

Aus der
Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



Immunphänotypisierung von COVID-19 bei Kindern und jungen
Erwachsenen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Benedict Jonathan Wendel

aus
Solingen

Jahr
2025

από Διεύθυνση Ψηφιακού Σχολικού Συστήματος και Συστήματος Ολοκλήρωσης Εκπαίδευσης
Σχολική [Ψηφιακή] και Ψηφιακή Συστήματα Ολοκλήρωσης

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Johannes Hübner
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Uta Behrends
Drittes Gutachten: PD Dr. Maximilian Münchhoff

53310 1000 50 255 1000 1000 1000 1000

1000 1000 1000 1000 1000 1000

1 INHALTSVERZEICHNIS

2	Abbildungsverzeichnis	3
3	Tabellenverzeichnis	3
4	Abkürzungen.....	4
5	Einleitung.....	5
5.1	Virologie	6
5.2	Epidemiologie.....	6
5.3	Klinische Präsentation & Pathologie	8
5.4	Therapie	9
5.5	Immunphänotypisierung.....	10
5.6	Alters-bedingte Veränderungen des Immunsystems.....	11
5.7	Immunologie SARS-CoV-2 Infektion	12
5.7.1	Erwachsene	12
5.7.2	Kinder.....	15
5.7.3	MIS-C.....	17
6	Fragestellung und Zielsetzung	19
7	Methodik	20
7.1	Studiendesign.....	20
7.2	Untersuchungspopulation und Kontrollgruppen	21
7.3	Datenerhebung	23
7.4	Probengewinnung	24
7.5	Durchflusszytometrie	24
7.6	Statistische Auswertung.....	25
8	Ergebnisse.....	27
8.1	Kohorte.....	27
8.2	Klinische Charakterisierung	28
8.2.1	Krankheitsverlauf	28
8.2.2	Symptomatik.....	29
8.2.3	Behandlung	30
8.3	Klinisches Labor	33
8.4	Immunphänotypisierung	36
8.4.1	Stratifizierung.....	36

8.4.2	Adaptive Immunantwort – T-Zellen	39
8.4.3	Adaptive Immunantwort – B-Zellen	43
8.4.4	Unspezifische Immunantwort – Myeloid Zellen	45
9	Diskussion	49
10	Limitationen	55
11	Literaturverzeichnis	56
12	Zusammenfassung	67
13	Abstract.....	68
14	Danksagung.....	69

2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 6-1 - Syptomdauer und Behandlungsverlauf	32
Abbildung 6-2 - Klinisches Labor	33
Abbildung 6-3 - Klinisches Blutbild.....	35
Abbildung 6-4 - Korrelations-Heatmap	36
Abbildung 6-5 - PCA-Analyse	38
Abbildung 6-6 - T-Zellen.....	40
Abbildung 6-7 - B-Zellen.....	44
Abbildung 6-8 - Myeloide Zellen –	47

3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 5-1 - Studiengruppen.....	20
Tabelle 5-2 - Altersgruppen	21
Tabelle 5-3 - Klassifikation Krankheitsverlauf - basierend auf (WHO 2020)	22
Tabelle 6-1 - Altersverteilung.....	27
Tabelle 6-2 - Vorerkrankungen	28
Tabelle 6-3 - Krankheitsverlauf	29
Tabelle 6-4 - Behandlung	31

4 ABKÜRZUNGEN

ARDS	Acute respiratory distress syndrome, dt. Akutes Atemnotsyndrom
BAL	Bronchoalveolären Lavage
CRP	C-reaktives Protein
CFR	Case-fatality-rate, dt: Fall-Verstorbenen-Rate
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome, dt.: kompensatorische Antiinflammatorische Antwort
CRS	Cytokine-release syndrome, dt: Zytokinfreisetzungssyndrom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen - DR-Isotyp
IFN- α ; - β ; - ω	Interferon- α ; - β ; - ω
IL-...	Interleukin-...
LPS	Lipopolysacchariden
MAS	Makrophagen-Aktivierungs-Syndrom
MERS	Middle-eastern respiratory syndrome
MIS-C	Multisystem Inflammatory Syndrome in Children
mDC	Myeloide dendritische Zelle
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PRR	Pattern-recognition-receptors
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PCA	Principal component analysis, dt: Hauptkomponentenanalyse
RSV	Respiratorisches-Synzytial-Virus
SARS-1	Severe acute respiratory syndrome
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, dt. Schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus 2
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
WHO	World Health Organization, dt. Weltgesundheitsorganisation

5 EINLEITUNG

Im Dezember 2019 kam es zu einer ersten Häufung von Fällen schwerer Lungenentzündungen in Wuhan, China (WHO 05.01.2020). Am 7. Januar 2020 wurde bekanntgegeben und am 9. Januar durch die WHO bestätigt, dass es sich um ein neuartiges Coronavirus handele, das fortan als *Severe-acute-respiratory-syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2, dt. *Schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus 2*) bezeichnet wurde (WHO 09.01.2022). Rund zwei Monate später, am 29. Februar 2020 waren 85.403 bestätigte COVID-19 Fälle in 57 Ländern bekannt und 2924 Tode in 9 Ländern gemeldet (Lai et al. 2020). Am 11.03.2020 erklärte der Generaldirektor der WHO Tedros Ghebreyesus den Ausbruch zur Pandemie (WHO 11.03.2020).

Innerhalb kurzer Zeit nach der Entdeckung des Virus wurden Erkenntnisse über die Biologie des Virus und der menschlichen Immunantwort gesammelt. Das Oberflächenmolekül ACE2 und die Protease TMPRSS-2 wurde als Eintrittspforte des Virus identifiziert (Letko et al. 2020). Cytokine-release-syndrome (CRS) wurde als wichtiges Kennzeichen einer schweren SARS-CoV-2 Infektion identifiziert (Chen et al. 2020b; Moore und June 2020). Die genauen Mechanismen der Immundysregulation und immunologische Risikofaktoren für schwere COVID-19 Verläufe, wie zum Beispiel eine Beeinträchtigung der Interferon-Antwort wurden entdeckt (Bastard et al. 2020; Zhang et al. 2020). Komplikationen und Spätfolgen wie Long-COVID und das Multisystem-Inflammatory-Syndrome in Children (MIS-C) wurden zum ersten Mal beschrieben (Verdoni et al. 2020; Wijeratne und Crewther 2020).

Schon früh im Verlauf der COVID-19-Pandemie wurde erkannt, dass Morbidität und Mortalität im Zusammenhang mit einer SARS-CoV2-Infektion einem Altersgradienten folgen, wobei Kinder und Jugendliche ein wesentlich geringeres Risiko für Krankenhausaufenthalte oder schwere Erkrankungen haben als Erwachsene (O'Driscoll et al. 2021; Zachariah et al. 2020; Li et al. 2021). Trotz bedeutender Fortschritte im Verständnis der SARS-CoV2-Infektion ist es nach wie vor unklar, warum Kinder relativ gut vor der Immunpathologie geschützt zu sein scheinen, die ein Kennzeichen von schwerem COVID-19 ist. Darüber hinaus ist nicht bekannt, inwieweit die Schutzmechanismen dieser Altersgruppe erregerspezifisch sind. Im Folgenden werden wichtige bereits gewonnene Erkenntnisse zu SARS-CoV-2 und der COVID-19 Erkrankung und ihren Spätfolgen mit einem besonderen Fokus auf die pädiatrische Immunologie präsentiert.

5.1 VIROLOGIE

SARS-CoV-2 ist ein einzelsträngiges RNA-Virus aus der Familie der *Coronaviridae*. Andere Viren dieser Familie können bekanntermaßen die oberen Atemwege infizieren und sind als Erreger der *common cold* (dt. grippaler Infekt) in weiten Teilen der Welt endemisch. (Zhu et al. 2020) Teil dieser Familie sind auch die Erreger von SARS-1 (*Severe acute respiratory syndrome*) und MERS (*Middle-eastern respiratory syndrome*) (Kuiken et al. 2003; Zaki et al. 2012).

Das Virusgenom enthält Gene für strukturelle und nicht strukturelle Proteine, die Funktionen des viralen Lebenszyklus steuern oder zur Immunevasion dienen. Das für die Wirtsspezifität wichtigste strukturelle Protein ist das sogenannte *spike*-Glykoprotein, das den Eintritt des Virus in die Zelle vermittelt. (Hulswit et al. 2016; V'kovski et al. 2021; Lamers und Haagmans 2022)

Identisch wie bei SARS-1 bindet SARS-CoV-2 mit dem *spike*-Protein an den ACE-2 Rezeptor der Wirtszelle. Nach der Spaltung an der sogenannten *cleavage-site* durch die Protease TMPRSS-2 wird das Spike-Protein aktiviert und initiiert die Fusion der viralen und wirtzellseitigen Doppellipidmembran und führt zur Freisetzung viraler RNA und Proteine in die Wirtszelle. (Hoffmann et al. 2020; Li et al. 2003; V'kovski et al. 2021; Zhou et al. 2020b)

In der Wirtszelle beginnt die Translation des viralen Genoms in Proteine zur Virusreplikation und Immunevasion (Ogando et al. 2020; V'kovski et al. 2021). Neben der Infektion der oberen und unteren Atemwege durch Aerosole wurde außerdem eine produktive Vermehrung von SARS-CoV-2 in Enterozyten nachgewiesen (Lamers et al. 2020).

5.2 EPIDEMIOLOGIE

SARS-CoV-2 ist zum Auslöser einer mehrjährigen, weltweiten Pandemie geworden. Am 14. Juni 2022 waren laut der WHO global 533.816.957 bestätigte COVID-19 Fälle und 6.309.633 Tode gemeldet worden (WHO 15.06.2022).

In den meisten Ländern folgten die SARS-CoV-2 Infektionen einem wellenartigen Verlauf. In einer 2021 veröffentlichten sequenzielle Seroprävalenzstudie wiesen Gornyk et al. eine mit den bekannten Infektionswellen ansteigende Prävalenz von Anti-SARS-CoV2 Antikörpern nach. In 7 verschiedenen Kreisen in Deutschland waren ab Juli 2020 Proband:innen mit einem Abstand von drei bis fünf Monaten getestet worden. Die Seroprävalenz, also die geschätzte abgelaufene Durchseuchung der Bevölkerung, zwischen Juli und Dezember 2020 wurde auf

1,3 bis 2,8% geschätzt. Diese stieg bis zum Zeitraum Februar bis Mai 2021, nach Ablauf der 2. Und 3. Infektionswelle auf 4,1 bis 13,1% an. (Gornyk et al. 2021)

Besonders während der Zeit restriktiverer Maßnahmen war die Rolle von Kindern bei der Aufrechterhaltung des Infektionsgeschehens und die Öffnung und Schließung von Betreuungseinrichtungen und Schulen ein politisch viel diskutiertes Thema. Eine deutsche Studie zeigte, dass Kinder und Jugendliche gerade am Anfang der Pandemie weniger häufig infiziert waren als Erwachsene. Hippich et al. fanden bei einer in Bayern, Deutschland durchgeführten Seroprävalenzstudie eine Prävalenz von 0,91% im Juli 2020 bei Kindern im Alter von 1 bis 18 Jahren, also deutlich geringer als die von Gornyk et al. ermittelte Seroprävalenz bei Erwachsenen. Allerdings weisen sie auch darauf hin, dass die im April 2020 bestimmte Prävalenz rund 6-mal so hoch war wie die aus gemeldeten Fällen errechnete (Hippich et al. 2020). In Einklang mit den Ergebnissen von Hippich et al. fand später eine internationale Metaanalyse aus dem Jahr 2021 mit mehr als 300.000 eingeschlossenen Patient:innen, davon mehr als 40.000 Kinder und Jugendliche, dass Kinder mit geringerer Wahrscheinlichkeit infiziert waren als Erwachsene und vermutlich eine geringere Rolle bei der Übertragung von SARS-CoV-2 gespielt hatten (Viner et al. 2021).

Ein wichtiger Parameter zur Einschätzung der Schwere von Infektionskrankheiten ist die *Case-Fatality-Rate* (CFR, dt.: Fall-Verstorbenen-Rate). Schätzungen waren im Verlauf der Pandemie auf Grund begrenzter Testkapazitäten, unterschiedlicher Teststrategien und Datenübermittlungspraktiken variabel. Generell muss beachtet werden, dass die gemeldeten Fälle häufig nur einen Teil aller Infektionen repräsentieren, was die valide Einschätzung der CFR erschwert. (O'Driscoll et al. 2021; Pastor-Barriuso et al. 2020; Verity et al. 2020; Zachariah et al. 2020)

In einem frühen klinischen Bericht über erwachsene Patient:innen mit COVID-19 in Wuhan lag die CFR hospitalisierter Patient:innen bei 28%. Schon hier war zu beobachten, dass die verstorbenen Patient:innen mit 69 Jahren im Mittelwert rund 17 Jahre älter waren als diejenigen, die die Erkrankung überlebten (Zhou et al. 2020a). Eine spätere Metaanalyse mit 281.461 Fällen aus den USA, China, Italien, Südkorea ermittelte eine CFR von 5,6%. 22,9% der Fälle erlitten einen schweren Verlauf und 10,96% mussten in der Intensivstation behandelt werden. Außerdem konstatierte diese Studie, dass 58,1 % der Patient:innen sich im Zusammenhang mit einer Reise angesteckt hatte. (Li et al. 2021)

Morbidität und Mortalität durch SARS-CoV2-Infektion folgen einem Altersgradienten. Kinder und Jugendliche zeigten ein wesentlich geringeres Risiko für Krankenhausaufenthalte oder schwere Erkrankungen als Erwachsene (Li et al. 2021; O'Driscoll et al. 2021; Zachariah et al. 2020). Laut einer Studie aus dem Jahr 2022 lag die altersspezifische CFR bei 7-jährigen bei 0,0023%. Nach dem 30. Lebensjahr stieg sie exponentiell auf 1,0035% bei 60 Jährigen und 20,3292% bei 90 Jährigen an (COVID-19 Forecasting Team 2022).

In einer Studie mit Daten von 242,158 zwischen Januar und Juni 2020 an COVID-19 erkrankten Kindern und Jugendlichen aus Deutschland, Frankreich, Spanien, den USA und Südkorea wurde eine Hospitalisierungsrate von 0,3% bis 1,3% beobachtet. Entwicklungsstörungen und neurologische, kardiologische oder onkologische Erkrankungen waren in der Gruppe der hospitalisierten Kinder signifikant häufiger als in der restlichen Kohorte. Eine 30-Tage Mortalität konnte auf Grund zu niedriger Ereigniszahlen nicht bestimmt werden (Duarte-Salles et al. 2021) . Auch auf Intensivstationen waren pädiatrische Patient:innen mit schweren Vorerkrankungen signifikant überrepräsentiert (Shekerdemian et al. 2020) .

In epidemiologischen Studien mit Erwachsenen wurde gezeigt, dass Vorerkrankungen wie Übergewicht, koronare Herzerkrankung und Diabetes mellitus mit einem deutlich erhöhten Risiko für einen schweren COVID-19 Verlauf assoziiert sind. Diese Krankheiten, genauso wie Alkohol- oder Tabakabusus, sind bei Kindern deutlich weniger prävalent, und tragen somit vermutlich ebenfalls zu einem niedrigeren Krankheitsrisiko bei. (Chou et al. 2022)

Die geringe Krankheitslast von SARS-CoV-2 bei Kindern und Jugendlichen ist bemerkenswert, da besonders junge Kinder normalerweise von respiratorischen Virus-Infektionen, zum Beispiel durch humanes Respiratorisches-Synzytial-Virus (RSV) oder Influenza, stark betroffen sind. Ein signifikanter Anteil der Krankheitslast der Influenza ist auf Kinder unter 5 Jahren in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen zurückzuführen (Wang et al. 2020). Beide Infektionen sind bekannte Auslöser eines pädiatrischen akuten Atemnotsyndroms (engl.: *acute respiratory distress syndrom*, ARDS) und verantwortlich für eine hohe Mortalität pädiatrischer Patient:innen. (Openshaw et al. 2017; Iwane et al. 2004; Nye et al. 2016)

5.3 KLINISCHE PRÄSENTATION & PATHOLOGIE

Die häufigsten Symptome einer SARS-Cov-2 Infektion sind Fieber, Husten und Erschöpfung und Malaise. Circa 9,5% der Patient:innen erleben Durchfall. Bauchschmerzen und Erbrechen

und Geruchs- und Geschmacksverlust gehören ebenso zu den häufigen Symptomen. (Li et al. 2021)

Bereits früh wurde bei an COVID-19 verstorbenen Patient:innen Sepsis, respiratorisches Versagen und ARDS beschrieben. Auch Herzversagen und Koagulopathien wurden beobachtet. Auf Röntgenaufnahmen der Lunge der Patienten zeigten sich Konsolidierungen, Milchglastrübungen und diffuse, beidseitige Infiltrate, vereinbar mit einer schweren viralen Pneumonie und ARDS. (Zhou et al. 2020a)

Histologische Untersuchungen der Lunge bestätigten die radiologischen Befunde und zeigten diffuse alveoläre Schädigung, Desquamation von Pneumozyten und hyaline Membranen. Interstitiell fanden sich mononukleäre entzündliche Infiltrate mit lymphozytärer Dominanz (Xu et al. 2020; Wichmann et al. 2020). Autopsien enthüllten außerdem eine hohe Prävalenz tiefer venöser Thrombosen und pulmonaler Emboli (Wichmann et al. 2020).

Obwohl Kinder prinzipiell ähnliche klinische Symptome wie Erwachsene COVID-19 Patient:innen zeigen, ist die Wahrscheinlichkeit eines schweren Verlaufs mit Pneumonie und ARDS deutlich geringer und somit milde Symptome weit häufiger (COVID-19 Forecasting Team 2022). Fieber, Dyspnoe und trockener Husten stellen die häufigsten Symptome milder und moderater Verläufe da (Qiu et al. 2020; Zachariah et al. 2020; Duarte-Salles et al. 2021). Einige Berichte haben gezeigt, dass eine Minderheit pädiatrischer Patienten sich mit vorwiegend gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit, Bauchschmerzen und Erbrechen präsentiert (Zachariah et al. 2020; Tullie et al. 2020; Duarte-Salles et al. 2021). Typische Veränderungen klinischer Laborparameter umfassen Lymphopenie und Leukopenie und erhöhte Werte der Marker CRP, Procalcitonin und Kreatinkinase MB (Qiu et al. 2020; Zachariah et al. 2020) .

5.4 THERAPIE

Die aktuelle deutsche Therapieleitlinie zur stationären Behandlung von COVID-19 stellt die supportive Therapie und die Sicherstellung einer ausreichenden Oxygenierung in den Vordergrund. Hierzu werden Nichtinvasive Beatmung, High-Flow Sauerstofftherapie und invasive Beatmung mit Bauchlagerung bei der Behandlung hypoxischer Patient:innen empfohlen. Medikamentös werden antivirale Medikamente in der Frühphase eingesetzt, im späteren Verlauf spielt die immunmodulatorische Therapie mit Dexamethason, Anti-IL-6

Rezeptor-Antikörper *Tocolizumab* oder dem Januskinase-Inhibitor *Baricitinib* eine wichtige Rolle. (Kluge et al. 2022)

Praktisch zeigte sich, dass vor allem in der Frühphase der Pandemie zusätzlich zu diesen weitere Medikamenten therapeutisch verabreicht wurde, in den USA und Südkorea unter anderem Antikoagulanzen, Antithrombotika, Hydroxichloroquin, Protonenpumpeninhibitoren, Vitamin D und H₂-Rezeptorantagonisten. (Duarte-Salles et al. 2021; Zachariah et al. 2020)

5.5 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG

Besonders zu Beginn der Pandemie wurden Techniken der Immunphänotypisierung, auch *immune-profiling* genannt, eingesetzt, um die Rolle immunologischer Vorgänge bei der Pathogenese von schwerem COVID-19 besser zu verstehen. Bei der Immunphänotypisierung wird anhand von Blutproben der Zustand des Immunsystems zu einem bestimmten Zeitpunkt mit Hilfe verschiedener Methoden charakterisiert. So können Erkenntnisse über die Reaktionsmuster des Immunsystems gewonnen und Hypothesen über physiologische oder pathophysiologische Vorgänge generiert oder getestet werden.

Eingesetzte Techniken umfassen die Durchflusszytometrie, den Nachweis gelöster Proteine und Metabolite mittels ELISA-Essays oder Massenspektrometrie und Genexpressionsanalysen mittels bulk- und single-cell-RNA-Sequenzierung. Bei der Zusammenschau verschiedener Datenmodalitäten wie Zytometrie, Proteomik, Genexpression und klinischen Daten wird häufig von Multi-Omics gesprochen.

Besonders zur Analyse der zellulären Zusammensetzung und Veränderungen eignet sich die Durchflusszytometrie. Diese wurde in den 1970er Jahren entwickelt um Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle, Größe und Granularität zuverlässig zu bestimmen (Herzenberg et al. 2002). Seit Ihrer Einführung hat die grundlegende Technik weitreichende Aktualisierungen erfahren und wird heute nach wie vor sowohl in der Forschung, als auch im klinischen Alltag, häufig eingesetzt (Kanegane et al. 2018; Manohar et al. 2021; Bandura et al. 2009; Tanner et al. 2013).

Das Ziel ist die Identifikation und Charakterisierung in Lösung suspendierter Zellen. Die Suspension wird mit für bestimmte Oberflächenmoleküle spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Antikörper sind mit einem Fluorophor konjugiert, welches bei optischer Aktivierung Licht

mit einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Die Antikörper binden Oberflächenmoleküle und markieren so die suspendierten Zellen. Im zweiten Schritt wird die Suspension durch eine enge Röhre geleitet, so dass die Zellen diese nur einzeln passieren können. Wenn die Zellen einen Laser passieren, werden die antikörpergebundenen Fluorophore angeregt und emittieren ein optisches Signal mit einer bestimmten Wellenlänge. Zusätzlich werden Parameter wie die Größe und Granularität der Zellen erfasst. Die Signale werden von einem Detektor aufgezeichnet und erlauben über Computer-gestützte Methoden die Bestimmung von Zelle mit Hilfe der an sie gebundenen Antikörper. (McKinnon 2018)

Zytometrische Immunphänotypisierung wurden bereits erfolgreich beim Studium verschiedener viraler Erkrankungen wie HIV, Hepatitis C und Ebola eingesetzt. Die Immunphänotypisierung von HIV-Patient:innen half dabei, den prognostischen Charakter verschiedener T-Zell-Unterarten und ihre Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf zu erkennen (Landay et al. 1990). 20 Jahre später wird Zytometrie weiterhin zum Studium der Pathogenese, bei Impfstudien und im klinischen Alltag zur Leitung von Therapieentscheidungen eingesetzt und schafft eine Grundlage für die Implementierung von Präzisionsmedizin bei HIV-Patient:innen (Chattopadhyay und Roederer 2010; Li et al. 2018).

Beim Studium der durch das HC-Virus (HCV) ausgelösten chronischen Hepatitis wurde festgestellt, dass anhaltenden Virämie HCV-spezifische CD4+ T-Helferzellen durch anhaltende Aktivierung dazu anregt, die inhibitorischen Oberflächenmoleküle PD-1 und CTLA-4 zu exprimieren und sie dadurch in ihrer Funktion beeinträchtigt und ein Ausheilen der Krankheit verhindert (Chen et al. 2020a).

Nach der Ebola-Epidemie in Westafrika 2014/2015 wurden dysregulierte T-Zellen mit starker systemischer Inflammation, bei Überlebenden auch nach der Infektion, bei erkrankten Patient:innen festgestellt und halfen schnell die molekulare Basis schwerer und tödlicher Verläufe zu verstehen. (Ruibal et al. 2016; Wiedemann et al. 2020)

5.6 ALTERS-BEDINGTE VERÄNDERUNGEN DES IMMUNSYSTEMS

Das Immunsystem von Kindern unterscheidet sich in mehreren wichtigen Punkten von dem von Erwachsenen und durchläuft im Verlauf der Kindheit eine Entwicklung, die zur immunologischen Reife und Ausbau der Abwehrfähigkeiten führt. Viele dieser Veränderungen können anhand von Immunprofilen mit Hilfe von Durchflusszytometrie nachvollzogen werden.

