



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Ernährungsmedizin

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Christian Sina

---

**Untersuchung der initialen B-Zell- und IgG-  
Antikörperantwort nach zwei Impfungen mit dem SARS-  
CoV-2 mRNA-Vakzin BNT162b2 Anfang 2021**

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Anne Sophie Lixenfeld

aus Hannover

Lübeck 2025



1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Ehlers

Amts-Kobetreuer: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Werner Solbach

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.10.2025

- Promotionskommission der Sektion Medizin -



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XII
<b>1. Einleitung und Fragestellung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das Immunsystem.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Das angeborene (unspezifische) Immunsystem .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. Das erworbene (spezifische, adaptive) Immunsystem.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Antikörper (Immunglobuline) .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.1. Struktur.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2. Funktion und Subklassen.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.3. Glykosylierung.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Impfungen.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.1. Prinzip.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.2. mRNA-Impfstoffe .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. Impfung gegen SARS-CoV-2 .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.1. SARS-CoV-2 und COVID-19 .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.2. Der mRNA-Impfstoff BNT162b2 .....</b>	<b>20</b>
<b>1.5. Zielsetzung .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Studiendesign.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2. Reagenzien, Materialien und Geräte .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.1. Probenaufarbeitung .....</b>	<b>26</b>

# Inhaltsverzeichnis

---

2.3.2.	EUROIMMUN ELISA: Anti-SARS-CoV-2-S1 IgG, Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG ...	27
2.3.3.	HL-1 ELISA: Anti-S1 IgG/ IgG1/ IgG2/ IgG3 oder IgG4 im Serum.....	27
2.3.4.	HL-2 ELISA: Anti-S1 IgG im Speichel .....	28
2.3.5.	Spezifitätskontrolle der Sekundärantikörper .....	29
2.4.	Glykosylierungsanalyse per LC-MS .....	29
2.4.1.	LC – Flüssigkeitschromatographie .....	30
2.4.2.	MS – Massenspektrometrie .....	31
2.4.3.	Analyse und Datenverarbeitung.....	31
2.5.	Durchflusszytometrie .....	32
2.5.1.	PBMC-Isolation .....	33
2.5.2.	Extra- und Intrazelluläre Zellfärbung.....	33
2.5.3.	Farbkopplung des ST6GAL1-Antikörpers.....	35
2.5.4.	Durchflusszytometrisches Gating.....	35
2.6.	Software/Statistik .....	37
3.	Ergebnisse .....	38
3.1.	Kohorte und Probensammlung.....	38
3.2.	mRNA-Vakzin BNT162b2 induzierte anti-S1 IgG-Subklassen Serum Antikörper Level.....	39
3.2.1.	Etablierung des Hansestadt Lübeck-1 (HL-1) anti-S1 IgG und IgG1–4 ELISA-Protokolls.....	40
3.2.2.	Anti-S1 IgG Serum Antikörper .....	45
3.2.3.	Anti-S1 Serum IgG-Subklassen .....	46
3.2.4.	Anti-S1 (und S2-) IgG-Antikörper im Speichel .....	49
3.3.	mRNA-Vakzin BNT162b2 induzierte anti-S IgG1 Serum Antikörper Fc-Glykosylierung.....	51
3.3.1.	Fukosylierung.....	52

3.3.2.	Bisection-GlcNAc .....	54
3.3.3.	Galaktosylierung und Sialylierung .....	55
3.4.	mRNA-Vakzin BNT162b2 induzierte S1-spezifische B-Zell-Antworten .....	58
3.4.1.	Etablierung eines Durchflusszytometrie-Protokolls zur Detektion von S-spezifischen B-Zell-Antworten .....	58
3.4.2.	S1-spezifische B-Zell-Populationen.....	63
3.4.3.	Plasmazell-Subpopulationen .....	66
3.4.4.	Sialyltransferase-Expression .....	67
4.	Diskussion.....	70
4.1.	Die zweifache mRNA-Impfung mit BNT162b2 induziert eine ausgeprägte initiale IgG-Antwort.....	70
4.1.1.	Serum IgG-Titer nach einer und zwei Impfungen.....	70
4.1.2.	Anti-S1 Speichel IgG - Durch Diffusion aus dem Serum?.....	71
4.1.3.	Kampfstarke IgG-Subklassen dominieren die initial induzierte IgG-Antikörperantwort nach der ersten und zweiten Impfung.....	72
4.2.	Die Fc-Glykosylierung von IgG1 variiert im Zeitverlauf nach zweifacher Impfung mit BNT162b2.....	74
4.2.1.	Keine langfristige F0-IgG1-Antwort nach Impfung mit BNT162b2 .....	74
4.2.2.	Bisection-IgG.....	76
4.2.3.	Dynamische Galaktosylierung und Sialylierung des IgG1 nach Impfungen: Ausdruck unterschiedlicher Herkünfte und verschiedener Funktionen.....	77
4.3.	Die zweifache Impfung mit BNT162b2 generiert Spike-spezifische Plasmazellen und auch potenzielle B-Gedächtniszellen .....	79
4.3.1.	Frühe PCs und potenzielle B-Gedächtniszellen .....	79
4.3.2.	Stammen CD27 <sup>+</sup> PCs von B-Gedächtniszellen ab?.....	80
4.3.3.	CD138 <sup>+</sup> PCs als Produzenten von Sial-IgG? .....	81
5.	Zusammenfassung.....	83

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>6.</b>	Literaturverzeichnis.....	86
<b>7.</b>	Anhänge .....	100
<b>7.1.</b>	Proband*innen .....	100
<b>7.2.</b>	Materialien .....	105
<b>7.2.1.</b>	Geräte .....	105
<b>7.2.2.</b>	Verbrauchsmaterialien .....	107
<b>7.2.3.</b>	Reagenzien .....	108
<b>7.2.4.</b>	Puffer .....	109
<b>7.2.5.</b>	Testkits.....	109
<b>7.2.6.</b>	Antikörper.....	110
<b>8.</b>	Danksagungen.....	113
<b>9.</b>	Lebenslauf.....	114
<b>10.</b>	Publikationen .....	115

### Abkürzungsverzeichnis

<b>ACE2</b>	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (angiotensin converting enzyme 2)
<b>ADCC</b>	Antikörperabhängige Zytotoxizität
<b>ADCP</b>	Antikörper-abhängige Phagozytose
<b>AnG</b>	Antigen
<b>ASC</b>	Antikörper-sezernierenden Zellen
<b>Asn</b>	Asparagin
<b>BCR</b>	B-Zell-Rezeptor
<b>CD</b>	Unterscheidungsgruppen (Cluster of differentiation)
<b>CDC</b>	Komplementabhängige Zytotoxizität
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>COVID-19</b>	Coronavirus-Krankheit-2019 (Coronavirus disease 2019)
<b>DCIR</b>	Dendritic Cell Immunoreceptor
<b>DC-SIGN</b>	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
<b>E</b>	Envelope
<b>EI</b>	EUROIMMUN
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>F0</b>	Afukosyliert
<b>Fab</b>	Antigen-bindendes Fragment (Fragment antigen binding)
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorting
<b>Fc</b>	kristallisierbares Fragment (Fragment crystalline)
<b>FcR</b>	Fc-Rezeptoren

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>FcγR</b>	Fc-gamma-Rezeptoren
<b>g</b>	Erdbeschleunigung (= 9,81 m/s <sup>2</sup> )
<b>G0</b>	Agalaktosyliert
<b>Gal-IgG</b>	Galaktosyliertes IgG
<b>GlcNAc</b>	N-Acetylglucosamin
<b>HBV</b>	Hepatitis B-Virus
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>HL</b>	Hansestadt Lübeck
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>IgG<sup>+</sup></b>	IgG-positiv
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IVIG</b>	Intravenöses Immunglobulin
<b>LC-MS</b>	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (Liquid chromatography–mass spectrometry)
<b>LNP</b>	Lipid Nanopartikel
<b>LUMC</b>	Leiden University Medical Center
<b>M</b>	Membran
<b>MFI</b>	durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescent Intensity)
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex)
<b>mRNA</b>	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger ribonucleic acid)
<b>NCP</b>	Nucleocapsid
<b>NK-Zellen</b>	natürliche Killerzellen
<b>OD</b>	optische Dichte

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>PAMP</b>	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular patterns)
<b>PB</b>	Plasmablast
<b>PBMC</b>	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)
<b>PC</b>	Plasmazelle
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
<b>PRR</b>	Mustererkennungsrezeptoren (Pattern recognition receptor)
<b>RBD</b>	Rezeptor-Binde-Domäne
<b>S</b>	Spike
<b>S0</b>	Unsialyliert
<b>S1<sup>+</sup></b>	S1-positiv
<b>SARS-CoV-2</b>	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom-Coronavirus-2 (Severe acute respiratory syndrome Corona virus 2)
<b>Sial-IgG</b>	Sialyliertes IgG
<b>ST6GAL1</b>	$\alpha$ -2,6-Sialyltransferase
<b>TCR</b>	T-Zell-Rezeptoren
<b>TFH-Zellen</b>	Follikuläre T-Helferzellen
<b>TH-Zelle</b>	T-Helferzelle
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
<b>Treg-Zelle</b>	Regulatorische T-Zelle
<b>UKSH</b>	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>FCS</b>	Flow Cytometry Standard
<b>IgA</b>	Immunglobulin A
<b>IgD</b>	Immunglobulin D
<b>IgE</b>	Immunglobulin E
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IgM</b>	Immunglobulin M
<b>IUs</b>	Infizierte Ungeimpfte
<b>NGs</b>	Naive Geimpfte
<b>NUs</b>	Naive Ungeimpfte
<b>Pot. G-BCs</b>	Potenzielle B-Gedächtniszellen
<b>VGs</b>	Vorinfizierte Geimpfte
<b>VUs</b>	Vorinfizierte Ungeimpfte

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls.....	7
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung beispielhafter IgG-Oligosaccharidstrukturen .....	11
<b>Abbildung 3:</b> Durchflusszytometrisches Gating .....	36
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Probensammelzeitpunkte .....	339
<b>Abbildung 5:</b> Spezifitätskontrolle der Sekundärantikörper (anti-human IgG, IgG1–4).....	41
<b>Abbildung 6:</b> Korrelation von HL-1 Anti-S1 IgG ELISA gegen EUROIMMUN Anti-S1 IgG ELISA .....	42
<b>Abbildung 7:</b> Anti-S1, -S2 und -NCP IgG-Titer zu t0 und t1 .....	44
<b>Abbildung 8:</b> Serum anti-NCP IgG und -S1 IgG-Titer im Zeitverlauf.....	46
<b>Abbildung 9:</b> Anti-S1 IgG-Subklassen Titer im Zeitverlauf .....	48
<b>Abbildung 10:</b> Korrelation zwischen anti-S1 IgG gegen anti-S1 IgG1–4 an t1 .....	49
<b>Abbildung 11:</b> Speichel anti-S1 IgG der NUs und Geimpften (NG/VG).....	51
<b>Abbildung 12:</b> Anti-Spike IgG1- und Gesamt IgG1-Fukosylierung im Zeitverlauf .....	54
<b>Abbildung 13:</b> Anti-Spike IgG1- und Gesamt IgG1-Bisection im Zeitverlauf.....	55
<b>Abbildung 14:</b> Anti-Spike IgG1- und Gesamt IgG1-Galaktosylierung und -Sialylierung im Zeitverlauf.....	57
<b>Abbildung 15:</b> S1-spezifische Lymphozyten zu t0 und t1.....	61
<b>Abbildung 16:</b> S1-spezifische Zellpopulationen Naiver Geimpfter und COVID-19 Positiver .....	65
<b>Abbildung 17:</b> Evolution verschiedener B-Zell Populationen zwischen t1* und t3 .....	66
<b>Abbildung 18:</b> Evolution von PC-Subgruppen zwischen t1* und t3.....	67
<b>Abbildung 19:</b> ST6GAL1-Expression in PC-Subgruppen von NUs, NGs und VGs.....	69

# Abbildungsverzeichnis

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht der Probeentnahme-Zeiträume .....	24
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht der Studienteilnehmer*innen .....	25
<b>Tabelle 3:</b> Verdünnung und Konzentration der Sekundärantikörper in den HL ELISA- Protokollen .....	28
<b>Tabelle 4:</b> Verdünnung und Konzentration der Detektionsantikörper des extrazellulären FACS-Färbeschrittes .....	34
<b>Tabelle 5:</b> Verdünnung und Konzentration der Detektionsantikörper der intrazellulären FACS-Färbeschritte.....	35
<b>Tabelle A1:</b> Übersicht über alle Studienteilnehmer*innen und Probeentnahme-Zeitpunkte .....	100
<b>Tabelle A2:</b> Übersicht aller verwendeter Geräte .....	105
<b>Tabelle A3:</b> Übersicht aller verwendeter Verbrauchsmaterialien .....	107
<b>Tabelle A4:</b> Übersicht aller verwendeter Reagenzien .....	108
<b>Tabelle A5:</b> Übersicht aller verwendeter Puffer.....	109
<b>Tabelle A6:</b> Übersicht aller verwendeter Testkits .....	109
<b>Tabelle A7:</b> Übersicht verwendeter Antikörper im ELISA.....	110
<b>Tabelle A8:</b> Übersicht verwendeter Antikörper im FACS .....	111

### 1. Einleitung und Fragestellung

Im Dezember 2019 häuften sich unklare Pneumonie-Fälle in Wuhan, China, bis die Erkrankung beziehungsweise das auslösende Virus im Januar 2020 ihren Namen erhielten: Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) beziehungsweise Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Die Erkrankung breitete sich rasant aus und wurde bereits im März 2020 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Pandemie erklärt (Siddiqui et al., 2022; World Health Organization, 2020). Bis November 2024 wurden weltweit knapp 777 Millionen Krankheitsfälle und über 7 Millionen Todesfälle aufgezeichnet, die realen Zahlen lagen vermutlich deutlich höher (World Health Organization, 2024a; World Health Organization, 2024b).

Nach einer langen Zeit, die durch Ausgangs- und Kontaktbeschränkungen geprägt war, kehrte Mitte 2022 in weiten Teilen der Welt wieder Normalität ein. Einen großen Beitrag dazu leisteten und leisten nach wie vor neu und schnell entwickelte mRNA- (Boten-Ribonukleinsäure) und Adenovirus-basierte Impfstoffe gegen SARS-CoV-2. Als erster Impfstoff, nur ein Jahr nach der Meldung des ersten COVID-19-Patienten, wurde der von BioNTech/Pfizer entwickelte mRNA-Impfstoff BNT162b2, später auch als COMIRNATY bezeichnet, zugelassen (Lamb, 2021; Siddiqui et al., 2022).

Um das Prinzip der Impfung und daraus resultierenden immunologischen Prozesse richtig einordnen zu können, werden im Folgenden zunächst die Grundlagen der Immunologie erläutert, bevor später näher auf das SARS-Coronavirus und das Vakzin BNT162b2 eingegangen wird.

#### 1.1. Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem zeichnet sich durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellen, Gewebe und Moleküle aus. Seine Aufgabe besteht darin, schädliche Eindringlinge wie Bakterien, Viren und Parasiten zu erkennen und zu bekämpfen. Es lässt sich in die angeborene, unspezifische sowie die erworbene, spezifische Immunantwort gliedern, die jeweils zelluläre und lösliche Anteile beinhaltet.

# Einleitung

---

## 1.1.1. Das angeborene (unspezifische) Immunsystem

Ab der Geburt vorhanden, stellt das angeborene Immunsystem eine erste Barriere gegen Eindringlinge dar. Dazu gehören mechanische, chemische und mikrobiologische Barrieren durch das Oberflächenepithel von Haut, Darm, Lunge und Augen, Nase und Mund, aber auch eine Gruppe von Leukozyten: darunter Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Letztere zusammen bilden die zelluläre Komponente. Unterstützt von Botenstoffen, den Zytokinen und Chemokinen, bekämpfen sie den Erreger. Ergänzend wirkt die humorale Komponente: das Komplementsystem. Dieses besteht aus einer Gruppe von über 30 Proteinen, die nach ihrer Aktivierung verschiedenste Funktionen übernehmen. Dazu gehören die Opsonisierung, also die oberflächliche Markierung von Erregern zur leichteren Erkennung und Zerstörung durch Fresszellen (Phagozyten), die direkte Lyse von Bakterien und Viren durch Porenbildung sowie die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen. (Murphy und Weaver, 2018a)

Das angeborene Immunsystem wird häufig vereinfacht als erste, schnelle und unspezifische Abwehrreaktion beschrieben. Tatsächlich reagiert es innerhalb weniger Stunden, während die erworbene Immunantwort mehrere Tage benötigt. Der Begriff „unspezifisch“ verweist jedoch auf eine zentrale Einschränkung des angeborenen Schutzmechanismus: Er kann Eindringlinge anhand ihrer Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) erkennen) und als fremd einstufen - allerdings über eine begrenzte Anzahl an unveränderlichen Mustererkennungsrezeptoren (PRRs). Dabei können einerseits Erreger übersehen und andererseits die erkannten Eindringlinge nicht weiter differenziert werden. Hinzu kommt, dass das angeborene Immunsystem über keinerlei Gedächtnisfunktion verfügt; bei jeder erneuten Infektion mit demselben Erreger beginnt die unspezifische Immunantwort von Neuem. Im Gegensatz dazu bekämpft die adaptive Immunantwort Eindringlinge deutlich wirksamer, da sie über erregerspezifische Rezeptoren verfügt und alle Ressourcen gezielt auf den jeweiligen Erreger konzentrieren kann. (Murphy und Weaver, 2018a)

## 1.1.2. Das erworbene (spezifische, adaptive) Immunsystem

Das erworbene Immunsystem entwickelt sich, wie der Name schon andeutet, im Laufe des Lebens immer weiter und zeichnet sich durch eine spezifischere Funktionsweise aus. Im

Gegensatz zur angeborenen Komponente kann es Eindringlinge gezielt erkennen, spezifisch auf sie reagieren und ein Immungedächtnis aufbauen. Diese Eigenschaften beruhen auf einer bestimmten Gruppe von Leukozyten: den Lymphozyten. Letztere lassen sich in B- und T-Zellen unterteilen (Kaech et al., 2002). Beide Zelltypen tragen variable antigenspezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, wobei jede naive B- oder T-Zelle immer nur eine spezifische Rezeptor-Variante exprimiert. Nach ihrer Aktivierung können sich beide Zellgruppen entweder zu Effektor- oder Gedächtniszellen differenzieren. Gedächtniszellen können bei erneutem Antigenkontakt wiederum Effektorzellen hervorbringen. CD8-positive (CD8+) -Effektorzellen sind in der Lage, infizierte Zellen direkt zu töten, während CD4-positive (CD4+) T-Effektorzellen B-Zellen unterstützen. B-Zellen wiederum sind für die Produktion von antigenspezifischen Antikörpern verantwortlich, die die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems bilden. (Murphy und Weaver, 2018a)

Eine enge Zusammenarbeit zwischen dem angeborenem und erworbenen Immunsystem ist für eine effektive Abwehrreaktion entscheidend. Das angeborene System wird durch das adaptive System unterstützt, indem dessen Komponenten beispielsweise Komplementreaktionen auslösen und verstärken oder übermäßige Entzündungsreaktionen kontrollieren können. Umgekehrt ist die adaptive Antwort auf das angeborene System angewiesen, das die Aktivierung und Reifung spezifischer Zellen fördert. (Murphy und Weaver, 2018b)

### **1.1.2.1. T-Lymphozyten (T-Zellen)**

T-Lymphozyten erkennen Antigene mithilfe ihrer T-Zell-Rezeptoren (TCR) und können anhand deren Ko-Rezeptoren in zwei Gruppen eingeteilt werden: CD4+ T-Helfer-Zellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen. Diese erkennen Antigene (Peptide) jedoch nur, wenn sie auf der Oberfläche körpereigener Zellen durch sogenannte MHC-Moleküle präsentiert werden (Nicholson, 2016). Dabei interagiert der Ko-Rezeptor CD8 mit MHC-Klasse-I Molekülen, die auf nahezu allen körpereigenen Zellen exprimiert werden. Ihr Ziel ist es, virusinfizierte Körperzellen zu eliminieren und somit die virale Ausbreitung einzudämmen.

CD4+ T-Lymphozyten werden hingegen durch die Interaktion mit MHC-Klasse-II Molekülen aktiviert, die auf der Oberfläche spezifischer Immunzellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert werden. Die von MHC-II präsentierten Antigene

## Einleitung

---

stammen überwiegend von extrazellulären Erregern. Nach ihrer Aktivierung differenzieren CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zu T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) oder regulatorischen T-Helferzellen (T<sub>reg</sub>-Zellen). Verschiedene Subtypen der T-Helferzellen, wie T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen produzieren verschiedene Zytokine und regulieren als folliculäre T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>-Zellen) in Lymphgeweben die B-Zell-Antwort. Regulatorische T-Helferzellen verhindern überschießende Immunreaktionen (Sheikh und Groom, 2020). Bei jedem Antigenkontakt differenzieren sich einige CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu spezifischen Gedächtniszellen, die eine schnelle und effiziente Immunantwort bei erneuter Infektion gewährleisten. (Murphy und Weaver, 2018a)

### 1.1.2.2. B-Lymphozyten (B-Zellen)

B-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet, reifen dort heran und verteilen sich anschließend auf periphere lymphatische Organe, unter anderem in Lymphknoten, Milz und Lymphgewebe der Schleimhäute. Nach ihrer Ankunft in der Peripherie sammeln sich die naiven B-Zellen in den primären Lymphfollikeln (B-Zell-Zone) der lymphatischen Organe, wo sie mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt treten können, in der Regel präsentiert durch Makrophagen oder folliculäre dendritische Zellen. Nach dem Antigenkontakt wandert die B-Zelle an die Grenze zur T-Zell-Zone. Hier tritt sie mit der weiter differenzierten Form der T-Helferzelle, der T<sub>FH</sub>-Zelle, in Kontakt, welche die B-Zelle zur Proliferation anregt (Turner et al., 2020). Zurück am Rand des Follikels beginnt der B-Lymphozyt zu proliferieren und sich zu differenzieren. Innerhalb von zwei bis drei Tagen wandern die neuen, aktivierten B-Zellen weiter in die interfolliculären Regionen (Primärfokus). Hier proliferieren und differenzieren sich die Lymphozyten innerhalb weniger Tage primär zu antikörperproduzierenden extrafolliculären Plasmazellen (PCs) oder zu B-Gedächtniszellen. Diese extrafolliculären PCs leben in der Regel nur einige Tage (Kurosaki et al., 2015; Murphy und Weaver, 2018c).

Andere aktivierte B-Zellen werden nicht Teil des Primärfokus, sondern wandern zusammen mit ihren assoziierten T<sub>FH</sub>-Zellen zurück in den Lymphfollikel. Dort proliferieren sie weiter, bilden ein Keimzentrum und differenzieren sich zu intrafolliculären langlebigen PCs oder B-Gedächtniszellen (Kurosaki et al., 2015). Der Lymphfollikel wird nun als sekundärer

Lymphfollikel bezeichnet, welcher für einige Wochen nach dem ersten Antigenkontakt bestehen bleibt (Murphy und Weaver, 2018c).

Kurzlebige extrafollikuläre PCs im Primärfokus und langlebigere intrafollikuläre PCs im Keimzentrum produzieren unterschiedliche Antikörper. Extrafollikuläre PCs sezernieren ab Tag vier bis fünf nach Antigenkontakt zunächst Immunglobulin M (IgM), das die frühe adaptive humorale Immunantwort kennzeichnet. Teile dieser Zellen können zu anderen Isotypen differenzieren. Ein Hauptmerkmal der extrafollikulären PCs ist deren eingeschränkte Affinität. In den Keimzentren hingegen finden neben dem Isotypenwechsel auch Selektionsprozesse statt: die durch Hypermutationen im B-Zellrezeptor induzierte Affinitätsreifung. Die hervorgehenden Zellen werden entweder zu Immunglobulin G- (IgG), Immunglobulin A- (IgA)- oder Immunglobulin E- (IgE) -sezernierenden hochaffinen langlebigen PCs oder zu B-Gedächtniszellen (Eibel et al., 2014). Die B-Gedächtniszellen können bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen eine schnellere und affinere Antikörperantwort auslösen, aber auch erneut die Selektionsprozesse der Keimzentren durchlaufen. (Murphy und Weaver, 2018d)

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die Aktivierung von B-Zellen nicht zwingend die Zusammenarbeit mit T<sub>FH</sub>-Zellen erfordert. Nicht-Protein-Antigene sind in der Lage, eine T-Zell-unabhängige Antikörperproduktion zu induzieren. Dabei kann auch ein Klassenwechsel stattfinden (Hess et al., 2013), jedoch entstehen dabei kaum B-Gedächtniszellen. Die Rolle dieser T-Zell unabhängigen B-Gedächtniszellen ist noch wenig erforscht und daher unklar (Kurosaki et al., 2015; Murphy und Weaver, 2018c).

### **1.2. Antikörper (Immunglobuline)**

Antikörper, auch als Immunglobuline bezeichnet, sind von B-Zellen sezernierte Glykoproteine und zentrale Effektoren der humoralen Immunantwort. Ihre Fähigkeit, spezifische Antigene zu erkennen, ermöglicht es ihnen, Pathogene direkt zu neutralisieren oder über die Aktivierung des Komplementsystems und von Immunzellen deren Zerstörung einzuleiten. Bei der Abwehr von Infektionen, der Regulierung der Immunantwort und der Bildung von Immunität nach Impfungen spielen Immunglobuline eine entscheidende Rolle.

