigt, wenn sie durch eine Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen wurde. Weil die Kapazität der RT-PCR-Untersuchung im Frühjahr 2020 beschränkt war und bei Kindern kaum durchgeführt wurde, galt eine Infektion auch bei symptomatischer Erkrankung (Fieber, Husten, Diarrhoe, Dysgeusia) mit serologischem Nachweis einer Infektion als bestätigt. Es wurden Haushalte zur Teilnahme an den Kinderkliniken der Universitäten in Tübingen, Freiburg, Heidelberg und Ulm rekrutiert.

In der hier beschriebenen Substudie wurden Proben von Haushalten aus Tübingen auf die zelluläre Immunantwort gegenüber SARS-CoV-2 3-4 Monate nach SARS-CoV-2-Infektion mindestens eines Haushaltsmitglieds untersucht.

2.2.2 Rekrutierung (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Teilnehmer wurden durch Mitteilungen in nationalen und lokalen Zeitungen sowie auf sozialen Medien rekrutiert. Um an der Studie teilzunehmen, mussten die Probanden folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Bei mindestens einem Haushaltsmitglied wurde mit Hilfe einer RT-PCR-Untersuchung eine SARS-CoV-2-Infektion nachgewiesen

ODER

Bei mindestens einem Haushaltsmitglied wurde eine SARS-CoV-2-Infektion serologisch nachgewiesen und dieses Haushaltsmitglied hatte mindestens ein Symptom einer SARS-CoV-2-Infektion (Fieber, Husten, Diarrhoe, Dysgeusia)

- Mindestens ein Kind (1-18 Jahre) lebte zusammen mit Eltern/ Elternteil und anderen Erwachsenen (keine Altersbegrenzung) in einem Haushalt
- Haushalt in Baden-Württemberg
- Schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an der Studie

Es galten folgende Ausschlusskriterien:

- Schwere kongenitale Erkrankungen (beispielsweise infantile Zerebralparese, schwere kongenitale Malformationen)
- Kongenitale oder erworbene Immundefizienz
- Nicht-Verstehen der deutschen Sprache

Nach Bewerbung wurden die Teilnehmer zufällig ausgewählt und über Risiken und Nebenwirkungen einer Blutentnahme aufgeklärt. Die Teilnahme war freiwillig und konnte jederzeit abgebrochen werden. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikum Tübingen unter der Projektnummer 293/2020B02 genehmigt.

2.2.3 Probenakquise (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Die Teilnehmer wurden im Zeitraum zwischen dem 11. Juli und 1. August 2020, etwa 3-4 Monate nach Infektion, eingeladen und es wurden Blutproben entnommen.

Bei den Teilnehmern wurden Kinder und Jugendliche (<18 Jahre) von Erwachsenen (≥18 Jahre) unterschieden. Bei Erwachsenen und Kindern mit einem Körpergewicht über 30 kg wurde etwa 30 ml peripheres venöses Blut abgenommen. Bei Kindern zwischen 10-30 kg Körpergewicht wurden 20 ml Blut

abgenommen. Bei Kindern unter 10 kg Körpergewicht wurden 10 ml Blut abgenommen. Die Blutproben wurden pseudonymisiert und mit einem intern erstellten Studiencode beschriftet. In einem Fragebogen wurden Geschlecht, Alter der teilnehmenden Haushaltsmitglieder, Komorbiditäten, Medikamenteneinnahme, Impfungen, erfolgte Tests auf SARS-CoV-2 und COVID-19 und Symptome, sowie der Besuch von Arbeit, Schule oder Kindergarten erfasst. In dieser Substudie wurde mit den Daten zu Geschlecht und Alter gearbeitet. Alle erfassten Studiendaten wurden in der secuTrial Datenbank des Center for Pediatric Clinical Studies (CPCS) Tübingen gespeichert.

2.2.4 PBMC-Isolierung

2.2.4.1 Hintergrund PBMC-Isolierung

Für die Versuche wurden Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) verwendet, welche verschiedene Arten von Lymphozyten umfassen, wie T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, sowie Monozyten und dendritische Zellen. Zur Isolierung von PBMC wird eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dabei schichtet man das frisch gewonnene periphere Blut auf eine Ficoll-Hypaque-Lösung. Diese Lösung hat eine spezifische Dichte von 1,077 g/l, durch die sich die Blutbestandteile bei Zentrifugation in verschiedene Schichten aufteilen. Wegen ihrer hohen Dichte sammeln sich die Erythrozyten und Granulozyten am Boden, in der obersten Phase verbleiben Blutplasma und Thrombozyten. Dazwischen bildet sich ein weißlich-trüber Ring aus PBMC. Diese PBMC können mit Hilfe einer Stripette isoliert werden. Die Zellsuspension wird daraufhin mehrmals gewaschen, um andere Blutbestandteile zu entfernen.

2.2.4.2 Durchführung PBMC-Isolierung (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Die Proben wurden in ein 50 ml Falcon überführt. Vor der PBMC-Isolierung wurden die Proben im Falcon bei 1950 g für 7 min bei 21 °C zentrifugiert und je 1 ml Plasma abgenommen und in Cryovials eingefroren. Danach wurden die Proben-Röhrchen mit PBS ausgespült und zur jeweiligen Probe hinzugegeben.

Zur Dichtegradientenzentrifugation wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt und davon je 30 ml auf 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung in einem 50 ml Falcon aufgeschichtet. Das Falcon wurde 30 min bei 800 g, 21 °C ohne Bremse zentrifugiert, sodass sich ein Ring aus PBMC bildete. Der PBMC-Ring wurde mit Hilfe einer 5 ml- Stripette isoliert und in ein frisches 50 ml Falcon zum Waschen überführt. Dafür wurde das Falcon mit PBS bis auf 50 ml aufgefüllt und anschließend bei 500 g, 21 °C mit Bremse für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet erneut mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und resuspendiert. Daraufhin wurde das Falcon bei 400 g, 21 °C mit Bremse für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde mithilfe eines automatisierten Zellzählers bestimmt.

Im letzten Waschschrift wurde das Falcon bei 300 g, 21 °C mit Bremse für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in kaltem Einfriermedium (~4 °C) gelöst und auf eine Konzentration von 10^7 Zellen/ ml eingestellt. Die PBMC wurden auf zwei Cryovials verteilt und eingefroren. Dafür wurden die Cryovials zuerst in einer Einfrierhilfe auf -80°C gekühlt und am folgenden Tag in einen Stickstofftank überführt.

2.2.5 Auftauen (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Die Cryovials wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, bis noch ein kleiner Eiskern im Cryovial zu sehen war. Dann wurde kaltes Auftaumedium hinzugegeben, bis der Eiskern geschmolzen war. Der Inhalt des Cryovials wurde in 7 ml Auftaumedium überführt und das Cryovial mit 500 µl kaltem Auftaumedium nachgespült. Die Zellsuspension wurde dann bei 350 g, 4 °C mit Bremse für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 10 ml kaltem Auftaumedium resuspendiert. Für eine Zählprobe wurden 10 µl Zellsuspension entnommen und mit 10 µl Trypanblau vermischt in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Wenn im vorherigen Schritt mindestens $13,75 \cdot 10^6$ PBMC gezählt wurden, wurde das Pellet in T-Zell-Medium (TCM) gelöst und auf eine Konzentration von

10*10⁶ Zellen/ ml eingestellt. Pro Kulturansatz wurden 250 µl (2,5*10⁶ Zellen) in ein Well einer 48-Well-Kulturplatte gegeben. Es wurden vier Peptid-Stimulation- Wells mit 250 µl Zellsuspension und ein Kontroll-Well mit 375 µl Zellsuspension angesetzt. Standen weniger PBMC zur Verfügung, wurde je nach Zellzahl das Kontroll-Well mit nur 250 µl angesetzt, eine geringere Zellzahl von mindestens 1,5*10⁶ PBMC pro Well in einer 48-Well-Kulturplatte toleriert oder das Zellpellet in 500 µl TCM gelöst und in fünf Wells zu je 100 µl auf einer 96-Well-Kulturplatte ausplattiert. Waren zu wenige PBMC dafür vorhanden, wurde das Zellpellet in nur 300 µl gelöst und nur zwei Peptid-Stimulations-Wells und ein Kontroll-Well mit 100 µl Zellsuspension angesetzt. In diesem Fall wurden die beiden Epitopmixe der HLA-Klasse-I und HLA-DR gepoolt und für eine Peptidstimulation verwendet, sodass mit einem SARS-CoV-2-spezifischen und einem HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Epitopmix stimuliert wurde. Die ungenutzten Wells der Platten wurden mit PBS befüllt, um Verdunstung des Kulturmediums zu verhindern. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C im Inkubator leicht schräg gelagert.

2.2.6 Präsensitivierung und Epitopmixe (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Die PBMC wurden 12 Tage in-vitro stimuliert, um antigenspezifische T-Zellen zu expandieren und so eine höhere Sensitivität zu erreichen. Die PBMC wurden aufgetaut und am darauffolgenden Tag mit verschiedenen Epitopmixen stimuliert. Dafür wurden vier verschiedenen Epitopmixe verwendet (siehe Tabelle 2 im Materialenteil Abschnitt 2.1.5 Peptide):

SI **Spezifisch** für SARS-CoV-2:
HLA class I T-cell epitope composition,
bestehend aus 16 Einzelpeptiden

SII **Spezifisch** für SARS-CoV-2:
HLA DR T-cell epitope composition,
bestehend aus 5 Einzelpeptiden

CI

Kreuzreaktiv für HCoV - und SARS-CoV-2:
HLA class I T-cell epitope composition,
bestehend aus 9 Einzelpeptiden

CII

Kreuzreaktiv für HCoV - und SARS-CoV-2:
HLA DR T-cell epitope composition,
bestehend aus 10 Einzelpeptiden

Für das Kontroll-Well wurden HLA-gepaarte Peptide (siehe Tabelle 3 im Materialenteil Abschnitt 2.1.5 Peptide) verwendet.

2.2.7 Präsensitivierung und Zellkultur (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Die Epitopmixe wurden in 250 µl (48-Well-Platte) oder 100 µl (96-Well-Platte) TCM verdünnt und das TCM-Epitop-Gemisch wurde der Zellkultur zugegeben, sodass die Endkonzentration im Well bei HLA-I-Peptiden 1 µg/ml und bei HLA-DR-Peptiden und der HLA-Peptid-Negativkontrolle 5 µg/ml betrug (siehe Abbildung 1).

An Tag 2, 5, 7 und 9 wurde Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-7 (IL-7) verdünnt in TCM zur Zellkultur gegeben. Die Endkonzentration betrug 10 U/ml für IL-2 und 10 ng/ml für IL-7. Bei der Kultur in einer 48-Well-Platte wurde am 2. und 5. Tag 250 µl TCM mit IL-2 und IL-7 hinzugegeben. An Tag 7 und 9 wurde 250 µl des Kulturmediums oder 500 µl bei starker Gelbfärbung des Kulturmediums abgenommen und mit frischem TCM mit IL-2 und IL-7 ersetzt. Bei der Kultur in einer 96-Well-Platte wurde am 2. Tag 50 µl TCM mit IL-2 und IL-7 hinzugegeben. An Tag 5, 7 und 9 wurde abhängig davon, wie gelb sich das Kulturmedium gefärbt hatte, 50 µl oder 100 µl des Kulturmediums abgenommen und mit neuem TCM mit IL-2 und IL-7 ersetzt.

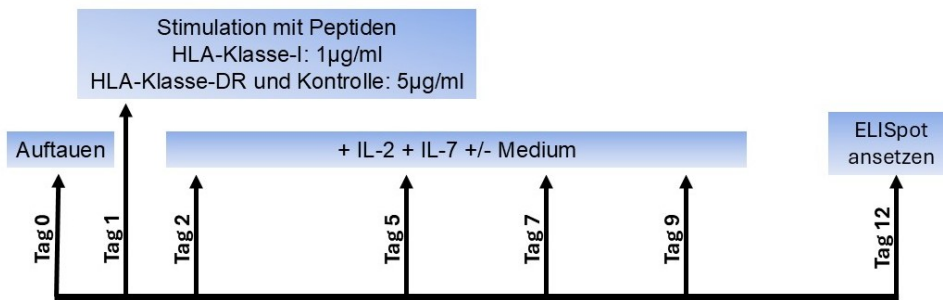


Abbildung 1: Schema der in vitro Präsensitivierung. Peptide siehe Materialenteil, Abschnitt 2.1.5 Peptide, Tabelle 2; IL-2 = Interleukin 2; IL-7= Interleukin 7; Medium = T-Zell-Medium (siehe Materialenteil, Abschnitt 2.1.6 Medien), Konzentrationen geben die Endkonzentrationen im Well an

2.2.8 IFN γ -ELISpot-Assay

2.2.8.1 Hintergrund Enzyme linked immuno spot assay (ELISpot-Assay)

Mit Hilfe des ELISpot-Assays lässt sich die Cytokinsekretion von aktivierten T-Zellen indirekt nachweisen (siehe Abbildung 2). Antigenspezifische T-Zellen können durch Stimulation mit dem entsprechenden Epitop aktiviert werden. Aktivierte T-Zellen sezernieren das Zytokin Interferon- γ (IFN γ), das in der ELISpot-Platte von membrangebundenen IFN γ -Antikörpern (1-D1K-Antikörper) gebunden und fixiert wird. Das fixierte IFN γ wird wiederum von einem zweiten IFN γ -spezifischen Antikörper (7-B6-1-Antikörper) gebunden. Dieser Zweitantikörper ist mit Biotin markiert, sodass an diesen markierten Stellen das Enzymkonjugat ExtrAvidin®-Alkalinphosphatase binden kann. Gibt man das Enzymsubstrat (BCIP/NBT) hinzu, katalysiert das Enzym eine Farbreaktion und führt zur Bildung eines sichtbaren Farbpunktes (Spot). Somit wird an den Stellen der Zellkultur, an denen eine T-Zelle IFN γ sezerniert hat, ein Spot sichtbar. Diese Spots können automatisiert ausgezählt werden.

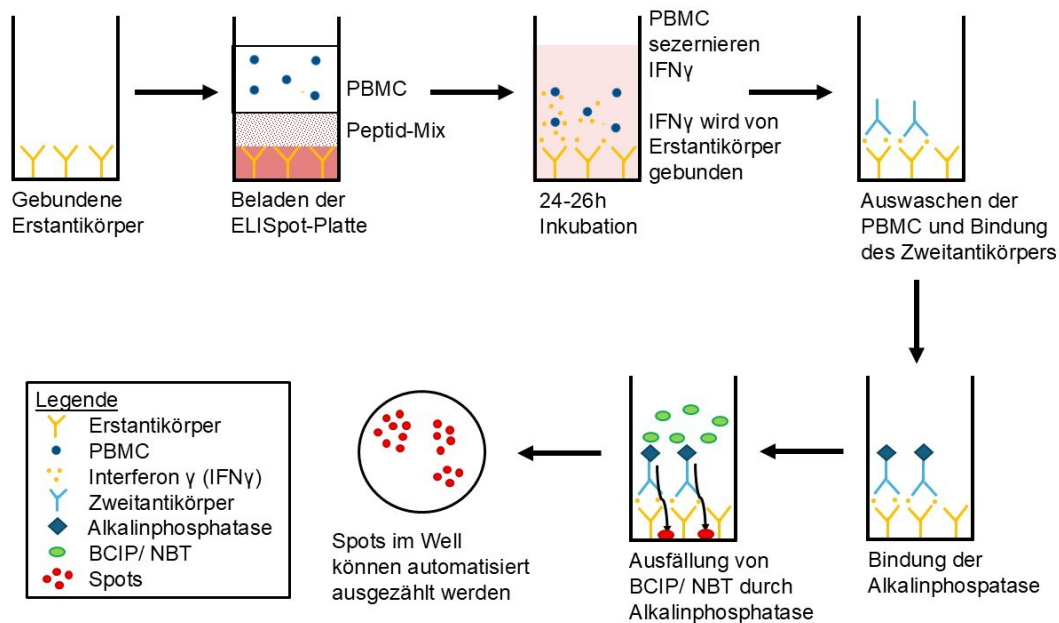


Abbildung 2: Schema des ELISpot-Assays. PBMC = Peripheral blood mononuclear cells; IFN γ = Interferon- γ ; BCIP = 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat; NBT = Nitroblautetrazoliumchlorid

2.2.8.2 Durchführung ELISpot-Assay (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Die ELISpot-Platten wurden mindestens einen Tag vor dem Assay mit dem Erstantikörper Anti-human IFN γ mAb 1-D1K beschichtet. Dafür wurde der Antikörper mit einer Zielkonzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ in PBS verdünnt und jeweils 100 μl pro Well blasenfrei pipettiert. Die Platte wurde in Klarsichtfolie eingewickelt, um ein Austrocknen zu verhindern, und bei 4 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Am Tag des Assays wurde die Platte steril abgeflackt und zweimal mit 200 μl PBS pro Well steril gewaschen. Pro Well wurden 50 μl TCM zugegeben und mindestens 1 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen.

Die PBMC wurden nach der 12-tägigen Präsensitivierung in den Kulturplatten gründlich resuspendiert, um die Zellen von der Kulturplatte zu lösen. Die einzelnen Zell-Suspensionen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube oder ein 15 ml Falcon überführt. Für eine Zählprobe wurden 10 μl Zellsuspension

entnommen, mit 10 µl Trypanblau vermischt und in einer Neubauer-Zahlkammer gezählt. Die Zell-Suspensionen wurden dann bei 350 g, 21 °C mit Bremse für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Wenn möglich wurden pro Epitopmix-Stimulation mindestens drei Wells (Triplikate) angesetzt. Für die Kontrollen wurden jeweils zwei Wells für die Positivkontrolle, zwei Wells für die DMSO-Negativkontrolle und zwei Wells für die HLA-Peptid-Negativkontrolle angestrebt. Die Epitopmixe wurden in 50 µl TCM verdünnt, sodass bei HLA-I-Peptiden die Endkonzentration im Well 1 µg/ml und bei HLA-DR-Peptiden 5 µg/ml betrug. Für die Positivkontrolle (PK) wurde Phytohämagglutinin-L (PHA-L) mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml verwendet. Die DMSO-Negativkontrolle (NKI) wurde mit DMSO in einer Endkonzentration von 1 µg/ml, die HLA-Peptid-Negativkontrolle (NKII) mit Endkonzentration 5 µg/ml durchgeführt.

Aufgrund von Lieferengpässen während der COVID-19-Pandemie wurde bei einzelnen Proben als Positivkontrolle Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) mit einer Endkonzentration im Well von 10 µg/ml oder Phorbol-12-myristate 13-acetat + Ionomycin (PMA+Iono) mit einer Endkonzentration von 50 ng/ml (PMA) und 0,71 µg/ml (Iono) verwendet.

Pro Well wurden 200.000- 500.000 Zellen ausplattiert. Diese Zellzahl zeigte in Kontroll-Titrationsen einen verlässlichen Nachweis einer T-Zell-Antwort. Entsprechend wurden die Zellen in warmem TCM auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und je 100 µl pro Well in die ELISpot Platte pipettiert. Die Platte wurde daraufhin 24-26 h bei 37 °C möglichst erschütterungsfrei gelagert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Platten im Waschbecken abgeflickt und jedes Well einmal mit 200 µl PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen, um verbliebene PBMC durch Disruption der Biomembran zu hämolysieren. Zum Entfernen von PBMC-Rückständen wurde die Platte wiederum zweimal mit destilliertem Wasser und dreimal mit 200 µl PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen. Daraufhin wurde der Zweitantikörper 7-B6-1 gegen humanes IFN-γ in PBS + 0,5 % Bovinem Serumalbumin (BSA) 1:3000 (Stockkonzentration: 1 mg/ml)

verdünnt und davon je 100 µl pro Well hinzugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Folgend wurde die Platte sechs Mal mit 200 µl PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen und anschließend je 100 µl pro Well ExtrAvidin® Alkalinphosphatase 1:1000 verdünnt in PBS + 0,5 % BSA hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. 20 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurde eine Tablette BCIP/ NBT in 10 ml destilliertem Wasser gelöst und im Dunkeln aufbewahrt. Im letzten Waschgang wurde die Platte dreimal mit 200 µl PBS + 0,05 % Tween 20 und dreimal mit 200 µl destilliertem Wasser pro Well gewaschen. Danach wurden pro Well 50 µl der BCIP/NBP-Lösung auf die Platte pipettiert und die Platte 7 Minuten im Dunkeln inkubiert. Um die Enzym-Substrat-Reaktion zu beenden, wurde die Platte unter laufendem Wasser ausgewaschen. Der Plastikrücken wurde entfernt und die Platte wurde lichtgeschützt zum Trocknen aufbewahrt.

2.2.9 Auslesen und Qualitätskontrolle (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Die ELISpot-Platten wurden im ImmunoSpot Series 6 Ultra-V Analyzer ELISpot Reader von C.T.L. gescannt und der Spotcount mit Hilfe der ImmunoSpot® Analysis Software 5.1 bestimmt. Es wurde eine softwaregestützte und eine manuelle Qualitätskontrolle durchgeführt, um eventuelle Falschzählungen oder Clusterspots auszugleichen. Folgende Parameter wurden angewandt:

Verstärkung (Gain)	1.797
Zeit	100-110 ms
Sensitivität	120-150
Hintergrund-Balance	70-100
Minimale Spot-Größe	0,0025 mm ²
Maximale Spot-Größe	9,6296 mm ²
Zählbereich (normalisierte Zählung)	95 %
Spot-Separation	1

Tabelle 4: Parameter beim Auslesen der ELISpot-Platten.

2.2.10 Statistische Analyse (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

Angelehnt an Nelde et al. wurde der Mean Spot Count (MSC) bestimmt, indem der Mittelwert der Spotcounts der Replikate einer Peptidstimulation berechnet und anschließend auf eine Zellzahl von 500.000 normalisiert wurde (Nelde et al. 2021).

$$\text{Mean Spot Count} = \text{Mittelwert (Spotcount Well 1, 2, \dots)} * \frac{500.000}{\text{Zellzahl im Well}}$$

Proben wurden als auswertbar eingestuft, wenn der Mean Spot Count der Positivkontrolle mindestens 100 betrug.

Weiterhin wurde die Intensität (I) durch Subtraktion des Mean Spot Counts der zur Peptid-Stimulation gehörigen Negativkontrolle vom Mean Spot Count der Peptid-Stimulation berechnet.

$$\text{Intensität (I)} = \text{Mean Spot Count (SI v CI)} - \text{Mean Spot Count (NKI)}$$

$$\text{Intensität (I)} = \text{Mean Spot Count (SII v CII)} - \text{Mean Spot Count (NKII)}$$

Bei manchen Proben war nicht genug Zellmaterial vorhanden, um eine DMSO-Negativkontrolle (NKI) anzufertigen. In diesem Fall wurde der Mean Spot Count der HLA-Peptid-Negativkontrolle (NKII) verwendet.

Eine Stimulation wurde als positiv gewertet, wenn die Intensität größer als 10 war und der Mean Spot Count der Peptidstimulation mehr als das Dreifache des Mean Spot Count der zugehörigen Negativkontrolle betrug.

$$\text{Positiv: } \text{Intensität} > 10 \quad \text{UND} \quad \text{MSC} > (3 * \text{MSC}(\text{NK}))$$

War mindestens eine der Stimulationen mit den Epitopmischen SI oder SII positiv, wurde die SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort als positiv gewertet. Ebenso wurde die HCoV-/ SARS-CoV-2-kreuzreaktive T-Zell-Antwort als positiv gewertet, wenn mindestens eine der Stimulationen mit den Epitopmischen CI oder CII positiv war.