Kinder kommen mit einem unreifen Immunsystem auf die Welt und besitzen zunächst keine erworbene Immunität, sondern sind von der vertikalen Transmission des immunologischen Schutzes der Mutter über die Plazenta und Muttermilch abhängig (Albrecht und Arck 2020). Für die frühe Entwicklung des Immunsystems ist vor allem das intestinale Mikrobiom wichtig. Der Darm besitzt eine große Schleimhautoberfläche mit assoziiertem Lymphgewebe und beherbergt das größte Reservoir an Mikroorganismen im Körper. Eine balancierte Mikroflora gilt seit langem als wichtiger Pfeiler einer regelrechten physiologischen Immunreifung. (Ouwehand et al. 2002; Ronan et al. 2021)

Immunstimulation durch das Mikrobiom aber auch Infektionen in der Kindheit tragen im Verlauf der Kindheit und Jugend zur Ausbildung eines gesunden Immunschutzes bei. Störungen des Mikrobioms oder fehlende Expositionen gegenüber Infektionen sind mit Krankheiten des atopischen Formenkreises wie Allergien und Asthma assoziiert. (Jenmalm 2011; Openshaw et al. 2004)

Auf zellulärer Ebene fand eine Studie aus dem Jahr 2018, bei der 100 Neugeborene mit Hilfe von Massenzytometrie longitudinal untersucht wurden, stereotype Veränderungen von Immunzellpopulationen nach der Geburt. Frühgeborene unterschieden sich direkt nach der Geburt von reifen Neugeborenen in der Immunzellzusammensetzung, jedoch konvergierten beide Gruppen nach kurzer Zeit. Allerdings fand diese Entwicklung bei Kindern mit früher Dysbiose des Darms nicht in derselben Weise statt. (Olin et al. 2018)

Auch während des späteren Verlaufs des Lebens finden Veränderungen der Immunzellzusammensetzung statt. Beispielsweise nimmt die absolute Anzahl von B und T Lymphozyten mit steigendem Alter ab und die Konzentrationen inflammatorischer Zytokine nehmen zu (Valiathan et al. 2016). Gleichzeitig findet über den Verlauf des Lebens eine Akkumulation von Gedächtnis B und T-Zellen und Abnahme der naiven Populationen, besonders ab dem 65. Lebensjahr, statt (Saule et al. 2006; Morbach et al. 2010).

5.7 IMMUNOLOGIE SARS-CoV-2 INFektion

5.7.1 Erwachsene

Schon frühe Studien identifizierten Sepsis und CRS und die damit einhergehende schwere Inflammation und Immunsuppression als potenzielle Pathomechanismen eines schweren COVID-19 Verlaufs (Mehta et al. 2020; Blanco-Melo et al. 2020). Eine Signatur

inflammatorischer Zytokine, gekennzeichnet durch hohe Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) wurden bei einem Großteil der intensivpflichtigen Patient:innen beschrieben und alle drei Marker als unabhängige Prädiktoren des Überlebens erkannt (Arunachalam et al. 2020; Del Valle et al. 2020; Mehta et al. 2020; Blanco-Melo et al. 2020). Ein zelluläres Kennzeichen von COVID-19 ist die Lymphopenie. Der Lymphozyten-Nadir ist mit der Schwere der Erkrankung assoziiert (Huang und Pranata 2020). Im Verlauf wird eine Lymphopenie häufig durch einen Anstieg von Zelllinien der angeborenen Immunität, zum Beispiel Granulozyten, begleitet. Ein hohes Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis hat prognostischen Charakter für einen schweren Verlauf (Lucas et al. 2020; Kuri-Cervantes et al. 2020; Schulte-Schrepping et al. 2020).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die frühe Detektion von Viren und die Fähigkeit des angeborenen Immunsystems bereits zu Beginn der Infektion eine robuste Immunantwort zu generieren mit dem Risiko für schwere COVID-19 Verläufe assoziiert ist. Hadjadj et al. fanden im Blut von COVID-19 Patient:innen eine gestörte Typ-1-Interferon-Antwort mit reduzierter bis nicht vorhandener Interferon- α (IFN- α) und Interferon- β (IFN- β) Aktivität. Sie stellten die Hypothese auf, dass eine gestörte Typ-1-Interferon-Antwort ein Kennzeichen einer schweren COVID-19 Erkrankung und ein möglicher Mechanismus für die gestörte initiale Immunantwort sein könnten (Hadjadj et al. 2020). Typ-1-Interferone werden nach der Aktivierung durch intrazellulärer *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRR) und *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) von Immun- und Epithelzellen sezerniert. Sie initiieren antivirale Verteidigungsmechanismen und locken Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems an (Vabret et al. 2020). Im ersten Jahr der Pandemie wurde diese Hypothese von zwei Studien bestätigt. Zhang et al. zeigten, dass Mutationen in Genen, die die Typ-1- und Typ-3-Interferon-Antwort regulieren, mit einem erhöhten Risiko für einen schweren COVID-19 Verlauf assoziiert sind (Zhang et al. 2020). In einer komplementären Studie zeigten Bastard et al., dass erhöhte Titer neutralisierender Anti-IFN- α 2 und Anti-IFN- ω -Antikörper, die mit einer höheren Prävalenz bei älteren, männlichen Patienten zu finden sind, bei knapp 10% der Patient:innen mit schwerem COVID-19 zu finden sind und zu nicht detektierbaren IFN- α Leveln während der akuten Infektion führen (Bastard et al. 2020). Beide Studien konnten einen Anteil der Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf vorhersagen und die wichtige Rolle der frühen, durch Interferone vermittelten, angeborenen Immunantwort bei der Kontrolle einer SARS-CoV-2 Infektion herausstellen.

Auf zellulärer Ebene ist COVID-19 neben der Lymphopenie durch weitere Veränderungen des Immunprofils und gestörte Phänotypen verschiedener Immunzell-Populationen gekennzeichnet. Eine Studie fand SARS-CoV-2 spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen im Plasma von respektive 100% und 70% konvaleszenten Spendern (Grifoni et al. 2020). In bronchoalveoläre Lavage (BAL) Proben wurden bei moderatem COVID-19 große Mengen klonal expandierte CD8+ T-Zellen beobachtet (Liao et al. 2020). Häufig ist die allgemeine T-Lymphopenie von einer Erhöhung der Frequenz der CD4+ und CD8+ Effektor-T-Zellen und T-Zell-Aktivierung, gemessen als Oberflächenexpression von CD38 und HLA-DR (Humanes Leukozyten Antigen – DR Isotyp), begleitet (Arunachalam et al. 2020; Mathew et al. 2020; Kuri-Cervantes et al. 2020). Eine Subgruppe der Patient:innen mit schwerem COVID-19 zeigte kaum T-Zell-Aktivierung sondern T-Zell-Erschöpfung und Seneszenz (Mathew et al. 2020; Biasi et al. 2020b; Zheng et al. 2020). T-Zell Erschöpfung ist durch PD-1 und CTLA-4 Expression auf der Oberfläche der T-Zellen und verminderte Responsivität und Zytokinsekretion gekennzeichnet. Sie tritt nach anhaltender Aktivierung durch inflammatorische Zytokine und Virusbestandteile auf. (Candia et al. 2020)

Eine B-Zell-Lymphopenie ist mit einer Erhöhung der Frequenz antikörperproduzierender Plasmablasten assoziiert (Arunachalam et al. 2020; Mathew et al. 2020; Kuri-Cervantes et al. 2020; Biasi et al. 2020a). Eine systematischer Literaturreview fand heraus, das fast alle eingeschlossenen Studien SARS-CoV-2-spezifische IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern schon Tage nach der Infektion nachweisen konnten (Huang et al. 2020). Die Anzahl der SARS-CoV-2 spezifischen CD4+ T-Zellen war mit der Höhe der Anti-SARS-CoV-2 IgA- und IgG-Titer korreliert. (Grifoni et al. 2020)

In BAL-Proben wurden bei schwer an COVID-19 erkrankter Patient:innen große Zahlen proinflammatorischer Makrophagen, die an die Stelle Gewebe reparierender alveolärer Makrophagen getreten waren, beobachtet (Liao et al. 2020). Monozyten und myeloide dendritische Zellen (mDCs) zeigten bei einem Teil der erwachsenen Patienten eine auffällige Reduktion der HLA-DR Oberflächen Expression (Arunachalam et al. 2020; Wilk et al. 2020). Giamarellos-Bourboulis et al. zeigten, dass in Ihrem Kollektiv alle 28 Patient:innen mit respiratorischem Versagen und ARDS entweder ein Makrophagen-Aktivierungs-Syndrom (MAS) mit erhöhter HLA-DR Oberflächenreduktion oder eine extrem niedrige HLA-DR Oberflächen Expression auf Monozyten zeigten. Bei der zweiten Grupp war dies von einer

Depletion von CD4+ T-Zellen, B-Zellen, Natürlicher Killer Zellen und zirkulierender Monozyten begleitet. Experimentell konnte das Plasma von COVID-19 Patient:innen die HLA-DR-Expression auf Monozyten inhibieren (Giamarellos-Bourboulis et al. 2020). In einer anderen Studie zeigten Schulte-Schrepping und Reusch et al., dass die Monozyten von Patient:innen mit einem milden COVID Verlauf eine Signatur Interferon stimulierter Gene zeigten und HLA-DR und CD11c, ein Integrin, welches die Extravasation von Zellen in entzündetes Gewebe steuert, in hohem Maße exprimierten. Schweres COVID-19 war hingegen mit HLA-DR-defizienten Monozyten assoziiert (Schulte-Schrepping et al. 2020).

5.7.2 Kinder

Obwohl das Risiko einer Krankenhauseinweisung auf Grund einer viralen, respiratorischen Infektion bei Kindern vergleichsweise hoch ist, verläuft pädiatrisches COVID-19 normalerweise mild (Yuki et al. 2020). Um diesen Unterschied zu erklären, fokussierten sich bisherige Studien vor allem auf Unterschiede der Viruseintrittsfaktoren, der Interferon-Signaltransduktion und der adaptiven Immunantwort. (Chou et al. 2022; Zimmermann und Curtis 2020)

Frühe Überlegungen waren, ob Kinder eine geringere Viruslast aufweisen würden, und hierdurch weniger stark betroffen und weniger infektiös wären. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass Kinder weniger ACE2-Rezeptoren auf der Oberfläche von Lungenepithelzellen hätten, was die Infektiosität von SARS-CoV-2 bei dieser Gruppe verringern würde (Zimmermann und Curtis 2020; Chou et al. 2022).

Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden, da Studienergebnisse nicht eindeutig zeigen konnten, ob und wie eine geringere ACE2 oder TMPRSS Expression zu geringeren Viruslasten und Infektiosität führt. So fand zwar eine Metaanalyse von *single-cell* Sequenzierungsstudien einen Anstieg von SARS-CoV-2 Eintrittsfaktoren auf Alveolarzellen, jedoch unterstützen nicht alle Studien die Hypothese, dass dies der Grund für eine niedrigere Viruskonzentration in der Lunge sei (Muus et al. 2021). Zusätzlich konnten viele Studien keinen signifikanten Unterschied der ACE2 Expression zwischen Kindern und Erwachsenen finden (Koch et al. 2022; Schuler et al. 2021; Heald-Sargent et al. 2020; Pierce et al. 2021)

Allgemein zeigten Kindern nur eine leicht verringerte Viruslast im Vergleich zu Erwachsenen. Die Viruslast korrelierte stattdessen mit der Schwere der Erkrankung und erreicht ihren Höhepunkt ein bis drei Tage vor Symptombeginn. Hospitalisierte Patient:innen hatten eine

höhere Viruslast als nicht hospitalisierte Patient:innen, und diese wiederum eine höhere Viruslast als asymptomatische Patient:innen. (Jones et al. 2021)

Andere Studien konzentrierten sich auf Unterschiede der initialen Immunantwort innerhalb der nasalen Mukosa und respiratorischen Epithelien. Koch et al. verglichen die Genexpression der nasalen Mukosa von Kindern mit SARS-CoV-2 Infektion mit Erwachsenen COVID-19 Patient:innen und Kindern mit RSV- oder Influenza-Infektion. Sowohl Kinder als auch Erwachsene zeigten eine Signatur mit erhöhter Expression durch Interferone stimulierter Gene. Die Höhe der Expression hing hier mit der Menge der Viruskopien zusammen, nicht mit der Schwere der Erkrankung, und war vergleichbar mit der Signatur von Patient:innen mit RSV- oder Influenza-Infektion. Erwachsene zeigten, trotz ähnlicher Viruslast, eine erhöhte Expression von Genen, die zu Neutrophilen Aktivierung und T-Zell Rezeptor Aktivierung führen (Koch et al. 2022). Im Gegensatz hierzu fanden Pierce et al. eine stärkere Signatur Interferon-stimulierter Gene bei Kindern als bei Erwachsenen (Pierce et al. 2021). Eine weitere Studie fand bei Kindern eine höhere basale Expression SARS-CoV-2-relevanter PRRs in Epithelien der oberen Atemwegen, Makrophagen und dendritischen Zellen was mit einer stärkeren initialen antiviralen Antwort assoziiert war (Loske et al. 2022). Die Stärker der Interferon Antwort ist vermutlich neben altersabhängigen Faktoren auch von extrinsischen Faktoren abhängig. Hierzu sind zum Beispiel die höhere Prävalenz von neutralisierenden Anti-Interferon-Autoantikörpern bei älteren Patienten und chronische virale Infektionen wie mit Zytomegalieviren zu zählen (Chou et al. 2022; Bastard et al. 2020).

Bisherige Studien haben teilweise uneindeutige Ergebnisse über die Immunprofilveränderungen bei Kindern während einer akuten COVID-19 Erkrankung berichtet. So wurden Erhöhungen der Zytokine IL-6 und IL-17A, Interferon- γ (IFN- γ) und TNF- α beschrieben, wobei die Serumkonzentrationen einiger Zytokine wie IFN- γ und IL-17A mit dem Alter abnahmen (Pierce et al. 2020). Andere Studien fanden außerdem eine Erhöhung der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL16 (Jia et al. 2020).

Auf zellulärer Ebene ist das Erwachsenwerden mit einer Vielzahl von Veränderungen, insbesondere der adaptiven Immunantwort, verbunden. Hierzu gehört die Akkumulation pathogen-spezifischer Gedächtnis T-Zellen, die Verringerung des T-Zell Rezeptor Repertoires und eine Veränderung des Transkriptionsprofils von T-Zellen insgesamt (Chou et al. 2022; Wedderburn et al. 2001). Dowell et al. fanden heraus, dass Kinder nach einer SARS-CoV-2

Infektion eine Spike-Protein spezifische T-Zell Antwort generierten, die in ihrer Kohorte stärker als bei mild erkrankten Erwachsenen war. Diese war bis zu 6 Monate nach der Infektion noch stabil. Spike-Protein-spezifische T-Zellen wurden auch bei seronegativen Kindern gefunden, was auf eine gewisse Kreuzreaktivität von T-Zellen zwischen SARS-CoV-2 und anderen Coronaviren hindeutet (Dowell et al. 2021). Cohen et al. und Pierce et al. hingegen fanden in ihren Studien eine weniger starke SARS-CoV-2 spezifische CD4+ und CD8+ T-Zell Antwort bei Kindern als bei Erwachsenen (Cohen et al. 2021; Pierce et al. 2020). Auch Studien zur humoralen Immunantwort zeigten unterschiedliche Ergebnisse. In einer serologischen Studie hatten Kinder und Erwachsene mit einer milden COVID-19 Erkrankung ähnliche Anti-SARS-CoV-2-IgG-Titer. Erwachsene mit einer schweren Erkrankung hingegen zeigten zusätzlich erhöhte Anti-SARS-CoV-2-IgA-Titer im Speichel (Bartsch et al. 2021). Dowell et al. wiesen vergleichbare Titer von Anti-Spike Antikörpern bei Kindern und Erwachsenen nach (Dowell et al. 2021). Pierce et al. und Cohen et al. hingegen fanden bei Kindern niedrigere Titer neutralisierender Anti-SARS-CoV-2 Antikörper als bei Erwachsenen (Pierce et al. 2020; Cohen et al. 2021).

5.7.3 MIS-C

Kurz nach den ersten großen Infektionswellen traten in vielen Ländern gehäuft Fälle auf, bei denen Kinder an einer an Kawasaki-Syndrom oder Toxisches Schock Syndrom erinnernden Krankheit litten, die mit ca. 4 Wochen Abstand nach eine SARS-CoV-2 Infektion auftrat. Das Krankheitsbild wurde Multisystem Inflammatory Syndrome in Children genannt. Klinisch ist MIS-C gekennzeichnet von Fieber, abdominellen Schmerzen, Hautausschlägen und Konjunktivitis. Viele Patient:innen entwickeln im Verlauf eine Schocksymptomatik und benötigen inotrope Unterstützung und Flüssigkeitssubstitution. (Riphagen et al. 2020; Verdoni et al. 2020; Whittaker et al. 2020)

Immunologisch ist MIS-C durch eine massive Aktivierung verschiedener Immunzellpopulationen und Zytopenien gekennzeichnet und geht mit hohen Konzentrationen inflammatorische Zytokine wie IFN- α & γ , IL-1 β , -6, -8, -10 und -17 einher (Carter et al. 2020; Consiglio et al. 2020; Gruber et al. 2020). Eingehende Untersuchungen fanden eine polyklonale T-Zell-Expansion mit einer Verschiebung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires. Dies ähnelt dem Befund beim toxischen Schock Syndrom, bei dem eine Superantigen-getriebenen T-Zell-Expansion mit anschließender Inflammation zu Grunde liegt (Moreews et al. 2021;

Porritt et al. 2021; Cheng et al. 2020). Da SARS-CoV-2 Enterozyten infizieren kann wird der Darm als potenzielles Virusreservoir vermutet (Yonker et al. 2021; Lamers et al. 2020). Enterale Viruspersistenz von SARS-CoV-2 könnte bei genetisch prädisponierten Kindern zur lokalen, MHC-2-unabhängigen Aktivierung von T-Zellen kommen, die im Verlauf zum Verlust der Darmbarriere mit Ausschwemmung von Superantigenen in die Blutbahn führen könnte. Diese würden die klinisch zu beobachtende systemische Inflammation und gastrointestinalen Symptome verursachen (Brodin 2022).

Die meisten MIS-C Patient:innen haben eine erhöhte Plasmablasten-Frequenz und neutralisierende Anti-SARS-CoV-2-IgG-Antikörper, wobei die Serokonversion auf eine abgelaufene oder seit längerem bestehende Infektion hindeutet (Gruber et al. 2020; Bartsch et al. 2021; Vella et al. 2020). Zwei Studien fanden, vor der Gabe von intravenösen Immunglobulinen, Autoantikörper gegen Endothelien und gastrointestinale Zellen, die normalerweise mit rheumatischen Erkrankungen assoziiert sind (Gruber et al. 2020; Consiglio et al. 2020). Autoantikörper gegen Typ-1-Interferone, wie sie bei schwerem COVID-19 bei Erwachsenen häufig vorkommen, wurden jedoch nicht nachgewiesen. (Cevins et al. 2021)

6 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die Corona-Pandemie hat die Notwendigkeit des Verständnisses der zellulären und molekularen Grundlagen und Determinanten einer COVID-19 Erkrankung für die Entwicklung von Therapien, Prävention und Risikostratifizierung von Patient:innen klar gezeigt. Trotz bedeutender Fortschritte in unserem Verständnis der SARS-CoV2-Infektion ist nicht eindeutig geklärt, warum Kinder relativ gut vor der Immunpathologie geschützt zu sein scheinen, die ein Kennzeichen von schwerem COVID-19 ist. Dies ist vor allem deshalb interessant, da Kinder sonst als vulnerabel gegenüber bestimmten Infektionskrankheiten anzusehen sind und bei der schwerwiegenden Spätkomplikation MIS-C Parallelen zu schwerem COVID-19 bei Erwachsenen zeigen können.

Im Sinne der bisher aufgestellten Hypothesen zur protektiven Immunität von Kindern gegenüber einem schweren COVID-19 Verlauf konzentrieren wir uns auf im peripheren Blut nachweisbare immunologischen Vorgänge während der akuten Infektion. Während klinische Studien mit pädiatrischen COVID-Patienten bereits durchgeführt wurden, haben diese die natürliche Entwicklung von Kindern und Jugendlichen und die damit einhergehenden immunologische Reifung häufig nicht berücksichtigt. Mit Hilfe hochdimensionaler Immunphänotypisierung lassen sich die immunologischen Zustände von Patienten im Kontext eines infektiösen Geschehens charakterisieren und gegeneinander vergleichen. Zwar können keine kausalen Zusammenhänge bewiesen werden, aber Erkenntnisse, die durch diese Methode gewonnen werden können in Zusammenschau mit Ergebnissen bisheriger klinischer und grundlegender Forschung zur Generierung von Hypothesen über die Pathophysiologie einer Erkrankung und mögliche Therapieansätze liefern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Immunantwort eines pädiatrischen Patientenkollektivs während einer akuten SARS-CoV-2 Infektion altersstratifiziert zu charakterisieren.

Zusätzlich soll untersucht werden, ob eine Spezifität der immunologischen Antwort auf SARS-CoV-2 vorliegt, und Unterschiede der Immunprofile von Patient:innen mit einer akuten SARS-CoV-2 Infektion gegenüber Patient:innen mit anderen Infektionskrankheiten herausgearbeitet werden. Als letztes soll das immunologische Profil von Kindern mit akutem COVID-19 gegenüber der Spätfolge MIS-C abgegrenzt werden, um herauszufinden, ob sich hierbei Kontinuitäten von der akuten Infektion hin zur pathologischen Hyperinflammation ziehen lassen.

7 METHODIK

7.1 STUDIENDESIGN

Für die Studie wurde das Design einer doppelt kontrollierten prospektiven Kohortenstudie gewählt. Patient:innen und Kontrollproband:innen wurden zwischen dem 31.03.2020 und 10.03.2022 im ambulanten und stationären Bereich des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals und der Kinderklinik Schwabing in München rekrutiert. Im Rahmen eines Multi-Omics Ansatzes wurden für die Päd-COVID-19 Studien neben EDTA Blutproben für die Erstellung von Immunprofilen mittels Durchflusszytometrie auch Proben für RNA-, Zytokin-, und Proteinisolation gesammelt.

Neben Patient:innen mit SARS-CoV-2 Infektion wurden (1) gesunde Kontrollpersonen, (2) Patient:innen mit einer anderen Infektionskrankheit als COVID-19 als Infektionskontrollen und (3) Patient:innen mit einem Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) in die Studie aufgenommen (siehe Tabelle 7-1).

Blutproben wurden nach erfolgter Studieneinwilligung im Rahmen von klinischen Untersuchungen gesammelt, um die Belastung durch die Studienteilnahme für junge Patient:innen zu minimieren. Bei Patient:innen mit einem schwereren Krankheitsverlauf und längerem Krankenhausaufenthalt wurde eine mehrfache Probenentnahme angestrebt, um den longitudinalen Verlauf immunologischer Veränderungen nachvollziehen zu können. Hierzu wurden die Patient:innen alle 3 ± 1 Tage angesprochen und nach Einwilligung bei der nächsten Routine Blutentnahme eine weitere Probe gesammelt.

Studiengruppen	Einschlusskriterium
COVID	Patient:innen mit einem positiven SARS-CoV-2 PCR Testergebnis
Kontrolle	Gesunde Patient:innen, keine Vorerkrankungen
Non-COVID	Patient:innen, mit Symptomen einer respiratorischen oder gastrointestinalen Infektion und einem negatives PCR-Testergebnis
MISC	Patient:innen mit Multisystem Inflammatory Syndrome in Children

Tabelle 7-1 - Studiengruppen

7.2 UNTERSUCHUNGSPOPULATION UND KONTROLLGRUPPEN

Als Untersuchungspopulation wurde Säuglinge, Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene mit akuter SARS-CoV-2 Infektion definiert (siehe Tabelle 7-2). Neben dem Alter wurden weitere Kriterien für die Aufnahme in die COVID-Studiengruppe definiert. Erstens, das Vorliegen ein positives PCR-Testergebnis bei Aufnahme oder ein Nachweis über ein externes PCR-Testergebnis maximal 7 Tage vor Aufnahme. Zweitens, das Vorliegen einer unterschriebenen Einwilligungserklärung. Bei Minderjährigen ist die Einverständniserklärung mindestens eines Elternteils rechtlich vorgeschrieben, soweit organisatorisch möglich wurde die Einwilligung beider Elternteile angestrebt. Es wurde außerdem eine kindergerechte und eine jugendgerechte Aufklärung verfasst und der Kindeswunsch zur Teilnahme an der Studie berücksichtigt.

Als Ausschlusskriterium wurde das Vorliegen einer schweren Vorerkrankung mit starken Auswirkungen auf das hämatopoetische System oder eine aktuelle immunsuppressive Behandlung festgelegt. Hierunter entfallen maligne Erkrankungen oder eine aktuelle laufende Chemotherapie und angeborene Immundefekte und hereditäre Erkrankungen des blutbildenden Systems.

Gesunde, altersentsprechende Kontrollpersonen wurden eingeschlossen, um die Veränderungen des Immunprofils der Patient:innen mit SARS-CoV-2 Infektion gegenüber dem gesunden, altersentsprechenden Immunprofil zu vergleichen. Diese Patient:innen wurden aus der kinderchirurgischen Tagesklinik des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals rekrutiert.

