

Veränderungen des zellulären Immunsystems in der Akutphase einer Infektion mit SARS-CoV-2 (COVID-19)

Phillip Löhr

Angaben zur Veröffentlichung / Publication details:

Löhr, Phillip. 2025. "Veränderungen des zellulären Immunsystems in der Akutphase einer Infektion mit SARS-CoV-2 (COVID-19)." Augsburg: Universität Augsburg.

Nutzungsbedingungen / Terms of use:

licgercopyright

Dieses Dokument wird unter folgenden Bedingungen zur Verfügung gestellt: / This document is made available under these conditions:

Deutsches Urheberrecht

Weitere Informationen finden Sie unter: / For more information see:

<https://www.uni-augsburg.de/de/organisation/bibliothek/publizieren-zitieren-archivieren/publiz/>



Aus der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums
Augsburg

Veränderungen des zellulären Immunsystems in der Akutphase einer Infektion mit SARS-CoV-2 (COVID-19)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

eingereicht an der

Medizinischen Fakultät der Universität Augsburg

vorgelegt von

Phillip Löhr

12.11.2024



Eidesstattliche Versicherung und Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Zudem wurden keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet. Außerdem versichere ich, dass die Dissertation keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde und ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

Statutory declaration and statement

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources/resources. As well I declare that I have not submitted a dissertation without success and not passed the oral exam. The present dissertation (neither the entire dissertation nor parts) has not been presented to another examination board.

Dissertation eingereicht am: 12.11.2024

Erstgutachter (Hauptbetreuer): Prof. Dr. med. Martin Trepel
Zweitgutachter: PD Dr. Stefanie Gilles

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2025

*Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Augsburg*

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Trepel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Rank

Dekanin: Prof. Dr. Martina Kadmon

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Definition und Epidemiologie	7
1.1.1	Ausbruchsgeschehen	7
1.2	Ursprung des SARS-CoV-2 Virus	9
1.2.1	Theorie eines „Laborunfalls“	9
1.2.2	Theorie eines zoonotischen Ursprungs	10
1.2.3	Initiale Verbreitung und pandemischer Verlauf	10
1.2.4	Inzidenz und Prävalenz von COVID-19	12
1.3	Erreger-Klassifikation von SARS-CoV-2	13
1.4	Pathogenese	14
1.5	Diagnostik	16
1.6	Klinik	17
1.7	Die Rolle des Immunsystems	20
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Einschlusskriterien zur Studienteilnahme	22
2.1.1	Akute COVID-19 Patienten	22
2.1.2	COVID-19 Rekonvaleszenten	22
2.1.3	Einschluss der gesunden Kontrollgruppe	24
2.1.4	Einhaltung von ethischen Standards	24
2.1.5	Ethikvotum	25
2.1.6	Einverständnis zum Studieneinschluss	25
2.1.7	Verwendetes Probenmaterial	25
2.2	Untersuchungsmethoden	26
2.2.1	Serum-Antikörpertest (Anti-SARS-CoV-2-ELISA)	26
2.2.2	Durchflusszytometrie	27
2.2.3	Spillover und Kompensation	32
2.2.4	Versuchsprotokoll	32
2.2.5	Lymphozyten-Subpopulationen	33

2.2.6	Gating-Strategie.....	34
2.2.7	Statistische Auswertung	39
3	 ERGEBNISSE	40
3.1	Charakterisierung von Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung	40
3.2	Univariate Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen von Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung	42
3.3	Multivariate Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen von Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung	48
3.4	Charakterisierung von COVID-19 Rekonvaleszenten	55
3.5	Subgruppen-Analyse von COVID-19 Rekonvaleszenten und der gesunden Kontrollgruppe	57
3.7	Subgruppen-Analyse von COVID-19 Rekonvaleszenten mit Fieber und COVID-19 Rekonvaleszenten ohne Fieber in der akuten Krankheitsphase	61
3.8	Geschlechter-spezifische Subgruppen-Analyse von COVID-19 Rekonvaleszenten	65
4	 DISKUSSION	68
4.1	Zellulärer Immunstatus bei Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung.....	68
4.1.1	Einfluss einer COVID-19 – Erkrankung auf die Lymphozyten-Zellzahlen bei Patienten mit mildem oder schwerem Verlauf.....	69
4.1.2	Geschlechterspezifischer Einfluss	72
4.1.3	Einfluss des Alters	73
4.2	Zellulärer Immunstatus bei COVID-19 Rekonvaleszenten.....	75
4.3	Limitationen	78
4.4	Schlussfolgerung und Perspektiven.....	80
5	 ZUSAMMENFASSUNG	82
5.1	Zusammenfassung der Studien zum zellulären Immunstatus bei akuten COVID-19 Patienten und COVID-19 Rekonvaleszenten.....	82

5.2	Summary of studies on cellular immune status in acute COVID-19 patients and COVID-19 convalescents	84
6	LITERATURVERZEICHNIS	85
7	APPENDIX	95
I	Abkürzungsverzeichnis	95
II	Abbildungsverzeichnis	97
III	Tabellenverzeichnis	100
IV	Danksagung	102
VI	Eigene Veröffentlichungen	103

1 Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie

1.1.1 Ausbruchsgeschehen

Am 31. Dezember 2019 wurde der weltweite Ausbruch der Atemwegserkrankung „COVID-19“, welche durch das neuartige Coronavirus „Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2“ (SARS-CoV-2) ausgelöst wird, von der World Health Organization (WHO) offiziell bestätigt¹. Der Krankheitserreger konnte erstmalig in der Stadt Wuhan auf dem Huanan-Fischmarkt in der Provinz Hubei in China identifiziert werden. Hier wurden bei insgesamt 15 Patienten virusspezifische Nukleinsäuresequenzen aus dem Blut, von Rachenabstrichen und aus der Lungenflüssigkeit nachgewiesen und isoliert. Unter dem Elektronenmikroskop zeigte das neuartige Virus das typische Erscheinungsbild von Coronaviren². Innerhalb von 9 Tagen nach Beginn des Ausbruchs konnte durch die Zusammenarbeit von Ärzten, Epidemiologen und Wissenschaftlern ein Vorliegen von hochkontagiösen Erregern wie zum Beispiel des Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1 (SARS-CoV-1) oder des Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus (MERS-CoV) ausgeschlossen werden, sodass SARS-CoV-2 als Erreger des lokalen Ausbruchsgeschehens verantwortlich gemacht wurde².

Von hier aus breitete sich das neuartige Coronavirus rasant auf der ganzen Welt aus. Am 30. Januar 2020 erklärte die WHO die Verbreitung von SARS-CoV-2 in China zu einem Notfall der internationalen Gesundheit. Dieser stelle insbesondere für Länder mit anfälligen Gesundheitssystemen ein hohes Risiko dar³.

Am 03. März 2020 zählte die WHO weltweit 90.869 bestätigte SARS-CoV-2 Infektionen; hiervon entfielen 80.304 Infektionen allein auf China. 67.217 Infektionen wurden hiervon in der Provinz Hubei gemeldet; daraus wurden bereits 2.834 Todesfälle im Zusammenhang mit COVID-19 erfasst⁴. Die übrigen globalen 10.565 Infektionen wurden zu diesem Zeitpunkt von 72 verschiedenen Ländern übermittelt⁴.

Am 11. März 2020 wurde daher die globale Ausbreitung von COVID-19 von der WHO zur Pandemie erklärt⁵. Zu diesem Zeitpunkt konnten weltweit 118.319 bestätigte Infektionen gezählt werden; wobei täglich etwa 4.500 Neuinfektionen gemeldet wurden. Ferner wurden bereits 4.292

Todesfälle im Zusammenhang mit COVID-19 festgestellt. Bestätigte SARS-CoV-2 Infektionen wurden aus 113 verschiedenen Ländern gemeldet⁵.

Bis zum 2. April 2020 wurden der WHO weltweit über 890.000 bestätigte Infektionen und über 45.000 mit SARS-CoV-2 assoziierte Todesfälle übermittelt⁶. Die initiale Verbreitung fand bis Mitte Februar hauptsächlich im Raum westlich des Pazifiks statt. Anschließend wurden vermehrt Neuinfektionen im östlichen Mittelmeerraum, sowie in Europa verzeichnet, bevor das Ausbruchsgeschehen auch ab Anfang März in Nord- und Südamerika beobachtet werden konnte (Abbildung 1).

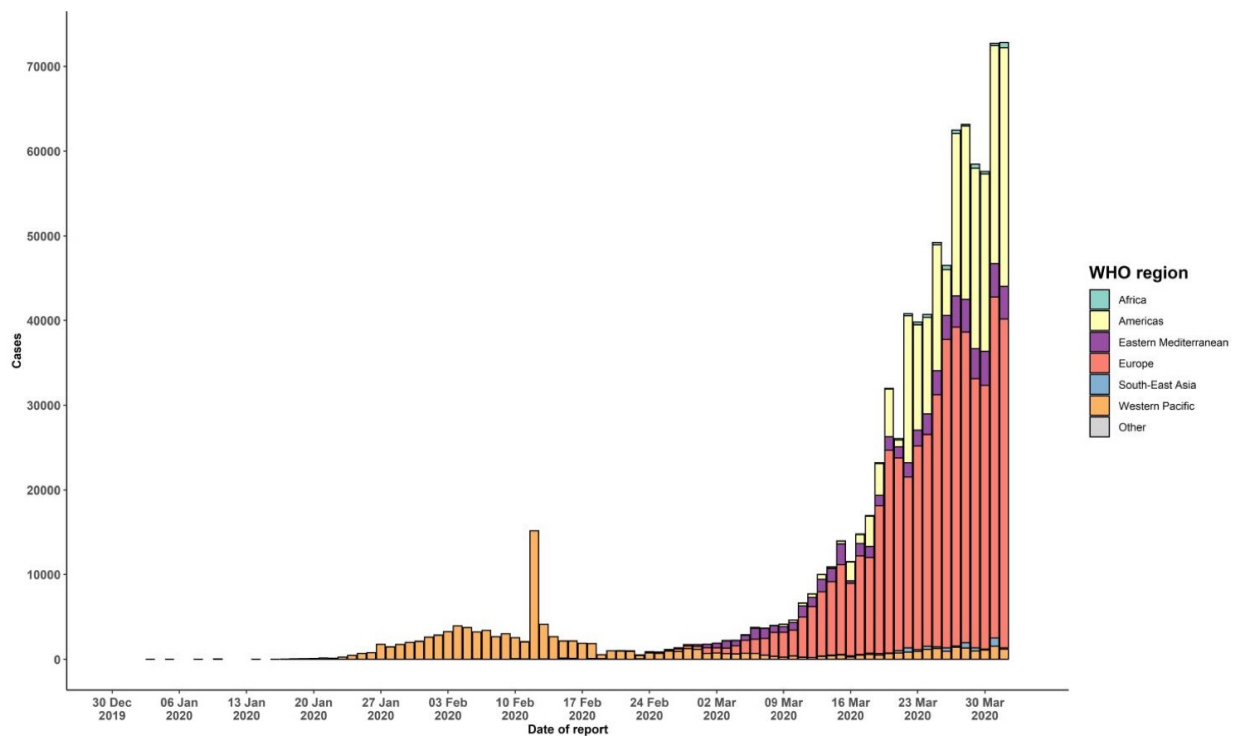


Abbildung 1: Epidemiekurve der bestätigten COVID-19-Erkrankungen. Nach Meldedatum und WHO-Region bis zum 02. April 2020. Die Anzahl der Infektionen („Cases“) ist gegen die Zeit aufgetragen („Date of Report“). *Adaptiert aus „Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 73“⁶.*

1.2 Ursprung des SARS-CoV-2 Virus

Der Ursprung des SARS-CoV-2 Virus konnte bisher nicht abschließend identifiziert werden. Neben der Theorie einer „unbeabsichtigten Laborfreisetzung“ aus dem Institut für Virologie in Wuhan (Wuhan Institute of Virology WIV) wird vor Allem die natürliche Selektion in einem tierischen Wirt vor der zoonotischen Übertragung auf den Menschen diskutiert⁷.

1.2.1 Theorie eines „Laborunfalls“

Die Theorie einer unbeabsichtigten Freisetzung aus dem WIV, z.B. durch eine unbemerkte Infektion von Mitarbeitern mit anschließender Weiterverbreitung in der Stadt Wuhan, stieß in der Öffentlichkeit auf großes Interesse und führte zu politischen Diskussionen⁸. Zudem sind immer wieder Fälle einer unbeabsichtigten Freisetzung von Laborviren bekannt geworden, obwohl Tierexperimente weltweit hauptsächlich in Laboren der biologischen Sicherheitsstufe 2 durchgeführt werden⁹. Biologisch denkbar wäre eine „gain-of-function“ Mutation im Spike-Protein des Virus unter Passage der Zellkulturen, wie es zum Beispiel bei SARS-CoV-1 beschrieben wurde¹⁰.

Auch am WIV wurden seit vielen Jahren Versuche in der Zellkultur oder im Tiermodell an SARS-CoV-1 – ähnlichen Coronaviren durchgeführt; als bevorzugter Wirt der zu untersuchenden Beta-Coronaviren diente insbesondere die Fledermaus¹¹. Phylogenetische Analysen der frühen SARS-CoV-2 – Stämme haben jedoch ergeben, dass die kultivierten Coronaviren am WIV eher den SARS-CoV-1 Viren ähneln. Daneben gab es keine Hinweise darauf, dass am WIV Experimente durchgeführt wurden, in denen „gain-of-function“ – Mutationen erzeugt oder provoziert wurden⁸. Auch gab es geographisch keinen Zusammenhang zwischen dem Ort des Ausbruchsgeschehens und dem WIV; und alle Mitarbeiter des WIV wurden im März 2020 Seronegativ auf SARS-CoV-2 – Antikörper getestet⁸.

Somit kann eine unbeabsichtigte Freisetzung aus einem Forschungslabor nicht ausgeschlossen werden; diese Theorie gilt jedoch als sehr unwahrscheinlich^{7,8}.

1.2.2 Theorie eines zoonotischen Ursprungs

Eine andere Theorie zum Ursprung des neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2 geht von einer Selektion im tierischen Wirt mit anschließender Übertragung auf den Menschen aus. Phylogenetische Untersuchungen der Sequenzmuster im Spike-Protein von SARS-CoV-2 Coronaviren, welche aus dem Schuppentier isoliert wurden, stützten diese Hypothese⁷. Im weiteren Pandemieverlauf wurde SARS-CoV-2 mit Rhinolophus-Fledermäusen in Verbindung gebracht; der genaue zoonotische Übertragungsweg ist jedoch weiterhin unbekannt¹².

Grundlage der Theorie ist die Erkenntnis, dass die Rezeptor-bindende Domäne (RBD) des Spike-Proteins von Viren, die aus Fledermäusen isoliert wurden, nicht an das menschliche Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) binden können. Da dieser Mechanismus als essenziell für eine humane Infektion mit SARS-COV-2 angesehen wird, erscheint eine Fledermaus-zu-Mensch Übertragung als Ursprung der Pandemie als eher unwahrscheinlich. Virusisolate aus Schuppentieren enthielten alle 6 entscheidenden Mutationen der RBD des Spike-Proteins, sodass ein evolutionärer Prozess durch Mutation möglich erscheint⁷. Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine Übertragung durch leblose, kontaminierte Objekte (Fomiten-Übertragung)¹³. Ähnliche Übertragungsmechanismen konnten bereits beim SARS-CoV-1 – Virus beobachtet werden⁸.

Ferner wird postuliert, dass das Virus zunächst auf den Menschen überggesprungen und anschließend humane Pathogenität entwickelt haben könnte. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits beim MERS-Coronavirus gemacht, bei dem es wiederholt zu selbstlimitierenden Mensch-zu-Mensch Übertragungen gekommen ist. Eine genetische Anpassung während einer solchen temporären Übertragung erscheint ebenfalls denkbar⁷. Es konnte jedoch bisher kein Hinweis auf die oben genannte Entwicklung im untersuchten Material der ersten COVID-19 – Patienten gefunden werden⁸.

1.2.3 Initiale Verbreitung und pandemischer Verlauf

Da nur ein geringer Anteil der ursprünglich erkrankten Patienten Kontakt zum Huanan-Fischmarkt, sowie zu den umliegenden Tiermärkten hatten, wird vor Allem eine lokale Mensch-zu-Mensch – Transmission via Tröpfcheninfektion und aerogener Übertragung in den anliegenden Wohnvierteln für die unkontrollierte Ausbreitung verantwortlich gemacht¹⁴. Da

Wuhan außerdem ein wichtiges Verkehrszentrum mit vielen Kontakten und Handelswegen in die umliegenden Regionen ist, hat die geographische Situation den Ausbruch vermutlich begünstigt⁸.

Die Gesamtumstände führten zu einer rapiden weltweiten Verbreitung des Krankheitserregers, sodass die WHO am 11. März 2020 das Ausbreitungsgeschehen zur Pandemie erklärte¹⁵.

Dabei gelten sowohl die SARS-CoV-1 Pandemie 2002 als auch die MERS-Pandemie 2012 als „Prototypen“ für die pandemische Ausbreitung humanpathogener Viren in einer globalisierten Welt¹⁶.

Schon 2002 verbreitete sich SARS-CoV-1 pandemisch und infizierte mutmaßlich 8.096 Menschen mit 774 registrierten Todesfällen in 27 verschiedenen Ländern¹⁷. Der Ursprung von SARS-CoV-1 konnte durch den Nachweis des Virus in Zibetkatzen, Marderhunden und Sonnendachsen auf einem Tiermarkt in Shenzhen in China identifiziert werden¹⁸. Das natürliche Reservoir von SARS-Coronaviren befindet sich jedoch in Fledermäusen; hier wurde die Artengrenze durch das SARS-Coronavirus vermutlich Ende 2002 überschritten. Anschließend erfolgte die humane Infektion bei Menschen, die sich in unmittelbarer Nähe zu den Tieren aufhielten¹⁹.

Auch im Verlauf der MERS-Pandemie, welche ab Juni 2012 zunächst in Saudi-Arabien und in den Vereinigten Arabischen Emiraten auftrat, wurden Fälle in Europa, Asien und den USA registriert. Bis zum 31. Mai 2015 konnten insgesamt 1.180 Infektionen labortechnisch gesichert werden. Daraus wurden 483 Todesfälle im Zusammenhang mit dem MERS-Virus registriert; dies entspricht einer Mortalität von über 40%²⁰. Obwohl das MERS-Coronavirus eigentlich in Fledermausarten zirkulierte, konnte das Virus in Abstrichen von arabischen Kamelen (Dromedar) nachgewiesen werden. Diese Fälle konnten anschließend mit der Infektion im Menschen in Zusammenhang gebracht werden¹⁹. Bei der MERS-Pandemie spielten außerdem nosokomiale Infektionen eine wichtige Rolle; so wurden im Rahmen eines „Superspreader Events“ im Mai 2015 in Südkorea 186 Personen durch eine Person aus dem mittleren Osten infiziert. Insgesamt 16 Krankenhäuser spielten bei der Unterbrechung der Infektionskette eine wichtige Rolle²¹.

Bemerkenswert ist, dass beide Pandemien vor Allem durch Maßnahmen der Infektionskontrolle und weniger durch medizinische Interventionen kontrolliert werden konnten¹⁹.

1.2.4 Inzidenz und Prävalenz von COVID-19

Inzidenz und Prävalenz von COVID-19 zeigten sich zu Beginn des Infektionsgeschehens dynamisch, da die Fallzahlen exponentiell zunahmen; bei Ausbleiben von infektionspräventiven Maßnahmen wird von einer Basisreproduktionszahl R_0 von ca. 2,8 -3,8 ausgegangen^{22,23}.

Weiterhin wurden saisonale Anstiege der Infektionszahlen beobachtet: In Europa kam es zwischen Februar und April 2020 zur sogenannten „ersten Infektionswelle“ mit zwischenzeitlicher Erholung der Rate von Neuinfizierten und einem erneuten Anstieg ab Ende September 2020 mit der „zweiten Infektionswelle“. Die genaue Erfassung der Fallzahlen gestaltete sich jedoch aufgrund von vielen asymptomatischen Verläufen schwierig^{24,25}.

Zu den weiteren Einflussfaktoren auf das Infektionsrisiko zählen unter anderem Armut, niedriger Bildungsstand, Zugehörigkeit zu einer ethnischen Minderheit, sowie fehlender Wohnsitz²⁶⁻²⁸. Außerdem spielen lokale Ausbrüche im Rahmen von „Superspreader Events“ in Altenpflegeeinrichtungen, Wohneinrichtungen für Geflüchtete oder Situationen mit räumlich beengter Unterbringung von Menschen (Kreuzfahrtschiffe, fleischverarbeitende Betriebe, Landwirtschaft) eine entscheidende Rolle zur Unterhaltung der Pandemie²⁹.

Das Risiko für einen schweren Verlauf der Covid-19 Erkrankung steigt bei über 65-jährigen Patienten stark an. Die höchste Inzidenz fand sich während der ersten Welle im Alter über 90 Jahre. In der zweiten Welle hingegen waren eher jüngere Patientengruppen betroffen (Durchschnittsalter positives Testergebnis 50 Jahre im Juni 2020 vs. 32 Jahre im August 2020)²³.

Im Zeitraum von Februar bis Juni 2020 entwickelten 3% der Patienten eine Pneumonie; 15% der an das Robert-Koch-Institut (RKI) übermittelten Fälle führten zu einem Krankenhausaufenthalt. Über den Sommer 2020 wurden viele Infektionen bei jüngeren Patienten nachgewiesen; die Hospitalisierungsrate blieb insgesamt niedrig²³.

Ab Oktober 2020 zeigte sich eine erneute Zunahme der Hospitalisierungsrate sowie eine Zunahme der intensivmedizinischen Behandlungsverläufe²³.

Die Fallsterblichkeit stieg ebenfalls mit dem Alter an: Von 0,1 % bei unter-50 -jährigen auf bis zu >10% bei über-80-jährigen Patienten³⁰.

Untersuchungen der Infektionssterblichkeit (Infection Fatality Rate [IFR]) ergaben 0,17 – 1,7%^{25,31}; des Weiteren konnte das Alter als wichtigster Einflussfaktor auf die Infektionssterblichkeit identifiziert werden³².

1.3 Erreger-Klassifikation von SARS-CoV-2

Die Virusfamilie der Coronaviren gehören zur Ordnung der Nidovirales, genauer zur Unterordnung der Cornidoviridae. Das Genom besteht aus RNA-Einzelsträngen und umfasst 27.000 – 31.000 Nukleotide³³. Die Systematik der Coronavirus-Familie ist in Abbildung 2 dargestellt.

Das neuartige SARS-CoV-2 Virus wird der Gattung der *Betacoronaviren* und damit der Unterfamilie der Orthocoronavirinae zugeordnet¹². Es besitzt eine enge strukturelle Verwandtschaft mit dem ebenfalls humanpathogenen SARS-CoV-1, welcher die Lungenerkrankung „Severe acute respiratory Syndrome“ (SARS) verursacht. SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 bilden zusammen die Untergattung der Sarbecoviren³⁴.

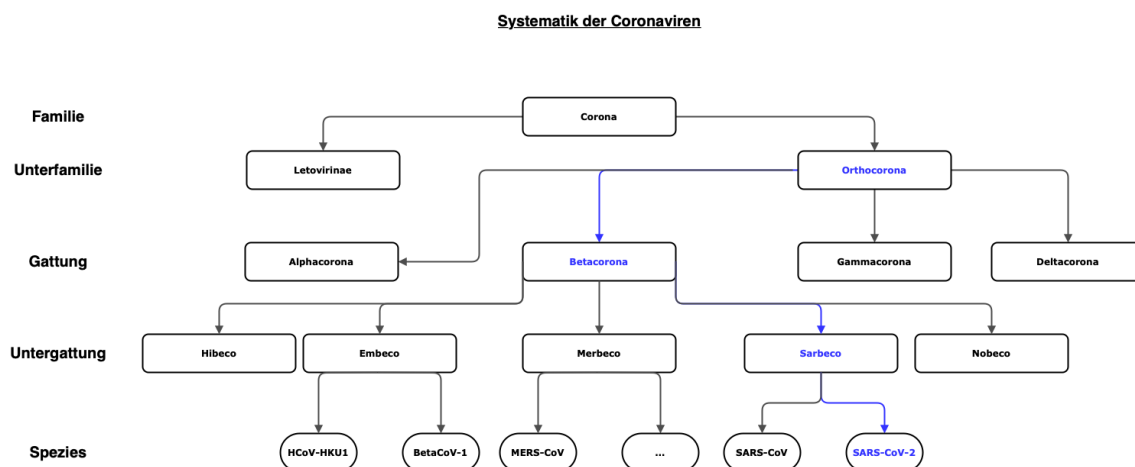


Abbildung 2: Systematik der Coronaviren. Die Familie der Coronaviren wird in die Unterfamilien der Letoviren und Orthocoronaviren aufgeteilt. Die Unterfamilie der Orthocoronaviren werden in die vier Gattungen der Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren gegliedert. Die Gattung der Betacoronaviren kann in die fünf Untergattungen der Embeco-, Merbeco-, Sarbeco-, Hibeco- und Nobecoviren unterteilt werden. Die SARS-CoV- und SARS-CoV-2- Spezies zählen zur Untergattung der Sarbecoviren. *Adaptiert aus "Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)"³⁵.*

Von SARS-CoV-2 wurden 3 Hauptstämme A, B und C identifiziert³⁶. Aufgrund des hohen Mutationspotentials von SARS-CoV-2 traten im Verlauf der Pandemie verschiedene SARS-CoV-2 – Varianten hervor:

Als Variants of Interest (VOI) werden Varianten mit genetischen Veränderungen bezeichnet, welche sich auf die viralen Eigenschaften auswirken oder Fälle bzw. Fallcluster in einzelnen Ländern verursachen und auf ein Risiko für die globale öffentliche Gesundheit hindeuten³⁷.

Als Variants of Concern (VOC) wird eine VOI bezeichnet, welche zusätzlich eine Zunahme von Übertragbarkeit, Virulenz, eine Veränderung des klinischen Krankheitsbildes oder eine Verringerung der Wirksamkeit von Maßnahmen im Bereich der öffentlichen Gesundheit, Diagnostika, Impfstoffe oder Therapeutika beinhaltet³⁷. Gemäß Nomenklatur der WHO werden VOC in griechischen Buchstaben in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt.

Global wurden 5 VOCs genau analysiert, da eine erhöhte Ausbreitungstendenz beobachtet wurde: B.1.1.7 („Alpha; Variante Vereinigtes Königreich“)³⁸, B.1.351 („Beta; Variante Südafrika“)³⁹, B.1.1.28 P1 („Gamma; Variante Brasilien“)⁴⁰, B.1.617.2 („Delta, Variante Indien“), sowie B.1.1.529 („Omikron“). Für die Ausbreitung von SARS-CoV-2 in Deutschland waren nach der Ursprungsvariante vor Allem die VOC „Alpha“ (seit September 2020) und „Omikron“ (seit Frühjahr 2022) von Bedeutung³⁷.

1.4 Pathogenese

Im Verlauf einer COVID-19 Erkrankung konnten direkte und indirekte Effekte der Virusinfektion beobachtet werden. Die Klinik ist hierbei variabel und reicht von asymptomatischen Verläufen bis hin zum akuten Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome [ARDS]) mit einhergehender Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Behandlung⁴¹. Daher gestaltet sich eine Aufteilung in allgemeingültige Phasen oder Krankheitsverläufe als schwierig.

Während der initialen Virusreplikation in den Atemwegen kommt es zu einer direkten Schädigung des Alveolarepithels durch die Virusinvasion: SARS-CoV-2 bindet mit Hilfe des Spike-Proteins an das ACE2. Anschließend verschmilzt die virale Membran mit der Zellmembran unter Vermittlung der „Transmembrane Serinprotease 2“ (TMPRSS2) und das Virus gelangt in

die Wirtszelle. Hier beginnt der Vermehrungszyklus bestehend aus der Freisetzung der Nukleinsäure ins Zytoplasma (Uncoating) mit anschließender viraler Genexpression (Translation), sowie Replikation und Transkription von Virusbestandteilen. Nach Zusammenbau der einzelnen Viruskomponenten (Assembly) kommt es zur Exozytose und der erneuten Infektion von Zellen des Alveolarepithels⁴². Die Wirtszelle wird hierbei geschädigt, sodass sich histopathologisch ein diffus-alveolärer Schaden des Lungenparenchyms ausbildet^{43,44}.

Am Gefäßendothel ist eine indirekte Schädigung durch Akkumulation von Angiotensin II nach Downregulation von ACE2 zu beobachten, wie es bei einer Infektion mit SARS-CoV-1 ebenfalls zu beobachten ist⁴⁵. Durch diese Dysregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems kommt es an kleinen Gefäßen vermehrt zu einer Vaskulitis oder Endothelitis. Dies führt zur Bildung von Mikrothromben, Gerinnungsstörungen und thromboembolischen Komplikationen im arteriellen und venösen Gefäßsystem⁴⁶.

Neben der Lunge sind noch weitere Organbeteiligungen von Herz und Leber^{43,47}, Niere, Dünndarm, sowie Gefäß-⁴⁸ und Nervensystem⁴⁹ beschrieben worden.

Des Weiteren spielt eine dysregulierte Immunantwort, welche dem Ablauf einer Sepsis ähnelt, eine Schlüsselrolle in der Pathogenese: Neben erhöhter Freisetzung von Interleukin-6 (IL-6) kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit Veränderungen des Gerinnungssystems. Klinisch bleibt eine Hypotonie, wie es von der Sepsis bekannt ist, eher aus⁵⁰. Unklar ist hingegen die Rolle des zellulären Immunsystems: Während eine Leukozytose mit einhergehender Lymphozytopenie bei schweren COVID-19 - Verläufen beschrieben wurde⁵¹, blieb die genaue Rolle der einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen ungeklärt. Zum einen wurde eine NK-Zell-Deaktivierung, sowie eine verminderte Konzentration und zunehmende Erschöpfung („exhaustion“) von CD8+ Lymphozyten beschrieben⁵², zum anderen zeigte sich eine überschießende Aktivität von CD8-positiven Zellen und Th17-Helferzellen⁴⁴.

1.5 Diagnostik

Zum Nachweis einer akuten SARS-CoV-2 Infektion gilt der Nachweis von Ribonukleinsäure (RNA) aus respiratorischen Sekreten mittels Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time RT-PCR) als Methode der Wahl⁵³. Dabei wird zunächst Material aus dem oberen Respirationstrakt via Abstrich des Oropharynx bzw. Nasopharynx oder via Rachenspülwasser gewonnen. Je nach Verlauf und Fragestellung ist auch eine Probengewinnung aus dem unteren Respirationstrakt als Sputum, Bronchial- und Trachealsekret oder als Bronchoalveoläre Lavage (BAL) notwendig, da das Virus im Verlauf der Infektion im oberen Respirationstrakt nicht mehr nachweisbar sein kann (Abbildung 3)⁵⁴. Eine weitere diagnostische Möglichkeit besteht durch den Nachweis aus Stuhlproben, da im Verlauf der Infektion inaktivierte Viruspartikel über den Darm ausgeschieden werden⁵⁵.