Die statistische Analyse und grafische Darstellung erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft 365) und GraphPad Prism 9.5.1. Für nicht parametrische Daten wurde

der zweiseitige Fisher's exact test verwendet. Die Intensität wurde im zweiseitige Mann-Whitney-Test für ungepaarte Variablen analysiert.

2.2.11 Serologie

Die serologische Immunantwort auf SARS-CoV-2 wurde im Rahmen der Hauptstudie erhoben (Renk et al. 2022). Die Daten wurden für diese Substudie zum Vergleich der zellulären und humoralen Immunantwort zur Verfügung gestellt.

Zur Erhebung der serologischen Immunantwort wurde der MultiCoV-Ab-Assay (Becker et al. 2021) verwendet. Mit Hilfe dieses Multiplex-Immunoassays wurden die Serumproben der Probanden auf Immunglobulin G (IgG) gegen folgende SARS-CoV-2- und HCoV-Antigene gescreent:

SARS-CoV-2 spezifisch

- trimeric full-length spike protein (Spike Trimer)
- receptor-binding domain (RBD)
- S1 domain (S1)
- S2 domain (S2)
- full-length nucleocapsid (N)
- N-terminal domain of nucleocapsid (N-NTD)

α -HCoVs (NL63 and 229E) und β -HCoVs (OC43 and HKU1)

- S1 domain (S1)
- full-length nucleocapsid (N)
- N-terminal domain of nucleocapsid (N-NTD)

Durch die breite Antigenabdeckung ist dieser Test sensitiver und spezifischer als kommerziell verfügbare Tests (Sensitivität 88,3 % und Spezifität 100 %) und kann somit präzise eine Infektion mit SARS-CoV-2 oder anderen HCoV nachweisen (Becker et al. 2021; Renk et al. 2022).

2.2.12 Analyisierte Daten (Dulovic et al. 2025; Müller JS 2025)

In Tübingen nahmen 117 Haushalte mit insgesamt 480 Probanden an der Beobachtungsstudie zur serologischen Immunität nach SARS-CoV-2-Infektion teil (s. Abbildung 3). Von diesen 117 Haushalten wurden 68 Haushalte mit insgesamt 286 Mitgliedern in die Untersuchung der zellulären Immunität mittels ELISpot eingeschlossen. Bei 39 Probanden konnten nicht ausreichend PBMCs isoliert werden, sodass keine Auswertung möglich war. Dabei handelte es sich meist um Proben von Kindern (1-17 Jahre), bei denen eine kleinere Menge Blut zur Verfügung stand. Es erfolgte die statistische Analyse der Daten zur zellulären Immunität von 247 Proben. Zudem wurde eine vergleichende statistische Analyse zwischen zellulärer und serologischer Immunität an 240 Proben durchgeführt.

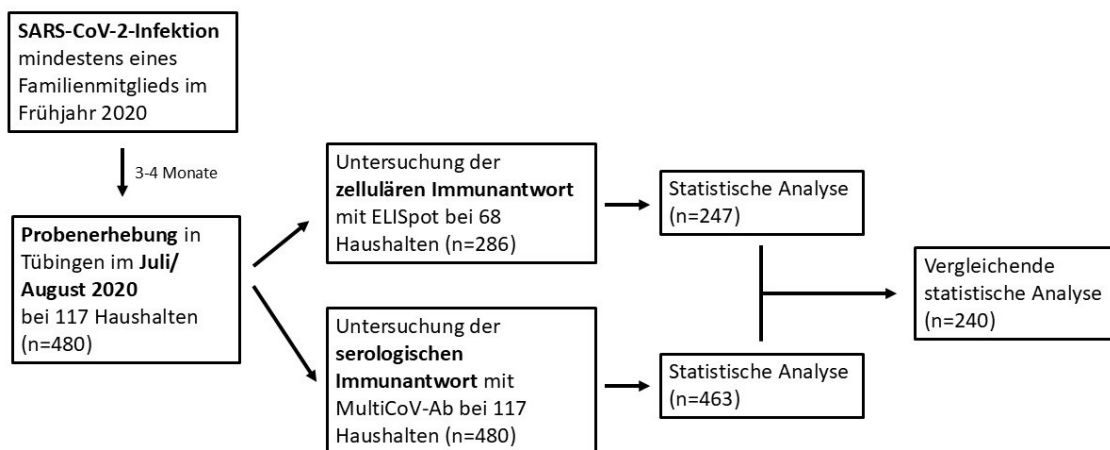


Abbildung 3: Flowchart Datenanalyse.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 247 Proben mittels IFN γ -ELISpot-Assay untersucht. Die Proben wurden in vitro mit insgesamt vier verschiedenen Peptidmischen stimuliert, deren einzelne Peptide als verifizierte T-Zell-Epitope fungieren. Zwei Peptidmische sind spezifisch für SARS-CoV-2, zwei weitere Peptidmische sind kreuzreaktiv zwischen anderen HCoV (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1) und SARS-CoV-2. Jeweils ein Mix der spezifischen und kreuzreaktiven Peptidmische ist auf HLA-Klasse-I-Peptiden und ein zweiter Mix ist auf HLA-DR-Peptide restringiert (s. Abbildung 4). Wenn es genügend Zellmaterial gab, wurde pro Probe und Peptidstimulation drei ELISpot-Wells (Triplikate) befüllt. Zudem wurde für die Stimulationen mit HLA-Klasse-I- und HLA-DR-Peptiden jeweils eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle angelegt.

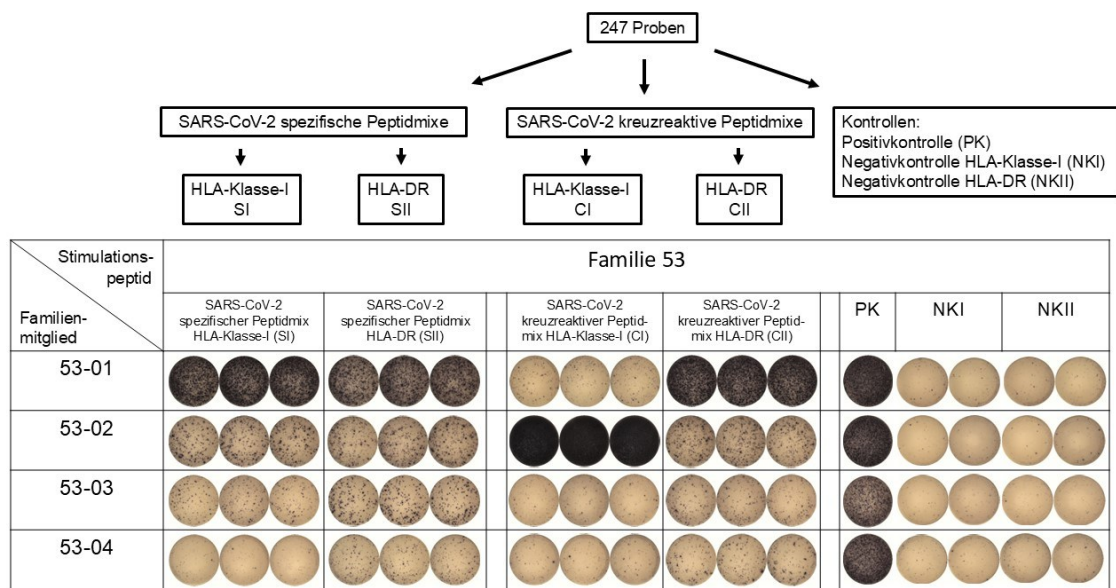


Abbildung 4: Stimulationsschema und Beispiel-IFN γ -ELISpot-Assay. Hier beispielhaft die Ergebnisse der Familie 53 mit insgesamt vier Mitgliedern. Pro Mitglied wurden Triplikate nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen und HCoV-/ SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmischen der HLA-Klasse-I (SI/ CI) und HLA-DR (SII/ CII) angelegt. Im rechten Teil der Abbildung sind die Positivkontrolle (PK) und Duplikate für die Negativkontrollen der HLA-Klasse-I (NKI) und HLA-DR (NKII) zu sehen.

Weil alle verwendeten Peptide als verifizierte T-Zell-Epitope fungieren, wird im Folgenden bei einer positiven Stimulation im ELISpot-Assay von einer vorhandenen T-Zell-Antwort gesprochen. War mindestens eine Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen-Peptidmischen der HLA-Klasse-I (SI) oder HLA-DR (SII) positiv, dann wurde dies als positive SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort gewertet. Ebenso wurde bei mindestens einer positiven Stimulation mit einem SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmix der HLA-Klasse-I (CI) oder HLA-DR (CII) die SARS-CoV-2-kreuzreaktive T-Zell-Antwort als positiv gewertet.

3.1 Zelluläre Immunantwort nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen

In 76,5% ($n = 189$) aller untersuchten Proben war nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen eine zelluläre IFN γ -Produktion messbar (s. Tabelle 5 und Abbildung 5). Es erfolgte die Einteilung in zwei Gruppen anhand des Alters: „Erwachsene“ (E) mit einem Alter von 18 bis 69 Jahren ($n = 150$) und „Kinder/ Jugendliche“ (K/J) mit einem Alter von 1 bis 17 Jahren ($n = 97$). Bei Erwachsenen war signifikant häufiger eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort nachweisbar als bei Kindern und Jugendlichen (s. Abbildung 5A, Erwachsene $n = 134$ (89,3%) positiv; Kinder/ Jugendliche $n = 55$ (56,7%) positiv; zweiseitiger Fisher's exact test ****, $p \leq 0,0001$).

Die SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort richtete sich bei 143 von 189 positiven Proben (75,7%) sowohl gegen den SI-Peptidmix als auch gegen den SII-Peptidmix (s. Abbildung 5B). Zwischen Erwachsenen und Kindern/ Jugendlichen zeigte sich in dieser Hinsicht kein signifikanter Unterschied (SI und SII positiv: E 77,6%; K/J 70,9%; zweiseitiger Fisher's exact test $p > 0,05$). Auch bei der Erkennungsrate des SI-Peptidmix zeigte sich kein Unterschied zwischen Erwachsenen und Kindern/ Jugendlichen (SI positiv: E 80,6%; K/J 85,5%; zweiseitiger Fisher's exact test $p > 0,05$). Jedoch war bei Erwachsenen signifikant häufiger eine Antwort auf den SII-Peptidmix nachweisbar als bei Kindern/ Jugendlichen (s. Abbildung 5B, SII positiv: E 97,0%; K/J 85,5%; zweiseitiger Fisher's exact test **, $p = 0,0061$).

Die Daten zur humoralen Immunantwort (s. Tabelle 5) wurden durch die Arbeitsgruppe Renk der Kinderinfektiologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Tübingen erhoben und wurden freundlicherweise zum Vergleich der humoralen mit der zellulären Immunantwort zur Verfügung gestellt.

	Gesamt <i>n (%)</i>	Erwachsene <i>n (%)</i>	Kinder/ Jugendliche <i>n (%)</i>
Anzahl Probanden	247 (100)	150 (100)	97 (100)
Alter (Jahre)			
Bereich	1-69	18-69	1-17
Median	35	44	10
Geschlecht			
Weiblich	123 (49,8)	75 (50,0)	48 (49,5)
Männlich	122 (49,4)	73 (48,7)	49 (50,5)
Keine Daten	2 (0,8)	2 (1,3)	-
Nachweisbare SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort (<i>n (%)</i>)			
SI und/ oder SII			
Positiv	189 (76,5)	134 (89,3)	55 (56,7)
Negativ	58 (23,5)	16 (10,7)	42 (43,3)
Positive Stimulationen bei Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellantwort (<i>n (%)</i> der Proben mit nachweisbarer SARS-CoV-2-spezifischer T-Zellantwort)			
SI und SII			
Positiv	143 (75,7)	104 (77,6)	39 (70,9)
SI			
Positiv	155 (82,0)	108 (80,6)	47 (85,5)
Negativ	34 (18,0)	26 (19,4)	8 (14,5)
SII			
Positiv	177 (93,7)	130 (97,0)	47 (85,5)
Negativ	12 (6,3)	4 (3,0)	8 (14,5)

Humorale Immunantwort auf SARS-CoV-2 (n (%))			
Positiv	123 (51,5)	95 (65,5)	28 (29,8)
Negativ	116 (48,5)	50 (34,5)	66 (70,2)
Keine Daten	8	5	3
Anzahl an Familien	67		
Datum der Probenentnahme	11. Juli bis 1. August 2020		

Tabelle 5: Zusammenfassung der analysierten Spenderdaten zur SARS-CoV-2-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort. Proben wurden anhand des Alters der Gruppe „Erwachsene“ (18-69 Jahre) und „Kinder/Jugendliche“ (1-17 Jahre) zugeordnet. Die T-Zell-Antwort wurde mit ELISpot-Assay nach in vitro-Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen jeweils restringiert zu HLA-Klasse-I (SI) und HLA-DR (SII) erhoben. Humorale Immunantwort ermittelt durch MultiCoV-Ab IgG-Assay.

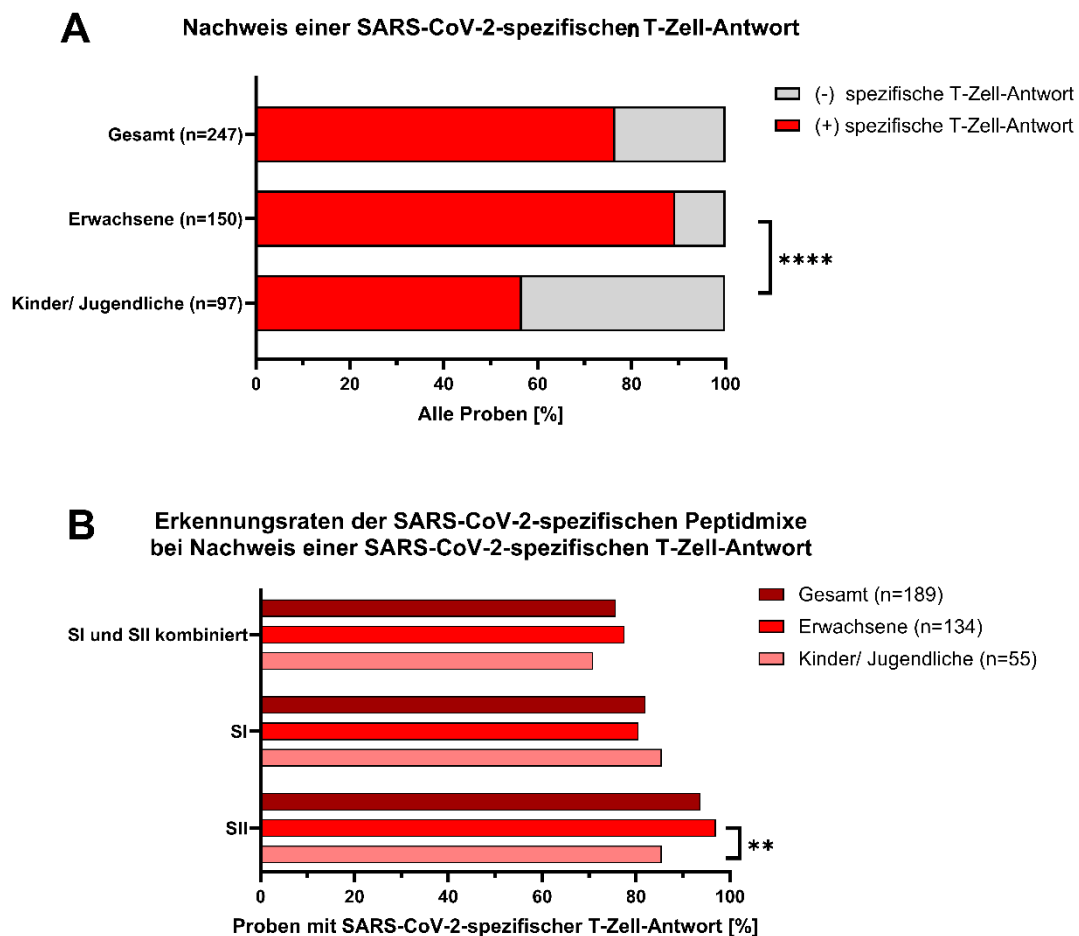


Abbildung 5: Prozentuale Verteilung der als positiv und negativ gewerteten Probanden nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen. (A) Prozentuale Verteilung der als positiv (+) und negativ (-) gewerteten Probanden in der Gesamtkohorte. Unterteilung in „Gesamt“ (alle untersuchten Probanden), „Erwachsene“ (Alter der Probanden 18-69 Jahre) und „Kinder/ Jugendliche“ (Alter der Probanden 1-17 Jahre). Gezeigt wird jeweils die Fraktion von allen 247 getesteten Proben. **** $p \leq 0.0001$ im zweiseitigen Fisher's exact test. (B) Prozentuale Verteilung der positiven Stimulationen mit Peptidmix SI, SII oder kombiniert positiver Stimulation (SI und SII) innerhalb der Proben mit nachgewiesener SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort aufgeteilt für die verschiedenen Altersgruppen (Gesamt $n = 189$, Erwachsene $n = 134$, Kinder/ Jugendliche $n = 55$). ** $p = 0,0061$ im zweiseitigen Fisher's exact test.

3.2 Zelluläre und serologische SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort im Vergleich

Folgend wurden Daten von insgesamt 239 Probanden analysiert, bei denen sowohl Informationen zur T-Zell-Antwort als auch zur Antikörper-Antwort vorlagen (Dulovic et al. 2025). Von diesen Probanden wiesen 182 (76,2%) eine messbare SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort auf. Innerhalb dieser Gruppe konnte bei 120 Probanden (65,9%) zusätzlich eine Serokonversion mit SARS-CoV-2-spezifischer Antikörper-Antwort im MultiCoV-Ab IgG-Assay festgestellt werden. Diese Untergruppe wird im weiteren Verlauf als Gruppe „B- und T-Zell-Antwort“ bezeichnet. Bei den verbleibenden 62 Probanden (34,1%) mit SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort konnte hingegen keine zusätzliche Antikörper-Antwort nachgewiesen werden. Diese Probanden werden in der weiteren Analyse der Gruppe „nur T-Zell-Antwort“ zugeordnet.

Bei 57 Probanden (23,8%) war keine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort nachweisbar, allerdings wurde bei 3 Probanden (5,26%) eine isolierte SARS-CoV-2-spezifische Antikörper-Antwort festgestellt. Diese Probanden bilden die Gruppe „nur B-Zell-Antwort“. Es ist anzumerken, dass alle 3 Proben in dieser Gruppe ausschließlich von Kindern und Jugendlichen stammten. Der Großteil der Probanden ohne SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort (54 Probanden (94,7%)) zeigte keine SARS-CoV-2-spezifische Antikörper-Produktion und wird im weiteren Verlauf als Gruppe „keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort“ benannt. Eine Übersicht über die Gruppen der B- und T-Zell-Antwort zeigt Abbildung 6.

Es fällt auf, dass Kinder und Jugendliche oft keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort zeigten, denn von 54 Proben ohne SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort stammten 38 Proben von Kindern/ Jugendlichen (s. Abbildung 7). Dem gegenüber steht, dass 95 von 120 Proben mit B- und T-Zell-Antwort von Erwachsenen stammten.

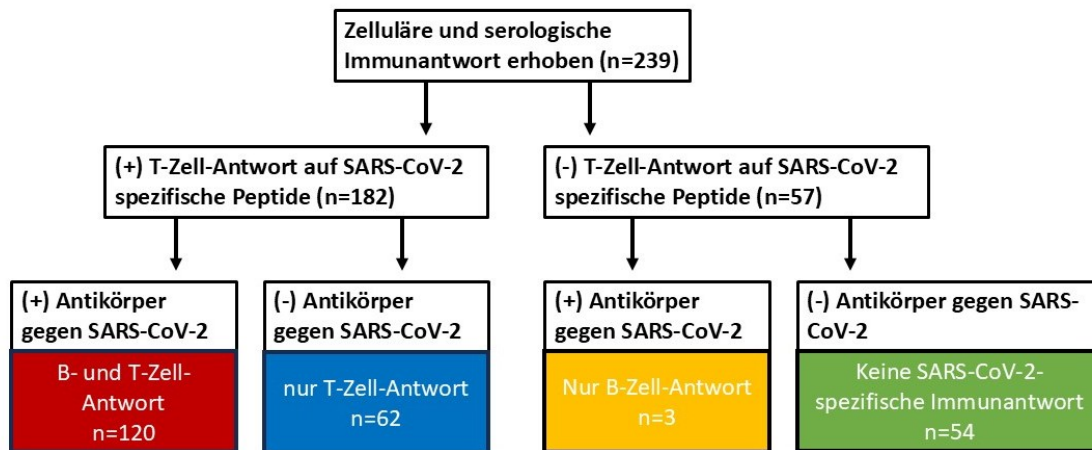


Abbildung 6: Einteilung in Gruppen anhand der SARS-CoV-2-spezifischen B- und T-Zell-Antwort. (+) = im Test positiv; (-) = im Test negativ; Einteilung nach SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort (Nachweis reaktiver T-Zellen nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen im ELISpot-IFN γ -Assay) und SARS-CoV-2-spezifischer B-Zell-Antwort (Nachweis von Antikörpern gegen SARS-CoV-2 mittels MultiCoV-Ab IgG-Assay).

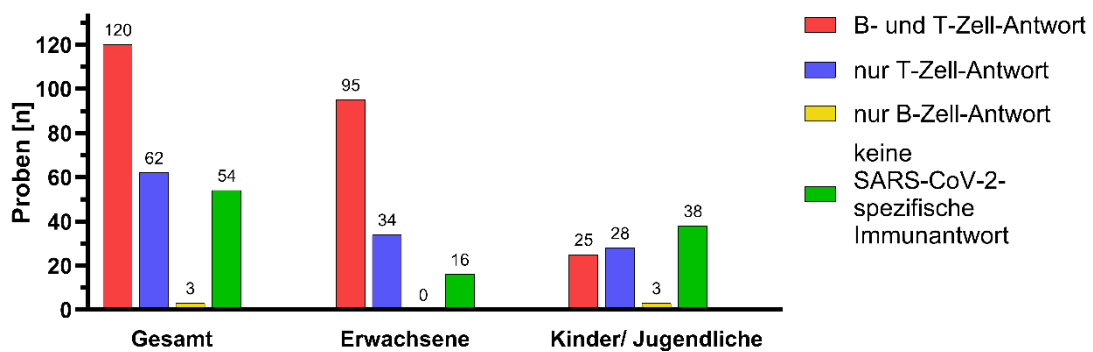


Abbildung 7: SARS-CoV-2-spezifische B- und T-Zell-Antwort eingeteilt nach Alter. Absolute Anzahl der Proben. Gesamt (Alter 1-69 Jahre) $n = 239$, Erwachsene (Alter 19-69 Jahre) $n = 145$, Kinder/ Jugendliche (1-17 Jahre) $n = 94$

Betrachtet man dies in Relation zu der Gruppengröße wird ersichtlich, dass bei Kindern und Jugendlichen insgesamt seltener eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort messbar war (s. Abbildung 8A; Gruppe „nur T-Zell-Antwort“ und „B- und T-Zell-Antwort“ addiert: E 89,0% aller Proben; K/J 56,4% aller Proben) (Dulovic et al. 2025). Wenn Kinder und Jugendlichen eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort zeigten, ist die Wahrscheinlichkeit einer zusätzlichen Serokonversion geringer als bei Erwachsenen (s. Abbildung 8B, „nur T-Zell-Antwort“ im Verhältnis zu Proben mit SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort K/J: 52,8%; E: 26,4%, zweiseitiger Fisher's exact test $***$, $p = 0,001$) (Dulovic et al. 2025).