Um die Spezifität der Immunantwort auf SARS-CoV-2 herauszufinden wurde eine zweite Kontrollgruppe rekrutiert. Patient:innen, die sich mit Symptomen einer akuten

Gruppe	Definition
<1	Säuglinge – jünger als ein Jahr
1-10	Kinder – 1-10 Jahre
11-18	Jugendliche – 11-18 Jahre
>18	Junge Erwachsene – 19-40 Jahre

Tabelle 7-2 - Altersgruppen

respiratorischen oder gastrointestinalen vorstellten und daraufhin behandelt wurden, wurden in diese Gruppe aufgenommen. Da besonders in der Notaufnahme nicht immer ein Erregernachweis angestrebt wird, wurde nach Ausschluss einer SARS-CoV-2 Infektion mittels PCR-Test die klinische Einschätzung des diensthabenden Arztes als Einschlusskriterium übernommen.

Patient:innen mit MIS-C wurden eingeschlossen, um Immunprofilveränderungen während akutem COVID-19 von inflammatorischen Spätfolgen abzugrenzen. Nach Stellung der klinischen Diagnosestellung von MIS-C wurden die Patient:innen von den Stationen der Studienzentren rekrutiert.

Der Krankheitsverlauf der Patient:innen wurde auf Basis einer von der WHO Guideline zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs von SARS-CoV-2 Patient:innen klassifiziert (siehe Tabelle 7-3) (WHO 2020).

Patientenzustand	Beschreibung	Score
Nicht infiziert	Kein klinischer oder virologischer Nachweis einer Infektion oder MIS-C	0
Ambulant - Mild	Keine Einschränkung der Aktivität / Asymptomatisch	1
	Leichte Einschränkung der Aktivität	2
Hospitalisiert – Moderat	Hospitalisiert, keine Sauerstofftherapie	3
	Sauerstoff über Nasenbrille oder Maske	4
Hospitalisiert – Schwer	Nicht-invasive Beatmung (NIV) oder High-Flow	5
	Intubation und mechanische Beatmung	6
	Beatmung + zusätzliche Organunterstützung (Vasopressoren, Dialyse, ECMO)	7
Tot	Tot	8

Tabelle 7-3 - Klassifikation Krankheitsverlauf - basierend auf (WHO 2020)

7.3 DATENERHEBUNG

Bei Vorstellung im Krankenhaus wurden die Patient:innen und Ihre Begleiter:innen angesprochen und die Päd-COVID-19 Studie vorgestellt. Bei Interesse erfolgte eine kind- und jugendgerechte Aufklärung über Studienziele, Nutzen und Risiken. Es wurde auf die Freiwilligkeit der Teilnahme und die Möglichkeit über eine rückwirkende Auflösung der Einwilligung aufgeklärt.

Nach erfolgter Einwilligung des/der Patient:in und mindestens eines Elternteils wurde je nach Alter des/der Patient:in eine Eigen- oder Fremdanamnese mittels eines strukturierten Fragebogens erhoben. Der gesamte Fragebogen liegt im Anhang bei.

Im ersten Abschnitt des Fragebogens wurde jeder/m Patient:in eine eindeutige Studien-ID (COV-xxx) zugeteilt und das Datum der Datenerhebung eingetragen. Im zweiten Abschnitt werden Patientendaten wie Geschlecht, Gewicht und Größe erfasst. Herkunftsland des Vaters und der Mutter wurden auf freiwilliger Basis erfragt. Abschnitt drei befasst sich mit der Impf- und Infektanamnese, Abschnitt vier enthält Fragen zur SARS-CoV-2 Diagnostik und Abschnitt fünf zu möglicherweise bekannten Kontaktpersonen des Kindes oder Jugendlichen, bei denen eine Ansteckung hätte geschehen können. Abschnitt sechs des Fragebogens erfragt allgemeine, respiratorische, gastrointestinale und SARS-CoV-2 spezifische Symptome während der Dauer der Erkrankung. Das Vorhandensein der jeweiligen Symptome und die Dauer seit Beginn zum Zeitpunkt der Datenerfassung wurden erfragt. Außerdem wurde erfragt, ob und wie die Symptome vor der Vorstellung im Krankenhaus mit Haushaltsmitteln und Medikamenten behandelt wurden. Im Abschnitt sieben werden bestehende Vorerkrankung des/der Patient:in abgefragt. Der achte Abschnitt erfragt regelmäßig eingenommene Medikamente.

Zusätzlich wurden Informationen über das elektronische Patientenverwaltungssystem und die Patientenkurve erhoben. Informationen zu therapeutischen Maßnahmen, Medikamentengaben und Verlegungen wurden aus der Patientenkurve erhoben und in eine elektronische Datenbank übertragen. Klinische Laborergebnisse wurden aus dem elektronische Patientenverwaltungssystem ausgelesen und ebenfalls in einer elektronischen Datenbank gespeichert. Die Daten aller Studienteilnehmenden wurden durch eine fortlaufende Studien-ID pseudonymisiert.

7.4 PROBENGWINNUNG

Blutproben wurden zum nächstmöglichen Zeitpunkt nach Aufnahme in die Studie gewonnen. Hierbei wurde darauf geachtet die Abnahme möglichst gleichzeitig mit einer Routineuntersuchung durchzuführen, um die jungen Patient:innen nicht mit multiplen Abnahmen zu belasten. Bei den gesunden Kontrollprobanden wurde nach Einwilligung der Patient:innen und eines Elternteils das Blut für die Proben während kleiner chirurgischer Eingriffe, wie zum Beispiel Plattenentfernung nach Knochenbrüchen, unter Sedierung oder Narkose abgenommen.

Blutproben wurden in 1.2 ml Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Probenröhrchen gesammelt und bei Raumtemperatur gelagert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte innerhalb von 24 Stunden.

7.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Blutproben in drei gleichgroße Aliquote zu je 400 µl aufgeteilt. Die Aliquoten wurden mit unterschiedlichen Panels aus monoklonalen Antikörpern gefärbt (für Liste der Antikörper, siehe Anhang – Tabelle A1). Panel 1 enthält Antikörper zur Analyse von CD3+ T-Zellen, Panel 2 Antikörper zur Analyse von B-Zellen und Panel 3 Antikörper zur Analyse von Monozyten, dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Panel-2-Blutaliquote wurden vor der Färbung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Hersteller: Gibco) gewaschen, um freies Immunglobulin zu entfernen und eine korrekte Färbung mit Anti-IgD- und Anti-IgM-Antikörpern zu ermöglichen. Rote Blutkörperchen wurden mit 1× BD FACS Zell Lyse Lösung (BD Bioscience) nach den Anweisungen des Herstellers lysiert.

Probenmessung wurden mit einem LSR Fortessa Flow Cytometer (BD Bioscience) durchgeführt. Die Ausgabedateien wurden mit der Software FlowJo (TreeStar) analysiert. Fluoreszenz-Kompensation und das Gating der Zellpopulationen wurde manuell durchgeführt.

Durchflusszytometrische Daten werden mit Hilfe einer Gating-Strategie analysiert. Zellen werden hierarchisch nach dem Vorhandensein eines Oberflächenmoleküls auf der Zelle charakterisiert und so schrittweise einer vorher definierten Immunzellpopulation zugeordnet. Die in dieser Studie verwendete Gating-Strategie ist im Anhang dargestellt. In Tabelle A2 im

Anhang sind die Definitionen der einzelnen Zellpopulationen nach Marker Expression aufgeführt.

Durchflusszytometrische Daten werden entweder als absolute Zellzahlen oder relative Anteile dargestellt. Relative Anteile sind gegenüber Schwankungen der Probengröße stabiler und werden deswegen in der vorliegenden Arbeit verwendet. Der verwendete Zähler der untersuchten Zellpopulation ist immer eine in der in der Gating-Strategie vorangegangene Zellpopulation und in den Abbildungen mit angegeben.

Das Färben der Blotaliquoten, die Messung am FlowCytometer, Fluoreszenz-Kompensation und das initiale Gating wurden von R. Conca, Forschungslabortechniker, am Comprehensive Childhood Research Center (CCRC) des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals durchgeführt.

7.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistischen Analysen und Visualisierungen wurden in R-Studio, Version 4.1.0, durchgeführt. Es wurde keine Randomisierung oder Verblindung durchgeführt. Proben von 86 Proband:innen waren für die mehrfarbige durchflusszytometrische Analyse von Vollblut verfügbar. 12 Patient:innen wurden aufgrund schwerwiegender medizinischer Vorerkrankungen, wie z. B. einer aktiven onkologischen Erkrankung oder einer Organtransplantation mit anschließender Immunsuppression, von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Somit standen 74 individuelle Patient:innen mit $n \geq 1$ Proben zur Analyse zur Verfügung.

Korrelationen sind als Spearman-Korrelationskoeffizienten angegeben.

Dargestellte Regressionen sind einfache lineare Regressionen. Das R^2 -Kriterium, bei dem die Residuen der Regression ins Verhältnis zu den Residuen eines einfachen Mittelwerts gesetzt werden, wurde als Goodness-of-Fit (*dt. Anpassungsgüte*) Kriterium ausgewählt.

Die Daten wurden zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung hin überprüft. Bei parametrischen Daten wurden die Signifikanz der Ergebnisse mit einem zweiseitigen t-Test festgestellt. Nichtparametrische Daten wurden mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Rank-Sum-Test für den Vergleich zweier Gruppen analysiert. Multiple-Test-Correction wurde mit Hilfe der Benjamini-Hochberg-Prozedur durchgeführt. p -Werte von weniger als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Sofern nicht anders angegeben,

wird die Anzahl der Proben als n bezeichnet. Es wurde keine statistische Methode verwendet, um die Stichprobengröße für die Analysen im Voraus zu bestimmen.

Principal-Component-Analysis (PCA, dt. *Hauptkomponenten Analyse*) ist eine mathematische Methode, die zur Dimensionsreduktion hochdimensionaler Daten eingesetzt wird, wie sie bei RNA-Sequenzierungs- oder Durchflusszytometrieexperimenten generiert werden. Ein großer Anteil der Varianz hochdimensionaler Daten, also statistischer Information, kann erhalten und in wenigen Vektoren repräsentiert werden. (Ringnér 2008)

Mathematisch werden Eigenvektoren berechnet, die eine lineare Kombination der ursprünglichen Variablen sind. Die Eigenvektoren liegen orthogonal zueinander im hochdimensionalen Raum, sind also statistisch unabhängig voneinander. Die Eigenschaft dieser Eigenvektoren ist es, dass die Gesamtvarianz des Datensatzes entlang jedes Vektors maximiert wird, bevor der nächste Eigenvektor berechnet wird. Es lässt sich dann die projizierte Position jeder einzelnen Probe auf den jeweiligen Eigenvektoren bestimmen.

Je größer der Abstand zweier Proben auf einem Eigenvektor, desto größer ist auch der geometrische Abstand dieser Proben im hochdimensionalen Raum. Der Anteil, den eine einzelne Variable bei der Konstruktion eines Vektors hat, wird als „Loading“ oder Gewichtung bezeichnet. Wenn ein Eigenvektor parallel zu der Axe einer Variablen, zum Beispiel einer Zellpopulation ist, ist das so genannte „Loading“ = 1, wenn der Eigenvektor orthogonal zu dieser Axe ist, beträgt das Loading = 0. Je größer das Loading ist, desto höher ist der Anteil der Varianz, den eine Variable bei dem jeweiligen Eigenvektor erklärt. (Ringnér 2008; Jolliffe 2005; Giuliani 2017)

Bei der vorliegenden Arbeit wurde vor der Berechnung der Eigenvektoren eine Normalisierung durchgeführt, so dass alle Werte als Standard-Deviations-from-Mean (Standardabweichungen vom gemeinsamen Mittelwert) repräsentiert wurden.

8 ERGEBNISSE

8.1 KOHORTE

Im Zeitraum vom 31.03.2020 bis zum 10.03.2022 wurden am Dr. von Hauner'schen Kinderspital und der Kinderklinik Schwabing 138 Patient:innen für die Päd-COVID-19 Studien rekrutiert. Durchflusszytometrische Messungen waren von 86 Patient:innen verfügbar. Da durchflusszytometrische Messungen innerhalb von 24 Stunden nach Abnahme der Blutprobe durchgeführt werden müssen konnten die Proben der nachts und an Wochenenden rekrutierte Patient:innen nicht durchflusszytometrisch analysiert werden. Von 86 zur Verfügung stehenden Spender*innen wurden 12 auf Grund von Vorerkrankungen aus dieser Arbeit ausgeschlossen (siehe 7.2 Untersuchungspopulation und Kontrollgruppen). Somit stehen insgesamt 74 individuelle Spender*innen zur Analyse zur Verfügung.

Die Altersverteilung ist nach Geschlecht und Altersgruppe aufgeschlüsselt in Tabelle 8-1 aufgeführt. Das mediane Alter der COVID-Patient:innen betrug 14,5 Jahre mit einer Spanne von 0 bis 40 Jahren. Das mediane Alter der gesunden Kontrollgruppe betrug 10 Jahre mit einer Spanne von 0 bis 40. In der Non-COVID Kontrollgruppe lag das mediane Alter ebenfalls bei 10 Jahren und die Spanne reichte von 0 bis 33 Jahren. Die rekrutierten Patient:innen, bei denen MIS-C diagnostiziert wurde waren im Median 7 Jahre alt mit einer Spanne von 5 bis 8 Jahren.

Anzumerken ist, dass das mediane Alter der COVID-Gruppe höher ist als in den anderen Untersuchungsgruppen. Dies erklärt sich aus der relativ geringeren Anzahl der Patient:innen in der Altersgruppe 1-10 in der COVID-Gruppe. Außerdem ist eine Überrepräsentation männlicher Patienten in der gesamten COVID-Gruppe (männlich 12 : 8 weiblich), besonders aber in der 1-10 Altersgruppe zu bemerken (männlich 4 : 0 weiblich).

	Kontrolle		COVID		Non-COVID		MISC	
	n=27		n=20		n=22		n=5	
	f	m	f	m	f	m	F	m
< 1 Jahr	0	3	1	3	1	2	0	0
1-10 Jahre	6	5	0	4	2	6	1	4
11-18 Jahre	1	6	4	3	2	3	0	0
> 18 Jahre	4	2	3	2	3	3	0	0

Tabelle 8-1 - Altersverteilung

Bei den MISC Patient:innen zeigte sich ebenfalls eine Überrepräsentation von männlichen Kindern. In Einklang mit bestehender Literatur alle Patient:innen im jüngeren Grundschulalter zwischen 5 und 8 Jahren.

Vorerkrankungen lagen bei einigen Patient:innen vor und sind in Tabelle 8-2 aufgeführt. In der COVID-Gruppe waren Allergien am häufigsten, in der Non-COVID Gruppe waren respiratorische Erkrankungen wie Asthma die häufigste Vorerkrankung. MISC-Patient:innen hatten bis auf zwei Patient:innen mit einfachen Allergien keine Vorerkrankungen.

	Kontrolle	COVID	Non-COVID	MISC
Allergien	1 (4%)	3 (15%)	1 (4%)	2 (40%)
Pulmonal	0	0	3 (14%)	0
Kardiovaskulär	0	1 (5%)	1 (4%)	0
Neurologisch/Neuromuskulär	0	1 (5%)	2 (9%)	0
Nephrologisch	0	1 (5%)	1 (4%)	0
Hämatologisch/Onkologisch	0	1 (5%)	2 (9%)	0
Angeborene Immundefekte	0	0	0	0
Autoimmun	0	1 (5%)	0	0
Diabetes mellitus	0	0	1 (4%)	0

Tabelle 8-2 - Vorerkrankungen

8.2 KLINISCHE CHARAKTERISIERUNG

8.2.1 Krankheitsverlauf

Krankheitsverläufe der Patient:innen wurden mit Hilfe der in Abschnitt 7.1 beschriebenen Skala in Schweregrade eingeteilt. In Tabelle 8-3 sind die Krankheitsverläufe und Symptomatik der Patient:innen nach Alter und Diagnose aufgeschlüsselt dargestellt.

60 % der COVID-Patient:innen zeigten einen moderaten Krankheitsverlauf. Drei Patient:innen waren asymptomatisch. In diesem Fall wurde die SARS-CoV-2 Infektion zufällig im Rahmen von Routinetests entdeckt. In der Altersgruppe <1 Jahr gab es keine milden und asymptomatischen Fälle, vermutlich wegen seltenerer Routinetests. Ein Patient erlitt einen schweren Krankheitsverlauf mit mehrtägigem Intensivaufenthalt und invasiver Beatmung.

Vergleichbar mit der COVID-Gruppe zeigten 46% der Patient:innen in der Non-COVID Kontrollgruppe einen moderaten Verlauf. Es gab ebenfalls einen schwer erkrankten Patienten. Patient:innen mit MISC waren deutlich schwerer betroffen als COVID-Patienten. 60% erlitten

einen schweren Verlauf mit Intensivpflichtigkeit, die restlichen 40% erlebten einen moderaten Verlauf.

Erwartbarerweise gab es weder in der Non-COVID Gruppen noch in der MISC Gruppe asymptomatischen Fälle, da auf andere Erreger nicht routinemäßig getestet wurde, wie auf SARS-CoV-2 während der Pandemie, und MIS-C eine rein anamnestisch-symptomatische Diagnose ohne spezifischen Nachweis ist.

8.2.2 Symptomatik

Allgemeine und respiratorische Symptome waren in der COVID-19 Gruppe die häufigsten Symptome. 65% der Patient:innen gaben Erschöpfung an und die Hälfte zeigte fieberhafte Temperaturen. 60% der Patient:innen litten an Husten und 50% berichteten von Luftnot. 30% der Patient:innen hatten zusätzlich an gastrointestinalen Symptomen wie Diarrhoe, Übelkeit mit Erbrechen und Bauchschmerzen. Diese Symptome waren insbesondere bei

	COVID					Non-COVID					MISC
Altersgruppe	<1	1-10	11-18	>18	Total	<1	1-10	11-18	>18	Total	1-10
Fallzahl	n=4	n=4	n=7	n=5	n=20	n=3	n=8	n=5	n=6	n=22	n=5
Krankheitsverlauf											
Asymptomatisch	0	2	1	0	3 (15%)	0	0	0	0	0	0
Mild	0	0	1	3	4 (20%)	0	2	3	6	11 (50%)	0
Moderat	4	1	5	2	12 (60%)	2	6	2	0	10 (46%)	2 (40%)
Schwer	0	1	0	0	1 (5%)	1	0	0	0	1 (4%)	3 (60%)
Symptome											
Fieber	3	2	3	2	10 (50%)	2	6	3	1	12 (55%)	5 (100%)
Husten	4	1	4	3	12 (60%)	2	3	1	2	8 (36%)	1 (20%)
Luftnot	2	2	4	2	10 (50%)	3	2	1	0	6 (27%)	2 (40%)
Halsschmerzen	0	0	2	3	5 (25%)	0	1	2	5	8 (36%)	1 (20%)
Rhinitis	4	1	4	2	11 (55%)	1	2	1	5	9 (41%)	2 (40%)
Diarrhoe	2	0	1	3	6 (30%)	0	1	2	1	4 (18%)	4 (80%)
Emesis	1	2	2	1	6 (30%)	1	2	1	0	4 (18%)	4 (80%)
Bauchschmerzen	1	1	2	0	4 (20%)	0	2	2	0	4 (18%)	4 (80%)
Erschöpfung	3	1	4	5	13 (65%)	1	5	5	2	13 (59%)	5 (100%)
Kopfschmerzen	0	0	4	5	9 (45%)	0	2	4	3	9 (41%)	4 (80%)
Geruchs- und Geschmacksverlust	0	1	4	2	7 (35%)	0	0	1	0	1 (5%)	1 (20%)

Tabelle 8-3 - Krankheitsverlauf

Säuglingen häufig. 35% der Patient:innen gaben Geschmacks- oder Geruchsverlust an, wobei dies wegen fehlender Kommunikationsmöglichkeiten von Säuglingen mit hoher Wahrscheinlichkeit die wahre Häufigkeit unterschätzt.

Die Non-COVID Kontrollgruppe präsentierte sich mit vergleichbarer Symptomatik. Erschöpfung und Fieber waren die häufigsten Symptome, gefolgt von Rhinitis und Kopfschmerzen. Ein Teil der Patient:innen zeigte hauptsächlich Symptome eines oberen Atemwegsinfekts wie Husten und Halsschmerzen. Ein weiterer Teil der Patient:innen präsentierte sich mit vornehmlich gastrointestinalen Beschwerden.

Im Vergleich hierzu zeigte die Gruppe der MISC Patient:innen eine sehr andere und eindrückliche Symptomatik: alle Patient:innen litten an Fieber und Erschöpfung. Die restlichen Symptome waren stark gastrointestinal betont. 80% der Patient:innen litten an Diarrhoen, Erbrechen und Bauchschmerzen. Respiratorische Symptome wurden hingegen nur von einem Teil der Patient:innen berichtet.

8.2.3 Behandlung

In Tabelle 8-4 sind Informationen über den Krankenhausaufenthalt und die Behandlung der Patient:innen dargestellt. Abbildung 8-1 zeigt den zeitlichen Ablauf der Erkrankung und Behandlung.

75% der COVID-Patient:innen wurden in einem der beiden Studienzentren stationär behandelt. Bei 45% der Patient:innen wurde die Infektion mit SARS-CoV-2 bei der festgestellt. Bei den restlichen 55% erfolgte die Testung außerhalb der Studienzentren. 70% der Patient:innen waren vor der Krankenhausvorstellung symptomatisch, teilweise seit mehr als 7 Tagen. Im Median war die Dauer des Krankenhausaufenthalts 3 Tage lang, die Spanne reichte von 0 bis 21 Tagen. Insgesamt wurden drei Patient:innen intensivpflichtig: ein Patient erlitt einen schweren Verlauf mit 11-tägigem Intensivaufenthalt und verbrachte insgesamt 21 Tagen im Krankenhaus. Ein weiterer Patient wurde über Nacht zur Überwachung übernommen, jedoch am nächsten Morgen wieder entlassen. Ein letzter Patient wurde auf Grund einer Verbrennung intensivpflichtig. 20% der Patient:innen benötigten im Verlauf der Behandlung eine Beatmungstherapie. Zwei Patient:innen erhielten Sauerstofftherapie per Maske oder Nasenbrille. Ein Patient wurde per C-PAP unterstützt. Ein Patient wurde auf Grund der Schwere der Erkrankung intubiert. Medikamentös wurden COVID Patient:innen am

	COVID	Non-COVID	MISC
Benötigte Krankenhausversorgung			
stationäre Behandlung (%)	15 (75%)	12 (55%)	5 (100%)
Intensivbehandlung (%)	2 (10%)	1 (5%)	3 (60%)
Mediane Aufenthaltsdauer (Spanne)	3 (0-21)	1 (0-12)	9 (6-15)
Therapie			
Sauerstofftherapie†	2 (10%)	1 (5%)	0
Nicht-invasive Beatmung (NIV,C-PAP)†	1 (5%)	2 (9%)	0
Intubation†	1 (5%)	1 (5%)	1 (20%)
NSAR	7 (35%)	4 (18%)	4 (80%)
Systemische Antibiotika	7 (35%)	6 (27%)	3 (60%)
Virostatika	1 (5%)	1 (5%)	0
Systemische Kortikosteroide	3 (15%)	4 (18%)	4 (80%)
Inotrope Unterstützung/Vasopressoren	1 (5%)	0	3 (60%)

† Patienten wurden unter der invasivsten Beatmungsform gelistet

Tabelle 8-4 - Behandlung

häufigsten mit Nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) (35%) und Systemischen Antibiotika (35%) behandelt. 15% der Patient:innen erhielten zusätzlich eine antiinflammatorische Therapie mit systemischen Kortikosteroiden. Der schwer betroffene, intensivpflichtige Patient erhielt im Rahmen des Intensivaufenthalts zusätzlich inotrope Unterstützung und wurde mit Virostatika behandelt.

Patient:innen aus der Non-COVID Gruppe wurden zu 55% aus der Notaufnahme rekrutiert. Die mediane Aufenthaltsdauer ist mit einem Tag kürzer als bei den COVID-Patient:innen. Die Spanne der Behandlungsdauer reichte von 0 bis 12 Tagen. Am häufigsten wurden die Non-COVID Patient:innen mit Antibiotika (27%), NSAR (18%) und Kortikosteroiden (18%) behandelt. Da viele der Kinder nicht im Krankenhaus, sondern zu Hause versorgt wurden und Medikamentengaben zu Hause nicht systematisch erfasst wurden besteht die Chance des Underreportings.

Patient:innen mit MISC hatten insgesamt längerer Klinikaufenthalt und schwerere Verläufe. Im Median betrug der Krankenhausaufenthalt 9 Tage mit einer Spanne von 6-15 Tagen und hoher Intensivpflichtigkeit. Im Vergleich zur COVID Gruppe spielte die Beatmungstherapie kaum eine Rolle, dafür standen Immunmodulation mit systemischen Kortikosteroiden (80%) und Fiebersenkung mit NSARs (80%) im Vordergrund der Behandlung. Zusätzlich erhielten 60% der Patient:innen systemische Antibiotika und Vasopressoren zur hämodynamischen Stabilisierung.