Der Test sollte auch bei negativem Befund alle 2-3 Tage wiederholt werden, da es aufgrund unzureichender Probenqualität, Fehlern beim Transport oder Lagerung des Probenmaterials, sowie während einer späten Krankheitsphase trotz hoher Sensitivität und Spezifität⁵⁶ zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann⁵⁴.

Im Verlauf der Pandemie standen zusätzlich Antigen-Schnelltests zum Nachweis von Virusprotein, sowie Antikörper-Tests zum Nachweis einer stattgehabten Immunantwort zur Verfügung⁵³. Da diese aber zum Zeitpunkt der Studiendurchführung (Datenerhebung von April bis Oktober 2020) noch nicht zur Verfügung standen, wird an dieser Stelle auf die weiterführende Fachliteratur verwiesen.

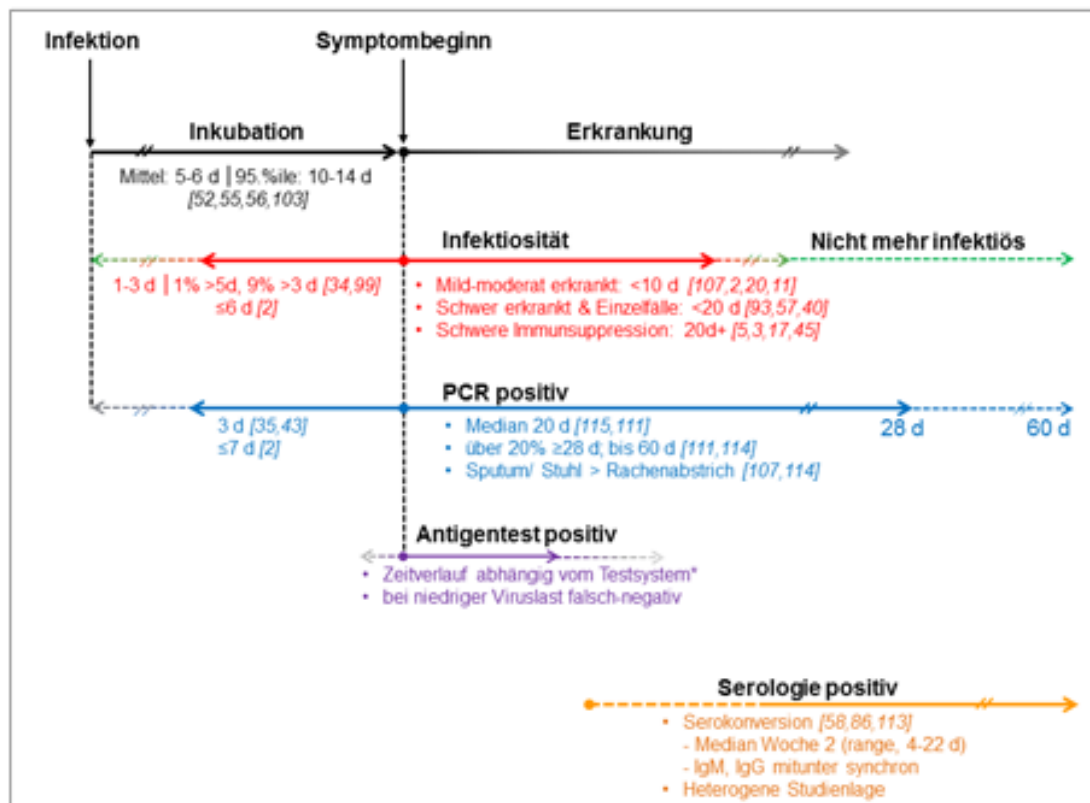


Abbildung 3: SARS-CoV-2 Infektion - Krankheitsverlauf und Labordiagnostik. Methode der Wahl in der COVID-19 Diagnostik ist die positive SARS-CoV-2 PCR vom Rachenabstrich. Unterstützend kann in Einzelfällen Material aus dem Respirationstrakt wie Sputum oder Sekret aus einer Bronchoalveolären Lavage verwendet werden. Zum Nachweis einer durchgemachten COVID-19 Erkrankung dient der positive Antikörper-Test in der Serologie. *adaptiert aus RKI, „Hinweise zur Testung von Patienten auf Infektion mit dem neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2“; Stand: 13.01.2021⁵⁴.*

1.6 Klinik

Der klinische Verlauf ist variabel und reicht von asymptomatischen bis hin zu schweren Verläufen mit dem klinischen Bild eines ARDS bzw. einer Sepsis. Die Symptome ähneln dabei einem grippalen Infekt, einer Influenza oder einer allergischen Rhinosinusitis, die gleichzeitig zu den wichtigsten Differentialdiagnosen gehören. Am häufigsten treten hierbei Fieber und Husten auf, gefolgt von Abgeschlagenheit/ Fatigue, Myalgien, Schnupfen, Halsschmerzen, Diarrhoe oder Anosmie/ Ageusie (Tabelle 1). Als Hinweis für einen schweren Covid-19 Verlauf kann Dyspnoe

auftreten; diese kann jedoch insbesondere bei chronisch vorerkrankten Patienten verkannt werden⁵⁷.

Zu den untypischen klinischen Präsentationen zählen sowohl Übelkeit/ Erbrechen, Diarrhö und Bauchschmerzen, als auch Konjunktivitiden⁵⁸. Hauteffloreszenzen wie das petechiale⁵⁹ oder varizellenartige Exanthem⁶⁰. Brustschmerz, Hämoptysen oder Hodenschmerzen wurden ebenfalls beschrieben, zählen jedoch zu den selteneren Symptomen.

Ein schwerer COVID-19 Verlauf ist nach ungefähr 2-7 Tagen durch die Entwicklung einer Pneumonie mit begleitender respiratorischer Insuffizienz gekennzeichnet; es kommt zu zunehmender Dyspnoe und Tachypnoe ($> 30/\text{min.}$), sowie zum Abfall der peripheren Sauerstoffsättigung (SpO_2) unter 90% (Tabelle 1).

Beim kritischen Verlauf besteht nach ungefähr 8-10 Tagen die Indikation zur Intubation und maschinellen Beatmung; klinisch dominiert das Bild eines ARDS bzw. einer Sepsis⁶¹.

Tabelle 1: Klinik bei COVID-19 Erkrankung. Während milde Verläufe vor Allem mit Fieber, Abgeschlagenheit (Fatigue), Husten und Appetitlosigkeit einhergehen, sind Luftnot und respiratorische Insuffizienz die vorrangigen Symptome beim schweren COVID-19 Verlauf²³.

Klinik bei COVID-19 - Erkrankung	
Milde Verläufe	Schwere Verläufe
Fieber	Luftnot
Abgeschlagenheit	respiratorische Insuffizienz
Husten (trocken)	
Myalgien	
Appetitlosigkeit	
Anosmie/ Ageusie	
untypische Symptome	
Diarrhoen	
Bauchschmerzen	
Schnupfen	
Halsschmerzen	
produktiver Husten	
Kopfschmerzen	

Die variable und unspezifische klinische Präsentation erschwert nicht nur die Diagnose, sondern auch die Prognose: Während milde Verläufe als Regelfall gelten (>80% der Infektionen verlaufen mild oder asymptomatisch), ist eine stationäre Aufnahme nur in 7% der Fälle notwendig⁶². Eine hohe Sterblichkeit ergibt sich nach wie vor beim Beginn einer intensivmedizinischen Behandlungspflicht. Da ein milder Verlauf allerdings jederzeit in einen schweren Verlauf übergehen kann, ergibt sich klinisch der Bedarf nach prädiktiven Verlaufsparametern vor und nach durchgemachter SARS-CoV-2 Infektion, um einen schweren COVID-19 Verlauf rechtzeitig zu erkennen und zu behandeln.

1.7 Die Rolle des Immunsystems

Hierbei kommt dem Immunsystem sowohl mit seinen zellulären als auch humoralen Anteilen eine entscheidende Rolle zu: Während SARS-CoV-2 spezifische IgM-Antikörper schon nach 7 Tagen mit ihrer maximalen Konzentration im Serum erscheinen, sind 9 Tage nach durchgemachter COVID-19 Erkrankung SARS-CoV-2 spezifische IgG-Antikörper im Blutserum als Teil der humoralen Immunantwort nachweisbar^{63,64}. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung von experimentellen Therapieversuchen bei schweren COVID-19 Verläufen mittels Transfusion von Rekonvaleszenten-Plasma; diese Praxis wurde jedoch bei fehlendem klinischen Nutzen wieder eingestellt⁶⁵.

Die genaue Rolle der zellulären Immunantwort war zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt. Bei COVID-19 Rekonvaleszenten konnte trotz ausbleibender Serokonversion eine ausreichende Immunität aufgrund von Gedächtnis- T Zellen beobachtet werden; ein Schutz vor schweren COVID-19 Verläufen aufgrund einer T-Zell Immunität wird daher angenommen⁶⁶. Eine transiente Lymphozytopenie ist bei akuter COVID-19 Infektion zu beobachten; diese korreliert mit der Schwere der Erkrankung^{67,68}. Dies wurde ebenso bei Infektionen durch andere Coronavirinae wie SARS oder MERS beobachtet^{69,70}. Im Vergleich zu anderen viralen Infektionen wurde eine Lymphopenie in der frühen Infektionsphase ebenfalls für die Vogelgrippe (Influenza H5N1)⁷¹, das Humane Respiratorische Synzytial-Virus⁷², sowie die Schweine Maul- und Klauenseuche⁷³ beschrieben; ansonsten bleibt die Lymphozytopenie ein seltener Befund bei viralen Infektionen.

Post-infektiös wurde für die Masern-Infektion bereits eine verlängerte Einschränkung der zellulären Immunität beschrieben. Hierbei führten niedrige Gesamt-Lymphozytenzahlen zu einer Abnahme der Immunantwort und zu einer erhöhten Mortalität der Masern-Erkrankung bei Kindern^{74,75}. Für das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2 wurde zu Beginn dieser Studie ein ähnlicher Mechanismus diskutiert.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Um die Rolle der zellulären Immunantwort im Kontext der COVID-19 Erkrankung genauer zu charakterisieren, wurden im ersten Teil dieser Studie Blutproben von akuten COVID-19 Patienten bei Erstdiagnose via Durchflusszytometrie analysiert, um die Auswirkungen einer akuten SARS-CoV-2 Infektion auf die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen zu untersuchen. Weiteren Einflussfaktoren wie Alter und Geschlecht der COVID-19 Patienten galten hierbei unser besonderes Interesse.

Darüber hinaus wurde das periphere Blut von COVID-19 Rekonvaleszenten auf eine Veränderung der Lymphozyten-Subpopulationen untersucht, um Hinweise auf einen anhaltenden Immundefekt und länger persistierende Veränderungen nach durchgemachter SARS-CoV-2 Infektion zu identifizieren. Hierbei wurden insbesondere Blutproben von Patienten mit einer milden Verlaufsform der COVID-19 Erkrankung analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Einschlusskriterien zur Studienteilnahme

2.1.1 Akute COVID-19 Patienten

Zur Analyse des zellulären Immunstatus im Verlauf einer akuten SARS-CoV-2 Infektion wurden Patienten eingeschlossen, bei denen eine Covid-19 Erkrankung unmittelbar via SARS-CoV-2 – PCR diagnostiziert wurde. Die Patienten stellten sich zwischen April und Oktober 2020 im Universitätsklinikum Augsburg über die Notaufnahme vor oder wurden im Rahmen einer Routineuntersuchung während des stationären Aufenthaltes via Rachenabstrich positiv auf SARS-CoV-2 getestet.

Ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen die COVID-19 Erstdiagnose länger als 24 Stunden zurücklag und welche zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme bereits immunmodulatorisch mithilfe von Cortison-haltigen Präparaten, Remdesivir, Rekonvaleszenten-Plasma oder anderen Immunsuppressiva behandelt worden waren.

Die Testung auf eine aktive SARS-CoV-2 Infektion erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) aus einem tiefen Rachenabstrich oder Rachenspülwasser. Das Testergebnis wurde durch das Institut für Mikrobiologie und Labormedizin erfasst und ausgewertet (Herr Dr. rer. nat. Hans-Georg Ruf, Institut für Mikrobiologie).

2.1.2 COVID-19 Rekonvaleszenten

Zur Untersuchung des zellulären Immunsystems nach durchgemachter COVID-19 Erkrankung wurden Probanden rekrutiert, welche gewillt und geeignet sind, Blutplasma zu spenden. Die Spende erfolgte im Rahmen einer Blutspende am Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums in Augsburg.

Zu den Einschlusskriterien zählten körperliches Wohlbefinden, ein Mindestalter von 18 Jahren sowie ein Mindestgewicht von 55 kg. Periphere Venen mussten gut punktierbar sein; weiterhin mussten die Probanden telefonisch für Rückfragen erreichbar sein. Bei Studieneinschluss lag der

Beginn der Symptome mindestens 4 Wochen zurück und die Teilnehmer mussten seit mindestens 2 Wochen symptomfrei sein. Ein positives Testergebnis zum Nachweis der Erstdiagnose einer SARS-CoV-2 Infektion wurde vor Studieneinschluss geprüft; darüber musste mindestens ein negativer SARS-CoV-2 Rachenabstrich vor Studieneinschluss vorliegen. Zusätzlich erfolgte der laborchemische Nachweis einer stattgehabten SARS-CoV-2 Infektion mittels Titer-Bestimmung von SARS-CoV-2 IgG- und IgA- Antikörpern im Blutserum.

Die allgemeinen Ausschlusskriterien orientierten sich an der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten⁷⁶. Diese sehen einen Ausschluss von Menschen mit schweren chronischen und aktiven Erkrankungen vor, insbesondere: Herz- und Gefäßerkrankungen, Erkrankungen des Zentralnervensystems, klinisch relevante Blutgerinnungsstörungen, rezidivierende Synkopen oder Krampfanfälle, insulinpflichtiger Diabetes Mellitus, oder Erkrankungen des gastrointestinalen, urogenitalen, hämatologischen, immunologischen, metabolischen, renalen oder respiratorischen Systems, bei denen eine Blutspende eine Gefährdung des Spenders oder Empfängers nach sich ziehen kann. Zudem wurden Patienten ausgeschlossen, welche an bösartigen Neoplasien leiden oder litten (Ausnahme: in-situ Karzinom und Basalzellkarzinom nach kompletter Resektion).

Zu den ausgeschlossenen Probanden zählten ebenfalls Personen, bei denen eine der folgenden infektiösen Erkrankungen oder Krankheitserreger nachgewiesen wurde: Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) 1 oder 2, Hepatitis-B-Virus (HBV) (Ausnahme: gesicherte Ausheilung), Hepatitis-C-Virus (HCV), Humanes T-lymphotropes Virus-1/-2 (HTLV-1/-2), Protozoosen, Syphilis, Malaria, Osteomyelitis, Tuberkulose, sowie andere chronisch persistierende bakterielle Infektionen.

Weiterhin wurden Personen mit dem Risiko der Übertragung spongiformer Enzephalopathien (TSE), Empfänger von Xenotransplantaten oder Frischzellen tierischen Ursprungs, sowie Personen mit vorbekanntem aktivem Drogenkonsum oder Medikamentenmissbrauch von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

Ergänzend wurde vor jeder Spende eine Prüfung der Spendertauglichkeit durchgeführt. Diese beinhaltet die Überprüfung des Alters (18-65 Jahre), des Körpergewichts (mindestens 55 kg), des Gesamteindrucks (keine erkennbaren Krankheitszeichen), die Bestimmung von Hämoglobin (Hb) und Hämatokrit (Hk) ($Hb > 125 \text{ g/l}$ und $Hk > 0,38 \text{ l/l}$ bei Frauen und $Hb > 135 \text{ g/l}$ und $Hk > 0,4 \text{ l/l}$ bei Männern), Blutdruckmessung (systolisch 100-180 mmHg, diastolisch $< 100 \text{ mmHg}$), Pulsfrequenz (rhythmisch, Frequenz 50-110 /min.), Messung der Körpertemperatur ($< 38,4^\circ\text{C}$), sowie der Haut an der Punktionsstelle (frei von Läsionen).

Ein schwerer Covid-19 Verlauf mit respiratorischer Insuffizienz, Sauerstoffpflicht oder ein Aufenthalt auf der Intensivstation führte ebenfalls zum Studienausschluss.

2.1.3 *Einschluss der gesunden Kontrollgruppe*

Als Kontrollgruppe konnte eine historische Kohorte von gesunden Probanden eingeschlossen werden; die Bestimmung des zellulären Immunstatus erfolgte vor Ausbruch der SARS-CoV-2 – Pandemie. Die Ein- und Ausschlusskriterien orientierten sich an den oben genannten Richtlinien. Zusätzlich wurde die Kontrollgruppe um gesunde Probanden ergänzt, bei denen zum Zeitpunkt der Messung keine akute oder durchgemachte SARS-CoV-2 Infektion bekannt war.

Den Studienteilnehmern in der gesunden Kontrollgruppe wurde nach ausführlicher Aufklärung und Studieneinschluss bei körperlichem Wohlbefinden einmalig eine periphere Blutprobe entnommen, welche innerhalb von 24 Stunden der Messung zugeführt wurde. Ältere Blutproben wurden verworfen.

2.1.4 *Einhaltung von ethischen Standards*

Alle Studienteilnehmer wurden ärztlich über die Teilnahme an der Studie aufgeklärt und das schriftliche Einverständnis liegt vor. Alle Teilnehmer willigten dabei in die Verwendung der Blutproben sowie der erhobenen Daten für wissenschaftliche Zwecke ein.

Die Autoren erklären, dass zum Zeitpunkt der Studie kein Interessenkonflikt vorlag.

2.1.5 Ethikvotum

Das Ethikvotum orientierte sich analog der CORKUM - Studie der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU). Es liegt ein positives Ethikvotum der Beratungskommission für klinische Forschung des Universitätsklinikums Augsburg vor (Forschungsvorhaben 2020-12). Die ethischen Standards der Deklaration von Helsinki⁷⁷ und ihren Revisionen (zuletzt Oktober 2013 durch die 64. Generalversammlung, Fortaleza, Brasilien) des Weltärztebundes wurden befolgt und eingehalten.

2.1.6 Einverständnis zum Studieneinschluss

Jeder Studienteilnehmer wurde ausführlich in Wort und Schrift über den Studieneinschluss aufgeklärt. Bei Patienten mit bestelltem Betreuer erfolgte zusätzlich die Aufklärung der/ des Betreuers.

2.1.7 Verwendetes Probenmaterial

Als Testmaterial zur Analyse des zellulären Immunstatus wurde peripher-venöses Blut verwendet, welches im Rahmen einer Blutbild-Untersuchung in der klinischen Routine abgenommen und unmittelbar im Anschluss mit EDTA versetzt wurde. Das Blut wurde innerhalb von 24 Stunden nach Erhalt des positiven Testergebnisses abgenommen und bis zur Analyse am Durchflusszytometer bei Raumtemperatur gelagert. Ältere Blutproben wurden von der Studie ausgeschlossen.

2.2 Untersuchungsmethoden

2.2.1 Serum-Antikörpertest (Anti-SARS-CoV-2-ELISA)

Um eine durchgemachte SARS-CoV-2 Infektion zu diagnostizieren wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf SARS-CoV-2- IgG- und IgA- Antikörper durchgeführt (Fa. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Deutschland).

Als Substrat kann entweder Blutserum oder Blutplasma eingesetzt werden. Zur Vorbereitung werden die Patientenproben im Verhältnis 1:100 mit gebrauchsfertigem Probenpuffer (Fa. EUROIMMUN, Lübeck, Deutschland) verdünnt. Anschließend werden je 100 µl Kalibrator, Positiv- und Negativkontrolle sowie verdünnte Patientenprobe in je ein Reagenzgefäß gegeben und für 60 min. bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Reagenzgefäße werden geleert und 3 x mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Zur Konjugat-Inkubation werden anschließend 100 µl Enzymkonjugat hinzugegeben und für 30 min. bei $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend werden die Ansätze dreimal gewaschen, bevor jeweils 100 µl Chromogen-/ Substratlösung hinzugegeben wurde. Es erfolgt die Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur. Anschließend werden jeweils 100 µl Stopplösung hinzugegeben und es erfolgt die fotometrische Auswertung mithilfe eines Mikrotiterplatten-Readers innerhalb von 30 min. (450 nm Messwellenlänge; 620-650 nm Referenzwellenlänge).

Zur Testauswertung werden die Extinktion der Kontrolle bzw. der Patientenprobe ins Verhältnis zur Extinktion des Kalibrators gesetzt. Dies erlaubt eine semiquantitative Abschätzung des Messergebnisses. Laut Hersteller wird folgende Befundinterpretation vorgeschlagen: Ratio $< 0,8$: negatives Testergebnis; Ratio $\geq 0,8$ bis $< 1,1$: grenzwertiges Testergebnis; Ratio $\geq 1,1$: positives Testergebnis. Als Nachweisempfindlichkeit des Tests wird die untere Erfassungsgrenze (Limit of Blank LoB) bei einer Ratio von 0,13 angegeben; für die untere Nachweisgrenze (Limit of Detection LoD) wird eine Ratio von 0,14 angegeben.

Die diagnostische Sensitivität des Tests für kombinierte IgG und IgA- Werte entspricht laut Hersteller 66,7% für eine Testung < 10 Tage nach Symptombeginn. 100% werden für die Testung > 10 Tage nach Symptombeginn angegeben; die Spezifität des Tests beträgt 98,5%.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Lymphozyten-Subpopulationen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FCM), bei der fluoreszenz-markierte, monoklonale Maus-Antikörper (Fa. Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) gegen Oberflächenproteine der Lymphozyten (Cluster of Differentiation, CD) mit der Patientenprobe inkubiert werden. Nach den anschließenden Waschschritten, sowie Aufnahme in einen Durchflusszytometrie-Puffer wurden die Patientenproben an einem FC500 Durchflusszytometer (Fa. Beckman Coulter) gemessen und ausgewertet.

Zur Messung im FC500 Durchflusszytometer wird die zu analysierende Probe über eine dünne Hohnadel mittels Überdruck-Kompression in das Gerät aufgenommen. Hier wird die Probe zunächst mit „Sheath Fluid“ (Fa. Beckman Coulter) versetzt und anschließend durch eine Messküvette geführt. Aufgrund der laminaren Strömung, sowie einer zunehmenden Verjüngung der Messküvette ordnen sich die zu analysierenden Zellen hintereinander in der Mitte des Flusses an, sodass jede Zelle einzeln die Messküvette durchläuft. Hier werden die Zellen nacheinander mittels Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt (Abbildung 4). Das emittierende Signal der Zelle wird anschließend von einem Photoelektronenvervielfacher („Photomultiplier Tube, PMT) aufgenommen und verstärkt (Abbildung 5). Die Wellenlänge sowohl für Forward- als auch Side Scatter beträgt 488 nm.

Der Detektor für das Signal des Forward Scatter (FC) befindet sich direkt hinter der Messküvette im Strahlengang des Lasers. Somit ist die Signal-Intensität des FC anti-proportional zur Größe des zu messenden Objektes, da der Laserstrahl durch das passierende Objekt unterbrochen wird. Insgesamt wird vom FC – Detektor das Streulicht in einem Winkel bis maximal 19° eingefangen.

Der Detektor für das Signal des Side Scatter (SC) befindet sich in einem Winkel von 45° zum Verlauf des Lichtstrahls. Das Streulicht wird mithilfe eines dichroitischen 488nm- Langpassfilters auf den Detektor gelenkt. Das SC- Signal verhält sich proportional zur Granularität des zu messenden Objektes.

Nach Zusammenführung der einzelnen Signale für die zu messenden Objekte kann das Signal des Forward Scatter gegen das Side Scatter- Signal in einem Punktdiagramm gegeneinander aufgetragen werden. Dies ermöglicht die Identifikation von Zellpopulationen, zum Beispiel im peripheren Blut oder Knochenmark.

Außerdem werden durch Exzitation mit dem Argon-Laser die Fluorochrom-Antikörper-Konjugate angeregt, welche je nach Farbstoff Licht in unterschiedlichen Wellenlängen

emittieren. Nach Durchlaufen des 488 nm Langpassfilters wird das SC-Streulicht mithilfe eines 500 nm Bandpassfilters blockiert, sodass lediglich das emittierte Signal der Fluorochrome übertragen wird. Der Lichtstrahl wird durch die Anwendung von teildurchlässigen Spiegeln auf insgesamt 5 verschiedene Bandpassfilter mit unterschiedlichen Wellenlängen (525 nm, 575 nm, 610 nm und 755 nm) gelenkt, sodass eine Unterscheidung des Signals nach emittierter Wellenlänge möglich ist. Anschließend wird das Lichtsignal von je einem PMT detektiert und amplifiziert.

Innerhalb eines PMT wird das eintreffende Lichtsignal durch Anlegen von hoher Spannung (500 – 800 Volt) und Auslösen einer Elektronenlawine verstärkt (Abbildung 5). Dieses Spannungsimpulssignal ist proportional zur Intensität des eintreffenden Lichts, welches der Sensor des PMT empfängt.

Die Intensität des empfangenen Lichtstrahls bestimmt dabei die Höhe des Spitzenimpulses. Die Breite des Impulses wird hingegen durch die Zeit bestimmt, die das zu messende Objekt im Laserstrahl verweilt. Die Gesamtfluoreszenz kann anschließend als Fläche unter dem Puls bestimmt werden (Abbildung 6).

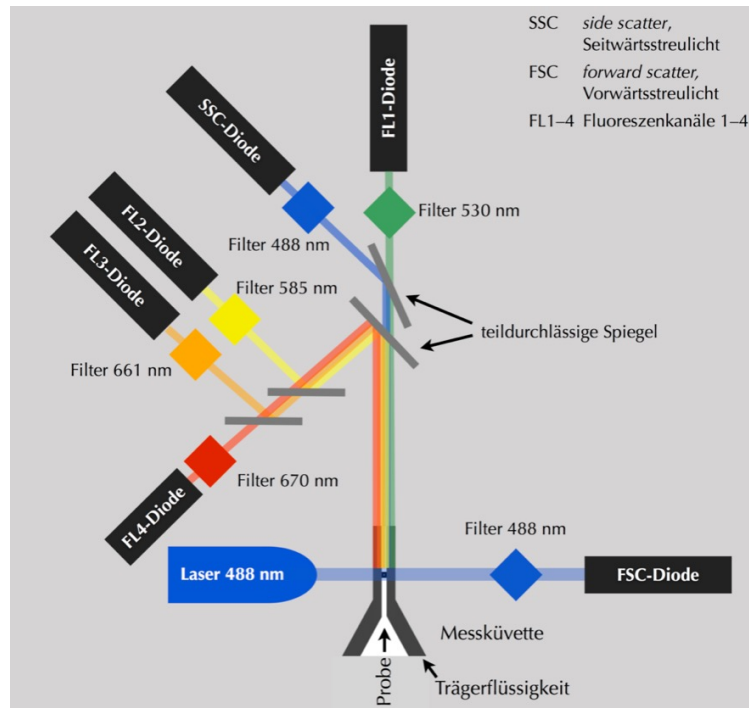


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Die Probe durchläuft eine Messküvette und die zu messenden Objekte werden nacheinander mit einem 488nm Argon-Ionen-Laser bestrahlt. Im direkten Lichtstrahl befindet sich der Detektor für den FC. Zudem wird der Lichtstrahl mit Hilfe von teildurchlässigen Spiegeln und Bandpassfiltern auf den SC und die Detektoren zur Erfassung des Fluorochrom-emittierten Lichtsignals umgeleitet. *Adaptiert aus <https://www.wikipedia.de/Durchflusszytometrie>⁷⁸.*

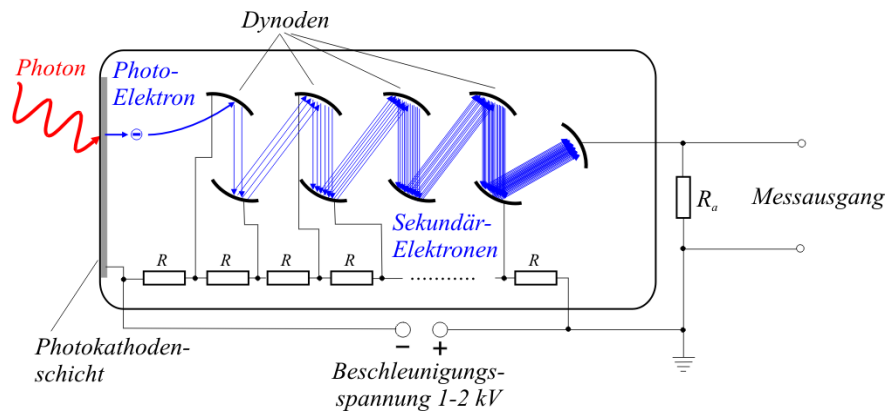


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Photoelektronenvervielfachers („Photomultiplier Tube“, PMT). Das einfallende Photon wird von einer Photokathodenschicht aufgenommen und mithilfe von Dynoden und Anlage einer Hochspannung von 1-2kV amplifiziert. Hierdurch entsteht eine Verstärkung des Signals, sodass der Lichtimpuls als elektrisches Signal gemessen und analysiert werden kann. Die Stärke des elektrischen Impulses ist proportional zur Lichtintensität des eintreffenden Photons. *Adaptiert aus <https://www.wikipedia.de/Photomultiplier>⁷⁹.*

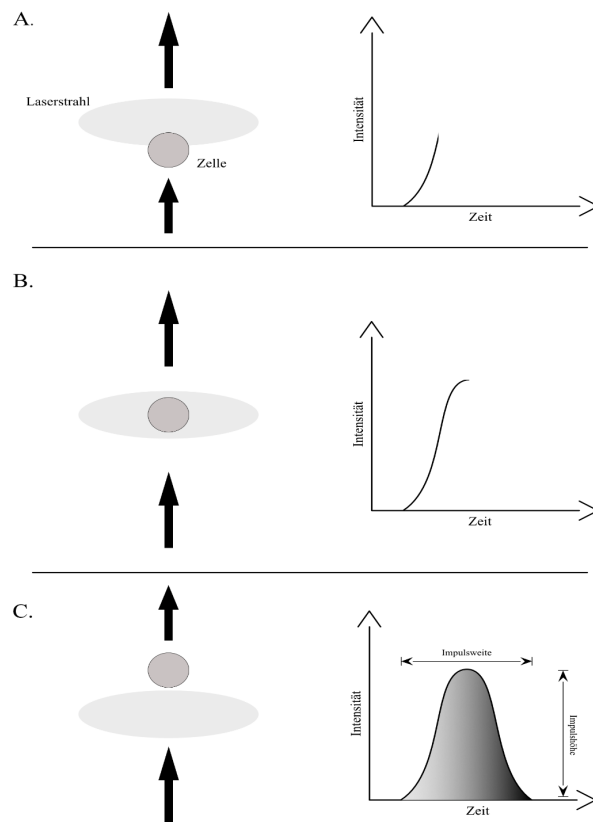


Abbildung 6: Bildung eines elektrischen Impulses. (A.) Beim Passieren des Lasers sendet das Antikörper-Fluorochrom-Konjugat einen Impuls aus. (B.) Die Lichtintensität ist hierbei proportional zur Höhe des elektrischen Impulses. (C.) Die Länge des Impulses ist proportional abhängig von der Länge des Lichtsignals. Anschließend kann die Fläche unter dem Impuls (Area-under-the-Curve) als gesamtes Fluoreszenzsignal berechnet und ausgewertet werden. *Adaptiert aus Cytomics FC 500 with CXP Software, Instructions for Use, Beckman Coulter, Juli 2016.*

Zur Darstellung der Messergebnisse in einem Koordinatensystem wird das Signal des FC und SC vorrangig auf einer linearen Achse abgebildet. Für Fluorochrom-emittierte Lichtsignale wird eine logarithmische Abbildung bevorzugt, da hier die Unterschiede zwischen kleinen Impulsen verstärkt zur Darstellung kommen; die Unterschiede zwischen den größeren Impulsen jedoch verringert wird. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, eine gemischte Einteilung der

Koordinatenachse („Logicle“) anzuwenden. Hier wird der niedrige Signalbereich linear und der höhere Signalbereich logarithmisch dargestellt.