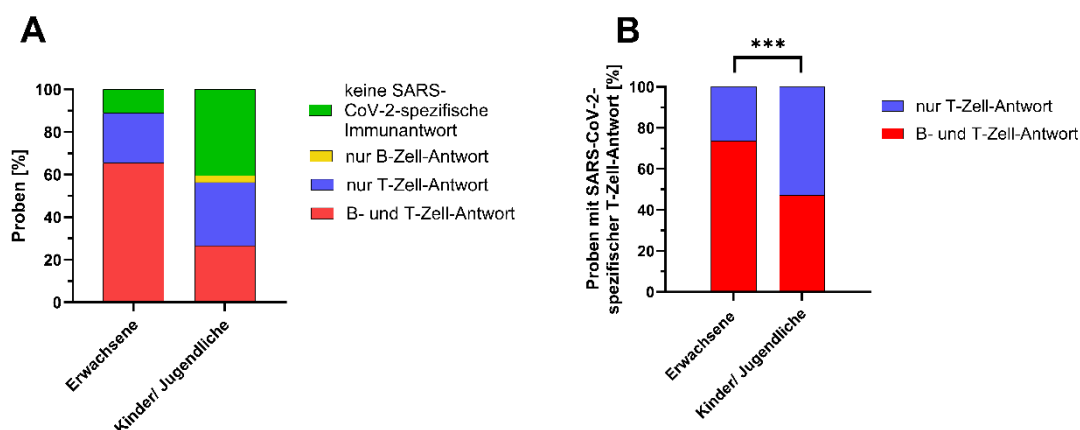
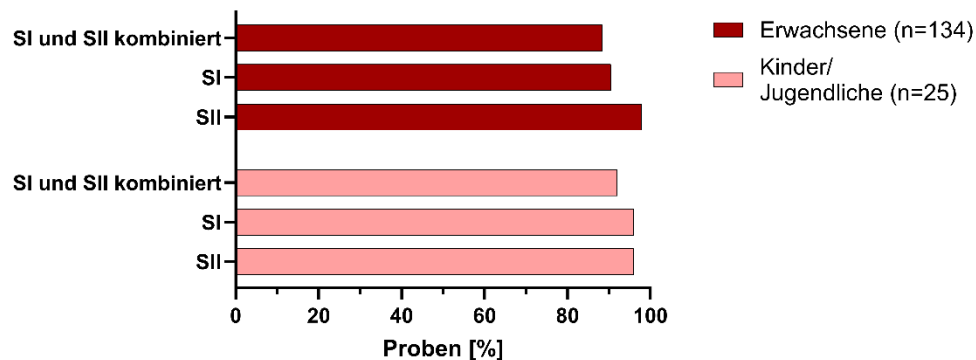


Abbildung 8: Prozentualer Anteil der SARS-CoV-2-spezifischen B- und T-Zell-Antwort bei Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen. (A) Anteil an allen ausgewerteten Proben: Erwachsene (Alter 18-69 Jahre) $n = 145$, Kinder/ Jugendliche (1-17 Jahre) $n = 94$. (B) Vergleich der Serokonversionrate bei positiver SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort bei Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen. Erwachsene $n = 129$; Kinder/ Jugendliche $n = 53$; $*** p = 0,001$ im zweiseitigen Fisher's exact test.

In den Gruppen mit SARS-CoV-2-spezifischer B- und T-Zell-Antwort wurden die unterschiedlichen SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmixe bei Erwachsenen und Kindern/ Jugendlichen mit ähnlich hohen Frequenzen erkannt (s. Abbildung 9A; E: SII 97,9%, SI 90,5%, SI und SII kombiniert 88,4%; K/J: SII 96,0%, SI 96,0%, SI und SII kombiniert 92,0%). Lag nur eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort vor, richtete sich diese bei Erwachsenen in 94,1% der Fälle gegen SII, bei Kindern und Jugendlichen jedoch nur in 75,0% der Fälle (siehe Abbildung 9B). Gegenüber SI reagierten Erwachsene jedoch seltener als Kinder und Jugendliche mit einer T-Zell-Antwort (SI: E 50%; K/J 75%). Die Erkennungsraten unterschieden sich zwischen Erwachsenen und Kindern/ Jugendlichen im zweiseitigen Fisher's exact test jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

A Erkennungsraten der SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmixe bei kombinierter B- und T-Zell-Antwort



B Erkennungsraten der SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmixe bei alleiniger T-Zell-Antwort

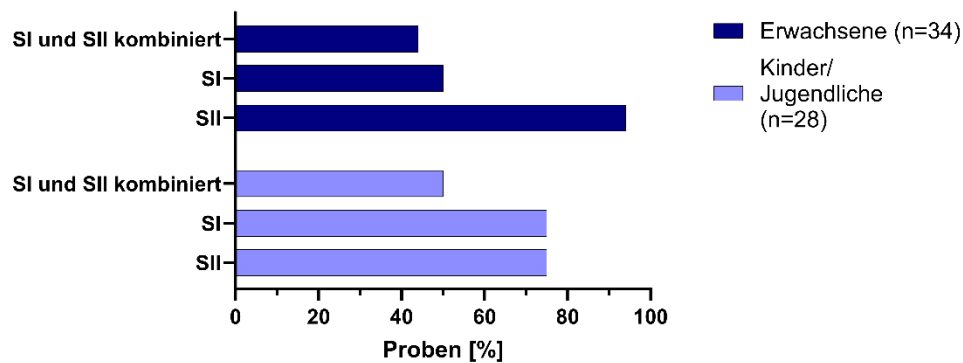


Abbildung 9: Erkennungsraten der SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmixe.

(A) Erkennungsraten der SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmixe SI, SII oder SI und SII kombiniert bei Probanden mit SARS-CoV-2-spezifischer B- und T-Zell-Antwort. Anteil an der jeweiligen Gruppengröße, Erwachsene $n = 134$, Kinder/ Jugendliche $n = 25$. (B) Erkennungsraten der SARS-CoV-2- spezifischen Peptidmixe SI, SII oder SI und SII kombiniert bei Probanden mit alleiniger SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort. Anteil an der jeweiligen Gruppengröße, Erwachsene $n = 34$, Kinder/ Jugendliche $n = 28$.

3.3 Intensität der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort

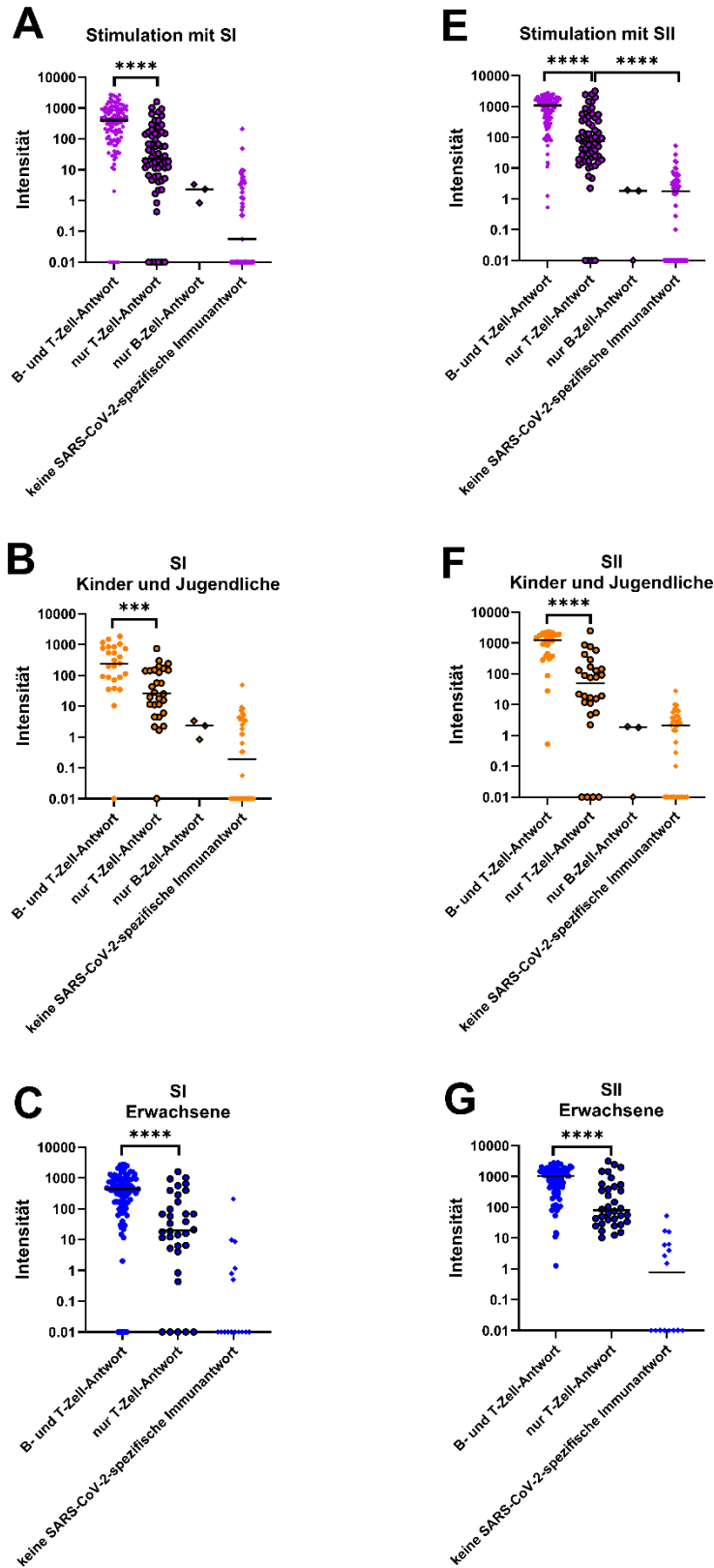
Um die Intensität der T-Zell-Antwort zu quantifizieren, wurde der Mittelwert der Spot Counts einer Peptid-Stimulation auf 500.000 Zellen normalisiert und dadurch der Mean Spot Count berechnet. Folgend wurde der Mean Spot Count der zur Peptid-Stimulation gehörenden Negativkontrolle von dem Mean Spot Count der Peptid-Stimulation subtrahiert, wie im Methodenteil im Abschnitt 2.2.10 Statistische Analyse beschrieben wird.

Die Intensität der Reaktion nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischungen erreichte ihre höchste Ausprägung bei kombinierter B- und T-Zell-Antwort. Dies zeigte sich in der medianen Intensität von 406,2 für den SI-Peptidmix und 1067,0 für den SII-Peptidmix (s. Abbildung 10A+E). Im Vergleich dazu betrug die mediane Intensität bei alleiniger T-Zell-Antwort 23,14 (SI) und 75,46 (SII). Die Intensitäten sowohl für SI als auch für SII unterschieden sich signifikant im zweiseitigen Mann-Whitney-Test in den Gruppen „B- und T-Zell-Antwort“ und „nur T-Zell-Antwort“ (**** $p \leq 0,0001$) und ebenfalls zwischen den Gruppen „nur T-Zell-Antwort“ und „keine SARS-CoV-2 spezifische Immunantwort“ (**** $p \leq 0,0001$) (Dulovic et al. 2025).

Dieser Unterschied zeigte sich sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern/Jugendlichen (s. Abbildung 10B, C, F, G) (Dulovic et al. 2025). Die medianen Intensitäten nach Stimulation mit SII-Peptidmix zeigten sich generell höher als beim SI-Peptidmix.

Zwischen den verschiedenen Altersgruppen bestand bezüglich der Intensität der T-Zell-Antwort auf den SI-Peptidmix kein signifikanter Unterschied, wie durch den zweiseitigen Mann-Whitney-Test (s. Abbildung 10D) bestätigt wurde ($p > 0,05$) (Dulovic et al. 2025). Jedoch fällt auf, dass in der Untergruppe "nur T-Zell-Antwort" bei Kindern und Jugendlichen eine signifikant geringere Intensität gegenüber dem SII-Peptidmix im Vergleich zu Erwachsenen gemessen wurde (s. Abbildung 10H; zweiseitiger Mann-Whitney-Test; * $p = 0,0467$; Median K/J = 49,13; E = 79,99).

Intensität nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen



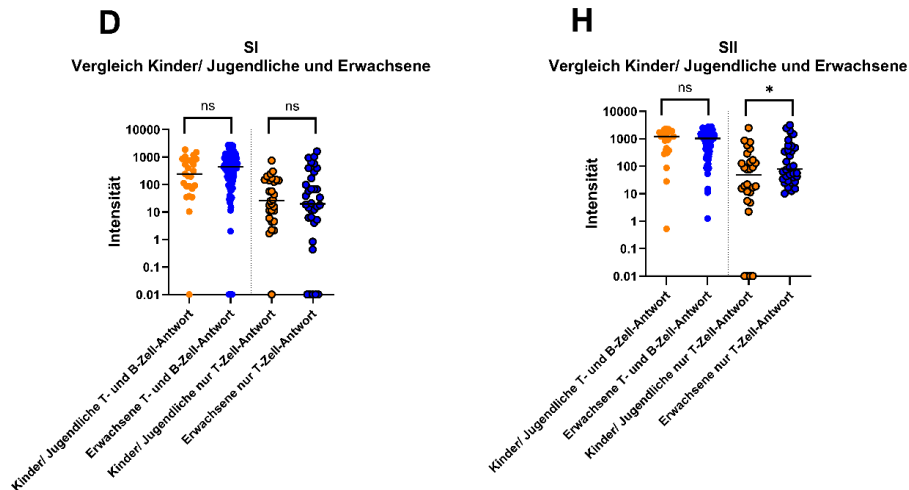


Abbildung 10: Intensität der T-Zell-Antwort nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmischen. Werte ≤ 0 auf 0,01 gesetzt. Bei der statistischen Auswertung im zweiseitigen Mann-Whitney-Test wurde mit den tatsächlichen Werten gerechnet. Datenpunkte repräsentieren die Intensität jeweils einer Probe, zusätzlich Darstellung des Medians. ns = nicht signifikant mit $p > 0,05$. (A-D) Intensität der T-Zell-Antwort auf SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmix SI unterteilt in Gruppen anhand der zellulären und serologischen SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort. (A) Intensität der T-Zell-Antwort auf SI aller Proben, **** $p \leq 0.0001$ (B) Intensität der T-Zell-Antwort auf SI der Gruppe Kinder/ Jugendliche (1-17 Jahre), *** $p = 0,0003$ (C) Intensität der T-Zell-Antwort auf SI der Gruppe Erwachsenen (18-69 Jahre), **** $p \leq 0.0001$ (D) Vergleich der Intensität zwischen Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen auf SI bei Nachweis einer zellulären und humoralen SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort („T- und B-Zell-Antwort“) und bei alleinigem Nachweis einer zellulären SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort („nur T-Zell-Antwort“) (E-H) Intensität der T-Zell-Antwort auf SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmix SII unterteilt in Gruppen Anhand der zellulären und serologischen SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort. (E) Intensität der T-Zell-Antwort auf SII aller Proben, **** $p \leq 0.0001$ (F) Intensität der T-Zell-Antwort auf SII der Gruppe Kinder/ Jugendliche (1-17 Jahre), **** $p \leq 0.0001$ (G) Intensität der T-Zell-Antwort auf SII der Gruppe Erwachsenen (18-69 Jahre), **** $p \leq 0.0001$ (H) Vergleich der Intensität zwischen Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen auf SII bei Nachweis einer zellulären und humoralen SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort („T- und B-Zell-Antwort“) und bei alleinigem Nachweis einer zellulären SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort („nur T-Zell-Antwort“), * $p = 0,0467$.

3.4 Zelluläre Immunantwort nach Stimulation mit HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmischen

Um eine Kreuzreaktivität zwischen SARS-CoV-2 und anderen humanpathogenen Coronaviren beurteilen zu können, wurde mit Peptidmischen stimuliert, die spezifisch für SARS-CoV-2 sind und gleichzeitig als Epitop für T-Zellen dienen, die Epitope aus endemischen Coronaviren (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1) erkennen.

Bei 89,8% der Proben ($n = 221$) war eine T-Zell-Antwort auf mindestens einen der zwei kreuzreaktiven Peptidmische (CI oder CII) nachweisbar (s. Abbildung 11 und Tabelle 6). Dies wird weiterhin als „kreuzreaktive T-Zell-Antwort“ bezeichnet. Es sticht ins Auge, dass bei fast allen Erwachsenen (95,3%) eine kreuzreaktive T-Zell-Antwort messbar war. Damit wiesen Erwachsene häufiger eine kreuzreaktive T-Zell-Antwort auf als Kinder/ Jugendliche (s. Abbildung 11, Erwachsene 95,3% ($n = 143$) vs. Kinder/ Jugendliche 81,3% ($n = 78$), zweiseitiger Fisher's exact test, *** $p = 0,0008$).

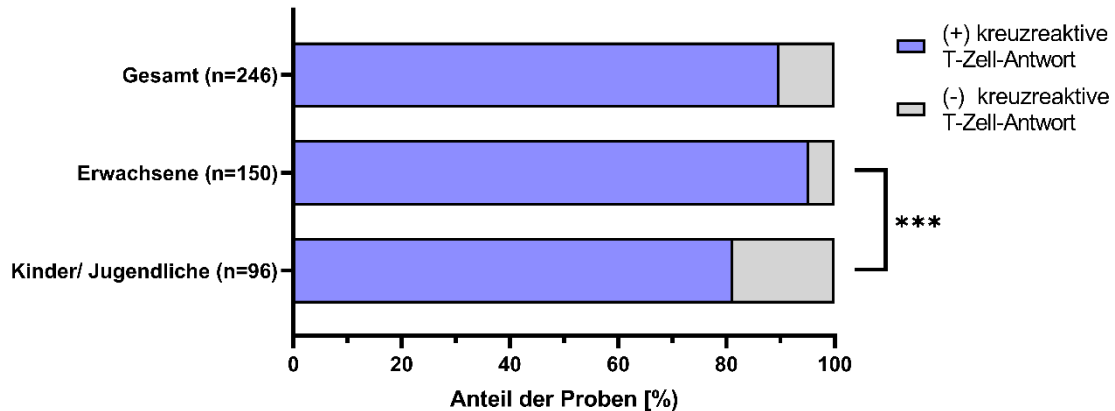


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der als positiv und negativ gewerteten Proben nach Stimulation mit HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmischen. Prozentuale Verteilung der als positiv und negativ gewerteten Proben in der Gesamtkohorte. Unterteilung in „Gesamt“ (alle untersuchten Proben), „Erwachsene“ (Alter der Spender 18-69 Jahre) und „Kinder/ Jugendliche“ (Alter der Spender 1-17 Jahre). Gezeigt wird jeweils die Fraktion von allen 246 getesteten Proben. *** $p = 0,0008$ im zweiseitigen Fisher's exact test.

	Gesamt n (%)	Erwachsene n (%)	Kinder/ Jugendliche n (%)
Anzahl Probanden	246 (100)	149 (100)	97 (100)
T-Zell-Antwort (n (%)) nach Stimulation mit SARS-CoV-2 kreuzreaktiven Peptidmischen			
CI und/ oder CII			
Positiv	221 (89,8)	143 (95,3)	78 (81,3)
Negativ	25 (10,2)	7 (4,7)	18 (18,8)
Positive Stimulationen bei Nachweis einer HCoV-/ SARS-CoV-2-kreuzreaktiven T-Zellantwort (n (% der Proben mit nachweisbarer HCoV/ SARS-CoV-2-kreuzreaktiver T-Zellantwort))			
CI und CII			
Positiv	139 (62,9)	97 (67,8)	42 (53,8)
CI			
Positiv	143 (64,7)	98 (68,5)	45 (57,7)
Negativ	78 (35,3)	45 (31,5)	33 (42,3)
CII			
Positiv	217 (98,2)	142 (99,3)	75 (96,2)
Negativ	4 (1,8)	1 (0,7)	3 (3,8)

Tabelle 6: Zusammenfassung der analysierten Spenderdaten zur HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven T-zellulären Immunantwort. Proben wurden anhand des Alters der Gruppe „Erwachsene“ (18-69 Jahre) und „Kinder/ Jugendliche“ (1-17 Jahre) zugeordnet. Die T-Zell-Antwort wurde mit ELISpot-Assay nach in vitro-Stimulation mit HCoV-/ SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmischen jeweils restringiert zu HLA-Klasse-I (CI) und HLA-DR (CII) erhoben.

Bei Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort wiesen sämtliche Proben mit nur einer Ausnahme (99,5%) gleichzeitig auch eine kreuzreaktive T-Zell-Antwort auf. Hingegen zeigten Proben ohne Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort nur in 57,9% der Fälle eine kreuzreaktive T-Zell-Antwort. Der zweiseitige Fisher's exact test zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort und der kreuzreaktiven T-Zell-Antwort (**** $p \leq 0,0001$, s. Abbildung 12). Diese Beziehung zeigte sich altersunabhängig bei Erwachsenen und Kindern/ Jugendlichen und spiegelt sich auch in Abbildung 11 wider, wenn man die hohe Prävalenz SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antworten bei Erwachsenen und die geringere Häufigkeit solcher Reaktionen bei Kindern berücksichtigt.

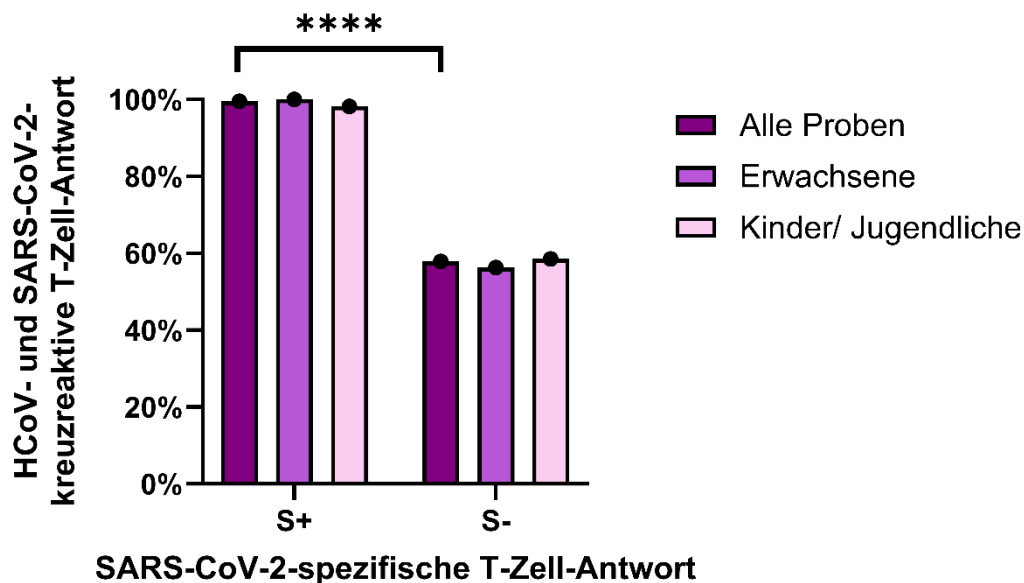


Abbildung 12: Kreuzreaktive T-Zell-Antwort abhängig von der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort. (S+) = T-Zell-Antwort auf SARS-CoV-2-spezifische Peptidmixe; (S-) = keine T-Zell-Antwort auf SARS-CoV-2-spezifische Peptidmixe, Alle Proben $n = 246$ ($n(S+) = 189$; $n(S-) = 57$), Erwachsene $n = 150$ ($(S+) = 134$; $(S-) = 16$), Kinder/ Jugendliche $n = 96$ ($(S+) = 55$; $(S-) = 41$); **** $p \leq 0,0001$ im zweiseitigen Fisher's exact test.