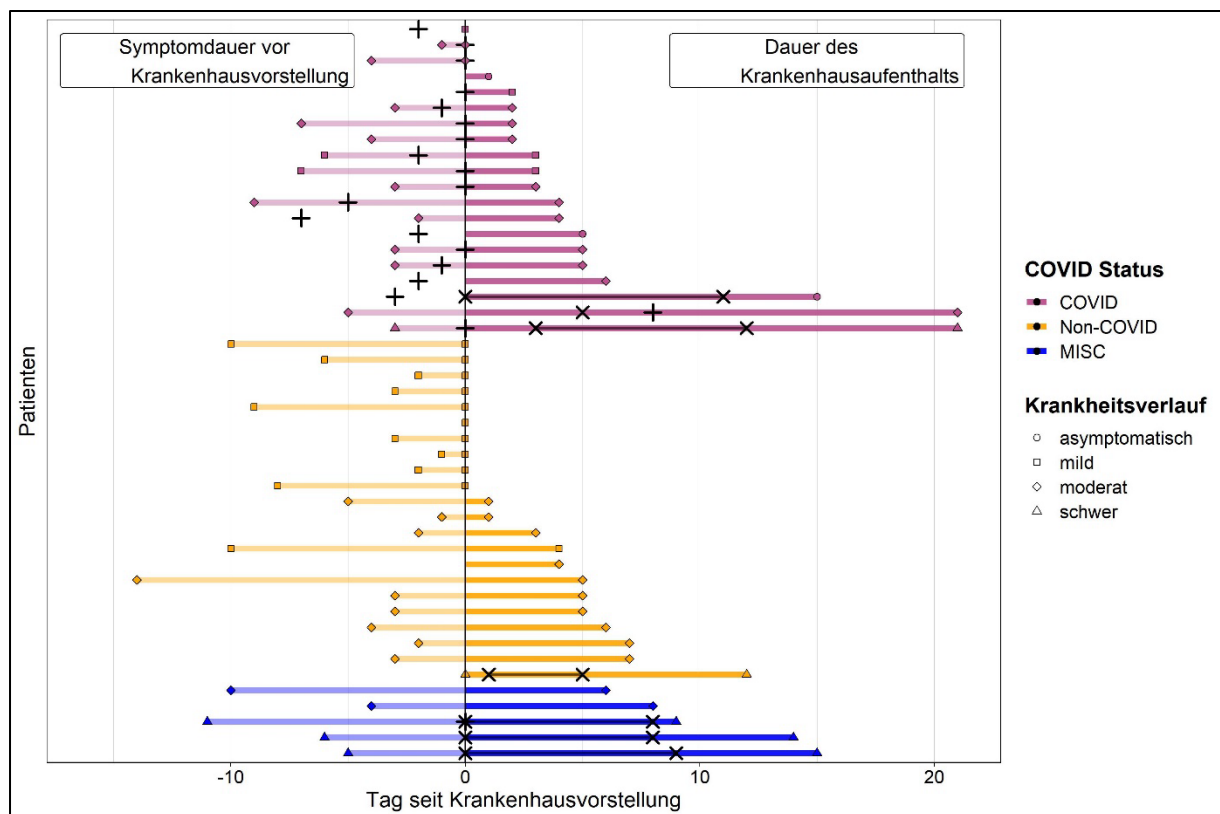


Abbildung 8-1 - Syptomdauer und Behandlungsverlauf - Symptombdauer vor der Krankenhausvorstellung und Dauer des Krankenhausaufenthalts aller COVID, Non-COVID und MISC Patient:innen gegen Tage seit der Krankenhausvorstellung auf der x-Achse, wenn zutreffend Tag des 1. positiven PCR-Testergebnisses (+) und Beginn und Ende der Intensivbehandlung (X) markiert. Farben und Formlegend neben der Abbildung.

8.3 KLINISCHES LABOR

Das klinische Labor enthält mit dem Blutbild, Entzündungsmarker, Gerinnung und Metabolite wichtige Informationen über den klinischen Zustand der Patient:innen. Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass schweres COVID-19 bei Erwachsenen mit schweren Blutbildveränderungen, dem Anstieg von Entzündungsparametern und Gerinnungsveränderungen einhergeht (Zhou et al. 2020a; Mathew et al. 2020; Lucas et al. 2020). Bei Kindern waren diese Veränderungen den im allgemeinen milderen Krankheitsverläufen entsprechend weniger stark ausgeprägt (Shekerdemian et al. 2020; Qiu et al. 2020).

Während einige Marker feste Referenzbereiche haben, müssen für Kinder über den Verlauf der Entwicklung bis zum Erwachsenenalter alterspezifische Referenzbereiche beachtet werden (Institut für medizinische und pharmazeutische Prüfungsfragen 2013). Abbildung 8-2 zeigt eine Auswahl klinischer Laborergebnisse, die für die klinische Versorgung von Patient:innen mit Infektionskrankheiten relevant sind und bei COVID-19 bereits als pathologisch verändert beschrieben worden sind mit altersunspezifischen Referenzbereichen.

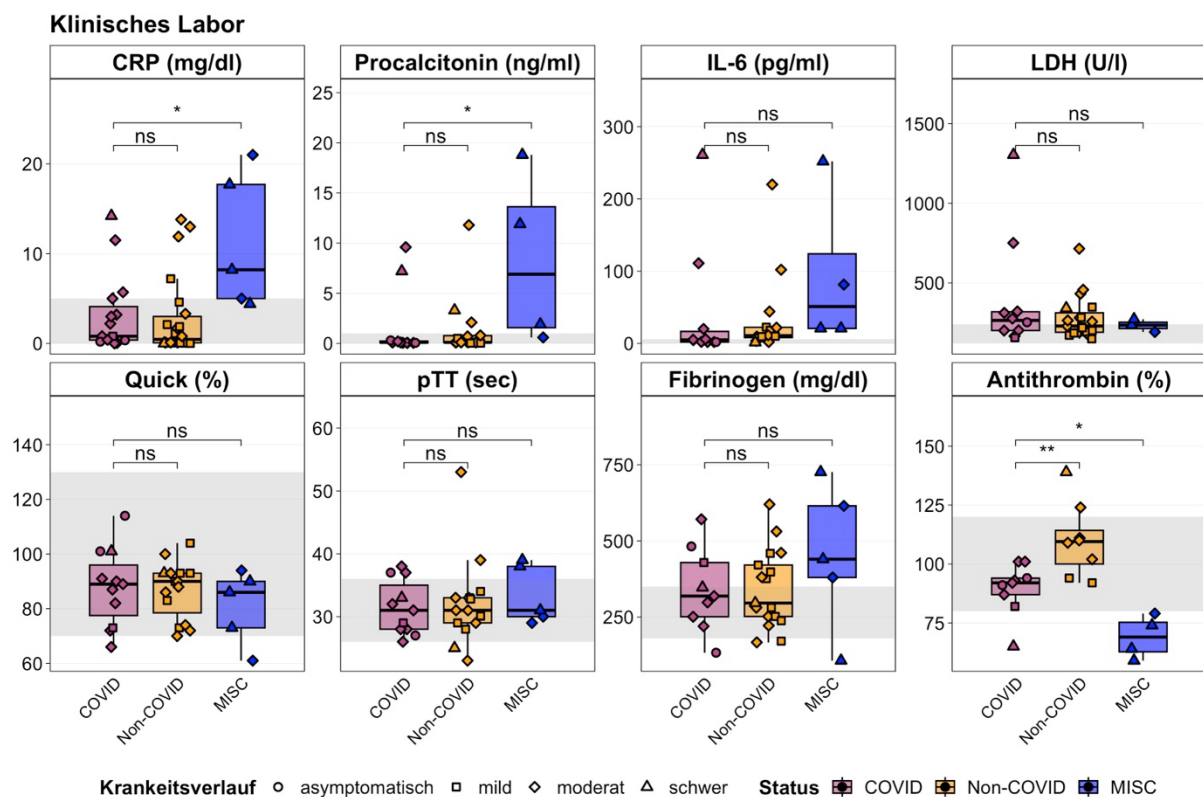


Abbildung 8-2 - Klinisches Labor - Klinische Laborparameter der Studiengruppen, Einheit im Kacheltitel, Achse wie beschriftet, Referenzbereiche grau hinterlegt. Die Resultate der statistischen Tests sind als p-Werte ermittelt durch Wilcoxon-Rank-Sum-Test angegeben, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001. Farben- und Formlegend unter der Abbildung

Der Großteil der COVID Patient:innen zeigte keine ausgeprägten Entzündungszeichen im klinischen Labor. C-reaktives Protein (CRP), Procalcitonin, und IL-6, die drei gängigsten klinischen Entzündungsparameter, waren für alle bis auf zwei Patient:innen im Normbereich. Die erhöhten Werte gehören zu zwei schwerer erkrankte pädiatrische COVID-19 Patient:innen. Diese präsentierten sich mit erhöhtem CRP, Procalcitonin und IL-6. Außerdem zeigten sie erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH) Aktivität im Blut.

Die Patient:innen der Non-COVID Gruppe präsentierten sich mit ähnlichen Laborbilder. Auch hier zeigte eine Subgruppe der Patient:innen erhöhte Entzündungsparameter. Im Gegensatz hierzu hatten Patient:innen mit MISC gegenüber der COVID Gruppe signifikant erhöhte CRP und Procalcitonin Werte, wobei sich eine Aufspaltung in einen Phänotyp mit stark erhöhter inflammatorischer Signatur und einen weniger stark ausgeprägten Phänotyp zeigte. Diese Werte stehen mit dem inflammatorischen Charakter der Erkrankung in Einklang, zeigen jedoch auch wie sich auch hier unterschiedliche Schweregrade im klinischen Labor widerspiegeln können.

Im Gerinnungslabor zeigten sowohl die COVID als auch die Non-COVID Gruppe normwertige Laborergebnisse. Einzig Fibrinogen, das als akute Phase Protein gewertet wird, war bei einer Untergruppe der COVID-19 Patient:innen und Non-COVID Patient:innen erhöht. Patient:innen mit MISC zeigten erhöhte Fibrinogen-Werte und eine gegenüber COVID Patient:innen signifikant verringerte Antithrombin-Aktivität.

Das klinische Laborbild der COVID-19 Patient:innen zeigt größtenteils den milden und moderaten Verläufen entsprechende Werte. Non-COVID Patient:innen präsentierten sich mit vergleichbaren Laborbildern. Im Gegensatz hierzu zeigten Patient:innen mit MIS-C eine ausgeprägte inflammatorische Signatur. Pathologische Veränderungen des Gerinnungslabors war bei COVID und Non-COVID Patient:innen nicht vorhanden. Nur die Gruppe der MIS-C Patient:innen zeigte übergreifend Veränderungen der Blutgerinnung mit prothrombotischem Charakter.

In Abbildung 8-3 sind vier für die Immunphänotypisierung relevante Parameter des klinischen Blutbilds dargestellt. Auf Grund der altersabhängige Referenzbereich sind Lymphozyten, Neutrophile Granulozyten & Monozyten gegen einen Altersverlauf dargestellt. Hier zeigte sich, dass 8 Covid Patient:innen eine gegenüber der altersspezifischen Referenzspanne erniedrigte

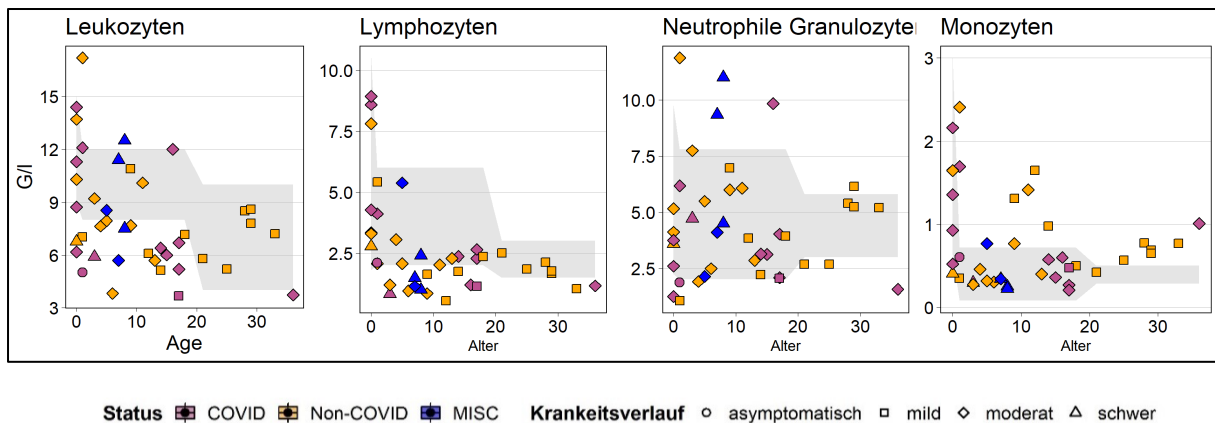


Abbildung 8-3 - Klinisches Blutbild - Immunzelltypen in G/l gegen Alter, Referenzbereich in grau hinterlegt. Farben- und Formlegende unter der Abbildung.

Leukozyten Zahl aufwiesen. Diese war auch bei 9 Non-COVID und 2 MISC Patient:innen zu beobachten. Lymphopenie gilt als ein Kennzeichen einer COVID-19 Erkrankung und der Schweregrad lässt Rückschlüsse und Vorhersagen über den Verlauf und den Ausgang schwerer Infektionen zu, wobei niedrigere Lymphozytenzahlen mit einem schlechteren Ausgang assoziiert sind (Huang und Pranata 2020). Nur drei COVID Patient:innen, unter anderem ein schwer betroffener Patient, zeigten im klinischen Blutbild eine nachweisbare absolute Lymphopenie. In der Non-COVID Gruppe war dies bei 6 Patient:innen und drei von fünf MISC Patient:innen zu finden.

Sowohl neutrophile Granulozyten als auch Monozyten waren in der COVID Gruppe im altersentsprechenden Referenzbereich. In der Non-COVID Gruppe zeigte eine Subgruppe der Patient:innen eine leichte Erhöhung der Monozyten Zahlen.

Das klinische Labor pädiatrischer COVID-Patient:innen zeigt den milden Verläufen entsprechend keine schweren Blutbildveränderungen und nur bei einer Untergruppe der Patient:innen eine inflammatorische Signatur. Veränderungen waren mit der Schwere der Erkrankung assoziiert und somit bei schwerer betroffenen Patient:innen stärker ausgeprägt.

Die Non-COVID Gruppe präsentierte sich mit größtenteils vergleichbaren Blutbildern. Dies bietet weitere Evidenz dafür eine Vergleichbarkeit der beiden Gruppen hinsichtlich systemischer inflammatorischer Prozesse anzunehmen. MIS-C grenzte sich zu beiden Gruppen durch eine inflammatorische Signatur und mit erhöhter Prävalenz auftretender Lymphopenie ab.

8.4 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG

8.4.1 Stratifizierung

Die Frequenz und funktionelle Kapazität verschiedener Immunzell-Subpopulationen zeigen eine breite, altersbedingte Varianz. Diese ist bei Immunzellen der adaptiven Immunantwort besonders ausgeprägt. Aber auch Zellen der angeborenen Immunantwort zeigen über den Verlauf des Lebens eine funktionelle Entwicklung. (Simon et al. 2015; Valiathan et al. 2016)

Um Abhängigkeiten innerhalb des Datensatzes aufzudecken und die Validität der Stratifizierungsstrategien zu überprüfen, wurde innerhalb der COVID-Gruppe eine Korrelationsanalyse aller gemessenen Immunzellsubpopulationen mit klinischen Verlaufs- und Laborparametern und eine PCA, wie in Abschnitt 7.6 beschrieben, durchgeführt. Abbildung 8-4 zeigt eine Heatmap der Korrelationskoeffizienten. Von 28 bestimmten T und B-Zellsubpopulationen zeigten 14 innerhalb der COVID-Gruppe eine signifikante Korrelation mit dem Alter der Patienten. Hiervon waren 9 nach der Korrektur für multiples Testen bei einem alpha-Niveau von 0.1 signifikant. Bei Zellen der angeborenen Immunantwort war diese starke, altersabhängige Varianz nicht zu beobachten.

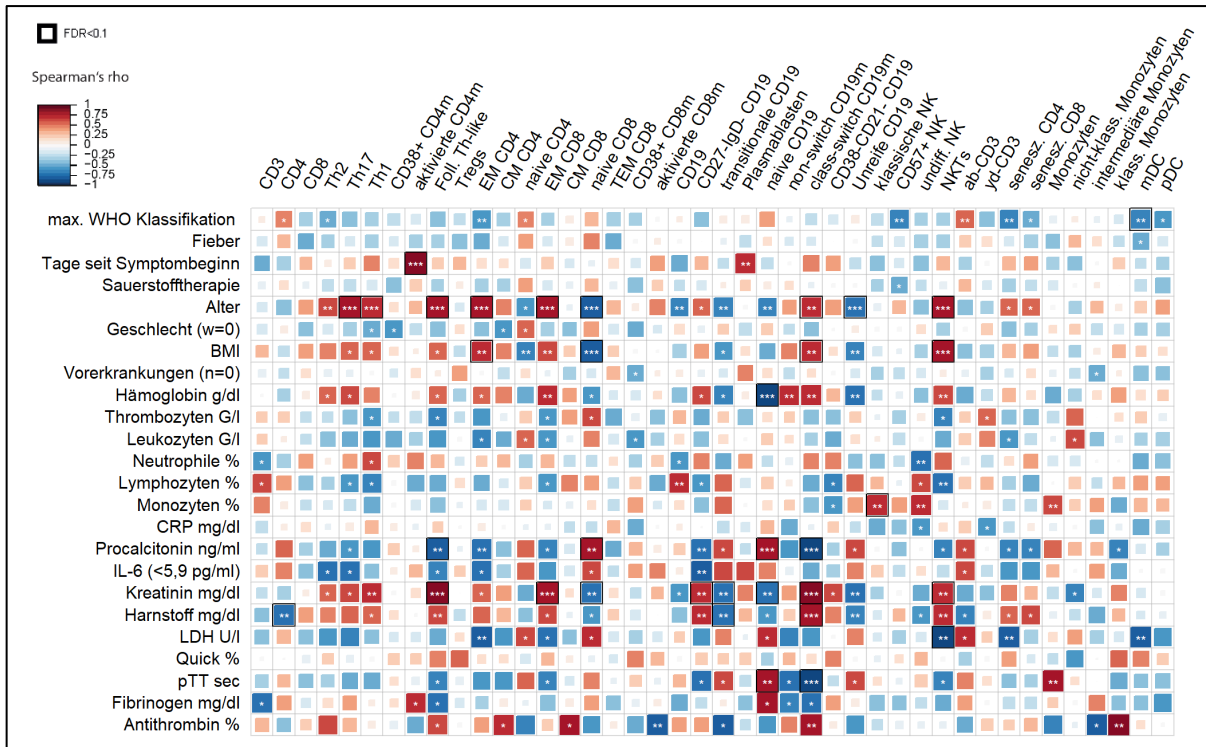


Abbildung 8-4 - Korrelations-Heatmap – Spearman-Korrelationskoeffizienten der angegebenen klinischen Eigenschaften und Laborwerten mit Immunzellfrequenzen. Die Resultate der statistischen Tests sind als p-Werte ermittelt durch Wilcoxon-Rank-Sum-Test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Multiple-Test-Correction wurde mittels Benjamini-Hochberg Prozedur durchgeführt, schwarzer Rahmen $FDR < 0.1$, Farblgende oben-links neben der Abbildung

Nur eine Zellsubpopulation (mDCs), war signifikant mit der Schwere des Krankheitsverlaufs korreliert, was sich wahrscheinlich auf die geringe Anzahl schwerer Verläufe und generell geringe Varianz hinsichtlich des Krankheitsverlaufs innerhalb der COVID-Gruppe zurückführen lässt. Mehrere B-Zell-Subpopulationen zeigten signifikante Korrelationen mit PCT, Kreatinin, Harnstoff und der partiellen Thromboplastinzeit-Zeit (pTT). Naive B-Zellen und IgG-produzierende Gedächtnis B-Zellen (class-switch CD19m) waren jeweils gegensätzlich mit Kreatinin, Harnstoff und PCT und signifikant mit dem Alter der Patient:innen korreliert, was auf einen maskierten, mit dem Alter der Patient:innen korrelierten Effekt hindeutet, da naive und Gedächtnis B-Zellen ein gegenläufige Altersabhängigkeit aufweisen.

Um Quellen von Varianz in unserem Datensatz weiter zu explorieren, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal component analysis – PCA), wie im Methodenabschnitt 7.6 beschrieben, durchgeführt und in Abbildung 8-5 dargestellt.

Hierbei zeigte sich, dass sich die Altersgruppen, diagnoseunabhängig, entlang der ersten Hauptkomponenten, der 25.25% der Varianz im gesamten Datensatz repräsentiert, aufreihen. Der erste Eigenvektor, auf den der höchste Anteil der Gesamtvarianz projiziert ist, hat mit dem Alter der Patient:innen einen Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0.71 (Konfidenzintervall: 0.575023- 0.8111413) , und die gepoolten Altersgruppen mit Patient:innen aus allen Studiengruppen sind hochsignifikant unterschiedlich voneinander. Hingegen Bestand zwischen den Studiengruppen entlang des ersten Hauptkomponenten kein signifikanter Gruppenunterschied.

Die Gewichtungen der Immunzellsubpopulationen zeigen, dass besonders naive und unreife T- und B-Zellen, und antigenerfahrene T- und B-Zellen in der Konstruktion dieses Hauptkomponenten wichtig sind. Die Verschiebung adaptiver Immunzellen von naiven und unreifen Phänotypen hin zu antigenerfahrenen Phänotypen ist also der wichtigste Faktor für die Auffächerung entlang des ersten Hauptkomponenten und somit für die Unterschiede zwischen den Altersgruppen.

Der zweite Hauptkomponent, auf den 10,0% der Gesamtvarianz des Datensatzes projiziert sind, zeigte keinen Unterschied zwischen den Altersgruppen. Dafür war die Gruppe der gesunden Kontrollen signifikant verschieden von COVID, Non-COVID und MISC Patient:innen. Ein signifikanter Unterschied zwischen COVID, Non-COVID und MISC Patient:innen bestand hingegen nicht.

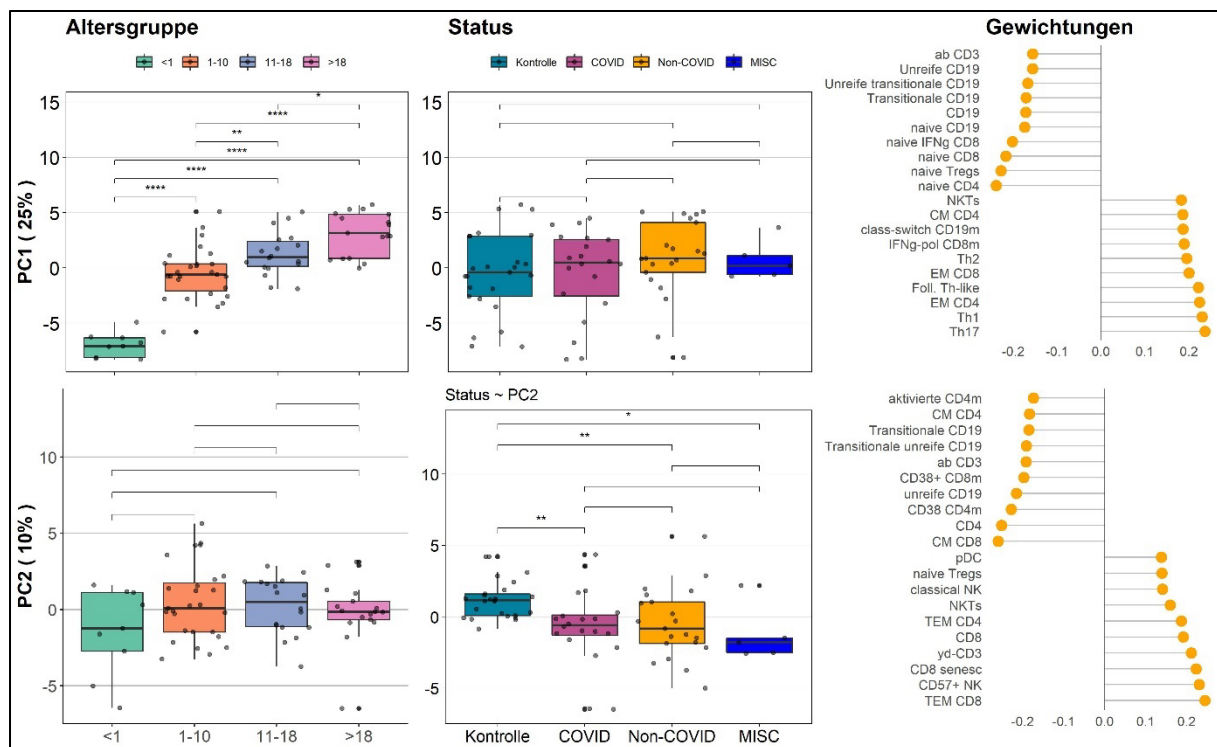


Abbildung 8-5 - PCA-Analyse – Oben: Projektionen der Patient:innen Proben auf Principal-Komponente 1 (PC1, dt. 1. Hauptkomponent), links: Projektion der Altersgruppen, Mitte: Projektionen der Studiengruppen, Rechts: Gewicht der Immunzellen bei PC1; Unten: Projektionen der Patient:innen Proben auf Principal-Komponente 2 (PC2, dt. 2. Hauptkomponent), links: Projektion der Altersgruppen, Mitte: Projektionen der Studiengruppen, Rechts: Gewicht der Immunzellen bei PC1; Die Resultate der statistischen Tests sind als p-Werte ermittelt durch Wilcoxon-Sum-Test angegeben, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Die Gewichtungen des zweiten Hauptkomponenten zeigen, dass aktivierte und Gedächtnis Phänotypen von CD4+ und CD8+ T-Zellen auf der einen und terminal differenzierte und seneszente CD4+ und CD8+ T-Zellen auf der anderen Seite für die Unterscheidung von gesunden und kranken Patient:innen wichtig sind.