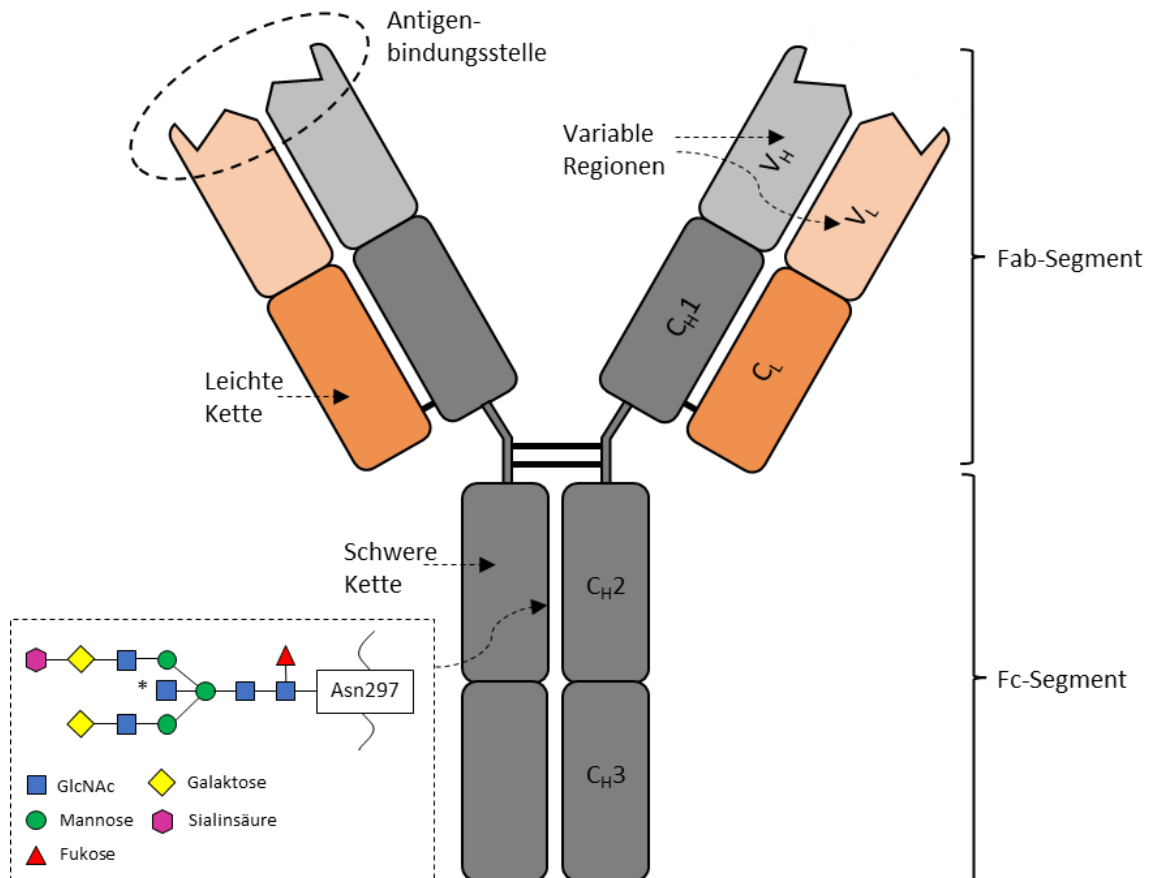
# Einleitung

---

## 1.2.1. Struktur

Antikörper sind die sezernierte Form des membrangebundenen B-Zell-Rezeptors (BCR) auf der Oberfläche einer B-Zelle. Diese Glykopeptide stimmen in ihrer Struktur überein. Sie bestehen aus zwei identischen leichten Ketten ( $\kappa$  oder  $\lambda$ ) und zwei identischen schweren ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , oder  $\epsilon$ ) Ketten. Jede Kette wird ihrerseits aus verschiedenen Regionen gebildet. Die schwere Kette eines IgG-Antikörpers umfasst vier Regionen:  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ; die leichte Kette besteht aus zwei Regionen:  $V_L$  und  $C_L$ . Die Ketten sind über Disulfidbrücken so verbunden, dass sie ein Ypsilon formen. Die  $V_H$ - und  $V_L$ -Regionen bilden zusammen den variablen Teil des Antikörpers, welcher die Antigenbindungsstelle beinhaltet; die  $C_L$ -, sowie die  $C_{H1}$ -,  $C_{H2}$ - und  $C_{H3}$ -Regionen formen den konstanten Teil der jeweiligen Kette. Das Molekül kann in drei Stücke aufgespalten werden: zwei Fab-Fragmente (aus  $V_H$ -,  $C_{H1}$ -,  $V_L$ - und  $C_L$ -Regionen), die für die Bindung von Antigenen verantwortlich sind, und ein Fc-Fragment (bestehend aus  $C_{H2}$ - und  $C_{H3}$ -Regionen), das die Effektorfunktion bestimmt (*Abbildung 1*). (Murphy und Weaver, 2018e; Schroeder und Cavacini, 2010)

Anhand der Sequenz der schweren Ketten, die entweder vom Typ  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , oder  $\epsilon$  sein kann, wird das Molekül einer der fünf Hauptklassen beziehungsweise Isotypen zugeordnet: Immunglobulin D (IgD), IgM, IgG, IgA und IgE. IgG und IgA (Nicholson, 2016; Schroeder und Cavacini, 2010). IgG und IgA lassen sich zudem in Subklassen unterteilen: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 beziehungsweise IgA1 und IgA2 (Murphy und Weaver, 2018f). Die konstante Domäne der Ketten determiniert die charakteristischen Funktionen der einzelnen Klassen beziehungsweise Subklassen (Goulet und Atkins, 2020).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls**

Dargestellt ist ein monomer vorliegender IgG-Antikörper (s. Kap. 1.2.1). An das Asparagin 297 in der C<sub>H2</sub>-Region kann eine Oligosaccharidstruktur angehängt werden (s. Kap. 1.2.3). Der Stern „\*“ markiert den Bisection-GlcNAc Zucker.

### 1.2.2. Funktion und Subklassen

Antikörper sind die Effektormoleküle der adaptiven humoralen Immunantwort. Ihre spezifische variable Region ermöglicht die Erkennung von Antigenen über zwei Bindungsstellen, während die konstante Region die Fc-abhängigen Effektorfunktionen steuert. Durch die Bindung an Antigene, wie Toxine oder Oberflächenmoleküle von Viren, können Antikörper diese neutralisieren. Der Fc-Teil vermittelt darüber hinaus Funktionen wie die Antikörper-abhängige Opsonisierung und Phagozytose durch Zellen (ADCP), die Antikörper-, beziehungsweise komplementabhängige Zytotoxizität (ADCC, beziehungsweise CDC) sowie die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (Cobb, 2020; Golay et al., 2022; Nimmerjahn et al., 2023).

## Einleitung

---

Neutralisierung bezeichnet die Bindung von Antikörpern an Pathogene, wodurch deren Eindringen in Zellen somit eine Infektion verhindert wird. Opsonisierung beschreibt die oberflächliche Bedeckung von Erregern zur leichteren Aufnahme durch Phagozyten, insbesondere Makrophagen und Neutrophile. Sind daran Antikörper beteiligt, spricht man von ADCP. Eine Möglichkeit zur Aktivierung des Komplementsystems ist der klassische Weg durch Antikörper. Die Kaskade wird durch die Anheftung von Pathogen-gebundenem IgM oder IgG, also Immunkomplexen, an das Komplementprotein C1q ausgelöst. Dieser Wirkmechanismus entspricht der CDC. ADCC beschreibt die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) durch Antikörper, die daraufhin zytotoxische Granula freisetzen (Golay et al., 2022; Goulet und Atkins, 2020).

Je nach Isotyp und Subklasse variieren die Eigenschaften der Immunglobuline. Nach der Aktivierung einer B-Zelle wird zunächst IgM sekretiert, das auch den membrangebundenen BCR vom IgM-Typ auf naiven B-Zellen widerspiegelt. Dieser Isotyp besitzt die Fähigkeit, J-Ketten-abhängige Pentamere, seltener J-Ketten-unabhängige Hexamere, zu bilden. Dadurch kann IgM effektiv Antigene binden, bevor die Affinität der variablen Regionen im Laufe der Immunantwort weiter erhöht wird (Randall et al., 1992). IgM als Pentamer findet man im Blutkreislauf, jedoch kann diese Form auch über die gebundene J-Kette aktiv auf mukosale Oberflächen transportiert werden.

IgD wird zusammen mit IgM auf der Oberfläche reifer naiver B-Zellen exprimiert, jedoch nur in geringen Mengen freigesetzt. Die genaue Funktion ist Gegenstand aktueller Forschung. IgA tritt sowohl als Monomer oder auch als J-Ketten-abhängiges Dimer auf. Es kommt im Blut sowie als Dimer auf mukosalen Oberflächen vor (Johansen et al., 2000). Als Hauptakteur in Sekreten und auf Epithelien der Atemwege übt es dort eine essenzielle Schutzfunktion aus. IgE, stets als Monomer, spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Parasiten und in der Pathophysiologie von Allergien. IgG, ebenfalls als Monomer, findet sich in der Blutbahn, sowie in Extrazellularräumen. Wie IgM kann es mit dem Komplementfaktor C1q interagieren und dadurch Komplementkaskaden auslösen (Goulet und Atkins, 2020; Murphy und Weaver, 2018f).

IgG ist der häufigste Isotyp im Blut und Extrazellularraum und zeichnet sich durch die längste Halbwertszeit im Serum aus: sie beträgt etwa sieben Tage für IgG3 und 20–21 Tage für IgG1, IgG2 und IgG4. (Goulet und Atkins, 2020). IgG übernimmt auch in den unteren

Atemwegen eine schützende Funktion, da es durch die weniger dichte Schleimschicht der Alveolen hindurchdringen kann (Murphy und Weaver, 2018c). IgG-Antikörper vereinen vielfältige Funktionsweisen: Neutralisierung, Opsonisierung, beziehungsweise ADCP, CDC und ADCC (Schroeder und Cavacini, 2010; Yu et al., 2020). Seine neutralisierende Wirkung entfaltet IgG insbesondere bei Toxinen, Bakterien und Viren. Viren nutzen häufig spezifische Oberflächenmoleküle, um an Wirtszellen zu binden, in sie einzudringen und eine Infektion auszulösen. Neutralisierende IgG-Antikörper verhindern diese Bindung und blockieren somit die Infektion. Über das Fc-Fragment binden Immunglobuline an sogenannte Fc-Rezeptoren (FcR), die ihre Effektorfunktionen vermitteln. IgG-Antikörper binden dabei entweder an klassische (Typ-I) Fc-gamma-Rezeptoren oder an Typ-II Fc-Rezeptoren, wie zum Beispiel C-Typ-Lektin-Rezeptoren, wie DC-SIGN oder CD23 (Pincetic et al., 2014).

Insgesamt kommen FcRs in unterschiedlichen Kombinationen auf verschiedenen Immunzelltypen und Blutplättchen vor. Die drei Varianten der klassischen humanen Fc-gamma-Rezeptoren (FcγRs: FcγRI, FcγRIIa/b/c und FcγRIIIa/b) erkennen den Fc-Teil von IgG. Während FcγRI, FcγRIIa/c und FcγRIIIa aktivierende Signalwege auslösen, vermittelt FcγRIIb hingegen inhibierende Signale (Golay et al., 2022; Oosterhoff et al., 2022). Bei Aktivierung induzieren FcRs neben oben genannte Effektorfunktionen (ADCP, ADCC und CDC) auch die Stimulation der aktivierten Zelle. Umgekehrt kann die Immunantwort durch die Hemmung der Stimulation über FcγRIIb eingedämmt werden. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die für die ADCC entscheidend sind, tragen insbesondere den aktivierenden FcγRIIIa auf ihrer Oberfläche. Dieser bindet bevorzugt Immunkomplexe, die IgG1- und IgG3-Antikörper enthalten. Im Gegensatz dazu exprimieren B-Zellen ausschließlich den inhibierenden FcγRIIb (Nimmerjahn und Ravetch, 2008).

Die oben beschriebenen Effektorfunktionen variieren zwischen den IgG-Subklassen IgG1--4. IgG1 und IgG3 sind in der Lage alle Funktionen auszuüben. Durch Hexamerbildung binden sie besonders gut C1q und durch können durch hohe Affinität zu aktivierenden FcγRs mit diesen interagieren. IgG2 wirkt wenig opsonisierend und löst nur eingeschränkt eine ADCC- oder CDC-Antwort aus. IgG4 nimmt eine Sonderstellung unter den IgG-Subklassen ein. In seinen Effektorfunktionen ähnelt es IgG2, kann jedoch keine CDC auslösen. Im Gegenteil wurde vorgeschlagen, dass es sogar die Hexamerbildung durch IgG1 und IgG3 hemmen könnte (Buhre et al., 2022; Lilienthal et al., 2018; Schroeder und Cavacini, 2010). Darüber

## Einleitung

---

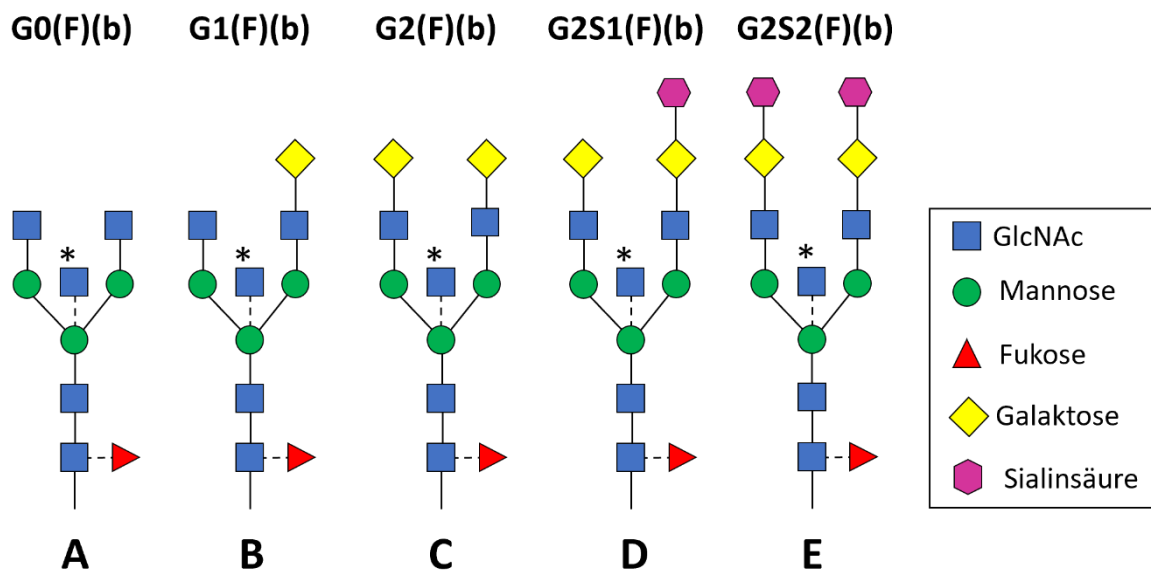
hinaus kann IgG4 durch den sogenannten Fab-arm exchange Hybridantikörper mit zwei verschiedenen Antigenespezifitäten bilden, was die Möglichkeit zur Immunkomplex-Bildung einschränkt. Von allen IgG-Subklassen zeigt IgG4 die niedrigste Affinität zu aktivierenden FcγRs, während es eine vergleichbare Affinität zum inhibitorischen FcγRIIb aufweist (Bruhns et al., 2009; Buhre et al., 2022; Goulet und Atkins, 2020). Aufgrund dieser Eigenschaften werden IgG4-Antikörpern nicht nur aktivierende, sondern auch inhibitorische Funktionen zugeschrieben.

Die IgG-Subklassen-Gene sind in einer definierten Reihenfolge im Immunglobulin-Schwereketten-gamma Genlocus angeordnet: IgG3, IgG1, IgG2 und IgG4. Aufgrund dieser Anordnung kann eine B-Zelle beispielsweise noch von IgG3 zu IgG4 „switchen“, jedoch nicht in umgekehrter Richtung. Bei bestimmten Immunantworten wird auch eine zeitliche Abfolge der IgG-Subklassen beobachtet: Zunächst entstehen IgG3-Antikörper, gefolgt von IgG1, später IgG2 und schließlich IgG4 (Irrgang et al., 2023; Jackson et al., 2014). Die Art des Erregers beeinflusst die dominierenden IgG-Subklassen in der Immunantwort. Oberflächenproteine induzieren typischerweise IgG1-Antikörper, begleitet von geringeren Mengen an IgG3 und IgG4. Bakterielle Kapselpolysaccharide lösen bevorzugt die Produktion von IgG2 aus, während Viren initial IgG3 induzieren, gefolgt von IgG1. Wiederholte und dauerhafte Exposition mit demselben Antigen führt vorwiegend zur Produktion von IgG4 (Vidarsson et al., 2014). Durch Protein-Antigene T-Zell-abhängig aktivierte B-Zellen produzieren nach dem Klassenwechsel eher IgG1 und IgG3, seltener IgG4 oder IgE. Im Gegensatz dazu führt die T-Zell-unabhängige Aktivierung von B-Zellen durch Polysaccharide eher zur Bildung von IgG2 (Vidarsson et al., 2014). Insgesamt wird IgG1 und IgG3 eine aggressivere Immunantwort zugeschrieben, während IgG2 und IgG4 unter bestimmten Bedingungen weniger aggressive Antworten hervorrufen.

### 1.2.3. Glykosylierung

Antikörper sind Glykoproteine. In Kapitel 1.2.1. wurde bereits die Proteinstruktur erklärt, hier soll auf die Glyko-Komponente eingegangen werden. Jedes Immunglobulin kann an durch den Isotyp vorgegebenen Peptidsequenzen durch Kohlenhydratketten ergänzt werden. Die Glykosylierung kann bei IgG regulär am Fc-, oder je nach Peptidsequenz am Fab-Fragment stattfinden. Während jedes IgG regulär je eine Kohlenhydratkette an jeder

schweren Kette im Fc-Teil trägt, sind es nur 15–25 % der variablen Regionen (van de Bovenkamp et al., 2016). Jedes IgG besitzt ein konserviertes Asparagin 297 in der konstanten C<sub>H</sub>2-Region der schweren Ketten, wo über eine N-glykosidische Bindung Polysaccharidstrukturen angehängt werden können. Die Kernstruktur besteht aus zwei N-Acetylglucosaminen (GlcNAc), gefolgt von drei Mannose-Zuckern, welche zwei Arme (Bisection) formen, jeweils verlängert durch ein GlcNAc. Die Arme können durch Galaktose und Sialinsäure verlängert werden, während das Kernstück durch einen Bisection-GlcNAc- und/ oder durch ein Fukose-Baustein ergänzt werden kann (Flevaris und Kontoravdi, 2022; Nimmerjahn et al., 2023). Auf diese Weise ergeben sich verschiedenste Glykosylierungsmuster (s. *Abbildung 2*), welche wie Isotypen und Subklassen Einfluss auf die Eigenschaften des Immunglobulins nehmen.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung beispielhafter IgG-Oligosaccharidstrukturen**

Abgebildet sind mögliche Zusammensetzungen der Zuckerkette am Asparagin 297 der C<sub>H</sub>2-Kette eines IgG-Antikörpers. Die Kernstruktur aus GlcNAc und Mannose (**A**) kann um (**B**) einen oder (**C**) mehrere Galaktose- (G) -Zucker und (**D, E**) Sialinsäure(n) (S) ergänzt werden. Zusätzlich können eine Kern-Fukose (F) und/oder ein Bisection-GlcNAc (b) (gekennzeichnet durch „\*“) angeknüpft werden, weshalb in der Abbildung die Bindung durch eine gestrichelte Linie dargestellt wird.

Der Großteil der Antikörper-Glykosylierung findet in PCs statt, allerdings werden auch extrazelluläre Modifikationen der Kohlenhydratkette diskutiert. Die extrazellulären Veränderungen sind jedoch langsam und beschränken sich vor allem auf den Fab-Teil des

## Einleitung

---

Immunglobulins. Die Aktivierung der B-Zellen und deren PCs sind im Laufe des Lebens dynamisch und abhängig von Alter, Herkunft, Geschlecht, Krankheits- und metabolischem Status und wirkt sich so unterschiedlich auf die IgG-Subklassen Glykosylierung aus (Cobb, 2020; Nimmerjahn et al., 2023).

### 1.2.3.1. Fukose

Durchschnittlich etwa 94 % der humanen Gesamt IgG-Antikörper im Blut tragen an ihrer Kern-Kohlenhydratkette eine Fukose (Nimmerjahn et al., 2023; Vidarsson et al., 2014). Dieser Anteil bleibt bei Erwachsenen im Laufe des Lebens in Abwesenheit von wesentlichen Einflussgrößen wie Krankheiten stabil. Im Rahmen von Autoimmunerkrankungen zeigen sich in Bezug auf die IgG-Fukosylierung keine eindeutigen Muster und es konnte keine eindeutige Funktion zugeordnet werden (Dekkers et al., 2018; Flevaris und Kontoravdi, 2022; Gudelj et al., 2018). Bei der Bekämpfung maligner Tumorerkrankungen scheint F0-IgG jedoch von Vorteil zu sein, da dieses eine höhere Affinität zum aktivierenden FcγRIIIa, zum Beispiel auf NK-Zellen, zeigt (Boune et al., 2020; Golay et al., 2022; Nimmerjahn und Ravetch, 2008; Pereira et al., 2018; T. T. Wang, 2019).

Afukosylierte, antigenspezifische IgG1-Antikörper werden unter anderem mit alloimmunen Reaktionen auf Erythrozyten und Thrombozyten sowie auf Humanes Immundefizienz-Virus (HIV), Cytomegalovirus (CMV), Hepatitis B-Virus (HBV) und Dengue-Virus assoziiert (Golay et al., 2022; Oosterhoff et al., 2022). Darüber hinaus konnten nach Masern- und Mumps-Impfungen (Lebendimpfstoffe) sowie entsprechenden Infektionen F0-IgGs nachgewiesen werden (Larsen, de Graaf et al., 2021). Insgesamt wurde ein Zusammenhang mit Immunreaktionen auf behüllte Viren, beziehungsweise auf Antigene, die in Membran-gebundener Form präsentiert werden, vermutet (Larsen, de Graaf et al., 2021).

Bei der Bekämpfung von Infektionen zeigte pathogenspezifischem F0-IgG einerseits positive Wirkungen, etwa bei der Bekämpfung von Malaria und HIV (Ackerman et al., 2013; Larsen, Lopez-Perez et al., 2021). Andererseits wurden im Rahmen von Dengue-Fieber stärkere Infektionen und schweren COVID-19 Verläufen massive Entzündungsreaktionen im Verbindung mit F0-IgG beobachtet (Bournazos et al., 2021; Chakraborty et al., 2021; Larsen, de Graaf et al., 2021). Speziell bei Dengue-Fieber konnte gezeigt werden, dass F0-IgG-Antikörper in diesem Ausnahmefall vermehrt Pathogene in Zielzellen einschleusen können

(Bournazos et al., 2021; Golay et al., 2022; Teo et al., 2023). Im Zusammenhang mit schweren inflammatorischen Immunreaktionen bei COVID-19 wurde zudem ein hoher Anteil an agalaktosylierten (G0)-Gesamt IgG Antikörpern (Pongracz et al., 2022) sowie die Entstehung breit autoreaktiver IgG Antikörper (Woodruff et al., 2020, 2022) beschrieben, so dass die Ursache der starken Inflammation noch unklar bleibt.

Grundsätzlich wäre es wahrscheinlich eher wünschenswert, dass Impfstoffe Antigen-spezifische F0-IgG-Antikörper induzieren, die Pathogene effektiver attackieren.

### **1.2.3.2. Bisection GlcNAc**

Die Kernstruktur des humanen IgG-Glykoelements wird in 10–15 % der Fälle mit einem Bisection-GlcNAc modifiziert (Boune et al., 2020; Nimmerjahn et al., 2023). Vermehrtes Vorkommen von Bisection im Gesamt IgG wird mit inflammatorischen Bedingungen, zum Beispiel im Rahmen von rheumatoiden Erkrankungen, entzündlichen Darmerkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2, in Verbindung gebracht (Flevaris und Kontoravdi, 2022; Meng et al., 2022). Jedoch wurden verminderte autoantigenspezifische Bisection-IgG-Anteile im Vergleich zum Gesamt IgG bei ANCA-assoziiierter Vaskulitis und Vorliegen einer Autoimmunhämolytischen Anämie nachgewiesen (Flevaris und Kontoravdi, 2022).

Die Veränderung des Bisection-Anteils bei Immunreaktionen auf Pathogene wurde bislang kaum erforscht und zeigt kein klares Bild. Nach Impfungen gegen Influenza (inaktivierter Virusimpfstoff) und Tetanus (Toxoidimpfstoff) wurde eine transiente Abnahme des antigenspezifischen Bisection-IgG1 beobachtet, während nach der Impfung gegen HIV (Viraler Vektorimpfstoff) mehr Bisection und bei der Impfung gegen Meningokokken (Outer Membrane Vesicle-Impfstoff) keine Veränderungen zu sehen waren (Mahan et al., 2016; Selman et al., 2012; Vestrheim et al., 2014). Der Einfluss auf die Funktion des Glykoproteins ist Gegenstand aktueller Forschung. In einigen Studien wird von einer höheren Affinität zu FcγRIIIa durch die Anwesenheit eines Bisection-GlcNAcs berichtet, was zu einer erhöhten ADCC-Zunahme führen könnte (Ferrara et al., 2006). Andere Studien debattieren diese Beobachtung (Hodoniczky et al., 2005; Shinkawa et al., 2003).

Im Rahmen von COVID-19 wurden beim geringere Bisection-Anteile beim SARS-CoV-2-spezifischen IgG(1) im Vergleich zum Gesamt IgG(1) beobachtet. Dabei zeigte das spezifische IgG(1) eine transiente Abnahme des Bisection-Anteils nach Infektion,

## Einleitung

---

beziehungsweise nach der Impfung, und im Verlauf eine Zunahme (Farkash et al., 2021; Larsen, de Graaf et al., 2021; Pongracz et al., 2022; Siekman et al., 2022; St. Germain et al., 2023). Schwerere COVID-19-Verläufe korrelierten bei einer Studie mit vermehrtem anti-S1 IgG1-Bisection (Pongracz et al., 2022), während eine andere Studie niedrige anti-S IgG1-Bisection-Level in Verbindung mit schweren Verläufen nachwies (Larsen, de Graaf et al., 2021).

### 1.2.3.3. Galaktose

Das zuständige Enzym für die IgG-Fc-Galaktosylierung ist die  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase (B4GalT1) (T. T. Wang, 2019). Der Anteil galaktosylierten IgGs (Gal-IgG) ist äußerst variabel, zwischen 20 und 80 %, steigt zum Beispiel in der Schwangerschaft und sinkt bei Entzündungen und im Alter (Jennewein et al., 2019; Nimmerjahn et al., 2023). Passend dazu wurden hohe Spiegel agalaktosylierter IgG-Antikörper (G0-IgG) bei inflammatorischen Zuständen, zum Beispiel im Kontext von Autoimmunerkrankungen, nachgewiesen (Buhre et al., 2022; Cobb, 2020; Gudelj et al., 2018). Darüber hinaus konnten Immunkomplexe mit murinem Gal-IgG1 über die Interaktion mit Fc $\gamma$ RIIb und Dectin-1 inflammatorische Immunprozesse inhibieren (Karsten et al., 2012). Im Rahmen von Autoimmunität gilt G0-IgG als inflammatorisch, während Gal-IgG antiinflammatorische Wirkungen zu haben scheint.

Im Kontext von Infektionserkrankungen zeigt sich bisher kein klares Bild. Bei Immunreaktionen gegen HBV und HCV korrelierte eine niedrige antigenspezifische IgG-Galaktosylierung mit der Schwere der Erkrankung (Mehta et al., 2008), während antigenspezifisches G0-IgG1 in Zusammenhang mit besseren antiviralen Antworten gegen HIV und nach Impfungen gebracht wurde (Ackerman et al., 2013; Vaccari et al., 2016).

Eine mögliche Erklärung könnte in der Beobachtung liegen, dass die IgG-Galaktosylierung unterschiedliche Effekte auf verschiedene Immunaktivierungen zu haben scheint. Es wurde darüber berichtet, dass durch die Präsenz endständiger Galaktose-Zucker an der Kohlenhydratkette, die IgG-Fc-Fragmente vermutlich besser interagieren und dadurch verstärkt hexamerisieren und C1q und somit die CDC aktivieren (Dekkers et al., 2017; Nimmerjahn et al., 2023; van Osch et al., 2021). Wie bei der inflammatorischen Autoimmunität könnte G0-IgG stärker Neutrophile aktivieren.

Uneinigkeit besteht darüber, ob Gal-IgG einen Einfluss auf FcγRs hat. Möglich ist, dass Galaktose die Bindung von IgG1 an FcγRIIIa und FcγRIIIa verstärkt, und somit auch die ADCC (Dekkers et al., 2017; Thomann et al., 2015). Passend dazu zeigten Jennewein et al. (2019), dass Gal-IgG im Vergleich zu G0-IgG stärker an FcγRs auf NK-Zellen bindet, wodurch diese zur Degranulierung und Chemokin-Sekretion animiert wurden. Im Gegensatz dazu beobachteten Vicente et al. (2022) im Rahmen von COVID-19 eine stärkere Bindung von G0-IgG an FcγRIIIa, was zu einer verstärkten NK-Zell-Aktivierung, beziehungsweise ADCC, führte.