Zwischen den Gruppen mit Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort („B- und T-Zell-Antwort“ und „nur T-Zell-Antwort“) bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der kreuzreaktiven T-Zell-Antwort (s. Abbildung 13; CI und CII kombiniert: „B- und T-Zell-Antwort“: 75,0%, „nur T-Zell-Antwort“: 61,3%; CI: „B- und T-Zell-Antwort“: 75,0%, „nur T-Zell-Antwort“: 66,1%; CII: „B- und T-Zell-Antwort“: 99,2%, „nur T-Zell-Antwort“: 95,2%; jeweils im zweiseitigen Fisher’s exact test nicht signifikant, $p > 0,05$). Wenn keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort gemessen wurde, war auch seltener eine kreuzreaktive T-Zell-Antwort nachweisbar (s. Abbildung 13; „keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort“: CI und CII kombiniert 17,0%, CI 18,9%, CII 56,6%). Insgesamt fiel auf, dass die kreuzreaktive T-Zell-Antwort vor allem durch CII-Peptide mediert wurde, auch wenn keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort nachgewiesen wurde („keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort“ Erkennungsraten: CII 56,6%; CI 18,9%). Diese Ergebnisse sind durch beide Altersgruppen konsistent.

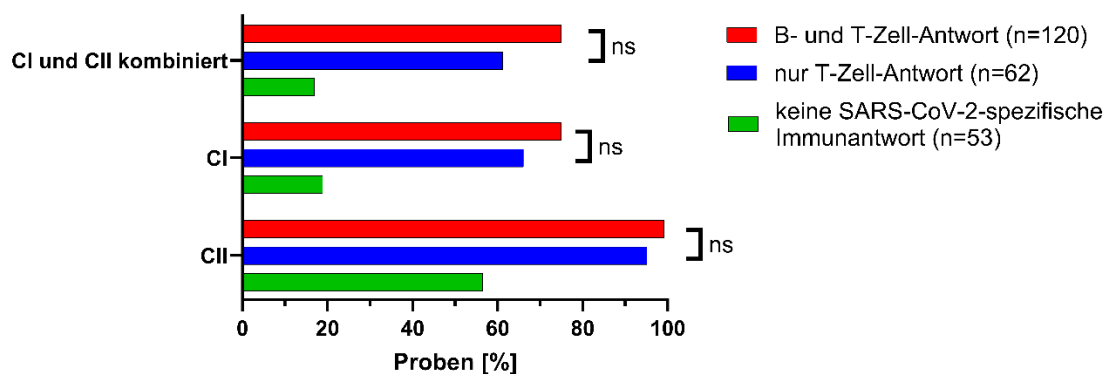


Abbildung 13: Erkennungsraten der HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmische CI und CII eingeteilt nach SARS-CoV-2-spezifischer Immunantwort. Erkennungsrate der Peptidmische CI, CII und beider Peptidmische CI und CII kombiniert, anteilig an der jeweiligen Gruppen, „B- und T-Zell-Antwort“ $n = 120$, „nur T-Zell-Antwort“ $n = 62$; „keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort“ $n = 53$; ns= nicht signifikant im zweiseitigen Fisher’s exact test, $p > 0,05$.

3.5 Intensität der kreuzreaktiven T-Zell-Antwort

Die Intensität der kreuzreaktiven T-Zell-Antwort war bei gleichzeitiger SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort höher als ohne diese, wie in Abbildung 14A dargestellt (Dulovic et al. 2025). Für den CI-Peptidmix betrug die mediane Intensität bei "B- und T-Zell-Antwort" 139,2, bei "nur T-Zell-Antwort" 29,07, bei "nur B-Zell-Antwort" 4,67 und bei "keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort" 1,11 (Dulovic et al. 2025). Gleiches zeigte sich in Abbildung 14E für den CII-Peptidmix, wo die Medianwerte für "B- und T-Zell-Antwort" 796,1, "nur T-Zell-Antwort" 238,7, "nur B-Zell-Antwort" 4,5 und "keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort" 16,72 betragen (Dulovic et al. 2025).

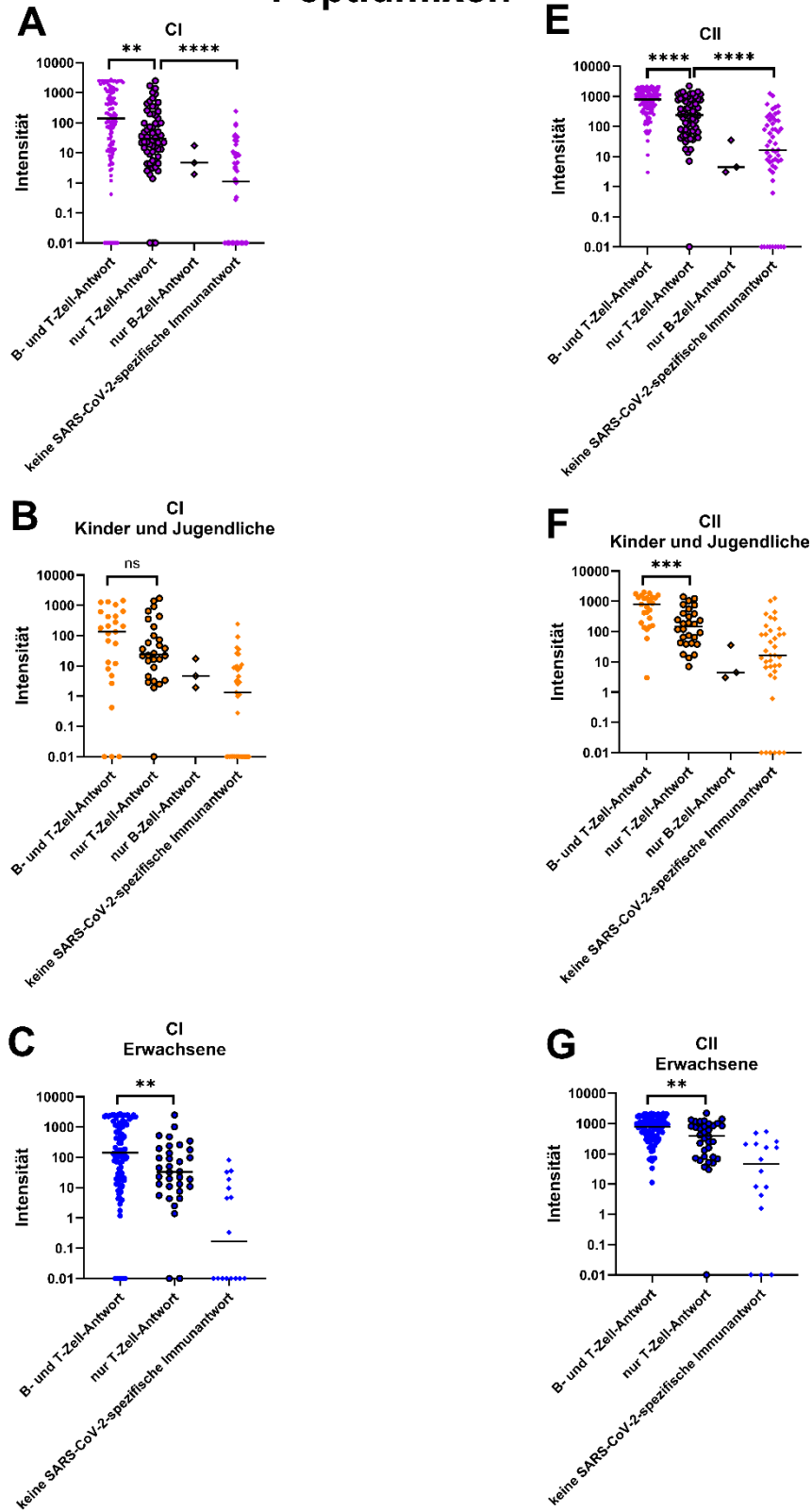
Die Intensität gegenüber CII-Peptiden zeigte eine höhere Ausprägung im Vergleich zu CI-Peptiden. Ebenso waren bei den SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antworten höhere Intensitäten ausgeprägt als bei kreuzreaktiven T-Zell-Antworten. Dies ist beispielsweise in der Gruppe "B- und T-Zell-Antwort" ersichtlich, wo die Medianintensität für CI 139,2 betrug, während sie für den SARS-CoV-2-spezifischen Peptidmix SI 406,2 war.

Wie schon zuvor bei der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort festgestellt wurde, fand sich unter Betrachtung aller Proben ein signifikanter Unterschied zwischen den Intensitäten der T-Zell-Antworten auf CI- und CII-Peptidmixe der Gruppen „B- und T-Zell-Antwort“ und „nur T-Zell-Antwort“ (zweiseitiger Mann-Whitney-Test, ** $p = 0,0014$; s. Abbildung 14A, D). Unter Berücksichtigung der Altersgruppen fiel jedoch auf, dass sich die Intensitäten der T-Zell-Antworten gegenüber dem CI-Peptidmix der Gruppen „B- und T-Zell-Antwort“ und „nur T-Zell-Antwort“ bei Kindern/ Jugendlichen nicht signifikant unterschieden (K/J: mediane Intensität „B- und T-Zell-Antwort“ 133,4; „nur T-Zell-Antwort“ 24,19; zweiseitiger Mann-Whitney-Test, $p > 0,05$, s. Abbildung 14B). Bei Erwachsenen unterschieden sich die beiden Gruppen signifikant (mediane Intensität „B- und T-Zell-Antwort“ 142,8; „nur T-Zell-Antwort“ 33,13; zweiseitiger Mann-Whitney-Test, ** $p = 0,0067$, s. Abbildung 14C). In den anderen Stimulationen mit CII-Peptidmix und auch nach Stimulation mit SI- und SII-Peptidmix war sonst immer ein signifikanter Unterschied der Intensität zwischen den beiden Untergruppen „B-

und T-Zell-Antwort“ und „nur T-Zell-Antwort“ messbar, auch innerhalb der Altersgruppen (s. Abbildung 14E, F, G).

Analog zur SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort haben Kinder/Jugendliche in der Gruppe „nur T-Zell-Antwort“ eine niedrigere mediane Intensität gegenüber CII-Peptidmix als Erwachsene (s. Abbildung 14D, H; mediane Intensität „nur T-Zell-Antwort“ K/J: 148,9; E: 395,5; zweiseitiger Mann-Whitney-Test * $p = 0,0404$). Abgesehen davon bestanden keine signifikanten Differenzen in den Intensitäten zwischen den Altersgruppen (Dulovic et al. 2025).

Intensität nach Stimulation mit HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmischen



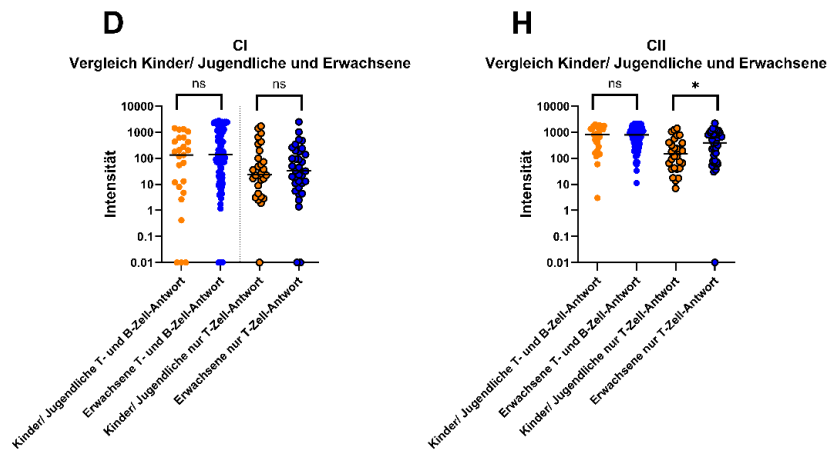


Abbildung 14: Intensität der T-Zell-Antwort nach Stimulation mit HCoV- und SARS-CoV-2 kreuzreaktiven Peptidmischen. Werte ≤ 0 auf 0,01 gesetzt. Bei der statistischen Auswertung im zweiseitigen Mann-Whitney-Test wurde mit den tatsächlichen Werten gerechnet. Datenpunkte repräsentieren die Intensität jeweils einer Probe, zusätzlich Darstellung des Medians. ns = nicht signifikant mit $p > 0,05$ (A-D) Intensität der T-Zell-Antwort auf HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmix CI unterteilt in Gruppen anhand der zellulären und serologischen SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort. (A) Intensität der T-Zell-Antwort auf CI aller Proben, ** $p = 0,0014$, **** $p \leq 0,0001$ (B) Intensität der T-Zell-Antwort auf CI der Gruppe Kinder/ Jugendliche (1-17 Jahre) (C) Intensität der T-Zell-Antwort auf CI der Gruppe Erwachsenen (18-69 Jahre) ** $p = 0,0067$ (D) Vergleich der Intensität auf CI zwischen Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen bei Nachweis einer zellulären und humoralen SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort („T- und B-Zell-Antwort“) und bei alleinigem Nachweis einer zellulären SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort („nur T-Zell-Antwort“) (E-H) Intensität der T-Zell-Antwort auf HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptidmix CII unterteilt in Gruppen anhand der zellulären und serologischen SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort. (E) Intensität der T-Zell-Antwort auf CII aller Proben, **** $p \leq 0,0001$ (F) Intensität der T-Zell-Antwort auf CII der Gruppe Kinder/ Jugendliche (1-17 Jahre), *** $p = 0,0006$ (G) Intensität der T-Zell-Antwort auf CII der Gruppe Erwachsenen (18-69 Jahre), ** $p = 0,0039$ (H) Vergleich der Intensität auf CII zwischen Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen bei Nachweis einer zellulären und humoralen SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort („T- und B-Zell-Antwort“) und bei alleinigem Nachweis einer zellulären SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort („nur T-Zell-Antwort“), * $p = 0,0404$.

3.6 Familiäre Durchseuchung

Es fand sich ein gemischtes Bild bezüglich der gemessenen SARS-CoV-2-spezifischen B- und T-Zell-Antwort zwischen einzelnen Familienmitgliedern (s. Abbildung 15). Dabei zeigte sich, dass in einigen Fällen lediglich ein einziges Familienmitglied eine SARS-CoV-2-spezifische T- und B-Zell-Reaktion entwickelte, während andere Familienmitglieder keine nachweisbaren SARS-CoV-2-spezifischen T- oder B-Zellen aufwiesen, so beispielsweise in den Familien 5, 8, 13, 47, 55, 37, 12. Im Gegensatz dazu war bei 30 der 66 (45,5%) Familien bei allen Familienmitgliedern, zu denen Daten vorlagen, eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort oder Serokonversion nachweisbar.

Interessanterweise erfolgte in 40 von 66 (60,6%) der analysierten Familien bei mindestens einem Familienmitglied eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Reaktion ohne begleitende Serokonversion und somit ohne Bildung von SARS-CoV-2-spezifischen Antikörpern. In sechs Familien (51, 46, 38, 52, 41, 64) war bei keinem Familienmitglied eine Serokonversion nachweisbar, jedoch manifestierte sich eine alleinige SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort.

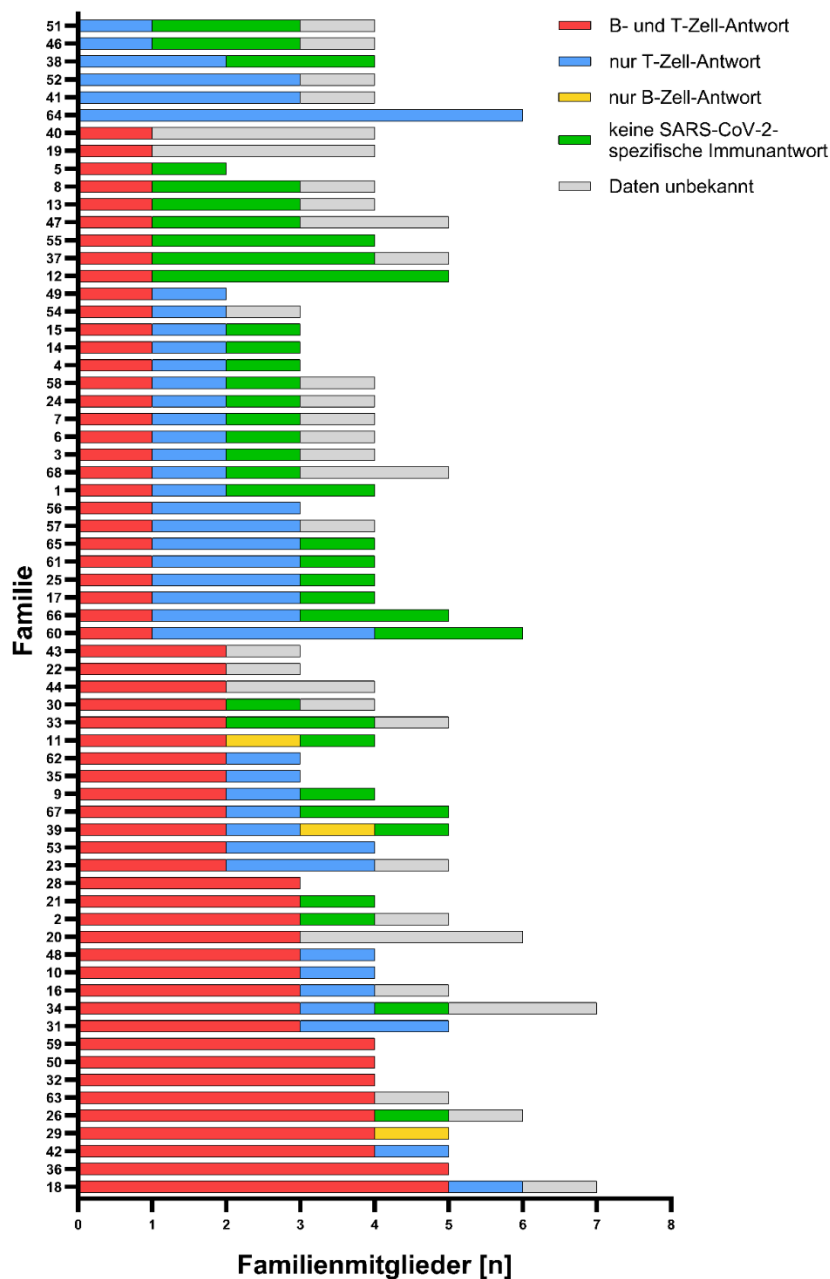


Abbildung 15: Familiäre Durchseuchung mit SARS-CoV-2-spezifischen T- und B-Zellen. Familie 27 und 45 wurden nicht in die Analyse eingeschlossen, da Daten zu T-Zell-Antwort oder Antikörper-Antwort unvollständig waren. Sortierung anhand der Anzahl der Proben mit positiver SARS-CoV-2-spezifischer B- und T-Zell-Antwort sowie mit alleiniger SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort und der Anzahl an Familienmitgliedern. Die Familiennummerierung erfolgte zufällig. „Daten unbekannt“ = Ergebnis für SARS-CoV-2-spezifische T- oder B-Zell-Antwort liegt nicht vor.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

T-Zell-Antwort auf SARS-CoV-2-spezifische Peptidmixe: Bei 89,3% aller Erwachsenen und bei 56,7% aller Kinder / Jugendlichen wurde eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort gemessen. Die SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort richtete sich bei 75,7% der Probanden sowohl gegen den SI- als auch gegen den SII-Peptidmix. Bei Erwachsenen war häufiger als bei Kindern/ Jugendlichen eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort auf SII-Peptidmix messbar.

Zelluläre und serologische SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort: Wurde eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort nachgewiesen, war die Antikörperantwort in nur 65,9% der Fälle positiv. Kinder und Jugendliche wiesen bei nachgewiesener SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort doppelt so häufig keine Antikörperantwort wie Erwachsene auf (K/J: 52,8%; E: 26,4%) (Dulovic et al. 2025).

Intensität der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort: Die Intensität der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort war am höchsten bei Probanden mit gleichzeitigem Nachweis von Antikörpern (Dulovic et al. 2025) und gegenüber dem SII-Peptidmix stärker ausgeprägt als gegenüber dem SI-Peptidmix. Bei Erwachsenen war in der Untergruppe „nur T-Zell-Antwort“ die Intensität der T-Zell-Antwort gegenüber dem SII-Peptidmix höher als bei Kindern/Jugendlichen.

HCoV- und SARS-CoV-2 Kreuzreaktivität abhängig von SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort: Bei Nachweis von SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen war altersunabhängig bis auf eine Ausnahme auch eine HCoV- und SARS-CoV-kreuzreaktive T-Zell-Antwort vorhanden, die sich vor allem gegen den CII-Peptidmix richtete (Dulovic et al. 2025). Ohne SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort war signifikant seltener (57,9% aller Proben) eine HCoV- und SARS-CoV-kreuzreaktive T-Zell-Antwort messbar, unabhängig des Alters.

Intensität der HCoV- und SARS-CoV-2 kreuzreaktiven T-Zell-Antwort: Die Intensität der T-Zell-Antwort gegenüber dem CII-Peptidmix war höher als gegenüber dem CI-Peptidmix. Ebenso wiesen SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antworten höhere Intensitäten im Vergleich zu HCoV- und SARS-CoV-2

kreuzreaktiven T-Zell-Antworten auf. Auch hier war bei Erwachsenen in der Untergruppe „nur T-Zell-Antwort“ die Intensität der T-Zell-Antwort gegenüber dem CII-Peptidmix höher als bei Kindern/Jugendlichen.

Durchseuchung: In etwa 6 von 10 untersuchten Familien zeigte mindestens ein Familienmitglied eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Reaktion, ohne dass zusätzlich Antikörper nachweisbar waren. Bei 45,5% der Familien lag bei allen Familienmitgliedern, zu denen Daten vorlagen, eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Reaktion oder Serokonversion vor.

4 Diskussion

4.1 Erwachsene vs. Kinder und Jugendliche: Häufigkeit der Infektion

In unserer Studie zu Beginn der COVID-19-Pandemie mit Proben aus dem Sommer 2020 konnten gezeigt werden, dass sich innerhalb einer Familie im Durchschnitt 76,5% der Angehörigen mit SARS-CoV-2 infiziert haben. Dabei wurden Kinder und Jugendliche (56,7%; 55 von 97) seltener infiziert als Erwachsene (89,3%; 134 von 150). Unsere Ergebnisse unterstützen andere Studien, aus denen hervorgeht, dass eine Transmission der SARS-CoV-2-Alpha-Variante im häuslichen Kontext häufiger Erwachsene betrifft als Kinder (Madewell et al. 2020) und dass Kinder und Heranwachsende weniger anfällig für eine Infektion mit SARS-CoV-2 sind (Davies et al. 2020; Viner et al. 2021). Trotzdem muss beachtet werden, dass viele weitere Faktoren wie Symptome, Viruslast, soziale Kontakte und Verhalten berücksichtigt werden müssen, um eine verlässliche Aussage zur Transmission treffen zu können (Viner et al. 2021).