Dies deutet darauf hin, dass die größte Varianz innerhalb des in dieser Arbeit verwendeten Datensatzes nicht durch die diagnosebezogene Gruppenzugehörigkeit (COVID, Non-COVID, MISC, Kontrolle), sondern durch das Alter bedingt ist. Kranke Patient:innen unterscheiden sich in ihrem globalen Immunprofil zwar signifikant von gesunden Proband:innen, jedoch nicht voneinander.

8.4.2 Adaptive Immunantwort – T-Zellen

Lymphopenie wird während einer akuten COVID-19 Erkrankung häufig beobachtet, und niedrige Lymphozytenzahlen sind bei Erwachsenen mit COVID-19 prädiktiv für einen schweren Verlauf (Huang und Pranata 2020; Giamarellos-Bourboulis et al. 2020). Bemerkenswerterweise zeigte eine Untergruppe erwachsener Patient:innen eine Hyperaktivierung und Erschöpfung von CD4+ und CD8+ T-Zellen. Diese kann zu einem Cytokine-release syndrome (CRS) beitragen, das mit einer stark erhöhten Sterblichkeit verbunden ist (Mathew et al. 2020; Del Valle et al. 2020; Giamarellos-Bourboulis et al. 2020; Lucas et al. 2020). Eine starke Aktivierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen ist auch bei Patient:innen mit MIS-C beschrieben worden. (Consiglio et al. 2020; Gruber et al. 2020; Vella et al. 2020)

Abbildung 6-6 zeigt die Ergebnisse der immunphänotypischen Charakterisierung von T-Zellen. In unserer Kohorte wiesen Kinder und Jugendliche mit COVID-19 eine gegenüber der gesunden Kohorte verminderten Anteil an T-Zellen unter allen Leukozyten auf. Diese war in der Gruppe der Jugendlichen signifikant und näherte sich der Signifikanzgrenze in der Gruppe der Kinder von 1-10 Jahren (Abb.8-6 A). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der COVID- und Non-COVID-Gruppe. Auch MISC Patient:innen hatten verminderte CD3-T-Zell-Frequenzen, jedoch nicht signifikant weniger als altersentsprechende COVID Patient:innen. Das Verhältnis der CD4+ zu CD8+ T-Zellen blieb in der COVID-Gruppe unverändert. Eine signifikante Verminderung zeigte sich altersübergreifend bei den CD4+ T-Zellen und nicht bei den CD8+ T-Zellen, wobei besonders CD4+ T-Zellen eine breite Streuung zeigten (Abb. 8-6 B).

In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Saule et al. 2006; Valiathan et al. 2016) konnten dynamische Veränderungen in der Zusammensetzung der Immunzellen und ihrer Untergruppen in Abhängigkeit vom Alter der Patient:innen beobachtet werden. Insbesondere naive CD4+ und CD8+ T-Zellen zeigten mit zunehmendem Alter eine Abnahme (Abb. 8-6 C). Dies spiegelt die natürliche Reifung des Immunsystems durch die antigengesteuerte Generierung von Gedächtniszellen aus dem Pool der naiven Zellen wider (Saule et al. 2006). Um der starken Altersabhängigkeit der naiven T-Zellen Rechnung zu tragen, wurden die Häufigkeit der Gedächtniszellen-Untergruppen als Anteil der nicht-naiven T-Zellen analysiert, um diesen Effekt zu kontrollieren und Verschiebungen innerhalb dieser Zellpopulationen klarer erkennbar zu machen.

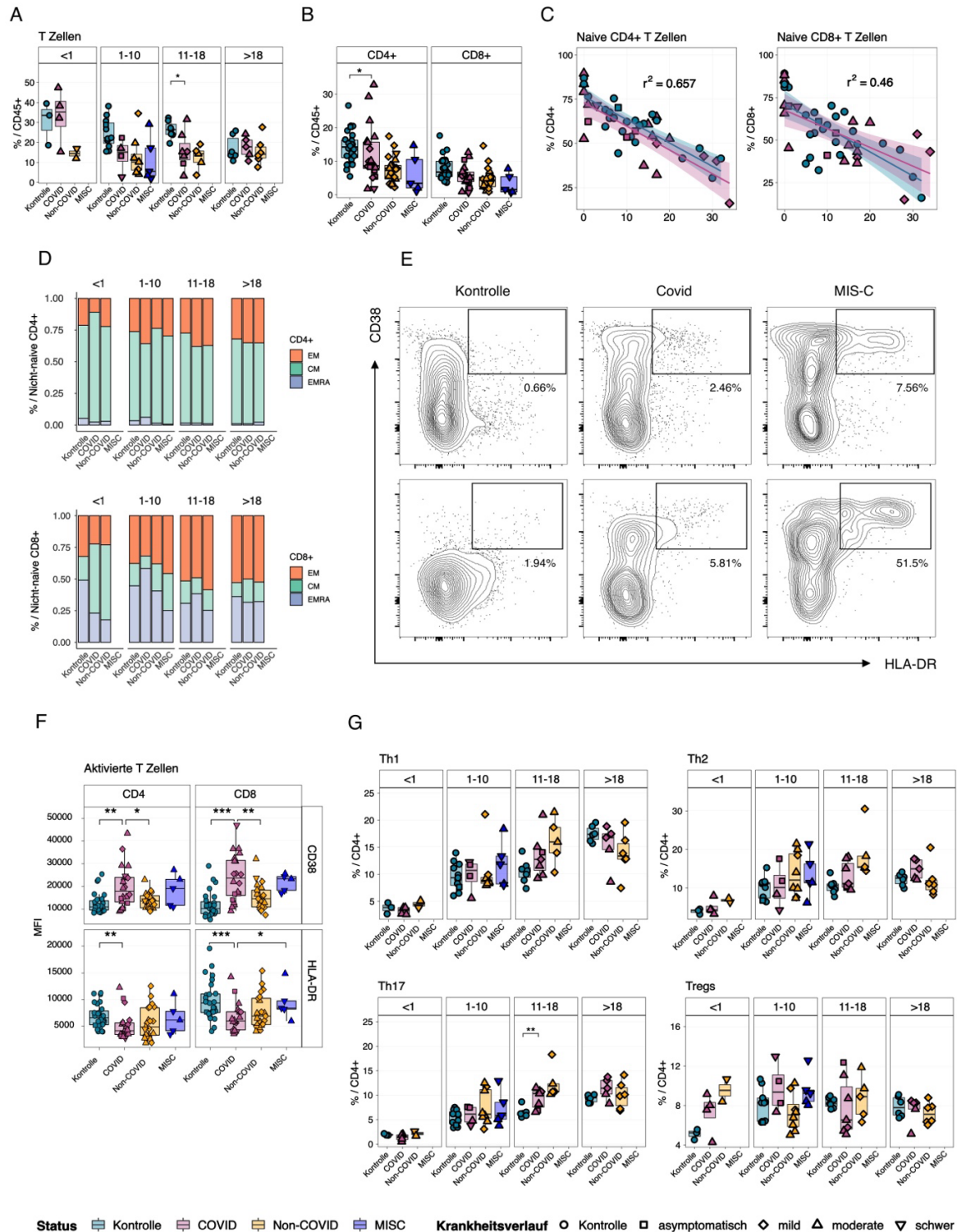


Abbildung 8-6 - T-Zellen – A, Frequenz CD3+ T-Zellen unter CD45+ Leukozyten; B, Frequenz von CD4+ und CD8+ T-Zellen unter CD45+ Leukozyten; C, Frequenz von naiven CD4+ und CD8+ T-Zellen unter respektive allen CD4+ und CD8+ T-Zellen gegen Alter, COVID-Patient*inne und gesunde Kontrollen; D, Relative Anteile zentraler Gedächtnis (engl. Central-memory, CM), Effektor-Gedächtnis (engl. Effector memory, EM) und terminal differenzierter (engl. terminally differentiated effector memory, TEM) CD4+ und CD8+ T-Zellen unter nicht-naiven CD4+ und CD8+ T-Zellen; E, Repräsentative Durchflusszytometrische Abbildungen und Quantifizierung CD38+HLA-DR+ nicht-naiver CD4+ und CD8+ T-Zellen bei Kontrollen, COVID- und MISC-Patient:innen; F, Durchschnittliche Fluoreszenz Intensität (engl. Mean-fluorescence intensity, MFI) von CD38 und HLA-DR der in E gezeigten Populationen; G, Frequenzen wichtiger CD4+ T-Zell Subpopulationen unter CD4+ T-Zellen. Die Resultate der statistischen Tests sind als p-Werte ermittelt durch Wilcoxon-Rank-Sum-Test angegeben, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Farben- und Formlegende unter der Abbildung.

Bei Erwachsenen mit COVID-19 wurde eine erhebliche Heterogenität der CD4⁺ T-Zell-Phänotypen beschrieben. Proinflammatorische Zytokin-Signaturen und massive T-Zell-Aktivierung wurden vor allem bei erwachsenen Patient:innen mit schwerem COVID-19 gefunden, während eine T-Zell-Erschöpfung, charakterisiert durch Expression inhibitorischer Oberflächenmoleküle wie CTLA-4 und PD-1 bei einer Untergruppe mit mittelschwerer und schwerer Erkrankung festgestellt wurde (Mathew et al. 2020; Lucas et al. 2020; Su et al. 2020).

In unserer Kohorte war das Kompartiment CD4⁺ T-Zellen von Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen mit COVID-19 durch höhere Frequenzen von CD45RO⁺ CCR7⁻ Effektor-T-Zellen und eine gleichzeitige Abnahme der CD45RO⁺ CCR7⁺ zentralen Gedächtnis-T-Zellen gekennzeichnet (Abb. 8-6 D oben). Säuglinge hingegen zeigten den umgekehrten Trend, gekennzeichnet durch eine Abnahme der Effektor-T-Zellen und einer Zunahme zentraler Gedächtnis-T-Zellen. Diese Verschiebung war auch bei den Nicht-COVID-Kontrollen variabler. Säuglinge und Kinder zeigten keine Verschiebungen gegenüber gesunden Kontrollen. Jugendliche und Erwachsene hatten ähnlich wie COVID Patient:innen erhöhte Frequenzen von Effektor-T-Zellen. Auch Patient:innen mit MIS-C zeigten erhöhte Effektor T-Zell Frequenzen.

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen werden mit dem Fortschreiten von einer leichten oder mittelschweren COVID-19 Erkrankung hin zu einem schweren Verlauf in Verbindung gebracht. Es wurden sowohl eine klonale Expansion in bronchoalveolären Lavage-Proben (BAL) (Liao et al. 2020) und als auch eine anhaltende Hyperaktivierung bis hin zur Erschöpfung im peripheren Blut beobachtet (Su et al. 2020; Candia et al. 2020). Bei MIS-C wurden Endothelpatrouillierende CD8⁺ T-Zellen beschrieben, die mit der Entstehung vaskulärer Manifestationen der Erkrankung in Verbindung gebracht wurden. (Vella et al. 2020)

CD8⁺ T-Zellen zeigten bei COVID-Patient:innen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit Non-COVID oder MIS-C-Patient:innen. Auch bei der Verteilung der nicht-naiven CD8⁺ Gedächtnis-Subsets zwischen COVID-19-Patient:innen und Personen in der gesunden oder Non-COVID-Kontrollgruppe gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb 8-6 D unten).

CD38⁺ HLA-DR⁺ T-Zellen gelten als aktiviert, und es hat sich gezeigt, dass die Frequenz aktivierter CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen bei Erwachsenen mit schwerem COVID-19- und MIS-C Patient:innen erhöht ist. Aktivierte T-Zellen können durch dysregulierte Zytokin-Freisetzung zur Entstehung eines CRS und hierdurch zur immunvermittelten Organschädigung beitragen

(Mathew et al. 2020; Candia et al. 2020; Del Valle et al. 2020; Lucas et al. 2020; Zhou et al. 2020c). Kinder und Jugendlichen zeigten eine leichte, nicht signifikante Erhöhung aktivierter CD4⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen zeigten keine erkennbare Aktivierung gegenüber gesunden Kontrollpersonen. Im Vergleich dazu wiesen Patienten mit MIS-C signifikant erhöhte Frequenzen aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf, was die hyperinflammatorische Natur der Erkrankung unterstreicht (Abb. 8-6 E).

Aktivierte T-Zellen wiesen bei COVID-Patient:innen ein markantes Expressionsprofil der Oberflächenmarker auf (Abb. 8-6 F). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD38 war bei COVID-19 Patient:innen auf aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen und Non-COVID Patient:innen signifikant erhöht. Darüber hinaus wiesen COVID-19-Patient:innen in allen Altersgruppen eine gegenüber der gesunden Kontrollgruppe geringere HLA-DR-Oberflächenexpression auf, die auch in der Non-COVID Kontrollgruppe zu beobachten war.

Es wird allgemein angenommen, dass T-Helfer-1-Zellen (Th1) durch die Stimulierung zytotoxischer T-Zellen und Makrophagen zur Viruskontrolle beitragen, während Th2-Zellen mit der Kontrolle von Parasiten und Helminthen in Verbindung gebracht werden. Th17 rekrutieren durch IL-17 und -22 Sekretion Neutrophile Granulozyten und Monozyten und spielen bei der Abwehr von Bakterien- und Pilzinfektionen, aber auch bei Autoimmunerkrankungen, eine wichtige Rolle. Regulatorische T-Zellen tragen durch Sekretion von Interleukin-10 und Interleukin-35 zur anti-inflammatorischen Regulation von Th1 und Th17 Zellen bei. (Candia et al. 2020).

Bei pädiatrischen COVID-19 Patient:innen war keine klare Signatur innerhalb des CD4 Kompartiments erkennbar. Einzig jugendliche Patient:innen zeigten eine signifikant erhöhte Frequenz von Th17 T-Zellen. Die Frequenz regulatorischer T-Zellen war bei Säuglinge sowohl in der COVID als auch in der Non-COVID Gruppe erhöht, auch wenn die Signifikanzgrenze nicht überschritten wurde.

Insgesamt zeigen die T-Zell Profile von pädiatrischen COVID-19 Patient:innen, alterstypische Veränderungen, eine Verschiebung von CD4⁺ T-Zellen zum Effektor Phänotyp und keine signifikante Aktivierung. MIS-C Patient:innen hingegen präsentierten sich mit gegenüber COVID-19 Patient:innen signifikant erhöhter T-Zell Aktivierung. Aktivierte T-Zellen von COVID-19 Patient:innen zeigen einen auffälligen Phänotyp mit hoher CD38 und niedriger HLA-

DR Expression. Allgemein bestand erhebliche Heterogenität zwischen den Altersgruppen innerhalb der Studiengruppen und zwischen leicht und schwer betroffenen Patient:innen.

8.4.3 Adaptive Immunantwort – B-Zellen

Eine verringerte Anzahl zirkulierender B-Lymphozyten und eine robuste Plasmablastenantwort sind bei Erwachsenen mit COVID-19 bereits beschrieben worden (Mathew et al. 2020; Arunachalam et al. 2020; Lucas et al. 2020). Pädiatrische Studien lieferten bisher widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die B-Zell-Häufigkeit und konzentrierten sich stattdessen auf die Antikörperproduktion als Stellvertreter für die B-Zell-Reaktion (Vella et al. 2020; Pierce et al. 2020). Trotz des post-infektiösen Zeitpunkts zeigten Patient:innen mit MIS-C eine erhöhte Frequenz Antikörper produzierende Plasmablasten und eine Bandbreite anti-viraler und autoreaktiver Antikörper. (Vella et al. 2020; Gruber et al. 2020; Consiglio et al. 2020)

Abbildung 8-7 zeigt die Ergebnisse der immunphänotypischen B-Zell-Charakterisierung. Jugendliche COVID-19-Patient:innen wiesen in unserer Kohorte eine geringere Häufigkeit von B-Zellen gegenüber der altersentsprechenden gesunden Vergleichsgruppe auf (Abb. 8-7 A). Diese Veränderung war bei Säuglingen, Kindern und Erwachsenen nicht zu beobachten. Der Unterschied zur Non-COVID und MISC Gruppe war nicht signifikant.

Interessanterweise wurde bei Kindern und Erwachsenen mit COVID-19 im Vergleich zu gesunden und Non-COVID-Kontrollen ein signifikanter Anstieg von CD24+CD38+ Transitionellen B-Zellen beobachtet (Abb. 8-7 B). Transitionelle B-Zellen stellen eine Zwischenstufe der B-Zell Entwicklung dar. Nach der Emigration unreifer B-Zellen aus dem Knochenmark findet die weitere Reifung in zu transitionellen B-Zellen in der Milz statt, wonach diese in den Pool reifer B-Zellen in den Follikeln der Lymphknoten und Milz aufgenommen werden. (Loder et al. 1999; Sims et al. 2005)

Die Verteilungen der B-Zell Gedächtnis Subpopulationen war auffällig verändert. Der Anteil naiver B-Zellen war erhöht, der Anteil IgM (IgD+CD27+) und IgG-produzierender (IgD-CD27+) Gedächtnis-B-Zellen hingegen erniedrigt (Abb. 8-7 C). Beide Veränderungen waren in allen Altersgruppen zu beobachten, jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei Erwachsenen war die Erhöhung der Frequenz naiver B-Zellen und die Erniedrigung der Frequenz von Gedächtnis-Subpopulationen klar zu erkennen und statistisch

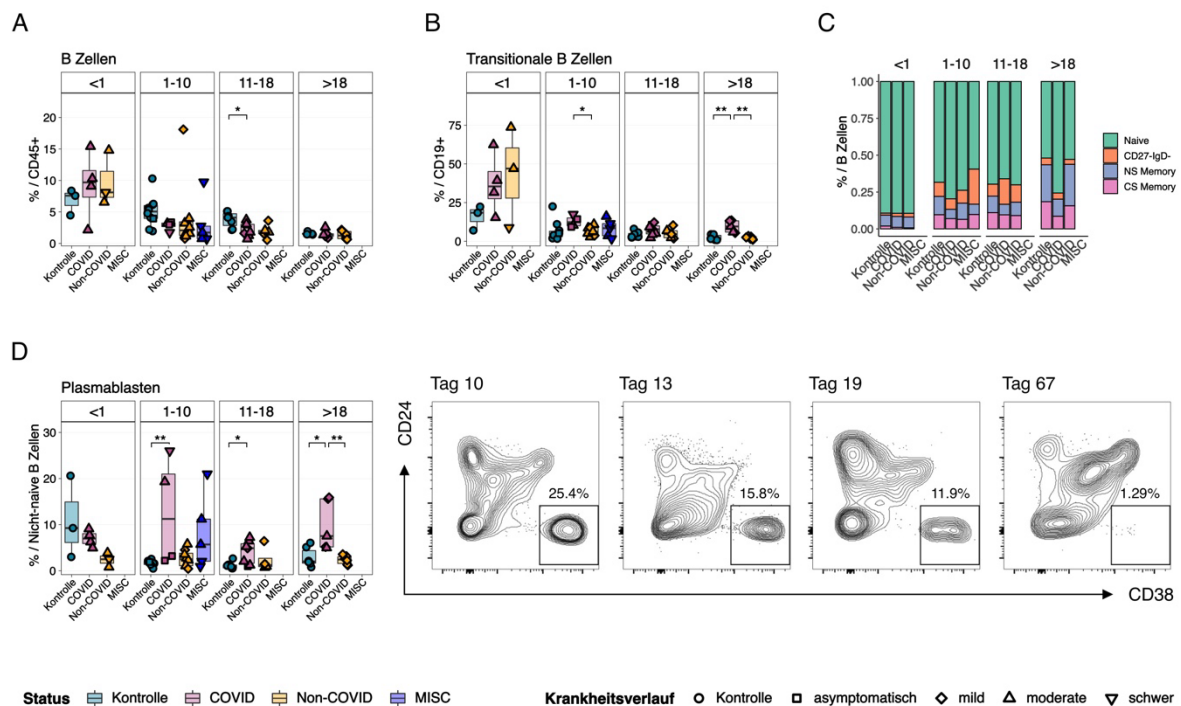


Abbildung 8-7 - B-Zellen – A, Frequenz CD19+ B-Zellen unter CD45+ Leukozyten; B, Frequenz transistionaler B-Zellen und CD19+ B-Zellen; C, Relative Anteile naiver (Naive), CD27-IgD-, IgM-produzierender Gedächtnis- (engl. Non-switch Memory, NS Memory) und IgG-produzierender Gedächtnis (engl. Class-switch memory, CS Memory) B-Zellen unter CD19+ B-Zellen; D, links, Frequenz von Plasmablasten unter nicht-naiven CD19+ B-Zellen, rechts, Durchflusszytometrische Abbildungen, die den Verlauf der Plasmablastenfrequenz an den Tagen 10, 13, 19 und 67 nach Symptombeginn illustrieren. Die Resultate der statistischen Tests sind als p-Werte ermittelt durch Wilcoxon-Rank-Sum-Test angegeben, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Farben- und Formlegende unter der Abbildung.

signifikant. Ein ähnlicher Trend zeichnete sich bei Kindern und Jugendlichen ab, war jedoch nicht durchgehend statistisch signifikant.

Einige Tage nach einer Infektion oder Impfung kann im peripheren Blut häufig ein vorübergehender Anstieg Antikörper-sezernierender CD24+ CD38+ Plasmablasten nachgewiesen werden (Ellebedy et al. 2014). In der Tat war eine COVID-19 Erkrankung bei der Mehrheit der Kinder, Jugendlichen und Erwachsenen mit einem signifikanten Anstieg der Plasmablastenfrequenz verbunden (Abb. 8-7 D). Bei Säuglingen war dies nicht zu beobachten. Bemerkenswert ist, dass ein direkter Vergleich von COVID-19- und MIS-C-Patient:innen eine ähnliche Höhe der Plasmablastenantwort zeigte. Trotz der beschriebenen Latenzphase von mehreren Wochen zwischen der Infektion mit SARS-CoV2 und dem Auftreten von MIS-C war die Häufigkeit von Plasmablasten bei Patienten mit MIS-C ähnlich hoch wie bei einigen der pädiatrischen COVID-19-Patienten.

Die longitudinale Untersuchung eines schwer betroffenen COVID-19-Patienten zeigte eine mit der Zeit abnehmende Frequenz der Plasmablasten nach initial sehr hohen Werten (Abb. 8-7 E). Der erfasste Höhepunkt lag 10 Tage nach Symptombeginn am Tag der Krankenhausaufnahme. In den folgenden 9 Tagen nahm die Plasmablastenfrequenz allmählich ab. Einschränkend muss erwähnt werden, dass der beschriebene Patient im klinischen Kontext mit immunmodulatorischen und antiviralen Medikamenten behandelt wurde, was vermutlich eine beeinflussende Rolle bei der Dynamik der Immunreaktion gespielt hat. Bei der Nachuntersuchung zwei Monate nach dem Krankenhausaufenthalt waren die Plasmablasten auf den Ausgangswert zurückgegangen.

Insgesamt zeigte die Analyse des B-Zell-Kompartiments bei pädiatrischem COVID-19 eine Veränderungen der Zusammensetzung der B-Zell-Untergruppen mit verstärkter Mobilisierung von Übergangszellen aus dem Knochenmark und eine Erhöhung des Anteils naiver Zellen im zirkulierenden B-Zell-Pool. Während der akuten Krankheitsphase war eine robuste Plasmablastenantwort mit vermutlich damit einhergehender Antikörperproduktion zu beobachten. MISC Patient:innen zeigten verringerte B-Zell Frequenzen und einen starken, mit einer schweren akuten Infektion vergleichbaren, Plasmablastenanstieg.