2.2.3 *Spillover und Kompensation*

Bei Exzitation durch den Laser wird Licht in einem für das jeweilige Fluorochrom-spezifische Spektrum emittiert. Bei der Verwendung von mehreren Fluorochrom-konjugierten Antikörpern kommt es daher zu einer Überlappung der emittierten Spektren. Dies kann zu einer Verzerrung der Messergebnisse führen, da das gleiche Signal in mehreren Detektoren mit unterschiedlicher Intensität gemessen wird („Spillover“ oder Streustrahlung).

Zur Korrektur des Messfehlers wird für jeden Detektor das spezifische Antikörper-Konjugat allein in einem Versuchsansatz inkubiert und es wird sowohl das Negative als auch das positive Signal gemessen. Aus diesen Daten lässt sich eine Kompensations-Matrix berechnen, die den Messfehler korrigiert. Anschließend wird einem vollständig gefärbten Ansatz („Full Stain Control“) die Streustrahlung unter Kompensation erneut gemessen und bewertet. Zudem wird während eines Experiments die Kompensation regelmäßig überprüft, um eventuelle Messfehler zu vermeiden.

2.2.4 *Versuchsprotokoll*

Zunächst werden jeweils 5µl eines spezifischen Antikörpers (Single Color Conjugated Antibody, Fa. Beckman-Coulter; Tabelle 3) in insgesamt 7 Ansätzen zusammen pipettiert.

Für die Ansätze „B-Zellen“, „T Gedächtniszellen“, „CD8 T Zellen“, „T Zell-Aktivierung“, „Natürliche Killerzellen“ und „T Helferzellen“ (Tabelle 3) werden zunächst 50µl peripheres Blut hinzugegeben und der Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren, werden 500µl Ammoniumchloridlösung (Versalyse, Fa. Beckman Coulter) hinzugegeben. Zur Bestimmung der Gesamt-Zellzahl wird der Ansatz

„Natürliche Killerzellen“ mit 50µl Polystyrol-Mikrosphären (Stem-Count Fluorospheres, Fa. Beckman Coulter) versetzt. In der nachfolgenden Analyse werden anhand der Polystyrol-Mikrosphären die Konzentrationen der Lymphozyten-Subpopulationen bestimmt.

Die übrigen Ansätze werden anschließend mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 5 min. gewaschen, bei 360g und RT zentrifugiert und mit 200µl PBS resuspendiert.

Zur Messung der regulatorischen T-Zellen in Ansatz 7 (regulatorische T Zellen) werden zunächst 50µl peripheres Blut mit 5µl Fixationslösung (PerFix-nc, Fa. Beckman Coulter) für 15 min. bei RT inkubiert und anschließend mit 300µl Permeabilisationslösung, sowie mit spezifischen Antikörpern (Tabelle 3) für mindestens 60 min. bei RT inkubiert. Schließlich wird der Ansatz einmal mit PBS und einmal mit Fixationspuffer für jeweils 5 min. gewaschen, in 500µl PBS resuspendiert und der Messung zugeführt. Mithilfe der Polystyrol-Mikrosphären kann anschließend von den relativen Messwerten auf eine absolute Zellzahl geschlossen werden.

2.2.5 Lymphozyten-Subpopulationen

Die Bestimmung der Lymphozyten-Subpopulationen erfolgt immunphänotypisch anhand verschiedener Oberflächen-Antigene, sog. Cluster of Differentiation („CD“), welche mittels Fluorochrom-markierten Antikörpern gebunden und detektiert werden können. Hierbei handelt es sich meist um Proteine (meist Glykoproteine), welche teils Zellspezifisch von einzelnen Zellen exprimiert werden. Somit ist eine Einteilung anhand der Expression von CDs in die Lymphozyten-Subpopulationen möglich (Tabelle 2). Mittlerweile wurden über 300 verschiedene CDs identifiziert und beschrieben⁸⁰.

2.2.6 Gating-Strategie

Gating bezeichnet den Prozess der Auswahl von bestimmten Markerkonstellationen, welche die jeweilige Subpopulation definieren. Durch eine 2-dimensionale Darstellung mittels Dot-Plots können bestimmte Zellpopulationen ausgewählt und selektiert werden. Anschließend wird diese Subpopulation in einem weiteren Dot-Plot durch die Auswahl von weiteren Markern erneut unterteilt. Das Vorgehen und die Unterteilung im Experiment bezeichnet man als Gating-Strategie; diese ist in Abbildung 7 dargestellt.

B-Lymphozyten werden durch die Anwesenheit von CD19 definiert und weiterhin in naive B-Zellen (IgD⁺, CD27⁻), B memory (IgD⁺, CD27⁺), class-switched (IgD⁻, CD27⁺) und transitionale B-Zellen (CD24⁺, CD38⁺) eingeteilt.

T-Lymphozyten werden durch den Nachweis von CD3 definiert und weiterhin in CD4- und CD8-positive Zellpopulationen unterteilt. Diese werden weiter unterteilt in naive T-Zellen (CD62L⁺, CD45RA⁺), sowie T-Gedächtniszellen (CD4⁺, CD45RA⁻, CD45RO⁺; bzw. CD8⁺, CD45RA⁻, CD45RO⁺). Diese werden weiterhin unterteilt in central memory (CD62L⁺, CD45RA⁻), effector memory (CD62L⁻, CD45RA⁻), effector memory RA⁺ (EMRA) (CD62L⁻, CD45RA⁺), activated memory (HLA-DR⁺ oder CD69⁺), sowie in regulatorische T-Zellen (FoxP3⁺).

Zudem werden die CD4-positiven T-Helferzellen (Th) in Th1-Zellen (CD4⁺, CXCR3⁺, CCR4⁻, CCR5⁺, CCR6⁻), Th2-Zellen (CD4⁺, CXCR3⁻, CCR4⁺, CCR5⁻, CCR6⁻) und Th17-Zellen (CD4⁺, CXCR3⁻, CCR4⁺, CCR5⁻, CCR6⁺) unterteilt.

CD8-positive zytotoxische T-Zellen werden in early (CD28⁺, CD27⁺), intermediate (CD28⁻, CD27⁺), late (CD28⁻, CD27⁻), sowie exhausted (CD279⁺) und terminale Effektor-T-Zellen (CD279⁻, CD57⁺) eingeteilt. Natürliche Killer (NK) -ähnliche T-Zellen werden als CD56⁺ und CD3⁺ identifiziert.

NK-Zellen (CD56⁺) werden in insgesamt 3 Untergruppen eingeteilt: CD56⁺ CD16⁺ und CD56dim CD16bright, sowie CD56bright CD16dim⁸¹⁻⁸³.

Tabelle 2: Fluorochrom-konjugierte Antikörper. Zur Definition der einzelnen Lymphozyten – Zellpopulationen sind die verwendeten Antikörper mit ihren Eigenschaften aufgeführt. Neben Ziel-Antigen wird das konjugierte Fluorochrom, der Antikörper-Klon, der Antikörper-Isotyp, sowie die Artikelbeschreibung des Herstellers (Firma Beckman Coulter/ Firma Biolegend) angegeben.

Zellpopulation	Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Artikelnummer
B Zellen	IgD	FITC	IA6-2	IgG2a	B30652
	CD24	PE	ALB9	IgG1	IM1428U
B Zellen, T exhausted	CD27	ECD	1A4CD27	IgG1	B26603
B Zellen	CD38	PC5	LS198-4-3	IgG1	A07780
	CD19	PC7	J3-119	IgG1 Kappa	IM3628
T memory	CD62L	FITC	DREG56	IgG1	IM1231U
	CD45RO	PE	UCHL1	IgG2a	A07787
T memory, T regulatorisch	CD45RA	ECD	2H4LDH11LDB9	IgG1	IM2711U
T memory, T aktiviert, T regulatorisch	CD4	PC5	13B8.2	IgG1	A07752
	CD8	PC7	SFC121Thy2D3	IgG1	737661
T CD8 exhausted	CD57	FITC	NC1	IgM	B49188
	CD279	PE	PD1.3	IgG2b	B30634
	CD28	PC5	CD28.2	IgG1	6607108
T aktiviert	HLA-DR	FITC	Immu-357	IgG1	IM1638U
	CD69	PE	TP1.55.3	IgG2b	IM1943U
	FoxP3	PE	Ab259D	IgG1 Kappa	B46031
T/ NK- Zellen	CD56	PE	N901/ NK-1	IgG1	A07788
	CD16	ECD	3G8	IgG1	A33098
	CD19	PC5	J3-119	IgG1	A07771
	CD3	PC7	UCHT1	IgG1	737657
Th - Untergruppen	CD183 (CXCR3)	AF488	G025H7	IgG1	B68144
	CD194 (CCR4)	PE	L291H4	IgG1	359412
	CD195 (CCR5)	PE/ Dazzle 594	J418F1	IgG2b	359126
	CD196 (CCR6)	PC7	B-R35	IgG2a	B68132

Tabelle 3: Ansätze zur Identifikation von Lymphozyten-Subpopulationen. Bei einem 5-Farben-Laser am FC500-Durchflusszytometer wurden pro Blutprobe 7 verschiedene Ansätze hergestellt, um die verschiedenen Subpopulationen zu charakterisieren. Dargestellt sind die einzelnen Röhrchen, sowie die Belegung der einzelnen Detektoren des Durchflusszytometers durch die verwendeten monoklonalen Antikörper (Tabelle 2). AF 488 = AlexaFluor 488; FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat; PE = R Phycoerythrin; ECD = R Phycoerythrin-Texas Red; PC5 = R Phycoerythrincyanin 5.1; PC7 = R Phycoerythrincyanin 7.

Versuchsansätze						
Fluorochrom	AF488	FITC	PE	Dazzle 5 / ECD 610 nm / 613 nm	PC5	PC7
Ansatz	488 nm	519 nm	575 nm		670 nm	774 nm
B-Zellen		anti-IgD (B30652)	anti-CD24 (IM1428U)	anti-CD27 (B26603)	anti-CD38 (A07780)	anti-CD19 (IM3628)
T-memory		anti-CD62L (IM1231U)	anti- CD45RO (A07787)	anti-CD45RA (B49193)	anti-CD4 (A07752)	anti-CD8 (737661)
CD8 T-Zellen		anti-CD57 (B49188)	anti-CD279 (B30634)	anti-CD27 (B26603)	anti-CD28 (6607108)	anti-CD8 (737661)
T-Zell- Aktivierung		anti-HLA-DR (B96758)	anti-CD69 (IM1943U)		anti-CD4 (A07752)	anti-CD8 (737661)
NK-Zellen			anti-CD56 (A07788)	anti-CD16 (B49216)	anti-CD19 (A07771)	anti-CD3 (737657)
T-Helferzellen	anti-CD183 (B68144)		anti-CD194 (359412)	anti-CD195 (359126)	anti-CD4 (A07752)	anti-CD196 (B68132)
regulatorische T-Zellen	anti-CD25 (IM0478U)		anti-FOXP3 (B46031)	anti-CD45RA (IM2711U)	anti-CD4 (A07752)	anti-CD8 (737661)

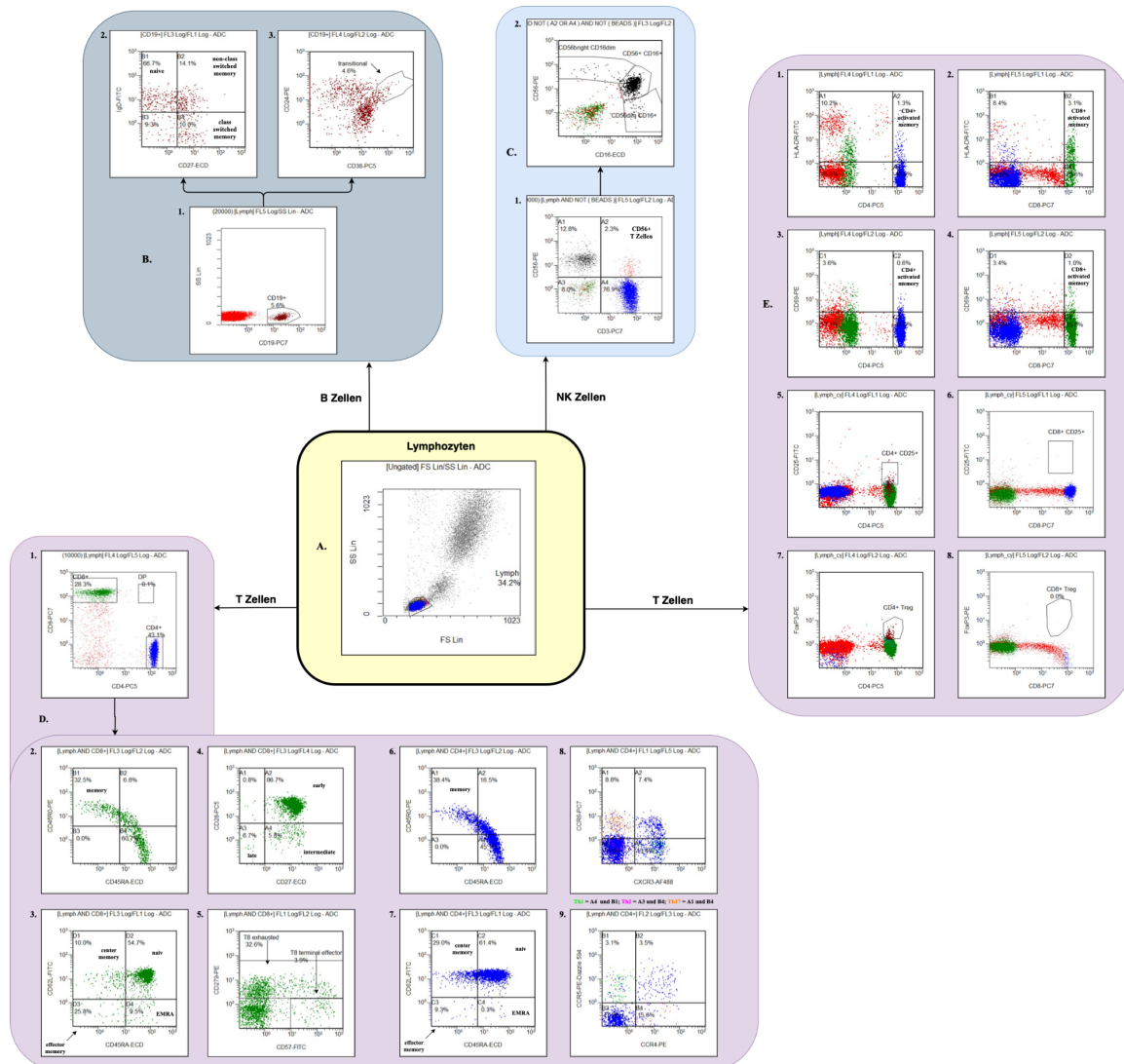


Abbildung 7: Gating-Strategie. (A.) Lymphozyten werden mit Hilfe von Vorwärtsstreuung („forward scatter“, FC) und Seitwärtsstreuung („side scatter“, SC) identifiziert. (B.) **B Zellen.** CD19-Positivität wird verwendet, um B-Zellen zu definieren (Diagramm 1), die weiter in naive (IgD+), class-switched Gedächtniszellen (CD27+), non class-switched Gedächtniszellen (IgD+ CD27+, Plot 2) und transitionale B-Zellen (CD24+ CD38+, Plot 3) unterteilt werden. (C.) **NK-Zellen.** Natürliche Killer-T-Zellen (NKT, CD3+ CD56+) werden zunächst identifiziert (Diagramm 1). Anschließend werden CD3-positive Zellen in 3 verschiedene Untergruppen von NK-Zellen eingeteilt (CD56+ CD16+, CD56bright CD56dim, CD56dim CD16bright, Diagramm 2). (D.) **T-Zellen** werden anhand ihrer CD4- oder CD8-Positivität identifiziert. Sowohl CD4+ als auch CD8+ Zellen wurden in Gedächtniszellen (CD45RA- CD45RO+) (Diagramme 1+6), naive Zellen (CD62L+ CD45RA+), zentrale Gedächtniszellen (CD62L+ CD45RA-), Effektor-Gedächtniszellen (CD62L- CD45RA-) und Effektor-Gedächtniszellen RA+ ("EMRA") (CD62L- CD45RA+) unterteilt (Diagramme 3+7). Zur Analyse der CD8+-Zellaktivität wurden die Zellen in frühe (CD27+ CD28+), intermediäre (CD27+ CD28-), späte (CD27- CD28-) (Diagramm 4) oder erschöpfte (CD279+) und terminale Effektorzellen (CD279- CD57+) unterteilt (Diagramm 5). CD4+ T-Helferzellen

wurden in Th1- (CXCR3+ CCR4- CCR5+ CCR6-), Th2- (CXCR3- CCR4+ CCR5- CCR6-) und Th17- (CXCR3- CCR4+ CCR5- CCR6+) Helfer-T Zellen eingeteilt (Diagramme 8+9). (E.) CD4+ und CD8+ Zellen wurden außerdem in aktivierte Gedächtniszellen (HLA-DR+ oder CD69+) (Diagramme 1-4) und regulatorische Zellen (CD25+ oder FoxP3+) (Diagramme 5-8) unterteilt⁸⁴.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Median-Werte mit Interquartilsabständen angegeben. Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Rangsummentest (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) angewendet; als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner 0,05 definiert. Die statistische Analyse wurde mit SPSS für Windows (IBM SPSS Statistics 24, Armonk, New York, USA) sowie R-Studio für Macintosh (R-Tools Technology Inc.; Richmond Hill, Ontario, Kanada) erhoben.

Bei Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung wurde der Verlauf der Erkrankung in Einklang mit den Klassifikationen der WHO in leicht, mittel oder schwer unterteilt⁸⁵. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte als uni- und multivariate Analyse mit Unterstützung von Dr. Stefan Schiele und Tim Tobias Arndt M. Sc. (Universität Augsburg, Institut für Mathematik).

Die Auswertung von erhobenen Daten der COVID-19 Rekonvaleszenten erfolgte nach einem Alters- und geschlechtsspezifischem Matching. Normalpersonen und Plasmaspender wurden zunächst verglichen und anschließend in 4 weitere Untergruppen eingeteilt: Plasmaspender gegen Kontrollgruppe, Plasmaspender mit Fieber gegen Kontrollgruppe, Plasmaspender ohne Fieber gegen Kontrollgruppe, sowie Plasmaspender mit Fieber gegen Plasmaspender ohne Fieber.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung

Es konnten 33 Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung in die Studie eingeschlossen werden. Die Patienten stellten sich zwischen April und Oktober 2020 in der Notaufnahme des Universitätsklinikums in Augsburg mit unterschiedlichen Symptomen vor (Tabelle 4). Das Alter der Probanden lag zwischen 17 und 94 Jahren (Median: 71 Jahre). 64% der Patienten (n = 21) waren männlich; 36% Patienten (n = 12) waren weiblich. Die Kontrollgruppe bestand aus 50 gesunden Blutspendern, welche vor dem Ausbruch von SARS-CoV-2 untersucht und gemessen wurden [Alter 18 – 81 Jahre (Median: 43 Jahre); $p = 1,46 \times 10^6$, 33 männliche (66%) und 17 weibliche Probanden (34%)].

Die häufigsten beobachteten Symptome reichten von Husten (55%), Atemnot (51%), Fieber (46%) und Myalgien (42%) bis hin zu Hals- (24%), Kopf- (15%), und Rückenschmerzen (12%). Weiterhin traten Diarrhoen (9%), Übelkeit (9%), kardiovaskuläre Symptome (9%), Geschmacksverlust (6%), Erbrechen (6%) sowie Brust- (6%) und Bauchschmerzen auf (3%) (Tabelle 4).

Die Patienten wurden darüber nach WHO-Schema bezüglich der Schwere der COVID-19 Erkrankung charakterisiert⁸⁵. Während bei 7 Patienten (21%) ein milder Krankheitsverlauf beobachtet wurde, konnte bei 4 (12%) eine Pneumonie diagnostiziert werden. 10 Patienten (30%) zeigten ferner Symptome einer schweren Pneumonie. 12 Patienten (36%) konnten dem Schweregrad eines ARDS zugeordnet werden. Hiervon mussten 8 Patienten (24%) maschinell beatmet werden. Insgesamt wurden 13 Patienten (39%) auf einer Intensivstation behandelt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Klinische Charakteristika der akuten COVID-19 Patienten.

Charakteristika	COVID-19 Patienten
Alter [Jahre]; Median (Bereich)	71 (17 - 94)
Geschlecht; n	
männlich	21 (64 %)
weiblich	12 (36 %)
Symptome während COVID-19; n	
Husten	18 (55 %)
Atemnot	17 (51 %)
Fieber (Körpertemperatur > 38°C)	15 (46 %)
Myalgie	14 (42 %)
Halsschmerz	8 (24 %)
Kopfschmerz	5 (15 %)
Rückenschmerz	4 (12 %)
Diarrhoe	3 (9 %)
Übelkeit	3 (9 %)
Kardiovaskuläre Symptome	3 (9 %)
Geschmacksverlust	2 (6 %)
Erbrechen	2 (6 %)
Brustschmerz	2 (6 %)
Bauchschmerz	1 (3 %)
COVID-19 Schweregrad (nach WHO); n	
Milde Erkrankung	7 (21 %)
Pneumonie	4 (12 %)
Schwere Pneumonie	10 (30 %)
ARDS	12 (36 %)
Behandlung auf einer Intensivstation; n	13 (39 %)
Invasive Beatmung; n	8 (24 %)

3.2 *Univariate Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen von Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung*

Sowohl bei COVID-19 Patienten mit *moderatem als auch mit schwerem Krankheitsverlauf* konnten erniedrigte Gesamt-Lymphozytenzahlen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe identifiziert werden (1120/ μ l und 730/ μ l vs. 1884/ μ l; $p=0,002$ und $p=0,001$; Abbildung 8). Bei Patienten mit schwerem Verlauf waren zudem die Anzahl der CD3- positiven Zellen (380/ μ l vs. 1175/ μ l; $p\leq 0,001$), der CD4- positiven Zellen mitsamt Untergruppen (209/ μ l vs. 782/ μ l; $p\leq 0,001$), sowie der CD8+ Zellen (112/ μ l vs. 292/ μ l) - mit Ausnahme der CD8+ terminal effector- und CD4+ EMRA- Zellen - vermindert (Tabelle 5). In der Gruppe der NK-Zellen (81/ μ l vs. 226/ μ l; $p\leq 0,01$) und B Zellen (71/ μ l vs. 211/ μ l; $p\leq 0,001$) mitsamt Untergruppen konnte ebenfalls eine Reduktion der Zellzahlen identifiziert werden (Abbildung 8). Eine Verminderung der Zellzahlen konnte auch bei Patienten mit moderatem COVID-19 Verlauf identifiziert werden, auch wenn in den T-Lymphozyten-Untergruppen der effector memory RA-positiven Zellen, sowie den Th1, Th2 Helferzellen, sowie den Interleukin-2-Rezeptor-positiven Zellen (IL2R+ das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde (Tabelle 5).

Des Weiteren wurde der Einfluss des Alters auf die Lymphozytenzahlen untersucht. Die Gesamt-Lymphozytenzahlen im Median reduzierten sich alle 10 Jahre um 12,5% (Abbildung 9A, Tabelle 6). Der altersabhängige Effekt konnte auch in CD3+ Zellen (-14,1% /10y, $p<0,001$), sowie CD8+ Zellen (-19,1% /10y, $p<0,001$; Abbildung 9B, Tabelle 6) und Untergruppen wie naive Zellen (-38,8% /10y, $p<0,001$; Abbildung 9C), memory Zellen (-19,6% /10y, $p<0,001$), central memory Zellen (-21,1% /10y, $p<0,001$), effector memory Zellen (-18,3% /10y, $p<0,001$), early (-29,5% /10y, $p<0,001$; Abbildung 9D, Tabelle 6), intermediate (-14,5% /10y, $p=0,002$) und exhausted CD8+ Zellen (-9,6% /10y, $p=0,015$) identifiziert werden. Auch bei den CD4- positiven Zellen (-14,8% /10y, $p<0,001$) und deren Untergruppen wie naive (-21,5% /10y, $p<0,001$), memory (-14,2% /10y, $p<0,001$), central memory (-16,0% /10y, $p<0,001$), effector memory (-13,0% /10y, $p=0,003$), regulatorische (-12,5% /10y, $p<0,001$) und IL2R+ CD4+ Zellen (-18,2% /10y, $p<0,001$) konnte ein signifikanter Unterschied gefunden werden. Auch die Analyse der NK Zellen (-13,6% /10y, $p<0,001$) und deren Untergruppen [CD56+ CD16+ (-13,4% /10y, $p<0,001$), CD56dim CD16bright (-17,8% /10y, $p<0,001$), CD56bright CD16dim (-19,0% /10y, $p<0,001$)] und B Zellen ((-14,4% /10y, $p<0,001$) mitsamt Untergruppen [naiv (-23,4% /10y, $p=0,001$), memory non-class switched (-24,0% /10y, $p=0,001$), memory class-switched (-10,8% /10y,

p=0,046), transitionale (-79,3% /10y, p<0,001)] B Zellen ergaben eine altersabhängige signifikante Reduktion der Zellzahlen (Tabelle 6).

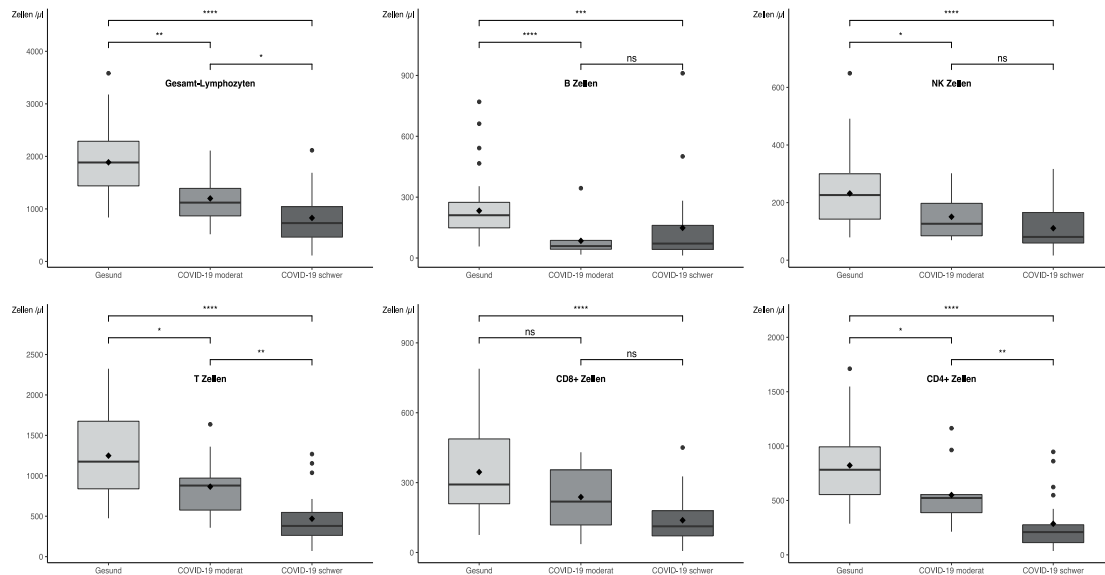


Abbildung 8: Gesamt-Lymphozyten und Hauptgruppen. Gesunde Probanden (hellgrau) mit Patienten mit moderatem (mittelgrau), sowie schwerem COVID-19 Verlauf (dunkelgrau). Schwarze Linie für Mittelwert; Schwarzer Punkt für Median. * ist $p < 0,05$; ** ist $p < 0,01$; *** ist $p < 0,001$; **** ist $p < 1 \times 10^{-4}$.

Tabelle 5: Lymphozyten- Untergruppen in Patienten mit moderatem und schwerem COVID-19 Verlauf. Zellzahlen sind als Median / μ l angegeben; Interquartilsabstand in Klammern. p1 ist gesund vs. COVID-19 moderat; p2 ist gesund vs. COVID-19 schwer; p3 ist COVID-19 moderat vs. COVID-19 schwer. $p < 0,05$.