4.2 Erwachsene vs. Kinder und Jugendliche: Breite der Immunantwort

Kinder und Jugendliche demonstrieren in unserer Studie analog zu Erwachsenen die Fähigkeit, eine breite SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort auf HLA-Klasse-I- und HLA-DR-restringierte Epitopmische zu entwickeln. In allen Altersgruppen ist die SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort vor allem durch HLA-DR-restringierte Epitope mediiert. Bilich et al. untersuchten mittels Durchflusszytometrie die Zusammensetzung der T-Zell-Antwort auf die verwendeten Epitop-Mischungen. Diese setzte sich gegenüber SARS-CoV-2-spezifischen HLA-DR-restringierten Epitopen vor allem aus CD4⁺-Zellen zusammen. Die T-Zell-Antwort gegenüber SARS-CoV-2-spezifischen HLA-Klasse-I-restringierten Epitopen wurde hingegen durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mediiert (Bilich et al. 2021). Dieses Phänomen könnte auf die Fähigkeit von HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen zurückzuführen sein, sich an primären und sekundären Peptidankermotiven zu binden, welche die zentralen 9 bis 10 Aminosäuren eines Peptids umfassen (Bilich et al. 2021).

Eine Dominanz von CD4⁺-T-Zellen bei der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort wurde bereits beschrieben (Moss 2022). Die CD4⁺-T-Zellen können als

follikuläre T-Helferzellen potentiell die humorale Immunantwort unterstützen und zu Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern beitragen (Boppana et al. 2021).

In unserer Studienpopulation zeigte sich die SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort bei Erwachsenen häufiger als bei Kindern durch HLA-DR-restringierten-Epitopmix vermittelt und bei Erwachsenen intensiver ausgeprägt als bei Kindern. Dies entspricht bei Bilich et al. einer CD4+-Zell-Antwort und könnte ein Hinweis für eine stärkere B-Zell-Stimulation durch CD4+-T-Helferzellen bei Erwachsenen sein. Auch in anderen Studien zeigten Kinder meist eine weniger stark ausgeprägte SARS-CoV-2-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zell-Antwort im Vergleich zu Erwachsenen (Cohen et al. 2021; Pierce et al. 2020).

4.3 Zelluläre Immunantwort ist sensitiver als Antikörpernachweis

In unserer Studienpopulation konnte in 34,1% (62 von 182) der Fälle bei SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort keine zusätzliche Serokonversion nachgewiesen werden (Dulovic et al. 2025). Durch die Verwendung von SARS-CoV-2-spezifischen-Epitopen kann eine fälschliche Messung einer zu anderen HCoV kreuzreaktiven T-Zell-Antwort ausgeschlossen werden (Nelde et al. 2021; Dulovic et al. 2025). Bei erfolgter Serokonversion konnte mit Ausnahme von 3 Proben eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort gemessen werden. Damit zeigte sich bei uns der ELISpot, also die T-zelluläre Immunantwort, für den Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort sensitiver als der Nachweis von Antikörpern. Zu berücksichtigen ist jedoch der höhere Aufwand, der mit der Durchführung des ELISpot verbunden ist.

Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass die Antikörperreaktion nach einer SARS-CoV-2-Infektion im Laufe der Zeit abnehmen kann, während die T-zelluläre Immunantwort bestehen bleibt (Becker et al. 2021; Bonifacius et al. 2021; Seow et al. 2020). Insbesondere zeigt sich bei asymptomatischen Verläufen eine meist schnelle, aber transiente Antikörperproduktion (Carsetti et al. 2020). Bei unserer Studienpopulation wurde der Serostatus etwa 3-4 Monate nach Bestätigung einer Infektion innerhalb des Haushalts erhoben und die meisten Teilnehmer zeigten einen asymptomatischen oder milden

Krankheitsverlauf. Dies macht eine partielle Abnahme der Antikörperreaktion vor Testung möglich.

Eine mögliche Erklärung bietet außerdem das Modell der „cellular sensitization without seroconversion“ (Moss 2022; Dulovic et al. 2025). Dies beschreibt eine virusspezifische T-zelluläre Immunantwort auf SARS-CoV-2 ohne Serokonversion und wurde bereits in anderen Studienpopulationen beobachtet (Bilich et al. 2021; Björkander et al. 2022; da Silva Antunes et al. 2021; Schwarzkopf et al. 2021; Sekine et al. 2020), auch im innerfamiliären Kontext (Gallais et al. 2021).

SARS-CoV-2-spezifische CD4⁺-Zellen konnten bereits mit einer protektiven Immunantwort assoziiert werden (Rydyznski Moderbacher et al. 2020) und SARS-CoV-2 spezifische T-Gedächtniszellen zeigten nach erneutem Antigenkontakt eine Expansion und Cytokinproduktion, welche mit einer antiviralen Wirkung assoziiert sind (Rodda et al. 2021). Es scheint also wahrscheinlich, dass auch eine alleinige „cellular sensitization“ protektiv gegen Infektion wirken kann.

Dennoch ist anzumerken, dass die SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort in unserer Kohorte bei der „cellular sensitization without seroconversion“ eine geringere Intensität der T-Zell-Antwort zeigte als bei zusätzlicher Serokonversion. Eine geringere Frequenz der CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen bei Seronegativen im Vergleich zu Seropositiven ist bereits vorbeschrieben (Sekine et al. 2020). Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass sich das Immunsystem weniger intensiv mit dem Virus auseinandergesetzt hat und ihn schneller abwehren konnte (Dulovic et al. 2025).

4.4 Kinder und Jugendliche zeigen seltener Serokonversion

Kinder und Jugendliche zeigten bei Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort in unserer Studie doppelt so häufig wie Erwachsene keine gleichzeitige Serokonversion (Gruppe „nur T-Zell-Antwort“ anteilig an den Proben mit SARS-CoV-2-spezifischer T-Zell-Antwort: Kinder/ Jugendliche 52,8%; Erwachsene: 26,4%) (Dulovic et al. 2025). Dies spricht für eine in jüngeren Jahren stärker ausgeprägte „cellular sensitization“ oder eine schnellere Abnahme der Antikörperantwort.

Bei isolierter spezifischer T-Zell-Antwort ohne Serokonversion reagierten Kinder und Jugendliche nach Stimulation mit SI-Peptidmix häufiger mit einer SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort als Erwachsene (Gruppe „nur T-Zell-Antwort“ Erkennungsrate SI bei Kindern/ Jugendlichen 75%, Erwachsene 50%). Unter Berücksichtigung der bereits bei Bilich et al. (2021) publizierten Daten entspricht dies einer CD4+ und CD8+ T-Zellen mediierten T-Zell-Antwort (Bilich et al. 2021).

Im Gegenzug zeigten Erwachsenen bei alleiniger spezifischer T-Zell-Antwort ohne Serokonversion häufiger als Kinder und Jugendliche eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort nach Stimulation mit SII-Peptidmix (Erkennungsrate SII Gruppe „nur T-Zell-Antwort“ bei Kindern/ Jugendlichen 75%, Erwachsene 94,1%). Die SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort nach Stimulation mit SII-Peptidmix zeigte sich zudem bei Erwachsenen intensiver als bei Kindern (Intensität Median Gruppe „nur T-Zell-Antwort“ bei Kindern/ Jugendlichen = 49,13, Erwachsene = 79,99) und entsprach bei Bilich et al. (2021) einer CD4+-vermittelten T-Zell-Antwort.

Dies ist ein Hinweis für eine bei Kindern und Jugendlichen eher CD8+-Zell-vermittelten SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort im Rahmen der „cellular sensitization“. Im Erwachsenenalter scheint die SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort hingegen häufiger durch CD4+-Zellen vermittelt zu sein.

Generell ist anzumerken, dass die CD4+-T-Zell-Antwort bei Kindern insbesondere in der ersten Lebensdekade im Vergleich zu Erwachsenen stärker durch Typ-2-T-Helferzellen (Th2) statt Typ-1-T-Helferzellen (Th1) mediiert wird (Hobbs et al. 2020; Kollmann et al. 2017; Saso und Kampmann 2017). Im verwendeten ELISpot wurde die IFN γ -Antwort gemessen und somit Th2-Zellen nicht detektiert. Dies könnte eine Erklärung dafür bieten, dass Kinder und Jugendliche eine geringere Frequenz oder Intensität der SARS-CoV-2-spezifischen CD4+-T-Zell-Antwort zeigen. Eine der Funktionen von Th2-Zellen ist insbesondere die Aktivierung von B-Zellen und somit die Antikörperproduktion (Boppana et al. 2021). Die Antikörperproduktion bei SARS-CoV-spezifischer T-Zell-Antwort im Kindesalter zeigte sich in unserer Kohorte jedoch seltener als bei Erwachsenen. Deswegen scheint eine starke, undetektierte Aktivierung der

Th2-Zellen im Kindesalter als alleinige Erklärung für die im Vergleich zu Erwachsenen möglicherweise stärkere Betonung der CD8+-T-Zellen der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort unwahrscheinlich.

Insbesondere Kinder haben eine stark reaktive direkte Immunantwort vermittelt durch Zellen des angeborenen Immunsystems. So kann vermutlich das mukosale Immunsystem durch vermehrte Interferon-Sekretion die virale Replikation von SARS-CoV-2 schneller stoppen (Pierce et al. 2020; Yoshida et al. 2022). Bei älteren Personen (>65 Jahre) wurde im Gegensatz dazu eine Verminderung der Interferon-Signalwege beschrieben (Chou et al. 2022). Es wird vermutet, dass Kinder durch einen größeren Pool naiver T-Zellen und gleichzeitig größerer Diversität im T-Zell-Rezeptor-Repertoire eine SARS-CoV-2-Infektion effektiver im Anfangsstadium bekämpfen können (Pierce et al. 2020; Yoshida et al. 2022).

Dies ist insbesondere für die weitere Impfforschung relevant. Häufig wird das Ansprechen von Impfungen anhand der Antikörper-Antwort gemessen (Khoury et al. 2021; Ward et al. 2022). Unsere Daten geben Hinweis darauf, dass die SARS-CoV-2-spezifischen Antikörper im Erwachsenenalter länger persistieren oder dass Kinder und Jugendliche seltener als Erwachsene SARS-CoV-2-spezifische Antikörper bilden trotz vorhandener SARS-CoV-2-spezifischer T-zellulärer Immunantwort (Dulovic et al. 2025).

Eine vorrangegangene Infektion mit prä-omikron Varianten von SARS-CoV-2 zeigte sich protektiv vor einer Re-Infektion und einem schweren Krankheitsverlauf (Stein et al. 2023). Die T-zelluläre Immunantwort scheint durch die hohe Polymorphie der HLA-Moleküle zudem im Vergleich zur humoralen Immunantwort robuster und langlebiger gegenüber Durchbruchinfektionen mit neuen besorgniserregenden Varianten von SARS-CoV-2 zu sein (Ahmed et al. 2020; Francis et al. 2022; Muik et al. 2023; Young 2022). Außerdem sind SARS-CoV-2-spezifischen CD4+-T-Zellen bei milden Verläufen von COVID-19 involviert (Braun et al. 2020; Rydyznski Moderbacher et al. 2020; Tan et al. 2021). und von Bedeutung für die Funktion von B-Zellen und die Bildung von Antikörpern (Ansari et al. 2022).

Die Betrachtung sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantwort scheint deswegen essenziell zu sein, um die Immunität gegenüber SARS-CoV-2 insbesondere bei Kindern richtig einzuschätzen (Dulovic et al. 2025). Unsere Studiendaten deuten darauf hin, dass Erwachsene und Kinder häufiger mit SARS-CoV-2 infiziert waren, als es durch Messung der SARS-CoV-2-spezifischen Antikörperproduktion vermutet wurde. Dies legt nahe, dass insbesondere Kinder und Jugendliche möglicherweise häufiger vor Re-Infektion mit neuen Virusvarianten oder vor einem schweren Krankheitsverlauf geschützt sind.

4.5 Zelluläre Kreuzreaktivität unterscheidet sich bei Kindern/Jugendlichen und Erwachsenen nicht

In unserer Studie manifestierte sich bei Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort bis auf eine Ausnahme immer eine HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktive T-Zell-Antwort. Dabei fällt auf, dass die HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktive T-Zell-Antwort eine höhere Intensität aufweist bei Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort als ohne den Nachweis dieser. Dies spricht am ehesten für eine erneute Aktivierung von vorbestehenden HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven T-Zellen im Rahmen einer SARS-CoV-2-Infektion (Dulovic et al. 2025), wie bereits bei Sealy und Hurwitz beschrieben (Sealy und Hurwitz 2021).

Eine HCoV- und SARS-CoV-kreuzreaktive T-Zell-Antwort konnte bereits in Personen nachgewiesen werden, die keine Exposition gegenüber SARS-CoV-2 oder COVID hatten (Le Bert et al. 2020). Zusätzlich scheint eine kürzlich stattgehabte Infektion mit HCoV mit einem besseren klinischen Verlauf einer Infektion mit SARS-CoV-2 assoziiert zu sein (Sagar et al. 2021). Außerdem konnte eine Korrelation von HCoV-Kreuzreaktivität mit einer schnellen zellulären und verstärkten humoralen Immunantwort nachgewiesen werden (Loyal et al. 2021). Dies kann einen milderen Krankheitsverlauf einer SARS-CoV-2-Infektion medieren (Loyal et al. 2021). In diesem Zusammenhang scheint der häufige Nachweis von HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven T-Zellen passend zu den

größtenteils asymptomatischen und milden Verläufen in unserer Studienpopulation.

Kreuzreaktivität zu HCoV kann potentiell eine Protektion vor Infektion mit SARS-CoV-2 vermitteln (Murray et al. 2023). So zeigten SARS-CoV-2-naive Personen in einer anderen Studienpopulation nach Kontakt zu COVID-19 innerhalb des Haushalts höhere Frequenzen von kreuzreaktiven T-Zellen als SARS-CoV-2-Infizierte (Kundu et al. 2022). Auch in unserer Kohorte bildeten 57,9% der Probanden ohne SARS-CoV-2 spezifische Immunantwort HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktive T-Zellen, die sie möglicherweise vor einer Infektion mit SARS-CoV-2 schützen konnten. Die Intensität der HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktive T-Zellen zeigte sich jedoch niedriger als bei gleichzeitiger SARS-CoV-2 spezifischer Immunantwort.

Das Vorkommen von HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven T-Zellen unterschied sich nicht zwischen Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen in den Untergruppen mit und ohne Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Hypothese, dass eine altersabhängige Abnahme kreuzreaktiver T-Zellen eine erhöhte Vulnerabilität älterer Individuen für eine Infektion mit SARS-CoV-2 vermittelt (Loyal et al. 2021; Saletti et al. 2020). Unsere Daten legen nahe, dass die T-zelluläre Kreuzreaktivität zwischen HCoV- und SARS-CoV-2 keinen wesentlichen Einfluss auf die Empfänglichkeit für SARS-CoV-2 zwischen Kindern/ Jugendlichen und Erwachsenen hat.

Einen Einfluss könnte auch eine vorherige Transmission von HCoV im Haushaltskontext haben, die beispielsweise bei Infektion der Kinder auch eine Infektion der Eltern bewirken kann und so zur Bildung von HCoV-/ SARS-CoV-2-kreuzreaktiven T-Zellen geführt haben könnte. Weiterhin ist anzumerken, dass durch unsere Daten keine komplette Einschätzung der individuell komplexen HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Immunantwort erfolgen kann.

4.6 Spezifische T-Zell-Antwort in einzelnen Haushalten

Es wurden bereits mehrere Studien zur Transmission von SARS-CoV-2 in Haushalten durchgeführt, die sehr variable Ergebnisse zeigten (Lewis et al.

2022). Unsere Daten unterstützen die Ergebnisse einiger Studien, die von einer erhöhten „secondary attack rate“ unter Ehepartnern und älteren Mitgliedern des Haushalts im Vergleich zu Kindern berichten (Bardhar und Khanna 2022; Madewell et al. 2020). Die genannten Studien wiesen eine Infektion in den meisten Fällen mittels RT-PCR oder Serologie nach, jedoch unterschieden sich die Diagnosekriterien und die Verfügbarkeit global. In unserer Studie zeigte sich, dass ein serologischer Nachweis allein nicht ausreichend ist, um eine Transmission von SARS-CoV-2 in Haushalten zu beurteilen. Insbesondere Kinder bildeten häufig eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zell-Antwort aus, ohne SARS-CoV-2-spezifische Antikörper zu bilden und sind dadurch potenziell in epidemiologischen serologischen Erhebungen unterrepräsentiert. Dabei bleibt zu bedenken, dass die Probenentnahme 3-4 Monate nach Infektion mit SARS-CoV-2 erfolgte und eine Abnahme der Antikörperantwort über Zeit möglich ist.

In etwa 60% der Haushalten unserer Studie zeigte sich mindestens eine serologisch nicht erfasste SARS-CoV-2 Infektion. In einigen Fällen betraf der alleinige Nachweis einer T-Zellulären Immunantwort auf SARS-CoV-2 ohne Antikörpernachweis sogar alle Haushaltsmitglieder.

Manche Haushalte zeigten lediglich einen Indexfall mit SARS-CoV-2-Infektion ohne den Nachweis einer SARS-CoV-2-spezifischen Immunantwort bei anderen Haushaltsmitgliedern. In diesen Haushalten könnte eine Ausbreitung von SARS-CoV-2 durch Quarantänemaßnahmen verhindert worden sein.

4.7 Praktische Implikationen

Unsere Daten geben Hinweise für eine verminderte Transmission von SARS-CoV-2 an Kinder und Jugendliche in Haushalten. Deswegen sollten die durchgeführten Isolationsmaßnahmen bei Kindern und Jugendlichen im Zuge der SARS-CoV-2-Pandemie aus heutiger Sicht kritisch beurteilt werden. Dies gilt vor allem in Anbetracht der Folgen der Isolationsmaßnahmen für die physische und psychische Gesundheit von Kindern und Jugendlichen (Luijten et al. 2021; Singh et al. 2020). Allerdings ist zu beachten, dass unsere Daten nicht alle Aspekte berücksichtigen, die wichtig sind um die Transmissionsraten einzuschätzen, wie

etwa Symptome, Viruslast, soziale Kontakte und Verhalten während der sozialen Interaktion (Viner et al. 2021).

Nach Kontakt mit SARS-CoV-2 bildet ein großer Teil der Bevölkerung SARS-CoV-2 spezifische langlebige T-Zellen, die eine SARS-CoV-2-Infektion eindämmen und dadurch den Krankheitsverlauf bei Reinfektion mit neuen Omikron-Varianten abmildern können (Huang et al. 2023). Es konnte gezeigt werden, dass SARS-CoV-2 spezifische Antikörper mit einer Protektion vor Reinfektion mit SARS-CoV-2 korrelieren (Israelow et al. 2021). Auch SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen können die Viruslast gleichermaßen wie die humorale Immunantwort verringern (Israelow et al. 2021) und auch nach Impfung gegen SARS-CoV-2 vor Hospitalisation und Tod schützen (Moss 2022).

Während es nach Impfung gegen SARS-CoV-2 wegen der hohen Spezifität der Antikörper bei Infektion mit neuen Virusvarianten zum Ausbleiben einer effektiven Antikörperproduktion kommen kann, bleibt die T-zelluläre Immunantwort meist konserviert (Liu et al. 2022; Pušnik et al. 2024). Die nach Impfung gegen SARS-CoV-2 gebildeten T-Zellen zeigen eine stärker ausgeprägte Kreuzreaktivität zu neuen SARS-CoV-2-Virusvarianten durch ihre höhere Toleranz für Mutationen in den Epitopen als die gebildeten Antikörper (Liu et al. 2022; Pušnik et al. 2024).

Die in unserer Studie nachgewiesenen SARS-CoV-2 spezifischen T-Zellen stellen im Vergleich zur humoralen Immunantwort somit potenziell einen langlebigeren Schutz vor einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf bei Infektion mit SARS-CoV-2 auch bei neuen SARS-CoV-2-Virusvarianten dar. Allerdings unterscheidet sich das Studiendesign der vorliegenden Untersuchung von denen zuvor publizierter Studien, sodass über die Funktion der hier nachgewiesenen SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Antwort keine abschließende Aussage getroffen werden kann. Für die Zukunft ist zudem der Verlauf der Virus-Evolution mit möglicher Ausbildung von Immune-Escape-Mechanismen zu berücksichtigen.

Unsere Daten weisen darauf hin, dass Kinder und Jugendliche verstärkt vor einer SARS-CoV-2-Infektion geschützt sind als Erwachsene, da sie sich insgesamt seltener mit SARS-CoV-2 infiziert haben. Der endgültige Mechanismus kann

durch unser Studiendesign leider nicht hinreichend erklärt werden und bedarf weiterer Forschungsanstrengung. HCoV- und SARS-CoV-2 Kreuzreaktivität zeigte sich in unserer Studie bei Kindern und Erwachsenen in gleicher Ausprägung und scheint somit keinen Einfluss auf den Unterschied in der Empfänglichkeit für eine SARS-CoV-2-Infektion zu haben. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet die im Kindesalter stark ausgeprägte mukosale Immunität, die in unserem Studiendesign nicht untersucht wurde (Alqahtani 2024; Russell et al. 2020).

4.8 Methodologische Überlegungen und Limitationen

4.8.1 Studiendesign

Beim Studiendesign bleibt zu bedenken, dass zum Zeitpunkt der nachgewiesenen Infektion im April/ Mai 2020 Ausgangs- und Kontaktbeschränkungen bestanden, insbesondere herrschte lediglich Notbetreuung in Kitas und Schulen (GEW Baden-Württemberg (2024)). Ab Mitte Mai wurde der eingeschränkte Regelbetrieb in Kindertagesstätten aufgenommen und ab 15. Juni waren Schulen mit reduziertem Stundenplan geöffnet (GEW Baden-Württemberg (2024)). Im Verlauf des Frühjahrs 2020 wurden Hygieneauflagen und eine Pflicht zum Tragen eines Mund-Nasen-Schutzes etabliert (Bundesministerium für Gesundheit (2024)). Dies könnte zu einer verminderten Transmission von SARS-CoV-2 insbesondere an Kinder und Jugendliche im Vergleich zu Erwachsenen geführt haben. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die genannten Maßnahmen zu Hygiene und Kontaktbeschränkung bei Kindern und insbesondere bei Kleinkindern nur eingeschränkt umsetzbar waren und daher möglicherweise eine geringere Wirksamkeit entfalten konnten. Es wurden zudem lediglich asymptomatische, milde und moderate verlaufende Infektionen in unserer Studie inkludiert, sodass keine Aussage zur T-Zell-Antwort bei schwerem Krankheitsverlauf getroffen werden kann.

Eine PCR-Testung bei allen Probanden wäre zum sichereren Nachweis einer SARS-CoV-2-Infektion wünschenswert gewesen. Allerdings war zum Zeitpunkt der Probenerhebung eine PCR-Testung nur sehr eingeschränkt verfügbar,

sodass in der Regel nur ein Indexfall pro Familie per PCR detektiert wurde (Dulovic et al. 2025).