8.4.4 Unspezifische Immunantwort – Myeloid Zellen

Monozyten und dendritische Zellen repräsentieren eine wichtige Schnittstelle des Immunsystems. Sie phagozytieren Pathogene direkt nach der Erkennung über Toll-like Rezeptoren und aktivieren Zellen der adaptiven Immunantwort durch die Präsentation von Polypeptiden über MHC-2 Moleküle wie HLA-DR auf ihrer Oberfläche. Außerdem koordinieren sie die initiale Immunantwort über die Sekretion von Zytokinen, die auf T- und B-Zellen und andere Zellen der angeborenen Immunantwort einwirken. Eine Fehlfunktion von Monozyten und dendritischen Zellen wurde mit der Entstehung einer überschießenden systemischen Inflammation bei schwerem COVID-19 assoziiert. Die stärkste Ausprägung ist ein sekundäres Makrophagenaktivierungssyndrom. Gleichzeitig wurden in ihrer Funktion eingeschränkte, inaktive Monozyten bei schwerem COVID-19 beschrieben. (Giamarellos-Bourboulis et al. 2020; Arunachalam et al. 2020; Schulte-Schrepping et al. 2020; Merad und Martin 2020)

Abbildung 8-8 zeigt die Ergebnisse der immunphänotypischen Charakterisierung von Monozyten und dendritischen Zellen

Kinder mit COVID-19 zeigten einen signifikanten Anstieg der Monozyten Frequenzen im Vergleich zu gesunden und Non-COVID Kontrollen, mit einem ähnlichen Trend bei Jugendlichen und Erwachsenen (Abb. 8-8 A). MISC Patient:innen unterschieden sich nicht signifikant von COVID-Patient:innen.

Monozyten-Subpopulationen zeigten während der akuten Infektion zeigten einige auffällige Veränderungen. CD14⁺CD16⁺, intermediäre Monozyten wiesen eine breite Streuung bei Jugendlichen und Erwachsenen auf, wobei die Frequenz intermediärer Monozyten bei einer Untergruppe der Patient:innen stark erhöht war. Bei jungen erwachsenen Patient:innen bestand ein signifikanter Unterschied gegenüber gesunden Kontrollen (Abb. 8-8 B). Bei Non-COVID und MISC Patient:innen war keine ähnliche Streuung zu beobachten. Intermediäre Monozyten haben die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6, die alle Kennzeichen der inflammatorischen Zytokinsignatur von schweren COVID-19 bei Erwachsenen und MIS-C sind. (Wong et al. 2012; Kapellos et al. 2019; Del Valle et al. 2020)

Jugendliche COVID-19 Patient:innen präsentierten sich mit gegenüber gesunden Kontrollen und Non-COVID Patient:innen signifikant reduzierter Anzahl von CD14⁺CD16⁺, nicht-klassischen Monozyten (Abb. 8-8 B). Während Kinder einen ähnlichen Trend zeigten, war bei Säuglingen und jungen Erwachsene keine eindeutige Signatur erkennbar. MIS-C Patient:innen wiesen eine Aufspaltung in hohe niedrige Frequenzen nicht-klassischer Monozyten auf.

Frühe Studien berichteten von einer erhöhten HLA-DR-Expression bei Erwachsenen mit leichtem COVID-19 und einer anhaltend niedrigen HLA-DR-Expression bei schweren Fällen. Eine Untergruppe der Patient:innen mit schwerem COVID-19 zeigte hingegen Merkmale eines sekundären Aktivierungssyndroms mit erhöhter HLA-DR Expression. (Giamarellos-Bourboulis et al. 2020; Schulte-Schrepping et al. 2020)

Bemerkenswert ist, dass eine offenbar altersabhängige Fähigkeit von Monozyten zur dynamischen Regulation der HLA-DR-Oberflächenexpression als Reaktion auf eine Infektion festgestellt werden konnte (Abb. 8-8 C). Bei gesunden Personen waren die HLA-DR-Werte bei Säuglingen niedrig, bei Kindern am höchsten und nahmen dann mit dem Alter deutlich ab. Im Gegensatz zu Säuglingen und Erwachsenen, deren HLA-DR-Oberflächenexpression nicht auf eine Infektion reagierten, wiesen Kinder und in geringerem Maße auch Jugendliche mit

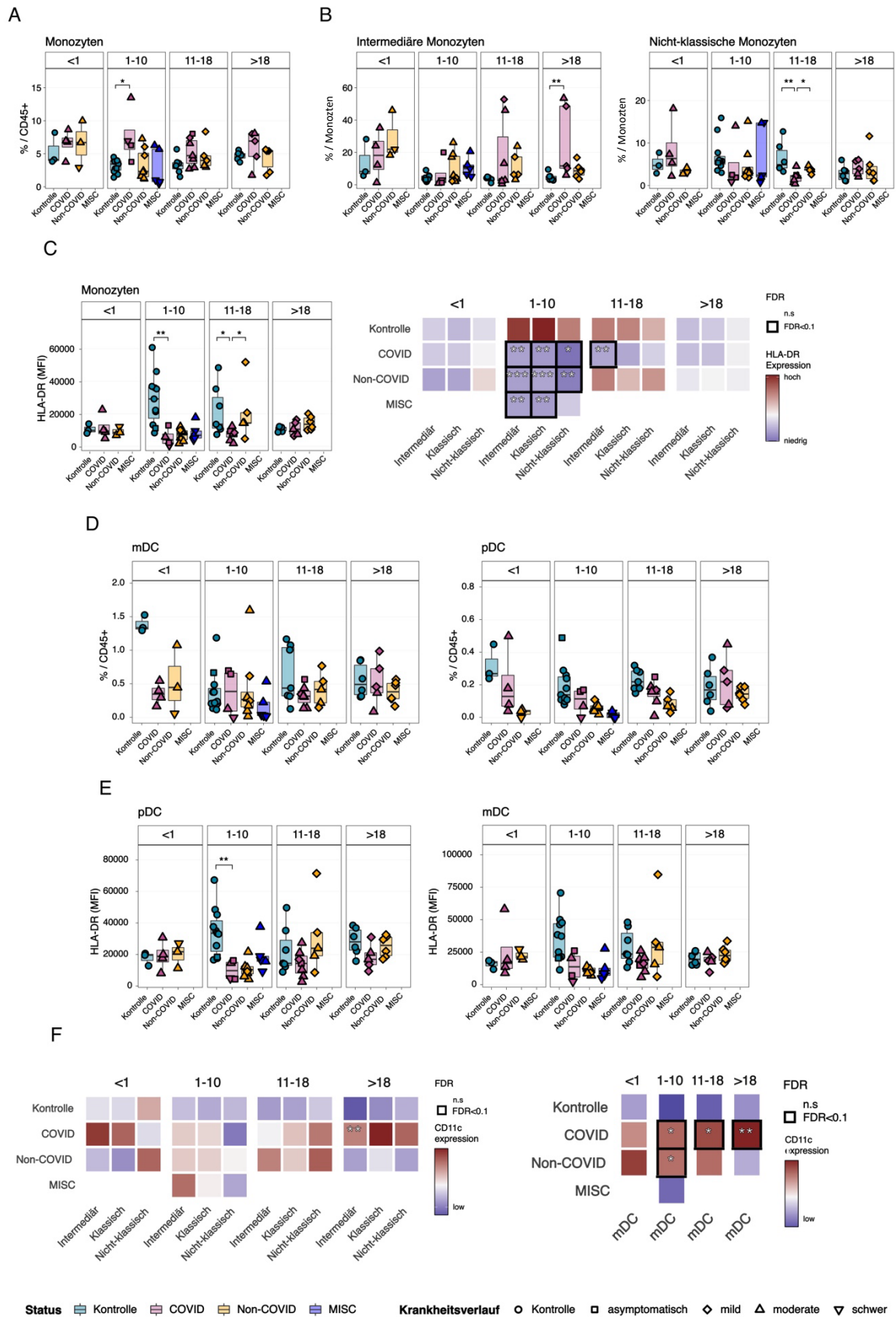


Abbildung 8-8 – Myeloide Zellen – A, Monozyten unter CD45+ Leukozyten; B, links, Intermediäre Monozyten unter Monozyten, rechts, Nicht-klassische Monozyten unter Monozyten; C, links, Durchschnittliche Fluoreszenz Intensität (engl. Mean-fluorescence intensity, MFI) von HLA-DR auf Monozyten, rechts, Kachelabbildung der standardisierten Abweichung der HLA-DR Expression von Monozyten-Subpopulationen wie angegeben vom gemeinsamen ... (Fortsetzung nächste Seite)

*(Fortsetzung vorherige Seite) ... Mittelwert, statistische Tests beziehen sich auf den Vergleich Kontrolle vs. COVID, Non-COVID & MISC, Farbenlegende neben der Abbildung; D, links, Frequenz von myeloiden dendritischen Zellen (mDC) unter CD45+ Leukozyten, rechts, Frequenz plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) unter CD45+ Leukozyten; E, links, Durchschnittliche Fluoreszenz Intensität (engl. Mean-fluorescence intensity, MFI) von HLA-DR auf pDCs, rechts, Durchschnittliche Fluoreszenz Intensität (engl. Mean-fluorescence intensity, MFI) von HLA-DR auf mDCs; F, links, Kachelabbildung der standardisierten Abweichung der CD11c Expression von Monozyten-Subpopulationen wie angegeben vom gemeinsamen Mittelwert, rechts Kachelabbildung der standardisierten Abweichung der CD11c Expression von mDCs vom gemeinsamen Mittelwert, statistische Tests beziehen sich auf den Vergleich Kontrolle vs. COVID, Non-COVID & MISC, Farbenlegende neben den Abbildungen. Die Resultate der statistischen Tests sind als p-Werte ermittelt durch Wilcoxon-Rank-Sum-Test angegeben, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Multiple-Test-Correction wurde mittels Benjamini-Hochberg Prozedur durchgeführt, schwarzer Rahmen $FDR < 0.1$. Allgemeine Farben- und Formlegende unter der Abbildung.*

COVID-19 eine signifikant niedrigere HLA-DR-Expression auf Monozyten auf als altersgleiche gesunde Personen (Abb. 8-8 C links). Ähnliche Veränderungen waren auch bei Non-COVID und MIS-C Patient:innen zu beobachten, was auf eine nicht infektiös- oder erregerspezifische Reaktion hindeutet. Eine anschließende Analyse der HLA-DR-Expression auf Monozyten-Untergruppen ergab ein ähnliches Muster der HLA-DR-Herabregulierung auf allen Monozyten-Untergruppen, am stärksten ausgeprägt auf intermediären Monozyten (Abb. 8-8 C rechts).

Plasmazytoide (pDCs) und myeloide dendritischen Zellen (mDCs) repräsentieren einen weiteren Arm der angeborenen Immunität mit der Funktion zur Antigenpräsentation. Insbesondere pDCs haben eine hohe Kapazität zur Sekretion von Typ-1 Interferonen, die sie nach der Detektion viraler RNA oder DNA über Toll-like Rezeptoren produzieren und die bei der frühen Antiviralen Reaktion eine wichtige Rolle spielen (Fitzgerald-Bocarsly et al. 2008). Während sich die Frequenz von pDCs und mDCs zwischen den Gruppen nicht konsistent signifikant unterschied, zeigten pDCs und mDCs ebenfalls eine verringerte HLA-DR-Expression sowohl bei Kindern mit COVID-19- als auch in der Non-COVID Gruppe (Abb. 8-8 D & E). Ähnlich wie auf Monozyten war derselbe Effekt bei Säuglingen, Jugendlichen und Erwachsenen nicht in der gleichen Weise zu beobachten. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Expression von CD11c, einem Integrin, das Chemotaxis und Zelladhäsion vermittelt, auf myeloischen dendritischen Zellen in allen Altersgruppen bei COVID-Patienten hochreguliert ist (Abb. 8-8 F). Auch Monozyten zeigten bei Erwachsenen eine signifikante Erhöhung der CD11c Expression.

Antigen-präsentierende Zellen zeigen bei pädiatrischem COVID-19, Nicht-COVID-19 Infektionen und MIS-C einen bisher unerkannten Phänotyp, insbesondere bei Kindern, der durch eine dynamische Herabregulierung der HLA-DR Expression selbst bei leichter Erkrankung gekennzeichnet ist und altersabhängige Unterschiede in der Immunantwort des Wirts auf SARS-CoV2 und andere Erkrankungen aufzeigt.

9 DISKUSSION

Die mit einer SARS-CoV-2-Infektion verbundene Morbidität und Mortalität ist zu einem großen Anteil immunvermittelt. Trotz weltweiter Bemühungen, die zellulären und molekularen Grundlagen des Immunschutzes gegen SARS-CoV2 zu entschlüsseln, hat sich bisher keine einheitliche Hypothese herauskristallisiert, warum Kinder von schwerer COVID-19-Immunpathologie weitgehend verschont bleiben. (COVID-19 Forecasting Team 2022; Lai et al. 2020; Li et al. 2021; O'Driscoll et al. 2021; Zhou et al. 2020a)

Im Rahmen der Päd-COVID-19 Studie wurde bei 20 Patient:innen mit COVID-19 im Verlauf der Erkrankung, die eine Vorstellung in der Notaufnahme oder einen Krankenhausaufenthalt erforderte, eine eingehende Immunphäotypisierung durchgeführt.

Es kann auf Grund von Altersverteilung und Krankheitsverlauf, beschrieben in Abschnitt 8.1 und 8.2, von einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Studiengruppen COVID, Non-COVID und Kontrolle ausgegangen werden. Die durchschnittliche Krankheitsschwere der COVID und Non-COVID Gruppen war vergleichbar. Der größte Teil der Patient:innen erlebte milde bis moderate Verläufe, mit jeweils zwei schwerer betroffenen Patient:innen pro Gruppe. Eine größere Vergleichbarkeit hätte durch eine genaue Altersentsprechung erreicht werden können, war aber im spezifischen Kontext der Pandemie leider so nicht realisierbar. MIS-C Patient:innen grenzen sich von diesen beiden Gruppen durch eine enge Altersspanne und übergreifend schwerere Krankheitsverläufe ab.

Die in Abschnitt 8.4.1 gezeigte PCA Analyse zeigt globale Altersabhängigkeiten in den Immunprofilen pädiatrischer Patient:innen. Wichtig für diese Veränderungen sind vor allem die Verschiebungen von Zellen der adaptiven Immunantwort von naiven hin zu Antigen-Erfahrenen Gedächtnis und Effektorzellen. Dies stimmt mit veröffentlichten Studien überein. Die Akkumulation von Gedächtniszellen ist insbesondere im Verlauf der Kindheit und Jugend rapide und sorgt für globale Verschiebungen in der Zusammensetzung der Immunzellsubpopulationen und des T-Zell Rezeptor Repertoires der Patient:innen (Saule et al. 2006; Wedderburn et al. 2001; Valiathan et al. 2016). Allgemein ist dieser Trend mit einer physiologischen immunologischen Reifung der Kinder und des Entstehens eines Gedächtnispools vereinbar. Die nach der Geburt einsetzende Exposition gegenüber Umweltkeimen und Antigenen spielt hier eine wichtige Rolle, genauso wie der Kontakt mit

dem nach der Geburt entstehenden Mikrobiom des Darms (Simon et al. 2015; Jenmalm 2011; Openshaw et al. 2004; Ouwehand et al. 2002).

Weiter wird in der PCA Analyse deutlich, dass mit Hilfe der Durchflusszytometrie global Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Patient:innen aufgedeckt wurden, aber Unterschiede zwischen den Diagnosen COVID-19, Non-COVID Infektion und MIS-C keinen großen Einfluss auf die globale Varianz der pädiatrischen Immunprofile in der vorliegenden Arbeit hatten.

Allgemein zeigt die vorliegende Arbeit die Wichtigkeit einer angemessenen Altersstratifizierungsstrategie bei der Durchführung von Immunphänotypisierungsstudien mit pädiatrischen Patienten. Die natürliche immunologische Entwicklung führt zu tiefgreifenden Veränderungen, die, wenn sie nicht berücksichtigt werden, die Validität der Ergebnisse durch Effektmodulation oder Effekt-Konfundierung einschränken können.

Durch die Feinkartierung des pädiatrischen Immunsystems während einer SARS-CoV2-Infektion konnten in dieser Studie kritische altersabhängige Merkmale wie eine geringe T-Zell-Aktivierung und eine Herabregulierung der Antigenpräsentationskapazitäten auf APCs festgestellt werden, die die Immunantwort in dieser Altersgruppe auszeichnen.

Der Großteil der pädiatrischen Patient:innen zeigte keine manifeste Lymphopenie, niedrige T-Zell-Aktivierung sowohl in den CD4+ als auch in den CD8+ T-Zell-Kompartimenten und eine Verschiebung hin zum Effektor-Phänotyp bei CD4+ T-Zellen. Diese Beobachtungen sind vereinbar mit einer milden, schnell abklingenden Infektion, wie sie auch in der Non-COVID Gruppe beobachtet werden konnten. Ein schwer betroffener Patient präsentierte sich mit deutlich anderem, eher erwachsene Patient:innen mit schwerem COVID-19 erinnernden Phänotyp, der durch starke T-Zell Aktivierung gekennzeichnet war. Eine schwere COVID-19-Erkrankung bei Erwachsenen ist auf T-Zell-Ebene durch eine anhaltende Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine gekennzeichnet (Mathew et al. 2020; Blanco-Melo et al. 2020; Lucas et al. 2020; Del Valle et al. 2020). Auf Grund der geringen Fallzahl schwer betroffener Patient:innen war eine Stratifizierung nach Krankheitsverlauf leider nicht möglich.

Die niedrige T-Zell-Aktivierung bei pädiatrischen COVID-19-Patient:innen wurde besonders deutlich im direkten Vergleich mit MIS-C Patient:innen deutlich. Die Mechanismen, die bei MIS-C zu T-Zell-Aktivierung und der damit einhergehenden systemischen Inflammation und

Immunpathologie führen, scheinen bei dem Großteil pädiatrischer COVID-19-Fällen nicht auf dieselbe Art zu wirken. Parallelen lassen sich aber zwischen schweren COVID-19 Verläufen bei Erwachsenen und dem in dieser Studie eingeschlossenen Fall eines schweren pädiatrischen COVID-19 ziehen.

Bei der Entstehung von MIS-C spielen genetische Faktoren eine wichtige Rolle. Verschiedene HLA-Allele sind mit der Entstehung der Krankheit assoziiert worden (Sacco et al. 2022). Das Spike Protein weist strukturelle Homologien zu bekannten Superantigenen auf, die T-Zellen ohne Antigenpräsentierende Zellen aktivieren und zu einem Toxischen Schock Syndrom führen können (Cheng et al. 2020; Porritt et al. 2021). Virale Persistenz in Enterozyten, die zu einer konstante Antigenexposition führt, ist als pathophysiologische Hypothese postuliert worden (Yonker et al. 2021; Lamers et al. 2020).

Die fehlende T-Zell-Aktivierung bei pädiatrischem COVID-19 könnte auf eine geringere Antigenmenge bei Kindern als zu Erwachsenen zurückzuführen sein. Studien hierzu fanden allerdings keine eindeutigen Antworten, denn meistens korrelierte die Viruslast eher mit der Schwere des Krankheitsverlaufs (Jones et al. 2021). In einigen Berichten wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine stärkere lokale Immunreaktion bei Kindern zu einer schnelleren Beseitigung des Virus führt. So wurde sowohl eine höhere Expression von intrazellulären PRR als auch eine stärkere Signatur Interferon-stimulierter Gene bei Kindern gefunden (Pierce et al. 2021; Loske et al. 2022; Koch et al. 2022). Hierfür würden auch die Berichte sprechen, die eine Einschränkung der Interferon-Antwort als Risikofaktor für einen schweren Krankheitsverlauf bei SARS-CoV-2 Infektion identifiziert haben (Zhang et al. 2020; Bastard et al. 2020; Combes et al. 2021; Hadjadj et al. 2020; Zhang et al. 2022). Eine niedrige T-Zell-Aktivierung stellt in dieser Studie ein zelluläres Korrelat für milde klinische Krankheitsverläufe und niedrige systemische Inflammation dar, wie sie im klinischen Labor der COVID-19 Patient:innen zu beobachten war.

In der vorliegenden Studie zeigten pädiatrische Patient:innen mit COVID-19 keine konsistente B-Zell Lymphopenie und einen signifikanten Anstieg Antikörper produzierender Plasmablasten. Beides ist mit dem Ablauf einer Infektion mit humoraler Immunantwort vereinbar. Interessanterweise fand sich auch bei MIS-C Patient:innen eine hohe Plasmablastenfrequenz. Der longitudinale Verlauf eines schwer erkrankten Patienten zeigt, dass die Induktion der Plasmablastenantwort normalerweise temporär ist und sich mit Ablauf der Infektion wieder

zurückbildet. Der post-infektiöse Zeitpunkt von MIS-C wirft zusammen mit der Anwesenheit von Antikörper-produzierenden Zellen also die Frage, warum MIS-C Patient:innen trotz negativer PCR-Testergebnisse weiterhin Antikörper produzieren. Neben autoimmunen Vorgängen ist wie bereits oben erwähnt virale Persistenz in Enterozyten in Betracht zu ziehen, was mit den gastrointestinalen Manifestationen von MIS-C zusammenpassen würde (Yonker et al. 2021; Lamers et al. 2020). Interessant war die Verringerung des Anteils von Gedächtnis B-Zell Subpopulationen bei einem gleichzeitigen Anstieg transitioneller B-Zellen bei einem Teil der COVID-Patient:innen. Da alle Immunzell-Frequenzen in dieser Arbeit als Fraktionen angegeben sind lässt sich nicht eindeutig sagen, ob es sich um eine absolute Abnahme der Gedächtnispopulationen oder eine relative Zunahme naiver Zellen handelt. Der gleichzeitige Befund einer fehlenden absoluten B-Zell-Lymphopenie und der Anstieg transitioneller B-Zellen lässt Letzteres wahrscheinlicher erscheinen. Transitionelle B-Zellen stellen eine Zwischenstufe der B-Zell Entwicklung dar und migrieren aus der Milz in die Lymphfollikel der Lymphknoten oder zurück in die Milz (Loder et al. 1999; Sims et al. 2005). Eine Erhöhung der Frequenz transitioneller B-Zellen könnte somit ein Zeichen für eine Mobilisierung von B-Zell Reservoirs aus der Milz oder dem Knochenmark darstellen, um den Pool zirkulierender und follikulärer B-Zellen aufzufüllen.

Der auffälligste Befund bei pädiatrischem COVID-19 war die Herabregulierung der Antigen-Präsentations-Kapazitäten auf APCs. Hierzu stellen sich zwei Fragen: Wie lässt sich die altersabhängig unterschiedliche Expression von HLA-DR auf Antigen-präsentierenden Zellen interpretieren und was ist die funktionale Bedeutung einer Verminderung der HLA-DR Expression während eines infektiösen oder inflammatorischen Geschehens?

Neben den Veränderungen der adaptiven Immunität während der Kindheit und Jugend finden auch wichtige Entwicklungen im angeborenen Arm des Immunsystems statt. Beispielsweise sind Zellen dieses Systems kurz nach der Geburt in ihren chemotaktischen, phagozytischen und sekretorischen Kapazitäten eingeschränkt (Simon et al. 2015; Kollmann et al. 2012; Georgountzou und Papadopoulos 2017).

Die inflammatorische Kapazität von Antigen-präsentierenden Zellen verändert sich über den Verlauf der Entwicklung. Neugeborenen zeigen eine sehr niedrige HLA-DR Expression, die sich über den Verlauf der ersten 3 bis 9 Monate dem Niveau von Erwachsenen angleicht. Dies geht mit einer Veränderung der Zytokin Sekretion der Antigen-präsentierenden Zellen nach

Stimulation von Toll-like-Rezeptoren (TLR) mit Lipopolysacchariden (LPS) und CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) einher. Monozyten aus Nabelschnur Blut produzierten nach Stimulation große Mengen IL-6, IL-8, IL-1 β und IL-10. Die Sekretion von TNF- α nach LPS Stimulation erreicht erst nach 6 bis 9 Monaten das Niveau von Erwachsenen. (Nguyen et al. 2010)

Ebenfalls bemerkenswert sind Parallelen zu Studien zur mukosalen Immunreaktion von pädiatrischen Patient:innen mit COVID-19: diese fanden eine erhöhte Baseline Expression von PRRs und eine stärkere initiale Typ 1 Interferon Antwort bei Kindern (Loske et al. 2022; Koch et al. 2022; Pierce et al. 2021).

Die unterschiedliche Reagibilität der HLA-DR Expression von Antigen-präsentierender Zellen zwischen Kindern und Erwachsenen stellt ein spezifisches Reaktionsmuster dar. Die Antigenpräsentation spielt eine zentrale Rolle bei der Generierung der adaptiven Immunantwort und könnte über diesen Mechanismus regulierend auf den Ablauf der Immunantwort einwirken und proinflammatorische oder antiinflammatorische Tendenzen modulieren.