Weitere Untersuchungen müssen in Zukunft angestrebt werden, um Klarheit darüber zu bringen. Verschieden galaktosylierte IgG-Subklassen mögen auf Komplement und verschiedene Immunzellen auch über noch unbekannte Glyko-Rezeptoren unterschiedliche Auswirkungen haben.

### **1.2.3.4. Sialinsäure**

In der Literatur finden sich breite Angaben zum Anteil sialylierten Gesamt IgGs (Sial-IgG) und reichen von zwei bis zu 15 % (Boune et al., 2020; Nimmerjahn et al., 2023; Vidarsson et al., 2014). Dieser Anteil unterliegt vielen Einflüssen, sinkt zum Beispiel im Alter und steigt bei erhöhtem Östrogenspiegel (Nimmerjahn et al., 2023). Das zuständige Enzym für die endständige IgG-Fc -Sialylierung ist die  $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase (ST6GAL1) (T. T. Wang, 2019).

Im Kontext von Autoimmunerkrankungen wird Sial-IgG eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben, während unsialyliertes IgG (S0-IgG) eher als inflammatorisch gilt (Gudelj et al., 2018) und natürlich durch Verlust des Anknüpfungspunktes mit G0-IgG korreliert. Einerseits scheint antigenspezifisches S0-IgG1 (wie auch G0-IgG1) bei der Bekämpfung von HIV von Vorteil zu sein (Ackerman et al., 2013), andererseits wurde bei Influenza-spezifischem IgG ein größerer sialylierter Anteil im Vergleich zum Gesamt IgG gemessen (Mahan et al., 2016). Nach Vakzinierung gegen Influenza, Tetanus, Pneumokokken und Meningokokken zeigten sich kurzfristig vermehrt Sial-IgG (wie auch Gal-IgG) (Selman et al., 2012; Vestrheim et al., 2014). Dabei konnten nach Influenza-Impfung vermehrte antigenspezifische Sial-IgGs nachgewiesen werden, welche eine Rolle in der Affinitätsreifung von IgG zu spielen scheinen (T. T. Wang et al., 2015).

## Einleitung

---

Der genaue Einfluss der Sialylierung auf die Funktion von IgG(1) wird noch erforscht. Beispielsweise soll die antiinflammatorische Wirkung des im Rahmen der Therapie von Rheumatoider Arthritis in großen Mengen (2mg/kg) eingesetzten IVIG (intravenöses Immunglobulin) durch Sial-IgG vermittelt werden (Kaneko et al., 2006). Dabei soll die Sialylierung des Gesamt Serum IgGs wie ein großes immunologisches Puffersystem wirken, bei dem Sial-IgG über ein C-Typ-Lektin-Rezeptor, DC-SIGN, zum Beispiel den inhibitorischen FcγRIIb hochreguliert (Anthony et al., 2011; Sondermann et al., 2013). Darüber hinaus wird diskutiert, ob die Sialylierung von IgG zu einer Konformationsänderung führt, woraus eine geringere Affinität zu aktivierenden FcγRs und stattdessen eine höhere Affinität zu zuckerbindenden Rezeptoren wie DC-SIGN und CD23 resultiert (Anthony et al., 2011; Kaneko et al., 2006; Pincetic et al., 2014; Sondermann et al., 2013; Temming et al., 2019). Die Bindung von Sial-IgG an CD23 soll eine stärkere Expression von FcγRIIb auf B-Zellen induzieren und somit die Aktivierungsschwelle über den BCR erhöhen, sodass nur besonders antigenaffine Zellen weiter proliferieren und sich differenzieren können, um hochaffine Antikörper zu produzieren (T. T. Wang et al., 2015; T. T. Wang, 2019). Außerdem wurde in vitro die Störung der Immunkomplexbildung und CDC durch Sial-IgG im Vergleich zu Gal-IgG beobachtet (Collin und Ehlers, 2013; T. Li et al., 2017; Quast et al., 2015; Thomann et al., 2015).

Der Effekt auf NK-Zellen und somit die ADCC fällt abhängig vom Kontext unterschiedlich aus und beteiligte Rezeptoren sind (noch) unbekannt. Somit zeigten Sial-IgG-Antikörper in einigen Studien (zum Teil in Kombination mit Fukosylierung) eine verminderte NK-Zell-Aktivierung, beziehungsweise korrelierte S0-IgG (wie auch G0-IgG) mit einer verstärkten NK-Zell-Aktivierung (Saldova et al., 2008; Vicente et al., 2022). Boudreau et al. (2023) zeigten hingegen vermehrte NK-Zell-Degranulierung im Zusammenhang mit Sial-IgG. Auch hier müssen in Zukunft weitere Studien Klarheit bringen.

Die Sialylierung der IgG-Antikörper wird insbesondere bei der Produktion je nach Aktivierung der B-Zelle reguliert. Innerhalb eines Individuums variiert die Sialylierung antigenspezifischer IgG-Antikörper, welche von externen Stimuli auf die aktivierte B-Zelle abhängt (Bartsch et al., 2020; Nimmerjahn et al., 2023). Je nach Ko-Stimulierung der B-Zelle, zum Beispiel durch unterschiedliche Zytokine, wird die Expression der ST6GAL1 und damit

der Sialylierungsgrad der IgG-Antikörper reguliert (Bartsch et al., 2020; Hess et al., 2013; T. Wang, 2019).

Interessante Erkenntnisse lieferte eine Immunisierungsstudie in Mäusen mit Fremdprotein und verschiedenen Adjuvantien (Bartsch et al., 2020). Die Studie zeigte, IgG-Antikörper kurz nach einer Immunisierung, produziert von kurzlebigen extrafollikulären Plasmazellen mit hoher ST6GAL1-Expression, stark galaktosyliert und sialyliert waren. Mit der Zeit dominierten jedoch langlebige, keimzentrumsabhängige Plasmazellen mit niedriger ST6GAL1-Expression und niedrige IgG-Galaktosylierung und -Sialylierung. Diese Ergebnisse könnten einen die oben beschriebenen unterschiedlichen Beobachtungen erklären und darauf hindeuten, dass der Zeitpunkt der Messung der IgG-Glykosylierung eine entscheidende Rolle spielt. Darüber hinaus liefert die Studie erste Hinweise darauf, dass frühe und späte IgG-Antikörper nach einer Impfung unterschiedliche Funktionen erfüllen könnten.

### **1.3. Impfungen**

Das Verständnis des Immunsystems nutzt der Mensch, um Schutzstrategien gegen Erreger zu entwickeln: Impfungen. Ziel der Impfung ist es, eine möglichst nachhaltige Immunität zu induzieren, das immunologische Gedächtnis des adaptiven Immunsystems als Schlüssel.

#### **1.3.1. Prinzip**

Das Prinzip der Impfung basiert auf der Exposition mit einem bestimmten abgetöteten oder attenuierten Pathogen oder einem Pathogenbestandteil (Antigen; inzwischen oft ein Oberflächenprotein) plus Adjuvans, welches im kontrollierten Rahmen eine Immunreaktion auslösen und somit auch das immunologische T- und B-Zell-Gedächtnis aktivieren soll. Adjuvantien wie Aluminiumhydroxid wurden ursprünglich als Depotsubstanz entwickelt, um das applizierte Molekül länger im Körpergewebe zu halten. Heute weiß und nutzt man, dass Adjuvantien wie immunologische Ko-Stimuli wirken können und es werden verschiedenste Adjuvantien entwickelt, um definierte Immunreaktionen zu fördern (Pulendran et al., 2021). Die latent im Organismus vertretenen Gedächtniszellen sollen bei einer tatsächlichen Infektion schneller und in größerer Anzahl aktiviert werden, um den Erreger schnell und effektiv zu bekämpfen, sodass die Erkrankung im besten Fall nicht ausbricht und keine Folgeschäden hinterlässt (Vetter et al., 2018). Je nach Natur des

## Einleitung

---

Erregers setzt eine schützende Immunität verschiedene Mechanismen voraus. Die meisten Pathogene können durch Antikörper effektiv bekämpft werden, andere, vor allem intrazelluläre Pathogene, erfordern zusätzlich eine zelluläre CD8+ T-Zell-Gedächtnisantwort (Murphy und Weaver, 2018a).

Um die Grundlage für eine ausreichende langfristige Immunität zu legen, werden einige Impfstoffe mehrfach verabreicht. Nach der primären Immunisierung bilden sich bereits erste antigenspezifische Antikörper und Immunzellen. Nach einer vorübergehenden Plateau-Phase sinken die Immunglobulin-Titer. Wird das „vorgewarnte“ Immunsystem zum richtigen Zeitpunkt im Rahmen einer sekundären Immunisierung (Boost) erneut mit dem Antigen konfrontiert, entstehen einerseits höhere Antikörpertiter, welche zusätzlich die Affinitätsreifung im Keimzentrum durchlaufen haben. (Murphy und Weaver, 2018a). Die Antikörpertiter fallen über die Zeit wieder ab, aber die IgG-Antikörpertiter halten je nach Impfung ein gewisses Niveau, welches von langlebigen PCs generiert wird. Diese können je nach Impfstoff über viele Jahre bestehen. In der Regel wird eine Impfung insbesondere an der Menge der initial entstehenden und manchmal zusätzlich an den langlebigen IgG-Antikörpern charakterisiert (Chen et al., 2022).

Auf dem aktuellen Markt werden unterschiedliche Impfstofftypen angewendet, unter anderem Lebendimpfstoffe mit attenuierten Erregern, Tot-, Peptid- und Vektorimpfstoffe, sowie mRNA-Impfstoffe, die für ein definiertes Pathogenoberflächenprotein kodieren. mRNA Impfstoffe erlangten im Rahmen der COVID-19 Pandemie große Bekanntheit, als der erste Impfstoff seiner Art, BNT162b2 mit dem Handelsnamen COMIRNATY aus dem Hause BioNTech/Pfizer, zugelassen wurde (Jain et al., 2021).

### 1.3.2. mRNA-Impfstoffe

mRNA wurde in den 1960ern entdeckt, aber erst seit 1984, mit der Entdeckung der Methode zur Synthese biologisch aktiver mRNA, zum medizinischen Einsatz erforscht (Dolgin, 2021). Bis zur COVID-19 Pandemie konzentrierte sich die Arbeit mit mRNA vor allem auf experimentelle Krebstherapien. Die im Rahmen der Krebsforschung erlangten Erkenntnisse wurden für die Produktion neuartiger mRNA-Impfstoffe angewendet. Der Wirkmechanismus besteht darin, die als Antigen-wirkenden Proteine in der mRNA zu kodieren, sodass körpereigene Zellen diese Proteine produzieren und eine spezifische

Immunantwort auslösen. So können sicher große Mengen des gewünschten Antigen-Produktes im Körper hergestellt werden und dort antigenspezifische Zellen und Antikörper aktivieren und generieren (Jain et al., 2021).

Allerdings verhält sich mRNA im Organismus instabil und wird schnell abgebaut (Jain et al., 2021). Um diese Problematik zu umgehen, wird die mRNA in Lipid Nanopartikel (LNPs) verpackt. Die LNPs stabilisieren die mRNA, verbessern die Aufnahme durch Körperzellen und verfügen selbst über das Potential als Adjuvans (Alameh et al., 2021; Kiaie et al., 2022). Außerdem werden die 3'- und 5'-Enden des mRNA-Strangs mit speziellen Sequenzen versehen, welche zur besseren Bindung an Ribosomen und Stabilität beitragen. Zusätzlich muss man zwischen replizierender und nicht-replizierender mRNA unterscheiden. Nicht-replizierende mRNA, wie sie im Impfstoff BNT162b2 verwendet wird, besteht lediglich aus dem Protein-kodierenden Abschnitt, zwischen untranslatierten Abschnitten und den modifizierten 3'- und 5'-Enden. Sie wird nicht in das Genom eingebaut und durch den Organismus degradiert (Jain et al., 2021).

Einmal injiziert, gelangt die in LNPs verpackte mRNA in das Zytoplasma körpereigener Zellen. Nachdem sie sich von den LNPs gelöst hat, wird sie von den Ribosomen translatiert, das heißt in das gewünschte Protein-Antigen übersetzt. Letzteres kann auf der Zelloberfläche oder als lösliches Protein sezerniert werden, und eine spezifische Immunantwort auslösen. (Jain et al., 2021)

### **1.4. Impfung gegen SARS-CoV-2**

Zur Bekämpfung der durch den SARS-CoV-2 Virus ausgelöste Pandemie wurden mRNA und Adenovirus-basierte Impfstoffe entwickelt und zugelassen. Innerhalb weniger Monate nach Veröffentlichung des Virusgenoms wurde der mRNA-Impfstoff BNT162b2 als erster für die breite Öffentlichkeit Ende 2020 zugelassen (Burki, 2023; Lamb, 2021). Um den Impfstoff und seine Funktionsweise besser zu verstehen, soll zuvor auf das SARS-CoV-2 eingegangen werden.

#### **1.4.1. SARS-CoV-2 und COVID-19**

Das SARS-CoV-2 Virus ist ein behülltes RNA-Virus. Das Virusgenom kodiert für nicht-strukturelle Proteine, welche für die Virusreplikation zuständig sind, und vier

## Einleitung

---

Strukturproteine, Spike (S), Envelope (E), Membran (M) und Nucleocapsid (NCP). Umhüllt von einer Membran, in welche S-, E- und M-Proteine eingebettet sind, bilden NCP-Proteine, gebunden an das virale Genom, das Zentrum des Virus. Das S-Protein wird als einzelne Polypeptidkette produziert und besteht aus zwei Domänen, S1 und S2. Im Verlauf können die Domänen gespalten werden und liegen als Heterodimere vor. Diese lagern sich wiederum zu Trimeren zusammen, sodass das S-Protein in der viralen Membran als Trimer vorliegt. Dabei bildet S1 den extrazellulären Part mit der Rezeptorbindedomäne (RBD), die für die Bindung an den Wirtszellrezeptor Angiotensin-Konvertierendes Enzym 2 (ACE2) zuständig ist, während S2 den membrandurchgängigen und intrazellulären Part darstellt (Gusev et al., 2022; Hardenbrook und Zhang, 2022).

SARS-CoV-2 ist der Auslöser von COVID-19. Es repliziert in den unteren Atemwegen und wird primär über Tröpfchen übertragen. Durch die lange Inkubationszeit und asymptomatische Infektionen, sowie hohe Ansteckungs- und Übertragungsfähigkeit, konnte es sich rasant ausbreiten. Zuerst im Dezember 2019 in Wuhan, China nachgewiesen, dauerte es knapp drei Monate, bis die WHO am elften März 2020 den Ausbruch als Pandemie charakterisierte (Siddiqui et al., 2022; World Health Organization, 2020). Vorwiegend wird COVID-19 als leichte Erkältungskrankheit symptomatisch, jedoch kann es auch zu schweren Verläufen mit Atem- und Organversagen bis hin zum Tod kommen und langfristige Schäden hinterlassen (Merad et al., 2022). Neben den gesundheitlichen Folgen kam es global zu massiven negativen Auswirkungen auf sozialer, gesellschaftlicher und wirtschaftlicher Ebene (Clemente-Suárez et al., 2021), welche die internationale Zusammenarbeit zur Bewältigung der Notlage notwendig machten. Somit startete der Wettlauf der Impfstoffforschung gegen SARS-CoV-2.

### 1.4.2. Der mRNA-Impfstoff BNT162b2

Am zweiten Dezember im Vereinigten Königreich, am elften Dezember in den USA und zehn Tage später in der Europäischen Union, wurde der erste SARS-CoV-2-Impfstoff und damit gleichzeitig der erste mRNA-Impfstoff BNT162b2 von BioNTech/Pfizer für die breite Bevölkerung zugelassen (Lamb, 2021). BNT162b2, entwickelt und produziert durch BioNTech/Pfizer, enthält Nukleosid-modifizierte mRNA, umhüllt von LNPs. Als antigenwirkende Komponente wurde das S-Protein gewählt und in mRNA-Form verwendet. Nach

zwei intramuskulären Dosen von je 30 µg im Abstand von 21 Tagen, sollte sieben Tage nach der zweiten Vakzinierung mit einem vollständigen Immunschutz zu rechnen sein (Lamb, 2021). Zur Messung des Impferfolges wurden in den klinischen Phase I/II-Studien primär Serum IgG-Titer und deren Fähigkeit zur Neutralisierung verschiedener Spike-Varianten, aber auch die Menge generierter SARS-CoV-2-spezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen, betrachtet. Insgesamt wurde in den Phase III-Studien wenige Wochen nach zweiten Impfung eine Effektivität von bis zu 95 % zur Verhinderung von COVID-19 erreicht, in Daten nach der Zulassung sogar bis zu 97 %, wenn man von symptomatischen und schweren COVID-19 Fällen ausgeht (Verbeke et al., 2021).

Im Laufe der COVID-19 Pandemie und im Rahmen von neuen SARS-CoV-2 Varianten wurde dazu aufgerufen, die Immunisierung ein drittes, oder viertes Mal aufzufrischen (Altmann und Boyton, 2022), was allerdings außerhalb des Zeitrahmens meiner Studie stattfand. Insgesamt wurde die Pandemie überwunden und momentan wird insbesondere auch der Langzeitschutz der Impfung untersucht.

# Einleitung

---

## 1.5. Zielsetzung

Impfstoffe werden seit Langem von Menschen zur Vorbeugung von Infektionen eingesetzt. mRNA-Impfstoffe gegen Pathogene stellen hingegen eine neuartige Entwicklung dar und wurden erstmals im Kontext der SARS-CoV-2 Pandemie zugelassen. Das erste zugelassene SARS-CoV-2 mRNA-Vakzin, BNT162b2, kodiert für das virale Spike-Protein (S) und wurde weltweit, auch in Deutschland, breit eingesetzt (Bundesministerium für Gesundheit, 2023; World Health Organization, 2024c). Obwohl frühzeitige Studien eine hohe Effektivität mit wenigen Nebenwirkungen wenige Wochen nach der zweiten mRNA-Impfung zeigten, waren zum Zeitpunkt meines Forschungsbeginns Ende 2020 nur begrenzte Daten über die tiefere Natur der Immunantwort verfügbar. Ziel der vorliegenden Forschung war es, die Immunantwort auf einen mRNA-Impfstoff detaillierter zu charakterisieren. Hierbei sollte die B-Zell- und Antikörperantwort nach ein bis zwei BNT162b2-Impfungen sowohl bei zuvor SARS-CoV-2-naiven Proband\*innen als auch bei genesenen Personen untersucht werden.

Im Rahmen der Studie wurden mehrere Schwerpunkte gesetzt: Zum einen sollte die anti-S IgG-Subklassen-Antwort sowie deren Fc-Glykosylierung im Blut charakterisiert werden.

Zum anderen sollte die S-spezifische B-Zell-Antwort, mit Fokus auf Plasmazellen und B-Gedächtniszellen, im Blut charakterisiert werden. Dabei sollte auch das Expressionslevel der  $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase-1 (ST6GAL1) in Plasmazellen, das Enzym, welches Sialinsäuren an IgG-Antikörper knüpft, betrachtet werden.

Darüber hinaus sollte die anti-S IgG-Antwort im Speichel analysiert werden, da diese Antikörper in vorderster Front im Kampf gegen das Virus in den Atemwegen wirken.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zur durch BNT162b2 induzierten B-Zell-Antwort, zur anti-S IgG-Subklassenverteilung und deren Glykosylierungsmuster sowie zur nachweisbaren Antikörperantwort im Speichel könnten einen wertvollen Beitrag für die Entwicklung zukünftiger mRNA-Impfstoffe leisten. Diese Erkenntnisse könnten dabei helfen, neue (mRNA-) Impfstoffgenerationen zu entwerfen, die noch gezielter und effektiver wirken.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studiendesign

In dieser Arbeit wurden Vollblut-, Serum und Speichelproben an verschiedenen Zeitpunkten vor und nach 1–2 Impfungen mit dem mRNA-Impfstoff BNT162b2 von BioNTech/Pfizer gegen SARS-CoV-2 untersucht (*Tabelle 1*). Alle Proband\*innen wurden im Winter 2020/21 am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (UKSH Lübeck) rekrutiert.

Die Auswahl der Proband\*innen beschränkte sich auf fünf Personengruppen (*Tabelle 2*). **Gruppe 1** enthielt 25 SARS-CoV-2 naive (ohne vorherige SARS-CoV-2 Infektion) Proband\*innen, von denen sechs im Untersuchungszeitraum einmalig und 19 im Abstand von 34–35 Tagen zweifach geimpft wurden (Naive Geimpfte, NGs). **Gruppe 2** enthielt neun geimpfte Individuen mit vergangener COVID-19 Infektion (Vorinfizierte Geimpfte, VGs) 158–305 Tagen vor der ersten Impfung. Die VGs erhielten ihre zweifache BNT162b2-Immunsierung im Abstand von 32–35 Tagen oder wurden im Untersuchungszeitraum nun einmalig geimpft. Darüber hinaus wurden als **Gruppe 3**: zwei Vorinfizierte Ungeimpfte (VUs) rekrutiert, deren SARS-CoV-2-PCR 25, beziehungsweise 30 Tage vor Untersuchungsbeginn positiv waren; als **Gruppe 4**: 26 Naive Ungeimpfte (NUs) und als **Gruppe 5**: sechs akut Infizierte von der Intensivstation des UKSH Lübeck (Infizierte Ungeimpfte; IUs).

Serum und Vollblut der Proband\*innen aus Gruppe 1 und 2 wurde an vier Zeitpunkten gesammelt: 0–2 Tage vor Impfung (**t0**), 21–31 Tage nach der ersten Impfung (**t1**), 5–8 (**t3**) und 27–35 Tage (**t4**) nach der zweiten Impfung (entsprechend 37–43 (**t3**) und 62–70 Tage (**t4**) nach erster Impfung). Zusätzlich wurde an Tag 7–14 (**t1\***) nur Vollblut von sechs NGs und fünf VGs abgenommen. Speichelproben von 14 der 25 NGs, sowie zwei der VGs wurden 35–36 Tage (**t2**) nach der ersten Impfung (entsprechend 0–1 Tage nach der zweiten Impfung) gesammelt (*Tabelle 1*). Drei der NGs wurden etwas außerhalb dieser Zeiträume, beziehungsweise an zusätzlichen Zeitpunkten Serum und Vollblut, sowie einmalig Speichel entnommen (*vgl. Tabelle A1*).

## Material und Methoden

---

Tabelle 1: Übersicht der Probeentnahme-Zeiträume

Zeitpunkt	Tage nach 1. (2.) Impfung	Beschaffenheit der Probe
<b>t0</b>	-2 –0 Tage	Serum und Vollblut
<b>t1*</b>	7–14 Tage	Vollblut
<b>t1</b>	21–31 Tage	Serum und Vollblut
<b>t2</b>	35–36 (0–1) Tage	Speichel
<b>t3</b>	37–43 (5–8) Tage	Serum und Vollblut
<b>t4</b>	62–70 (27–35) Tage	Serum und Vollblut

Als Negativkontrollen wurden 26 ungeimpfte Individuen (Gruppe 4) ohne vorherigen Kontakt zu SARS-CoV-2 (Naive Ungeimpfte, NUs) rekrutiert. Eine Testperson spendete Serum, Vollblut und Speichel, sieben Proband\*innen nur Vollblut und 18 Proband\*innen nur Speichel.

Weiterhin wurden sechs PCR-positiv getestete COVID-19 Intensivpatient\*innen (Infizierte Ungeimpfte, IUs) (Gruppe 5) rekrutiert. Vollblutproben von fünf, sowie Serumproben von allen sechs Proband\*innen wurden gesammelt und analysiert.

**Tabelle 2: Übersicht der Studienteilnehmer\*innen**

<b>Proband*innen</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Serum*</b>	<b>Vollblut*</b>	<b>Speichel*</b>
<b>Gruppe 1: Naive Geimpfte (NGs)</b>	25	19	25	14
<b>Gruppe 2: Vorinfizierte Geimpfte (VGs)</b>	9	2	9	2
<b>Gruppe 3: Vorinfizierte Ungeimpfte (VUs)</b>	2	2	2	/
<b>Gruppe 4: Naive Ungeimpfte (NUs)</b>	26	1	8	19
<b>Grippe 5: akut infizierte Ungeimpfte (IUs)</b>	6	6	5	/
<b>Gesamt</b>	<b>68</b>	<b>30</b>	<b>49</b>	<b>35</b>

\* Proben von einem bis mehreren Zeitpunkten

Eine detaillierte Übersicht über alle Studienteilnehmer\*innen und Probeentnahmezeitpunkte findet sich im Anhang (*Kap. 7.1, Tabelle A1*).

Alle Probenentnahmen und -untersuchungen der NGs, VGs, VUs und NUs wurden auf Grundlage einer schriftlich informierten Einwilligung unter dem mit der Ethiknummer 20-123, welche am 9. April 2020 durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt und am 4. Mai 2020 erweitert wurde, durchgeführt. Die Probenentnahmen und -untersuchungen, welche die Gruppe 5 (IUs) betrafen, wurden unter dem Aktenzeichen 19-019(A) der Universität zu Lübeck durchgeführt.

### **2.2. Reagenzien, Materialien und Geräte**

Alle verwendeten Reagenzien, Materialien und Geräte sind im Anhang (*Tabellen A2–A7*) aufgeführt. Detaillierte Beschreibungen deren Anwendung folgen in den entsprechenden Kapiteln.

## Material und Methoden

---

### 2.3. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Das ELISA-Verfahren dient dem Nachweis von bestimmten Analyten, im Falle dieser Arbeit von Antikörpern, in einer Probe. Zunächst wird das Zielantigen an den Boden einer Mikrotiterplatte gekoppelt. Im nächsten Schritt wird die verdünnte (hier Serum- oder Speichel-) Probe aufgetragen, sodass vorhandene Antikörper gegen das gekoppelte Antigen binden können. Daraufhin detektiert man die gebundenen Antikörper mit einem spezifischen sekundären Enzym-konjugiertem Antikörper, der mit Hilfe eines farbigen Substrates sichtbar gemacht wird. Abschließend lässt sich durch die Messung der Absorption eine Aussage über Vorhandensein und Titer der Antikörper in der Probe treffen.

In dieser Arbeit kamen zwei Verfahren zum Einsatz, zum einen kommerziell erhältliche Anti-SARS-CoV-2-S1 IgG und Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG ELISA-Testsysteme (EUROIMMUN, Lübeck), sowie zwei verschiedene hauseigene Protokolle: HL-1, zum Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-S1 IgG/IgG1/IgG2/IgG3/IgG4 im Serum, sowie HL-2, zum Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-S1 IgG im Speichel.

#### 2.3.1. Probenaufarbeitung

##### Serum:

Die venöse Blutentnahme erfolgte mittels Sarstedt Safety Multifly-Kanüle. Nach einer mindestens 15-minütigen Stehzeit der Röhrchen bei Raumtemperatur wurden diese entweder direkt wie unten beschrieben weiterverarbeitet oder bis zu 48 Stunden bei 4 °C aufbewahrt. Durch eine zehnmündige Zentrifugation bei 3000-facher Erdbeschleunigung (g) bei Raumtemperatur konnte die Serum-Schicht getrennt und abpipettiert werden. Bis zur Durchführung des ELISAs wurden die Seren, abhängig vom Zeitpunkt der Weiterverwendung bei 4 °C, beziehungsweise bei -20 °C oder -80 °C gelagert.