Teilweise stimmten Haushaltsmitglieder der Probenentnahme nicht zu oder es konnte nur wenig Probenmaterial entnommen werden, sodass keine angemessene Auswertung möglich war (Dulovic et al. 2025). Dies führt dazu, dass einige Haushalte nicht in Gänze untersucht werden konnten. Zudem wurden mehr Proben von Erwachsenen als von Kindern und Jugendlichen untersucht, insbesondere in der Gruppe mit SARS-CoV-spezifischer T-Zell-Antwort.

4.8.2 Epitopmixe und ELISpot-Assay

Die verwendeten Epitopmixe zeigten sich alle spezifisch für SARS-CoV-2. (Nelde et al. 2021). Nach Stimulation mit den hier verwendeten HCoV-/ SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Epitopen wurden sowohl bei Probanden, die keinen Kontakt zu SARS-CoV-2 hatten, als auch bei Probanden, die zuvor ein SARS-CoV-2-Infektion hatten, T-Zellen nachgewiesen, die vermutlich aus einer vorherigen Infektion mit HCoV stammen (Nelde et al. 2021). Zur Bestätigung wurde bei Nelde et al. ein Screening von 100 präpandemische Proben durchgeführt, die nach Stimulation mit SARS-CoV-2-spezifischen Epitopmixen keine T-Zelluläre-Immunantwort im ELISpot zeigten. Ebenso führte Dr. med. Julia Müller, Arbeitsgruppe Prof. Lang der Immunologie an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen, ebenfalls ein Screening an 35 präpandemischen Proben durch und konnte somit die SARS-CoV-2-Spezifität der Epitopmixe SI und SII verifizieren.

Bei der Untersuchung von PBMC ist zu beachten, dass diese nur einen Teil des Immunsystems abbilden (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen) (Kleiveland 2015; Murphy und Weaver 2018). Insbesondere gewebsresidente Immunzellen werden in unserer Studie nicht miterfasst. Durch einen *ex-vivo* Ansatz wäre eine genauere Beurteilung der *in-vivo* Aktivität der Immunzellen möglich gewesen (Power et al. 1999). Die *in-vitro*-Stimulation wurde wegen der höheren Sensitivität verwendet, um falsch-negative Ergebnisse so gering wie möglich zu halten, die insbesondere bei den verwendeten kreuzreaktiven Epitopmixen vorbeschrieben waren (Nelde et al. 2021). Darüber

hinaus wurden strenge Kriterien herangezogen, um die korrekte Bewertung einer T-Zell-Antwort als positiv sicherzustellen.

Die verwendeten Peptide decken 91,7% der weltweiten HLA-Klasse-I-Allotypen und 70,6% der HLA-DR-Allotypen ab (Bui et al. 2006; Nelde et al. 2021; Vita et al. 2015). Dies ermöglicht eine Abdeckung der Weltbevölkerung von 97,6% mit mindestens einem HLA-Allotyp. (Nelde et al. 2021). Dennoch kann es durch HLA-Inkompatibilität zum fehlenden Nachweis einer vorhandenen T-Zell-Antwort gekommen sein (Dulovic et al. 2025). Dies stellt eine mögliche Erklärung für die drei Proben der Gruppe „nur B-Zellen“ dar. Auch die Daten für die Intensität der T-Zell-Antwort sind insbesondere für HLA-I-restringierte Epitope aufgrund der unterschiedlichen individuellen HLA-Kompatibilität mit den Epitopen nur eingeschränkt vergleichbar. Somit kann zur Intensität der T-Zell-Antwort nur begrenzt eine Aussage getätigt werden. Zudem unterscheiden sich die einzelnen Epitopmixe in der Anzahl der enthaltenen Epitope. Dies könnte auch zu einem Unterschied in den Intensitäten zwischen den Epitopmixen, insbesondere CI (9 Epitope) und SI (16 Epitope), beitragen.

Die ELISpot-Auswertung wurde nach Vorbild von Nelde et al. durchgeführt und ist angelehnt an ein bereits publiziertes und etabliertes Protokoll (Janetzki et al. 2015; Nelde et al. 2021). Eine weitere, komplementäre Analyse mittels Durchflusszytometrie wäre wünschenswert gewesen, war aber durch begrenztes Probenmaterial nicht möglich. Die Spozahl pro Well wurde nach oben hin begrenzt, sodass es zur Verfälschung der Intensitäten gekommen sein kann. Bei der Betrachtung der Intensität ist generell zu beachten, dass der ELISpot-Assay lediglich eine semiquantitative Methode darstellt und man somit lediglich Trends aufweisen kann. Dennoch bietet der ELISpot-Assay eine unübertroffene Sensitivität beim Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen mit niedriger Frequenz (Janetzki et al. 2015).

4.8.3 Serologie

Mithilfe des MultiCoV-Ab-Assay können SARS-CoV-2-Infektionen präzise durch eine umfassende Abdeckung verschiedener Antigene nachgewiesen werden (6 SARS-CoV-2 spezifische Antigene: trimeric full-length spike protein (Spike

Trimer), receptor-binding domain (RBD), S1 domain (S1), S2 domain (S2), full-length nucleocapsid (N) und N-terminal domain of nucleocapsid (N-NTD) und S1, N, and N-NTD-Antigene von humanpathogenen α - (NL63 and 229E) and β -HCoVs (OC43 and HKU1)) (Becker et al. 2021). In unserer Studie wurde auf IgG gegen entsprechende Antigene gescreent. Dennoch ist es möglich, dass Antikörper, die sich nicht gegen die Antigene des MultiCoV-Ab-Assays richten, nicht erfasst wurden. Insgesamt erreichte der MultiCoV-Ab allerdings eine Sensitivität von 88,3 % und eine Spezifität von 100 % mit IgG-Nachweis und damit eine bessere Sensitivität im Vergleich zu kommerziellen Tests (Becker et al. 2021).

5 Zusammenfassung

Die Verbreitung von SARS-CoV-2 stellt eine Bedrohung für die Gesundheit der gesamten Weltbevölkerung dar. Da lediglich eine symptomatische Therapie möglich ist, kommen Präventionsmaßnahmen und dem Verständnis der immunologischen Kontrolle eine wichtige Rolle zu, um die Bevölkerung und insbesondere Kinder effektiver schützen zu können.

In unserer Studie wurde die humorale und zelluläre Immunantwort in 68 Haushalten nach SARS-CoV-2-Infektion eines Haushaltmitglieds anhand von Blutproben aus dem Sommer 2020 etwa 3-4 Monate nach Infektion untersucht. Aus den Blutproben wurde Serum und PBMC gewonnen. Im Serum wurde mit Hilfe eines Multiplex-Immunoassay die Antikörper-Antwort auf SARS-CoV-2 und HCoV-229E bestimmt. Die PBMC wurden zur Untersuchung der SARS-CoV-2-spezifischen und SARS-CoV-2- und HCoV-229E-kreuzreaktiven T-zellulären Immunantwort genutzt. Dafür wurden die PBMC durch in-vitro Peptidstimulation präsensitiviert und die T-Zell-Antwort im IFN γ -ELISpot gemessen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Kinder und Jugendliche innerhalb eines Haushalts mit nachweislichem Indexfall deutlich seltener T-Zellen und Antikörper gegenüber SARS-CoV-2 gebildet haben als Erwachsene (Dulovic et al. 2025). Dies könnte darauf hindeuten, dass Kinder und Jugendliche einen gewissen Schutz vor einer Infektion mit SARS-CoV-2 aufweisen oder dass eine Infektion im Kindes- und Jugendalter weniger Zellreihen des adaptiven Immunsystems involviert oder diese Zellreihen über einen kürzeren Zeitraum nachweisbar sind als bei Erwachsenen.

Mehr als die Hälfte der Kinder, Jugendlichen und Erwachsenen, die keine SARS-CoV-2-spezifische Immunantwort zeigten, bildeten eine HCoV- und SARS-CoV-2 kreuzreaktive T-zelluläre Immunantwort aus, die potenziell eine Protektion vor einer Infektion mit SARS-CoV-2 vermittelt. Kinder, Jugendliche und Erwachsene zeigten gleiche Erkennungsraten von HCoV- und SARS-CoV-2-kreuzreaktiven Peptiden (Dulovic et al. 2025).

Insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, aber auch bei Erwachsenen, die eine SARS CoV 2-spezifische T-zelluläre Immunantwort bildeten, fand nicht

immer eine persistierende Serokonversion statt (Dulovic et al. 2025). Dies könnte entweder auf das Ausbleiben einer Serokonversion oder auf deren Kurzlebigkeit zurückzuführen sein. Der serologische Nachweis von SARS-CoV-2-spezifischen Antikörpern bildet folglich nicht repräsentativ die Gesamtheit der SARS-CoV-2-Infizierten ab. Der Nachweis von SARS-CoV-2-spezifischen Antikörpern allein ist daher ungeeignet für die Bewertung einer vorangegangenen Infektion und Rekonvaleszenz. Der Schutz durch spezifische T-Zellen bei fehlenden Antikörpern vor einer Re-Infektion mit neuen Virusvarianten oder einem schweren Krankheitsverlauf ist derzeit nicht fundiert zu bewerten. Weitere Forschung ist erforderlich, um die Komplexität des kindlichen Immunsystems und die Übertragungsdynamik in verschiedenen Altersgruppen zu verstehen und mögliche Einflussfaktoren zu ermitteln.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, NM; Grassmann, S; Sun, JC (2020): Clonal expansion of innate and adaptive lymphocytes. In: *Nature reviews. Immunology* 20, S. 694–707. DOI: 10.1038/s41577-020-0307-4.
- Adil, MT; Rahman, R; Whitelaw, D; Jain, V; Al-Ta'an, O; Rashid, F; Munasinghe, A; Jambulingam, P (2021): SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. In: *Postgraduate medical journal* 97, S. 110–116. DOI: 10.1136/postgradmedj-2020-138386.
- Agrawal, B (2019): Heterologous Immunity: Role in Natural and Vaccine-Induced Resistance to Infections. In: *Front. Immunol.* 10, 2631. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02631.
- Ahmed, SF; Quadeer, AA; McKay, MR (2020): Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. In: *Viruses* 12, 254. DOI: 10.3390/v12030254.
- Alqahtani, SAM (2024): Mucosal immunity in COVID-19: a comprehensive review. In: *Front. Immunol.* 15, 1433452. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1433452.
- Ansari, A; Sachan, S; Jit, BP; Sharma, A; Coshic, P; Sette, A; Weiskopf, D; Gupta, N (2022): An efficient immunoassay for the B cell help function of SARS-CoV-2-specific memory CD4+ T cells. In: *Cell reports methods* 2, 100224. DOI: 10.1016/j.crmeth.2022.100224.
- Araf, Y; Akter, F; Tang, Y-D; Fatemi, R; Parvez, MSA; Zheng, C; Hossain, MG (2022): Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. In: *Journal of medical virology* 94 (5), S. 1825–1832. DOI: 10.1002/jmv.27588.
- Auranen, K; Shubin, M; Erra, E; Isosomppi, S; Kontto, J; Leino, T; Lukkarinen, T (2023): Efficacy and effectiveness of case isolation and quarantine during a growing phase of the COVID-19 epidemic in Finland. In: *Scientific reports* 13, 298. DOI: 10.1038/s41598-022-27227-2.

- Baden, LR; El Sahly, HM; Essink, B; Kotloff, K; Frey, S; Novak, R; Diemert, D; Spector, SA; Roupshael, N; Creech, CB; McGettigan, J; Khetan, S; Segall, N; Solis, J; Brosz, A; Fierro, C; Schwartz, H; Neuzil, K; Corey, L; Gilbert, P; Janes, H; Follmann, D; Marovich, M; Mascola, J; Polakowski, L; Ledgerwood, J; Graham, BS; Bennett, H; Pajon, R; Knightly, C; Leav, B; Deng, W; Zhou, H; Han, S; Ivarsson, M; Miller, J; Zaks, T (2021): Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. In: *The New England journal of medicine* 384 (5), S. 403–416. DOI: 10.1056/NEJMoa2035389.
- Bardhar, S; Khanna, A (2022): The secondary attack rate (SAR) of SARS-CoV-2 in households: a systematic review. In: *Int J Res Med Sci* 10 (8), 1737. DOI: 10.18203/2320-6012.ijrms20221988.
- Becker, M; Strengert, M; Junker, D; Kaiser, PD; Kerrinnes, T; Traenkle, B; Dinter, H; Häring, J; Ghozzi, S; Zeck, A; Weise, F; Peter, A; Hörber, S; Fink, S; Ruoff, F; Dulovic, A; Bakchoul, T; Baillot, A; Lohse, S; Cornberg, M; Illig, T; Gottlieb, J; Smola, S; Karch, A; Berger, K; Rammensee, H-G; Schenke-Layland, K; Nelde, A; Märklin, M; Heitmann, JS; Walz, JS; Templin, M; Joos, TO; Rothbauer, U; Krause, G; Schneiderhan-Marra, N (2021): Exploring beyond clinical routine SARS-CoV-2 serology using MultiCoV-Ab to evaluate endemic coronavirus cross-reactivity. In: *Nat Commun* 12, 1152. DOI: 10.1038/s41467-021-20973-3.
- Bilich, T; Nelde, A; Heitmann, JS; Maringer, Y; Roerden, M; Bauer, J; Rieth, J; Wacker, M; Peter, A; Hörber, S; Rachfalski, D; Märklin, M; Stevanović, S; Rammensee, H-G; Salih, HR; Walz, JS (2021): T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals. In: *Sci. Transl. Med.* 13 (590), eabf7517. DOI: 10.1126/scitranslmed.abf7517.
- Björkander, S; Du, L; Zuo, F; Ekström, S; Wang, Y; Wan, H; Sherina, N; Schoutens, L; Andréll, J; Andersson, N; Georgelis, A; Bergström, A; Marcotte, H; Kull, I; Hammarström, L; Melén, E; Pan-Hammarström, Q (2022): SARS-CoV-2-specific B- and T-cell immunity in a population-based

study of young Swedish adults. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 149 (1), S. 65-75.e8. DOI: 10.1016/j.jaci.2021.10.014.

Bobrovitz, N; Ware, H; Ma, X; Li, Z; Hosseini, R; Cao, C; Selemon, A; Whelan, M; Premji, Z; Issa, H; Cheng, B; Abu Raddad, LJ; Buckeridge, DL; van Kerkhove, MD; Piechotta, V; Higdon, MM; Wilder-Smith, A; Bergeri, I; Feikin, DR; Arora, RK; Patel, MK; Subissi, L (2023): Protective effectiveness of previous SARS-CoV-2 infection and hybrid immunity against the omicron variant and severe disease: a systematic review and meta-regression. In: *The Lancet. Infectious diseases* 23 (5), S. 556–567. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00801-5.

Bonati, M; Campi, R; Segre, G (2022): Psychological impact of the quarantine during the COVID-19 pandemic on the general European adult population: a systematic review of the evidence. In: *Epidemiology and psychiatric sciences* 31, e27, 1–19. DOI: 10.1017/S2045796022000051.

Bonifacius, A; Tischer-Zimmermann, S; Vogel, A; Dragon, AC; Krettek, U; Gödecke, N; Yilmaz, M; Kraft, ARM; Hoepfer, MM; Pink, I; Li, Y; Welte, T; Maecker-Kolhoff, B; Martens, J; Stankov, MV; Behrens, G; Cornberg, M; David, S; Blasczyk, R; Eiz-Vesper, B; Administrator, SP (2021): Covid-19 Immune Signatures Reveal Stable Antiviral T-Cell Function Despite Declining Humoral Responses. In: *SSRN Journal* 54, S. 340–354. DOI: 10.2139/ssrn.3661946.

Boppana, S; Qin, K; Files, JK; Russell, RM; Stoltz, R; Bibollet-Ruche, F; Bansal, A; Erdmann, N; Hahn, BH; Goepfert, PA (2021): SARS-CoV-2-specific circulating T follicular helper cells correlate with neutralizing antibodies and increase during early convalescence. In: *PLoS pathogens* 17 (7), e1009761. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009761.

Braun, J; Loyal, L; Frentsch, M; Wendisch, D; Georg, P; Kurth, F; Hippenstiel, S; Dingeldey, M; Kruse, B; Fauchere, F; Baysal, E; Mangold, M; Henze, L; Lauster, R; Mall, MA; Beyer, K; Röhmel, J; Voigt, S; Schmitz, J; Miltenyi, S; Demuth, I; Müller, MA; Hocke, A; Witzernath, M; Suttorp, N; Kern, F; Reimer, U; Wenschuh, H; Drosten, C; Corman, VM; Giesecke-Thiel, C;

- Sander, LE; Thiel, A (2020): SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. In: *Nature* 587, S. 270–274. DOI: 10.1038/s41586-020-2598-9.
- Bui, H-H; Sidney, J; Dinh, K; Southwood, S; Newman, MJ; Sette, A (2006): Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. In: *BMC bioinformatics* 7, 153. DOI: 10.1186/1471-2105-7-153.
- Bundesministerium für Gesundheit (2024): Chronik zum Coronavirus SARS-CoV-2, <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/coronavirus/chronik-coronavirus> [Zugriff 19.02.2024].
- Carsetti, R; Zaffina, S; Piano Mortari, E; Terreri, S; Corrente, F; Capponi, C; Palomba, P; Mirabella, M; Cascioli, S; Palange, P; Cuccaro, I; Milito, C; Zumla, A; Maeurer, M; Camisa, V; Vinci, MR; Santoro, A; Cimini, E; Marchioni, L; Nicastrì, E; Palmieri, F; Agrati, C; Ippolito, G; Porzio, O; Concato, C; Onetti Muda, A; Raponi, M; Quintarelli, C; Quinti, I; Locatelli, F (2020): Different Innate and Adaptive Immune Responses to SARS-CoV-2 Infection of Asymptomatic, Mild, and Severe Cases. In: *Frontiers in immunology* 11, 610300. DOI: 10.3389/fimmu.2020.610300.
- Chan, JF-W; Kok, K-H; Zhu, Z; Chu, H; To, KK-W; Yuan, S; Yuen, K-Y (2020): Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. In: *Emerging microbes & infections* 9 (1), S. 221–236. DOI: 10.1080/22221751.2020.1719902.
- Chicz, RM; Urban, RG; Lane, WS; Gorga, JC; Stern, LJ; Vignali, DA; Strominger, JL (1992): Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. In: *Nature* 358 (6389), S. 764–768. DOI: 10.1038/358764a0.
- Chou, J; Thomas, PG; Randolph, AG (2022): Immunology of SARS-CoV-2 infection in children. In: *Nat Immunol* 23 (2), S. 177–185. DOI: 10.1038/s41590-021-01123-9.

- Chu, IY-H; Alam, P; Larson, HJ; Lin, L (2020): Social consequences of mass quarantine during epidemics: a systematic review with implications for the COVID-19 response. In: *Journal of travel medicine* 27 (7), taaa192. DOI: 10.1093/jtm/taaa192.
- Cohen, CA; Li, APY; Hachim, A; Hui, DSC; Kwan, MYW; Tsang, OTY; Chiu, SS; Chan, WH; Yau, YS; Kavian, N; Ma, FNL; Lau, EHY; Cheng, SMS; Poon, LLM; Peiris, M; Valkenburg, SA (2021): SARS-CoV-2 specific T cell responses are lower in children and increase with age and time after infection. In: *Nature communications* 12, 4678. DOI: 10.1038/s41467-021-24938-4.
- Coulon, P-G; Prakash, S; Dhanushkodi, NR; Srivastava, R; Zayou, L; Tifrea, DF; Edwards, RA; Figueroa, CJ; Schubl, SD; Hsieh, L; Nesburn, AB; Kuppermann, BD; Bahraoui, E; Vahed, H; Gil, D; Jones, TM; Ulmer, JB; BenMohamed, L (2024): High frequencies of alpha common cold coronavirus/SARS-CoV-2 cross-reactive functional CD4+ and CD8+ memory T cells are associated with protection from symptomatic and fatal SARS-CoV-2 infections in unvaccinated COVID-19 patients. In: *Front. Immunol.* 15, 1343716. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1343716.
- Cui, J; Li, F; Shi, Z-L (2019): Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. In: *Nature reviews. Microbiology* 17, S. 181–192. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- da Silva Antunes, R; Pallikkuth, S; Williams, E; Dawen Yu, E; Mateus, J; Quiambao, L; Wang, E; Rawlings, SA; Stadlbauer, D; Jiang, K; Amanat, F; Arnold, D; Andrews, D; Fuego, I; Dan, JM; Grifoni, A; Weiskopf, D; Krammer, F; Crotty, S; Hoffer, ME; Pahwa, SG; Sette, A (2021): Differential T-Cell Reactivity to Endemic Coronaviruses and SARS-CoV-2 in Community and Health Care Workers. In: *The Journal of Infectious Diseases* 224 (1), S. 70–80. DOI: 10.1093/infdis/jiab176.
- Davies, NG; Klepac, P; Liu, Y; Prem, K; Jit, M; Eggo, RM (2020): Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. In: *Nature medicine* 26 (8), S. 1205–1211. DOI: 10.1038/s41591-020-0962-9.

- Dendrou, CA; Petersen, J; Rossjohn, J; Fugger, L (2018): HLA variation and disease. In: *Nat Rev Immunol* 18 (5), S. 325–339. DOI: 10.1038/nri.2017.143.
- DGIIN, DIVI, DGP, DGI, AWMF-Leitlinie (2025): S3-Leitlinie - Empfehlungen zur Therapie von Patienten mit COVID-19 der Deutschen Gesellschaft für Internistische Intensivmedizin und Notfallmedizin (DGIIN), Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI), Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP), Deutschen Gesellschaft für Infektiologie (DGI), AWMF-Register-Nr. 113/001, Version 11.0, Dezember 2024, Verfügbar unter: https://register.awmf.org/assets/guidelines/113-001l_S3_Empfehlungen-zur-Therapie-von-Patienten-mit-COVID-19_2025-04.pdf, [Zugriff am 05.05.2025].
- Duan, L; Zheng, Q; Zhang, H; Niu, Y; Lou, Y; Wang, H (2020): The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens. In: *Frontiers in immunology* 11, 576622. DOI: 10.3389/fimmu.2020.576622.
- Dulovic, A; Rabsteyn, A; Remppis, J; Gentzcke, IKE; Mueller, J; Tuecks, N; Becker, M; Junker, D; Kaiser, PD; Traenkle, B; Rothbauer, U; Walz, JS; Peter, A; Hörber, S; Ganzenmueller, T; Iftner, T; Stich, M; Tönshoff, B; Henneke, P; Elling, R; Debatin, K-M; Janda, A; Schneiderhan-Marra, N; Franz, AR; Lang, P; Renk, H (2025): Longitudinal analysis of humoral and cellular immunity in SARS-CoV-2 exposed families. In: *Scientific reports* 15 (1), S. 26041. DOI: 10.1038/s41598-025-07739-3.
- Esper, FP; Adhikari, TM; Tu, ZJ; Cheng, Y-W; El-Haddad, K; Farkas, DH; Bosler, D; Rhoads, D; Procop, GW; Ko, JS; Jehi, L; Li, J; Rubin, BP (2023): Alpha to Omicron: Disease Severity and Clinical Outcomes of Major SARS-CoV-2 Variants. In: *The Journal of Infectious Diseases* 227 (3), S. 344–352. DOI: 10.1093/infdis/jiac411.