	Gesunde Kontrollgruppe Zellzahl als Median (Interquartilsabstan (n=50)	moderater COVID- 19 Verlauf Zellzahl als Median (Interquartilsabstand) (n=11)		schwerer COVID- 19 Verlauf Zellzahl als Median (Interquartilsabstan (n=22)	p₁	p₂	p₃
Gesamt-Lymphozyten	1884 (1439 –	1120 (867 – 1390)	.002	730 (463 – 1043)		.000	.040
CD3+ Zellen	1175 (839 – 1675)	879 (576 – 971)	.017	380 (263 – 547)		.000	.003
CD8+ Zellen	292 (209 – 488)	219 (118 – 354)	.058	112 (71 – 179)		.000	.053
Naiv	78 (44 – 138)	27 (20 – 124)	.298	15 (7 – 35)		.000	.032
Memory	124 (65 – 164)	55 (48 – 86)	.017	24 (17 – 66)		.000	.123
CM	35 (14 – 56)	16 (8 – 33)	.163	8 (6 – 19)		.002	.204
EM	94 (56 – 139)	54 (30 – 62)	.017	21 (14 – 49)		.000	.178
EMRA	51 (23 – 119)	24 (17 – 132)	.528	45 (19 – 80)		.374	.749
Early	180 (154 – 291)	92 (55 – 152)	.008	35 (19 – 54)		.000	.004
Intermediate	21 (13 – 34)	7 (4 – 26)	.050	8 (5 – 14)		.000	.778
Late	51 (28 – 124)	27 (16 – 77)	.159	58 (23 – 110)		.816	.396
Exhausted	86 (59 – 133)	53 (43 – 94)	.196	36 (19 – 62)		.000	.044
terminal	24 (13 – 95)	16 (9 – 70)	.431	24 (11 – 52)		.494	.985
Regulatorisch	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	.616	0 (0 – 0)		.022	.336
IL2R+	1 (0 – 1)	0 (0 – 0)	.019	0 (0 – 0)		.004	.462
CD4+ Zellen	782 (554 – 993)	523 (388 – 554)	.016	209 (113 – 277)		.000	.003
Naiv	311 (191 – 411)	174 (142 – 318)	.098	53 (29 – 110)		.000	.002
Memory	430 (323 – 608)	270 (168 – 402)	.018	123 (77 – 184)		.000	.017
CM	272 (159 – 406)	154 (116 – 304)	.149	81 (50 – 135)		.000	.040
EM	147 (94 – 235)	91 (53 – 111)	.005	39 (21 – 59)		.000	.008
EMRA	4 (1 – 31)	4 (2 – 19)	.688	2 (1 – 5)		.107	.105
Th1	27 (15 – 59)	28 (15 – 35)	.632	8 (4 – 20)		.000	.069
Th2	45 (30 – 69)	34 (27 – 43)	.124	14 (10 – 27)		.000	.063
Th17	60 (35 – 81)	31 (29 – 37)	.013	17 (10 – 36)		.000	.029
Regulatorisch	43 (29 – 63)	24 (20 – 29)	.008	12 (9 – 21)		.000	.026
IL2R+	17 (9 – 21)	10 (7 – 14)	.052	6 (3 – 9)		.000	.063
CD3+ CD56+ Zeller	45 (18 – 77)	47 (15 – 85)	.903	29 (8 – 49)		.035	.191
NK-Zellen	226 (143 – 300)	127 (85 – 197)	.017	81 (60 – 166)		.000	.097
CD56+ CD16+	193 (114 – 270)	102 (76 – 173)	.021	68 (51 – 130)		.000	.097
CD56dim	15 (11 – 20)	10 (5 – 13)	.013	4 (3 – 12)		.001	.281
CD56bright	15 (10 – 19)	8 (6 – 12)	.009	4 (2 – 7)		.000	.003

	Gesunde Kontrollgruppe	moderater COVID- 19 Verlauf		schwerer COVID- 19 Verlauf		
	Zellzahl als Median (Interquartilsabstan (n=50)	Zellzahl als Median (Interquartilsabstand) (n=11)	p₁	Zellzahl als Median (Interquartilsabstan (n=22)	p₂	p₃
B Zellen	211 (149 – 274)	59 (43 – 87)	.000	71 (42 – 161)	.000	.418
Naiv	129 (92 – 171)	29 (16 – 50)	.000	33 (20 – 71)	.000	.585
non-class switch	8 (5 – 13)	1 (1 – 2)	.000	1 (1 – 2)	.000	.985
class switch	25 (14 – 43)	9 (5 – 11)	.000	6 (5 – 11)	.000	.985
Transitional	10 (6 – 17)	3 (1 – 6)	.003	2 (1 – 4)	.000	.749

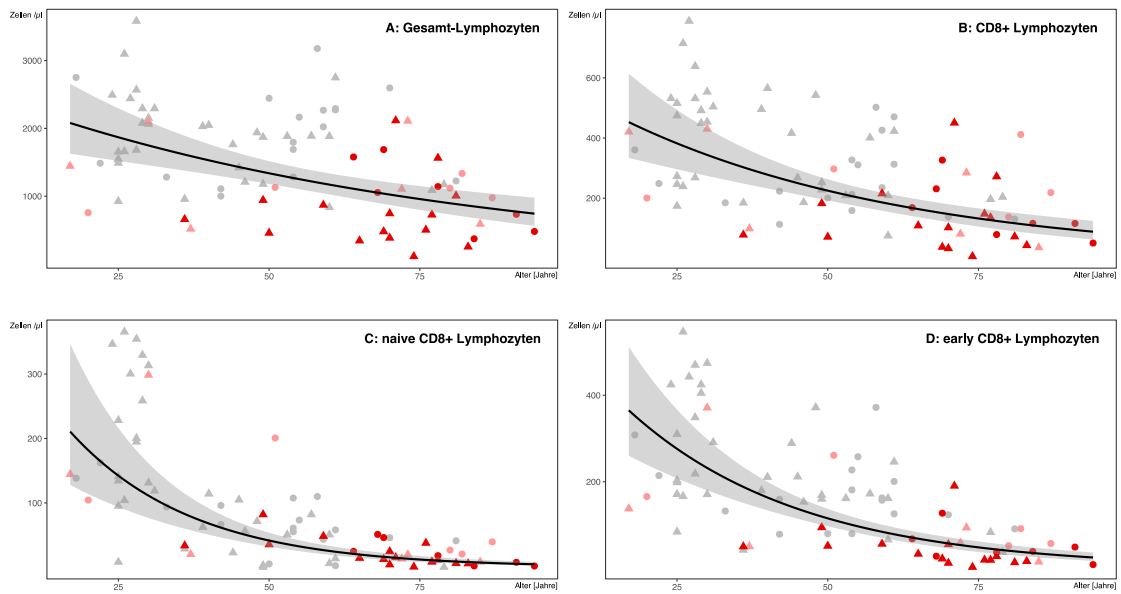


Abbildung 9: Altersabhängige Verteilung von Lymphozyten-Zellzahlen in Abhängigkeit vom Lebensalter (schwarze Linie, 95% - Konfidenzintervall in grau). Dargestellt sind die Gesamt-Lymphozytenzahlen (A), die CD8- positiven Lymphozyten (B) und die Untergruppen der naiven CD8+ und early CD8+ Lymphozyten (C und D). Die gesunden Kontrollpersonen sind in grau dargestellt; Patienten mit moderatem COVID-19 Verlauf in hellrot und Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf in dunkelrot. Dreiecke kennzeichnen das Männliche-, Kreise das weibliche Geschlecht.

Tabelle 6: Lymphozyten-Zellzahlen und -Untergruppen der Gesamt-Kohorte mit COVID-19 Patienten und der gesunden Kontrollgruppe (n=83). Zellzahlen sind im Median / μ l dargestellt. Die relative Veränderung der Zellzahlen ist mitsamt p Wert pro 10 Jahre (/10y) angegeben.

	Zellzahl als Median / μ l (Interquartilsabstand)	Relative Zellzahl-Veränderung pro 10 Jahre	p Wert
Gesamt-Lymphozyten	1490 (968 - 2071)	-12.5%	< .001
CD3+ Zellen	961 (529 - 1354)	-14.1%	< .001
CD8+ Zellen	231 (138 - 422)	-19.1%	< .001
naiv	49.6 (14 - 109)	-38.8%	< .001
memory	83 (39 - 143)	-19.6%	< .001
CM	21 (7 - 44)	-21.1%	< .001
EM	65 (29 - 120)	-18.3%	< .001
EMRA	49 (21 - 108)	+3.5%	.541
early	153 (54 - 213)	-29.5%	< .001
intermediate	15 (7 - 28)	-14.5%	.002
late	47 (24 - 121)	-4.0%	.49
exhausted	65 (40 - 114)	-9.6%	.015*
terminal effector	23 (11 - 79)	-7.0%	.286
regulatorisch	0.3 (0.1 - 0.6)	-13.3%	.109
IL2R+	0.4 (0.2 - 0.8)	27.6%	.0956
CD4+ Zellen	574 (320 - 937)	-14.8%	< .001
naiv	221 (114 - 372)	-21.5%	< .001
memory	338 (168 - 537)	-14.2%	< .001
CM	219 (92 - 344)	-16.0%	< .001
EM	98 (53 - 181)	-13.0%	.003
EMRA	3 (1 - 19)	-12.9%	.215
Th1	21 (11 - 44)	-6.1%	.326
Th2	34.0 (19 - 52)	-5.1%	.439
Th17	38.8 (24 - 72)	-11.0%	.064
regulatorisch	30 (20 - 52)	-12.5%	< .001
IL2R+	11 (6 - 19)	-18.2%	< .001
CD3+ CD56+ Zellen	34 (17 - 67)	-3.5%	.549
NK-Zellen	171 (93 - 269)	-13.6%	< .001
CD56+ CD16+	137 (80 - 240)	-13.4%	< .001
CD56dim CD16bright	13 (7 - 19)	-17.8%	< .001
CD56bright CD16dim	11 (6 - 17)	-19.0%	< .001
B Zellen	166 (76 - 238)	-14.4%	< .001
naiv	93 (38 - 149)	-23.4%	0.001
memory non-class switch	5 (1 - 10)	-24.0%	0.001
memory class switch	15 (7 - 33)	-10.8%	.046
transitional	6 (3 - 11)	-79.3%	< 0.001

3.3 Multivariate Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen von Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung

Die multivariate Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen von Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung wurde in Kooperation mit Dr. Stefan Schiele und Tim Tobias Arndt M. Sc. vom Institut für Mathematik der Universität in Augsburg durchgeführt.

Um den jeweiligen Einfluss eines moderaten und schweren COVID-19 Verlaufs, sowie Geschlecht und Alter auf die Lymphozytenzahlen im peripheren Blut zu untersuchen, wurde ein lineares Regressionsmodell für die Zellzahlen verwendet. Die Ergebnisse sind in einem multivariaten Modell zusammengefasst (Angabe in multiplikativen Faktoren [=Koeffizient B], logarithmierter Skala; Abbildung 10, Tabelle 7).

Die *Gesamt-Lymphozytenzahlen* zeigten sich sowohl bei Patienten mit moderatem (kB: 0,640; p=0,08) als auch mit schwerem COVID-19 Verlauf (kB:0,427; p<0,001) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erniedrigt, während sich für Alter und Geschlecht kein signifikanter Einfluss identifizieren ließ.

Die Gesamtzahl der *CD3-positiven T Zellen* war in Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf erniedrigt (kB:0,395; p<0,001) und bei weiblichen Patientinnen erhöht (kB:1,291; p=0,033).

Die Anzahl der *CD8- positiven Zellen* war bei Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf erniedrigt (kB:0,472; p=0,001). Des Weiteren zeigte sich eine Reduktion der Zellzahlen mit steigendem Lebensalter (kB:0,876; p=0,004). Bei den Untergruppen zeigten sich insbesondere die Anzahl der CD8+ memory (kB:0,395; p=0,003), effector memory (kB:0,394; p=0,003), early (kB:0,320; p<0,001), intermediate (kB:0,480; p=0,010), exhausted (kB: 0,429; p<0,001) und IL2R+ - Zellen (kB:0,380; p=0,002) reduziert. Ein altersabhängiger, reduzierender Einfluss konnte zusätzlich bei den CD8+ early Zellen (kB: 0,793; p<0,001) identifiziert werden. Bei Patienten mit moderatem COVID-19 Verlauf zeigte sich lediglich eine signifikante Reduktion der Zellzahlen für die Untergruppen der intermediate (kB:0,427; p=0,007) und Interleukin-2-Rezeptor-positiven Zellen (kB:0,411; P=0,014). Für die Anzahl der naiven CD8-positiven Zellen konnte kein COVID-19 – abhängiger Einfluss gezeigt werden; es zeigte sich lediglich eine signifikante Reduktion der Zellzahlen mit steigendem Lebensalter (kB:0,584; p<0,001), sowie erhöhte Zellzahlen bei Probandinnen (kB:1,773; p=0,044). Das Lebensalter hatte zudem einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der central memory CD8-positiven Zellen (kB:0,809;

p=0,011). Für die übrigen Lymphozyten-Subpopulationen konnte kein signifikanter Unterschied identifiziert werden (Tabelle 7).

Die Analyse der *CD4-positiven THelferzellen* zeigte eine Reduktion bei Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf (kB: 0,320; p<0,001) und erhöhte Zellzahlen bei weiblichen Patientinnen (kB:1,363; p=0,027) im Vergleich zu männlichen Patienten. Zusätzlich waren die Subgruppen der naiven (kB: 0,278; p<0,001), memory (kB:0,326; p<0,001), central memory (kB:0,477; p=0,004), effector memory (kB:0,222; p<0,001), EMRA (kB: 0,165; p=0,002), sowie der Helferzellen Typ 1 (kB:0,223; p<0,001), Typ 2 (kB:0,260; p<0,001), Typ 17 (kB:0,336; p<0,001), der IL2R+ (kB:0,540; p=0,006) und der regulatorischen Zellen (0,346; p<0,001) bei schwerem COVID-19 Verlauf signifikant erniedrigt. Bei Patienten mit moderatem COVID-19 Verlauf konnten signifikante Verminderungen der Zellzahlen bei CD4-positiven memory (kB: 0,624; p=0,036), effector memory (kB:0,492; p=0,004), Typ 2 Helferzellen (kB:0,433; p=0,003) und regulatorischen Zellen (kB:0,165; p=0,002) identifiziert werden. Zudem zeigten sich naive CD4+ Zellzahlen (kB:1,647; p=0,012) bei weiblichem Geschlecht erhöht. Für das steigende Lebensalter konnte ein vermindernder Einfluss auf naive (kB:0,882; p=0,020), central memory (kB:0,899; p=0,049), sowie IL2R+ (kB:0,873; p=0,004) Zellzahlen identifiziert werden. Steigende Zellzahlen in Abhängigkeit zum Lebensalter konnten hingegen für die Subgruppen der EMRA (kB:1,404; p=0,005) und Typ2 Helferzellen (kB:1,111; p=0,049) ausgemacht werden.

Die Untergruppe der *CD3+/CD56+ NKT-Zellen* war unabhängig von Alter und Geschlecht in Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf vermindert (kB:0,431; p=0,020).

Die Gesamtzahl der *B Zellen* war sowohl in Patienten mit moderatem (kB:0,335; p<0,001), als auch mit schwerem COVID-19 Verlauf (kB:0,503; p=0,004) vermindert. Bei Betrachtung der B-Zell-Subpopulationen zeigte sich sowohl bei Patienten mit moderatem Krankheitsverlauf [naiv (kB:0,219; p<0,001), non-class switched memory (kB:0,202; p<0,001), class switched memory (kB:0,272; p<0,001), transitionale (kB:0,388; p=0,002)], als auch bei Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf [naiv (kB:0,380; p=0,005), non-class switched memory (kB:0,279; p<0,001), class switched memory (kB:0,256; p<0,001), transitionale (kB:0,862; p=0,020)] eine signifikante Reduktion der Zellzahlen. Überdies zeigte sich eine altersabhängige Reduktion der Zellzahlen von naiven (kB:0,219; p<0,001), non-class switched memory (kB:0,202; p<0,001), class switched memory (kB:0,272; p<0,001) und transitionalen (kB:0,862; p=0,020) B Zellen.

Die Analyse der *NK- Zellen* und ihren Subgruppen ergab bei Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf eine Reduktion der Zellzahlen der Gesamt- NK-Zellzahl (kB:0,499; p<0,001), sowie deren Subgruppen CD56+/CD16+ (kB:0,480; p<0,001), CD56bright/CD16dim (kB:0,344; p=0,014), und CD56dim/CD16bright (kB:0,515; p=0,014). Ferner ergab sich ein negativer

Einfluss des Lebensalters auf die Zellzahlen von CD56bright/ CD16dim (kB:0,902; p=0,008) und CD56dim/ CD16bright (kB:0,873; p=0,018) – Untergruppen.

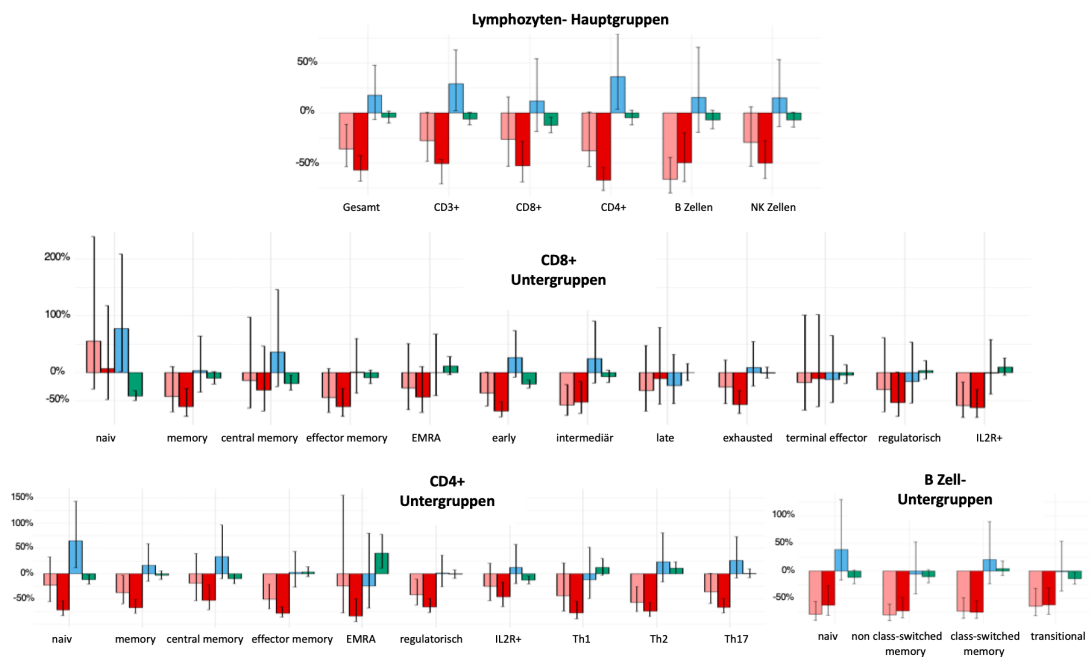


Abbildung 10: Geschätzter Einfluss eines moderaten/ schweren COVID-19 Verlaufs (hellrot/ rot), sowie Geschlecht (blau) und Alter (grün) auf die Lymphozytenzahlen in der multivariaten Analyse. Angegeben ist die relative Abweichung von der gesunden Kontrollgruppe. Blaue Balken zeigen der Einfluss des weiblichen Geschlechts. Das Alter ist in prozentualer Abweichung pro 10 Jahre angegeben. Schwarze Balken zeigen das 95%-Konfidenzintervall.

Tabelle 7: Relativer Einfluss eines moderaten/ schweren COVID-19 Verlaufs, sowie Alter und Geschlecht auf die Lymphozytenzahlen (= Koeffizient B [kB]). Der Einfluss des weiblichen Geschlechts ist im Vergleich zum männlichen Geschlecht angegeben. Der Einfluss des steigenden Lebensalters ist pro 10 Jahre angegeben.

	Variablen	Koeffizienten B (95% CI)	p-Wert
Gesamt-Lymphozyten	moderater COVID-19 Verlauf	0.640 (0.463 – 0.885)	0.008
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.427 (0.318 – 0.574)	0.000
	Geschlecht	1.176 (0.935 – 1.478)	0.163
	Alter (/10 Jahre)	0.958 (0.899 – 1.020)	0.174
T Zellen (CD3+)	moderater COVID-19 Verlauf	0.723 (0.519 – 1.006)	0.054
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.395 (0.292 – 0.534)	0.000
	Geschlecht	1.291 (1.022 – 1.632)	0.033
	Alter (/10 Jahre)	0.941 (0.883 – 1.004)	0.064
Zytotoxische T Zellen (CD8+)	moderater COVID-19 Verlauf	0.738 (0.470 – 1.160)	0.185
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.472 (0.312 – 0.714)	0.001
	Geschlecht	1.121 (0.814 – 1.544)	0.478
	Alter (/10 Jahre)	0.876 (0.803 – 0.957)	0.004
CD8+ naiv	moderater COVID-19 Verlauf	1.553 (0.709 – 3.401)	0.267
	schwerer COVID-19 Verlauf	1.066 (0.520 – 2.182)	0.860
	Geschlecht	1.773 (1.016 – 3.095)	0.044
	Alter (/10 Jahre)	0.584 (0.502 – 0.680)	0.000
CD8+ memory	moderater COVID-19 Verlauf	0.574 (0.299 – 1.102)	0.094
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.395 (0.218 – 0.717)	0.003
	Geschlecht	1.036 (0.653 – 1.642)	0.880
	Alter (/10 Jahre)	0.896 (0.790 – 1.017)	0.088
CD8+ CM	moderater COVID-19 Verlauf	0.858 (0.373 – 1.977)	0.716
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.684 (0.319 – 1.977)	0.325
	Geschlecht	1.363 (0.753 – 2.466)	0.302
	Alter (/10 Jahre)	0.809 (0.689 – 0.951)	0.011
CD8+ EM	moderater COVID-19 Verlauf	0.557 (0.290 – 1.070)	0.078
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.394 (0.217 – 0.715)	0.003
	Geschlecht	1.007 (0.633 – 1.602)	0.977
	Alter (/10 Jahre)	0.913 (0.805 – 1.037)	0.158
CD8+ EMRA	moderater COVID-19 Verlauf	0.723 (0.347 – 1.509)	0.384
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.561 (0.286 – 1.099)	0.091
	Geschlecht	1.996 (0.591 – 1.680)	0.989
	Alter (/10 Jahre)	1.109 (0.961 – 1.278)	0.154
CD8+ early	moderater COVID-19 Verlauf	0.639 (0.406 – 1.005)	0.053
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.320 (0.212 – 0.484)	0.000
	Geschlecht	1.265 (0.918 – 1.743)	0.148
	Alter (/10 Jahre)	0.793 (0.726 – 0.866)	0.000
CD8+ intermediate	moderater COVID-19 Verlauf	0.427 (0.233 – 0.783)	0.007
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.480 (0.276 – 0.834)	0.010
	Geschlecht	1.243 (0.810 – 1.907)	0.315
	Alter (/10 Jahre)	0.926 (0.824 – 1.042)	0.199

	Variablen	Koeffizienten B (95% CI)	p-Wert
CD8+ late	moderater COVID-19 Verlauf	0.683 (0.317 – 1.470)	0.325
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.889 (0.441 – 1.792)	0.740
	Geschlecht	0.766 (0.445 – 1.317)	0.331
	Alter (/10 Jahre)	0.994 (0.857 – 1.154)	0.937
CD8+ exhausted	moderater COVID-19 Verlauf	0.740 (0.448 – 1.221)	0.235
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.429 (0.271 – 0.678)	0.000
	Geschlecht	1.081 (0.758 – 1.541)	0.664
	Alter (/10 Jahre)	0.991 (0.899 – 1.093)	0.856
CD8+ terminal effector	moderater COVID-19 Verlauf	0.821 (0.335 – 2.015)	0.683
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.892 (0.393 – 2.026)	0.783
	Geschlecht	0.873 (0.463 – 1.647)	0.672
	Alter (/10 Jahre)	0.952 (0.800 – 1.134)	0.578
CD8+ IL2R+	moderater COVID-19 Verlauf	0.411 (0.203 – 0.830)	0.014
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.380 (0.206 – 0.701)	0.002
	Geschlecht	0.895 (0.613 – 1.581)	0.949
	Alter (/10 Jahre)	1.090 (0.951 – 1.250)	0.212
CD8+ FoxP3+	moderater COVID-19 Verlauf	0.693 (0.297 – 1.617)	0.391
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.467 (0.216 – 1.007)	0.052
	Geschlecht	0.835 (0.455 – 1.533)	0.556
	Alter (/10 Jahre)	1.033 (0.882 – 1.208)	0.685
T Helfer-Zellen (CD4+)	moderater COVID-19 Verlauf	0.686 (0.466 – 1.011)	0.057
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.320 (0.225 – 0.457)	0.000
	Geschlecht	1.363 (1.036 – 1.793)	0.027
	Alter (/10 Jahre)	0.952 (0.883 – 1.027)	0.202
CD4+ naiv	moderater COVID-19 Verlauf	0.772 (0.448 – 1.330)	0.346
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.278 (0.169 – 0.457)	0.000
	Geschlecht	1.647 (1.119 – 2.425)	0.012
	Alter (/10 Jahre)	0.882 (0.793 – 0.980)	0.020
CD4+ memory	moderater COVID-19 Verlauf	0.624 (0.402 – 0.970)	0.036
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.326 (0.218 – 0.487)	0.000
	Geschlecht	1.165 (0.853 – 1.591)	0.331
	Alter (/10 Jahre)	0.968 (0.889 – 1.055)	0.458
CD4+ CM	moderater COVID-19 Verlauf	0.812 (0.470 – 1.401)	0.449
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.477 (0.290 – 0.786)	0.004
	Geschlecht	1.334 (0.905 – 1.967)	0.143
	Alter (/10 Jahre)	0.899 (0.809 – 1.000)	0.049
CD4+ EM	moderater COVID-19 Verlauf	0.492 (0.307 – 0.790)	0.004
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.222 (0.144 – 0.342)	0.000
	Geschlecht	1.029 (0.735 – 1.440)	0.866
	Alter (/10 Jahre)	1.036 (0.945 – 1.136)	0.443
CD4+ EMRA	moderater COVID-19 Verlauf	0.757 (0.225 – 2.553)	0.650
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.165 (0.054 – 0.501)	0.002
	Geschlecht	0.759 (0.320 – 1.800)	0.527
	Alter (/10 Jahre)	1.404 (1.110 – 1.777)	0.005
	moderater COVID-19 Verlauf	0.562 (0.260 – 1.215)	0.141

	Variablen	Koeffizienten B (95% CI)	p-Wert
Typ 1-Helferzellen	schwerer COVID-19 Verlauf	0.223 (0.110 – 0.451)	0.000
	Geschlecht	0.883 (0.512 – 1.523)	0.652
	Alter (/10 Jahre)	1.124 (0.968 – 1.305)	0.124
Typ 2-Helferzellen	moderater COVID-19 Verlauf	0.433 (0.252 – 0.743)	0.003
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.260 (0.158 – 0.427)	0.000
	Geschlecht	1.234 (0.841 – 1.809)	0.278
	Alter (/10 Jahre)	1.111 (1.000 – 1.235)	0.049
Typ17-Helferzellen	moderater COVID-19 Verlauf	0.643 (0.411 – 1.008)	0.054
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.336 (0.223 – 0.508)	0.000
	Geschlecht	1.260 (0.916 – 1.732)	0.153
	Alter (/10 Jahre)	1.006 (0.922 – 1.098)	0.896
CD4+ IL2R+	moderater COVID-19 Verlauf	0.749 (0.465 – 1.207)	0.231
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.540 (0.349 – 0.836)	0.006
	Geschlecht	1.125 (0.803 – 1.577)	0.489
	Alter (/10 Jahre)	0.873 (0.796 – 0.957)	0.004
CD4+ FoxP3+	moderater COVID-19 Verlauf	0.584 (0.381 – 0.896)	0.014
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.346 (0.234 – 0.512)	0.000
	Geschlecht	1.010 (0.746 – 1.367)	0.947
	Alter (/10 Jahre)	0.989 (0.911 – 1.075)	0.798
CD3+ CD56+	moderater COVID-19 Verlauf	0.852 (0.394 – 1.839)	0.679
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.431 (0.213 – 0.871)	0.020
	Geschlecht	1.032 (0.598 – 1.778)	0.910
	Alter (/10 Jahre)	1.058 (0.911 – 1.229)	0.454
B Zellen (CD19+)	moderater COVID-19 Verlauf	0.335 (0.201 – 0.556)	0.000
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.503 (0.316 – 0.801)	0.004
	Geschlecht	1.156 (0.807 – 1.657)	0.425
	Alter (/10 Jahre)	0.930 (0.842 – 1.026)	0.147
Naive B Zellen	moderater COVID-19 Verlauf	0.219 (0.107 – 0.446)	0.000
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.380 (0.197 – 0.734)	0.005
	Geschlecht	1.386 (0.836 – 2.300)	0.203
	Alter (/10 Jahre)	0.886 (0.772 – 1.018)	0.087
Non-class switched memory	moderater COVID-19 Verlauf	0.202 (0.102 – 0.397)	0.000
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.279 (0.150 – 0.518)	0.000
	Geschlecht	0.945 (0.585 – 1.526)	0.815
	Alter (/10 Jahre)	0.898 (0.788 – 1.025)	0.109
B Zellen Class switched memory B Zellen	moderater COVID-19 Verlauf	0.272 (0.144 – 0.513)	0.000
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.256 (0.143 – 0.458)	0.000
	Geschlecht	1.205 (0.768 – 1.891)	0.411
	Alter (/10 Jahre)	1.044 (0.923 – 1.181)	0.491
Transitionale B Zellen	moderater COVID-19 Verlauf	0.364 (0.193 – 0.684)	0.002
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.388 (0.218 – 0.691)	0.002
	Geschlecht	0.987 (0.633 – 1.539)	0.953
	Alter (/10 Jahre)	0.862 (0.761 – 0.976)	0.020
NK-Zellen	moderater COVID-19 Verlauf	0.707 (0.470 – 1.062)	0.094
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.499 (0.344 – 0.723)	0.000

	Variablen	Koeffizienten B (95% CI)	p-Wert
	Geschlecht	1.151 (0.863 – 1.535)	0.334
	Alter (/10 Jahre)	0.929 (0.859 – 1.006)	0.068
CD56+ CD16+	moderater COVID-19 Verlauf	0.696 (0.452 – 1.074)	0.100
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.480 (0.323 – 0.713)	0.000
	Geschlecht	1.079 (0.794 – 1.465)	0.623
	Alter (/10 Jahre)	0.940 (0.864 – 1.022)	0.146
CD56bright CD16dim	moderater COVID-19 Verlauf	0.690 (0.467 – 1.021)	0.063
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.344 (0.241 – 0.493)	0.000
	Geschlecht	1.280 (0.970 – 1.688)	0.080
	Alter (/10 Jahre)	0.902 (0.836 – 0.973)	0.008
CD56dim CD16bright	moderater COVID-19 Verlauf	0.686 (0.386 – 1.220)	0.196
	schwerer COVID-19 Verlauf	0.515 (0.304 – 0.870)	0.014
	Geschlecht	1.346 (0.896 – 2.021)	0.150
	Alter (/10 Jahre)	0.873 (0.781 – 0.976)	0.018

3.4 Charakterisierung von COVID-19 Rekonvaleszenten

Es konnten insgesamt 44 Plasmaspender sowie 44 gesunde Kontrollpersonen im Alter zwischen 18 und 61 Jahren in die Studie eingeschlossen werden. Die Gruppe der Plasmaspender bestand aus 13 Frauen (30%) und 31 Männern (71%). In der altersgematchten Kontrollgruppe befanden sich 16 Frauen (36%) und 28 Männer (64%) (Altersmedian 43 vs. 40 Jahre, $p = 0,93$; n.s.).