##### Speichel:

Die Speichelproben wurden mittels der Sammelsystems ORACOL+ entsprechend der Anleitung des Herstellers gesammelt und zunächst bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen der Probe wurde diese bei Raumtemperatur zehn Minuten bei 3000 x g zentrifugiert, sodass der Speichel für die Analysen eingesammelt werden konnte. Der so gewonnene Überstand wurde bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt.

### 2.3.2. EUROIMMUN ELISA: Anti-SARS-CoV-2-S1 IgG, Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG

#### Serum:

Zum Nachweis von anti-S1 IgG-Antikörpern, sowie anti-NCP IgG-Antikörpern im Serum wurden unter anderem kommerziell erhältliche ELISA-Kits von EUROIMMUN (EI) verwendet. Die Durchführung der Analysen erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers.

In Kürze: Einstündige Inkubation bei 37 °C der vorbeschichteten Platte mit 100 µl 1:100 verdünntem Serum, gefolgt von dreifacher Waschung mit 300 µl Waschpuffer. Halbstündige Inkubation bei 37 °C (anti-S1 IgG) oder Raumtemperatur (anti-NCP IgG) mit 100 µl Peroxidase-markiertem Antikörper. Erneute dreifache Waschung mit 300 µl Waschpuffer, finale Inkubation über 15 (anti-NCP IgG), beziehungsweise 30 Minuten (anti-S1 IgG) bei Raumtemperatur mit 100 µl Chromogen-/Substratlösung und Abstoppen der Reaktion mit 100 µl Stopplösung. Die Absorptionsmessung erfolgte innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm und 620 nm als Referenzwellenlänge.

### 2.3.3. HL-1 ELISA: Anti-S1 IgG/ IgG1/ IgG2/ IgG3 oder IgG4 im Serum

Zunächst wurde eine 4 µg/ml S1-Lösung durch Verdünnung des lyophilisierten S1-Proteins in hauseigenem HL-Coating-Puffer (Zusammensetzung s. *Tabelle A5*) hergestellt. Anschließend wurden 96-well Mikrotiterplatten mit 33 µl je Well der S1-Lösung über Nacht bei 4 °C gekoppelt.

Am darauffolgenden Tag wurde die Platte einmal mit 20 µl HL-Waschpuffer (Zusammensetzung s. *Tabelle A5*) gewaschen und anschließend zwei Stunden rüttelnd, bei Raumtemperatur mit 30 µl des 1:100 verdünntem Serum im hauseigenen HL-Sample-Puffer (Zusammensetzung s. *Tabelle A5*) inkubiert. Daraufhin wurde die Platte dreimal gewaschen und 40 Minuten rüttelnd, bei Raumtemperatur mit 30 µl der 1:20000 (IgG, IgG1 und IgG3) oder 1:5000 (IgG2 und IgG4, alle verdünnt in HL-Sample-Puffer) gelöstem HRP-konjugiertem Sekundäantikörper (*Tabelle 3*) inkubiert. Es folgten drei Waschschritte, bevor die Wells mit 100 µl TMB überschichtet wurden. Die Reaktion wurde nach 5–10 Minuten mit 50 µl HL-Stopplösung (Zusammensetzung s. *Tabelle A5*) beendet. Die photometrische

## Material und Methoden

---

Bestimmung der Farbintensität erfolgte nach spätestens 30 Minuten bei 450 nm, mit einer Referenzwellenlänge von 610 nm.

**Tabelle 3: Verdünnung und Konzentration der Sekundärantikörper in den HL ELISA-Protokollen**

Detektionsantikörper (Klon)	Ausgangs-Konzentration (mg/ml)	Verdünnung	Finale Konzentration (µg/ml)
Anti-IgG (A80-104P)	1,0	1:20000	0,05
Anti-IgG1 (HP6001)	0,5	1:20000	0,025
Anti-IgG2 (HP6014)	0,55	1:5000	0,11
Anti-IgG3 (HP6050)	0,35	1:20000	0,0175
Anti-IgG4 (HP6025)	0,5	1:5000	0,1

### 2.3.4. HL-2 ELISA: Anti-S1 IgG im Speichel

Ähnlich wie im HL-1 Protokoll wurden 96-well-Mikrotiterplatten mit 50 µl einer 4 µg/ml S1-Lösung über Nacht bei 4 °C gekoppelt.

Am darauffolgenden Tag wurde die Platte einmal mit 150 µl HL-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 15 µl HL-Coating-Puffer pro Well eine Stunde rüttelnd bei Raumtemperatur geblockt. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, erfolgte nach einem Waschgang ein einstündiger Blockierungsschritt mit 15 µl HL-Sample-Puffer rüttelnd bei Raumtemperatur. Nach drei Waschgängen wurden die Wells mit 50 µl des 1:10 verdünntem Speichel im HL-Sample-Puffer zwei Stunden rüttelnd, bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Platte dreimal gewaschen und 40 Minuten rüttelnd, bei Raumtemperatur mit 50 µl einer 0,05 µg/ml IgG-HRP-Lösung (verdünnt in HL-Sample-Puffer) inkubiert. Es folgten drei Waschschrte, bevor die Wells mit 100 µl TMB überschichtet wurden. Die Reaktion wurde nach 5–10 Minuten mit 50 µl HL-Stopplösung beendet. Die fotometrische Bestimmung der Farbintensität erfolgte nach spätestens 30 Minuten bei 450 nm, mit einer Referenzwellenlänge von 610 nm.

Der Speichel-ELISA wurde von der Doktorandin Inga Künsting in unserem Labor etabliert und dann gemeinsam durchgeführt (Lixenfeld et al., 2021).

### 2.3.5. Spezifitätskontrolle der Sekundärantikörper

Die LC-MS, kurz Um die Spezifität der im HL ELISA verwendeten Gesamt IgG und IgG1–4-Sekundärantikörper zu überprüfen, wurden monoklonale Antikörper verschiedener Subklassen eingesetzt, hier anti-Kollagen Typ VII IgG1–4, IgA1 und IgA2 (Lixenfeld et al., 2021).

Letztere wurden zu 1 µg/ml in HL-Coating Puffer verdünnt und mit 35 µl pro Well für zwei Stunden bei 37 °C an ELISA-Platten gekoppelt. Einige Wells wurden freigelassen, um zu prüfen, ob die Sekundärantikörper unspezifische Bindungen mit der Platte eingehen. Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit 250 µl HL-Waschpuffer gewaschen und mit den verdünnten zu testenden HRP-konjugierten IgG- und IgG1–4-Detektionsantikörpern (Konzentrationen wie für HL-1 ELISA, Tab. 2.3) für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Waschungen wurde die Farbreaktion mit 100 µl TMB eingeleitet und nach 5–10 Minuten mit 50 µl HL-Stopplösung beendet. Die fotometrische Bestimmung der Farbintensität erfolgte nach spätestens 30 Minuten bei 450 nm, mit einer Referenzwellenlänge von 610 nm.

Dieses Versuchsprotokoll wurde gemeinsam mit der Doktorandin Selina Lehrian und Dr. Johann Rahmöller aus unserem Labor entwickelt und durchgeführt.

### 2.4. Glykosylierungsanalyse per LC-MS

Die LC-MS, kurz für Liquid chromatography-mass spectrometry, dient der Trennung und Bestimmung von Substanzen, in Fall dieser Arbeit von IgG-Subklassen-Fc-Glykostrukturen. Hierbei wird der synergistische Effekt der Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) ausgenutzt. So trennt man die Analyten per Flüssigkeitschromatographie auf und nutzt die Massenspektrometrie, um diese zu identifizieren.

Die Glykosylierungsanalyse der Seren wurde in Kooperation mit dem Zentrum für Metabolomik und Proteomik am Leiden University Medical Center (LUMC), Niederlande unter Leitung von Prof. Dr. Manfred Wuhrer durchgeführt und wurde zuvor in (Buhre et al., 2023; de Haan et al., 2017; Falck et al., 2017; Larsen, de Graaf et al., 2021; Pongracz et al., 2022; Van Coillie, Pongracz, Rahmöller et al., 2023) beschrieben.

## Material und Methoden

---

### 2.4.1. LC – Flüssigkeitschromatographie

Es wurden zum einen die Zuckerstruktur von SARS-CoV-2-spezifischen Antikörpern (Anti-S IgG) and zum anderen von Gesamt IgG im Serum der Proband\*innen untersucht. Das Serum wurde, wie in Kapitel 2.3.1. beschrieben, aufgearbeitet. Für die weitere Aufreinigung kamen unterschiedliche Protokolle zum Einsatz.

#### Anti-S IgG:

Zur Aufreinigung von Anti-S IgG wurden zunächst 96-well-Platten (NUNC, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) über Nacht bei 4 °C mit rekombinantem trimerisiertem Spike-Protein beschichtet. Anschließend wurden die Platten dreifach mit 250 µl HL-Waschpuffer gewaschen. Jeweils 20 µl des Serums wurde mit 180 µl HL-Waschpuffer verdünnt und für eine Stunde rüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten drei Waschgänge mit 250 µl HL-Waschpuffer, zwei Waschgänge mit 250 µl PBS und zwei Waschgänge mit 250 µl Ammoniumhydrogencarbonat (55 mM). (Larsen, de Graaf et al., 2021)

#### Gesamt IgG:

Zur Aufreinigung von Gesamt IgG wurden entweder von Protein G Sepharose 4 Fast Flow beads (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) in 96-well-Platten (Millipore Multiscreen, Amsterdam, Netherlands), oder Protein-G AssayMAP Patronen (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) auf dem Bravo Liquid-Handling-System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet.

Die Protein G Sepharose 4 Fast Flow beads wurden dreifach mit PBS gewaschen. Danach wurden in 96-well-Platten jeweils 50 µl einer Mischung, bestehend aus circa 15 µl der Beads, 150 µl PBS und 2 µl Serum, gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur rüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreifach mit 200 µl PBS und dreifach mit 200 µl Reinwasser gewaschen. (Falck et al., 2017; Selman et al., 2010) Die Waschschrte erfolgten mit Hilfe eines Vakuumverteilers.

Alternativ wurde jeweils 1 µl Serum in PBS verdünnt, in die Patronen gegeben und mehrfach mit PBS und Reinwasser gewaschen. (Larsen, de Graaf et al., 2021)

Die anti-S IgGs, sowie die Gesamt IgGs wurden anschließend für fünf Minuten rüttelnd in 200 µl Methansäure (100 mM) eluiert und in konischen 96-well-Platten für 150 Minuten bei 50 °C in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. (Kapur et al., 2014)

### 2.4.2. MS – Massenspektrometrie

Im nächsten Schritt sollte die Kohlenhydratstruktur der Antikörper untersucht werden. Hierfür wurden die Antikörper nach einem Trocknungsschritt der Verdauung durch Trypsin zugeführt. Das Enzym spaltet die Antikörper so, dass Glykopeptide, bestehend aus einem Peptid der CH2-Domäne und der Zuckerstruktur am konservierten Asparagin 297, entstehen. Per Massenspektrometrie können die IgG-Subklasse Antikörper-Fragmente untersucht und identifiziert werden. In dieser Arbeit waren folgende Zuckerbestandteile von Interesse: Fukose, Bisection-GlcNAc, Galaktose und Sialinsäure.

Zunächst wurden die getrockneten Antikörper in 20 µl Ammoniumhydrogencarbonat (25 mM) für zehn Minuten rüttelnd bei Raumtemperatur resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde Trypsin (200 ng in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat) hinzugefügt und ebenfalls zehn Minuten rüttelnd bei Raumtemperatur, und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Auftrennung und Erfassung der Glykopeptide wurde das UltiMate 3000 High-performance liquid chromatography- (HPLC-) -System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), gekoppelt an das Quadrupole Time-of-flight (QTOF) Massenspektrometrie-System (Bruker Daltonics, Billerica, MA) verwendet, wie zuvor beschrieben (Pongracz et al., 2022). Dabei wurde primär IgG1, über die Masse und Position in der Flüssigkeitschromatographie, untersucht. Das IgG3-Glykopeptid lässt sich mit der verwendeten Messmethode nicht von dem IgG2-Glykopeptid unterscheiden (Falck et al., 2017). Die IgG4-Glykopeptid-Intensitäten waren zu diesen Zeitpunkten für Auswertungen zu gering.

### 2.4.3. Analyse und Datenverarbeitung

Die LC-MS-Spektren wurden in mzXML-Dateien umgewandelt und anschließend konnten die Rohdaten über LaCyTools, eine hauseigene Software in Leiden (Niederlande), aligned und extrahiert werden (Jansen et al., 2016). Für das Alignment wurden die durchschnittlichen Retentionszeiten der drei häufigsten Glykoformen verwendet. Die

## Material und Methoden

---

Extraktion der 2+ und 3+ Ladungen basierte auf manueller Kennzeichnung und Literatur (Bartsch et al., 2020; Pongracz et al., 2022). Für die finale Analyse wurden die Daten entsprechend bestimmter Qualitätsmerkmale selektiert (Buhre et al., 2023). Folgende zwölf IgG1-Glykopeptide wurden entsprechend ausgewählt: G0F, G1, G1F, G2, G2F, G1FN, G1FS1, G2S1, G2FN, G2FS1, G2FNS1, G2FS2. Anschließend wurde die Intensität (Fläche unter den Peaks) (%) jeder Glykopeptidform anhand der Summe aller Glykopeptidformen normalisiert und verwendet (van Coillie, Pongracz, Šuštić et al, 2023; Buhre et al, 2023). IgG1-Fukosylierung, -Bisection, -Galaktosylierung und -Sialylierung wurden wie folgt errechnet (Buhre et al., 2023; Van Coillie, Pongracz, Rahmüller et al., 2023):

$$\text{Fukosylierung: } \frac{\text{G0F} + \text{G1F} + \text{G2F} + \text{G1FN} + \text{G1FS1} + \text{G2FN} + \text{G2FS1} + \text{G2FNS1} + \text{G2FS2}}{\text{Summe aller IgG1-Glykopeptide}}$$

$$\text{Bisection: } \frac{\text{G1FN} + \text{G2FN} + \text{G2FNS1}}{\text{Summe aller IgG1-Glykopeptide}}$$

Galaktosylierung:

$$\frac{0,5 * (\text{G1} + \text{G1F} + \text{G1FN} + \text{G1FS1}) + \text{G2} + \text{G2F} + \text{G2S1} + \text{G2FN} + \text{G2FS1} + \text{G2FNS1} + \text{G2FS21}}{\text{Summe aller IgG1-Glykopeptide}}$$

$$\text{Sialylierung: } \frac{0,5 * (\text{G1FS1} + \text{G2S1} + \text{G2FS1} + \text{G2FNS1}) + \text{G2FS2}}{\text{Summe aller IgG1-Glykopeptide}}.$$

Serumproben mit sehr geringen Mengen an anti-S IgG, insbesondere zum Zeitpunkt vor der Impfung, wurden aufgrund nicht ausreichender Signalstärken ausgeschlossen.

### 2.5. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Untersuchung von Zellsuspensionen. Verwendet werden Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper, die definierte Oberflächenproteine oder intrazelluläre Proteine anfärben. Anschließend werden die Zellen vereinzelt durch eine Messkammer geleitet und dort von mehreren Lasern angestrahlt. So können anhand der fluoreszierenden Eigenschaften gewünschte Zellpopulationen charakterisiert werden. Alle mit dem in den folgenden Abschnitten erläuterten Durchflusszytometrie-Protokoll erhobenen Daten wurden in Zusammenarbeit mit der Doktorandin Jana Buhre aus dem Labor erstellt.

### 2.5.1. PBMC-Isolation

Die venöse Blutentnahme von EDTA-Vollblut erfolgte über die Sarstedt Safety Multifly-Kanüle. Alle Proben wurden spätestens drei Stunden nach Entnahme weiterverarbeitet.

Zur Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurde in 50 ml Falcons eine 1,077 g/ml Polysucrose-Lösung mit demselben Volumen des 1:1 mit 1 x PBS verdünnten EDTA-Blutes langsam überschichtet. Anschließend wurden die geschichteten Proben bei 25 Minuten, 800 x g mit kleinstmöglicher Beschleunigung und ohne Bremse, bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde die obere Plasmaschicht abgesaugt und die darunterliegende PBMC-Schicht in ein frisches 50 ml Falcon übertragen, welches mit 50 ml 1 x PBS aufgefüllt wurde. Ab diesem Schritt wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Mittels Neubauer-Zählkammer wurden die isolierten Zellen in Trypanblau gezählt und 20 Millionen Zellen in ein neues 50 ml Falcon überführt, welches für zehn Minuten, bei 600 x g und 4 °C zentrifugiert wurde. Das am Boden sitzende PBMC-Pellet wurde abschließend in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt.

### 2.5.2. Extra- und Intrazelluläre Zellfärbung

Die in die 96-well Mikrotiterplatte überführten Zellen wurden zunächst für sechs Minuten, bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert, um den Flüssigkeitsüberstand durch Abklopfen der Platte auf Zellpapier zu verwerfen.

Im extrazellulären Färbeschritt wurden die Zellen in 100 µl Färbelösung mit Hilfe einer Multikanalpipette resuspendiert und darin für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Für diesen Vorgang wurden die entsprechenden Antikörper (CD19, CD27, CD38, CD138, IgA, IgG), sowie der Lebendigkeitsfarbstoff (Live-Dead) in FACS-Puffer (Zusammensetzung s. *Tabelle 5*) verdünnt (*Tabelle 4*). Anschließend wurde die Suspension mit 200 µl FACS-Puffer aufgefüllt und wie oben zentrifugiert und vom Überstand befreit.

## Material und Methoden

---

Tabelle 4: Verdünnung und Konzentration der Detektionsantikörper des extrazellulären FACS-Färbeschrittes

Marker	Fluorochrom	Verdünnung	Endkonzentration
CD19	BV510	1:40	1 µg/ml
CD27	BV785	1:100	1 µg/ml
CD38	BV421	1:50	1 µg/ml
CD138	BV711	1:50	1 µg/ml
IgA	PE-Vio770	1:75	0,67 µg/ml
IgG	PE	1:30	0,83 µg/ml
Live-Dead		1:1000	

Die Zellen wurden anschließend in 150 µl Cytofix/Cytoperm resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert sowie permeabilisiert. Es folgte ein Waschschrift mit 200 µl PermWash-Puffer. Das Pellet wurden wie oben in 100 µl Färbelösung resuspendiert und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hier wurden die Antikörper und das Antigen (IgA, IgG, ST6GAL1, S1-Biotin,) in PermWash-Puffer verdünnt (*Tabelle 5*). Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PermWash-Puffer. Für die Detektion des S1-Biotins wurde eine zweite intrazelluläre Färbung mit 100 µl in PermWash-Puffer verdünnten Streptavidin-APC (*Tabelle 5*), für 40 Minuten, bei Raumtemperatur, durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen wieder in PermWash-Puffer gewaschen und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden entweder direkt im Anschluss oder nach einer Nacht bei 4 °C am FACS-Gerät analysiert.

Tabelle 5: Verdünnung und Konzentration der Detektionsantikörper der intrazellulären FACS-Färbeschritte

Marker	Konjugat	Verdünnung	Endkonzentration	Färbung
IgA	PE-Vio770	1:75	0,67 µg/ml	Intra 1
IgG	PE	1:30	0,83 µg/ml	Intra 1
S1	Biotin	1:40	5 µg/ml	Intra 1
ST6GAL1	AF488	1:70	2,9 µg/ml	Intra 1
Streptavidin	APC	1:100	10 µg/ml	Intra 2

### 2.5.3. Farbkopplung des ST6GAL1-Antikörpers

Das Alexa Fluor™ 488 Antibody Labeling Kit wurde verwendet, um den ST6GAL1-Antikörper und die Isotyp-Kontrolle im FACS nutzen zu können. Alle Arbeitsschritte erfolgten im Dunkeln bei Raumtemperatur. (Entsprechend Herstelleranleitung) wurden 100 µg des lyophilisierten Antikörpers in 100 µl Natriumbicarbonat (0,1 M, 1 mg/ml) gelöst, danach mit 100 µl Färbelösung vermischt und eine Stunde inkubiert. Um die Reaktion zu beenden wurden 50 µl Tris (1 M, pH = 8) hinzugegeben und weitere 20 Minuten inkubiert. Um eine finale Konzentration von 0,2 mg/ml zu erhalten, wurden 350 µl FACS-Puffer hinzugefügt.

### 2.5.4. Durchflusszytometrisches Gating

Die FACS-Daten wurden am FACS-Gerät Attune NXT, Thermo Fisher Scientific erhoben. Die Flow Cytometry Standard (FCS) 3.0 Dateien wurden mit FlowJo Version 10.0.7 (BD Biosciences) analysiert.

Zunächst wurden die Lymphozyten im FSC-A/SSC-A-Fenster eingekreist, davon im FSC-A/FSC-H -Fenster einzelne Zellen und davon erneut die lebenden Lymphozyten eingegrenzt.

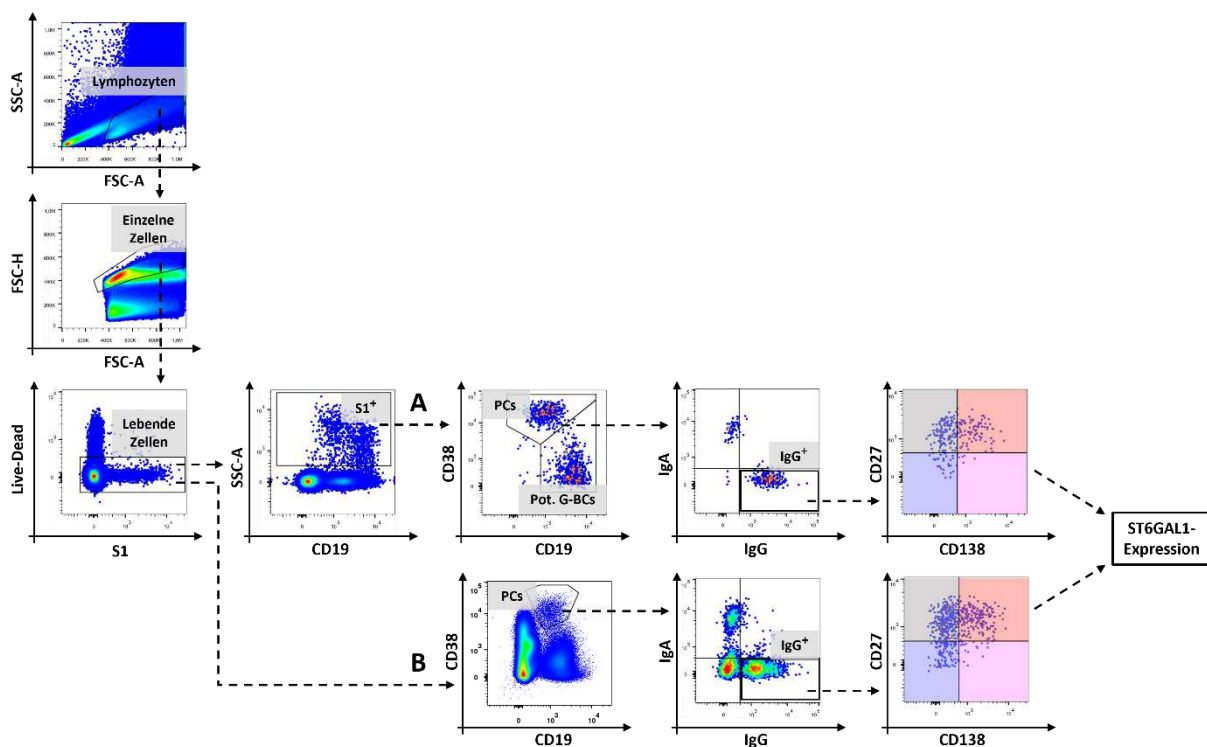
Ausgehend von den einzelnen lebenden Lymphozyten wurden zuerst S1-positive (S1<sup>+</sup>) Zellen eingekreist. Dieser Schritt wurde bei Proben, die keine S-spezifischen B-Zellen enthielten, übersprungen; beziehungsweise diente bei denen als Negativ-Kontroll-Nachweis. (s. *Abbildung 3B*). Es ließen sich mithilfe der Oberflächenmarker CD38 und CD19

## Material und Methoden

zwei B-Zell-Populationen einteilen: CD19-intermediär bis positive CD38-positive PCs ( $CD19^{int/+}CD38^{++}$  PCs) und CD19-positive CD38-niedrige potenzielle Gedächtniszellen ( $CD19^{+}CD38^{-/int}$  B-Gedächtniszellen); (s. *Abbildung 3A*).

Von den PCs wurden weiter IgA-negative, IgG-positive ( $IgG^{+}$ ) Zellen abgegrenzt und weiter auf die Oberflächenmarker CD27 und CD138 untersucht, indem sie in vier Gruppen eingeteilt wurden:  $CD27^{-/int}CD138^{-/int}$ ,  $CD27^{+}CD138^{-/int}$ ,  $CD27^{-/int}CD138^{+}$  und  $CD27^{+}CD138^{+}$ .

Von diesen Untergruppen ausgehend wurden die ST6GAL1-Expression analysiert.



**Abbildung 3: Durchflusszytometrisches Gating**

Dargestellt ist der Gating-Verlauf für die durchflusszytometrische Analyse verschiedener B-Zell Populationen, genau beschrieben in Kapitel 2.5.4. Die Abkürzung PCs steht für Plasmazellen und „Pot. G-BCs“ für potenzielle B-Gedächtniszellen. Die  $IgG^{+}$  PCs wurden wie oben beschrieben in vier Populationen entsprechend der CD27- und CD138-Expression eingeteilt. Die  $CD27^{-/int}CD138^{-/int}$  PCs wurden in Blau, die  $CD27^{+}CD138^{-/int}$  PCs in Grau, die  $CD27^{-/int}CD138^{+}$  PCs in Rosa und  $CD27^{+}CD138^{+}$  PCs in Rot dargestellt, da diese Farbgebung in den Abbildungen 18, 21 und 22 weiterverwendet wird. Mit (A) und (B) wurden die zwei möglichen Enden des Gatings gekennzeichnet: (A) für die Trennung von  $S1^{+}$  Zellen in PCs und Pot. G-BCs und (B) für die Analyse aller PCs.

### 2.6. Software/Statistik

Alle ELISA-Versuche wurden doppelt durchgeführt und deren Mittelwerte für die statistische Auswertung, beziehungsweise die graphische Darstellung genutzt.

Die Durchflusszytometrie-Daten wurden als Flow Cytometry Standard (FCS) 3.0 Dateien aufgenommen und mit FlowJo Version 10.0.7 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) analysiert.

In Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) zusammengeführte Daten wurden weiter im selben Programm oder mit GraphPad Prism Version 6.0 statistisch ausgewertet. Es wurden ausschließlich nichtparametrische Tests durchgeführt. Korrelationen wurden über die Spearman-Rangkorrelation berechnet, Zusammenhänge zwischen zwei unabhängigen Gruppen über den Mann-Whitney-U-Test (gekennzeichnet durch eine Gerade und Zusammenhänge zwischen drei oder mehr Gruppen über den Kruskal-Wallis-Test (gekennzeichnet durch eine eckige Klammer. Bei einem Konfidenzintervall von 95 % galten alle p-Werte unter  $p < 0,05$  als signifikant und wurden folgendermaßen gekennzeichnet: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Nicht signifikante Ergebnisse wurden in den Abbildungen nicht dargestellt.