Eine temporäre Herabregulierung von HLA-DR auf Monozyten wird als kompensatorisches anti-inflammatorisches Reaktionssyndrom (CARS) bezeichnet und es wird angenommen, dass diese Reaktion zur Wiederherstellung einer pro- und antiinflammatorischen Balance beiträgt (Frazier und Hall 2008; Hall et al. 2017). Eine anhaltende Herabregulierung von HLA-DR auf Monozyten wird hingegen als Immunparalyse bezeichnet (Frazier und Hall 2008). Der Zustand der Immunparalyse ist mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit nosokomialer Infektionen und erhöhter Mortalität verbunden (Landelle et al. 2010; Hall et al. 2011; Monneret et al. 2006). Auch im pädiatrischen Patient:innenkollektiv ist eine Immunparalyse mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verknüpft (Manzoli et al. 2016). Niedrige HLA-DR Expression wurde bei Frühgeborenen festgestellt und gilt als Marker für eine bestehende Immunsuppression (Palojärvi et al. 2013). Ex vivo konnte gezeigt werden, dass die Monozyten von Patient:innen mit Immunparalyse nach LPS- Stimulation weniger TNF- α sezernierten (Hall et al. 2017). Stimulation mit IL-6 und IL-10 führte zur Internalisierung von HLA-DR und einer verminderten Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen (Ohno et al. 2016; Fumeaux und Pugin 2002).

Bei Erwachsenen Patient:innen mit COVID-19 sind unterschiedliche Phänotypen Antigen-präsentierender Zellen beschrieben worden. Eine leichte Erkrankung führt häufig zu einer

Erhöhung der HLA-DR Expression. Schwer betroffene Patient:innen zeigten zwei gegensätzlich Phänotypen mit entweder sehr niedriger HLA-DR Expression und Immunsuppression oder extrem hoher HLA-DR Expression im Rahmen eines Makrophagen-Aktivierungs-Syndroms (MAS). Beide Phänotypen waren mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert. (Schulte-Schrepping et al. 2020; Giamarellos-Bourboulis et al. 2020; Arunachalam et al. 2020)

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das Plasma von COVID-19 Patient:innen die HLA-DR Expression von Monozyten ex vivo inhibierte, was durch eine Zugabe des IL-6-Rezeptor Antikörpers Tocilizumab wieder aufgehoben werden konnte. (Giamarellos-Bourboulis et al. 2020)

In unsere Studie zeigten sowohl COVID als auch Non-COVID und MIS-C Patient:innen niedrige HLA-DR Expressionsniveaus. Dies lässt sich aber nur im Falle des einen schwer betroffenen Patienten als Immunsuppression deuten. Bei den anderen Patient:innen scheint die vorübergehende Herabregulierung der Kapazitäten zur Antigenpräsentation eher protektive, anti-inflammatorische Auswirkungen gehabt zu haben. Dieser Effekt scheint faszinierenderweise altersspezifisch, aber erregerunabhängig zu sein. Interessant ist auch, dass Kinder diesen Phänotyp trotz weitestgehend niedriger IL-6 Serumkonzentrationen im klinischen Labor zeigten.

Reduzierte Antigenpräsentationskapazitäten können zu einer reduzierten Aktivierung von T-Zellen durch APC-vermittelte T-Zell-Rezeptor-Signalgebung führen (Ohno et al. 2016). Eine frühe und starke Herabregulierung der Antigen-präsentierenden Kapazitäten auf APCs könnte die Interaktionsdynamik zwischen angeborenen und adaptiven Immunzellen direkt beeinflussen und dazu beitragen, übermäßige Entzündungen früh im Krankheitsverlauf zu regulieren, wie dies bereits bei CARS beschrieben wurde.

10 LIMITATIONEN

Unsere pädiatrische Studie ist, wie viele andere auch, durch die geringe Anzahl der für die Analyse verfügbaren Proben begrenzt, was die Granularität der Stratifizierung nach Krankheitsschwere oder Alter einschränkt. Künftige größere Studien werden daher aufschlussreich dabei sein, altersspezifische Reaktionsmuster zu charakterisieren und die Unterschiede leichter und schwerer COVID-19 Verläufe zu beschreiben .

Des Weiteren wäre eine oder mehrere einheitliche Non-COVID Vergleichsgruppe mit derselben, respiratorischen Virusinfektion, wie zum Beispiel RSV oder Influenza, wünschenswert gewesen. Auf Grund praktischer Umstände während der Pandemie waren diese Proben leider schwer zu sammeln. Außerdem sind keine asymptomatisch infizierten Patient:innen in der Non-COVID Gruppe vertreten. Zukünftige Studien, die sich auf die speziellen Unterschiede zwischen verschiedenen respiratorischen Virusinfektionen konzentrieren, könnten hier größeren Aufschluss über die spezifischen Mechanismen protektiver Immunität bei pädiatrischen Patient:innen geben.

Da die Patienten entweder selbst mit COVID-19-bezogenen Symptomen ins Krankenhaus kamen oder positiv getestet wurden, während sie wegen einer anderen Erkrankung behandelt wurden, kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass Selektionsverzerrungen die externe Validität unserer Ergebnisse beeinträchtigen. Die klinischen Gegebenheiten führen zu einer weiteren Heterogenität in Bezug auf den Zeitpunkt des Auftretens von Symptomen oder der ersten bestätigten PCR-Positivität. Das Verständnis der pädiatrischen Immunreaktion zu einem frühen Zeitpunkt im Verlauf der Infektion wird weitere nützliche Erkenntnisse über die Schutzmechanismen der Immunität von Kindern gegen SARS-CoV-2 liefern.

Klinische Labordaten der gesunden Kontrollen wurden nicht erhoben, weswegen zur Kontrolle die allgemein verbreiteten Referenzwerte genutzt wurden.

11 LITERATURVERZEICHNIS

- Albrecht, Marie; Arck, Petra Clara (2020): Vertically Transferred Immunity in Neonates: Mothers, Mechanisms and Mediators. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 555. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00555.
- Arunachalam, Prabhu S.; Wimmers, Florian; Mok, Chris Ka Pun; Perera, Ranawaka A. P. M.; Scott, Madeleine; Hagan, Thomas et al. (2020): Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. In: *Science (New York, N.Y.)* 369 (6508), S. 1210–1220. DOI: 10.1126/science.abc6261.
- Bandura, Dmitry R.; Baranov, Vladimir I.; Ornatsky, Olga I.; Antonov, Alexei; Kinach, Robert; Lou, Xudong et al. (2009): Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. In: *Analytical chemistry* 81 (16), S. 6813–6822. DOI: 10.1021/ac901049w.
- Bartsch, Yannic C.; Wang, Chuangqi; Zohar, Tomer; Fischinger, Stephanie; Atyeo, Caroline; Burke, John S. et al. (2021): Humoral signatures of protective and pathological SARS-CoV-2 infection in children. In: *Nature medicine* 27 (3), S. 454–462. DOI: 10.1038/s41591-021-01263-3.
- Bastard, Paul; Rosen, Lindsey B.; Zhang, Qian; Michailidis, Eleftherios; Hoffmann, Hans-Heinrich; Zhang, Yu et al. (2020): Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. In: *Science (New York, N.Y.)* 370 (6515). DOI: 10.1126/science.abd4585.
- Biasi, Sara de; Lo Tartaro, Domenico; Meschiari, Marianna; Gibellini, Lara; Bellinazzi, Caterina; Borella, Rebecca et al. (2020a): Expansion of plasmablasts and loss of memory B cells in peripheral blood from COVID-19 patients with pneumonia. In: *European journal of immunology* 50 (9), S. 1283–1294. DOI: 10.1002/eji.202048838.
- Biasi, Sara de; Meschiari, Marianna; Gibellini, Lara; Bellinazzi, Caterina; Borella, Rebecca; Fidanza, Lucia et al. (2020b): Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. In: *Nature communications* 11 (1), S. 3434. DOI: 10.1038/s41467-020-17292-4.
- Blanco-Melo, Daniel; Nilsson-Payant, Benjamin E.; Liu, Wen-Chun; Uhl, Skyler; Hoagland, Daisy; Møller, Rasmus et al. (2020): Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. In: *Cell* 181 (5), 1036–1045.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.026.
- Brodin, Petter (2022): SARS-CoV-2 infections in children: Understanding diverse outcomes. In: *Immunity* 55(2), S.201–209. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.01.014.
- Candia, Paola de; Prattichizzo, Francesco; Garavelli, Silvia; Matarese, Giuseppe (2020): T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. In: *Trends in Immunology*. DOI: 10.1016/j.it.2020.11.002.
- Carter, Michael J.; Fish, Matthew; Jennings, Aislinn; Doores, Katie J.; Wellman, Paul; Seow, Jeffrey et al. (2020): Peripheral immunophenotypes in children with multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection. In: *Nature medicine* 26 (11), S. 1701–1707. DOI: 10.1038/s41591-020-1054-6.
- Cevins, Camille de; Luka, Marine; Smith, Nikaia; Meynier, Sonia; Magéus, Aude; Carbone, Francesco et al. (2021): A monocyte/dendritic cell molecular signature of SARS-CoV-2-related multisystem inflammatory syndrome in children with severe myocarditis. In: *Med* 2 (9), 1072–1092.e7. DOI: 10.1016/j.medj.2021.08.002.

Chattopadhyay, Pratip K.; Roederer, Mario (2010): Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77 (7), S. 614–622. DOI: 10.1002/cyto.a.20905.

Chen, Diana Y.; Wolski, David; Aneja, Jasneet; Matsubara, Lyndon; Robilotti, Brandon; Hauck, Garrett et al. (2020a): Hepatitis C virus-specific CD4⁺ T cell phenotype and function in different infection outcomes. In: *The Journal of clinical investigation* 130 (2), S. 768–773. DOI: 10.1172/JCI126277.

Chen, Guang; Di Wu; Guo, Wei; Cao, Yong; Da Huang; Wang, Hongwu et al. (2020b): Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. In: *The Journal of clinical investigation* 130 (5), S. 2620–2629. DOI: 10.1172/JCI137244.

Cheng, Mary Hongying; Zhang, She; Porritt, Rebecca A.; Noval Rivas, Magali; Paschold, Lisa; Willscher, Edith et al. (2020): Superantigenic character of an insert unique to SARS-CoV-2 spike supported by skewed TCR repertoire in patients with hyperinflammation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (41), S. 25254–25262. DOI: 10.1073/pnas.2010722117.

Chou, Janet; Thomas, Paul G.; Randolph, Adrienne G. (2022): Immunology of SARS-CoV-2 infection in children. In: *Nature immunology* 23 (2), S. 177–185. DOI: 10.1038/s41590-021-01123-9.

Cohen, Carolyn A.; Li, Athena P. Y.; Hachim, Asmaa; Hui, David S. C.; Kwan, Mike Y. W.; Tsang, Owen T. Y. et al. (2021): SARS-CoV-2 specific T cell responses are lower in children and increase with age and time after infection. In: *Nature communications* 12 (1), S. 4678. DOI: 10.1038/s41467-021-24938-4.

Combes, Alexis J.; Courau, Tristan; Kuhn, Nicholas F.; Hu, Kenneth H.; Ray, Arja; Chen, William S. et al. (2021): Global absence and targeting of protective immune states in severe COVID-19. In: *Nature* 591 (7848), S. 124–130. DOI: 10.1038/s41586-021-03234-7.

Consiglio, Camila Rosat; Cotugno, Nicola; Sardh, Fabian; Pou, Christian; Amodio, Donato; Rodriguez, Lucie et al. (2020): The Immunology of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children with COVID-19. In: *Cell*. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.016.

COVID-19 Forecasting Team (2022): Variation in the COVID-19 infection–fatality ratio by age, time, and geography during the pre-vaccine era: a systematic analysis. In: *The Lancet* 399 (10334), S. 1469–1488. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02867-1.

Del Valle, Diane Marie; Kim-Schulze, Seunghye; Huang, Hsin-Hui; Beckmann, Noam D.; Nirenberg, Sharon; Wang, Bo et al. (2020): An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. In: *Nature medicine* 26 (10), S. 1636–1643. DOI: 10.1038/s41591-020-1051-9.

Dowell, Alexander C.; Butler, Megan S.; Jinks, Elizabeth; Tut, Gokhan; Lancaster, Tara; Sylla, Panagiota et al. (2021): Children develop strong and sustained cross-reactive immune responses against spike protein following SARS-CoV-2 infection.

Duarte-Salles, Talita; Vizcaya, David; Pistillo, Andrea; Casajust, Paula; Sena, Anthony G.; Lai, Lana Yin Hui et al. (2021): Thirty-Day Outcomes of Children and Adolescents With COVID-19: An International Experience. In: *Pediatrics* 148 (3). DOI: 10.1542/peds.2020-042929.

Ellebedy, A. H.; Krammer, F.; Li, G.-M.; Miller, M. S.; Chiu, C.; Wrammert, J. et al. (2014): Induction of broadly cross-reactive antibody responses to the influenza HA stem region following H5N1 vaccination in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (36), S. 13133–13138. DOI: 10.1073/pnas.1414070111.

- Fitzgerald-Bocarsly, Patricia; Dai, Jihong; Singh, Sukhwinder (2008): Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19 (1), S. 3–19. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2007.10.006.
- Frazier, W. Joshua; Hall, Mark W. (2008): Immunoparalysis and adverse outcomes from critical illness. In: *Pediatric clinics of North America* 55 (3), 647–68, xi. DOI: 10.1016/j.pcl.2008.02.009.
- Fumeaux, Thierry; Pugin, Jérôme (2002): Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 166 (11), S. 1475–1482. DOI: 10.1164/rccm.200203-217oc.
- Georgountzou, Anastasia; Papadopoulos, Nikolaos G. (2017): Postnatal Innate Immune Development: From Birth to Adulthood. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 957. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00957.
- Giamarellos-Bourboulis, Evangelos J.; Netea, Mihai G.; Rovina, Nikoletta; Akinosoglou, Karolina; Antoniadou, Anastasia; Antonakos, Nikolaos et al. (2020): Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. In: *Cell host & microbe* 27 (6), 992–1000.e3. DOI: 10.1016/j.chom.2020.04.009.
- Giuliani, Alessandro (2017): The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data. In: *Drug discovery today* 22 (7), S. 1069–1076. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.01.005.
- Gorny, Daniela; Harries, Manuela; Glöckner, Stephan; Strengert, Monika; Kerrinnes, Tobias; Heise, Jana-Kristin et al. (2021): SARS-CoV-2 Seroprevalence in Germany. In: *Deutsches Arzteblatt international* 118 (48), S. 824–831. DOI: 10.3238/arztebl.m2021.0364.
- Grifoni, Alba; Weiskopf, Daniela; Ramirez, Sydney I.; Mateus, Jose; Dan, Jennifer M.; Moderbacher, Carolyn Rydzynski et al. (2020): Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. In: *Cell* 181 (7), 1489–1501.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.015.
- Gruber, Conor N.; Patel, Roosheel S.; Trachtman, Rebecca; Lepow, Lauren; Amanat, Fatima; Krammer, Florian et al. (2020): Mapping Systemic Inflammation and Antibody Responses in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C). In: *Cell* 183 (4), 982–995.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.034.
- Hadjadj, Jérôme; Yatim, Nader; Barnabei, Laura; Corneau, Aurélien; Boussier, Jeremy; Smith, Nikaïa et al. (2020): Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. In: *Science (New York, N.Y.)* 369 (6504), S. 718–724. DOI: 10.1126/science.abc6027.
- Hall, Mark W.; Greathouse, Kristin C.; Thakkar, Rajan K.; Sribnick, Eric A.; Muszynski, Jennifer A. (2017): Immunoparalysis in Pediatric Critical Care. In: *Pediatric clinics of North America* 64 (5), S. 1089–1102. DOI: 10.1016/j.pcl.2017.06.008.
- Hall, Mark W.; Knatz, Nina L.; Vetterly, Carol; Tomarello, Steven; Wewers, Mark D.; Volk, Hans Dieter; Carcillo, Joseph A. (2011): Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. In: *Intensive care medicine* 37 (3), S. 525–532. DOI: 10.1007/s00134-010-2088-x.
- Heald-Sargent, Taylor; Muller, William J.; Zheng, Xiaotian; Rippe, Jason; Patel, Ami B.; Kocielek, Larry K. (2020): Age-Related Differences in Nasopharyngeal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Levels in Patients With Mild to Moderate Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). In: *JAMA pediatrics* 174 (9), S. 902–903. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.3651.
- Herzenberg, Leonard A.; Parks, David; Sahaf, Bitia; Perez, Omar; Roederer, Mario; Herzenberg, Leonore A. (2002): The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow

Cytometry: A View from Stanford. In: *Clinical Chemistry* 48 (10), S. 1819–1827. DOI: 10.1093/clinchem/48.10.1819.

Hippich, Markus; Holthaus, Lisa; Assfalg, Robin; Zapardiel Gonzalo, Jose M.; Kapfelsperger, Heidi; Heigermoser, Martin et al. (2020): Public health antibody screening indicates a six-fold higher SARS-CoV-2 exposure rate than reported cases in children. In: *Med*. DOI: 10.1016/j.medj.2020.10.003.

Hoffmann, Markus; Kleine-Weber, Hannah; Schroeder, Simon; Krüger, Nadine; Herrler, Tanja; Erichsen, Sandra et al. (2020): SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. In: *Cell* 181 (2), 271-280.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

Huang, Angkana T.; Garcia-Carreras, Bernardo; Hitchings, Matt D. T.; Yang, Bingyi; Katzelnick, Leah C.; Rattigan, Susan M. et al. (2020): A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. In: *Nature communications* 11 (1), S. 4704. DOI: 10.1038/s41467-020-18450-4.

Huang, Ian; Pranata, Raymond (2020): Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. In: *Journal of intensive care* 8, S. 36. DOI: 10.1186/s40560-020-00453-4.

Hulswit, R. J. G.; Haan, C. A. M. de; Bosch, B-J (2016): Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. In: *Advances in virus research* 96, S. 29–57. DOI: 10.1016/bs.aivir.2016.08.004.

Institut für medizinische und pharmazeutische Prüfungsfragen (2013): Laborparameter-Tabellen mit Referenzbereichen* für Erwachsene und Kinder. Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Herbst 2013. Hg. v. Amboss. Institut für medizinische und pharmazeutische Prüfungsfragen, Mainz. Mainz. Online verfügbar unter <https://www.amboss.com/de/referenzwertliste/H13.pdf>, zuletzt geprüft am 05.07.2022.

Iwane, Marika K.; Edwards, Kathryn M.; Szilagyi, Peter G.; Walker, Frances J.; Griffin, Marie R.; Weinberg, Geoffrey A. et al. (2004): Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. In: *Pediatrics* 113 (6), S. 1758–1764. DOI: 10.1542/peds.113.6.1758.

Jenmalm, Maria C. (2011): Childhood immune maturation and allergy development: regulation by maternal immunity and microbial exposure. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 66 Suppl 1, S. 75–80. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2011.01036.x.

Jia, Ran; Wang, Xiangshi; Liu, Pengcheng; Liang, Xiaozhen; Ge, Yanling; Tian, He et al. (2020): Mild Cytokine Elevation, Moderate CD4+ T Cell Response and Abundant Antibody Production in Children with COVID-19. In: *Virologica Sinica* 35 (6), S. 734–743. DOI: 10.1007/s12250-020-00265-8.

Jolliffe, Ian (2005): Principal Component Analysis. In: Brian S. Everitt und David C. Howell (Hg.): *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Jones, Terry C.; Biele, Guido; Mühlemann, Barbara; Veith, Talitha; Schneider, Julia; Beheim-Schwarzbach, Jörn et al. (2021): Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. In: *Science (New York, N.Y.)* 373 (6551). DOI: 10.1126/science.abi5273.

Kanegane, Hirokazu; Hoshino, Akihiro; Okano, Tsubasa; Yasumi, Takahiro; Wada, Taizo; Takada, Hidetoshi et al. (2018): Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. In: *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 67 (1), S. 43–54. DOI: 10.1016/j.alit.2017.06.003.

- Kapellos, Theodore S.; Bonaguro, Lorenzo; Gemünd, Ioanna; Reusch, Nico; Saglam, Adem; Hinkley, Emily R.; Schultze, Joachim L. (2019): Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 2035. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02035.
- Kluge, Stefan; Janssens, Uwe; Welte, Tobias; Weber-Carstens, Steffen; Schälte, Gereon (2022): S3-Leitlinie - Empfehlungen zur stationären Therapie von Patienten mit COVID-19. Hg. v. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. Berlin. Online verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/113-001LGI_S3_Empfehlungen-zur-stationaeren-Therapie-von-Patienten-mit-COVID-19_2022-03.pdf.
- Koch, Clarissa M.; Prigge, Andrew D.; Anekalla, Kishore R.; Shukla, Avani; Do Umehara, Hanh Chi; Setar, Leah et al. (2022): Age-related Differences in the Nasal Mucosal Immune Response to SARS-CoV-2. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 66 (2), S. 206–222. DOI: 10.1165/rcmb.2021-0292OC.
- Kollmann, Tobias R.; Levy, Ofer; Montgomery, Ruth R.; Goriely, Stanislas (2012): Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. In: *Immunity* 37 (5), S. 771–783. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.10.014.
- Kuiken, Thijs; Fouchier, Ron am; Schutten, Martin; Rimmelzwaan, Guus F.; van Amerongen, Geert; van Riel, Debby et al. (2003): Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. In: *The Lancet* 362 (9380), S. 263–270. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13967-0.
- Kuri-Cervantes, Leticia; Pampena, M. Betina; Meng, Wenzhao; Rosenfeld, Aaron M.; Ittner, Caroline A. G.; Weisman, Ariel R. et al. (2020): Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. In: *Science immunology* 5 (49). DOI: 10.1126/sciimmunol.abd7114.
- Lai, Chih-Cheng; Wang, Cheng-Yi; Wang, Ya-Hui; Hsueh, Shun-Chung; Ko, Wen-Chien; Hsueh, Po-Ren (2020): Global epidemiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19): disease incidence, daily cumulative index, mortality, and their association with country healthcare resources and economic status. In: *International journal of antimicrobial agents* 55 (4), S. 105946. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105946.
- Lamers, Mart M.; Beumer, Joep; van der Vaart, Jelte; Knoop, Kevin; Puschhof, Jens; Breugem, Tim I. et al. (2020): SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. In: *Science (New York, N.Y.)* 369 (6499), S. 50–54. DOI: 10.1126/science.abc1669.
- Lamers, Mart M.; Haagmans, Bart L. (2022): SARS-CoV-2 pathogenesis. In: *Nature reviews. Microbiology* 20 (5), S. 270–284. DOI: 10.1038/s41579-022-00713-0.
- Landay, A.; Ohlsson-Wilhelm, B.; Giorgi, J. V. (1990): Application of flow cytometry to the study of HIV infection. In: *AIDS (London, England)* 4 (6), S. 479–497. DOI: 10.1097/00002030-199006000-00001.
- Landelle, Caroline; Lepape, Alain; Voirin, Nicolas; Tognet, Eve; Venet, Fabienne; Bohé, Julien et al. (2010): Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. In: *Intensive care medicine* 36 (11), S. 1859–1866. DOI: 10.1007/s00134-010-1962-x.
- Letko, Michael; Marzi, Andrea; Munster, Vincent (2020): Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. In: *Nature microbiology* 5 (4), S. 562–569. DOI: 10.1038/s41564-020-0688-y.
- Li, Jie; Huang, Daniel Q.; Zou, Biyao; Yang, Hongli; Hui, Wan Zi; Rui, Fajuan et al. (2021): Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. In: *Journal of medical virology* 93 (3), S. 1449–1458. DOI: 10.1002/jmv.26424.

Li, Liuzhe; Liu, Yan; Gorny, Mirosław K. (2018): Association of Diverse Genotypes and Phenotypes of Immune Cells and Immunoglobulins With the Course of HIV-1 Infection. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 2735. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02735.

Li, Wenhui; Moore, Michael J.; Vasilieva, Natalya; Sui, Jianhua; Wong, Swee Kee; Berne, Michael A. et al. (2003): Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. In: *Nature* 426 (6965), S. 450–454. DOI: 10.1038/nature02145.

Liao, Mingfeng; Liu, Yang; Yuan, Jing; Wen, Yanling; Xu, Gang; Zhao, Juanjuan et al. (2020): Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. In: *Nature medicine* 26 (6), S. 842–844. DOI: 10.1038/s41591-020-0901-9.

Loder, F.; Mutschler, B.; Ray, R. J.; Paige, C. J.; Sideras, P.; Torres, R. et al. (1999): B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. In: *The Journal of experimental medicine* 190 (1), S. 75–89. DOI: 10.1084/jem.190.1.75.

Loske, J.; Röhm, J.; Lukassen, S.; Stricker, S.; Magalhães, V. G.; Liebig, J. et al. (2022): Pre-activated antiviral innate immunity in the upper airways controls early SARS-CoV-2 infection in children. In: *Nature biotechnology* 40 (3), S. 319–324. DOI: 10.1038/s41587-021-01037-9.