Alle Blutentnahmen bei den COVID-19 – Rekonvaleszenten erfolgten zwischen dem 20.04.2020 und dem 28.04.2020. Die positiven COVID-19 Testergebnisse der Rekonvaleszenten lagen vor und wurden zwischen dem 03.03.2020 und dem 01.04.2020 erhoben. Die ersten Symptome traten bei den Probanden zwischen dem 01.03.2020 und dem 25.03.2020 auf; das Ende der Symptomatik lag zwischen dem 08.03.2020 und dem 08.04.2020. Die Symptombdauer variierte zwischen 1 und 26 Tagen. Die Blutentnahme und die Erhebung des zellulären Immunstatus erfolgten 13 bis 45 Tage nach Ende der Symptomatik.

Bei allen eingeschlossenen COVID-19 Rekonvaleszenten konnte ein milder COVID-19 Erkrankungsverlauf beobachtet werden (definiert nach WHO als Erkrankung ohne Bedarf an zusätzlicher Sauerstoff-Applikation). Während der akuten COVID-19 Erkrankung konnten bis zu 3 verschiedene Symptome gleichzeitig identifiziert werden. Hierzu gehörten Fieber (Körpertemperatur $>38,0^{\circ}\text{C}$) (27; 61%), Husten (17; 39%), Abgeschlagenheit (2), Myalgien (19; 43%), Kopfschmerzen (9; 21%), Atemnot (3; 7%), Diarrhoen (2; 5%), Halsschmerzen (6; 14%), Rückenschmerzen (6; 14%), sowie Geschmacksverlust (4; 9%). Bei einem Patienten wurde radiologisch eine Pneumonie diagnostiziert. Sechs Patienten litten weiterhin unter medikamentenpflichtigen Vorerkrankungen. Bei jedem Patienten wurde zum Testzeitpunkt ein Blutserum-Antikörpertest auf SARS-CoV-2 spezifische IgG- und IgA- Antikörper durchgeführt. Bei jedem der Probanden konnten Covid-19 Antikörper nachgewiesen werden; bei einem Patienten ließen sich jedoch nur IgA – Antikörper nachweisen. Die Konzentrationen (Ratio) reichten bei IgG- Antikörpern von 0 - 8,73 (Median 3,32) und bei IgA- Antikörpern von 0,39 - 9,72 (Median 4,0; Tabelle 8).

Tabelle 8: Charakterisierung der COVID-19 Rekonvaleszenten. Die Kontrollgruppe zeigte sich sowohl hinsichtlich des Alters (Median, 40 Jahre (18 – 61), $p = 0.930$, n.s.), als auch des Geschlechts (weiblich $n=14$ [32%]; männlich, $n= 30$ [68%]; $p = 0.818$, n.s.) als gematcht zur Kohorte der COVID-19 Rekonvaleszenten.

Charakteristika	COVID-19 Rekonvaleszenten ($n=44$)
Alter [Jahre]; Median (Bereich)	43 (18 - 61)
Geschlecht	
männlich; n	31 (70.5 %)
weiblich; n	13 (29.5 %)
Symptome während COVID-19; n	
Fieber ($> 38^{\circ}\text{C}$)	27 (61.4 %)
Myalgie	19 (43.2 %)
Husten	17 (38,6 %)
Kopfschmerz	9 (20,5 %)
Halsschmerz	6 (13.6 %)
Rückenschmerz	6 (13,6 %)
Geschmacksverlust	4 (9,1 %)
Atemnot	3 (6,8 %)
Diarrhoe	2 (4,5 %)
COVID-19 Schweregrad (nach WHO); n	
milde Erkrankung	43 (97,7 %)
Pneumonie	1 (2,3 %)
Schwere Pneumonie	0
ARDS	0
Sepsis	0
Symptombdauer [Tage]; Median (Bereich)	11 (1 – 26)
Zeit zwischen Symptombeginn und Blutentnahme [Tage]; Median	37 (26 - 51)
Zeit zwischen Ende der Symptomatik und Blutentnahme [Tage]; Median (Bereich)	27 (13-45)

3.5 Subgruppen-Analyse von COVID-19 Rekonvaleszenten und der gesunden Kontrollgruppe

Zunächst wurde die gesamte Gruppe der COVID-19 Rekonvaleszenten mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der Gesamtzahl der Lymphozyten (1758/ μ l vs. 1884/ μ l; $p=0,486$), sowie der Lymphozyten-Hauptgruppen: Für die B-Zellen (195/ μ l vs. 206/ μ l; $p=0,767$), die CD4⁺ T-Zellen (753/ μ l vs. 833/ μ l; $p=0,172$), die CD8-positiven T-Zellen (348/ μ l vs. 320/ μ l; $p=0,491$), sowie die NK-Zellen (181/ μ l vs. 226/ μ l; $p=0,265$) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 11A).

Die Analyse der *B-Lymphozyten*-spezifischen Subgruppen ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bei den transitorischen B-Zellen (13/ μ l vs. 10/ μ l, $p=0,076$), den naiven B-Zellen (128/ μ l vs. 123/ μ l; $p=0,352$), den non class-switched B-Gedächtniszellen (8/ μ l vs. 7/ μ l; $p=0,661$), sowie den class-switched B-Gedächtniszellen (24/ μ l vs. 25/ μ l; $p=0,518$; Abbildung 11B).

Für die *T-Zell-Gesamtzahl* (CD3⁺; 1244,0/ μ l vs. 1175,1/ μ l; $p=0,757$) konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 11C).

Bei den *CD4⁺ - Subgruppen* zeigte sich für die T-Gedächtniszellen (447/ μ l vs. 456/ μ l; $p=0,631$), die naiven T-Zellen (252/ μ l vs. 319/ μ l; $p=0,098$), die central memory T-Zellen (305/ μ l vs. 276/ μ l; $p=0,710$), die effector memory T-Zellen (132/ μ l vs. 145/ μ l; $p=0,379$), die effector memory- RA⁺ Zellen (2/ μ l vs. 4/ μ l; $p=0,319$), die HLA-DR positiven Zellen (46/ μ l vs. 38/ μ l; $p=0,361$), sowie die CD69 positiven T-Zellen (11/ μ l vs. 12/ μ l; $p=0,767$) kein signifikanter Unterschied. Für die CD4 positiven T-Helferzellen ergab sich für die Th1-Zellen (22/ μ l vs. 27/ μ l; $p=0,437$), die Th2-Zellen (48/ μ l vs. 47/ μ l; $p=0,902$), für die Th17-Zellen (58/ μ l vs. 60/ μ l; $p=0,718$), die regulatorischen T-Zellen (35/ μ l vs. 43/ μ l; $p=0,070$), sowie für die Interleukin-2-Rezeptor-positiven CD4⁺ Zellen (17/ μ l vs. 19/ μ l; $p=0,867$) ebenfalls kein signifikanter Unterschied (Abbildung 11D).

Für die Analyse der *CD8⁺ Zellen* zeigte sich unter den Gedächtniszellen (115/ μ l vs. 129/ μ l; $p=0,698$), den naiven CD8⁺ positiven Zellen (105/ μ l vs. 96/ μ l; $p=0,402$), den central memory CD8-Zellen (43/ μ l vs. 35/ μ l; $p=0,649$), den effector memory-CD8-Zellen (91/ μ l vs. 103/ μ l; $p=0,365$), den effector memory RA⁺ CD8-Zellen (44/ μ l vs. 49/ μ l; $p=0,698$), sowie den frühen CD8-Zellen (226/ μ l vs. 202/ μ l; $p=0,897$), den intermediären CD8-Zellen (27/ μ l vs. 22/ μ l; $p=0,066$), den späten CD8-Zellen (41/ μ l vs. 51/ μ l; $p=0,241$), den exhausted CD8-Zellen (106/ μ l vs. 91/ μ l; $p=0,215$), und den terminal effector CD8-Zellen (25/ μ l vs. 25/ μ l; $p=0,625$) ebenfalls

kein signifikanter Unterschied. Weiterhin konnte auch bei den CD4- und CD8- doppelpositiven T-Zellen ($3/\mu\text{l}$ vs. $3/\mu\text{l}$; $p=0,844$) und NK-T Zellen ($35/\mu\text{l}$ vs. $44/\mu\text{l}$; $p=0,680$) kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Für die HLA-DR- positiven CD8-Zellen ($45/\mu\text{l}$ vs. $32/\mu\text{l}$; $p=0,038$), die CD69- positiven CD8-Zellen ($92/\mu\text{l}$ vs. $41/\mu\text{l}$; $p=0,002$), die regulatorischen CD8-Zellen ($0,0/\mu\text{l}$ vs. $0,3/\mu\text{l}$; $p < 0,001$) und für die IL2-Rezeptor- positiven CD8-Zellen ($0,2/\mu\text{l}$ vs. $0,5/\mu\text{l}$; $p=0,004$) ergaben sich signifikante Unterschiede bei den gemessenen Zellkonzentrationen mit jeweils höheren Werten bei den Rekonvaleszenten (Abbildung 11E).

Das Verhältnis von CD4- zu CD8- positiven Zellen betrug 2,1 vs. 2,3 ($p=0,450$) und unterschied sich damit ebenfalls nicht signifikant (Tabelle 9).

Für die Untergruppen der *NK-Zellen* ($181/\mu\text{l}$ vs. $226/\mu\text{l}$; $p=0,265$) wie CD56dim-CD15bright - Zellen ($17/\mu\text{l}$ vs. $15/\mu\text{l}$; $p=0,440$), CD56bright-CD16dim – Zellen ($12/\mu\text{l}$ vs. $15/\mu\text{l}$; $p=0,192$) und CD56- CD16- doppel-positive Zellen ($12/\mu\text{l}$ vs. $15/\mu\text{l}$; $p=0,167$) ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (Tabelle 9).

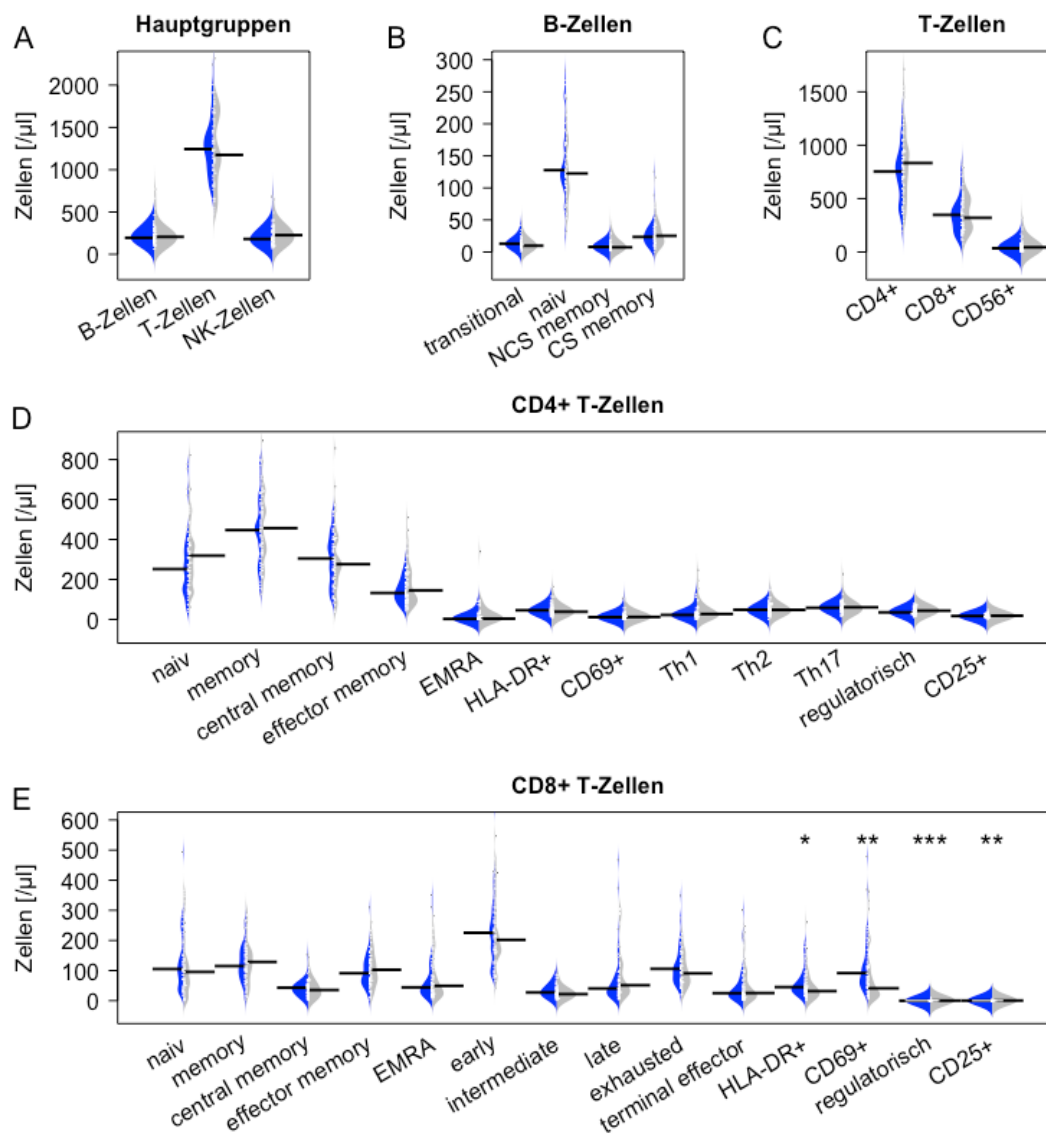


Abbildung 11: Subgruppen-Analyse COVID-19 Rekonvaleszenten und gesunde Kontrollgruppe. Verteilung der Lymphozyten-Hauptgruppen und -Untereinheiten. Vergleich zwischen der gesunden Kontrollgruppe (grau), sowie den COVID-19 Rekonvaleszenten (blau). Violin-Diagramme; schwarze Balken zeigen den Median, * ist $p < 0,05$; ** ist $p < 0,005$; *** ist $p < 0,001$.

Tabelle 9: Vergleich von COVID-19 Rekonvaleszenten und der gesunden Kontrollgruppe.
Median, sowie Interquartilsabstand in Klammern.

Hauptgruppe	Subpopulation	Median Rekonvaleszenten n = 44	Median Kontrollgruppe n = 44	p - Wert	Signifikanz
	Alter	43 (30 - 50)	40 (28 - 53)	0,933	n.s.
	Gesamtlymphozyten	1758 (1496 - 2066)	1884 (1489 - 2293)	0,486	n.s.
B Zellen	Gesamt	195 (172 - 289)	206 (146 - 276)	0,767	n.s.
	transitionale	13 (8 - 16)	10 (6 - 17)	0,076	n.s.
	naiv	128 (109 - 175)	123 (90 - 172)	0,352	n.s.
	non-class-switched memory	8 (5 - 12)	7 (5 - 13)	0,661	n.s.
	class-switched memory	24 (16 - 35)	25 (14 - 42)	0,518	n.s.
T Zellen	Gesamt	1244 (1040 - 1450)	1175 (935 - 1678)	0,761	n.s.
	CD4+ / CD8+ doppelt-positiv	3 (2 - 6)	3 (2 - 7)	0,844	n.s.
	CD4+ zu CD8+ Ratio	2,1	2,3	0,450	n.s.
CD4+ T Zellen	Gesamt	753 (541 - 893)	833 (576 - 1017)	0,172	n.s.
	memory	447 (298 - 571)	456 (331 - 622)	0,631	n.s.
	naiv	252 (150 - 355)	319 (210 - 414)	0,098	n.s.
	central memory	305 (193 - 400)	276 (187 - 406)	0,710	n.s.
	effector memory	132 (95 - 184)	145 (94 - 236)	0,379	n.s.
	effector memory RA+	2 (1 - 7)	4 (1 - 28)	0,319	n.s.
	HLA-DR+	46 (33 - 56)	38 (27 - 57)	0,361	n.s.
	CD69+	11 (8 - 18)	12 (8 - 19)	0,767	n.s.
	Th1	22 (14 - 32)	27 (14 - 56)	0,437	n.s.
	Th2	48 (32 - 63)	47 (30 - 71)	0,902	n.s.
	Th17	58 (46 - 79)	60 (35 - 79)	0,718	n.s.
	regulatorisch	35 (27 - 48)	43 (30 - 63)	0,070	n.s.
	Interleukin2-Rezeptor+	17 (11 - 23)	19 (11 - 21)	0,867	n.s.
CD8+ T Zellen	Gesamt	348 (201 - 417)	320 (221 - 497)	0,491	n.s.
	memory	115 (81 - 165)	129 (79 - 166)	0,698	n.s.
	naiv	105 (64 - 178)	96 (51 - 146)	0,402	n.s.
	central memory	43 (24 - 52)	35 (18 - 64)	0,649	n.s.
	effector memory	91 (59 - 127)	103 (66 - 149)	0,365	n.s.
	effector memory RA+	44 (22 - 81)	49 (23 - 117)	0,698	n.s.
	early	226 (150 - 280)	202 (160 - 309)	0,897	n.s.
	intermediate	27 (19 - 45)	22 (14 - 34)	0,066	n.s.
	late	41 (23 - 75)	51 (29 - 123)	0,241	n.s.
	exhausted	106 (68 - 142)	91 (62 - 136)	0,215	n.s.
	terminal effector	25 (13 - 50)	25 (12 - 94)	0,625	n.s.
	HLA-DR+	45 (33 - 72)	32 (18 - 55)	0,038	*
	CD69+	92 (57 - 145)	41 (18 - 110)	0,002	**
	regulatorisch	0 (0 - 0,17)	0,3 (0,19 - 0,64)	< 0,001	***
	Interleukin2-Rezeptor+	0,24 (0 - 0,59)	0,5 (0,2 - 1,16)	0,004	**
NK-Zellen	NK-T Zellen	35 (21 - 62)	44 (19 - 69)	0,680	n.s.
	Gesamt	181 (130 - 275)	226 (150 - 301)	0,265	n.s.
	CD56dim CD16bright	17 (13 - 24)	15 (11 - 20)	0,440	n.s.
	CD56+ CD16+	146 (110 - 225)	193 (118 - 274)	0,167	n.s.
	CD56bright CD16dim	12 (9 - 17)	15 (11 - 19)	0,192	n.s.

3.7 Subgruppen-Analyse von COVID-19 Rekonvaleszenten mit Fieber und COVID-19 Rekonvaleszenten ohne Fieber in der akuten Krankheitsphase

Bei 62% der eingeschlossenen Probanden wurde Fieber als Symptom während der akuten COVID-19 Erkrankung identifiziert (Tabelle 8). Um Unterschiede zu den Probanden ohne Fieber zu identifizieren, wurde eine prospektiv geplante Subgruppenanalyse durchgeführt und das zelluläre Immunsystem von Probanden der Interventionsgruppe, welche mit Fieber symptomatisch geworden sind (n=27), gegen Probanden ohne Fieber (n=17) und gegen die gesunde Kontrollgruppe verglichen (p-Werte adjustiert für multiples Testen nach Bonferroni).

Das *Alter* der beiden Subgruppen unterschied sich nicht signifikant (44 Jahre vs. 43 Jahre; $p=0,604$). Auch das Zeitintervall von Symptombeginn bis Blutentnahme (38d vs. 36d; $p=0,111$), von Symptomende bis Blutentnahme (27d vs. 26d; $p=0,579$), sowie die Gesamtzahl der symptomatischen Tage (13d vs. 10d; $p=0,304$) unterschieden sich nicht signifikant (Tabelle 8). Bezüglich der COVID-19 Antikörperkonzentration im Serum konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied für SARS-CoV-2 spezifische IgG (4,42 vs. 3,99; $p=0,563$) oder IgA (2,6 vs. 3,85; $p=0,214$) Antikörper festgestellt werden.

Im Vergleich der *Probanden mit Fieber mit Probanden ohne Fieber* als Symptom ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Gesamt-Lymphozytenzahlen, sowie in den Hauptgruppen bestehend aus B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen (Tabelle 10, Abbildung 12A-D).

Bei Untersuchung der *CD8-positiven Zellen* zeigte sich in der Gesamtzahl (273/ μ l vs. 374/ μ l; $p=0,038$), der CD8+ Gedächtniszellen (101/ μ l vs. 150/ μ l; $p=0,029$) und der central memory CD8-positiven Zellen (28/ μ l vs. 50/ μ l; $p=0,011$) eine signifikante Verminderung in der Gruppe der Patienten mit Fieber. Bei den intermediären CD8-Zellen (24/ μ l vs. 44/ μ l; $p=0,044$), den late CD8-Zellen (33/ μ l vs. 68/ μ l; $p=0,011$), sowie den terminal-effector-Zellen (19/ μ l vs. 54/ μ l; $p=0,018$) ergab sich ebenfalls eine signifikante Verminderung bei Probanden mit Fieber als Symptom im Vergleich zu Probanden ohne Fieber (Abbildung 12C+E).

Bei Analyse des zellulären Immunstatus von *Probanden mit Fieber im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe* konnte eine Erniedrigung von late CD8-positiven T-Zellen identifiziert werden, die jedoch das Signifikanzniveau knapp verfehlte (33/ μ l vs. 51/ μ l; $p=0,05$). Auch die schon vorbekannte Verringerung der regulatorischen und Interleukin2-Rezeptor-positiven Zellen aus dem Vergleich zwischen der Rekonvaleszenten-Gesamtkohorte mit den gesunden Probanden

zeichnete sich im Vergleich von Probanden mit Fieber mit der gesunden Kontrollgruppe erneut ab (reg. CD8+ 0/ μ l vs. 0,3/ μ l; $p < 0,001$; IL2-R+ CD8+ 0,2/ μ l vs. 0,5/ μ l; $p = 0,026$).

Interessanterweise ergab ein Vergleich der *Patienten ohne Fieber mit der gesunden Kontrollgruppe* eine Erhöhung von intermediären CD8 Zellen, sowie von HLA-DR-positiven CD8 Zellen (intermediär 44/ μ l vs. 22/ μ l; $p = 0,014$; HLA-DR 62/ μ l vs. 32/ μ l; $p = 0,023$), und der CD69+ Zellzahl (92/ μ l vs. 41/ μ l; $p = 0,022$; Tabelle 10).

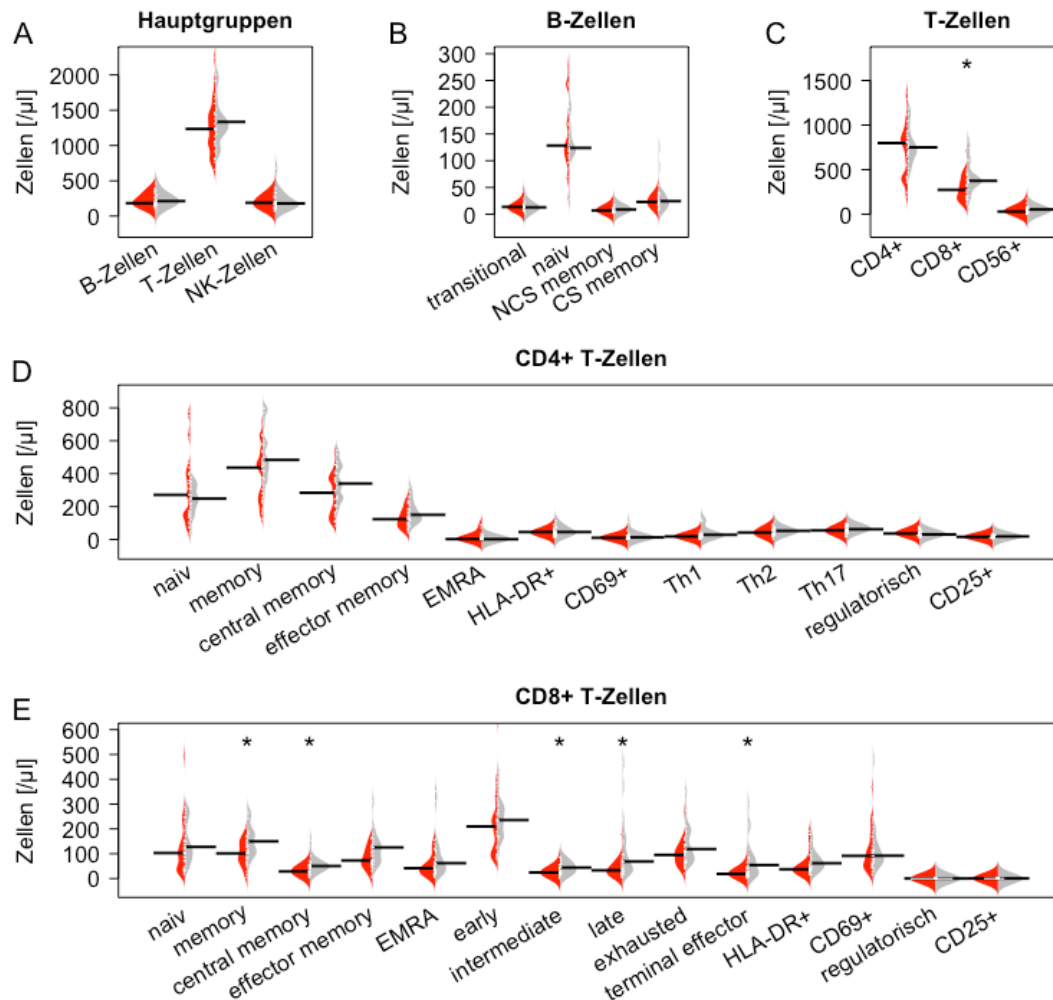


Abbildung 12: Subgruppen-Analyse Fieber als Symptom. Vergleich zwischen Probanden mit Fieber (rot) und Probanden ohne Fieber (grau) während der COVID-19 Erkrankung. Violin-Diagramme; schwarze Balken zeigen den Median, * ist $p < 0,05$; p-Werte adjustiert für multiples Testen nach Bonferroni.

Tabelle 10: Vergleich COVID- Rekonvaleszenten mit Fieber, ohne Fieber, sowie gesunder Kontrollgruppe. Angegeben sind der Median, sowie der Interquartilsabstand in Klammern. P-Werte adjustiert für multiples Testen nach Bonferroni (ncs – memory = non class-switched memory; cs – memory = class-switched memory; CD4+/ CD8+ DP = CD4+/ CD8+ doppelt-positiv; CD56dCD16b = CD56dim CD16bright; CD56bCD16d = CD56bright CD16dim).

Hauptgruppe	Subpopulation	Median Fieber n = 27	Median kein Fieber n = 17	Median Kontroll- gruppe n = 44	Fieber- kein Fieber p ₁	Fieber- Kontroll- gruppe p ₂	Kein Fieber – Kontroll- gruppe p ₃
Alter		44 (32 - 50)	43 (26 - 50)	40 (28 - 53)	1,0	1,0	1,0
Gesamt- Lymphozyten		1811 (1473 - 1994)	1750 (1587 - 2084)	1884 (1489 - 2293)	1,0	1,0	1,0
B Zellen	Gesamt	183 (162 - 292)	213 (172 - 287)	206 (146 - 276)	1,0	1,0	1,0
	transitionale	14 (9 - 17)	13 (7 - 15)	10 (6 - 17)	1,0	0,281	0,771
	naiv	128 (107 - 180)	124 (116 - 166)	123 (90 - 172)	1,0	1,0	1,0
	ncs – memory	7 (5 - 11)	9 (5 - 13)	7 (5 - 13)	1,0	1,0	1,0
	cs – memory	23 (16 - 33)	24 (12 - 39)	25 (14 - 42)	1,0	1,0	1,0
T Zellen	Gesamt	1235 (1006 - 1454)	1335 (1171 - 1420)	1175 (935 - 1678)	1,0	1,0	1,0
	CD4+/ CD8+ DP	3 (2 - 5)	3 (2 - 8)	3 (2 - 7)	1,0	1,0	1,0
	CD4+/ CD8+ Ratio	2,5	1,9	2,3	0,151	1,0	0,298
CD4+ T Zellen	Gesamt	798 (413 - 900)	750 (659 - 856)	833 (576 - 1017)	1,0	0,471	1,0
	memory	437 (244 - 511)	484 (412 - 600)	456 (331 - 622)	0,134	0,420	0,855
	naiv	271 (143 - 404)	248 (194 - 310)	319 (210 - 414)	1,0	0,951	0,204
	central memory	284 (152 - 370)	340 (253 - 446)	276 (187 - 406)	0,126	1,0	0,423
	effector memory	124 (86 - 174)	150 (118 - 208)	145 (94 - 236)	0,235	0,366	1,0
	EMRA+	3 (1 - 10)	2 (1 - 4)	4 (1 - 28)	1,0	1,0	0,603
	HLA-DR+	46 (33 - 55)	46 (34 - 71)	38 (27 - 57)	1,0	1,0	0,969
	CD69+	10 (7 - 17)	13 (9 - 23)	12 (8 - 19)	0,813	1,0	1,0
	Th1	19 (11 - 29)	29 (19 - 36)	27 (14 - 56)	0,080	0,256	1,0
	Th2	43 (23 - 64)	53 (38 - 60)	47 (30 - 71)	0,885	1,0	1,0
	Th17	55 (37 - 72)	62 (53 - 87)	60 (35 - 79)	0,226	1,0	0,465
	regulatorisch	36 (29 - 54)	30 (25 - 45)	43 (30 - 63)	0,867	0,834	0,13
	IL2-Rezeptor+	16 (11 - 22)	19 (15 - 27)	19 (11 - 21)	0,423	1,0	1,0
CD8+ T Zellen	Gesamt	273 (181 - 386)	374 (354 - 446)	320 (221 - 497)	0,038	0,242	0,897
	memory	101 (66 - 145)	150 (105 - 186)	129 (79 - 166)	0,029	0,462	0,711
	naiv	103 (39 - 152)	128 (85 - 219)	96 (51 - 146)	0,612	1,0	0,492
	central memory	28 (16 - 47)	50 (44 - 54)	35 (18 - 64)	0,011	1,0	0,152
	effector memory	73 (54 - 113)	125 (72 - 148)	103 (66 - 149)	0,105	0,224	1,0
	EMRA+	41 (19 - 57)	62 (33 - 115)	49 (23 - 117)	0,126	0,633	1,0
	early	210 (110 - 260)	236 (171 - 292)	202 (160 - 309)	0,639	1,0	1,0
	intermediate	24 (13 - 40)	44 (23 - 61)	22 (14 - 34)	0,044	1,0	0,014
	late	33 (17 - 56)	68 (32 - 156)	51 (29 - 123)	0,011	0,050	0,969
	exhausted	95 (63 - 121)	119 (72 - 193)	91 (62 - 136)	0,118	1,0	0,071
	terminal effector	19 (11 - 34)	54 (23 - 86)	25 (12 - 94)	0,018	0,288	0,57
	HLA-DR+	37 (27 - 54)	62 (43 - 83)	32 (18 - 55)	0,063	0,984	0,023
	CD69+	91 (49 - 149)	92 (70 - 142)	41 (18 - 110)	1,000	0,051	0,022
	regulatorisch	0 (0 - 0,17)	0 (0 - 0,16)	0,3 (0,19 - 0,64)	1,000	< 0,001	< 0,001
	IL2-Rezeptor+	0,2 (0 - 0,57)	0,3 (0,15 - 0,59)	0,5 (0,2 - 1,16)	1,000	0,026	0,145
	Gesamt	188 (124 - 276)	180 (133 - 264)	226 (150 - 301)	1,000	0,969	1,0
	CD56dCD16b	18 (14 - 22)	16 (12 - 29)	15 (11 - 20)	1,000	1,0	1,0
	CD56+ CD16+	157 (106 - 226)	143 (111 - 217)	193 (118 - 274)	1,000	0,648	0,99
	CD56bCD16d	12 (9 - 20)	13 (8 - 16)	15 (11 - 19)	1,000	1,0	0,435
	NK-T Zellen	29 (23 - 56)	53 (17 - 64)	44 (19 - 69)	1,000	1,0	1,0

3.8 Geschlechter-spezifische Subgruppen-Analyse von COVID-19 Rekonvaleszenten

In einer ebenfalls prospektiv geplanten Analyse von geschlechter-spezifischen Unterschieden bei COVID-19 Rekonvaleszenten konnten insgesamt 31 männliche und 13 weiblichen Probanden analysiert werden. Es ergab sich jedoch ein signifikanter Altersunterschied im Vergleich der beiden Patientengruppen (männlich 47 vs. weiblich 33 Jahre, $p=0,047$; Tabelle 8, Tabelle 11, Abbildung 13). Dies muss bei Interpretation und Diskussion berücksichtigt werden.