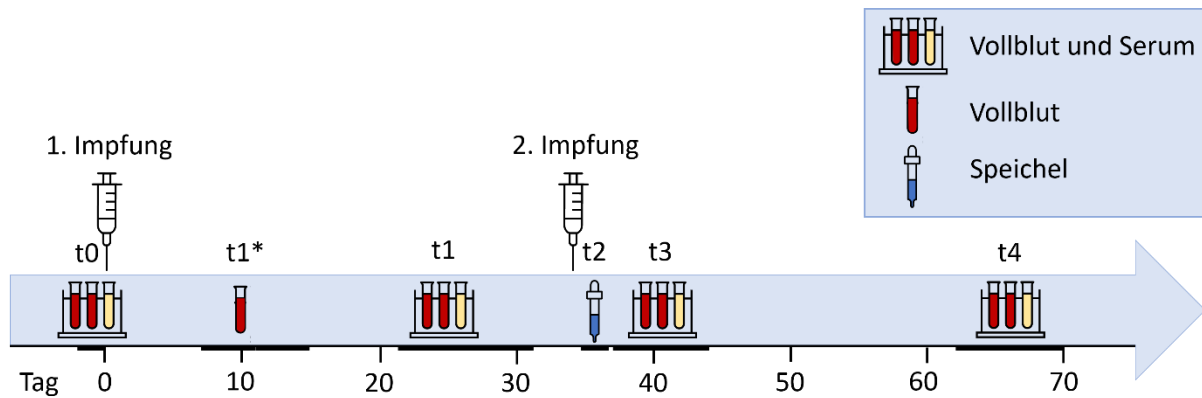
Für die graphische Darstellung der ELISA-, Glykosylierungs- und Durchflusszytometrie-Daten wurden die Programme Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) und GraphPad Prism Version 6.0 (Graphpad, La Jolla, CA) verwendet

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Kohorte und Probensammlung

Um die B-Zell- und Antikörperantwort nach ein bis zwei Impfungen mit dem mRNA-Impfstoff BNT162b2 von BioNTech/Pfizer gegen SARS-CoV-2 in naiven Proband\*innen und in solchen, die zuvor mit SARS-CoV-2 infiziert waren, und zum Vergleich von ungeimpften Naiven und SARS-CoV-2-Infizierten zu untersuchen, wurden Vollblut-, Serum und / oder Speichelproben von insgesamt 68 Individuen von Dezember 2020 bis Februar 2021 gesammelt und analysiert (*s. Kap. 2.1.*). Zusammengefasst befanden sich darunter 25 Individuen ohne nachgewiesene COVID-19 Infektion vor der ersten Impfung (Naive Geimpfte; **NGs**), neun Individuen mit 158- bis 305-tägigem Abstand zwischen SARS-CoV-2 Infektion und der anschließenden ersten Impfung (Vorinfizierte Geimpfte; **VGs**), zwei Individuen mit positivem SARS-CoV-2 PCR-Nachweis 25–30 Tage vor Probeentnahme, die zuvor keine Impfung bekommen hatten (Vorinfizierte Ungeimpfte; **VUs**), sechs ungeimpfte Intensivpatient\*innen (Infizierte Ungeimpfte; **IUs**) mit zum Probeentnahme-Zeitpunkt positiver SARS-CoV-2 PCR und 26 naive Kontrollproband\*innen ohne Impfung in dem Studienzeitraum (Naive Ungeimpfte; **NUs**) (*Tabelle 2*). Geimpfte Proband\*innen erhielten 32–35 Tage nach der ersten Impfung ihre zweite Impfung.

Wie in Kapitel 2.1. erläutert, wurden von den Geimpften an sechs Zeitpunkten Proben gesammelt (*vgl. Tabelle 1 und Abbildung 4*): Serum und Vollblut 2–0 Tage vor der ersten Impfung (**t0**), 21–31 Tage nach der ersten Impfung (**t1**), 37–43 Tage nach der ersten, entsprechend 5–8 Tage nach der zweiten Impfung (**t3**) und 62–70 Tage nach der ersten, entsprechend 27–35 Tage nach der zweiten Impfung (**t4**). Alternativ wurde einigen Proband\*innen 7–14 Tage nach der ersten Impfung (**t1\***) nur Vollblut abgenommen. Speichel wurde einmalig 0–1 Tage nach der zweiten Impfung gesammelt (**t2**). Bei drei Impfstudienteilnehmer\*innen wurden andere Probezeitpunkte gewählt (*vgl. Tabelle A1*).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Probensammlungszeitpunkte**

Auf einem Zeitstrahl dargestellt finden sich die zwei Impfzeitpunkte (Die zweite Impfung lag 32–35 Tage nach der ersten Impfung) mit BNT162b2 und die sechs Haupt-Probesammlungszeitpunkte (t0, t1\*, t1, t2, t3 und t4), genau beschrieben in Kapitel 2.1. Die Spritze steht für die Impfungen, der Reagenzglasständer für Vollblut (rot) und Serum (gelb), das rote Reagenzglas allein für Vollblut und die Pipette (blau) für Speichel. Außerhalb der sechs Hauptzeitpunkte wurden vereinzelt andere Probeentnahmetage gewählt (vgl. *Tabelle A1*) und in dieser Abbildung nicht dargestellt.

### 3.2. mRNA-Vakzin BNT162b2 induzierte anti-S1 IgG-Subklassen Serum Antikörper Level

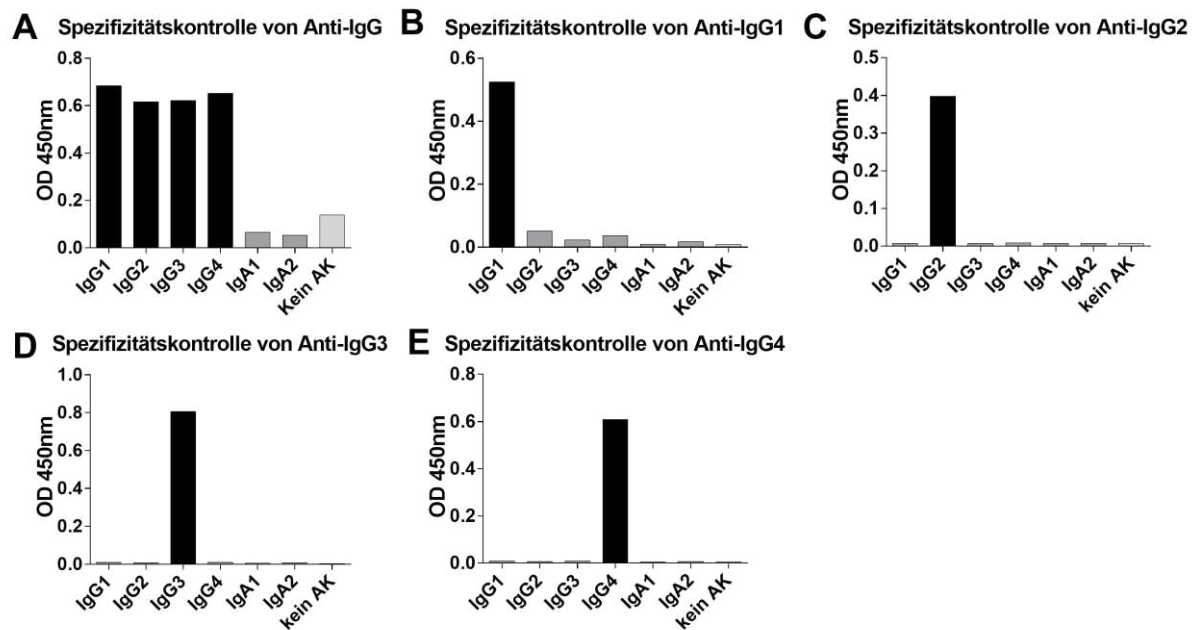
Antikörper wurden per ELISA-Technik untersucht. IgG-Antikörper erscheinen im späteren Verlauf der adaptiven humoralen Immunantwort und werden als häufigster Immunglobulin-Isotyp langfristig im Blut nachgewiesen (Goulet und Atkins, 2020). Deren Titer, insbesondere anti-S, beziehungsweise anti-S1 oder anti-RBD IgG-Titer, werden in der Literatur als Protektionskorrelat gegen COVID-19 gehandelt (King et al., 2023; Regev-Yochay et al., 2023) und werden zur Messung des Impferfolges eingesetzt (Zhang et al., 2022).

Hier wurden die Titer von anti-SARS-CoV-2-S1 IgG, IgG1–4, sowie anti-NCP IgG untersucht (Lixenfeld et al., 2021; Van Coillie, Pongracz, Rahmüller et al., 2023). Zusätzlich wurden in Zusammenarbeit mit Inga Künsting aus unserem Labor anti-S1 IgG-Titer im Speichel von 14 der 25 NGs, zwei der neun VGs, sowie von 19 NUs analysiert (Lixenfeld et al., 2021).

### 3.2.1. Etablierung des Hansestadt Lübeck-1 (HL-1) anti-S1 IgG und IgG1–4 ELISA-Protokolls

Für den Antikörpernachweis kamen verschiedene Protokolle zum Einsatz; zum Ersten kommerziell erwerbbar Testsysteme von der Firma Euroimmun (EI) zum Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-S1 IgG (EI anti-S1 IgG) und Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG (EI anti-NCP IgG). Das S1-Protein ist Teil des S-Proteins an der Oberfläche von SARS-CoV-2 (Kirtipal et al., 2020), für welches der mRNA-Impfstoff BNT162b2 kodiert (Verbeke et al., 2021). NCP steht für das Nucleocapsid-Protein, mit welchem nur natürlich Infizierte in Kontakt kommen, da dieses nicht durch den mRNA-Impfstoff BNT162b2 kodiert wird. Zum Zweiten wurde ein eigenes HL-1 ELISA-Protokoll zum Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-S1 IgG und IgG1–4 im Labor entwickelt. Zum Dritten wurde das HL-1 Protokoll leicht modifiziert und als HL-2 ELISA-Protokoll zum Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-S1 IgG im Speichel verwendet. Die Speichel-ELISA wurden von Inga Künsting etabliert. Die Spezifität der kommerziell erworbenen anti-IgG und anti-IgG1–4 Sekundärantikörper mit HRP-Kopplung für den HL-1 ELISA wurde geprüft, indem diese auf Bindung an die an die Platte-gekoppelten monoklonalen anti-Kollagen-7 IgG1–4, IgA1 und IgA2 Antikörper mit identischen V(D)J Sequenzen getestet wurden (Recke et al., 2010, 2014). Der anti-IgG Sekundärantikörper wies keine unspezifischen Bindungen auf und erkannte die IgG-Subklassen 1–4, aber nicht die IgA1 und IgA2 Antikörper (*s. Abbildung 5*).

Die sekundären Antikörper gegen IgG1, 2, 3 oder 4 zeigten sich ebenfalls als hochspezifisch und erkannten im Spezifitätstest nur die entsprechende IgG-Subklasse und nicht IgA1 und IgA2 (*s. Abbildung 5*).

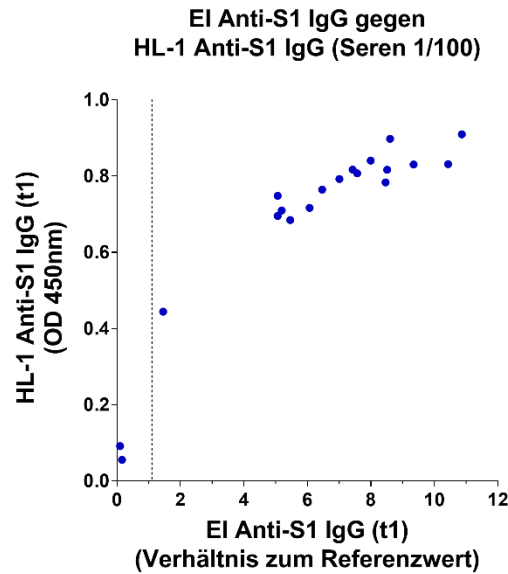


**Abbildung 5: Spezifitätskontrolle der Sekundärantikörper (anti-human-IgG, -IgG1–4)**

Die im HL-1 ELISA-Protokoll verwendeten Sekundärantikörper wurden auf ihre Spezifität geprüft, indem Anti-Kollagen-7 IgG1–4 und IgA1,2-Antikörper an eine ELISA-Platte gekoppelt wurden. „Kein AK“ bezeichnet die Vertiefungen der Platte ohne gekoppelte Antikörper. Anschließend wurden die zu testenden mit HRP-gekoppelten Antikörper (A) anti-IgG, (B) -IgG1, (C) -IgG2, (D) -IgG3 und (E) -IgG4, jeweils gegen IgG1–4, IgA1 und IgA2 und auf die ungekoppelten Wells aufgetragen.

Weiterhin sollte das EI mit dem HL-1 Protokoll verglichen werden. Hierfür wurden dieselben Proben jeweils mit dem EI S1-IgG Kit und dem HL-1 S1-IgG System untersucht. Werden die gemessenen Extinktionswerte gegeneinander aufgetragen (*s. Abbildung 6*), zeigt sich eine starke Korrelation (Spearman:  $r = 0,9246$ ;  $p < 0,0001$ ). Demnach ist zu schließen, dass das EI und das HL-1 ELISA-Protokoll vergleichbare Ergebnisse lieferten.

## Ergebnisse



**Abbildung 6: Korrelation von HL-1 Anti-S1 IgG ELISA gegen EUROIMMUN Anti-S1 IgG ELISA**

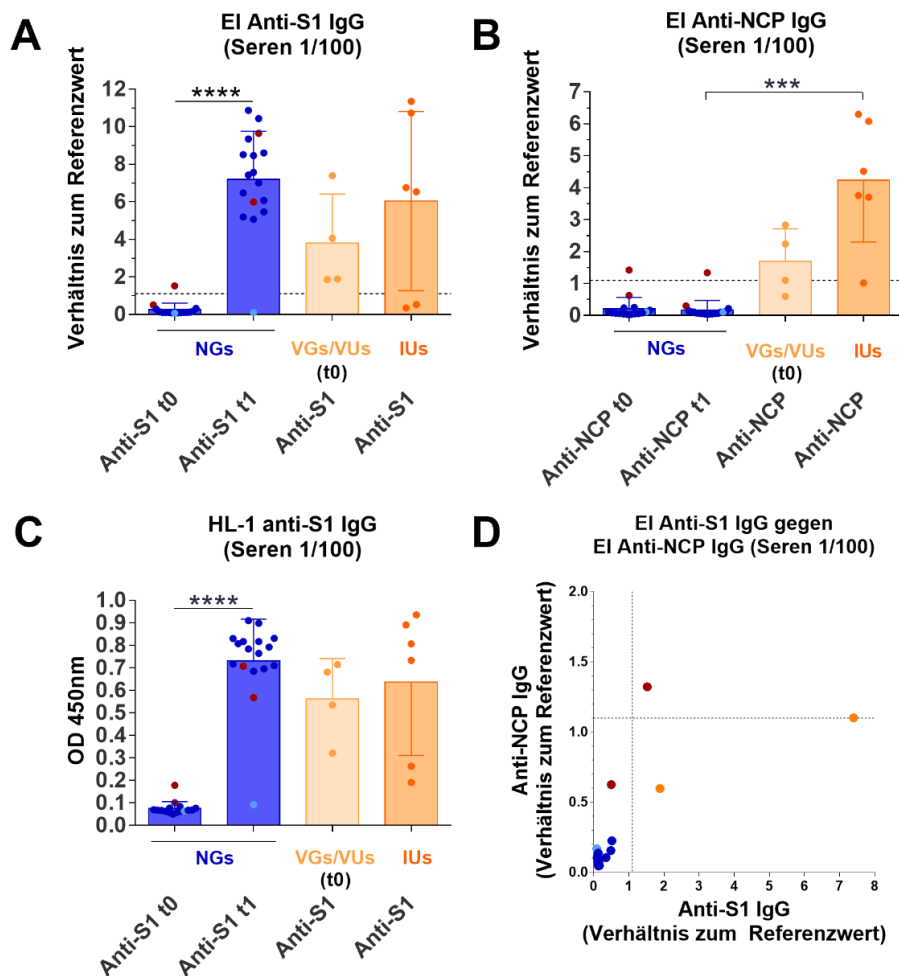
Die Seren von 19 Naiven Geimpften (NGs) wurden mittels EI und HL-1 Protokollen auf anti-S1 IgG untersucht. Die gestrichelte Linie entspricht dem von EUROIMMUN ermittelten Cut-off-Wert für S1. Hier dargestellt ist die Korrelation zwischen den Ergebnissen an t1 mit EI anti-S1 IgG- und HL-1 anti-S1 IgG ELISA, statistisch überprüft durch die Spearman-Rangkorrelation ( $p < 0,0001$ ;  $r = 0,9426$ ).

Anschließend wurde die inhaltliche Validität der Protokolle untersucht. Hierfür wurden die Seren von zehn der SARS-CoV-2 Vor-/Infizierten (zwei Vorinfizierten Geimpften = VGs vor der Impfung, zwei Vorinfizierten Ungeimpften = VUs, sechs Infizierten Ungeimpften = IUs) und 18 Naiven Geimpften (NGs) vor (t0) und nach der ersten Impfung mit BNT162b2 (t1) auf Antikörper gegen das NCP- und S1-Protein untersucht (s. *Abbildung 7*). Es wurde erwartet, dass im Serum von SARS-CoV-2 Vor-/Infizierten Antikörper gegen NCP und S1 nachzuweisen wären, während stattdessen im Serum der NGs nur welche gegen S1 und in Seren vor der ersten Impfung und in NUs (nicht gezeigt) keine SARS-CoV-2-spezifischen Antikörper nachzuweisen wären. Die ELISA Ergebnisse entsprachen diesen Erwartungen mit wenigen Ausnahmen (s. *Abbildung 7*).

Zu Zeitpunkt t0 vor der ersten Impfung waren außer zwei Proband\*innen (9 und 10) alle „negativ“ für anti-S1 und anti-NCP. Ab Zeitpunkt t1 nach der ersten Impfung ließen sich bei allen Geimpften, mit Ausnahme von Proband\*in 11, anti-S1 IgG-Antikörper nachweisen. Anti-NCP IgG-Antikörper wurden, wie zu erwarten, nur bei SARS-CoV-2 Vor-/Infizierten nachgewiesen. Diese Individuen waren zum Zeitpunkt t0 dementsprechend also

höchstwahrscheinlich noch nicht mit dem SARS-CoV-2 in Kontakt gekommen und entsprechend als naiv rekrutiert. Zwei als naiv rekrutierte Proband\*innen, insbesondere Proband\*in 9, stachen mit erhöhten anti-NCP beziehungsweise -S1 IgG-Spiegeln heraus. Bei diesen Proband\*innen konnte zu diesem Zeitpunkt eine vorherige COVID-19 Infektion nicht ausgeschlossen werden. Zu t1 fiel Proband\*in 9 weiterhin mit erhöhten anti-NCP IgG-Titern auf.

Wegen der genannten Auffälligkeiten im Vergleich zum Rest der Kohorte wurden in der Abbildung 7 und in folgenden Grafiken die Daten zu den Proband\*innen 9 und 10 Dunkelrot, die zu Proband\*in 11 in Hellblau dargestellt.



**Abbildung 7: Anti-S1, -S2 und -NCP IgG-Titer zu t0 und t1**

Die Seren von 16 Naiven Geimpften (NGs) mit den EI Protokollen auf (A) anti-S1 IgG und (B) anti-NCP IgG, sowie (C) mit dem HL-1 ELISA-Protokoll auf anti-S1 IgG zu t0 und t1 untersucht. Zusätzlich wurden mit den entsprechenden Protokollen Seren der zwei Vorinfizierten Geimpften (VGs) zu t0, von zwei Vorinfizierten Ungeimpften (VUs) 25–30 Tage nach positiver PCR und von sechs Infizierten Ungeimpften (IUs) 2–13 Tage nach positiver PCR untersucht. Jeder Punkt steht für eine Proband\*in an einem Zeitpunkt. Die Balken zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. Die Ergebnisse der NGs wurden in Dunkelblau dargestellt, mit Ausnahme von Proband\*innen 9 und 10, welche in Rot, und 11, welcher in Hellblau abgebildet ist. Für die Darstellung der Ergebnisse der Vorinfizierten (VG/VU) wurde Hellorange, für die der IUs Dunkelorange gewählt. Diese Farbgebung wird in den folgenden Abbildungen fortgesetzt, sofern nicht anders angegeben. (D) Außerdem wurden die Ergebnisse mit den EI Protokollen der NGs und VGs zu t0 gegeneinander aufgetragen. Statistische Signifikanzen wurden bei dem Vergleich von zwei Gruppen über den Mann-Whitney-U- (waagerechte Linie) und bei drei Gruppen über den Kruskal-Wallis-Test (eckige Klammer) berechnet; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Um die Zusammenhänge zwischen anti-S1 und anti-NCP IgG-Titern zu verdeutlichen, wurden die gemessenen Werte zu t0 (vor der Impfung) von den NGs und zur Veranschaulichung von den zwei VGs gegeneinander aufgetragen (s. *Abbildung 7D*).

Die Seren der Vor-/Infizierten Ungeimpften (VUs, IUs) dienten vor allem als Positivkontrollen für die ELISA. Deren Anzahl war zu klein, um Vergleiche anzustellen.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass das HL-1 ELISA-Protokoll zuverlässig anti-S1 IgG-Antikörper nachweist und anti-S1 „negative“ gegen „positive“ Proband\*innen gut unterscheiden kann und einen geeigneten Test für den Impferfolg darstellt.

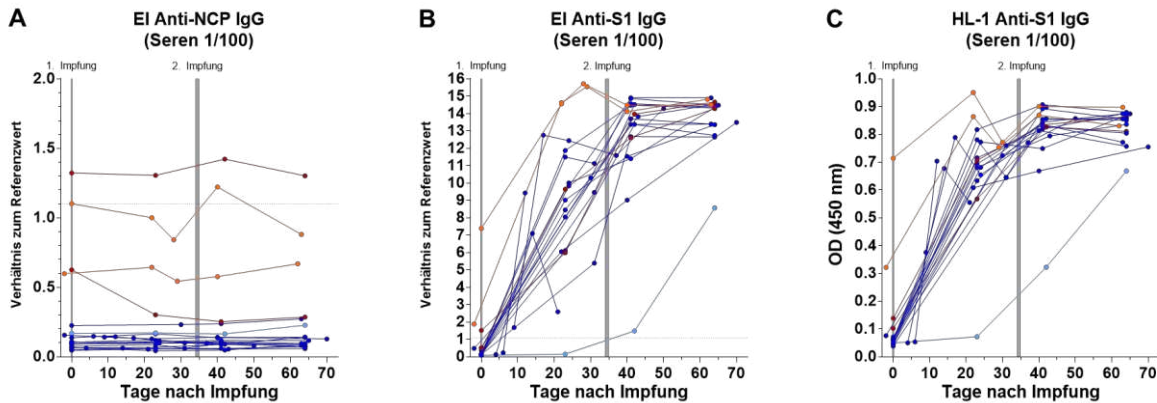
### **3.2.2. Anti-S1 IgG Serum Antikörper**

In *Abbildung 8* werden alle NGs in Dunkelblau und die zwei VGs in Hellorange dargestellt. Proband\*in 10 der NG-Kohorte zeigte zu t0 auffällig hohe anti-NCP Werte, jedoch keine anti-S1 Antikörper (s. *Kap. 3.1.1.*). Im Verlauf waren die anti-NCP IgG-Titer nur noch leicht erhöht. Somit blieb ein möglicher zuvor stattgefundenener unerkannter SARS-CoV-2-Kontakt unklar. Anti-NCP Titer von Proband\*in 9 blieben über t3 und t4 weiterhin erhöht, was auf eine zurückliegende unerkannte COVID-19 Infektion hinweisen könnte. Proband\*in 11 stach weiter aus der NG-Kohorte durch niedrigere anti-S1 IgG-Titer heraus. Ab t3 konnten jedoch für Proband\*in 11 SARS-CoV-2-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Zu t0 konnten in der NG-Gruppe keine anti-S1 und keine anti-NCP Antikörper nachgewiesen werden, mit oben genannten Ausnahmen. Nach der ersten Immunisierung ließ sich ein Anstieg der anti-S1 IgG-Titer feststellen. Bei drei Proband\*innen (17, 18, 19) wurden andere Proben-Zeitpunkte gewählt, weshalb ein grober Verlauf zwischen erster und zweiter Impfung nachvollzogen werden könnte. Entsprechend könnten die höchsten anti-S1 IgG-Werte an Tag 12–17 erreicht worden sein, sanken aber bis Tag 21–24 wieder leicht ab. Genauere Aussagen lassen sich aufgrund der geringen Proband\*innen-Anzahl an Tag 12–17 (drei Proband\*innen) nicht treffen. 5–8 Tage nach dem Boost (der zweiten Impfung) stiegen die anti-S1 IgG-Antikörper erneut und reduzierten sich wieder leicht zu Zeitpunkt t4. Anti-NCP IgG-Antikörper wurden nur bei VGs (und NG Proband\*in 9 und leicht bei NG Proband\*in 10) nachgewiesen und blieben von t0 zu t4 unverändert erhöht.

## Ergebnisse

Die zwei VGs zeigten bis zur zweiten Impfung einen tendenziell höheren anti-S IgG-Titer im Vergleich zu den NGs. Zu t0 wurden bereits erhöhte Titer nachgewiesen, welche 22 Tage nach der ersten Immunisierung weiter zunahmen, und zu diesem Zeitpunkt über den Werten der NGs lagen. Ab t3 waren die anti-S1 IgG-Titer vergleichbar zwischen NGs und den beiden VGs.



**Abbildung 8: Serum anti-NCP IgG und -S1 IgG-Titer im Zeitverlauf**

Die Seren von 19 Naiven Geimpften (NGs; blaue und rote Punkte) und zwei Vorinfizierten Geimpften (VGs; orangefarbene Punkte) wurden an verschiedenen Zeitpunkten vor und nach den zwei BNT126b2-Immunisierungen mit dem (A) EI anti-NCP IgG, dem (B) EI anti-S1 IgG, sowie mit dem (C) HL-1 anti-S1 IgG-Testsystem untersucht.

### 3.2.3. Anti-S1 Serum IgG-Subklassen

Genauso wie der Isotyp eines Antikörpers trägt die Subklasse zu seiner Funktion bei. IgG-Immunglobuline werden in vier Subklassen eingeteilt, nummeriert nach abfallender Häufigkeit: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Die Klassen variieren in ihren Eigenschaften, beispielsweise binden IgG1 und IgG3 mit einer höheren Affinität an die meisten Fc $\gamma$ -Rezeptoren als IgG2 und IgG4 (Goulet und Atkins, 2020).

Im Folgenden wurden die durch BNT126b2, als auch durch eine natürliche Infektion mit SARS-CoV-2, induzierten anti-S1 IgG-Subklassen untersucht. Als häufigste IgG-Subklasse ließen sich primär anti-S1 IgG1-Antikörper nachweisen. Der Zeitverlauf verhielt sich ähnlich des für anti-S1 Gesamt IgG beobachteten Verhaltens (*s. Abbildung 9*). In Kürze: Zwischen t0 und t1 nahm die Konzentration an anti-S1 IgG1 stark zu, stagnierte oder sank leicht kurz vor dem Boost und erreichte den Höchstwert kurz nach dem Boost (t3) und sank danach (t4)

leicht. VGs zeigten bis t1 die höchsten anti-S1 IgG1-Antikörpertiter und blieben auch nach der Impfung vergleichsweise hoch.