- European Centre for Disease Prevention and Control (2024): COVID-19 Vaccine Tracker, <https://vaccinetracker.ecdc.europa.eu/public/extensions/COVID-19/vaccine-tracker.html#age-group-tab> [Zugriff 21.02.2024].
- Farber, DL; Yudanin, NA; Restifo, NP (2014): Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. In: *Nat Rev Immunol* 14 (1), S. 24–35. DOI: 10.1038/nri3567.
- Fehr, AR; Perlman, S (2015): Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1282, S. 1–23. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
- Felsenstein, S; Hedrich, CM (2020): SARS-CoV-2 infections in children and young people. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 220, 108588. DOI: 10.1016/j.clim.2020.108588.
- Francis, JM; Del Leistritz-Edwards; Dunn, A; Tarr, C; Lehman, J; Dempsey, C; Hamel, A; Rayon, V; Liu, G; Wang, Y; Wille, M; Durkin, M; Hadley, K; Sheena, A; Roscoe, B; Ng, M; Rockwell, G; Manto, M; Gienger, E; Nickerson, J; Moarefi, A; Noble, M; Malia, T; Bardwell, PD; Gordon, W; Swain, J; Skoberne, M; Sauer, K; Harris, T; Goldrath, AW; Shalek, AK; Coyle, AJ; Benoist, C; Pregibon, DC (2022): Allelic variation in class I HLA determines CD8+ T cell repertoire shape and cross-reactive memory responses to SARS-CoV-2. In: *Science immunology* 7 (67), eabk3070. DOI: 10.1126/sciimmunol.abk3070.
- Funk, AL; Kuppermann, N; Florin, TA; Tancredi, DJ; Xie, J; Kim, K; Finkelstein, Y; Neuman, MI; Salvadori, MI; Yock-Corrales, A; Breslin, KA; Ambroggio, L; Chaudhari, PP; Bergmann, KR; Gardiner, MA; Nebhrajani, JR; Campos, C; Ahmad, FA; Sartori, LF; Navanandan, N; Kannikeswaran, N; Caperell, K; Morris, CR; Mintegi, S; Gangoiti, I; Sabhaney, VJ; Plint, AC; Klassen, TP; Avva, UR; Shah, NP; Dixon, AC; Lunoe, MM; Becker, SM; Rogers, AJ; Pavlicich, V; Dalziel, SR; Payne, DC; Malley, R; Borland, ML; Morrison, AK; Bhatt, M; Rino, PB; Beneyto Ferre, I; Eckerle, M; Kam, AJ; Chong, S-L; Palumbo, L; Kwok, MY; Cherry, JC; Poonai, N; Waseem, M; Simon, N-J; Freedman, SB (2022): Post-COVID-19 Conditions Among Children 90 Days

After SARS-CoV-2 Infection. In: *JAMA Netw Open* 5 (7), e2223253. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2022.23253.

Gallais, F; Velay, A; Nazon, C; Wendling, M-J; Partisani, M; Sibilia, J; Candon, S; Fafi-Kremer, S (2021): Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Associated with Cellular Immune Response without Seroconversion, France. In: *Emerging infectious diseases* 27 (1), S. 113–121. DOI: 10.3201/eid2701.203611.

Garcia, KC; Adams, EJ (2005): How the T cell receptor sees antigen - a structural view. In: *Cell* 122 (3), S. 333–336. DOI: 10.1016/j.cell.2005.07.015.

GEW Baden-Württemberg (2024): Corona-Rückblick 2022, 2021 und 2020, <https://www.gew-bw.de/aktuelles/detailseite/corona-rueckblick-2020> [Zugriff 19.02.2024].

Gil, A; Kenney, LL; Mishra, R; Watkin, LB; Aslan, N; Selin, LK (2015): Vaccination and heterologous immunity: educating the immune system. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 109 (1), S. 62–69. DOI: 10.1093/trstmh/tru198.

Girum, T; Lentiro, K; Geremew, M; Migora, B; Shewamare, S (2020): Global strategies and effectiveness for COVID-19 prevention through contact tracing, screening, quarantine, and isolation: a systematic review. In: *Tropical medicine and health* 48 (1), 91. DOI: 10.1186/s41182-020-00285-w.

Gorkhali, R; Koirala, P; Rijal, S; Mainali, A; Baral, A; Bhattarai, HK (2021): Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. In: *Bioinformatics and biology insights* 15, 11779322211025876. DOI: 10.1177/11779322211025876.

Graham, RL; Baric, RS (2010): Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. In: *Journal of Virology* 84 (7), S. 3134–3146. DOI: 10.1128/JVI.01394-09.

- Grommé, M; Neefjes, J (2002): Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. In: *Molecular immunology* 39 (3-4), S. 181–202. DOI: 10.1016/S0161-5890(02)00101-3.
- Guo, Y; Han, J; Zhang, Y; He, J; Yu, W; Zhang, X; Wu, J; Zhang, S; Kong, Y; Guo, Y; Lin, Y; Zhang, J (2022): SARS-CoV-2 Omicron Variant: Epidemiological Features, Biological Characteristics, and Clinical Significance. In: *Frontiers in immunology* 13, 877101. DOI: 10.3389/fimmu.2022.877101.
- Gupta, SL; Tyagi, R; Dhar, A; Oswal, N; Khandelwal, A; Jaiswal, RK (2023): Children's SARS-CoV-2 Infection and Their Vaccination. In: *Vaccines* 11, 418. DOI: 10.3390/vaccines11020418.
- Haan, JMM den; Arens, R; van Zelm, MC (2014): The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. In: *Immunology letters* 162 (2 Part B), S. 103–112. DOI: 10.1016/j.imlet.2014.10.011.
- Harty, JT; Tvinnereim, AR; White, DW (2000): CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. In: *Annual review of immunology* 18, S. 275–308. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.275.
- Heath, PT; Galiza, EP; Baxter, DN; Boffito, M; Browne, D; Burns, F; Chadwick, DR; Clark, R; Cosgrove, C; Galloway, J; Goodman, AL; Heer, A; Higham, A; Iyengar, S; Jamal, A; Jeanes, C; Kalra, PA; Kyriakidou, C; McAuley, DF; Meyrick, A; Minassian, AM; Minton, J; Moore, P; Munsoor, I; Nicholls, H; Osanlou, O; Packham, J; Pretswell, CH; San Francisco Ramos, A; Saralaya, D; Sheridan, RP; Smith, R; Soiza, RL; Swift, PA; Thomson, EC; Turner, J; Viljoen, ME; Albert, G; Cho, I; Dubovsky, F; Glenn, G; Rivers, J; Robertson, A; Smith, K; Toback, S (2021): Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. In: *The New England journal of medicine* 385 (13), S. 1172–1183. DOI: 10.1056/NEJMoa2107659.
- Heesters, BA; van der Poel, CE; Das, A; Carroll, MC (2016): Antigen Presentation to B Cells. In: *Trends in immunology* 37 (12), S. 844–854. DOI: 10.1016/j.it.2016.10.003.

- Heikkinen, T; Järvinen, A (2003): The common cold. In: *Lancet (London, England)* 361 (9351), S. 51–59. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12162-9.
- Hobbs, CV; Khaitan, A; Kirmse, BM; Borkowsky, W (2020): COVID-19 in Children: A Review and Parallels to Other Hyperinflammatory Syndromes. In: *Frontiers in pediatrics* 8, 593455. DOI: 10.3389/fped.2020.593455.
- Hu, B; Guo, H; Zhou, P; Shi, Z-L (2021): Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. In: *Nature reviews. Microbiology* 19 (3), S. 141–154. DOI: 10.1038/s41579-020-00459-7.
- Huang, CQ; Vishwanath, S; Carnell, GW; Chan, ACY; Heeney, JL (2023): Immune imprinting and next-generation coronavirus vaccines. In: *Nature microbiology* 8 (11), S. 1971–1985. DOI: 10.1038/s41564-023-01505-9.
- Israelow, B; Mao, T; Klein, J; Song, E; Menasche, B; Omer, SB; Iwasaki, A (2021): Adaptive immune determinants of viral clearance and protection in mouse models of SARS-CoV-2. In: *Science immunology* 6 (64), eabl4509. DOI: 10.1126/sciimmunol.abl4509.
- Itano, AA; Jenkins, MK (2003): Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. In: *Nat Immunol* 4 (8), S. 733–739. DOI: 10.1038/ni957.
- Jackson, CB; Farzan, M; Chen, B; Choe, H (2022): Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 23 (1), S. 3–20. DOI: 10.1038/s41580-021-00418-x.
- Janetzki, S; Price, L; Schroeder, H; Britten, CM; Welters, MJP; Hoos, A (2015): Guidelines for the automated evaluation of Elispot assays. In: *Nature protocols* 10 (7), S. 1098–1115. DOI: 10.1038/nprot.2015.068.
- Jin, P; Wang, E (2003): Polymorphism in clinical immunology - From HLA typing to immunogenetic profiling. In: *Journal of translational medicine* 1, 8. DOI: 10.1186/1479-5876-1-8.
- Kalfaoglu, B; Almeida-Santos, J; Tye, CA; Satou, Y; Ono, M (2021): T-cell dysregulation in COVID-19. In: *Biochemical and biophysical research communications* 538, S. 204–210. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.10.079.

- Kesheh, MM; Hosseini, P; Soltani, S; Zandi, M (2022): An overview on the seven pathogenic human coronaviruses. In: *Reviews in medical virology* 32 (2), e2282. DOI: 10.1002/rmv.2282.
- Khemiri, H; Ayouni, K; Triki, H; Haddad-Boubaker, S (2022): SARS-CoV-2 infection in pediatric population before and during the Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529) variants era. In: *Virology journal* 19, 144. DOI: 10.1186/s12985-022-01873-4.
- Khoury, DS; Cromer, D; Reynaldi, A; Schlub, TE; Wheatley, AK; Juno, JA; Subbarao, K; Kent, SJ; Triccas, JA; Davenport, MP (2021): Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. In: *Nature medicine* 27 (7), S. 1205–1211. DOI: 10.1038/s41591-021-01377-8.
- Kim, Y; Bae, S; Chang, H-H; Kim, S-W (2023): Long COVID prevalence and impact on quality of life 2 years after acute COVID-19. In: *Scientific reports* 13, 11207. DOI: 10.1038/s41598-023-36995-4.
- Klein, J; Sato, A (2000): The HLA system. First of two parts. In: *The New England journal of medicine* 343 (10), S. 702–709. DOI: 10.1056/NEJM200009073431006.
- Kleiveland, CR (2015): The impact of food bioactives on gut health. In vitro and ex vivo models. Chapter 15 - Peripheral Blood Mononuclear Cells. Hg. v. Kitty Verhoeckx und Paul Cotter: Springer Open, Cham.
- Kollmann, TR; Kampmann, B; Mazmanian, SK; Marchant, A; Levy, O (2017): Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. In: *Immunity* 46 (3), S. 350–363. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.03.009.
- Krummel, MF; Bartumeus, F; Gérard, A (2016): T cell migration, search strategies and mechanisms. In: *Nature reviews. Immunology* 16 (3), S. 193–201. DOI: 10.1038/nri.2015.16.
- Kundu, R; Narean, JS; Wang, L; Fenn, J; Pillay, T; Fernandez, ND; Conibear, E; Koycheva, A; Davies, M; Tolosa-Wright, M; Hakki, S; Varro, R; McDermott,

E; Hammett, S; Cutajar, J; Thwaites, RS; Parker, E; Rosadas, C; McClure, M; Tedder, R; Taylor, GP; Dunning, J; Lalvani, A (2022): Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. In: *Nat Commun* 13 (1), 80. DOI: 10.1038/s41467-021-27674-x.

Kurosaki, T; Kometani, K; Ise, W (2015): Memory B cells. In: *Nat Rev Immunol* 15 (3), S. 149–159. DOI: 10.1038/nri3802.

Lam, N; Lee, Y; Farber, DL (2024): A guide to adaptive immune memory. In: *Nat Rev Immunol* 24, S. 810–829. DOI: 10.1038/s41577-024-01040-6.

Laue, M; Kauter, A; Hoffmann, T; Möller, L; Michel, J; Nitsche, A (2021): Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. In: *Scientific reports* 11, 3515. DOI: 10.1038/s41598-021-82852-7.

Le Bert, N; Tan, AT; Kunasegaran, K; Tham, CYL; Hafezi, M; Chia, A; Chng, MHY; Lin, M; Tan, N; Linster, M; Chia, WN; Chen, MI-C; Wang, L-F; Ooi, EE; Kalimuddin, S; Tambyah, PA; Low, JG-H; Tan, Y-J; Bertoletti, A (2020): SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. In: *Nature* 584, S. 457–462. DOI: 10.1038/s41586-020-2550-z.

Lewis, HC; Marcato, AJ; Meagher, N; Valenciano, M; Villanueva-Cabezas, J-P; Spirkoska, V; Fielding, JE; Karahalios, A; Subissi, L; Nardone, A; Cheng, B; Rajatonirina, S; Okeibunor, J; Aly, EA; Barakat, A; Jorgensen, P; Azim, T; Wijesinghe, PR; Le, L-V; Rodriguez, A; Vicari, A; van Kerkhove, MD; McVernon, J; Pebody, R; Price, DJ; Bergeri, I; Al Areqi, L; Alemu, MA; Alvi, Y; Bukusi, EA; Chung, PS; Dambadarjaa, D; Das, AK; Dub, T; Dulacha, D; Ebrahim, F; González-Duarte, MA; Guruge, D; Heraud, J-M; Heredia-Melo, DC; Herman-Roloff, A; Herring, BL; Inbanathan, FY; Islam, F; Jeewandara, KC; Kant, S; Khan, W; Lako, R; Leite, J; Malavige, GN; Mandakh, U; Mariam, W; Mend, T; Mize, VA; Musa, S; Nohynek, H; Olu, OO; Osorio-Merchán, MB; Pereyaslov, D; Randremanana, RV; Dieu Randria, MJ de; Ransom, J; Saxena, S; Sharma, P; Sreedevi, A; Satheesh, M; Subhashini,

- KJ; Tippet-Barr, BA; Usha, A; Wamala, JF; Watore, SH; Yadav, K (2022): Transmission of SARS-CoV-2 in standardised first few X cases and household transmission investigations: A systematic review and meta-analysis. In: *Influenza and other respiratory viruses* 16 (5), S. 803–819. DOI: 10.1111/irv.13002.
- Liguoro, I; Pilotto, C; Bonanni, M; Ferrari, ME; Pusiol, A; Nocerino, A; Vidal, E; Cogo, P (2020): SARS-COV-2 infection in children and newborns: a systematic review. In: *Eur J Pediatr* 179 (7), S. 1029–1046. DOI: 10.1007/s00431-020-03684-7.
- Liu, J; Chandrashekar, A; Sellers, D; Barrett, J; Jacob-Dolan, C; Lifton, M; McMahan, K; Sciacca, M; VanWyk, H; Wu, C; Yu, J; Collier, A-RY; Barouch, DH (2022): Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron. In: *Nature* 603, S. 493–496. DOI: 10.1038/s41586-022-04465-y.
- Loyal, L; Braun, J; Henze, L; Kruse, B; Dingeldey, M; Reimer, U; Kern, F; Schwarz, T; Mangold, M; Unger, C; Dörfler, F; Kadler, S; Rosowski, J; Gürcan, K; Uyar-Aydin, Z; Frentsch, M; Kurth, F; Schnatbaum, K; Eckey, M; Hippenstiel, S; Hocke, A; Müller, MA; Sawitzki, B; Miltenyi, S; Paul, F; Mall, MA; Wenschuh, H; Voigt, S; Drosten, C; Lauster, R; Lachman, N; Sander, L-E; Corman, VM; Röhmel, J; Meyer-Arndt, L; Thiel, A; Giesecke-Thiel, C (2021): Cross-reactive CD4+ T cells enhance SARS-CoV-2 immune responses upon infection and vaccination. In: *Science* 374 (6564), eabh1823. DOI: 10.1126/science.abh1823.
- Lu, LL; Suscovich, TJ; Fortune, SM; Alter, G (2018): Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. In: *Nat Rev Immunol* 18, S. 46–61. DOI: 10.1038/nri.2017.106.
- Luijten, MAJ; van Muilekom, MM; Teela, L; Polderman, TJC; Terwee, CB; Zijlmans, J; Klaufus, L; Popma, A; Oostrom, KJ; van Oers, HA; Haverman, L (2021): The impact of lockdown during the COVID-19 pandemic on mental and social health of children and adolescents. In: *Quality of life research* :

an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation 30, S. 2795–2804. DOI: 10.1007/s11136-021-02861-x.

Madewell, ZJ; Yang, Y; Longini, IM; Halloran, ME; Dean, NE (2020): Household Transmission of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *JAMA network open* 3 (12), e2031756. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.31756.

Medhasi, S; Chantratita, N (2022): Human Leukocyte Antigen (HLA) System: Genetics and Association with Bacterial and Viral Infections. In: *Journal of immunology research* 2022, 9710376. DOI: 10.1155/2022/9710376.

Mehta, NS; Mytton, OT; Mullins, EWS; Fowler, TA; Falconer, CL; Murphy, OB; Langenberg, C; Jayatunga, WJP; Eddy, DH; Nguyen-Van-Tam, JS (2020): SARS-CoV-2 (COVID-19): What Do We Know About Children? A Systematic Review. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 71 (9), S. 2469–2479. DOI: 10.1093/cid/ciaa556.

Moss, P (2022): The T cell immune response against SARS-CoV-2. In: *Nat Immunol* 23 (2), S. 186–193. DOI: 10.1038/s41590-021-01122-w.

Muik, A; Lui, BG; Quandt, J; Diao, H; Fu, Y; Bacher, M; Gordon, J; Toker, A; Grosser, J; Ozhelvaci, O; Grikscheit, K; Hoehl, S; Kohmer, N; Lustig, Y; Regev-Yochay, G; Ciesek, S; Beguir, K; Poran, A; Vogler, I; Türeci, Ö; Sahin, U (2023): Progressive loss of conserved spike protein neutralizing antibody sites in Omicron sublineages is balanced by preserved T cell immunity. In: *Cell Reports* 42 (8), 112888. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112888.

Müller JS (2025): Epidemiologische Untersuchung der spezifischen T-Zell-Immunantwort in Familien nach Infektion mit SARS-CoV-2. Medizinische Dissertation, Universität Tübingen.

Murphy, K; Weaver, C (2018): Janeway Immunologie. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.

- Murray, SM; Ansari, AM; Frater, J; Klenerman, P; Dunachie, S; Barnes, E; Ogbe, A (2023): The impact of pre-existing cross-reactive immunity on SARS-CoV-2 infection and vaccine responses. In: *Nat Rev Immunol* 23 (5), S. 304–316. DOI: 10.1038/s41577-022-00809-x.
- Nalbandian, A; Desai, AD; Wan, EY (2023): Post-COVID-19 Condition. In: *Annual review of medicine* 74, S. 55–64. DOI: 10.1146/annurev-med-043021-030635.
- Nathanielsz, J; Toh, ZQ; Do, LAH; Mulholland, K; Licciardi, PV (2023): SARS-CoV-2 infection in children and implications for vaccination. In: *Pediatric research* 93 (5), S. 1177–1187. DOI: 10.1038/s41390-022-02254-x.
- National Institutes of Health (NIH) (2024): COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. [Zugriff 22.02.2024].
- Neefjes, J; Jongma, MLM; Paul, P; Bakke, O (2011): Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. In: *Nat Rev Immunol* 11 (12), S. 823–836. DOI: 10.1038/nri3084.
- Nelde, A; Bilich, T; Heitmann, JS; Maringer, Y; Salih, HR; Roerden, M; Lübke, M; Bauer, J; Rieth, J; Wacker, M; Peter, A; Hörber, S; Traenkle, B; Kaiser, PD; Rothbauer, U; Becker, M; Junker, D; Krause, G; Strengert, M; Schneiderhan-Marra, N; Templin, MF; Joos, TO; Kowalewski, DJ; Stos-Zweifel, V; Fehr, M; Rabsteyn, A; Mirakaj, V; Karbach, J; Jäger, E; Graf, M; Gruber, L-C; Rachfalski, D; Preuß, B; Hagelstein, I; Märklin, M; Bakchoul, T; Gouttefangeas, C; Kohlbacher, O; Klein, R; Stevanović, S; Rammensee, H-G; Walz, JS (2021): SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. In: *Nat Immunol* 22 (1), S. 74–85. DOI: 10.1038/s41590-020-00808-x.
- Nickbakhsh, S; Ho, A; Marques, DFP; McMenamin, J; Gunson, RN; Murcia, PR (2020): Epidemiology of Seasonal Coronaviruses: Establishing the Context for the Emergence of Coronavirus Disease 2019. In: *The Journal of Infectious Diseases* 222 (1), S. 17–25. DOI: 10.1093/infdis/jiaa185.

- Pamer, E; Cresswell, P (1998): Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. In: *Annual review of immunology* 16, S. 323–358. DOI: 10.1146/annurev.immunol.16.1.323.
- Patel, JM (2022): Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C). In: *Current allergy and asthma reports* 22 (5), S. 53–60. DOI: 10.1007/s11882-022-01031-4.
- Peters, B; Nielsen, M; Sette, A (2020): T Cell Epitope Predictions. In: *Annual review of immunology* 38, S. 123–145. DOI: 10.1146/annurev-immunol-082119-124838.
- Pierce, CA; Preston-Hurlburt, P; Dai, Y; Aschner, CB; Cheshenko, N; Galen, B; Garforth, SJ; Herrera, NG; Jangra, RK; Morano, NC; Orner, E; Sy, S; Chandran, K; Dziura, J; Almo, SC; Ring, A; Keller, MJ; Herold, KC; Herold, BC (2020): Immune responses to SARS-CoV-2 infection in hospitalized pediatric and adult patients. In: *Sci. Transl. Med.* 12 (564). DOI: 10.1126/scitranslmed.abd5487.
- Pieren, DKJ; Boer, MC; Wit, J de (2022): The adaptive immune system in early life: The shift makes it count. In: *Front. Immunol.* 13, 1031924. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1031924.
- Pishesha, N; Harmand, TJ; Ploegh, HL (2022): A guide to antigen processing and presentation. In: *Nature reviews. Immunology* 22 (12), S. 751–764. DOI: 10.1038/s41577-022-00707-2.
- Polack, FP; Thomas, SJ; Kitchin, N; Absalon, J; Gurtman, A; Lockhart, S; Perez, JL; Pérez Marc, G; Moreira, ED; Zerbini, C; Bailey, R; Swanson, KA; Roychoudhury, S; Koury, K; Li, P; Kalina, WV; Cooper, D; Frenck, RW; Hammitt, LL; Türeci, Ö; Nell, H; Schaefer, A; Ünal, S; Tresnan, DB; Mather, S; Dormitzer, PR; Şahin, U; Jansen, KU; Gruber, WC (2020): Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. In: *The New England journal of medicine* 383 (27), S. 2603–2615. DOI: 10.1056/NEJMoa2034577.