Bei Analyse der Lymphozyten-Zellzahlen konnte ein signifikanter Unterschied in der Gruppe der naiven CD8 T Zellen identifiziert werden (männlich $101/\mu\text{l}$ vs. $194/\mu\text{l}$; $p=0,017$). Zudem zeigten sich die Zellzahlen der CD56dim CD16bright NK Zell-Subpopulation bei männlichen Rekonvaleszenten im Vergleich zu den weiblichen Probanden erhöht ($18/\mu\text{l}$ vs. $12/\mu\text{l}$; $p=0,022$; Abbildung 13).

Für die übrigen Lymphozyten-Subpopulationen ergab sich kein signifikanter Unterschied (Tabelle 10), wenngleich bei der Gruppe der naiven CD4-positiven T-Lymphozyten ein deutlicher Trend zu höheren Zellzahlen beim weiblichen Geschlecht im Vergleich zum männlichen Geschlecht festgestellt werden konnte (männlich $241/\mu\text{l}$ vs. weiblich $330/\mu\text{l}$; $p=0,085$ n.s.). Ferner zeigten sich die early CD8-positiven Lymphozyten beim weiblichen Geschlecht erhöht, wobei ebenfalls das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde (männlich $190/\mu\text{l}$ vs. weiblich $256/\mu\text{l}$; $p=0,053$ n.s., Tabelle 11). Eine leichte Zellzahl-Erhöhung konnte zudem beim weiblichen Geschlecht im Vergleich zum männlichen Geschlecht bei den CD8-positiven memory- und effector memory T Zellen identifiziert werden.

Dagegen zeigten sich beim männlichen Geschlecht die B Zellen leicht erhöht aufgrund einer Erhöhung der naiven B Zell – Subpopulation (männlich $136/\mu\text{l}$ vs. weiblich $121/\mu\text{l}$; $p=0,401$ n.s.); dies konnte auch bei den memory, und insbesondere bei den central memory CD4-positiven Zellen beobachtet werden (männlich $335/\mu\text{l}$ vs. weiblich $264/\mu\text{l}$; $p=0,593$ n.s.; Tabelle 11).

Tabelle 11: Vergleich von männlichen und weiblichen COVID- Rekonvaleszenten. Angegeben sind der Median, sowie der Interquartilsabstand in Klammern.

Hauptgruppe	Subpopulation	Median männlich n = 31	Median weiblich n = 13	p	Signifikanz
	Alter	47 (35 - 52)	33 (25 - 43)	0,047	*
	Gesamtlymphozyten	1765 (1556 - 1926)	1750 (1478 - 2552)	0,666	n.s.
B Zellen	Gesamt	213 (173 - 279)	176 (170 - 306)	0,647	n.s.
	transitional	13 (9 - 17)	13 (8 - 15)	0,839	n.s.
	naiv	136 (109 - 180)	121 (111 - 128)	0,401	n.s.
	non-class-switched memory	8 (5 - 11)	8 (4 - 12)	0,800	n.s.
	class-switched memory	24 (17 - 35)	21 (15 - 33)	0,939	n.s.
T Zellen	Gesamt	1235 (1023 - 1400)	1336 (1131 - 1725)	0,144	n.s.
	CD4+ / CD8+ doppelt-positiv	3 (2 - 5)	5 (3 - 8)	0,181	n.s.
	CD4+ zu CD8+ Ratio	2,1	2,6	0,919	n.s.
CD4+ T Zellen	Gesamt	746 (532 - 871)	806 (597 - 992)	0,373	n.s.
	memory	459 (335 - 574)	446 (266 - 531)	0,684	n.s.
	naiv	241 (138 - 326)	330 (194 - 401)	0,085	n.s.
	central memory	335 (203 - 389)	264 (174 - 400)	0,593	n.s.
	effector memory	132 (101 - 182)	132 (91 - 185)	0,939	n.s.
	effector memory RA+	2 (1 - 7)	3 (2 - 17)	0,124	n.s.
	HLA-DR+	47 (31 - 57)	40 (33 - 47)	0,415	n.s.
	CD69+	11 (8 - 13)	11 (8 - 23)	0,476	n.s.
	Th1	22 (13 - 31)	24 (18 - 38)	0,254	n.s.
	Th2	48 (33 - 64)	50 (32 - 60)	0,865	n.s.
	Th17	59 (45 - 82)	57 (51 - 67)	0,648	n.s.
	regulatorisch	39 (28 - 46)	29 (25 - 49)	0,589	n.s.
	Interleukin2-Rezeptor+	16 (11 - 22)	18 (14 - 24)	0,598	n.s.
CD8+ T Zellen	Gesamt	323 (188 - 396)	365 (273 - 503)	0,240	n.s.
	memory	113 (83 - 173)	130 (55 - 147)	0,430	n.s.
	naiv	101 (47 - 128)	194 (103 - 263)	0,017	*
	central memory	45 (25 - 52)	41 (18 - 49)	0,320	n.s.
	effector memory	77 (65 - 128)	101 (39 - 126)	0,684	n.s.
	effector memory RA+	43 (24 - 96)	48 (22 - 61)	1,000	n.s.
	early	190 (123 - 262)	256 (221 - 324)	0,053	n.s.
	intermediate	23 (18 - 43)	37 (24 - 56)	0,308	n.s.
	late	37 (24 - 82)	52 (22 - 73)	0,741	n.s.
	exhausted	105 (71 - 137)	108 (67 - 162)	0,919	n.s.
	terminal effector	24 (14 - 60)	27 (12 - 44)	1,000	n.s.
	HLA-DR+	48 (33 - 79)	37 (33 - 49)	0,183	n.s.
	CD69+	92 (59 - 127)	91 (57 - 185)	0,919	n.s.
	regulatorisch	0 (0 - 0,16)	0 (0 - 0,21)	0,446	n.s.
	Interleukin2-Rezeptor+	0,19 (0 - 0,54)	0,32 (0,15 - 0,7)	0,466	n.s.
NK-Zellen	NK-T Zellen	40 (20 - 65)	29 (27 - 53)	0,919	n.s.
	Gesamt	182 (159 - 276)	133 (123 - 264)	0,559	n.s.
	CD56dim CD16bright	18 (15 - 25)	12 (11 - 18)	0,022	*
	CD56+ CD16+	147 (124 - 226)	111 (101 - 224)	0,647	n.s.
	CD56bright CD16dim	13 (9 - 21)	11 (9 - 12)	0,117	n.s.

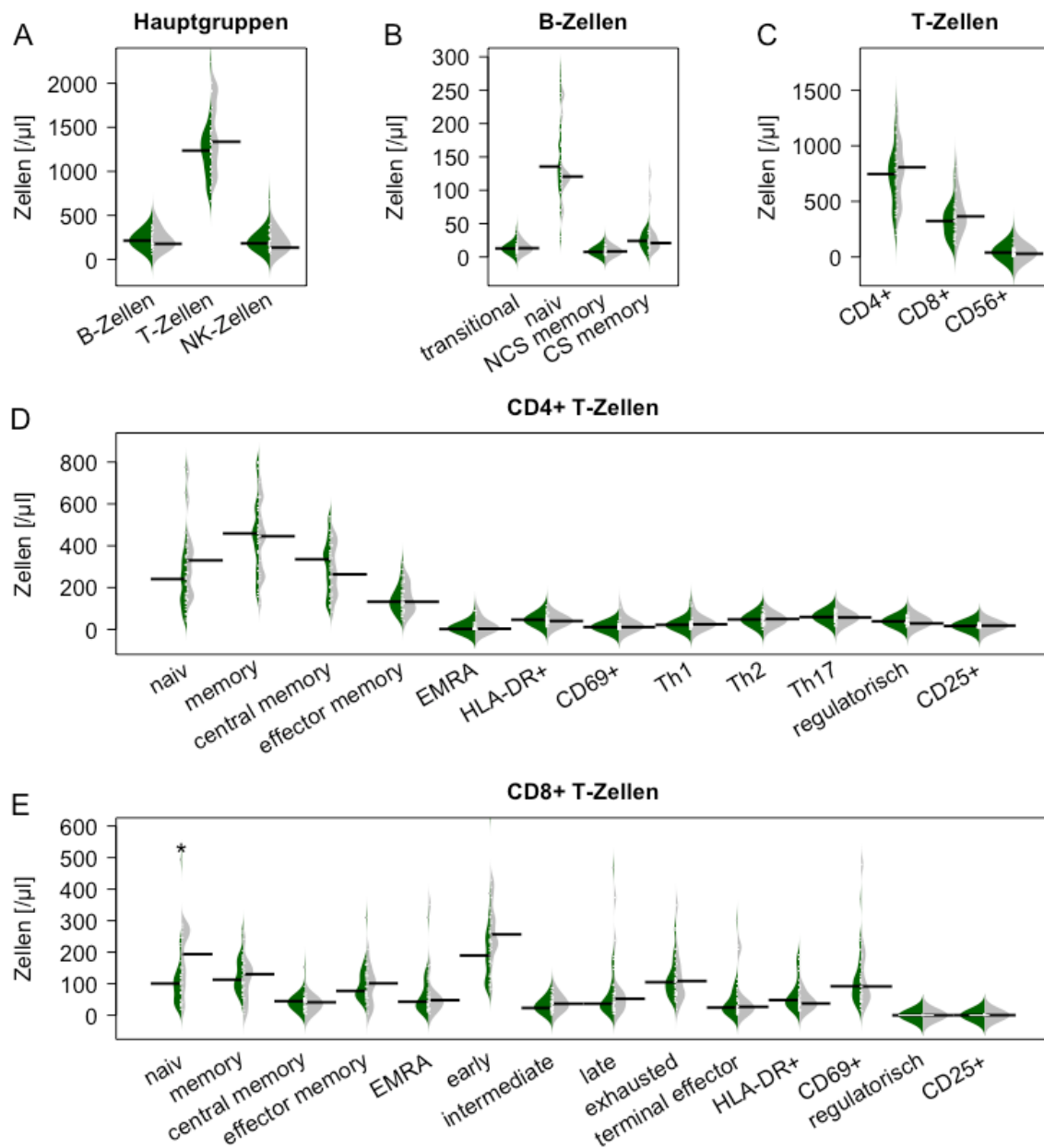


Abbildung 13: Geschlechter-spezifische Subgruppen-Analyse. Vergleich von männlichen (grün) und weiblichen (grau) COVID-19 – Rekonvaleszenten. Violin-Diagramme; schwarze Balken zeigen den Median, * ist $p < 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Zellulärer Immunstatus bei Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung

Zunächst wurde der Einfluss einer akuten COVID-19 Erkrankung auf 33 erwachsene Patienten mit unterschiedlicher Schwere der Erkrankung untersucht. In einer univariaten Analyse konnten bei Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf erniedrigte Werte der Gesamtlymphozyten, sowie aller gemessenen Subgruppen mit Ausnahme der CD4- und CD8- positiven EMRA-Zellen und der late und terminal effector CD8+ Zellen identifiziert werden. Bei Patienten mit moderatem Krankheitsverlauf konnte ein ähnlicher Trend beobachtet werden, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Tabelle 5).

Die transiente Reduktion der Lymphozytenzahlen ist ein bei Virusinfektionen oft beobachtetes Phänomen und von Infektionen mit dem Cytomegalievirus (CMV)-⁸⁶, dem Epstein-Barr-Virus⁸⁷ oder dem humanen Immundefizienz-Virus⁸⁸ bekannt. Eine generalisierte Lymphozytopenie ist jedoch nur bei Infektionen mit dem Influenza-Virus H5N1⁷¹, dem Respiratorischen Synzytial – Virus⁷² oder bei der Hand-und-Fuß Krankheit bei Schweinen⁷³ bekannt. Zu dieser Gruppe gehören auch Infektionen, die durch einige Coronaviren verursacht werden^{69,70}. Die Pathophysiologie bei COVID-19 Patienten ist hierbei noch nicht vollständig aufgeklärt. Als mögliche Ursache ist die Rekrutierung von T-Zellen zum Fokus der Infektion, insbesondere dem infizierten Lungengewebe, zu nennen, da hier eine Lymphozyten-Invasion bei Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf beobachtet wurde⁴³. Eine transiente Suppression des angeborenen und erworbenen Immunsystems durch die Viruserkrankung, insbesondere im Kontext mit post-COVID-19 entstehender Autoimmunität, wurde ebenfalls diskutiert⁸⁹.

Nach Rekonstitution bei durchgemachter leichter bis moderater SARS-CoV-2 Infektion konnte – wie im zweiten Teil der Studie untersucht – keine anhaltende Lymphozytopenie beobachtet werden. Hierbei ist vermutlich die Rekrutierung von Lymphozyten ins Gewebe weniger ausgeprägt, da die Lymphozyten-Invasion ins infizierte Gewebe vor Allem bei Patienten mit schwerem bis letalem COVID-19 Verlauf beobachtet wurde⁴³. Darüber hinaus werden vermutlich weniger Immunzellen verbraucht, da die systemische Reaktion des Patienten geringer ausfällt und ein Zytokin-Sturm, welcher vor Allem bei Patienten mit schwerem und letalem Verlauf beobachtet wird, ausbleibt.

Da sich die Kohorte der COVID-19 – Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe alters- und geschlechtsspezifisch unterschied, wurde eine multivariate Analyse in Kooperation mit dem Institut für Mathematik der Universität Augsburg durchgeführt (Abbildung 10). Ein Alters- und geschlechtsspezifisches Matching der akut erkrankten COVID-19 Patienten mit der Kontrollkohorte war im Pandemieverlauf aufgrund der geltenden Kontaktbeschränkungen nicht möglich; zudem bestand die Gefahr einer Verzerrung der Ergebnisse durch Einschluss von klinisch inapparent erkrankten COVID-19 Patienten in die gesunde Kontrollgruppe.

4.1.1 Einfluss einer COVID-19 – Erkrankung auf die Lymphozyten-Zellzahlen bei Patienten mit mildem oder schwerem Verlauf

Bei Betrachtung der *Lymphozyten-Hauptgruppen* zeigte sich ein durchgehend supprimierender Einfluss einer milden COVID-19 Erkrankung auf die Zellzahlen. Sowohl die Gesamt-Leukozytenzahlen als auch die CD3-, CD8-, CD4- positiven Zellzahlen, sowie die B- und NK-Zellen zeigten sich durch einen milden COVID-19 Verlauf deutlich vermindert. Dies betont den negativen, isolierten Einfluss einer COVID-19 Erkrankung auf die Lymphozytenzahlen unabhängig von ebenfalls Zellzahl-vermindernden Einflüssen wie Alter und männliches Geschlecht. In der Akutphase einer COVID-19 Erkrankung ist dies gut passend zu pathophysiologischen Prozessen im Rahmen eines Infektionsgeschehens mit einer vermehrten Rekrutierung von Lymphozyten ins infizierte Gewebe.

Darüber hinaus konnte bei Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf – mit Ausnahme der B Zellen – ein jeweils stärkerer Einfluss auf die Reduktion der Zellzahlen im Vergleich zum milden COVID-19 Verlauf beobachtet werden. Dies zeigt sich analog zu einem erhöhten Bedarf von Lymphozyten bei zunehmender Schwere der Infektion für die ablaufende Immunreaktion; insbesondere zytotoxische CD8-positive T-Zellen, sowie CD4-positive T-Helferzellen und NK-Zellen sind in der Akutphase einer infektiösen Erkrankung wichtige Mediatoren des Immunsystems und werden im Rahmen der Inflammation vermehrt ins Gewebe rekrutiert^{90,91}.

Eine Ausnahme stellen die *B Zell- Subpopulationen* dar, welche durch einen milden COVID-19 Verlauf stärker supprimiert wurden als durch einen schweren COVID-19 Verlauf. Hier zeigten sich vor Allem die naiven und non-class switched B Zell-Subpopulationen bei mildem COVID-19 Verlauf stärker erniedrigt als bei einem schweren COVID-19 Verlauf. In der Literatur wird

über eine Dysregulation von naiven B Zellen berichtet, wobei hier die Expansion einer Antikörper-sekretierenden, naiven B Zellpopulation im Rahmen eines schweren COVID-19 Verlaufs identifiziert wurde, welche ferner in Zusammenhang mit de novo Autoreaktivität gebracht wurde⁹². Dies könnte für die weniger ausgeprägte Reduktion insbesondere der naiven B Zellen in unserer Studienkohorte verantwortlich sein. Auch die Subpopulationen der class-switched memory und transitionalen B Zellen zeigten sich durch eine milde und starke COVID-19 Erkrankung gleichermaßen supprimiert. Dies kann am ehesten im Rahmen der ablaufenden Immunreaktion gewertet werden. In der Studie von Woodruff et al. wird ferner von einem Anstieg von class switched und non-class switched B memory – Zellen während einer COVID-19 Infektion berichtet; darüber hinaus konnte eine Korrelation von IgM-positiven B Zellen mit der Symptombdauer in 40 nicht-hospitalisierten COVID-19 Patienten identifiziert werden⁹².

In dieser Studie konnte jedoch zu diesen Ergebnissen aufgrund einer fehlenden Verlaufskontrolle, sowie des frühen Messzeitpunktes unmittelbar bei Erstdiagnose, keine Aussage getroffen werden. Eine Zunahme von IgM-positiven B memory – Zellen würde den Einfluss der COVID-19 Erkrankung auf die B Zellen bei numerischer Bestimmung der Zellzahlen vermutlich abschwächen.

Bei Patienten mit mildem COVID-19 Verlauf imponierte eine deutlich ausgeprägte Erhöhung der naiven *CD8-positiven Zellen* (Zellzahl-Erhöhung > 50%). Auch bei Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf ergab sich in Summe ein leicht erhöhender bzw. unwesentlicher Einfluss der Erkrankung auf die Zellpopulation. Die naiven CD8-positiven Zellen waren dementsprechend die einzige Subpopulation, welche sich unter einer COVID-19 Erkrankung zunehmend zeigten. Dies könnte mit einer vermehrten Bildung von naiven, zytotoxischen T-Zellen einhergehen, da diese im Rahmen der Entzündungsreaktion rasch ins Gewebe rekrutiert und verbraucht werden. Interessant ist insofern die stärkere Erhöhung bei milder COVID-19 Erkrankung im Vergleich zum schweren COVID-19 Verlauf; dies könnte durch ein vermindertes regeneratives Potential des Knochenmarks im Rahmen einer schweren Entzündungsreaktion oder eines Zytokin-Release-Syndroms verursacht sein.

Die *CD8-positiven Subgruppen* der memory, central memory, effector memory, effector memory RA+, exhausted, regulatorischen und Interleukin2-Rezeptor-positiven Zellen zeigten sich ebenfalls erniedrigt. Genauer konnte eine stärkere Verminderung bei schweren COVID-19 Verläufen im Vergleich zum milden COVID-19 Verlauf beobachtet werden. Eine Ausnahme bilden die late CD8-positiven Zellen, welche sich bei einem milden COVID-19 Verlauf stärker erniedrigt zeigten als bei einem schweren COVID-19 Verlauf. Dies könnte auf einer vermehrten Progression von early und intermediate CD8-positiven Zellen beruhen, welche im Rahmen der

Infektion und Antigen-Kontakt eine Seneszenz durchlaufen. Da der Messzeitpunkt bei den Patienten jedoch im Rahmen der Erstdiagnose erfolgte, wäre eine ausgeprägte Konvertierung von CD8- positiven Zellen in einen „erschöpften“ Zustand erst in späteren Stadien der Inflamationsreaktion zu erwarten. Zudem zeigt sich nur ein geringer Unterschied der Konfidenzintervalle, sodass allgemein von einem moderaten, negativen Einfluss der COVID-19 Erkrankung auf die late CD8-positiven Zellen ausgegangen werden kann.

Bei den *CD4-positiven Subpopulationen* zeigt sich durchgehend für die Populationen sowohl der naiven, memory, central memory, effector memory, effector memory RA+, Interleukin-2-Rezeptor-positiven Zellen, als auch für die regulatorischen und für die Th1-, Th2- und Th17-Helferzellen ein negativer Einfluss durch eine milde COVID-19 Erkrankung. Der Einfluss der schweren COVID-19 Erkrankung hat im Vergleich zum milden COVID-19 Verlauf durchgehend einen stärkeren negativen Einfluss auf die Lymphozytenzahlen. Dies passt gut zum Vorgang der ablaufenden Immunreaktion bei einer COVID-19 Infektion, da CD4-positive Helferzellen einen wichtigen Bestandteil der koordinierten Immunantwort darstellen, aber auch in der Rekrutierung von weiteren Immunzellen eine wichtige Rolle spielen. Somit erfolgt bei einer stärkeren Immunreaktion auch eine vermehrte Rekrutierung von Immunzellen. Diese sind wiederum selbst in der Lage, im Sinne eines selbst verstärkenden Mechanismus durch Ausschüttung von Zytokinen, Interleukinen und Mediatoren weitere Lymphozyten zu rekrutieren.

Bei Analyse der *NK-Zellen* ergab sich eine COVID-19 abhängige Verminderung der Zellzahlen, sowohl bei den Gesamtzahlen als auch in den einzelnen Subpopulationen der CD56- CD16-doppeltpositiven, der CD56dim CD16bright- und der CD56bright CD16dim- Populationen. Auch die NKT- Zellen zeigten sich in Abhängigkeit einer COVID-19 Erkrankung vermindert. Dabei zeigten sich die Zellzahlen bei einem schweren COVID-19 Verlauf stärker und signifikant vermindert, während bei einem moderaten COVID-19 Verlauf eine Tendenz, jedoch keine statistisch signifikante Verminderung der Zellzahlen identifiziert werden konnte. Dies könnte aufgrund einer verstärkten Migration ins SARS-CoV-2 infizierte Gewebe bedingt sein, da NK-Zellen ein wichtiger Mediator des unspezifischen Immunsystems sind^{44,93}. Auffallend ist zudem die COVID-19 abhängige Zellzahl-Verminderung, welche über alle Subpopulationen hinweg gleichmäßig ausfällt. Dies spricht für eine Einbindung sowohl der zytotoxischen CD56dim CD16bright-, als auch der nicht-direkt zytotoxischen, Zytokin-produzierenden CD56bright CD16dim- Populationen, aber auch der CD56- CD16 doppelt-positiven Populationen in die akute Immunreaktion zur Abwehr der SARS-CoV-2 Infektion. Die wichtige Rolle der NK-Zellen im Rahmen der COVID-19 Immunreaktion, eine Verminderung der Zellzahlen im Rahmen einer COVID-19 Erkrankung, sowie die Beteiligung an einer Überaktivierung im Rahmen eines

Zytokin-Release-Syndroms, wurden in der Literatur ebenfalls beschrieben und zeigen sich passend zu den erhobenen Daten⁹⁴. Ferner konnte eine zunehmende Erschöpfung der NK-Zell Populationen im Rahmen einer SARS-CoV-2 Infektion beobachtet werden; die Erschöpfung der NK-Zellen wurde zudem als prognostisch relevant für die COVID-19 Erkrankung beschrieben⁹⁵.

4.1.2 Geschlechterspezifischer Einfluss

Die Analyse des geschlechterspezifischen Einflusses auf die Zellzahlen der *Lymphozyten-Hauptgruppen* ergab höhere Lymphozyten-Zellzahlen bei Probanden mit weiblichem Geschlecht. Dieser Unterschied konnte für die Gesamtzahl der Leukozyten, aber auch die Populationen der CD3-, CD4- und CD8- positiven Zellen, sowie der B- und NK-Zellen identifiziert werden. Dabei zeigte sich der Einfluss bei CD4-positiven Zellen am stärksten ausgeprägt. Dies ist im Einklang mit Voruntersuchungen, in denen bei weiblichen Patienten eine höhere CD4- Zellzahl beschrieben wurde. Eine Kausalität zwischen höheren CD4-positiven Zellzahlen, sowie dem vermehrten Auftreten von Autoimmunerkrankungen bei weiblichen Personen wird bereits in der Literatur diskutiert⁹⁶.

Die Analyse der *CD8-positiven Subgruppen* ergab gesteigerte Zellzahlen für die naiven, central memory, early und intermediären Zellpopulationen, während sich die Subgruppen der late, terminal effector und regulatorischen Zellen im Vergleich zum männlichen Geschlecht vermindert zeigten. Dieser Trend konnte auch für die *CD4-positiven Subgruppen* identifiziert werden; hier zeigten sich die Zellzahlen der naiven, central memory, sowie Th2- und Th17- Zellen bei weiblichen Patienten im Vergleich zu Patienten mit männlichem Geschlecht erhöht. CD8-positive effector memory RA+ - Zellen, sowie Th1- Zellen zeigten sich hingegen leicht vermindert.

Auch bei den *B-Zell Subpopulationen* zeigten sich vor Allem die naiven B Zellen, sowie die class-switched memory Zellen bei weiblichen Patienten im Vergleich zu männlichen Patienten erhöht.

Bei *weiblichen Probanden* waren somit gesteigerte Lymphozyten-Zellzahlen zu erkennen, wobei der Unterschied insbesondere im Bereich der naiven Lymphozyten-Subpopulationen deutlich erkennbar war. Ferner wurde bei Frauen eine höhere Anzahl von CD4- positiven Zellen bereits in der Literatur beschrieben^{97,98}. Weiterhin könnten die geschlechterspezifischen Unterschiede des Hormonhaushaltes eine Rolle spielen. Es wurde bereits gezeigt, dass der Menstruationszyklus

einen signifikanten Einfluss auf das zelluläre Immunsystem hat. Dies liegt in der Ausstattung von T Zellen mit Östrogen- und Progesteron- Rezeptoren, sowie den direkten Effekten von Sexualhormonen auf den Zellkern von Lymphozyten begründet⁹⁹. Auch bei postmenopausalen Frauen führen die Veränderungen im Hormonhaushalt zu verminderten CD4- positiven und B- Zellzahlen, während die CD8- positiven Zellzahlen gesteigert sind.

Bei Betrachtung der Subgruppen der NK-Zellen konnte kein geschlechtsspezifischer Einfluss identifiziert werden; die Zellzahlen unterschieden sich sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse nicht signifikant.

4.1.3 Einfluss des Alters

Die statistische Analyse ergab in der univariaten Analyse einen signifikanten Einfluss des Patientenalters auf CD3- und insbesondere CD8- positive Zellen mit verminderten Zellzahlen bei ansteigendem Alter. Dieser Effekt konnte in der multivariaten Analyse bestätigt werden: Mit zunehmendem Alter ergab sich ein negativer Einfluss auf die *Lymphozyten-Hauptgruppen*. Sowohl die Gesamt-Leukozytenzahl als auch die CD3-, CD4-, und CD8- positiven Zellen, aber auch die B- und NK- Zellpopulationen zeigten sich mit zunehmendem Alter vermindert. Dabei war der Einfluss auf die CD8- positiven Zellen am deutlichsten durch das zunehmende Alter negativ beeinflusst.

Bei der Subgruppenanalyse fiel insbesondere eine Zellzahl-Reduktion bei naiven, central memory, sowie early und intermediären *CD8- positiven Zellen* auf. Die Subgruppe der regulatorischen und Interleukin-2- positiven Zellpopulationen hingegen zeigten sich mit zunehmendem Alter ansteigend. Dies ist im Einklang mit Daten aus der Literatur, in der eine zunehmende Seneszenz insbesondere von CD8- positiven T Zellen mit Abnahme der naiven Zellpopulationen beschrieben wurde¹⁰⁰.

Die Analyse der *CD4- positiven Untergruppen* ergab einen negativen Einfluss des zunehmenden Alters bei naiven, central memory, sowie Interleukin-2-Rezeptor-positiven Zellzahlen. Die Subgruppen der Th1- und Th2- Zellpopulationen zeigten sich hingegen erhöht; der stärkste Einfluss ergab sich jedoch für die effector memory RA+ - Zellen. Eine Erhöhung der CD4- EMRA Zellpopulation unter persistierender CMV - Infektion bei älteren Patienten wurde in der Literatur bereits beschrieben¹⁰¹. Diese Daten passen gut zu unseren Ergebnissen, da bei einer

Seroprävalenz der Allgemeinbevölkerung von ~ 83% auch in unserem Patientenkollektiv CMV-seropositive Patienten eingeschlossen wurden. Auf eine persistierende oder durchgemachte CMV-Infektion wurde jedoch in dieser Studie nicht getestet. Das Absinken der T Zellzahlen in Abhängigkeit vom Alter ist überdies in vielen Veröffentlichungen vorbeschrieben¹⁰²⁻¹⁰⁴ und wird hauptsächlich durch die Thymus-Involution und die begleitende Dysregulation der epithelialen Struktur der Thymus-Zellen verursacht^{105,106}.

Die *B Zellpopulationen* zeigten sich altersabhängig leicht erniedrigt für die naiven, non class-switched memory und transitionalen Subgruppen. Lediglich die class-switched memory Zellzahlen zeigten sich mit zunehmendem Alter leicht steigend. Die Verringerung der naiven, sowie non-class switched memory B Zellen könnte durch die Rekrutierung zum Ort des Infektionsgeschehens und damit erhöhtem Verbrauch bedingt sein. Zudem könnten sich die ersten memory B Zellen bereits in einer beginnenden Transition von non-class switched zu class-switched befinden. Aufgrund fehlender Messungen im Verlauf der akuten COVID-19 Infektion konnte die Hypothese in dieser Studie jedoch nicht weiterverfolgt werden.