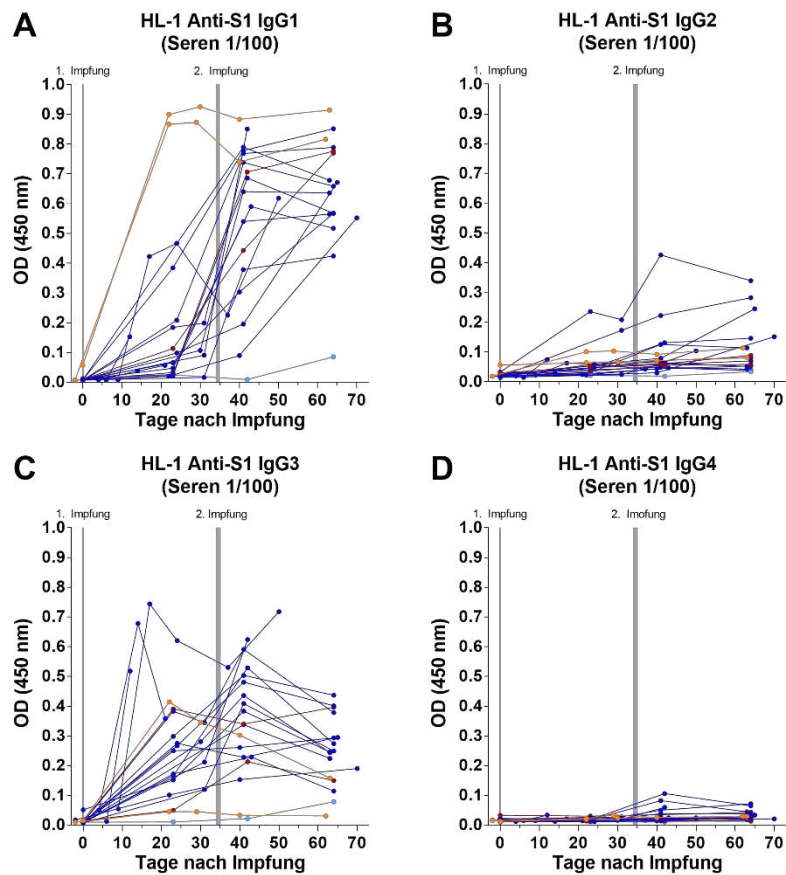
Weiterhin ließen sich bei allen Proband\*innen, mit zwei Ausnahmen (NG 11 und VG 26, s.u.), die Bildung von anti-S1 IgG3 nachweisen. Auch hier stiegen die Titer nach der ersten Impfung an. Besonders hohe Werte ließen sich kurz nach der ersten und zweiten Impfung nachweisen. Vor der zweiten Impfung war ein umso stärkerer Abfall des anti-S1 IgG3 zu sehen und der erneute Anstieg nach dem Boost fiel tendenziell weniger stark aus als nach der ersten Impfung.

Interessanterweise entwickelte auch VG Proband\*in 26 mit nachweisbarem anti-S1 IgG3-Titer nach der ersten Impfung ebenfalls kaum anti-S1 IgG3 nach der zweiten Impfung.

Die anti-S1 IgG2-Titer waren relativ niedrig, aber einige Proband\*innen entwickelten anti-S1 IgG2-Antikörper, vor allem Proband\*innen 3 und 6. Im Gegensatz zu IgG3 ließ sich ein leichter Aufwärtstrend ab der zweiten Impfung beobachten.

IgG4-Antikörper-Level waren im HL-1 anti-S1 IgG4 ELISA nach der ersten Impfung negativ, zeigten nach der zweiten Impfung aber einen tendenziell leichten Anstieg.

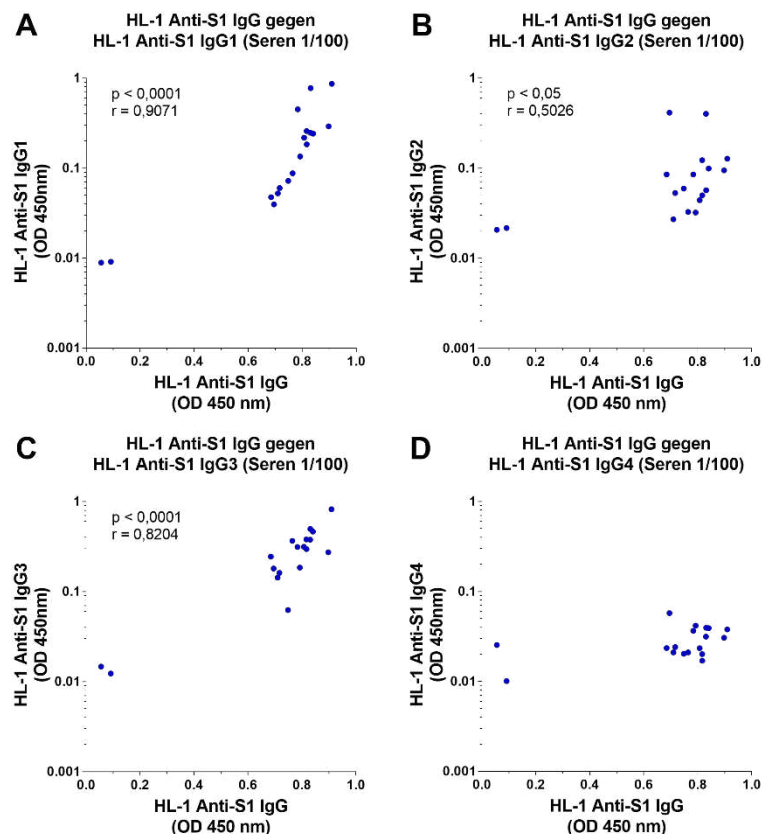
Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Geimpften in dem untersuchten Zeitraum vor allem IgG1 und IgG3 entwickelten, aber kaum IgG2 und IgG4. Nach dem Boost stieg IgG1 noch weiter an, wohingegen IgG3 dann eher abfiel, aber IgG2 und IgG4 tendenziell eher leicht stiegen.



**Abbildung 9: Anti-S1 IgG-Subklassen Titer im Zeitverlauf**

Die Seren von 19 Naiven Geimpften (NGs; blaue und rote Punkte) und zwei Vorinfizierten Geimpften (VGs; orangene Punkte) wurden an verschiedenen Zeitpunkten vor und nach den zwei BNT126b2-Immunisierungen, bis maximal 70 Tage nach der ersten Impfung, entsprechend bis maximal 35 Tage nach der zweiten Impfung, mit dem HL-1 Testsystem auf (A) anti-S1 IgG1, (B) IgG2, (C) IgG3 und (D) IgG4 untersucht.

Um den Einfluss der Subklassen auf den Gesamt IgG-Titer zu erfassen, wurden die gemessenen anti-S1 IgG-Subklassen-Werte der Individuen an Zeitpunkt t1 jeweils gegen die zugehörigen anti-S1 IgG-Werte aufgetragen (*s. Abbildung 10*). Über Spearman-Korrelation konnten für IgG1, IgG2 und IgG3 ein signifikanter positiver Zusammenhang gezeigt werden. IgG1 korrelierte mit  $r = 0,9071$  und  $p < 0,0001$ , IgG2 mit  $r = 0,5026$  und  $p = 0,0335$ , IgG3 mit  $r = 0,8204$  und  $p < 0,0001$ . Das entspricht einer starken Korrelation zwischen anti-S1 IgG und -S1 IgG1 beziehungsweise und -S1 IgG3 und einer mittelstarken Korrelation zwischen -S1 IgG und -S1 IgG2 nach Spearman. Zwischen anti-S1 IgG und IgG4 konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden, da zu t1 aber auch kein anti-S1 IgG4 gemessen werden konnte.



**Abbildung 10: Korrelation zwischen anti-S1 IgG gegen anti-S1 IgG1–4 an t1**

Die Seren von 19 Naiven Geimpften (NGs) wurden an t1 mittels HL-1 Protokoll auf anti-S1 IgG und IgG1–4 untersucht. Hier dargestellt ist die Korrelation zwischen den anti-S1 IgG Werten und den (A) anti-S1 IgG1-, (B) IgG2-, (C) IgG3- und (D) IgG4-Werten, statistisch überprüft durch Spearman-Rangkorrelation.

In Folgeuntersuchungen der Arbeitsgruppe (Buhre et al., 2023) wurden diese Proband\*innen bis zu 270 Tage nach der ersten Impfung verfolgt. Anti-S1 IgG1 und IgG3 der NGs zeigten einen bis Tag 270 anhaltenden kontinuierlichem Abstieg. Interessanterweise blieben IgG2-Titer bis Tag 270 konstant, während IgG4-Werte ab Tag 150 zunahmen.

### 3.2.4. Anti-S1 (und S2-) IgG-Antikörper im Speichel

Das SARS-CoV-2 Virus wird primär über Aerosole übertragen und vermehrt sich in den Atemwegen (Hu et al., 2021). Eine optimale Impfantwort würde bereits an dieser Stelle angreifen, um das Infektions- und Übertragungsrisiko zu minimieren. Zwar ist IgA der dominierende Isotyp in Körpersekreten und auf Schleimhautoberflächen wie den Atemwegen, jedoch spielt an dieser Stelle auch IgG eine Rolle. Vor allem in den unteren

## Ergebnisse

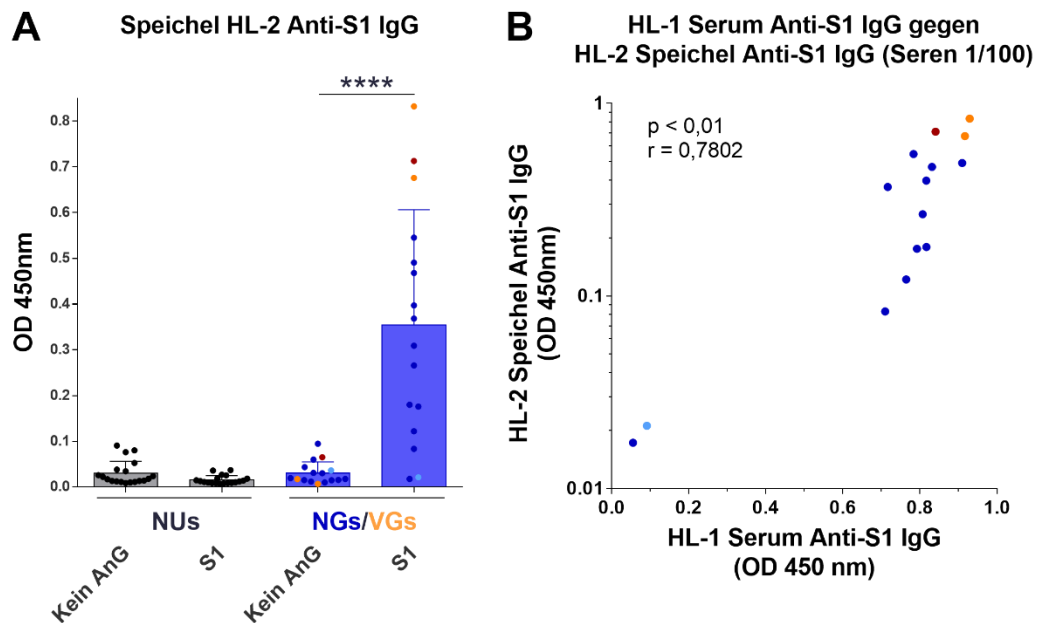
---

Atemwegen lässt die Dicke der Schleimschicht nach, sodass auch IgG-Antikörper dorthin gelangen können, um ihre Schutzwirkung zu entfalten (Murphy und Weaver, 2018c).

Um Immunantworten des BNT162b2-Impfstoffes in den Atemwegen zu testen, konnte Speichel von 14 Naiven Geimpften (NGs) und zwei Vorinfizierten Geimpften (VGs) gesammelt werden. Von 13 Proband\*innen erfolgte die Speichelsammlung an t2 (35–36 Tage nach der ersten, beziehungsweise 0–1 Tage nach der zweiten Impfung). Dieser Zeitpunkt wurde kurzfristig noch gewählt, um den Einfluss der einmaligen Impfung auf die mukosale Immunantwort zu untersuchen. Am Tag des Boostens, beziehungsweise einen Tag nach dem Boost, war noch kein zusätzlicher Effekt zu der humorale Immunantwort der ersten Impfung zu erwarten (Kobashi et al., 2022). Abweichend wurde Speichel (und synchron Serum) von Proband\*innen 17, 18 und 19 an Tag 20, 17 und 6 nach der ersten Immunisierung gesammelt. Als Negativkontrollen wurden 19 SARS-CoV-2 Naive Ungeimpfte Proband\*innen (NUs) untersucht. Der Speichel wurde mit dem HL-2 ELISA-Protokoll auf anti-S1 IgG-Antikörper untersucht (Lixenfeld et al., 2021).

Es ließen sich bei 14 der 16 geimpften Proband\*innen anti-S1 IgG-Antikörper im Speichel nachweisen (*s. Abbildung 11A*). Die Ausnahme bestand in NG Proband\*in 11, der auch zu t1 bis t3 keine S1-spezifische Immunantwort zeigte und in NG Proband\*in 19, bei der die Speichelprobe nur sechs Tage nach der ersten Impfung gesammelt wurde. Die beiden VGs entwickelten besonders hohe anti-S1 IgG-Titer. Alle 19 Negativproband\*innen wiesen keine anti-S1 IgG-Antikörper auf. Um unspezifische Bindungen an die Platte auszuschließen, wurden ebenfalls Wells, die ohne gekoppeltes S1 Antigen mit unspezifischem Protein geblockt wurden, mitentwickelt (*s. Abbildung 5*). Keine unspezifischen Bindungen konnten festgestellt werden, und die so erhaltenen Ergebnisse unterschieden sich signifikant von denen mit gekoppeltem S1 Antigen ( $p < 0,0001$ ).

Da im Speichel typischerweise IgA-Antikörper zu finden sind, die sehr wahrscheinlich durch PCs vor Ort produziert werden (Matsuzaki et al., 2020), stellt sich die Frage der Herkunft der IgG-Antikörper. Durch Spearman-Korrelation zwischen Serum anti-S1 IgG-Titern und Speichel anti-S1 IgG-Titern (*s. Abbildung 11B*) wurde eine starke Korrelation festgestellt ( $r = 0,7802$ ,  $p = 0,0025$ ). Möglicherweise geraten die anti-S1 IgG-Antikörper über passive Diffusion aus dem Serum in den Speichel und tragen zur lokalen Abwehr im Respirationstrakt bei.



**Abbildung 11: Speichel anti-S1 IgG der NUs und Geimpften (NG/VG)**

Der Speichel von 14 Naiven Geimpften (NGs; blaue und roter Punkte) und zwei Vorinfizierten Geimpften (VGs; orangene Punkte) wurde mit dem HL-2 Protokoll auf anti-S1 IgG untersucht. Zusätzlich wurde einmalig der Speichel von 19 SARS-CoV-2 Naiven Ungeimpften Kontrollproband\*innen (NUs; schwarze Punkte) untersucht. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde (A) der Speichel auf S1-gekoppelte Wells, als auch auf mit unspezifischem Protein geblockten Wells ohne Antigen (AnG) entwickelt. Zusätzlich (B) wurden die mit dem HL-1 Protokoll an t3 (37–43 Tage nach der ersten, beziehungsweise. 5–8 Tage nach der zweiten Impfung; oder im Falle von Proband\*innen 17, 18 und 19 am selben Tag der Speichelentnahme) gemessenen Serum anti-S1 IgG Werte gegen die entsprechenden Speichel anti-S1 IgG-Werte aufgetragen. Statistische Auswertungen wurden mit dem (A; (waagerechte Linie)) Mann-Whitney-U-Test und (B) der Spearman-Korrelation vorgenommen; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.3. mRNA-Vakzin BNT162b2 induzierte anti-S IgG1 Serum Antikörper Fc-Glykosylierung

Nicht nur Isotyp und Subklasse bestimmen die Fc-vermittelten Effektorfunktionen von Antikörpern, sondern auch deren Fc-Glykosylierung. Im Fc-Teil von IgG-Antikörpern befindet sich eine konservierte N-Glykosylierungsstelle. An das konservierte Asparagin 297 jeder schweren Kette im Fc-Teil eines IgG-Antikörpers sind Oligosaccharid-Strukturen angehängt (s. Abbildungen 1 und 2). Diese hochkonservierte Glykosylierung besteht aus

## Ergebnisse

---

einer zweiarmigen Kernstruktur von sieben Sacchariden (4 N-Acetylglucosamine (GlcNAc) und 3 Mannosen), welche durch zusätzliche Zucker modifiziert werden kann: Fukose, Bisection-GlcNAc, Galaktose an einem oder beiden Armen, die durch Sialinsäuren erweitert werden können (T. T. Wang, 2019). Die Zusammensetzung der Zuckerkette hat unmittelbare Auswirkungen auf die Konformation des Fc-Teils und die Interaktion mit den klassischen Fc $\gamma$ -Rezeptoren und Zucker-bindenden Rezeptoren (Pincetic et al., 2014).

Gesamt und SARS-CoV-2-S-spezifische Serum IgG1-Fc-Glykopeptidprofile wurden in Kooperation von dem Institut für Proteomik und Metabolomik von Prof. Dr. Manfred Wuhrer am Leiden University Medical Center (LUMC) , Niederlande, mittels LC-MS IgG1 Glycopeptid-Analyse untersucht und für die folgenden vier Glyko-Traits dargestellt: Fukosylierung, Bisection, Galaktosylierung und Sialylierung (Lixenfeld et al., 2021; Van Coillie, Pongracz, Rahmöller et al., 2023). S-spezifische IgG1-Antikörper/Glykopeptide konnten bei NGs erst ab circa zehn Tagen nach der ersten Impfung detektiert und somit der Glykoanalyse zugeführt werden. Wie im ELISA-Abschnitt beschrieben konnten bei Proband\*in 11 bis zu t4 keine oder nur sehr geringe Mengen an S-spezifischen IgG-Antikörpern gemessen werden. Folglich war es nicht möglich eine entsprechende Glykosylierungsanalyse durchzuführen, weshalb diese\*r Proband\*in hiervon ausgeschlossen wurde.

Aufgrund der oben beschriebenen Auffälligkeiten werden die von Proband\*innen 9 und 10 gemessenen Daten in Dunkelrot dargestellt.

### 3.3.1. Fukosylierung

Zunächst wurden die anti-S und Gesamt IgG1-Antikörper auf das Vorhandensein von Fukose untersucht (s. *Abbildung 12*). Unfukosylierte (afukosylierte; F0-) Antikörper werden vor allem bei Immunantworten auf Alloantigene, Plasmodium falciparum und behüllte Viren, wie SARS-CoV-2, beobachtet (Oosterhoff et al., 2022). Eine fehlende Fukose an der Kern-Zuckerstruktur des IgG1 bewirkt im Kontext der Abwehrreaktion gegen behüllte Viren eine stärkere ADCC durch stärkere Affinität zum aktivierenden IgG-Fc-Rezeptor IIIA (Fc $\gamma$ RIIIa) (Larsen, de Graaf et al., 2021; Van Coillie, Pongracz, Rahmöller et al., 2023).

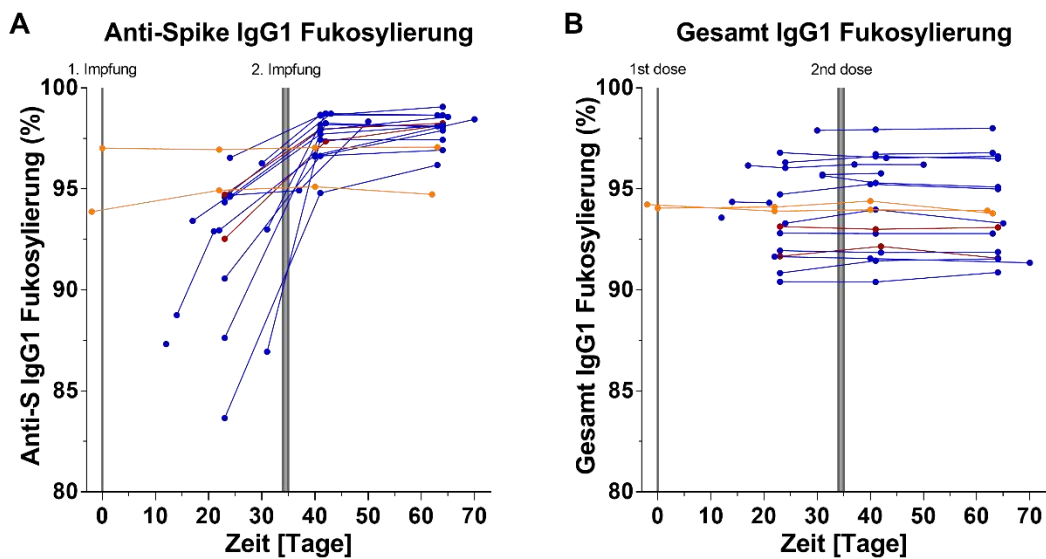
Die NGs zeigten zwei bis drei Wochen nach der ersten Immunisierung mit BNT162b2 eine auffallend hohe Afukosylierung (F0) der anti-S IgG1-Antikörper. Dabei wurden F0-Anteile bis

zu 16,3 % beobachtet. Gemittelt über die Tage 12–31 lag der Anteil von afukosyliertem anti-S IgG1 bei 8,0 % und damit über dem des Gesamt IgG1 (5,9 %) und den VGs (4,1 %) in diesem Zeitraum. Auf Abbildung 12 lässt sich jedoch deutlich erkennen, dass ein hoher F0-Anteil der NGs insbesondere initial nach der ersten Impfung und nur vorübergehend zu beobachten war und kontinuierlich wieder anstieg. An t3 wiesen die NGs im Mittel nur noch 2,4 % F0 anti-S IgG1 auf, an t4 sogar nur noch 2,0 %. Einen Einfluss auf das Gesamt IgG1 ließ sich nicht erkennen. Dieses blieb im Untersuchungszeitraum konstant bei einem Mittelwert von etwa 6,0 %.

Über den Untersuchungszeitraum hinweg blieb der unfukosylierte S-spezifische IgG1-Anteil der zwei VGs konstant bei gemittelt 4,2 % ohne erkennbaren Einfluss der Immunisierungen. Dabei lag der F0-Anteil leicht unter dem entsprechenden Anteil der Gesamt IgG1-Antikörper (6,0 %), jedoch ab t3 unter dem der NGs (gemittelt 2,2 %).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Naive Geimpfte (NGs) einen deutlichen, aber nur temporären F0-Peak nach der ersten Impfung zeigten, der sich nach der zweiten Impfung nicht messbar wiederholte. Vorinfizierte Geimpfte (VGs) hielten ihren ursprünglichen (t0) F0-Anteil konstant über die Zeit, der langfristig tendenziell höher war als bei NGs.

Bei Folgeuntersuchungen dieser Impfkohorte (Buhre et al., 2023) wurden die Proband\*innen bis Tag 270 nach der ersten Immunisierung beobachtet. Somit konnte der Langzeitverlauf der Glykosylierungsmuster weiterverfolgt werden. Auch nach 270 Tagen blieb der afukosylierte Anteil von anti-S1 IgG1-Antikörpern der NG bei etwa 2%. Bei den VGs, im Vergleich zu NGs, blieb der afukosylierte Anteil von anti-S1 IgG1-Antikörpern leicht niedriger, was sich bei der Untersuchung einer weiteren Kohorte (Van Coillie, Pongracz, Rahmüller et al., 2023) bestätigte.



**Abbildung 12: Anti-Spike IgG1- und Gesamt IgG1-Fukosylierung im Zeitverlauf**

Das Serum von 18 Naiven Geimpften (NGs; blau) und zwei Vorinfizierten Geimpften (VGs; orange) wurde mittels LC-MS IgG1-Glykoprofilanalyse untersucht. Proband\*innen 9 und 10 werden in Rot abgebildet. Die Proband\*innen-Auswahl und die Farbgebung wird für alle Abbildungen des Abschnitts 3.3 beibehalten. Da bei Proband\*in 11 nicht ausreichend hohe anti-S IgG1-Glykoprofilprofile gemessen wurden, wurde diese\*r Proband\*in von den Glykosylierungsanalysen ausgenommen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil fukosylierter IgG1-Fc-Glykopeptide (**A**) unter allen SARS-CoV-2-S-spezifischen IgG1-Fc-Glykopeptiden, beziehungsweise (**B**) unter allen Gesamt IgG1-Fc-Glykopeptiden im untersuchten Zeitraum (bis zu 70 Tagen nach der ersten Impfung mit BNT162b2).

Diese Daten wurden in Kooperation von dem Institut für Proteomik und Metabolomik von Prof. Dr. Manfred Wuhrer am LUMC, Niederlande erhoben.

### 3.3.2. Bisection-GlcNAc

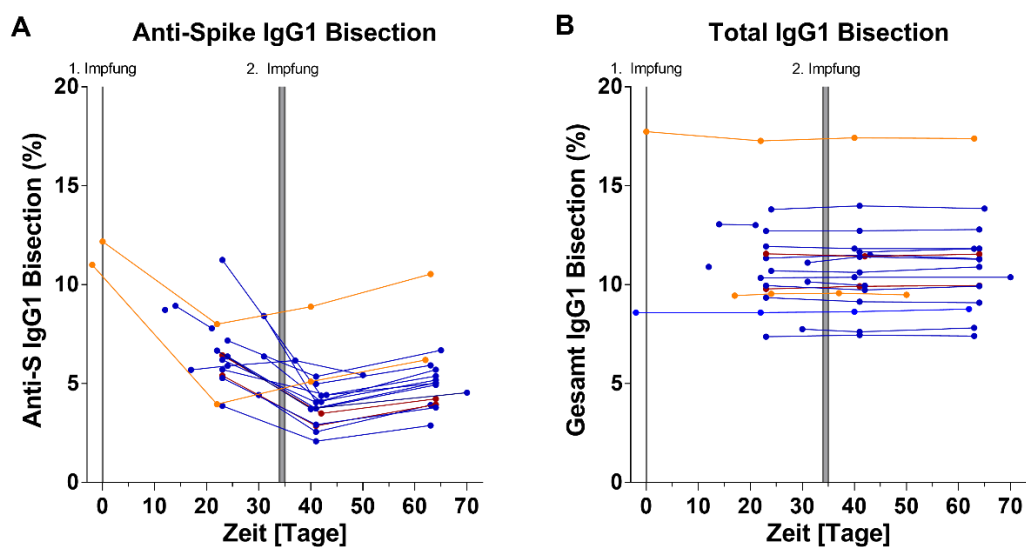
Parallel wurde der prozentuale Anteil an Bisection-GlcNAc (im Verlauf nur Bisection genannt) anti-S1 IgG1- und Gesamt IgG1-Fc-Glykopeptiden kalkuliert (*s. Abbildung 13*). Der Einfluss dieses Merkmals auf die Funktion von Antikörpern ist noch unklar.

In Abbildung 13 ist der Bisection-Trend im Zeitverlauf dargestellt. Der initiale Bisection-Anteil der beiden VGs sank von anfänglich (t0) 11,0 auf (t3) 4,0 %, beziehungsweise von (t0) 12,2 auf (t3) 8,0 % an Tag 22 nach der ersten Impfung. Auch der induzierte S-spezifische

Bisection-Anteil bei NGs sank nach der ersten Impfung von t1 nach t3. Im weiteren Verlauf nach der zweiten Impfung (t4) stieg Bisection anti-S IgG1 langsam wieder an.

Zusammenfassend fielen die Bisection anti-S1 IgG1 Spiegel bei NGs und VGs bis kurz nach der zweiten Impfung (t3) und stiegen danach wieder leicht an.

In weiterführenden Untersuchungen dieser Kohorte (Buhre et al., 2023) ließ sich dieser Bisection anti-S IgG1 Aufwärtstrend bestätigen. Auch nach 270 Tagen wurde bei den VGs und NGs eine weitere Zunahme des anti-S1 Bisection-Anteils beobachtet, er blieb jedoch unter dem Bisection-Anteil von Gesamt IgG1.