Lucas, Carolina; Wong, Patrick; Klein, Jon; Castro, Tiago B. R.; Silva, Julio; Sundaram, Maria et al. (2020): Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. In: *Nature* 584 (7821), S. 463–469. DOI: 10.1038/s41586-020-2588-y.

Manohar, Sonal M.; Shah, Prachi; Nair, Anusree (2021): Flow cytometry: principles, applications and recent advances. In: *Bioanalysis* 13 (3), S. 181–198. DOI: 10.4155/bio-2020-0267.

Manzoli, Talita Freitas; Troster, Eduardo Juan; Ferranti, Juliana Ferreira; Sales, Maria Mirtes (2016): Prolonged suppression of monocytic human leukocyte antigen-DR expression correlates with mortality in pediatric septic patients in a pediatric tertiary Intensive Care Unit. In: *Journal of critical care* 33, S. 84–89. DOI: 10.1016/j.jcrc.2016.01.027.

Mathew, Divij; Giles, Josephine R.; Baxter, Amy E.; Oldridge, Derek A.; Greenplate, Allison R.; Wu, Jennifer E. et al. (2020): Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. In: *Science (New York, N.Y.)* 369 (6508). DOI: 10.1126/science.abc8511.

McKinnon, Katherine M. (2018): Flow Cytometry: An Overview. In: *Current protocols in immunology* 120, 5.1.1-5.1.11. DOI: 10.1002/cpim.40.

Mehta, Puja; McAuley, Daniel F.; Brown, Michael; Sanchez, Emilie; Tattersall, Rachel S.; Manson, Jessica J. (2020): COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. In: *The Lancet* 395 (10229), S. 1033–1034. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.

Merad, Miriam; Martin, Jerome C. (2020): Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. In: *Nature reviews. Immunology* 20 (6), S. 355–362. DOI: 10.1038/s41577-020-0331-4.

Monneret, Guillaume; Lepape, Alain; Voirin, Nicolas; Bohé, Julien; Venet, Fabienne; Debar, Anne-Lise et al. (2006): Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. In: *Intensive care medicine* 32 (8), S. 1175–1183. DOI: 10.1007/s00134-006-0204-8.

Moore, John B.; June, Carl H. (2020): Cytokine release syndrome in severe COVID-19. In: *Science (New York, N.Y.)* 368 (6490), S. 473–474. DOI: 10.1126/science.abb8925.

Morbach, H.; Eichhorn, E. M.; Liese, J. G.; Girschick, H. J. (2010): Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. In: *Clinical and experimental immunology* 162 (2), S. 271–279. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04206.x.

Moreews, Marion; Le Gouge, Kenz; Khaldi-Plassart, Samira; Pescarmona, Rémi; Mathieu, Anne-Laure; Malcus, Christophe et al. (2021): Polyclonal expansion of TCR Vbeta 21.3+ CD4+ and CD8+ T cells is a hallmark of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. In: *Science immunology* 6 (59). DOI: 10.1126/sciimmunol.abh1516.

Muus, Christoph; Luecken, Malte D.; Eraslan, Gökçen; Sikkema, Lisa; Waghray, Avinash; Heimberg, Graham et al. (2021): Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. In: *Nature medicine* 27 (3), S. 546–559. DOI: 10.1038/s41591-020-01227-z.

Nguyen, Muriel; Leuridan, Elke; Zhang, Tong; Wit, Dominique de; Willems, Fabienne; van Damme, Pierre et al. (2010): Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life. In: *PloS one* 5 (4), e10407. DOI: 10.1371/journal.pone.0010407.

Nye, Steven; Whitley, Richard J.; Kong, Michele (2016): Viral Infection in the Development and Progression of Pediatric Acute Respiratory Distress Syndrome. In: *Frontiers in pediatrics* 4, S. 128. DOI: 10.3389/fped.2016.00128.

O'Driscoll, Megan; Ribeiro Dos Santos, Gabriel; Wang, Lin; Cummings, Derek A. T.; Azman, Andrew S.; Paireau, Juliette et al. (2021): Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. In: *Nature* 590 (7844), S. 140–145. DOI: 10.1038/s41586-020-2918-0.

Ogando, Natacha S.; Dalebout, Tim J.; Zevenhoven-Dobbe, Jessika C.; Limpens, Ronald W. A. L.; van der Meer, Yvonne; Caly, Leon et al. (2020): SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. In: *The Journal of general virology* 101 (9), S. 925–940. DOI: 10.1099/jgv.0.001453.

Ohno, Yosuke; Kitamura, Hidemitsu; Takahashi, Norihiko; Ohtake, Junya; Kaneumi, Shun; Sumida, Kentaro et al. (2016): IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 65 (2), S. 193–204. DOI: 10.1007/s00262-015-1791-4.

Olin, Axel; Henckel, Ewa; Chen, Yang; Lakshmikanth, Tadepally; Pou, Christian; Mikes, Jaromir et al. (2018): Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. In: *Cell* 174 (5), 1277–1292.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2018.06.045.

Openshaw, Peter J. M.; Chiu, Chris; Culley, Fiona J.; Johansson, Cecilia (2017): Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. In: *Annual review of immunology* 35, S. 501–532. DOI: 10.1146/annurev-immunol-051116-052206.

Openshaw, Peter J. M.; Yamaguchi, Yuko; Tregoning, John S. (2004): Childhood infections, the developing immune system, and the origins of asthma. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 114 (6), S. 1275–1277. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.08.024.

Ouwehand, Arthur; Isolauri, Erika; Salminen, Seppo (2002): The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. In: *European journal of nutrition* 41 Suppl 1, 132–7. DOI: 10.1007/s00394-002-1105-4.

Palojärvi, Anniina; Petäjä, Jari; Siitonen, Sanna; Janér, Cecilia; Andersson, Sture (2013): Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants. In: *Pediatric research* 73 (4 Pt 1), S. 469–475. DOI: 10.1038/pr.2012.199.

Pastor-Barriuso, Roberto; Pérez-Gómez, Beatriz; Hernán, Miguel A.; Pérez-Olmeda, Mayte; Yotti, Raquel; Oteo-Iglesias, Jesús et al. (2020): Infection fatality risk for SARS-CoV-2: a nationwide seroepidemiological study in the non-institutionalized population of Spain.

Pierce, Carl A.; Preston-Hurlburt, Paula; Dai, Yile; Aschner, Clare Burn; Cheshenko, Natalia; Galen, Benjamin et al. (2020): Immune responses to SARS-CoV-2 infection in hospitalized pediatric and adult patients. In: *Science translational medicine* 12 (564). DOI: 10.1126/scitranslmed.abd5487.

Pierce, Carl A.; Sy, Sharlene; Galen, Benjamin; Goldstein, Doctor Y.; Orner, Erika; Keller, Marla J. et al. (2021): Natural mucosal barriers and COVID-19 in children. In: *JCI insight* 6 (9). DOI: 10.1172/jci.insight.148694.

Porritt, Rebecca A.; Paschold, Lisa; Rivas, Magali Noval; Cheng, Mary Hongying; Yonker, Lael M.; Chandnani, Harsha et al. (2021): HLA class I-associated expansion of TRBV11-2 T cells in multisystem inflammatory syndrome in children. In: *The Journal of clinical investigation* 131 (10). DOI: 10.1172/JCI146614.

Qiu, Haiyan; Wu, Junhua; Hong, Liang; Luo, Yunling; Song, Qifa; Chen, Dong (2020): Clinical and epidemiological features of 36 children with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Zhejiang, China: an observational cohort study. In: *The Lancet Infectious Diseases* 20 (6), S. 689–696. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30198-5.

Ringnér, Markus (2008): What is principal component analysis? In: *Nature biotechnology* 26 (3), S. 303–304. DOI: 10.1038/nbt0308-303.

Riphagen, Shelley; Gomez, Xabier; Gonzalez-Martinez, Carmen; Wilkinson, Nick; Theocharis, Paraskevi (2020): Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. In: *The Lancet* 395 (10237), S. 1607–1608. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31094-1.

Ronan, Victoria; Yeasin, Rummanu; Claud, Erika C. (2021): Childhood Development and the Microbiome-The Intestinal Microbiota in Maintenance of Health and Development of Disease During Childhood Development. In: *Gastroenterology* 160 (2), S. 495–506. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.08.065.

Ruibal, Paula; Oestereich, Lisa; Lüdtke, Anja; Becker-Ziaja, Beate; Wozniak, David M.; Kerber, Romy et al. (2016): Unique human immune signature of Ebola virus disease in Guinea. In: *Nature* 533 (7601), S. 100–104. DOI: 10.1038/nature17949.

Sacco, Keith; Castagnoli, Riccardo; Vakkilainen, Svetlana; Liu, Can; Delmonte, Ottavia M.; Oguz, Cihan et al. (2022): Immunopathological signatures in multisystem inflammatory syndrome in children and pediatric COVID-19. In: *Nature medicine* 28 (5), S. 1050–1062. DOI: 10.1038/s41591-022-01724-3.

Saule, Pasquine; Trauet, Jacques; Dutriez, Virginie; Lekeux, Véronique; Dessaint, Jean-Paul; Labalette, Myriam (2006): Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. In: *Mechanisms of ageing and development* 127 (3), S. 274–281. DOI: 10.1016/j.mad.2005.11.001.

Schuler, Bryce A.; Habermann, A. Christian; Plosa, Erin J.; Taylor, Chase J.; Jetter, Christopher; Negretti, Nicholas M. et al. (2021): Age-determined expression of priming protease TMPRSS2 and localization of SARS-CoV-2 in lung epithelium. In: *The Journal of clinical investigation* 131 (1). DOI: 10.1172/JCI140766.

Schulte-Schrepping, Jonas; Reusch, Nico; Paclik, Daniela; Baßler, Kevin; Schlickeiser, Stephan; Zhang, Bowen et al. (2020): Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. In: *Cell* 182 (6), 1419-1440.e23. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.001.

Shekerdemian, Lara S.; Mahmood, Nabihah R.; Wolfe, Katie K.; Riggs, Becky J.; Ross, Catherine E.; McKiernan, Christine A. et al. (2020): Characteristics and Outcomes of Children With Coronavirus

Disease 2019 (COVID-19) Infection Admitted to US and Canadian Pediatric Intensive Care Units. In: *JAMA pediatrics* 174 (9), S. 868–873. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.1948.

Simon, A. Katharina; Hollander, Georg A.; McMichael, Andrew (2015): Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. In: *Proceedings. Biological sciences* 282 (1821), S. 20143085. DOI: 10.1098/rspb.2014.3085.

Sims, Gary P.; Ettinger, Rachel; Shirota, Yuko; Yarboro, Cheryl H.; Illei, Gabor G.; Lipsky, Peter E. (2005): Identification and characterization of circulating human transitional B cells. In: *Blood* 105 (11), S. 4390–4398. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4284.

Su, Yapeng; Chen, Daniel; Yuan, Dan; Lausted, Christopher; Choi, Jongchan; Dai, Chengzhen L. et al. (2020): Multi-Omics Resolves a Sharp Disease-State Shift between Mild and Moderate COVID-19. In: *Cell*. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.037.

Tanner, Scott D.; Baranov, Vladimir I.; Ornatsky, Olga I.; Bandura, Dmitry R.; George, Thaddeus C. (2013): An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 62 (5), S. 955–965. DOI: 10.1007/s00262-013-1416-8.

Tullie, Lucinda; Ford, Kathryn; Bisharat, May; Watson, Tom; Thakkar, Hemanshoo; Mullassery, Dhanya et al. (2020): Gastrointestinal features in children with COVID-19: an observation of varied presentation in eight children. In: *The Lancet Child & Adolescent Health* 4 (7), e19–e20. DOI: 10.1016/S2352-4642(20)30165-6.

Vabret, Nicolas; Britton, Graham J.; Gruber, Conor; Hegde, Samarth; Kim, Joel; Kuksin, Maria et al. (2020): Immunology of COVID-19: Current State of the Science. In: *Immunity* 52 (6), S. 910–941. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.05.002.

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.

Vella, Laura; Giles, Josephine R.; Baxter, Amy E.; Oldridge, Derek A.; Diorio, Caroline; Alanio, Cecile et al. (2020): Deep Immune Profiling of MIS-C demonstrates marked but transient immune activation compared to adult and pediatric COVID-19. In: *medRxiv : the preprint server for health sciences*. DOI: 10.1101/2020.09.25.20201863.

Verdoni, Lucio; Mazza, Angelo; Gervasoni, Annalisa; Martelli, Laura; Ruggeri, Maurizio; Ciuffreda, Matteo et al. (2020): An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. In: *The Lancet* 395 (10239), S. 1771–1778. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31103-X.

Verity, Robert; Okell, Lucy C.; Dorigatti, Ilaria; Winskill, Peter; Whittaker, Charles; Imai, Natsuko et al. (2020): Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. In: *The Lancet Infectious Diseases* 20 (6), S. 669–677. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30243-7.

Viner, Russell M.; Mytton, Oliver T.; Bonell, Chris; Melendez-Torres, G. J.; Ward, Joseph; Hudson, Lee et al. (2021): Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adolescents Compared With Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *JAMA pediatrics* 175 (2), S. 143–156. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.4573.

V'kovski, Philip; Kratzel, Annika; Steiner, Silvio; Stalder, Hanspeter; Thiel, Volker (2021): Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. In: *Nature reviews. Microbiology* 19 (3), S. 155–170. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.

Wang, Xin; Li, You; O'Brien, Katherine L.; Madhi, Shabir A.; Widdowson, Marc-Alain; Byass, Peter et al. (2020): Global burden of respiratory infections associated with seasonal influenza in children

under 5 years in 2018: a systematic review and modelling study. In: *The Lancet Global Health* 8 (4), e497-e510. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30545-5.

Wedderburn, L. R.; Patel, A.; Varsani, H.; Woo, P. (2001): The developing human immune system: T-cell receptor repertoire of children and young adults shows a wide discrepancy in the frequency of persistent oligoclonal T-cell expansions. In: *Immunology* 102 (3), S. 301–309. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2001.01194.x.

Whittaker, Elizabeth; Bamford, Alasdair; Kenny, Julia; Kaforou, Myrsini; Jones, Christine E.; Shah, Priyen et al. (2020): Clinical Characteristics of 58 Children With a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CoV-2. In: *JAMA* 324 (3), S. 259–269. DOI: 10.1001/jama.2020.10369.

WHO (05.01.2020): COVID-19 - China. Pneumonia of unknown cause - China. Geneva, Switzerland. Online verfügbar unter <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2020-DON229>, zuletzt geprüft am 14.06.2022.

WHO (Hg.) (2020): Novel Coronavirus COVID-19 - Therapeutic Trial Synopsis. WHO R&D Blueprint. WHO. Geneva, Switzerland. Online verfügbar unter https://cdn.who.int/media/docs/default-source/blue-print/covid-19-therapeutic-trial-synopsis.pdf?sfvrsn=44b83344_1&download=true.

WHO (11.03.2020): WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Geneva, Switzerland. Online verfügbar unter <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>, zuletzt geprüft am 15.06.2022.

WHO (09.01.2022): WHO Statement regarding cluster of pneumonia cases in Wuhan, China. Geneva, Switzerland. Online verfügbar unter <https://www.who.int/china/news/detail/09-01-2020-who-statement-regarding-cluster-of-pneumonia-cases-in-wuhan-china>, zuletzt geprüft am 15.06.2022.

WHO (15.06.2022): WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Online verfügbar unter <https://covid19.who.int/>, zuletzt geprüft am 15.06.2022 Uhr.

Wichmann, Dominic; Sperhake, Jan-Peter; Lütgehetmann, Marc; Steurer, Stefan; Edler, Carolin; Heinemann, Axel et al. (2020): Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19: A Prospective Cohort Study. In: *Annals of internal medicine* 173 (4), S. 268–277. DOI: 10.7326/M20-2003.

Wiedemann, Aurélie; Foucat, Emile; Hocini, Hakim; Lefebvre, Cécile; Hejblum, Boris P.; Durand, Mélanie et al. (2020): Long-lasting severe immune dysfunction in Ebola virus disease survivors. In: *Nature communications* 11 (1), S. 3730. DOI: 10.1038/s41467-020-17489-7.

Wijeratne, Tissa; Crewther, Sheila (2020): Post-COVID 19 Neurological Syndrome (PCNS); a novel syndrome with challenges for the global neurology community. In: *Journal of the neurological sciences* 419, S. 117179. DOI: 10.1016/j.jns.2020.117179.

Wilk, Aaron J.; Rustagi, Arjun; Zhao, Nancy Q.; Roque, Jonasel; Martínez-Colón, Giovanni J.; McKechnie, Julia L. et al. (2020): A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. In: *Nature medicine* 26 (7), S. 1070–1076. DOI: 10.1038/s41591-020-0944-y.

Wong, Kok Loon; Yeap, Wei Hseun; Tai, June Jing Yi; Ong, Siew Min; Dang, Truong Minh; Wong, Siew Cheng (2012): The three human monocyte subsets: implications for health and disease. In: *Immunologic research* 53 (1-3), S. 41–57. DOI: 10.1007/s12026-012-8297-3.

Xu, Zhe; Shi, Lei; Wang, Yijin; Zhang, Jiyuan; Huang, Lei; Zhang, Chao et al. (2020): Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. In: *The Lancet Respiratory Medicine* 8 (4), S. 420–422. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.

Yonker, Lael M.; Gilboa, Tal; Ogata, Alana F.; Senussi, Yasmeen; Lazarovits, Roey; Boribong, Brittany P. et al. (2021): Multisystem inflammatory syndrome in children is driven by zonulin-dependent loss of gut mucosal barrier. In: *The Journal of clinical investigation* 131 (14). DOI: 10.1172/JCI149633.

Yuki, Koichi; Fujiogi, Miho; Koutsogiannaki, Sophia (2020): COVID-19 pathophysiology: A review. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 215, S. 108427. DOI: 10.1016/j.clim.2020.108427.

Zachariah, Philip; Johnson, Candace L.; Halabi, Katia C.; Ahn, Danielle; Sen, Anita I.; Fischer, Avital et al. (2020): Epidemiology, Clinical Features, and Disease Severity in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Children's Hospital in New York City, New York. In: *JAMA pediatrics* 174 (10), e202430. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.2430.

Zaki, Ali M.; van Boheemen, Sander; Bestebroer, Theo M.; Osterhaus, Albert D. M. E.; Fouchier, Ron A. M. (2012): Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. In: *The New England journal of medicine* 367 (19), S. 1814–1820. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.

Zhang, Qian; Bastard, Paul; Cobat, Aurélie; Casanova, Jean-Laurent (2022): Human genetic and immunological determinants of critical COVID-19 pneumonia. In: *Nature* 603 (7902), S. 587–598. DOI: 10.1038/s41586-022-04447-0.

Zhang, Qian; Bastard, Paul; Liu, Zhiyong; Le Pen, Jérémie; Moncada-Velez, Marcela; Chen, Jie et al. (2020): Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. In: *Science (New York, N.Y.)* 370 (6515). DOI: 10.1126/science.abd4570.

Zheng, Meijuan; Gao, Yong; Wang, Gang; Song, Guobin; Liu, Siyu; Sun, Dandan et al. (2020): Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. In: *Cellular & molecular immunology* 17 (5), S. 533–535. DOI: 10.1038/s41423-020-0402-2.

Zhou, Fei; Yu, Ting; Du, Ronghui; Fan, Guohui; Liu, Ying; Liu, Zhibo et al. (2020a): Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. In: *The Lancet* 395 (10229), S. 1054–1062. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.

Zhou, Peng; Yang, Xing-Lou; Wang, Xian-Guang; Hu, Ben; Zhang, Lei; Zhang, Wei et al. (2020b): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. In: *Nature* 579 (7798), S. 270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Zhou, Yonggang; Fu, Binqing; Zheng, Xiaohu; Wang, Dongsheng; Zhao, Changcheng; Qi, Yingjie et al. (2020c): Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. In: *National Science Review* 7 (6), S. 998–1002. DOI: 10.1093/nsr/nwaa041.

Zhu, Na; Zhang, Dingyu; Wang, Wenling; Li, Xingwang; Yang, Bo; Song, Jingdong et al. (2020): A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. In: *The New England journal of medicine* 382 (8), S. 727–733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.

Zimmermann, Petra; Curtis, Nigel (2020): Why is COVID-19 less severe in children? A review of the proposed mechanisms underlying the age-related difference in severity of SARS-CoV-2 infections. In: *Archives of disease in childhood*. DOI: 10.1136/archdischild-2020-320338.

12 ZUSAMMENFASSUNG

Schwere COVID-19-Erkrankungen sind durch übermäßige Entzündungen und immunvermittelte Organschäden gekennzeichnet. Während Kinder im Allgemeinen von schweren Krankheitsverläufen verschont bleiben, sind die immunologischen Determinanten des Schutzes nach wie vor unklar.

Um Signaturen der schützenden und pathologischen Immunität gegen SARS-CoV-2 bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen zu identifizieren, wurden Patient:innen mit COVID-19, die sich in zwei Kinderkliniken der Tertiärversorgung vorstellten, sowie altersgleiche gesunde Personen und Patienten mit Nicht-COVID-Infektionen rekrutiert. Es wurden klinische, epidemiologische und Labordaten erhoben. Anhand von Vollblutproben wurde eine durchflusszytometrische Immunphänotypisierung durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass das Alter eine wichtige Determinante für die Variation der Immunantwort bei pädiatrischen COVID-19 ist. Während die phänotypischen Veränderungen bei Kindern und Jugendlichen im Allgemeinen milder ausfielen als bei Erwachsenen, deuten die dynamischen Veränderungen der Antigenpräsentationskapazitäten in dieser Altersgruppe auf einen möglichen Mechanismus zur effizienten Eindämmung sowohl der SARS-CoV-2-Infektion als auch der übermäßigen systemischen Entzündung hin.

Das Verständnis der altersspezifischen Reaktionsphänotypen von Patient:innen nach einer SARS-CoV-2-Infektion kann dazu beitragen, die Pathologie von COVID-19 in verschiedenen Patientenpopulationen besser zu verstehen, und damit die klinische Entscheidungsfindung zu unterstützen und künftige therapeutische Strategien zu finden.

13 ABSTRACT

Severe COVID-19 is characterized by excessive inflammation and immune-mediated organ damage. While children are generally spared severe courses of disease, the immunological determinants of protection remain unclear.

To identify signatures of protective and pathological immunity to SARS-CoV-2 in children, adolescents, and young adults, we recruited patients with COVID-19, as well as age-matched healthy individuals and patients with non-COVID-19 infections who presented to one of two tertiary care pediatric hospitals. Clinical, epidemiological and laboratory data were collected. Flow cytometric immunophenotyping was performed on whole blood samples.

The results of this study suggest that age is an important determinant of immune response variation in pediatric COVID-19. While the phenotypic changes in children and adolescents were generally milder than in adults, dynamic changes in antigen presentation capacities in this age group suggest a potential mechanism for efficient containment of both SARS-CoV-2 infection and excessive systemic inflammation.

Understanding the age-specific response phenotypes of patients after SARS-CoV-2 infection may help to better understand the pathology of COVID-19 in different patient populations, thus supporting clinical decision making and finding future therapeutic strategies.

14 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Hilfe diese Promotionsschrift nicht zu Stande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Johannes Hübner, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Unterstützung und dem mir entgegengebrachten Vertrauen.

Außerdem gilt mein außerordentlicher Dank Frau Dr. med. Sarah Kim-Hellmuth, meiner Betreuerin, Initiatorin der Päd-COVID-19-Studie und Zweitbegutachterin, für die zahlreichen Gespräche, kritischen Anmerkungen und hilfreichen Anstöße und für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Die Zeit unserer Zusammenarbeit war für mich sehr lehrreich und ich bin dankbar für die hierdurch möglichen gewordene Entwicklung.

Weiter möchte ich Herr Dr. Daniel Petersheim danken. Die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene werden mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben. Ich habe unsere Dialoge stets als Ermutigung und Motivation empfunden und bin dankbar für den Humor, der manche langen Tage kürzer gemacht hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Sepideh Sharakami, Rafaele Conca, Sathya Darmalinggam, Alina Czwienzek und Carola Kaltenhauser, meinen Kollegen bei der Päd-COVID-19 Studie, für die mannigfaltige Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Studie, den interessanten Austausch und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern, Bettina und Joachim Wendel, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und auf deren Unterstützung und Vertrauen ich immer zählen konnte, weshalb ich ihnen diese Arbeit widmen möchte.



Eidesstattliche Versicherung

Wendel, Benedict Jonathan

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Immunphänotypisierung von COVID-19 bei Kindern und jungen Erwachsenen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.10.2025

Ort, Datum

Benedict Jonathan Wendel

Unterschrift Benedict Jonathan Wendel



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Wendel, Benedict Jonathan

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Immunphänotypisierung von COVID-19 bei Kindern und jungen Erwachsenen

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 18.10.2025

Ort, Datum

Benedict Jonathan Wendel

Unterschrift Benedict Jonathan Wendel