Für fast alle Subgruppen der *NK-Zellen* zeigte sich durchgehend ein negativer Einfluss des Patientenalters auf die Zellzahlen. Der stärkste Effekt konnte für die Subpopulationen der Zytokin-produzierenden CD56bright CD16dim- und der zytotoxischen CD56dim CD16bright-Zellen identifiziert werden; dieser war zudem statistisch signifikant. NKT-Zellen zeigten sich hingegen altersabhängig nicht verändert. Im Rahmen der Alterung ist eine Seneszenz und Dysfunktion von NK-Zellen bereits identifiziert worden. Die Dysfunktion geht mit einer Verminderung von Zytokin-produzierenden und zytotoxischen NK-Zellen einher und trägt ferner zu einer chronischen, leichtgradigen Inflammation („Inflamming“) bei. Eine Rolle dieses NK-spezifischen Immundefektes in der Entstehung von chronischen Erkrankungen wie Krebs, Alzheimer oder kardiovaskulären Erkrankungen wird zusätzlich postuliert¹⁰⁷.

Zusammenfassend konnte in der durchgeführten Studie ein Absinken der Lymphozytenzahlen bei akut erkrankten COVID-19 Patienten, insbesondere bei einem schweren Verlauf, identifiziert werden. Insbesondere die zytotoxischen T Zellen, sowie die B- und NK-Zellen zeigten sich bei den eingeschlossenen COVID-19 Patienten erniedrigt. Dieser Trend wurde in der Analyse der Subgruppen für viele Lymphozyten-Subpopulationen bestätigt. Darüber hinaus wurde der Einfluss einer COVID-19 Erkrankung auf die Lymphozytenzahlen in einer multivariaten Analyse untersucht und hier auch unabhängig vom Einfluss des Alters und des Geschlechts bestätigt. Da SARS-CoV-2 vor Allem zu Beginn der Pandemie in einer Situation ohne wirksamen Impfstoff bei älteren Patienten zu einem schweren COVID-19 Verlauf führte, ist es wichtig, das Alter als

zusätzlichen Einflussfaktor insbesondere auf CD4- und CD8- positive Lymphozyten zu berücksichtigen. Ferner muss eine Verminderung von insbesondere CD3- und CD8- positiven Lymphozyten bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Patienten bei der Interpretation von Lymphozytenzahlen im Kontext einer COVID-19 Erkrankung berücksichtigt werden.

4.2 Zellulärer Immunstatus bei COVID-19 Rekonvaleszenten

Die transiente Lymphozytopenie während einer akuten COVID-19 Infektion wirft die Frage auf, ob auch eine längerfristige Beeinträchtigung der Lymphozytenzahlen zu einer Einschränkung der zellulären Immunantwort und somit zu einem sekundären Immundefekt mit einhergehendem Infektionsrisiko führt. Daher wurden die Zellzahlen für B-, T- und NK- Zellen und ihren Subgruppen bei 44 COVID-19 Rekonvaleszenten überprüft und mit einer gesunden, alters- und geschlechtsspezifisch gematchten Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund des Matchings hinsichtlich des Alters und des Geschlechts wurde auf eine multivariate Analyse der erhobenen Daten verzichtet. Es konnte nach überstandener COVID-19 Infektion eine signifikante Verminderung der Zellzahlen in der Anzahl der aktivierten CD8- positiven T Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden (CD8+/ HLA-DR+ und CD8+/ CD69+). Dies ist vermutlich auf das akute Infektionsgeschehen im Verlauf der COVID19-Erkrankung zurückzuführen und stimmt mit den Ergebnissen von anderen Studien überein. In einer post-COVID-19 Studie von Feargal et al.¹⁰⁸ wurde das Immunsystem von insgesamt 69 Patienten nach einer durchgemachten SARS-CoV-2 Infektion im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe für insgesamt 24 Wochen untersucht. Hier konnte ebenfalls eine transiente Reduktion von Lymphozyten, insbesondere von unter Anderem T Helferzellen und regulatorischen T Zellen, aber auch NK-Zellen, Neutrophilen Granulozyten und CXCR3- positiven Monozyten beobachtet werden. Dabei wurden die niedrigsten Lymphozytenwerte 12 und 16 Wochen nach Ablauf des akuten Infektionsgeschehens erhoben¹⁰⁸.

In der vorliegenden Studie wurden COVID-19 Rekonvaleszenten eingeschlossen, deren Ende der Symptomatik 4 Wochen (27 [13-45] Tage) zurücklag. Leider konnten studienbedingt keine Folgeuntersuchungen durchgeführt werden, sodass keine Aussage über die Entwicklung der Lymphozyten-Zellzahlen der eingeschlossenen Probanden getroffen werden kann; es wäre jedoch eine weitere Verminderung der Lymphozyten-Subpopulationen nach durchgemachter COVID-19 Erkrankung möglich. In der Studie von Feargal et al. zeigten sich Symptome wie Fatigue auch

nach durchgemachter SARS-CoV-2 Infektion für längere Zeit persistierend (Long-COVID). Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden; alle eingeschlossenen COVID-19 Rekonvaleszenten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme und durchflusszytometrischen Analyse symptomfrei.

Die Subgruppenanalyse ergab signifikante Veränderungen der Lymphozytenzahlen bei COVID-19 Patienten mit Fieber im Vergleich zu Patienten ohne Fieber, mit niedrigeren Werten insbesondere der CD8⁺ memory, central memory, sowie intermediate, late und terminal effector CD8⁺ positiven Zellen. Die Subpopulationen der CD8⁺ positiven Lymphozyten spielen in der Immunreaktion gegen das SARS-CoV-2 – Virus eine entscheidende Rolle¹⁰⁹. Fieber kann überdies Ausdruck einer systemischen Reaktion des Organismus auf das Infektionsgeschehen sein¹¹⁰. Dies könnte für einen erhöhten Verbrauch oder für eine Migration von Lymphozyten zum Ort der Infektion und eine damit einhergehende Reduktion der Lymphozytenzahlen im peripheren Blut sprechen. Als Limitation der Studie ist der variable Zeitpunkt zwischen Genesung und Messzeitpunkt zu nennen (13-45 Tage). Darüber hinaus gibt es keine weiteren Verlaufskontrollen, sodass die Frage einer vollständigen Rekonstitution des Immunsystems bei Patienten mit Fieber im Vergleich zu Patienten ohne Fieber nicht vollumfänglich erfasst wurde.

Im Vergleich der Patientenkohorte mit Fieber zur gesunden Kontrollgruppe ergaben sich ferner signifikant niedrigere Zellzahlen bei den regulatorischen und Interleukin-2-Rezeptor-positiven Lymphozyten. Insbesondere die erniedrigten Zellzahlen von memory- und regulatorischen T-Zellen könnten von prognostischer klinischer Bedeutung sein, da in Studien nach Infektion mit nicht-Coronaviren, wie zum Beispiel dem Masern-Virus, Langzeit-Veränderungen beobachtet wurden, die mit einer Immunschwäche und erhöhter Sterblichkeit einhergehen^{74,75}. Somit kann aufgrund des eingeschlossenen Patientenkollektivs ein längerfristiger zellulärer Immundefekt nach einer durchgemachten SARS-CoV-2 Infektion auf Basis der erhobenen Daten dieser Studie nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In der Geschlechter-spezifischen Analyse zeigten sich signifikant niedrigere naive CD8⁺ positive T Zellzahlen bei männlichen Rekonvaleszenten im Vergleich zu weiblichen Rekonvaleszenten. Dieser Befund zeigte sich passend zu der multivariaten Analyse bei akut erkrankten COVID-19 – Patienten, bei denen ein Einfluss des weiblichen Geschlechts auf die naiven CD8⁺ und CD4⁺ positiven T Zellen beobachtet wurde. Auch die naiven CD4⁺ positiven T Zellzahlen zeigten sich bei den weiblichen Rekonvaleszenten im Vergleich zu den männlichen Probanden erhöht; der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die Ergebnisse sind jedoch nur eingeschränkt interpretierbar, da sich die männliche und weibliche Kohorte im Alter signifikant

unterschied (männlich 47 vs. weiblich 33 Jahre). Eine Erhöhung der naiven T-Zellzahlen bei weiblichen Probanden kann somit durch das jüngere Alter beeinflusst worden sein.

Zusätzlich konnte in der durchgeführten Studie ein Anstieg von COVID-19 spezifischen Antikörpern nach durchgemachter SARS-CoV-2 Infektion im Sinne einer Reaktion des humoralen Immunsystems festgestellt werden; eine quantitative Veränderung der B-Zellpopulationen wurde jedoch nicht beobachtet. Das Ergebnis ist mit den Daten aus einer Publikation von Jääskeläinen et al. vergleichbar, in welcher bei 39 COVID-19 Patienten einen Anstieg der SARS-CoV-2 - spezifischen IgG- und IgA- Antikörper 11-12 Tage nach Symptombeginn identifiziert werden konnte⁷⁷. Leider wurde sich hier auf die Untersuchung des humoralen Immunsystems beschränkt, sodass in dieser Studie keine korrelierenden Daten zu B-Zell Subpopulationen erhoben wurden und somit kein direkter Vergleich zu den Daten der vorliegenden Studie möglich ist.

Zusammenfassend ergab sich in dieser Studie bei COVID-19 Rekonvaleszenten kein Hinweis auf einen längerfristigen zellulären Immundefekt nach einer durchgemachten COVID-19 Erkrankung. Es konnte jedoch ein signifikanter Alters- und geschlechtsspezifischer, negativer Einfluss auf die Lymphozytenzahlen identifiziert werden. Dieser steht einem eher geringen negativen Einfluss der COVID-19 Erkrankung auf die Lymphozyten-Zellzahlen gegenüber und wird im Rahmen der aus der Literatur bekannten Veränderungen der Lymphozyten-Subgruppen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht gewertet. Ein längerfristiger Immundefekt aufgrund einer Kompromittierung des zellulären Immunsystems nach durchgemachter SARS-CoV-2 Infektion kann somit nicht ausgeschlossen werden; jedoch erscheint ein längerfristiger zellulärer Immundefekt, wie bereits von anderen Erkrankungen wie der Masernvirus-Infektion bekannt, eher unwahrscheinlich.

4.3 Limitationen

Die Studienkohorte, in welcher die akute Infektionsphase von COVID-19 analysiert wurde, hat einige Limitationen. Die Untersuchung war auf erwachsene Personen beschränkt; daher sind die Ergebnisse nicht auf Kinder übertragbar. Weiterhin ist die Gesamtzahl der Patienten limitiert; insbesondere in der Untergruppe der moderat erkrankten COVID-19 Patienten konnte nur eine geringe Zahl von Probanden rekrutiert werden. Dies ist insbesondere auf die rückläufigen Infektionszahlen im Sommer 2020, sowie die Kontaktbeschränkungen im Rahmen des zweiten „Lock-Downs“ ab November 2020 bedingt, sodass keine weitere Rekrutierung von akut an COVID-19 erkrankten Patienten erfolgen konnte. Vielmehr zeigte das Virus bereits hier erste mutagene Veränderungen; in der Dynamik des Infektionsgeschehens nahm der Anteil an Infektionen mit „Variants of Concern“ zu. Da auch Veränderungen in Übertragung und Immun-Evasion zu beobachten waren, wurde die Rekrutierung von Patienten auf die erste SARS-CoV-2 Infektionswelle beschränkt. Zusätzlich konnte keine ausreichende Anzahl an Messungen im Krankheitsverlauf erhoben werden, da insbesondere moderat erkrankte Patienten nicht zwingend hospitalisiert wurden. Somit kann in dieser Studie keine Aussage bezüglich Veränderungen des zellulären Immunsystems während des COVID-19 Krankheitsverlaufs getroffen werden.

Auch methodisch ergaben sich Limitationen in der durchgeführten Studie. Die Erhebung des zellulären Immunstatus erfolgte analog der ONE-Studie. Die regulatorischen T-Zellen wurden daher mit Hilfe von CD25 und FOXP3 identifiziert. Dies wird in der Literatur kritisch diskutiert, da auch eine Identifizierung über CD25⁺ und CD127^{low} – exprimierende Zellen beschrieben ist¹¹¹. Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass es hierdurch in der Gesamtzahl der Lymphozyten-Subpopulationen zu Unterschieden kommt; zusätzlich konnten in unseren internen Untersuchungen vergleichbare Lymphozyten- Zellzahlen detektiert werden.

In dieser Studie wurde ein Durchflusszytometer (FC500, Fa. Beckman Coulter) verwendet, welches 5 unterschiedliche Fluorochrome gleichzeitig detektieren kann. Daher wurden pro Patientenprobe insgesamt 7 Ansätze mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Fluorochrom-markierten Antikörpern benötigt, um die Lymphozyten-Subpopulationen umfassend zu identifizieren. Hierdurch ergaben sich methodisch bedingt Schwankungen in der eingesetzten Zellzahl pro Ansatz. Die Zellzahlen pro Ansatz wurden daher durch den Einsatz von speziell beschichteten „Microbeads“ (Flow-Count Fluorospheres, Fa. Beckman Coulter) zur Bestimmung der Zellkonzentration in dem jeweiligen Ansatz kontrolliert und die Messung wurde bei starken Schwankungen der Zellzahlen über 2% wiederholt.

Aufgrund des Studiendesigns konnten die NK-Zellen nicht auf Seneszenz-Marker untersucht werden, sodass lediglich die Analyse von 3 verschiedenen NK-Subpopulationen erfolgte. Die genaue Analyse von NK-Zell Seneszenz, sowie die Identifikation von naiven oder effector- NK-Subpopulationen im Kontext der Covid-19 Erkrankung ist Gegenstand von zukünftigen Studien.

Auch für die Studienkohorte der COVID-19 Rekonvaleszenten in dieser Promotionsarbeit sind Limitationen zu nennen: Es wurden hauptsächlich erwachsene COVID-19 Rekonvaleszenten untersucht, die einen milden Verlauf der Erkrankung erlitten. Auch wenn diese Patientengruppe mit ca. 80% die Mehrheit der COVID-19 Patienten darstellt²³, lassen sich die Ergebnisse nicht auf schwere COVID-19 Verläufe, auf Kinder oder auf ältere Patienten übertragen.

Aufgrund des Studiendesigns sowie der Patientenrekrutierung konnten zudem keine Lymphozyten-Zellzahlen der Rekonvaleszenten während des akuten COVID-19 Krankheitsverlaufs erhoben werden, sodass keine Aussagen bezüglich des zeitlichen Verlaufs getroffen werden können.

Die eingeschlossenen Probanden stellten sich im Rahmen einer Studie zur Applikation von Rekonvaleszenten-Blutplasma am Universitätsklinikum in Augsburg vor. Voraussetzung hierfür war die Symptommfreiheit und das körperliche Wohlbefinden. Hierdurch konnten keine Patienten für die Studie rekrutiert werden, welche unter eine post-COVID Symptomatik litten. Die Beeinträchtigung des zellulären Immunsystems bei Patienten, die nach durchgemachter Infektion an anhaltenden Symptomen leiden, ist daher Gegenstand von zukünftigen Studien.

4.4 Schlussfolgerung und Perspektiven

In dieser Studie wurden die Auswirkungen einer SARS-CoV-2 Infektion auf den zellulären Immunstatus sowohl bei Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung als auch bei COVID-19 Rekonvaleszenten untersucht. Die identifizierten Veränderungen der Lymphozyten-Subpopulationen waren dabei vergleichbar mit dem Ablauf eines Infektionsgeschehens, wie es bereits von anderen viralen Erkrankungen bekannt ist. Aufgrund der erhobenen Daten ist nicht davon auszugehen, dass die SARS-CoV-2 Infektion sowohl in Rahmen der akuten Entzündungsreaktion als auch nach abgelaufenem Infektionsgeschehen für einen tiefergreifenden Defekt des zellulären Immunsystems verantwortlich ist.

COVID-19 als neuartige Erkrankung stellt die Gesundheitssysteme sowohl im akuten Erkrankungsgeschehen als auch nach Ablauf der Infektion weltweit vor große Herausforderungen. Anhaltende Beschwerden nach durchgemachter SARS-CoV-2 Infektion werden als Long COVID Syndrom bezeichnet und sind Inhalt von weiteren Studien¹¹²⁻¹¹⁴. In dieser Studie konnte kein Hinweis auf eine längerfristige Beeinträchtigung des zellulären Immunsystems identifiziert werden. Diese Ergebnisse können für zukünftige Behandlungsstrategien eine entscheidende Rolle spielen: Insbesondere zu Beginn der Pandemie wurde durch kontaktbeschränkende Maßnahmen versucht, die Ausbreitung des Virus einzudämmen. Diese Maßnahmen hatten große Auswirkungen auf das Leben vieler Menschen mit entsprechenden negativen Konsequenzen auf die mentale und physische Gesundheit¹¹⁵.

Eine Strategie zur Kontrolle der SARS-CoV-2 Pandemie könnte somit der Aufbau einer Herdenimmunität der Bevölkerung darstellen. Indem eine Grundimmunität durch Impfungen und Durchseuchung der Bevölkerung aufbaut, könnte das pandemische Geschehen kontrollierbar werden. Eine vollständige Ausrottung des SARS-CoV-2 Virus, aber auch ein Übergang in eine endemische Situation, wie von den Influenza-Viren bekannt, sind hierbei denkbare Szenarien.

Weiterhin ist eine suffiziente Risikoeinschätzung von Patienten bei Erstdiagnose der akuten COVID-19 Erkrankung essenziell. Bei der Interpretation von Laborwerten und Blutbildern spielen die Leukozyten-Zellzahlen eine wichtige Rolle. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass nicht nur der Verlauf einer COVID-19 Erkrankung, sondern auch das Alter und das Geschlecht der Patienten bei Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Diese Studie leistet somit einen Beitrag zum besseren Verständnis der kurz- und mittelfristigen Auswirkungen einer SARS-CoV-2 Infektion auf das zelluläre Immunsystem.

Perspektivisch ergeben sich auf Basis dieser Arbeit weiterführende Fragestellungen. In dieser Studie erfolgte die Erhebung des zellulären Immunstatus bei akuten COVID-19 Patienten unmittelbar nach der Erstdiagnose bei Vorstellung in der Notaufnahme des Universitätsklinikums in Augsburg. Weiterhin wurde ein Patientenkollektiv untersucht, welches nach durchgemachter COVID-19 Erkrankung bei Symptommfreiheit zur Plasmaspende am Universitätsklinikum vorstellig wurde. Eine tiefergreifende Analyse der Lymphozyten-Zellzahlen im Verlauf der COVID-19 Erkrankung von Erstdiagnose bis zur Rekonvaleszenz, sowie in definierten Zeiträumen nach durchgemachter Erkrankung würde ein besseres Verständnis der Dynamik des Immunsystems im Rahmen einer SARS-CoV-2 Infektion ermöglichen. Zudem könnte auf Basis dieser Daten eine Risiko-Klassifizierung entwickelt werden, welcher die bessere Triagierung von Patienten bei COVID-19 Erstdiagnose ermöglicht, bei denen das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf erhöht ist.

Des Weiteren wurden in die Kohorte der COVID-19 Rekonvaleszenten Probanden eingeschlossen, welche zum Zeitpunkt der Messung von Symptommfreiheit berichteten. Somit konnten Patienten mit persistierender Symptomatik nach durchgemachter Erkrankung, welche allgemein unter dem Long-COVID Syndrom zusammengefasst werden, nicht untersucht werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die Fragestellung, ob eine Symptom-Persistenz nach SARS-CoV-2 Infektion auch mit Beeinträchtigungen Immunsystems einhergeht. Eine Analyse des zellulären Immunstatus bei Long-COVID Patienten könnte daher einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathogenese des Long-COVID – Syndroms leisten.

Im Verlauf der COVID-19 Pandemie konnte sowohl auf Ebene der viralen SARS-CoV-2 RNA, als auch klinisch eine Dynamik des Infektionsgeschehens beobachtet werden. Dies wurde maßgeblich durch die Bildung von Variants of Concern des SARS-CoV-2 Virus verursacht und führte zu einer veränderten Wirksamkeit von Gegenmaßnahmen wie Diagnostika, Impfungen und Medikamenten. Zudem unterlagen Faktoren wie Virulenz, Übertragbarkeit und Letalität einer zeitlichen Veränderung. Eine Analyse des zellulären Immunstatus von COVID-19 Patienten im weiteren Pandemieverlauf könnte daher das bessere Verständnis der Veränderungen einer Infektion mit VOC auf das zelluläre Immunsystem ermöglichen.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung der Studien zum zellulären Immunstatus bei akuten COVID-19 Patienten und COVID-19 Rekonvaleszenten

Der Ausbruch der neuartigen Atemwegserkrankung COVID-19 im Dezember 2019 in China mit weltweiter, pandemischer Ausbreitung führt zu der Frage, ob eine Infektion mit dem SARS-CoV-2 Virus mit Veränderungen des zellulären Immunstatus bei Patienten sowohl in der akuten Erkrankungsphase unmittelbar nach der Infektion als auch nach durchgemachter COVID-19 Erkrankung einhergeht. In dieser Studie wurde der zelluläre Immunstatus bei Patienten mit akut diagnostizierter SARS-CoV-2 Infektion, sowie bei COVID-19 Rekonvaleszenten erhoben.

Methodisch konnten 36 verschiedene Subpopulationen aus T-, B- und NK- Zellen mittels Immunphänotypisierung identifiziert werden. Untersucht wurde peripheres Blut von Patienten bei Erstdiagnose einer SARS-CoV-2 Infektion, sowie bei COVID-19 Rekonvaleszenten im Rahmen einer Plasmaspende am Universitätsklinikum in Augsburg.

Als Ergebnis konnten insgesamt 33 Patienten mit akuter COVID-19 Erkrankung in die Studie eingeschlossen werden. Die univariate Analyse zeigte eine Reduktion der Zellzahlen von zytotoxischen T-Zellen, B- und NK-Zellen bei mildem und schwerem COVID-19 Verlauf. Diese Ergebnisse wurden in einer multivariaten Analyse bestätigt, es zeigte sich zusätzlich eine Alters- und geschlechtsabhängige Reduktion der Zellzahlen, insbesondere der T-Lymphozyten.

Weiterhin konnten insgesamt 44 COVID-19 Rekonvaleszenten mit je einem Alters- und geschlechtsspezifisch gematchtem Probanden einer präpandemischen, gesunden Kontrollgruppe in die Studie eingeschlossen werden. Hier zeigte sich eine Zellzahlreduktion vor Allem bei den aktivierten, zytotoxischen T-Lymphozyten. Zudem zeigte sich eine Zellzahlreduktion der Lymphozyten bei Probanden mit zunehmendem Alter, sowie männlichem Geschlecht.

Zusammenfassend ist bei einem Absinken der T-, B- und NK- Zellzahlen und Subpopulationen im peripheren Blut bei Patienten mit mildem und insbesondere schwerem COVID-19 Verlauf von einer passageren Immunschwäche auszugehen. Dieser Effekt ist insbesondere bei älteren und männlichen Patienten verstärkt und sollte bei der Behandlung von dieser Patientengruppe beachtet werden, da sich zunehmendes Alter und männliches Geschlecht ebenfalls negativ auf die Lymphozytenzahlen auswirken.

Die Analyse des zellulären Immunstatus von COVID-19 Rekonvaleszenten konnte erniedrigte Zellzahlen bei aktivierten, zytotoxischen T-Zellen identifizieren, welche sich am ehesten aufgrund der abgelaufenen Immunreaktion anhaltend erniedrigt zeigten.

Somit ergaben sich in dieser Studie keine Hinweise auf eine dauerhafte Beeinträchtigung des zellulären Immunsystems nach durchgemachter SARS-CoV-2 Infektion. Diese Studie leistet damit einen Beitrag zum besseren Verständnis der kurz- und mittelfristigen Veränderungen des zellulären Immunsystems nach und während einer SARS-CoV-2 Infektion.

5.2 Summary of studies on cellular immune status in acute COVID-19 patients and COVID-19 convalescents

The December 2019 outbreak of the novel respiratory disease COVID-19 in China, with worldwide pandemic spread, leads to the question whether SARS-CoV-2 virus infection is associated with alterations in cellular immune status of patients both in the acute phase of illness immediately after infection with SARS-CoV-2 virus and after recovery from COVID-19 disease. In this study, cellular immune status was assessed in patients with acutely diagnosed SARS-CoV-2 infection, as well as in COVID-19 convalescents.

Methodologically, 36 different subpopulations of T, B, and NK cells were identified by immunophenotyping. Peripheral blood of patients with first diagnosis of SARS-CoV-2 infection as well as of COVID-19 convalescents in the context of a plasma donation at the University Hospital in Augsburg was examined.

As a result, a total of 33 patients with acute COVID-19 disease were included in the study. Univariate analysis showed a reduction in cell numbers of cytotoxic T, B and NK cells in mild and severe COVID-19. These results were confirmed in multivariate analysis, which additionally showed an age- and sex- dependent reduction of cell numbers, especially of T lymphocytes.

Furthermore, a total of 44 COVID-19 convalescents were included in the study with one age- and sex- specific matched subject each from a pre-pandemic healthy control group. Especially in the subgroup of activated cytotoxic T-lymphocytes a cell count reduction was observed. In addition, a reduction of lymphocyte cell counts was observed in subjects with increasing age and male gender.

In conclusion, a decrease in T, B, and NK cell counts and subpopulations in peripheral blood of patients with mild and especially severe COVID-19 can be assumed due to passive immunodeficiency. This effect is particularly magnified in elderly and male patients and should be considered when treating this group of patients, as increasing age and male gender also negatively affect lymphocyte counts.

Analysis of the cellular immune status of COVID-19 convalescents could identify decreased cell counts in activated cytotoxic T cells, which were most likely to be decreased after expired immune response. Thus, there was no evidence for a permanent impairment of the cellular immune system after SARS-CoV-2 infection. This study contributes to a better understanding of the short- and medium- term changes in the cellular immune system after and during a SARS-CoV-2 infection.

6 Literaturverzeichnis

1. Sohrabi C, Alsafi Z, O'Neill N, et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *Int J Surg.* Apr 2020;76:71-76. doi:10.1016/j.ijsu.2020.02.034
2. Lu H, Stratton CW, Tang Y-W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *Journal of Medical Virology.* 2020;92(4):401-402. doi:<https://doi.org/10.1002/jmv.25678>
3. World Health O. *Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 12.* 2020. 2020-02-01. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330777>
4. World Health O. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 43.* 2020. 2020-03-03. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331354>
5. World Health O. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 51.* 2020. 2020-03-11. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331475>
6. World Health O. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 73.* 2020. 2020-04-02. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331686>
7. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* Apr 2020;26(4):450-452. doi:10.1038/s41591-020-0820-9
8. Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell.* Sep 16 2021;184(19):4848-4856. doi:10.1016/j.cell.2021.08.017
9. Lim PL, Kurup A, Gopalakrishna G, et al. Laboratory-acquired severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* Apr 22 2004;350(17):1740-5. doi:10.1056/NEJMoa032565
10. Sheahan T, Rockx B, Donaldson E, et al. Mechanisms of zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus host range expansion in human airway epithelium. *J Virol.* Mar 2008;82(5):2274-85. doi:10.1128/JVI.02041-07
11. Ge XY, Li JL, Yang XL, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* Nov 28 2013;503(7477):535-8. doi:10.1038/nature12711
12. Singh J, Pandit P, McArthur AG, Banerjee A, Mossman K. Evolutionary trajectory of SARS-CoV-2 and emerging variants. *Virol J.* Aug 13 2021;18(1):166. doi:10.1186/s12985-021-01633-w

13. Cai J, Sun W, Huang J, Gamber M, Wu J, He G. Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China, 2020. *Emerg Infect Dis.* Jun 2020;26(6):1343-1345. doi:10.3201/eid2606.200412
14. Wang H, Li X, Li T, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Sep 2020;39(9):1629-1635. doi:10.1007/s10096-020-03899-4
15. Jin Y, Yang H, Ji W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses.* Mar 27 2020;12(4)doi:10.3390/v12040372
16. Zhu Z, Lian X, Su X, Wu W, Marraro GA, Zeng Y. From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. *Respir Res.* Aug 27 2020;21(1):224. doi:10.1186/s12931-020-01479-w
17. World Health O. Summary of probably SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. WHO. http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/
18. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science.* Oct 10 2003;302(5643):276-8. doi:10.1126/science.1087139
19. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* Aug 2016;14(8):523-34. doi:10.1038/nrmicro.2016.81
20. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *The Lancet.* 2015;386(9997):995-1007. doi:10.1016/s0140-6736(15)60454-8
21. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Outbreak in the Republic of Korea, 2015. *Osong Public Health Res Perspect.* Aug 2015;6(4):269-78. doi:10.1016/j.phrp.2015.08.006
22. Du Z, Xu X, Wu Y, Wang L, Cowling BJ, Meyers LA. Serial Interval of COVID-19 among Publicly Reported Confirmed Cases. *Emerg Infect Dis.* Jun 2020;26(6):1341-1343. doi:10.3201/eid2606.200357
23. Robert-Koch-Institut. Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html?nn=13490888#doc13776792bodyText4
24. Li R, Pei S, Chen B, et al. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science.* May 1 2020;368(6490):489-493. doi:10.1126/science.abb3221

25. Streeck H, Schulte B, Kummerer BM, et al. Infection fatality rate of SARS-CoV2 in a super-spreading event in Germany. *Nat Commun*. Nov 17 2020;11(1):5829. doi:10.1038/s41467-020-19509-y
26. Martinez DA, Hinson JS, Klein EY, et al. SARS-CoV-2 Positivity Rate for Latinos in the Baltimore-Washington, DC Region. *JAMA*. Jul 28 2020;324(4):392-395. doi:10.1001/jama.2020.11374
27. Wadhera RK, Wadhera P, Gaba P, et al. Variation in COVID-19 Hospitalizations and Deaths Across New York City Boroughs. *JAMA*. Jun 2 2020;323(21):2192-2195. doi:10.1001/jama.2020.7197
28. Baggett TP, Keyes H, Sporn N, Gaeta JM. Prevalence of SARS-CoV-2 Infection in Residents of a Large Homeless Shelter in Boston. *JAMA*. Jun 2 2020;323(21):2191-2192. doi:10.1001/jama.2020.6887
29. Ing AJ, Cocks C, Green JP. COVID-19: in the footsteps of Ernest Shackleton. *Thorax*. Aug 2020;75(8):693-694. doi:10.1136/thoraxjnl-2020-215091
30. Onder G, Rezza G, Brusaferro S. Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. *JAMA*. May 12 2020;323(18):1775-1776. doi:10.1001/jama.2020.4683
31. Meyerowitz-Katz G, Merone L. A systematic review and meta-analysis of published research data on COVID-19 infection fatality rates. *Int J Infect Dis*. Dec 2020;101:138-148. doi:10.1016/j.ijid.2020.09.1464
32. Levin AT, Hanage WP, Owusu-Boaitey N, Cochran KB, Walsh SP, Meyerowitz-Katz G. Assessing the age specificity of infection fatality rates for COVID-19: systematic review, meta-analysis, and public policy implications. *Eur J Epidemiol*. Dec 2020;35(12):1123-1138. doi:10.1007/s10654-020-00698-1
33. Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol*. Mar-Apr 2011;8(2):270-9. doi:10.4161/rna.8.2.15013
34. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. Feb 22 2020;395(10224):565-574. doi:10.1016/s0140-6736(20)30251-8
35. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res*. Jan 4 2018;46(D1):D708-D717. doi:10.1093/nar/gkx932
36. Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 28 2020;117(17):9241-9243. doi:10.1073/pnas.2004999117