**Abbildung 13: Anti-Spike IgG1- und Gesamt IgG1-Bisection im Zeitverlauf**

Das Serum von 18 Naiven Geimpften (NGs; blau) und zwei Vorinfizierten Geimpften (VGs; orange) wurde mittels LC-MS IgG1-Glykopeptidanalyse untersucht. Proband\*innen 9 und 10 werden in Rot abgebildet. Dargestellt ist der Anteil von Bisection-IgG1-Glykopeptiden (A) unter allen SARS-CoV-2-S-spezifischen IgG1-Glykopeptiden, beziehungsweise (B) unter allen Gesamt IgG1-Glykopeptiden.

Diese Daten wurden in Kooperation von dem Institut für Proteomik und Metabolomik von Prof. Dr. Manfred Wuhrer am LUMC, Niederlande erhoben.

### 3.3.3. Galaktosylierung und Sialylierung

Die IgG1-Galaktosylierung (Gal) und -Sialylierung (Sial) werden aufgrund einer beobachteten vergleichbaren Dynamik (s. *Abbildung 14*) zusammen besprochen. Die Rolle

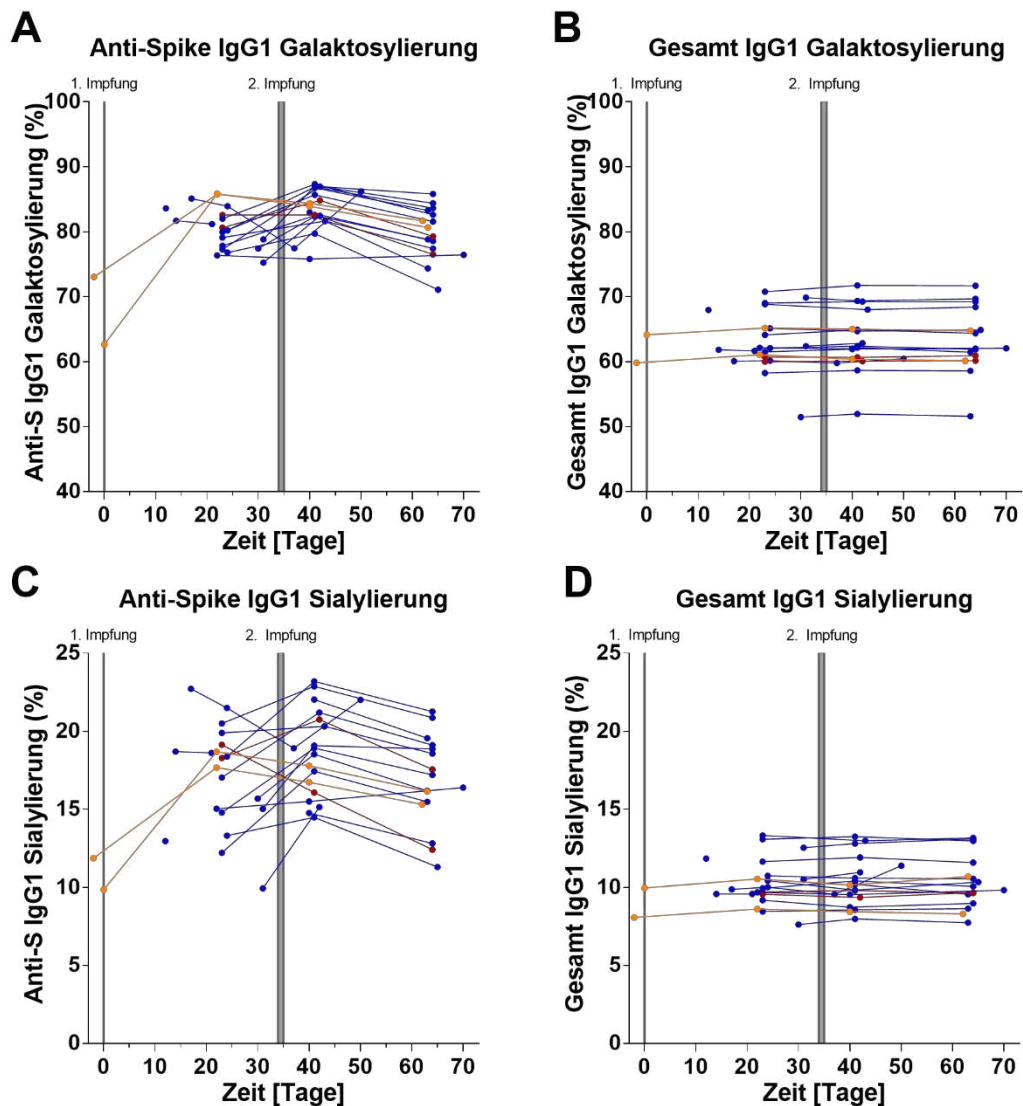
## Ergebnisse

---

der antigenspezifischen IgG-, beziehungsweise IgG1-Galaktosylierung und -Sialylierung, ist komplex; sie wurde in der Einleitung erwähnt und wird in der Diskussion weiter aufgegriffen.

Die beiden VGs zeigten einen deutlichen Anstieg beider anti-S IgG1 Glykomerkmale zwischen t0 und t1; deutlich über die Anteile der Gesamt IgG1-Gal und –Sial Glykoformen hinaus. Nach der zweiten Impfung fielen die Titer der anti-S IgG1-Gal und -Sial Glykoformen ab. Die anti-S IgG1-Gal und -Sial Anteile der NGs und VGs zeigten vergleichbar hohe anti-S IgG1-Gal und -Sial Anteile mit einer abfallenden Tendenz über die Zeit nach der ersten Impfung. Nach der zweiten Impfung stiegen die anti-S Anteile tendenziell erneut, um danach wieder abzufallen.

Zusammenfassend zeigten VGs und NGs einen vergleichbaren Verlauf mit hohen Anteilen an anti-S IgG1-Gal und -Sial Glykoformen nach jeder Impfung, die nach der zweiten Impfung über die Zeit abfielen.



**Abbildung 14: Anti-Spike IgG1- und Gesamt IgG1-Galaktosylierung und -Sialylierung im Zeitverlauf**

Das Serum von 18 Naiven Geimpften (NGs; blau) und zwei Vorinfizierten Geimpften (VGs; orange) wurde mittels LC-MS IgG1-Glykopeptidanalyse untersucht. Proband\*innen 9 und 10 werden in Rot abgebildet. Dargestellt ist der Anteil galaktosylierter IgG1-Antikörper **(A)** unter allen SARS-CoV-2-S-spezifischen IgG1-Fc-Glykopeptiden und **(B)** unter allen Gesamt IgG1-Fc-Glykopeptiden, beziehungsweise sialylierter IgG1-Fc-Glykopeptiden **(C)** unter allen SARS-CoV-2-S-spezifischen IgG1-Glykopeptiden und **(D)** unter allen Gesamt IgG1-Glykopeptiden im untersuchten Zeitraum.

Diese Daten wurden in Kooperation von dem Institut für Proteomik und Metabolomik von Prof. Dr. Manfred Wuhrer am LUMC, Niederlande erhoben.

## Ergebnisse

---

In Folgeuntersuchungen (Buhre et al., 2023) bestätigte sich der nach der zweiten Impfung beobachtete Abwärtstrend der anti-S Gal-IgG1 und Sial-IgG1 Glykoformen mit einer kontinuierlichen Abnahme bis Tag 270.

Die hier gezeigten Daten, die Folgeuntersuchungen (Buhre et al., 2023) und Untersuchungen in Mäusen (Bartsch et al., 2020) führten zu der Vermutung, dass sich anti-S IgG1-Titer und deren Gal-, Sial- und Bisection-Anteile nach jeder Impfung in wiederkehrenden Wellenformen bewegen: i) mit hohen anti-S(1) IgG1-Titern mit hohen Gal- und Sial- sowie niedrigen Bisection-Anteilen kurz nach jeder Impfung, die danach ii) über die Zeit wieder abnahmen und niedrigere Gal- und Sial- und höhere Bisection-Anteile zeigten. Es wurde vermutet (Buhre et al., 2023), dass die hohen initialen anti-S IgG1-Antworten von NGs und VGs nach jeder Impfung mit hohen Gal- und Sial-Anteilen extrafollikuläre kurzlebige Plasmazellantworten widerspiegeln, wohingegen die niedrigeren Langzeit anti-S IgG1-Titer mit niedrigeren Gal- und Sial-Anteilen in Keimzentren generierte langlebige Plasmazellantworten entsprechen könnten.

Die anti-S IgG1 Fukosylierung schien nicht dieser Wellenform zu folgen und war zwischen NGs und VGs unterschiedlich. Bei NGs war im Gegensatz zu den VGs initial nach der ersten Impfung, aber nicht nach der zweiten Impfung, eine deutliche anti-S IgG1 F0-Antwort zu beobachten. Stattdessen zeigten VGs kontinuierlich über die Zeit einen leicht höheren anti-S IgG1 F0-Anteil (Buhre et al., 2023; Van Coillie, Pongracz, Rahmöller et al., 2023).

### **3.4. mRNA-Vakzin BNT162b2 induzierte S1-spezifische B-Zell-Antworten**

Als Nächstes wurden S-spezifische B-Zell-Antworten betrachtet, da diese für die Antikörperproduktion und deren Glykosylierung zuständig sind (J. Wang et al., 2011). Für die Analysen wurde die Durchflusszytometrie (FACS) als Methode gewählt und ein auf SARS-CoV-2-spezifische B-Zellen im Blut abgestimmtes Färbeprotokoll entwickelt (Lixenfeld et al., 2021).

#### **3.4.1. Etablierung eines Durchflusszytometrie-Protokolls zur Detektion von S-spezifischen B-Zell-Antworten**

B-Zellen sind für die Produktion der im Kapiteln 3.1. per ELISA und 3.2. per Glykosylierungsanalyse, untersuchten Antikörper zuständig. Verschiedene B-Zell-Untergruppen übernehmen verschiedene Aufgaben. Nach Impfung sezernieren zu

PCs differenzierte B-Zellen Antikörper. Zunächst entwickeln sich kurzlebige extrafollikuläre PCs, welche nach wenigen Tagen oder Wochen absterben. Fließend übergehend übernehmen dann langlebige PCs, vorwiegend aus der Keimzentrumsreaktion hervorgegangen, die Antikörperproduktion. Langlebige PCs können über Jahre zum Beispiel im Knochenmark überleben (Dörner und Radbruch, 2007; Khodadadi et al., 2019). Eine weitere wichtige B-Zell-Subpopulation sind B-Gedächtniszellen, welche sich in den ersten Wochen nach Antigenkontakt vorrangig aus der Keimzentrumsreaktion ausbilden und bis zu lebenslang im Organismus verbleiben können. Diese langlebigen B-Zell-Gruppen tragen bei erneutem Antigenkontakt zu einer schnelleren und intensiveren Immunantwort bei (Kurosaki et al., 2015).

Um eine Vorstellung von den induzierten B-Zell-Antworten nach SARS-CoV-2-Impfung im Blut zu erhalten, sollte ein Protokoll zur S-spezifischen B-Zell-Färbung per FACS etabliert werden.

Die Oberflächenmarker CD19 (B-Zellmarker), CD27 (B-Gedächtniszellmarker), CD38 (Plasmazellmarker) und CD138 (Plasmazellmarker) sollten extrazellulär, IgG und IgA extra- und intrazellulär und die alpha-2,6-Sialyltransferase (ST6GAL1) und das S1-Protein nur intrazellulär angefärbt werden. Dazu wurden Fluorochrom-gekoppelte Merkmal-spezifische kommerziell erwerbbar Antikörper sorgfältig ausgewählt.

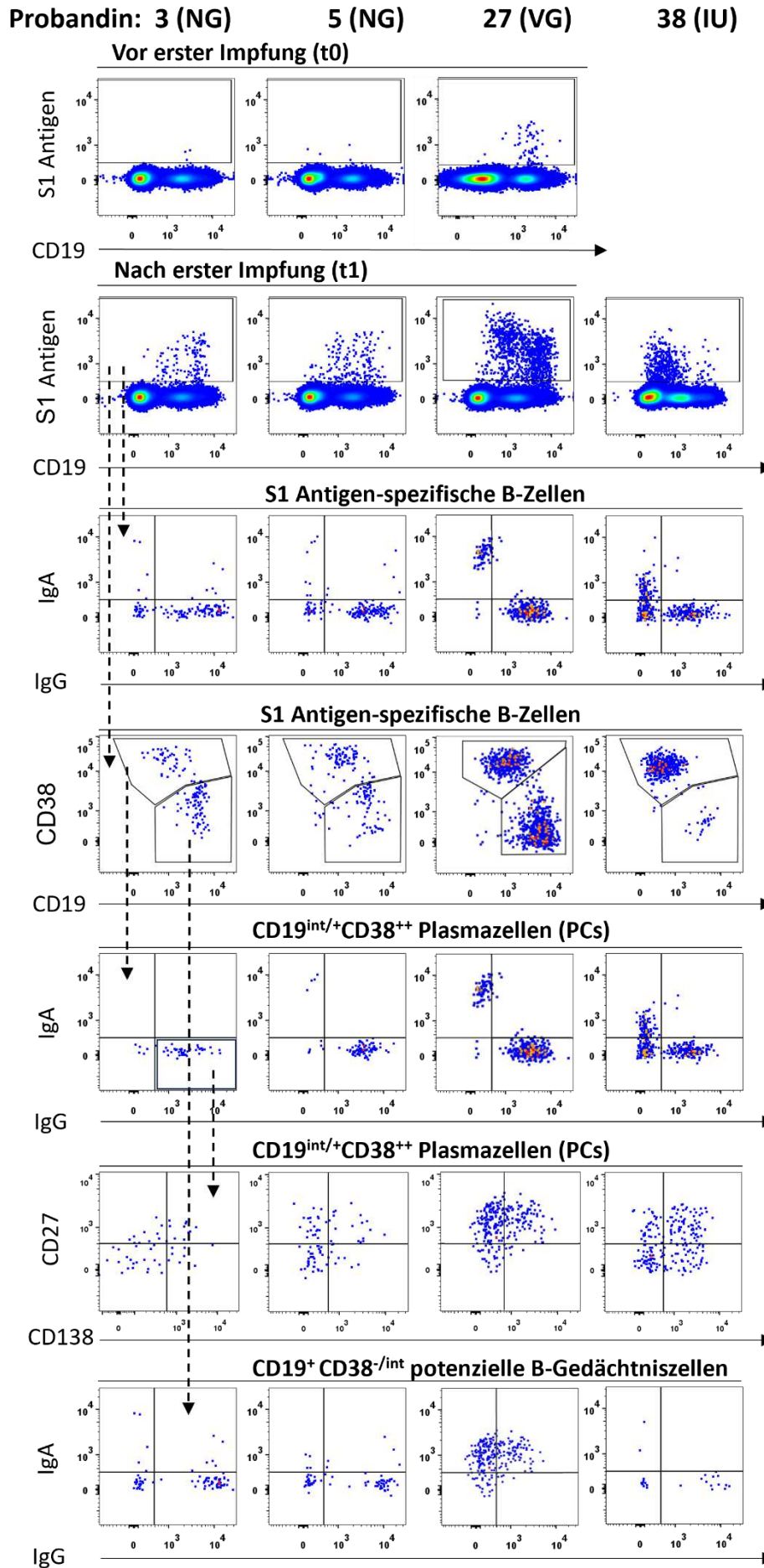
Um eine aussagekräftige Menge an S-spezifischen B-Zell-Gruppen aus dem Blut darzustellen, wurde pro Ansatz eine PBMC-Anzahl von 20 Millionen Zellen gefärbt. Entsprechend Fachliteratur wurden aus den isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) über FlowJo Software Lymphozyten eingekreist (*s. Kap. 2.5.4.*). Entsprechend wurde anhand des Vorwärtsstreulichts (FSC) und des Seitwärtsstreulichts (SSC) im ersten Schritt Lymphozyten identifiziert. Danach konnten Zelldubletten und mithilfe eines Viabilitätsfarbstoffes tote Zellen, angelehnt an (Cossarizza et al., 2017), ausgeschlossen werden.

Danach wurde auf S1-spezifischen Zellen gated. Abbildung 15 zeigt beispielhaft Durchflusszytometrie-Bilder von vier der untersuchten Individuen. Proband\*innen 3 und 5 (t0 und t1) gehörten zur NG-Kohorte, Proband\*in 27 zur VG-Kohorte und Proband\*in 38 zu den Intensivpatient\*innen (IUs). S1<sup>+</sup> Lymphozyten ließen sich erst zu t1 (nach der Impfung

## Ergebnisse

---

mit BNT162b2), beziehungsweise in der Intensivpatientin 38 nachweisen. Die Färbemethode lieferte also verlässliche Aussagen, über das Vorhandensein SARS-CoV-2-spezifischer Blutzellen.



## Ergebnisse

---

### Abbildung 15: S1-spezifische Lymphozyten zu t0 und t1

Aus dem Vollblut, hier beispielhaft von zwei Naiven Geimpften (NGs; Proband\*innen 3 und 5) und einer Vorinfizierten Geimpften (VG; Proband\*in 27) zu Zeitpunkt t0 und t1, sowie von einem akut infiziertem Intensivpatienten (IU; Proband\*in 38) während der Infektion, wurden PBMCs isoliert und entsprechend des in Teil 2.5.4. und Abbildung 3 beschriebenen Gatings untersucht. Lymphozyten wurden im Vorwärts-/Seitwärts-Scatter eingekreist und Doubletten sowie tote Zellen ausgegrenzt. Die verbliebenen Lymphozyten/Zellen wurden auf S1-, CD19-, CD38-, CD27-, CD138-, IgA- und IgG-Bindung untersucht.

Um die aus der Glykosylierungsanalyse erhaltenen Daten zu unterstützen, wurde die ST6GAL1 im Inneren der B-Zellen angefärbt. Das Enzym katalysiert die Anknüpfung von Sialinsäure an eine Galaktose über eine  $\alpha$ -2,6 Bindung (Zhang et al., 2019). Die Anfärbung der ST6GAL1 im Zellinneren einer Plasmazelle lässt Rückschlüsse darauf zu, ob mehr oder weniger sialylierte Antikörper produziert werden.

Um möglichst alle IgG<sup>+</sup> B-Zellen zu erreichen, wurde der anti-IgG Antikörper im extra- und intrazellulären Färbegang eingesetzt (siehe auch (Biswas et al., 2021), ebenso wie der anti-IgA-Antikörper. Der anti-IgA-Antikörper diente auch des Ausschlusses IgG/IgA doppelt positiver Zellen.

In aktueller Fachliteratur werden für B-Gedächtniszellen und PCs vor allem folgende Gating-Strategien verwendet: CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>-/int</sup>CD138<sup>-</sup> für B-Gedächtniszellen und CD19<sup>int/+</sup>CD20<sup>-</sup>CD27<sup>++</sup>CD38<sup>++</sup>CD138<sup>-/+</sup> für PCs (Caraux et al., 2010; Fink, 2012; Velounias und Tull, 2022). Es wurde entschieden, über CD19 und CD38 B-Gedächtniszellen (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-/int</sup>) und PCs (CD19<sup>int/+</sup>CD38<sup>++</sup>) zu trennen.

CD19, ein Transmembran-Glykoprotein und ein B-Zell Ko-Rezeptor (Murphy und Weaver, 2018c) ist ein verlässlicher, häufig genutzter B-Zell-Marker, welcher durch die B-Zell-Evolution von Pro B-Zellen bis hin zu enddifferenzierten PCs in variabler Dichte exprimiert wird (Caraux et al., 2010; Cossarizza et al., 2017; Fink, 2012; Pitoiset et al., 2018; Velounias und Tull, 2022; K. Wang et al., 2012). Nicht nur zur Unterscheidung verschiedener B-Zell-Subgruppen durch unterschiedlich starke Expression, sondern auch zum Ausschluss von T-Zellen und anderen PBMCs (CD19-negativ) handelt es sich um einen essenziellen B-Zell-Identifikator. Außerdem exprimieren Plasmazellen weniger CD19 als B-Gedächtniszellen,

sodass eine anti-CD19 Färbung auch für diese Unterscheidung genutzt werden kann (Khodadadi et al., 2019).

CD38, ebenfalls ein Transmembran-Glykoprotein, wird unter anderem auf B-Zellen, aber auch auf T-Zellen exprimiert (W. Li et al., 2022; Morbach et al., 2010). Eine besonders starke Expression findet sich auf PCs. B-Gedächtniszellen verlieren das Merkmal und exprimieren nur wenig bis kein CD38 auf ihrer Oberfläche (Caraux et al., 2010; Fink, 2012; Velounias und Tull, 2022). Auf Grundlage dieser Merkmale wurden B-Zellen in zwei Gruppen eingeteilt (Lixenfeld et al., 2021; Van Coillie, Pongracz, Rahmöller et al., 2023): CD19-intermediär bis -positive, CD38-positive ( $CD19^{int/+}CD38^{++}$ ) PCs und CD19-positive, CD38-niedrige ( $CD19^{+}CD38^{-/int}$ ) B-Gedächtniszellen. Weiterhin wurden die PC-Marker CD27 und CD138 ausgewählt, um die PCs in Subpopulationen einzuteilen (Sanz et al., 2008)

Die Gating-Strategie wird im Kapitel 2.5.4. beschrieben und ist dort in Abbildung 3 und hier in Abbildung 15 dargestellt. Zunächst wurden einzelne, lebende Lymphozyten eingekreist, wovon wiederum die  $S1^{+}$  Lymphozyten erfasst wurden. Diese wurden im anti-CD19 gegen anti-CD38 Darstellungen in PCs ( $CD19^{int/+}CD38^{++}$ ) und B-Gedächtniszellen ( $CD19^{+}CD38^{-/int}$ ) aufgegliedert. Danach wurden eingekreiste Plasmazellen oder eingekreiste B-Gedächtniszellen in einer anti-IgG gegen anti-IgA Darstellung aufgegliedert.  $IgG^{+}$  PCs wurden anschließend in einer anti-CD138 gegen anti-CD27 Darstellung aufgegliedert, sodass auf Basis der Einteilung des CD27/CD138-Fensters in vier Quadranten vier PC-Gruppen entstanden:  $CD27^{-/int}CD138^{-/int}$ ,  $CD27^{+}CD138^{-/int}$ ,  $CD27^{-/int}CD138^{+}$  und  $CD27^{+}CD138^{+}$ . Die Sialyltransferase-Expression dieser vier Subpopulationen wurde ebenfalls ausgewertet (s. *Abbildungen 3 und 19*).

### 3.4.2. S1-spezifische B-Zell-Populationen

Per Durchflusszytometrie sollten die zellulären Grundlagen der humoralen Immunantwort auf BNT162b2 untersucht werden. Um genauere Informationen über die Antikörperproduzierenden Zellen zu erlangen, wurden oben genannte Marker eingesetzt und verschiedene B-Zell-Populationen untersucht. FACS-Daten wurden an den Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_1^*$ ,  $t_1$ ,  $t_3$  und  $t_4$  erhoben. Dabei wurde  $t_0$  als Negativkontrolle verwendet. Im Folgenden werden die Daten aus  $t_4$  nicht berücksichtigt, da dieser Blutentnahme-Zeitpunkt mit 37–43

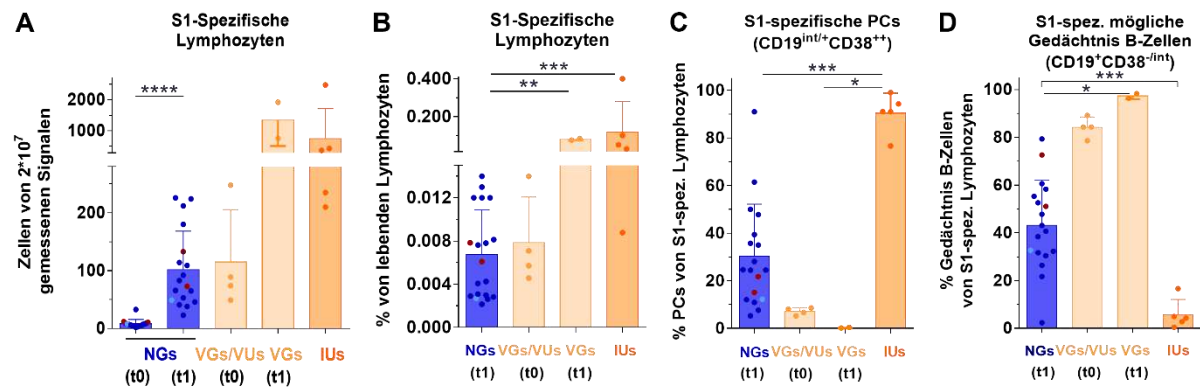
## Ergebnisse

---

Tagen nach der zweiten Immunisierung zu weit entfernt lag, um genügend S1-spezifische PCs im Blut zu detektieren.

Bei infizierten COVID-19 Patienten (Positivkontrollen) als auch nach BNT162b2 Immunisierung konnten S1-spezifische Lymphozyten detektiert werden (*s. Abbildungen 15 und 16*). Dabei stieg die Zahl der S1<sup>+</sup> Lymphozyten bei den NGs zwischen t0 und t1 signifikant an ( $p < 0,0001$ ). Die NGs erreichten 21–31 Tage nach der ersten Impfung (t1) einen ähnlichen S1-positiven Anteil unter allen Lymphozyten wie die VUs/VGs an t0, von durchschnittlich 0,007 % gegen 0,008 %, beziehungsweise konnte nach Mann-Whitney kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Dagegen zeigten die VGs an t1 einen deutlichen Anstieg auf 0,08 % S1-spezifischer Lymphozyten und somit einen signifikant höheren Anteil als die NGs an t1 ( $p = 0,0095$ ). Die Intensivpatient\*innen (IUs) verfügten im Vergleich zu den NGs an t1 über einen signifikant höheren Anteil ( $p = 0,0009$ ) von gemittelt 0,12 % S1-spezifischer B-Zellen unter allen Lymphozyten.