- Power, CA; Grand, CL; Ismail, N; Peters, NC; Yurkowski, DP; Bretscher, PA (1999): A valid ELISPOT assay for enumeration of ex vivo, antigen-specific, IFN γ -producing T cells. In: *Journal of immunological methods* 227 (1-2), S. 99–107. DOI: 10.1016/s0022-1759(99)00074-5.
- Pušnik, J; Zorn, J; Monzon-Posadas, WO; Peters, K; Osypchuk, E; Blaschke, S; Streeck, H (2024): Vaccination impairs de novo immune response to omicron breakthrough infection, a precondition for the original antigenic sin. In: *Nat Commun* 15, 3102. DOI: 10.1038/s41467-024-47451-w.
- Renk, H; Dulovic, A; Seidel, A; Becker, M; Fabricius, D; Zernickel, M; Junker, D; Groß, R; Müller, J; Hilger, A; Bode, SFN; Fritsch, L; Friehe, P; Haddad, A; Görne, T; Remppis, J; Ganzemueller, T; Dietz, A; Huzly, D; Hengel, H; Kaier, K; Weber, S; Jacobsen, E-M; Kaiser, PD; Traenkle, B; Rothbauer, U; Stich, M; Tönshoff, B; Hoffmann, GF; Müller, B; Ludwig, C; Jahrsdörfer, B; Schrezenmeier, H; Peter, A; Hörber, S; Iftner, T; Münch, J; Stamminger, T; Groß, H-J; Wolkewitz, M; Engel, C; Liu, W; Rizzi, M; Hahn, BH; Henneke, P; Franz, AR; Debatin, K-M; Schneiderhan-Marra, N; Janda, A; Elling, R (2022): Robust and durable serological response following pediatric SARS-CoV-2 infection. In: *Nat Commun* 13, 128. DOI: 10.1038/s41467-021-27595-9.
- Reynolds, CJ; Pade, C; Gibbons, JM; Otter, AD; Lin, K-M; Muñoz Sandoval, D; Pieper, FP; Butler, DK; Liu, S; Joy, G; Forooghi, N; Treibel, TA; Manisty, C; Moon, JC; Semper, A; Brooks, T; McKnight, Á; Altmann, DM; Boyton, RJ; Abbass, H; Abiodun, A; Alfarihi, M; Alldis, Z; Amin, OE; Andiapien, M; Artico, J; Augusto, JB; Baca, GL; Bailey, SNL; Bhuvana, AN; Boulter, A; Bowles, R; Bracken, OV; O'Brien, B; Bullock, N; Captur, G; Carr, O; Champion, N; Chan, C; Chandran, A; Coleman, T; Couto de Sousa, J; Couto-Parada, X; Cross, E; Cutino-Moguel, T; D'Arcangelo, S; Davies, RH; Douglas, B; Di Genova, C; Dieobi-Anene, K; Diniz, MO; Ellis, A; Feehan, K; Finlay, M; Fontana, M; Francis, S; Gillespie, D; Gilroy, D; Hamblin, M; Harker, G; Hemingway, G; Hewson, J; Heywood, W; Hickling, LM; Hicks, B; Hingorani, AD; Howes, L; Itua, I; Jardim, V; Lee, W-YJ; Jensen, M; Jones, J; Jones, M;

Kapil, V; Kelly, C; Kurdi, H; Lambourne, J; Lloyd, A; Louth, S; Maini, MK; Mandadapu, V; Menacho, K; Mfuko, C; Mills, K; Millward, S; Mitchelmore, O; Moon, C; Moon, J; Murray, SM; Noursadeghi, M; Otter, A; Palma, S; Parker, R; Patel, K; Pawarova, M; Petersen, SE; Piniera, B; Rannigan, L; Rapala, A; Richards, A; Robathan, M; Rosenheim, J; Rowe, C; Royds, M; Sackville West, J; Sambile, G; Schmidt, NM; Selman, H; Seraphim, A; Simion, M; Smit, A; Sugimoto, M; Swadling, L; Taylor, S; Temperton, N; Thomas, S; Thornton, GD; Tucker, A; Varghese, A; Veerapen, J; Vijayakumar, M; Warner, T; Welch, S; White, H; Wodehouse, T; Wynne, L; Zahedi, D; Chain, B (2022): Immune boosting by B.1.1.529 (Omicron) depends on previous SARS-CoV-2 exposure. In: *Science* 377 (6603), eabq1841. DOI: 10.1126/science.abq1841.

Rodda, LB; Netland, J; Shehata, L; Pruner, KB; Morawski, PA; Thouvenel, CD; Takehara, KK; Eggenberger, J; Hemann, EA; Waterman, HR; Fahning, ML; Chen, Y; Hale, M; Rathe, J; Stokes, C; Wrenn, S; Fiala, B; Carter, L; Hamerman, JA; King, NP; Gale, M; Campbell, DJ; Rawlings, DJ; Pepper, M (2021): Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. In: *Cell* 184 (1), S. 169–183.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2020.11.029.

Rossjohn, J; Gras, S; Miles, JJ; Turner, SJ; Godfrey, DI; McCluskey, J (2015): T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. In: *Annual review of immunology* Volume 33, 2015, S. 169–200. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112334.

Rotulo, GA; Palma, P (2023): Understanding COVID-19 in children: immune determinants and post-infection conditions. In: *Pediatric research* 94 (2), S. 434–442. DOI: 10.1038/s41390-023-02549-7.

Rudolph, MG; Stanfield, RL; Wilson, IA (2006): How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. In: *Annual review of immunology* 24, S. 419–466. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658.

- Russell, MW; Moldoveanu, Z; Ogra, PL; Mestecky, J (2020): Mucosal Immunity in COVID-19: A Neglected but Critical Aspect of SARS-CoV-2 Infection. In: *Front. Immunol.* 11, 611337. DOI: 10.3389/fimmu.2020.611337.
- Rydzynski Moderbacher, C; Ramirez, SI; Dan, JM; Grifoni, A; Hastie, KM; Weiskopf, D; Belanger, S; Abbott, RK; Kim, C; Choi, J; Kato, Y; Crotty, EG; Kim, C; Rawlings, SA; Mateus, J; Tse, LPV; Frazier, A; Baric, R; Peters, B; Greenbaum, J; Ollmann Saphire, E; Smith, DM; Sette, A; Crotty, S (2020): Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. In: *Cell* 183 (4), S. 996-1012.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.038.
- Sagar, M; Reifler, K; Rossi, M; Miller, NS; Sinha, P; White, LF; Mizgerd, JP (2021): Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19. In: *The Journal of clinical investigation* 131 (1), e143380. DOI: 10.1172/JCI143380.
- Saletti, G; Gerlach, T; Jansen, JM; Molle, A; Elbahesh, H; Ludlow, M; Li, W; Bosch, B-J; Osterhaus, ADME; Rimmelzwaan, GF (2020): Older adults lack SARS CoV-2 cross-reactive T lymphocytes directed to human coronaviruses OC43 and NL63. In: *Scientific reports* 10, 21447. DOI: 10.1038/s41598-020-78506-9.
- Sanchez-Ramirez, DC; Normand, K; Zhaoyun, Y; Torres-Castro, R (2021): Long-Term Impact of COVID-19: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. In: *Biomedicines* 9 (8), 900. DOI: 10.3390/biomedicines9080900.
- Saso, A; Kampmann, B (2017): Vaccine responses in newborns. In: *Seminars in immunopathology* 39 (6), S. 627–642. DOI: 10.1007/s00281-017-0654-9.
- Schuijs, MJ; Hammad, H; Lambrecht, BN (2019): Professional and 'Amateur' Antigen-Presenting Cells In Type 2 Immunity. In: *Trends in immunology* 40 (1), S. 22–34. DOI: 10.1016/j.it.2018.11.001.
- Schwarzkopf, S; Krawczyk, A; Knop, D; Klump, H; Heinold, A; Heinemann, FM; Thümmler, L; Temme, C; Breyer, M; Witzke, O; Dittmer, U; Lenz, V; Horn, PA; Lindemann, M (2021): Cellular Immunity in COVID-19 Convalescents

with PCR-Confirmed Infection but with Undetectable SARS-CoV-2–Specific IgG. In: *Emerg. Infect. Dis.* 27 (1), S. 122–129. DOI: 10.3201/eid2701.203772.

Sealy, RE; Hurwitz, JL (2021): Cross-Reactive Immune Responses toward the Common Cold Human Coronaviruses and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Mini-Review and a Murine Study. In: *Microorganisms* 9 (8), 1643. DOI: 10.3390/microorganisms9081643.

Sebzda, E; Mariathasan, S; Ohteki, T; Jones, R; Bachmann, MF; Ohashi, PS (1999): Selection of the T cell repertoire. In: *Annual review of immunology* Volume 17, 1999, S. 829–874. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.829.

Seder, RA; Ahmed, R (2003): Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. In: *Nat Immunol* 4 (9), S. 835–842. DOI: 10.1038/ni969.

Sekine, T; Perez-Potti, A; Rivera-Ballesteros, O; Strålin, K; Gorin, J-B; Olsson, A; Llewellyn-Lacey, S; Kamal, H; Bogdanovic, G; Muschiol, S; Wullimann, DJ; Kammann, T; Emgård, J; Parrot, T; Folkesson, E; Rooyackers, O; Eriksson, LI; Henter, J-I; Sönnnerborg, A; Allander, T; Albert, J; Nielsen, M; Klingström, J; Gredmark-Russ, S; Björkström, NK; Sandberg, JK; Price, DA; Ljunggren, H-G; Aleman, S; Buggert, M (2020): Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. In: *Cell* 183 (1), S. 158-168.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.017.

Seow, J; Graham, C; Merrick, B; Acors, S; Pickering, S; Steel, KJA; Hemmings, O; O'Byrne, A; Kouphou, N; Galao, RP; Betancor, G; Wilson, HD; Signell, AW; Winstone, H; Kerridge, C; Huettner, I; Jimenez-Guardeño, JM; Lista, MJ; Temperton, N; Snell, LB; Bisnauthsing, K; Moore, A; Green, A; Martinez, L; Stokes, B; Honey, J; Izquierdo-Barras, A; Arbane, G; Patel, A; Tan, MKI; O'Connell, L; O'Hara, G; MacMahon, E; Douthwaite, S; Nebbia, G; Batra, R; Martinez-Nunez, R; Shankar-Hari, M; Edgeworth, JD; Neil, SJD; Malim, MH; Doores, KJ (2020): Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-

CoV-2 infection in humans. In: *Nature microbiology* 5 (12), S. 1598–1607. DOI: 10.1038/s41564-020-00813-8.

Setiabudi, D; Sribudiani, Y; Hermawan, K; Andriyoko, B; Nataprawira, HM (2022): The Omicron variant of concern: The genomics, diagnostics, and clinical characteristics in children. In: *Frontiers in pediatrics* 10, 898463. DOI: 10.3389/fped.2022.898463.

Sette, A; Crotty, S (2021): Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. In: *Cell* 184 (4), S. 861–880. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.007.

Shen, K; Yang, Y; Wang, T; Zhao, D; Jiang, Y; Jin, R; Zheng, Y; Xu, B; Xie, Z; Lin, L; Shang, Y; Lu, X; Shu, S; Bai, Y; Deng, J; Lu, M; Ye, L; Wang, X; Wang, Y; Gao, L (2020): Diagnosis, treatment, and prevention of 2019 novel coronavirus infection in children: experts' consensus statement. In: *World journal of pediatrics : WJP* 16 (3), S. 223–231. DOI: 10.1007/s12519-020-00343-7.

Shevryev, D; Tereshchenko, V (2019): Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. In: *Front. Immunol.* 10, 3100. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03100.

Silva, MJA; Ribeiro, LR; Lima, KVB; Lima, LNGC (2022): Adaptive immunity to SARS-CoV-2 infection: A systematic review. In: *Front. Immunol.* 13, 1001198. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1001198.

Singh, S; Roy, D; Sinha, K; Parveen, S; Sharma, G; Joshi, G (2020): Impact of COVID-19 and lockdown on mental health of children and adolescents: A narrative review with recommendations. In: *Psychiatry Research* 293, 113429. DOI: 10.1016/j.psychres.2020.113429.

Smith-Garvin, JE; Koretzky, GA; Jordan, MS (2009): T cell activation. In: *Annual review of immunology* 27, S. 591–619. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.

Stein, C; Nassereldine, H; Sorensen, RJD; Amlag, JO; Bisignano, C; Byrne, S; Castro, E; Coberly, K; Collins, JK; Dalos, J; Daoud, F; Deen, A; Gakidou, E; Giles, JR; Hulland, EN; Huntley, BM; Kinzel, KE; Lozano, R; Mokdad, AH;

- Pham, T; Pigott, DM; Reiner Jr, RC; Vos, T; Hay, SI; Murray, CJL; Lim, SS; COVID-19 Forecasting Team (2023): Past SARS-CoV-2 infection protection against re-infection: a systematic review and meta-analysis. In: *Lancet (London, England)* 401 (10379), S. 833–842. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02465-5.
- Stone, JD; Chervin, AS; Kranz, DM (2009): T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. In: *Immunology* 126 (2), S. 165–176. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.03015.x.
- Tan, AT; Linster, M; Tan, CW; Le Bert, N; Chia, WN; Kunasegaran, K; Zhuang, Y; Tham, CYL; Chia, A; Smith, GJD; Young, B; Kalimuddin, S; Low, JGH; Lye, D; Wang, L-F; Bertoletti, A (2021): Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. In: *Cell Reports* 34 (6), 108728. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108728.
- Tönshoff, B; Müller, B; Elling, R; Renk, H; Meissner, P; Hengel, H; Garbade, SF; Kieser, M; Jeltsch, K; Grulich-Henn, J; Euler, J; Stich, M; Chobanyan-Jürgens, K; Zernickel, M; Janda, A; Wölfle, L; Stamminger, T; Iftner, T; Ganzenmueller, T; Schmitt, C; Görne, T; Laketa, V; Olberg, S; Plaszczyca, A; Cortese, M; Bartenschlager, R; Pape, C; Remme, R; Huzly, D; Panning, M; Weigang, S; Giese, S; Ciminski, K; Ankerhold, J; Kochs, G; Schwemmler, M; Handgretinger, R; Niemeyer, CM; Engel, C; Kern, WV; Hoffmann, GF; Franz, AR; Henneke, P; Debatin, K-M; Kräusslich, H-G (2021): Prevalence of SARS-CoV-2 Infection in Children and Their Parents in Southwest Germany. In: *JAMA pediatrics* 175 (6), S. 586–593. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2021.0001.
- Torjesen, I (2022): Covid-19: Omicron variant is linked to steep rise in hospital admissions of very young children. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 376, o110. DOI: 10.1136/bmj.o110.
- Trapani, JA; Smyth, MJ (2002): Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. In: *Nature reviews. Immunology* 2 (10), S. 735–747. DOI: 10.1038/nri911.

- Trinité, B; Tarrés-Freixas, F; Rodon, J; Pradenas, E; Urrea, V; Marfil, S; La Rodríguez de Concepción, ML; Ávila-Nieto, C; Aguilar-Gurrieri, C; Barajas, A; Ortiz, R; Paredes, R; Mateu, L; Valencia, A; Guallar, V; Ruiz, L; Grau, E; Massanella, M; Puig, J; Chamorro, A; Izquierdo-Useros, N; Segalés, J; Clotet, B; Carrillo, J; Vergara-Alert, J; Blanco, J (2021): SARS-CoV-2 infection elicits a rapid neutralizing antibody response that correlates with disease severity. In: *Scientific reports* 11, 2608. DOI: 10.1038/s41598-021-81862-9.
- Valiathan, R; Ashman, M; Asthana, D (2016): Effects of Ageing on the Immune System: Infants to Elderly. In: *Scandinavian journal of immunology* 83 (4), S. 255–266. DOI: 10.1111/sji.12413.
- Verhoeven, D; Teijaro, JR; Farber, DL (2008): Heterogeneous memory T cells in antiviral immunity and immunopathology. In: *Viral Immunology* 21 (2), S. 99–113. DOI: 10.1089/vim.2008.0002.
- Viner, RM; Mytton, OT; Bonell, C; Melendez-Torres, GJ; Ward, J; Hudson, L; Waddington, C; Thomas, J; Russell, S; van der Klis, F; Koirala, A; Ladhani, S; Panovska-Griffiths, J; Davies, NG; Booy, R; Eggo, RM (2021): Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adolescents Compared With Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *JAMA Pediatr* 175 (2), S. 143–156. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.4573.
- Vinuesa, CG; Tangye, SG; Moser, B; Mackay, CR (2005): Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. In: *Nat Rev Immunol* 5 (11), S. 853–865. DOI: 10.1038/nri1714.
- Vita, R; Overton, JA; Greenbaum, JA; Ponomarenko, J; Clark, JD; Cantrell, JR; Wheeler, DK; Gabbard, JL; Hix, D; Sette, A; Peters, B (2015): The immune epitope database (IEDB) 3.0. In: *Nucleic acids research* 43 (D1), D405-12. DOI: 10.1093/nar/gku938.
- Walls, AC; Park, Y-J; Tortorici, MA; Wall, A; McGuire, AT; Velesler, D (2020): Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. In: *Cell* 181 (2), 281–292. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.

- Ward, H; Whitaker, M; Flower, B; Tang, SN; Atchison, C; Darzi, A; Donnelly, CA; Cann, A; Diggle, PJ; Ashby, D; Riley, S; Barclay, WS; Elliott, P; Cooke, GS (2022): Population antibody responses following COVID-19 vaccination in 212,102 individuals. In: *Nat Commun* 13, 907. DOI: 10.1038/s41467-022-28527-x.
- Welsh, RM; Che, JW; Brehm, MA; Selin, LK (2010): Heterologous immunity between viruses. In: *Immunological reviews* 235 (1), S. 244–266. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2010.00897.x.
- Yang, S; Yu, Y; Xu, Y; Jian, F; Song, W; Yisimayi, A; Wang, P; Wang, J; Liu, J; Yu, L; Niu, X; Wang, Y; Shao, F; Jin, R; Wang, Y; Cao, Y (2024): Fast evolution of SARS-CoV-2 BA.2.86 to JN.1 under heavy immune pressure. In: *The Lancet. Infectious diseases* 24 (2), e70-e72. DOI: 10.1016/S1473-3099(23)00744-2.
- Yoshida, M; Worlock, KB; Huang, N; Lindeboom, RGH; Butler, CR; Kumasaka, N; Dominguez Conde, C; Mamanova, L; Bolt, L; Richardson, L; Polanski, K; Madisson, E; Barnes, JL; Allen-Hyttinen, J; Kilich, E; Jones, BC; Wilton, A de; Wilbrey-Clark, A; Sungnak, W; Pett, JP; Weller, J; Prigmore, E; Yung, H; Mehta, P; Saleh, A; Saigal, A; Chu, V; Cohen, JM; Cane, C; Iordanidou, A; Shibuya, S; Reuschl, A-K; Herczeg, IT; Argento, AC; Wunderink, RG; Smith, SB; Poor, TA; Gao, CA; Dematte, JE; Reynolds, G; Haniffa, M; Bowyer, GS; Coates, M; Clatworthy, MR; Calero-Nieto, FJ; Göttgens, B; O'Callaghan, C; Sebire, NJ; Jolly, C; Coppi, P de; Smith, CM; Misharin, AV; Janes, SM; Teichmann, SA; Nikolić, MZ; Meyer, KB (2022): Local and systemic responses to SARS-CoV-2 infection in children and adults. In: *Nature* 602, S. 321–327. DOI: 10.1038/s41586-021-04345-x.
- Young, A (2022): T cells in SARS-CoV-2 infection and vaccination. In: *Therapeutic advances in vaccines and immunotherapy* 10, S. 1–20. DOI: 10.1177/25151355221115011.
- Zhou, P; Yang, X-L; Wang, X-G; Hu, B; Zhang, L; Zhang, W; Si, H-R; Zhu, Y; Li, B; Huang, C-L; Chen, H-D; Chen, J; Luo, Y; Guo, H; Jiang, R-D; Liu, M-Q; Chen, Y; Shen, X-R; Wang, X; Zheng, X-S; Zhao, K; Chen, Q-J; Deng, F;

Liu, L-L; Yan, B; Zhan, F-X; Wang, Y-Y; Xiao, G-F; Shi, Z-L (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. In: *Nature* 579, S. 270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Zimmermann, P; Curtis, N (2020): COVID-19 in Children, Pregnancy and Neonates: A Review of Epidemiologic and Clinical Features. In: *The Pediatric infectious disease journal* 39 (6), S. 469–477. DOI: 10.1097/INF.0000000000002700.

Zimmermann, P; Curtis, N (2022): Why Does the Severity of COVID-19 Differ With Age?: Understanding the Mechanisms Underlying the Age Gradient in Outcome Following SARS-CoV-2 Infection. In: *The Pediatric infectious disease journal* 41 (2), S. e36-e45. DOI: 10.1097/INF.0000000000003413.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Peter Lang durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. rer. nat. Armin Rabsteyn in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Alex Dulovic und Dr. med. Hanna Renk.

Die Sammlung der Blutproben wurde durch Dr. med. 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 organisiert und durchgeführt. Die PBMC wurden durch mich und weitere Mitglieder der AG Lang und AG Seitz isoliert. Prof. Dr. med. Juliane S. Walz aus dem immunologischen Institut der Universität Tübingen stellte uns die HLA-Peptide zur Verfügung.

Die Versuche wurden nach Einführung von Dr. rer. nat. Armin Rabsteyn und Anne-Marie Lang von mir eigenständig durchgeführt. Die Antikörperdaten wurden von Renk et al. erhoben und freundlicherweise unter der Zustimmung von Hanna Renk zum Vergleich der humoralen Antwort mit der T-zellulären SARS-CoV-2 spezifischen Immunantwort genutzt. Ein Teil der hier analysierten Daten wurde für den Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort 3-4 Monate und 11-12 Monate nach Infektion im Rahmen der Dissertation von Dr. med. Julia Müller verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Auch die Literaturrecherche erfolgte ausschließlich durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurde bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Dulovic, A., Rabsteyn, A., Remppis, J., Gentzcke, I.K.E., Mueller, J., Tuecks, N *et al.* Longitudinal analysis of humoral and cellular immunity in SARS-CoV-2 exposed families. *Sci Rep* **15**, 26041 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-07739-3>

Zudem wurden Teile der Daten für den Vergleich der SARS-CoV-2 spezifischen T-Zell-Antwort 3-4 Monate und 11-12 Monate nach Infektion im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Julia S. Müller veröffentlicht:

Müller JS (2025): Epidemiologische Untersuchung der spezifischen T-Zell-Immunantwort in Familien nach Infektion mit SARS-CoV-2. Medizinische Dissertation, Universität Tübingen.

9 Danksagung

Ich danke allen, mit deren Hilfe ich diese Forschungsarbeit vollenden konnte. Ein großer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lang und meinem Betreuer Dr. rer. nat. Rabsteyn für die stete Unterstützung – durch Inspiration, Bereitstellung der nötigen Ressourcen und guten wissenschaftlichen und zwischenmenschlichen Rat.

Ich danke den Mitgliedern der AG Lang, namentlich Anne-Marie Lang, Florian Heubach, Julia Müller und Nadja Tücks, für tatkräftige Hilfe und Ratschläge und für all die schönen Momente innerhalb und außerhalb der Laborwände.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die stets unterstützend an meiner Seite stehen. Sie haben immer sowohl meine geistige als auch finanzielle Freiheit gefördert und so die Durchführung dieser Doktorarbeit ermöglicht.

Meinem Partner Nicolas Zang danke ich für die Kraft und Motivation, die er mir in anstrengenden Stunden gegeben hat. Ohne seine beständige Unterstützung und sein Durchhaltevermögen wäre ich heute nicht der Mensch, der ich bin.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Judith Fromhold für die sorgfältige sprachlich-stilistische Beratung und ihre stete Inspiration, über den Tellerrand hinauszudenken, und meinen Freunden Lorenzo Homann und Barbara Krolik für den Zuspruch und Rückhalt auf dem gemeinsamen Weg zur Approbation.