37. World Health O. Tracking SARS-CoV-2 variants. Updated 2023-02-09. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
38. Galloway SE, Paul P, MacCannell DR, et al. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* Jan 22 2021;70(3):95-99. doi:10.15585/mmwr.mm7003e2
39. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature.* Mar 9 2021;doi:10.1038/s41586-021-03402-9
40. Sabino EC, Buss LF, Carvalho MPS, et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *Lancet.* Feb 6 2021;397(10273):452-455. doi:10.1016/S0140-6736(21)00183-5
41. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* Feb 15 2020;395(10223):507-513. doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7
42. Wang Y, Grunewald M, Perlman S. Coronaviruses: An Updated Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2020;2203:1-29. doi:10.1007/978-1-0716-0900-2_1
43. Schaller T, Hirschbuhl K, Burkhardt K, et al. Postmortem Examination of Patients With COVID-19. *JAMA.* May 21 2020;doi:10.1001/jama.2020.8907
44. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* Apr 2020;8(4):420-422. doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X
45. Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* Aug 2005;11(8):875-9. doi:10.1038/nm1267
46. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA.* 2020;324(8):782-793. doi:10.1001/jama.2020.12839
47. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol.* Jul 1 2020;5(7):802-810. doi:10.1001/jamacardio.2020.0950
48. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet.* May 2 2020;395(10234):1417-1418. doi:10.1016/S0140-6736(20)30937-5

49. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci.* Feb 2021;24(2):168-175. doi:10.1038/s41593-020-00758-5
50. Li H, Liu L, Zhang D, et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet.* May 9 2020;395(10235):1517-1520. doi:10.1016/S0140-6736(20)30920-X
51. Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* Jul 28 2020;71(15):762-768. doi:10.1093/cid/ciaa248
52. Diao B, Wang C, Tan Y, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 2020;11:827. doi:10.3389/fimmu.2020.00827
53. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. *Ann Intern Med.* Jun 2 2020;172(11):726-734. doi:10.7326/M20-1301
54. Robert-Koch-Institut. Hinweise zur Testung von Patienten auf Infektion mit dem neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2; Stand: 13.01.2021. Accessed 2021-03-12, 2021. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html
55. Kipkorir V, Cheruiyot I, Ngure B, Misiani M, Munguti J. Prolonged SARS-CoV-2 RNA detection in anal/rectal swabs and stool specimens in COVID-19 patients after negative conversion in nasopharyngeal RT-PCR test. *J Med Virol.* Nov 2020;92(11):2328-2331. doi:10.1002/jmv.26007
56. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* Jan 2020;25(3)doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
57. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA.* May 26 2020;323(20):2052-2059. doi:10.1001/jama.2020.6775
58. Seah I, Agrawal R. Can the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Affect the Eyes? A Review of Coronaviruses and Ocular Implications in Humans and Animals. *Ocular Immunology and Inflammation.* 2020/04/02 2020;28(3):391-395. doi:10.1080/09273948.2020.1738501
59. Diaz-Guimaraens B, Dominguez-Santas M, Suarez-Valle A, et al. Petechial Skin Rash Associated With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *JAMA Dermatol.* Jul 1 2020;156(7):820-822. doi:10.1001/jamadermatol.2020.1741

60. Marzano AV, Genovese G, Fabbrocini G, et al. Varicella-like exanthem as a specific COVID-19-associated skin manifestation: Multicenter case series of 22 patients. *J Am Acad Dermatol*. Jul 2020;83(1):280-285. doi:10.1016/j.jaad.2020.04.044
61. Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. May 2020;8(5):475-481. doi:10.1016/S2213-2600(20)30079-5
62. Tolksdorf K BS, Schuler E, Wieler LH, Haas W. Schwereinschätzung von COVID-19 mit Vergleichs- daten zu Pneumonien aus dem Krankenhaussentinel für schwere akute Atemwegserkrankungen am RKI (ICOSARI). *Epidemiologisches Bulletin*. 2020;14:3 – 9. doi:10.25646/6601
63. Wang Y, Zhang L, Sang L, et al. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *J Clin Invest*. Oct 1 2020;130(10):5235-5244. doi:10.1172/JCI138759
64. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. Jul 2020;75(7):1564-1581. doi:10.1111/all.14364
65. Roback JD, Guarner J. Convalescent Plasma to Treat COVID-19: Possibilities and Challenges. *JAMA*. Apr 28 2020;323(16):1561-1562. doi:10.1001/jama.2020.4940
66. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. Oct 1 2020;183(1):158-168 e14. doi:10.1016/j.cell.2020.08.017
67. Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. May 1 2020;130(5):2620-2629. doi:10.1172/JCI137244
68. Huang W, Berube J, McNamara M, et al. Lymphocyte Subset Counts in COVID-19 Patients: A Meta-Analysis. *Cytometry A*. Aug 2020;97(8):772-776. doi:10.1002/cyto.a.24172
69. Li T, Qiu Z, Zhang L, et al. Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Infect Dis*. Feb 15 2004;189(4):648-51. doi:10.1086/381535
70. Wang F, Nie J, Wang H, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis*. May 11 2020;221(11):1762-1769. doi:10.1093/infdis/jiaa150
71. Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh WJ, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. *J Virol*. May 2002;76(9):4420-9. doi:10.1128/jvi.76.9.4420-4429.2002

72. O'Donnell DR, Carrington D. Peripheral blood lymphopenia and neutrophilia in children with severe respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Pulmonol.* Aug 2002;34(2):128-30. doi:10.1002/ppul.10140
73. Bautista EM, Ferman GS, Golde WT. Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV). *Vet Immunol Immunopathol.* Mar 20 2003;92(1-2):61-73. doi:10.1016/s0165-2427(03)00004-7
74. Griffin DE. Measles virus-induced suppression of immune responses. *Immunol Rev.* Jul 2010;236:176-89. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00925.x
75. Mina MJ, Metcalf CJ, de Swart RL, Osterhaus AD, Grenfell BT. Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality. *Science.* May 8 2015;348(6235):694-9. doi:10.1126/science.aaa3662
76. Bundesärztekammer. Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Haemotherapie). In: Paul-Ehrlich-Institut, editor. 2017. p. 103.
77. Jaaskelainen AJ, Kekalainen E, Kallio-Kokko H, et al. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples. *Euro Surveill.* May 2020;25(18)doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.18.2000603
78. FabianK. Schematischer Aufbau eines Durchflussszytometers. In: Durchflussszytometer.png, editor. www.wikipedia.de: Wikimedia; 2012. p. Schematischer Aufbau eines Durchflussszytometers mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und vier Fluoreszenzkanälen.
79. Jkrieger. Photomultiplier. In: Photomultiplier, editor. 5 ed: Wikimedia; 2007. p. Schematische Darstellung eines Photoelektronenvervielfachers.
80. Chan JK, Ng CS, Hui PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology.* May 1988;12(5):461-80. doi:10.1111/j.1365-2559.1988.tb01967.x
81. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol.* Oct 2009;133(1):95-107. doi:10.1016/j.clim.2009.05.020
82. Finak G, Langweiler M, Jaimes M, et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Sci Rep.* Feb 10 2016;6:20686. doi:10.1038/srep20686

83. van Tilburg CM, van Gent R, Bierings MB, et al. Immune reconstitution in children following chemotherapy for haematological malignancies: a long-term follow-up. *Br J Haematol.* Jan 2011;152(2):201-10. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08478.x
84. Lohr P, Schiele S, Arndt TT, et al. Impact of age and gender on lymphocyte subset counts in patients with COVID-19. *Cytometry A.* Jun 14 2021;doi:10.1002/cyto.a.24470
85. Marshall JC, Murthy S, Diaz J, et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *The Lancet Infectious Diseases.* 2020;20(8):e192-e197. doi:10.1016/S1473-3099(20)30483-7
86. Gratama JW, Kardol M, Naipal AM, et al. The influence of cytomegalovirus carrier status on lymphocyte subsets and natural immunity. *Clin Exp Immunol.* Jul 1987;69(1):16-24.
87. Callan MF. The evolution of antigen-specific CD8⁺ T cell responses after natural primary infection of humans with Epstein-Barr virus. *Viral Immunol.* 2003;16(1):3-16. doi:10.1089/088282403763635401
88. Niu MT, Stein DS, Schnittman SM. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: review of pathogenesis and early treatment intervention in humans and animal retrovirus infections. *J Infect Dis.* Dec 1993;168(6):1490-501. doi:10.1093/infdis/168.6.1490
89. Canas CA. The triggering of post-COVID-19 autoimmunity phenomena could be associated with both transient immunosuppression and an inappropriate form of immune reconstitution in susceptible individuals. *Med Hypotheses.* Dec 2020;145:110345. doi:10.1016/j.mehy.2020.110345
90. Fioranelli M, Roccia MG, Flavin D, Cota L. Regulation of Inflammatory Reaction in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* May 17 2021;22(10)doi:10.3390/ijms22105277
91. Gustine JN, Jones D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. *Am J Pathol.* Jan 2021;191(1):4-17. doi:10.1016/j.ajpath.2020.08.009
92. Woodruff MC, Ramonell RP, Haddad NS, et al. Dysregulated naive B cells and de novo autoreactivity in severe COVID-19. *Nature.* Nov 2022;611(7934):139-147. doi:10.1038/s41586-022-05273-0
93. Liao M, Liu Y, Yuan J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med.* Jun 2020;26(6):842-844. doi:10.1038/s41591-020-0901-9
94. Hammer Q, Cuapio A, Bister J, Bjorkstrom NK, Ljunggren HG. NK cells in COVID-19-from disease to vaccination. *J Leukoc Biol.* Oct 26 2023;114(5):507-512. doi:10.1093/jleuko/qiad031

95. Li M, Guo W, Dong Y, et al. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8(+) T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Front Immunol.* 2020;11:580237. doi:10.3389/fimmu.2020.580237
96. Afshan G, Afzal N, Qureshi S. CD4+CD25(hi) regulatory T cells in healthy males and females mediate gender difference in the prevalence of autoimmune diseases. *Clin Lab.* 2012;58(5-6):567-71.
97. Kverneland AH, Streitz M, Geissler E, et al. Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry A.* Jun 2016;89(6):543-64. doi:10.1002/cyto.a.22855
98. Andreu-Ballester JC, Garcia-Ballesteros C, Benet-Campos C, et al. Values for alphabeta and gammadelta T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: assessment by age and gender. *Cytometry B Clin Cytom.* Jul 2012;82(4):238-44. doi:10.1002/cyto.b.21020
99. Oertelt-Prigione S. Immunology and the menstrual cycle. *Autoimmun Rev.* May 2012;11(6-7):A486-92. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.023
100. Gupta S, Bi R, Su K, Yel L, Chiplunkar S, Gollapudi S. Characterization of naive, memory and effector CD8+ T cells: effect of age. *Exp Gerontol.* Apr 2004;39(4):545-50. doi:10.1016/j.exger.2003.08.013
101. Joisten N, Wences Chirino TY, Bosslau TK, et al. Older adults with cytomegalovirus reveal increased CD8(+) /CD4(+) EMRA T cells and elevated systemic levels of kynurenic acid. *Immunology.* May 2023;169(1):113-116. doi:10.1111/imm.13609
102. Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint JP, Labalette M. 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. *Mech Ageing Dev.* Mar 2006;127(3):274-81. doi:10.1016/j.mad.2005.11.001
103. Goronzy JJ, Fang F, Cavanagh MM, Qi Q, Weyand CM. Naive T cell maintenance and function in human aging. *Journal of immunology.* May 1 2015;194(9):4073-80. doi:10.4049/jimmunol.1500046
104. Chinn IK, Blackburn CC, Manley NR, Sempowski GD. Changes in primary lymphoid organs with aging. *Semin Immunol.* Oct 2012;24(5):309-20. doi:10.1016/j.smim.2012.04.005
105. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature reviews Immunology.* Jan 2014;14(1):24-35. doi:10.1038/nri3567
106. Palmer DB. The effect of age on thymic function. *Front Immunol.* Oct 7 2013;4:316. doi:10.3389/fimmu.2013.00316

107. Brauning A, Rae M, Zhu G, et al. Aging of the Immune System: Focus on Natural Killer Cells Phenotype and Functions. *Cells*. Mar 17 2022;11(6)doi:10.3390/cells11061017
108. Ryan FJ, Hope CM, Masavuli MG, et al. Long-term perturbation of the peripheral immune system months after SARS-CoV-2 infection. *BMC Med*. Jan 14 2022;20(1):26. doi:10.1186/s12916-021-02228-6
109. Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol*. Apr 2021;93(4):e12998. doi:10.1111/sji.12998
110. Mackowiak P. Temperature regulation and pathogenesis of fever. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practise of infectious disease*. 6th Edition ed. Elsevier Churchill Livingstone; 2005:703-718.
111. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry Part A*. 2019;95(6):647-654. doi:<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23724>
112. The L. Long COVID: 3 years in. *Lancet*. Mar 11 2023;401(10379):795. doi:10.1016/S0140-6736(23)00493-2
113. Iwasaki A, Putrino D. Why we need a deeper understanding of the pathophysiology of long COVID. *Lancet Infect Dis*. Apr 2023;23(4):393-395. doi:10.1016/S1473-3099(23)00053-1
114. Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol*. Mar 2023;21(3):133-146. doi:10.1038/s41579-022-00846-2
115. Okuyama J, Seto S, Fukuda Y, et al. Mental Health and Physical Activity among Children and Adolescents during the COVID-19 Pandemic. *Tohoku J Exp Med*. Mar 2021;253(3):203-215. doi:10.1620/tjem.253.203

7 Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

ACE2.....	Angiotensin-converting Enzyme 2
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome; Akute Lungenschädigung
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalievirus
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fa	Firma
FC	Forward Scatter
FCM	Flow Cytometry
Hb.....	Hämoglobin
HBV	Hepatitis B - Virus
HCV	Hepatitis C - Virus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
Hk.....	Hämatokrit
HLA-DR.....	Humanes Leukozyten-Antigen
HTLV	Humanes T-lyphotropes Virus
IFR	Infection Fatality Rate
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL2R+	Interleukin-2-Rezeptor-positive
IL-6	Interleukin-6
LMU.....	Ludwig-Maximilians-Universität München
LoB.....	Limit of Blank
LoD.....	Limit of Detection

MERS-CoV.....	<i>Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus</i>
NK	<i>natürliche Killerzellen</i>
NKT	<i>Natural Killer T cells, Natürliche Killer-T Zellen</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung</i>
PMT.....	<i>Photomultiplier Tube</i>
RA+	CD45 ("Leukocyte Common Antigen"). RA besitzt nur die A-Region des Proteins
RBD.....	<i>Rezeptor-bindende Domäne</i>
RKI	<i>Robert-Koch-Institut</i>
RNA.....	<i>Ribonukleinsäure</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
RT-PCR.....	<i>Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion</i>
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SARS-CoV-1	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SC	<i>Side Scatter</i>
SpO ₂	<i>periphere Sauerstoffsättigung</i>
Th	<i>T-Helferzellen</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane Serinprotease 2</i>
TSE	<i>Transmissible Spongiforme Enzephalopathie</i>
VOC	<i>Variant of Concern</i>
VOI	<i>Variant of Interest</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WIV	<i>Wuhan Institute of Virology</i>

II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Epidemiekurve der bestätigten COVID-19-Erkrankungen. Nach Meldedatum und WHO-Region bis zum 02. April 2020. Die Anzahl der Infektionen („Cases“) ist gegen die Zeit aufgetragen („Date of Report“). *Adaptiert aus „Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 73“⁶*.8
- Abbildung 2: Systematik der Coronaviren. Die Familie der Coronaviren wird in die Unterfamilien der Letoviren und Orthocoronaviren aufgeteilt. Die Unterfamilie der Orthocoronaviren werden in die vier Gattungen der Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren gegliedert. Die Gattung der Betacoronaviren kann in die fünf Untergattungen der Embeco-, Merbeco-, Sarbeco-, Hibeco- und Nobecoviren unterteilt werden. Die SARS-CoV- und SARS-CoV-2- Spezies zählen zur Untergattung der Sarbecoviren. *Adaptiert aus "Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)"³⁵*.13
- Abbildung 3: SARS-CoV-2 Infektion - Krankheitsverlauf und Labordiagnostik. Methode der Wahl in der COVID-19 Diagnostik ist die positive SARS-CoV-2 PCR vom Rachenabstrich. Unterstützend kann in Einzelfällen Material aus dem Respirationstrakt wie Sputum oder Sekret aus einer bronchoalveolären Lavage verwendet werden. Zum Nachweis einer durchgemachten COVID-19 Erkrankung dient der positive Antikörper-Test in der Serologie. *adaptiert aus RKI, „Hinweise zur Testung von Patienten auf Infektion mit dem neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2“; Stand: 13.01.2021⁵⁴*.17
- Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Die Probe durchläuft eine Messküvette und die zu messenden Objekte werden nacheinander mit einem 488nm Argon-Ionen-Laser bestrahlt. Im direkten Lichtstrahl befindet sich der Detektor für den FC. Zudem wird der Lichtstrahl mit Hilfe von teildurchlässigen Spiegeln und Bandpassfiltern auf den SC und die Detektoren zur Erfassung des Fluorochrom-emittierten Lichtsignals umgeleitet. *Adaptiert aus <https://www.wikipedia.de/Durchflusszytometrie>⁷⁸*.29
- Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Photoelektronenvervielfachers („photomultiplier tube“, PMT). Das einfallende Photon wird von einer Photokathodenschicht aufgenommen und mithilfe von Dynoden und Anlage einer Hochspannung von 1-2kV amplifiziert. Hierdurch entsteht eine Verstärkung des Signals, sodass der Lichtimpuls als elektrisches Signal gemessen und analysiert werden kann. Die Stärke des elektrischen Impulses ist proportional zur Lichtintensität des

eintreffenden Photons. *Adaptiert aus <https://www.wikipedia.de/Photomultiplier>*⁷⁹.
30

Abbildung 6: Bildung eines elektrischen Impulses. (A.) Beim Passieren des Lasers sendet das Antikörper-Fluorochrom-Konjugat einen Impuls aus. (B.) Die Lichtintensität ist hierbei proportional zur Höhe des elektrischen Impulses. (C.) Die Länge des Impulses ist proportional abhängig von der Länge des Lichtsignals. Anschließend kann die Fläche unter dem Impuls (Area-under-the-Curve) als gesamtes Fluoreszenzsignal berechnet und ausgewertet werden. *Adaptiert aus Cytomics FC 500 with CXP Software, Instructions for Use, Beckman Coulter, Juli 2016*.....31

Abbildung 7: Gating-Strategie. (A.) Lymphozyten werden mit Hilfe von Vorwärtsstreuung („forward scatter“, FC) und Seitwärtsstreuung („side scatter“, SC) identifiziert. (B.) B Zellen. CD19-Positivität wird verwendet, um B-Zellen zu definieren (Diagramm 1), die weiter in naive (IgD+), class-switched Gedächtniszellen (CD27+), non class-switched Gedächtniszellen (IgD+ CD27+, Plot 2) und transitionale B-Zellen (CD24+ CD38+, Plot 3) unterteilt werden. (C.) NK-Zellen. Natürliche Killer-T-Zellen (NKT, CD3+ CD56+) werden zunächst identifiziert (Diagramm 1). Anschließend werden CD3-positive Zellen in 3 verschiedene Untergruppen von NK-Zellen eingeteilt (CD56+ CD16+, CD56bright CD56dim, CD56dim CD16bright, Diagramm 2). (D.) T-Zellen werden anhand ihrer CD4- oder CD8-Positivität identifiziert. Sowohl CD4+ als auch CD8+ Zellen wurden in Gedächtniszellen (CD45RA- CD45RO+) (Diagramme 1+6), naive Zellen (CD62L+ CD45RA+), zentrale Gedächtniszellen (CD62L+ CD45RA-), Effektor-Gedächtniszellen (CD62L- CD45RA-) und Effektor-Gedächtniszellen RA+ ("EMRA") (CD62L- CD45RA+) unterteilt (Diagramme 3+7). Zur Analyse der CD8+-Zellaktivität wurden die Zellen in frühe (CD27+ CD28+), intermediäre (CD27+ CD28-), späte (CD27- CD28-) (Diagramm 4) oder erschöpfte (CD279+) und terminale Effektorzellen (CD279- CD57+) unterteilt (Diagramm 5). CD4+ T-Helferzellen wurden in Th1- (CXCR3+ CCR4- CCR5+ CCR6-), Th2- (CXCR3- CCR4+ CCR5- CCR6-) und Th17- (CXCR3- CCR4+ CCR5- CCR6+) Helfer-T Zellen eingeteilt (Diagramme 8+9). (E.) CD4+ und CD8+ Zellen wurden außerdem in aktivierte Gedächtniszellen (HLA-DR+ oder CD69+) (Diagramme 1-4) und regulatorische Zellen (CD25+ oder FoxP3+) (Diagramme 5-8) unterteilt⁸⁴.
37

Abbildung 8: Gesamt-Lymphozyten und Hauptgruppen. Gesunde Probanden (hellgrau) mit Patienten mit moderatem (mittelgrau), sowie schwerem COVID-19 Verlauf

	(dunkelgrau). Schwarze Linie für Mittelwert; Schwarzer Punkt für Median. * ist $p < 0,05$; ** ist $p < 0,01$; *** ist $p < 0,001$; **** ist $p < 1 \times 10^{-4}$	43
Abbildung 9:	Altersabhängige Verteilung von Lymphozyten-Zellzahlen in Abhängigkeit vom Lebensalter (schwarze Linie, 95% - Konfidenzintervall in grau). Dargestellt sind die Gesamt-Lymphozytenzahlen (A), die CD8- positiven Lymphozyten (B) und die Untergruppen der naiven CD8+ und early CD8+ Lymphozyten (C und D). Die gesunden Kontrollpersonen sind in grau dargestellt; Patienten mit moderatem COVID-19 Verlauf in hellrot und Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf in dunkelrot. Dreiecke kennzeichnen das Männliche-, Kreise das weibliche Geschlecht.	46
Abbildung 10:	Geschätzter Einfluss eines moderaten/ schweren COVID-19 Verlaufs (hellrot/ rot), sowie Geschlecht (blau) und Alter (grün) auf die Lymphozytenzahlen in der multivariaten Analyse. Angegeben ist die relative Abweichung von der gesunden Kontrollgruppe. Blaue Balken zeigen der Einfluss des weiblichen Geschlechts. Das Alter ist in prozentualer Abweichung pro 10 Jahre angegeben. Schwarze Balken zeigen das 95%-Konfidenzintervall.	50
Abbildung 11:	Subgruppen-Analyse COVID-19 Rekonvaleszenten und gesunde Kontrollgruppe. Verteilung der Lymphozyten-Hauptgruppen und -Untereinheiten. Vergleich zwischen der gesunden Kontrollgruppe (grau), sowie den COVID-19 Rekonvaleszenten (blau). Violin-Diagramme; schwarze Balken zeigen den Median, * ist $p < 0,05$; ** ist $p < 0,005$; *** ist $p < 0,001$	59
Abbildung 12:	Subgruppen-Analyse Fieber als Symptom. Vergleich zwischen Probanden mit Fieber (rot) und Probanden ohne Fieber (grau) während der COVID-19 Erkrankung. Violin-Diagramme; schwarze Balken zeigen den Median, * ist $p < 0,05$; p-Werte adjustiert für multiples Testen nach Bonferroni.	63
Abbildung 13:	Geschlechter-spezifische Subgruppen-Analyse. Vergleich von männlichen (grün) und weiblichen (grau) COVID-19 – Rekonvaleszenten. Violin-Diagramme; schwarze Balken zeigen den Median, * ist $p < 0,05$	67

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klinik bei COVID-19 Erkrankung. Während milde Verläufe vor Allem mit Fieber, Abgeschlagenheit (Fatigue), Husten und Appetitlosigkeit einhergehen, sind Luftnot und respiratorische Insuffizienz die vorrangigen Symptome beim schweren COVID-19 Verlauf ²³19
Tabelle 2:	Fluorochrom-konjugierte Antikörper. Zur Definition der einzelnen Lymphozyten – Zellpopulationen sind die verwendeten Antikörper mit ihren Eigenschaften aufgeführt. Neben Ziel-Antigen wird das konjugierte Fluorochrom, der Antikörper-Klon, der Antikörper-Isotyp, sowie die Artikelbeschreibung des Herstellers (Firma Beckman Coulter/ Firma Biolegend) angegeben.35
Tabelle 3:	Ansätze zur Identifikation von Lymphozyten-Subpopulationen. Bei einem 5-Farben-Laser am FC500-Durchflusszytometer wurden pro Blutprobe 7 verschiedene Ansätze hergestellt, um die verschiedenen Subpopulationen zu charakterisieren. Dargestellt sind die einzelnen Röhrchen, sowie die Belegung der einzelnen Detektoren des Durchflusszytometers durch die verwendeten monoklonalen Antikörper (Tabelle 1). AF 488 = AlexaFluor 488; FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat; PE = R Phycoerythrin; ECD = R Phycoerythrin-Texas Red; PC5 = R Phycoerythrincyanin 5.1; PC7 = R Phycoerythrincyanin 7.36
Tabelle 4:	Klinische Charakteristika der akuten COVID-19 Patienten.41
Tabelle 5:	Lymphozyten- Untergruppen in Patienten mit moderatem und schwerem COVID-19 Verlauf. Zellzahlen sind als Median / μ l angegeben; Interquartilsabstand in Klammern. p1 ist gesund vs. COVID-19 moderat; p2 ist gesund vs. COVID-19 schwer; p3 ist COVID-19 moderat vs. COVID-19 schwer. $p < 0,05$44
Tabelle 6:	Lymphozyten-Zellzahlen und -Untergruppen der Gesamt-Kohorte mit COVID-19 Patienten und der gesunden Kontrollgruppe (n=83). Zellzahlen sind im Median / μ l dargestellt. Die relative Veränderung der Zellzahlen ist mitsamt p Wert pro 10 Jahre (/10y) angegeben.47
Tabelle 7:	Relativer Einfluss eines moderaten/ schweren COVID-19 Verlaufs, sowie Alter und Geschlecht auf die Lymphozytenzahlen (= Koeffizient B [kB]). Der Einfluss des weiblichen Geschlechts ist im Vergleich zum männlichen Geschlecht angegeben. Der Einfluss des steigenden Lebensalters ist pro 10 Jahre angegeben.51

Tabelle 8:	Charakterisierung der COVID-19 Rekonvaleszenten. Die Kontrollgruppe zeigte sich sowohl hinsichtlich des Alters (Median, 40 Jahre (18 – 61), $p = 0.930$, n.s.), als auch des Geschlechts (weiblich $n=14$ [32%]; männlich, $n= 30$ [68%]; $p = 0.818$, n.s.) als gematcht zur Kohorte der COVID-19 Rekonvaleszenten.....	56
Tabelle 9:	Vergleich von COVID-19 Rekonvaleszenten und der gesunden Kontrollgruppe. Median, sowie Interquartilsabstand in Klammern.....	60
Tabelle 10:	Vergleich COVID- Rekonvaleszenten mit Fieber, ohne Fieber, sowie gesunder Kontrollgruppe. Angegeben sind der Median, sowie der Interquartilsabstand in Klammern. P-Werte adjustiert für multiples Testen nach Bonferroni (ncs – memory = non class-switched memory; cs – memory = class-switched memory; CD4+/ CD8+ DP = CD4+/ CD8+ doppelt-positiv; CD56dCD16b = CD56dim CD16bright; CD56bCD16d = CD56bright CD16dim).	64
Tabelle 11:	Vergleich von männlichen und weiblichen COVID- Rekonvaleszenten. Angegeben sind der Median, sowie der Interquartilsabstand in Klammern.....	66

IV Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Martin Trepel für die Möglichkeit, diese spannende Arbeit berufsbegleitend und schon wenige Wochen nach Aufnahme meiner Tätigkeit in der 2. Medizinischen Klinik der Universitätsklinik in Augsburg durchzuführen. Sowohl die zeitliche Freistellung von der klinischen Tätigkeit als auch das Vertrauen, eine neuartige Virus-Erkrankung mit Labormethoden in einem wissenschaftlichen Kontext zu erforschen, empfinde ich als Privileg.

Herrn Professor Dr. Andreas Rank gilt ebenfalls mein besonderer Dank für die Planung, Durchführung und Unterstützung während des Promotionsprojektes– sowohl fachlich als auch menschlich. Es war eine großartige Erfahrung, als Doktorand eine so ausgiebige Betreuung, Unterstützung und Förderung zu erhalten. Diese Art der engen und vertrauensvollen Zusammenarbeit ist für mich einzigartig und wird hoffentlich auch in Zukunft weiterhin bestehen.

Ich bedanke mich außerdem bei Frau Tatjana Lenskaja und Gabriele Ziegler für die fachliche Unterstützung und die von großer Freude geprägte Zusammenarbeit im Labor für spezielle Hämatologie. Die Möglichkeit, mit so erfahrenen und wissenschaftlich interessierten Kolleginnen an einem Projekt zu arbeiten, hat mich sehr viel gelehrt. Ich werde die zahlreichen Vor- und Nachmittage des Kopfzerbrechens nie vergessen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Johanna Waidhauser für die Etablierung des durchflusszytometrischen Immunstatus und wissenschaftlichen Unterstützung während des gesamten Projektes bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Christoph Schmid für die zahlreichen Beratungen, Freistellungen von der klinischen Tätigkeit, sowie der fachlichen und menschlichen Unterstützung während des gesamten Projektes.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. Bruno Märkl für die fachliche und mentale Unterstützung, insbesondere während der intensiven Phase des Schreibprozesses, bedanken.

Überdies möchte ich meinen Eltern Ursula und Peter Löhr, sowie meiner Schwester Franziska Löhr für die Unterstützung und Motivation während des gesamten Projektes danken.

VI Eigene Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Löhr P, Schiele S, Arndt TT, Grützner S, Claus R, Römmele C, Müller G, Schmid C, Dennehy KM, Rank A. Impact of age and gender on lymphocyte subset counts in patients with COVID-19. *Cytometry A*. 2021 Jun 14;10.1002/cyto.a.24470. Doi: 10.1002/cyto.a.24470. Epub ahead of print. PMID: 34125495; PMCID: PMC8426831.

Rank A, **Löhr P**, Hoffmann R, Ebigbo A, Grützner S, Schmid C, Claus R. Sustained cellular immunity in adults recovered from mild COVID-19. *Cytometry A*. 2021 May;99(5):429-434. Doi: 10.1002/cyto.a.24309. Epub 2021 Jan 31. PMID: 33522107; PMCID: PMC8014675.