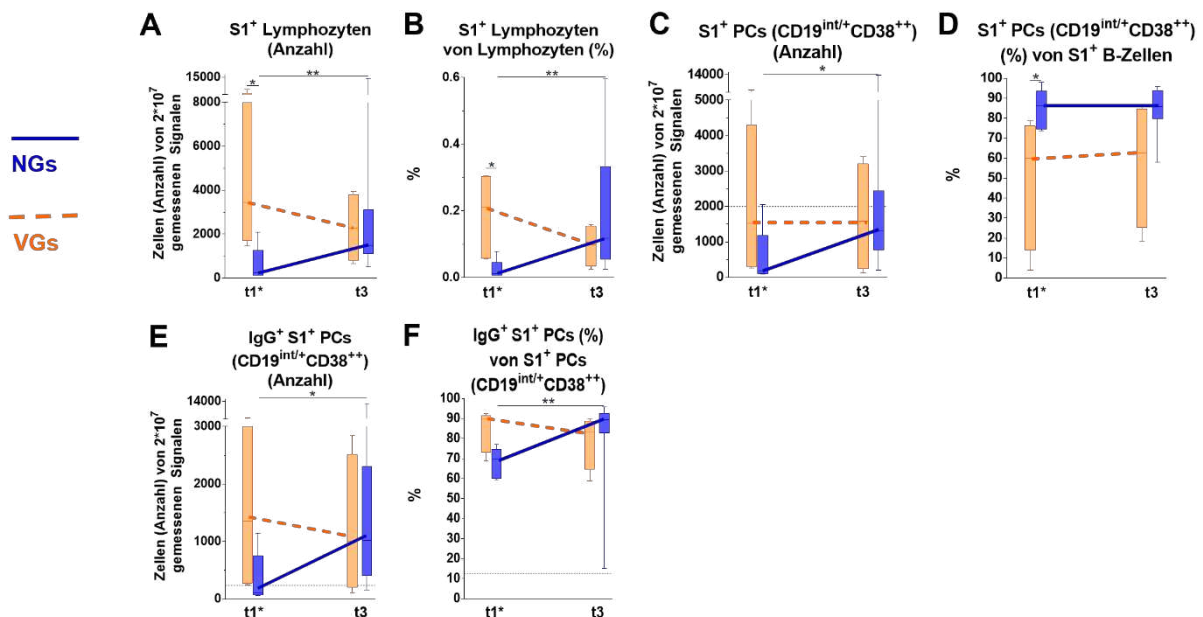
Deutlich signifikante Unterschiede bestanden in den B-Zell-Subpopulationen. Während VGs an t0 und VUs vor allem S1-spezifische B-Gedächtniszellen aufwiesen (durchschnittlich 84,1 % der S1-spezifischen B-Zellen), beziehungsweise bei den VGs an t1 97,4 %, waren es bei den NGs zu t1 nur 43,2 % und bei den IUs durchschnittlich 5,8 %. Dagegen zeigten sich PCs als dominante Subpopulation mit 90,4 % unter den S1<sup>+</sup> B-Zellen bei den IUs, während der PC-Anteil bei VGs an t0 und VUs 7,1 % und bei den VGs an t1 nur 0,3 % betrug. Die NGs zeigten an t1 einen durchschnittlichen PC-Anteil von 30,4 %. Einschränkend muss erwähnt werden, dass der Blutentnahmezeitpunkt bei den IUs wenige Tage nach der Infektion lag, bei den VGs zu t0 und den VUs dagegen ein bis zehn Monate nach Infektion, bei den NGs und VGs zu t1 wiederum circa drei Wochen nach der ersten Immunisierung.



**Abbildung 16: S1-spezifische Zellpopulationen Naiver Geimpfter und COVID-19 Positiver**

Das Vollblut von 18 Naiven Geimpften (NGs) wurde zu Zeitpunkt t0 (-2 bis 0 Tage nach erster Impfung) und t1 (21–31 Tage nach erster Impfung) untersucht. Wie in vorangehenden Abbildungen sind Daten von Proband\*innen 9 und 10 in Rot, die von Proband\*in 11 in Hellblau dargestellt. Zusätzlich wurde das Vollblut von fünf Infizierten Ungeimpften (IUs; dunkelorange), zwei Vorinfizierten Ungeimpften (VUs; hellorange) und zwei Vorinfizierten Geimpften (VGs; hellorange) untersucht. Der hier dargestellten Werte der VGs beziehen sich auf t0, also den Zeitpunkt vor der ersten Immunisierung. S1-spezifische Lymphozyten wurden weiter in mögliche PCs (CD19<sup>int/+</sup>CD38<sup>++</sup>) und B-Gedächtniszellen (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-/int</sup>) aufgetrennt. Dargestellt sind die **(A)** Anzahl S1-spezifischer Lymphozyten, **(B)** der Anteil (%) S1-spezifischer Lymphozyten an allen lebenden Lymphozyten, **(C)** der Anteil S1-spezifischer PCs unter aller S1-spezifischen Lymphozyten und **(D)** der Anteil möglicher S1-spezifischer B-Gedächtniszellen unter allen S1-spezifischen Lymphozyten. Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen oder zwei Zeitpunkten wurde der Mann-Whitney-U-Test (waagerechte Linie) und für drei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test (eckige Klammer) durchgeführt; \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

Um die bei den NGs und VGs nach jeder Impfung induzierten PCs besser vergleichen zu können, wurden als Nächstes ähnliche/zusätzliche Blutentnahmezeiträume nach den beiden Immunisierungen gewählt. Abbildung 17 zeigt einen Vergleich zwischen den an t1\* und t3, also 7–14 und 37–43 Tage nach der ersten Impfung (letzteres entspricht 5–8 Tage nach der zweiten Impfung), gemessenen Werten von NGs und VGs. VGs wiesen an t1\* signifikant (p < 0,05) mehr S1<sup>+</sup> Lymphozyten auf als NGs. An Zeitpunkt t3 hatten NGs und VGs ähnliche Anzahlen an S1<sup>+</sup> Lymphozyten, S1<sup>+</sup> Plasmazellen und IgG<sup>+</sup>S1<sup>+</sup> PCs. Bei der Untersuchung der Subpopulationen zeigten sich an t1\* und t3 bei den NGs höhere Anteile an S1<sup>+</sup> PCs unter allen B-Zellen.



**Abbildung 17: Evolution verschiedener B-Zell Populationen zwischen t1\* und t3**

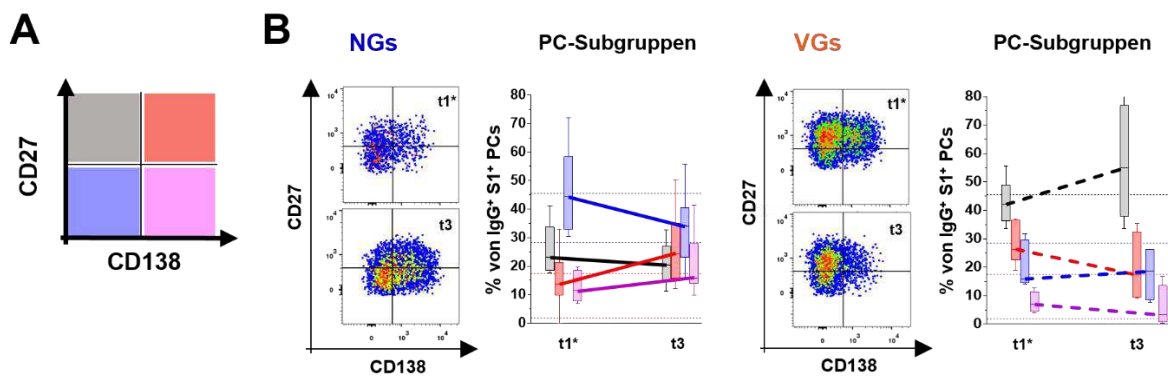
Das Vollblut von sechs Naiven Geimpften (NGs; blau) und fünf Vorinfizierten Geimpften (VGs; orange) wurde zu Zeitpunkt t1\* (7–14 Tage nach erster Impfung) und von 15 NGs (blau) und vier VGs (orange) wurde zu Zeitpunkt t3 (37–43 nach der ersten, beziehungsweise 5–8 Tage nach zweiter Impfung) untersucht. Aus S1-spezifischen B-Zellen ( $S1^+CD19^+$ ) wurden PCs ( $CD19^{int/+}CD38^{++}$ ) ausgewählt und daraus wiederum  $IgG^+$  PCs untersucht. Dargestellt sind jeweils an t1\* und t3 (A) die Anzahl S1-spezifischer B-Zellen, (B) der Anteil S1-spezifischer B-Zellen an allen lebenden Lymphozyten, (C) die Anzahl S1-spezifischer PCs, (D) der Anteil S1-spezifischer PCs unter aller S1-spezifischer B-Zellen, (E) die Anzahl  $IgG^+$  S1-spezifischer PCs und (F) der Anteil  $IgG^+$  S1-spezifischer PCs unter allen S1-spezifischer B-Zellen von NGs und VGs. Die gestrichelten schwarzen horizontalen Linien zeigen die entsprechenden Werte von ( $IgG^+$ ) PCs von NU Kontrollproband\*innen. Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen oder zwei Zeitpunkten wurde der Mann-Whitney-U- Test (waagerechte Linie) durchgeführt. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.4.3. Plasmazell-Subpopulationen

PCs sind die eigentlichen Produzenten von Antikörpern und somit von besonderem Interesse dieser Arbeit. Wie oben (Kap. 3.3.1.) beschrieben, wurden S1-spezifische  $CD19^{int/+}CD38^{++}IgG^+$  PCs weiter auf Expression der Marker CD27 und CD138 untersucht. Bei der Einteilung in vier Populationen ( $CD27^{-/int}CD138^{-/int}$ ,  $CD27^+CD138^{-/int}$ ,  $CD27^{-/int}CD138^+$

und CD27<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) fielen zwischen NGs und VGs folgende Unterschiede auf. Bei den NGs dominierte zu t1\* und t3 die CD27<sup>-/int</sup>CD138<sup>-/int</sup> Gruppe, während bei den VGs vor allem CD27<sup>+</sup>CD138<sup>-/int</sup> PCs zu finden waren (s. Abbildungen 18 und 19).

Möglicherweise handelt es sich um PC-Subpopulationen unterschiedlicher Entstehung. Vorinfizierte sind bereits vor der ersten Immunisierung mit dem S1-Protein des SARS-CoV-2 in Kontakt gekommen und verfügen ohne Immunisierung bereits über S1-spezifische B-Gedächtniszellen (s. Abbildung 16D). So könnten die bei den VGs vorwiegend nachgewiesenen CD27<sup>+</sup>CD138<sup>-/int</sup> PCs aus B-Gedächtniszellen entstanden sein, während die CD27<sup>-/int</sup>CD138<sup>-/int</sup> Gruppe aus naiven B-Zellen generiert sein könnte.



**Abbildung 18: Evolution von PC-Subgruppen zwischen t1\* und t3**

(A) Das Vollblut von sechs Naiven Geimpften (NGs) und fünf Vorinfizierten Geimpften (VGs) wurde zu Zeitpunkt t1\* (7–14 Tage nach erster Impfung) und an t3 (37–43 nach der ersten, beziehungsweise 5--8 Tage nach zweiter Impfung) von 14 NGs und vier VGs untersucht. S1<sup>+</sup> PCS (CD19<sup>int/+</sup>CD38<sup>++</sup>) wurden in vier Subpopulationen eingeteilt: CD27<sup>-/int</sup>CD138<sup>-/int</sup> (blau), CD27<sup>+</sup>CD138<sup>-/int</sup> (grau), CD27<sup>-/int</sup>CD138<sup>+</sup> (rosa) und CD27<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> (rot). (B) Dargestellt sind jeweils an t1\* und t3 die prozentuellen Anteile der vier Populationen von NGs und VGs. Die gestrichelten horizontalen Linien zeigen die entsprechenden PC-Subgruppen-Anteile von Naiven Ungeimpften Kontrollproband\*innen (NUs).

### 3.4.4. Sialyltransferase-Expression

Im Kapitel 3.3. wurden die Ergebnisse der IgG1-Fc N-Glykosylierungsanalyse beschrieben. Unter anderem wurde die Sialylierung der IgG1-Antikörper untersucht. Sialinsäure wird fast ausschließlich über eine  $\alpha$ -2,6-Bindung an Galaktose in der Polysaccharidkette am Fc-Teil des IgG-Moleküls befestigt; das entsprechende Enzym ist die ST6GAL1. (Boune et al., 2020).

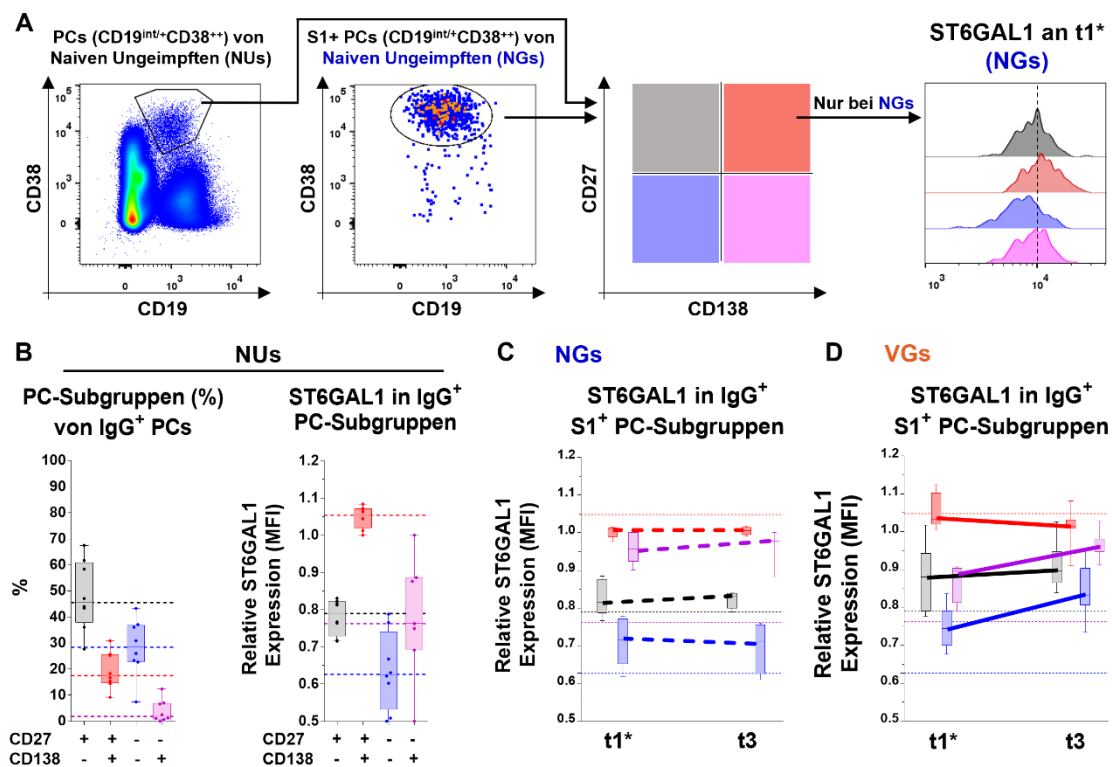
## Ergebnisse

---

Das Durchflusszytometrie-Protokoll wurde so etabliert, dass die ST6GAL1 in den B-Zellen angefärbt werden konnte, mit dem Ziel, die für die initiale hohe Sialylierung der IgG-Antikörper nach jeder Impfung zuständigen Plasmazell-Subpopulationen auffindig zu machen.

Über alle untersuchten Gruppen, den NUs, NGs und VGs, hinweg fand sich stets die höchste ST6GAL1-Expression in der CD27<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> PC-Subpopulation und bei den NGs zusätzlich in der CD27<sup>-int</sup>CD138<sup>+</sup> PC-Population (*s. Abbildung 19*). Am wenigsten ST6GAL1 wurde in der CD27<sup>-int</sup>CD138<sup>-int</sup> und tendenziell der CD27<sup>+</sup>CD138<sup>-int</sup> PC-Subpopulation nachgewiesen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es unterschiedliche PC-Subpopulationen gibt, die entsprechend unterschiedlich glykosylierte IgG-Antikörper produzieren könnten. Generell könnten die frühen hoch sialylierten IgG-Antikörper nach jeder Impfung vor allem von CD138<sup>+</sup> PCs generiert werden.



**Abbildung 19: ST6GAL1-Expression in PC-Subgruppen von NUs, NGs und VGs**

Das Vollblut von sieben Naiven Ungeimpften (NUs), von sechs Naiven Geimpften (NGs) und fünf Vorinfizierten Geimpften (VGs) zu Zeitpunkt t1\* (7–14 Tage nach erster Impfung), sowie von 14 NGs und vier VGs zu t3 (37–43 nach der ersten, beziehungsweise 5–8 Tage nach zweiter Impfung) wurde untersucht. **(A)** Aus den IgG<sup>+</sup> S1-spezifischen Lymphozyten (beziehungsweise allen Lymphozyten für die NUs) wurden die vier CD27/CD38 Subpopulationen (CD27<sup>-/int</sup>CD138<sup>-/int</sup> (blau), CD27<sup>+</sup>CD138<sup>-/int</sup> (grau), CD27<sup>-/int</sup>CD138<sup>+</sup> (rosa) und CD27<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> (rot)) auf ST6GAL1-Expression (Mittelwert der Mediane) untersucht. Beispielhaft wird hier ein Überlagerungs-Histogramm der ST6GAL-Expression eines NGs an t1\* gezeigt. Abgebildet werden **(B)** die IgG<sup>+</sup> PC-Subgruppen-Anteile der NUs und die relative ST6GAL1-Expression (MFI) der IgG<sup>+</sup> PC-Subgruppen von den NUs, sowie von den **(C)** NGs und **(D)** VGs jeweils an t1\* und t3. Die gestrichelten horizontalen Linien zeigen die entsprechende S6GAL1-Expression der PC-Subgruppen von NUs

Teile dieser Arbeit und fortgeführte Analysen dieser Kohorte (wie erwähnt) wurden inzwischen in Lixenfeld et al., 2021, Van Collie et al., 2023 und Buhre et al., 2023 publiziert.

### 4. Diskussion

#### 4.1. Die zweifache mRNA-Impfung mit BNT162b2 induziert eine ausgeprägte initiale IgG-Antwort

Das Ziel einer jeden Impfung besteht darin, einen Immunschutz gegen eine bestimmte Krankheit beziehungsweise einen Erreger aufzubauen. Sie aktiviert den adaptiven Teil des Immunsystems, sodass dieser im Falle eines Kontaktes mit dem Erreger schnell und effizient reagieren kann. Im Optimalfall verleiht die Impfung sterile Immunität, das heißt, sie schützt bereits vor einer Ansteckung und damit Vermehrung des Pathogens, sodass sich die Erkrankung gar nicht erst ausbreiten kann. Alternativ kann man sich aber auch mit einer durch die Impfung generierten schützenden Immunität zufriedengeben, die einen schweren Verlauf der betreffenden Erkrankung verhindert (Wahl und Wardemann, 2022).

Träger der Immunität sind die Immunzellen, darunter B-Gedächtniszellen und zu PCs differenzierte B-Zellen, als Produzenten von Antikörpern. IgG, als häufigster Isotyp im Blut und leicht im Labor nachweisbar wird oft als Schutzkorrelat nach einer Impfung angesehen (Monzon-Posadas et al., 2023; Schroeder und Cavacini, 2010; Yu et al., 2020). Funktional wird meist deren neutralisierendes Potential, sprich die Verhinderung der Anheftung des Pathogens an seinen Rezeptor auf Wirtszellen, beschrieben. Im Kontext der Immunantwort sind weiterhin die IgG-Fc-vermittelten Effektorfunktionen wie ADCC, ADCP und CDC für die Immunantwort entscheidend. Von daher ist es wichtig, nach einer Impfung dem IgG-Titer sowie dessen qualitative Subklassenverteilung zu charakterisieren.

##### 4.1.1. Serum IgG-Titer nach einer und zwei Impfungen

In dieser Arbeit konnten ab Tag zehn nach der ersten Immunisierung mit BNT162b2 anti-S1 IgG-Antikörper im Serum nachgewiesen werden, welche wenige Tage nach der zweiten Impfung (circa 40 Tage nach der ersten Immunisierung) ihr Maximum erreichten, und bis zum Ende des Studienzeitraumes circa einen Monat nach der zweiten Impfung und 70 Tage nach der ersten Impfung langsam wieder sanken (*s. Abbildung 8*). Andere Arbeitsgruppen lieferten ähnliche Ergebnisse. Markewitz et al. (2022) wiesen Serum anti-S1 IgG ab Tag zwölf nach der ersten Immunisierung mit BNT162b2 nach, wobei die Titer in den folgenden zwei Wochen und nach der zweiten Immunisierung signifikant anstiegen. Salvagno et al. (2021)

zeigten einen Anstieg RBD- oder S-spezifischer IgG-Antikörper im Serum zwischen Tag 21 und 50. Langfristige Untersuchungen ergaben einen sinkenden Trend der anti-RBD und -S1 IgG-Antikörper über die Zeit nach der zweiten Impfung (Buhre et al., 2023; Skorupa et al., 2022). Wie in dieser Arbeit ließ sich auch in diesen und einer weiteren Studie (van Coillie, Pongracz, Šuštić et al., 2023) bei VGs nach den Impfungen ein Anstieg von Serum anti-S1 IgG nachweisen, wobei die Titer nach der ersten Impfung, aber nicht mehr nach der zweiten Impfung höher lagen, als bei NGs (Markewitz et al., 2022).

Die Impfung mit BNT162b2 scheint demnach eine spezifische Immunantwort gegen SARS-CoV-2 auszulösen und führte auch bei Vorinfizierten offensichtlich zu einer Re-Aktivierung von Gedächtniszellen. Weiterhin wurde ein positiver Zusammenhang zwischen den hohen initialen Serum anti-S1 IgG-Titern, einem Neutralisationspotenzial dieser IgG-Antikörper und einem Schutz vor COVID-19 wenige Wochen nach zwei Impfungen mit BNT162b2 beschrieben (Monzon-Posadas et al., 2023; Z. Wang et al., 2021).

### **4.1.2. Anti-S1 Speichel IgG - Durch Diffusion aus dem Serum?**

Das SARS-CoV-2 wird vorwiegend über Aerosole übertragen und vermehrt sich in den Atemwegen (Ravi et al., 2022; To et al., 2021). Die erste Schutzbarriere mit dem das Virus also in Kontakt tritt, sind die Schleimhäute der Atemwege. Abwehrmechanismen vor Ort umfassen örtlich ansässige Zellen und Bestandteile des angeborenen Immunsystems, aber auch Zellen des adaptiven Immunsystems, unter anderem in Speichel vorliegende spezifische Antikörper (Murphy und Weaver, 2018g).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten im Speichel geimpfter Proband\*innen anti-S1 IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Die Speichel anti-S1 IgG-Titer korrelierten mit den Serum anti-S1 IgG-Titern (s. *Abbildung 11*). Aktuelle Literatur bestätigt diese Beobachtungen (Guerra et al., 2022; Monzon-Posadas et al., 2023). Die starke Korrelation zwischen Serum und Speichel IgG-Titern lässt vermuten, dass anti-S1 IgG durch Diffusion aus dem Serum in den Speichel gelangt.

Die im Speichel gemessenen Spiegel waren immer niedriger als die im Serum und sanken mit größer werdendem Abstand zur Impfung wie im Blut ab (Madsen et al., 2023; Monzon-Posadas et al., 2023; Pinilla et al., 2021). Sie konnten verschiedene Varianten des

## Diskussion

---

SARS-CoV-2 in vitro neutralisieren, wobei die Speichel IgG-Antikörper von Vorinfizierten ein höheres Neutralisierungspotenzial aufwiesen (Azzi et al., 2022; Guerra et al., 2022).

Zusammenfassend führte die Impfung durch BNT162b2 zwar zu nachweisbarem anti-S1 IgG im Speichel, dessen Nutzen zur tatsächlichen lokalen Bekämpfung und Verbreitung des Virus wird jedoch noch diskutiert. Anti-S IgA-Antikörper konnten in Naiven Geimpften nach den zwei Impfungen ebenfalls nachgewiesen werden. Allerdings waren die anti-S IgA-Titer in Vorinfizierten Ungeimpften und Vorinfizierten Geimpften höher, beziehungsweise blieben länger erhöht (Buhre et al., 2023; Lapuente et al., 2024).

Insgesamt führt die Immunisierung in Naiven Geimpften eher zu einer systemischen Immunantwort, welche geringe IgA- und passive IgG-Auswirkungen auf die Atemwege zu haben scheint. Wahrscheinlich sind die so erreichten Speichel-Antikörper-, insbesondere IgA-Titer, zu niedrig, um eine Ansteckung oder Übertragung zu verhindern. Andere Applikationsformen, insbesondere intranasale Impfungen, werden aktuell erforscht und wurden von Alu et al. (2022) systematisch zusammengefasst. Sie liefern überzeugende Ergebnisse für einen verbesserten Schutz der Schleimhäute, unter anderem durch die Induktion von IgA im Speichel. Könnte man bereits die Übertragung des SARS-CoV-2 vorbeugen, entstünde eine sterile Immunität, welche das Infektionsgeschehen deutlich eingrenzen würde. Möglicherweise könnte eine duale Verabreichungsstrategie, das heißt intramuskulär, kombiniert mit intranasal, verfolgt werden, um einen ganzheitlichen Immunschutz zu erreichen.

### **4.1.3. Kampfstarke IgG-Subklassen dominieren die initial induzierte IgG-Antikörperantwort nach der ersten und zweiten Impfung**

IgG-Antikörper kommen in unterschiedlichen Subklassen vor: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Bei viralen Infektionen entstehen meist vor allem IgG1 und IgG3 (Ferrante et al., 1990). Dabei steigen entsprechend der Reihenfolge im Immunglobulin-Schwerketten-Genlocus (IgG3, IgG1, IgG2, IgG4) in der Regel zunächst die IgG3-, später die IgG1-Titer (Bashirova et al., 2021; Rastawicki et al., 2023). Passend dazu konnten nach der Impfung primär ebensolche Subklassen (IgG1 > IgG3) gegen das S1-Protein beobachtet werden, während weniger anti-S1 IgG2 und IgG4 nur in geringen Mengen kurz nach der zweiten Impfung nachgewiesen wurden. Tatsächlich wurden die höchsten anti-S1 IgG3-Spiegel an Tag 10–20 nach der

ersten Impfung mit BNT162b2 nachgewiesen, während die höchsten IgG1-Titer an Tag 20–40 gemessen wurden. Bei den Vorinfizierten Geimpften zeigten sich besonders hohe anti-S1 Ig1-Titer im Vergleich zu den Naiven Geimpften, während ihre IgG3-Titer schwächer waren und schnell abfielen (*s. Abbildung 9*).

In den ersten Wochen nach der ersten und zweiten Impfung mit BNT162b2 ließen sich also bei VGs und NGs primär SARS-CoV-2-spezifische IgG1- > IgG3-Antikörper nachweisen, wobei IgG3 insbesondere im früheren Verlauf und bei NGs zu finden war (siehe auch Buhre et al., 2023, 2023; Farkash et al., 2021). Bei den beiden Subklassen handelt es sich um die kampfstärksten unter allen IgG-Subklassen. Die proinflammatorischen Subklassen haben in vitro eine hohe Affinität zu aktivierenden FcγRs und C1q und können durch Hexamerbildung niederschwellig eine CDC auslösen (Buhre et al., 2022; de Jong et al., 2016; Melis et al., 2015; G. Wang et al., 2016). Die Immunisierung mit BNT162b2 führt folglich in den ersten Wochen nach zwei verabreichten Dosen zu einer potenten adaptiven humoralen Immunantwort im Blut.

Anti-S1 IgG4 konnte im Untersuchungszeitraum nicht oder nur kaum nach der zweiten Impfung nachgewiesen werden. Diese Subklasse erscheint im Laufe einer Infektion in der Regel als Letzte und im Rahmen wiederholter Exposition mit demselben Antigen (Rastawicki et al., 2023). Studien mit erweitertem Untersuchungszeitraum berichten von einem Abfall von SARS-CoV-2-spezifischen IgG3, und stattdessen einem Anstieg von IgG4 5–7 Monate nach der zweiten und insbesondere dritten Immunisierung mit BNT162b2 (Buhre et al., 2023; Irrgang et al., 2023; Rastawicki et al., 2023). Damit verringert sich die kampfstärke Komponente der spezifischen IgG-Immunantwort zugunsten der weniger kampfstarken Subklasse IgG4. Tatsächlich gilt IgG4 als wenig potent in der Auslösung von Fc-medierten Prozessen, wie ADCC und ADCP (Irrgang et al., 2023). Studien an Mäusen suggerieren, dass das menschliche IgG4-Antikörper sogar die Abwehrfunktionen der potenteren Subklasse IgG1 stören könnten (Lilienthal et al., 2018). Die Rolle von IgG4 im Kontext von Infektionserkrankungen, insbesondere viralen Erkrankungen ist noch kaum erforscht und muss weiter untersucht werden. Anti-S IgG2 war niedriger, blieb aber selbst nach drei BNT162b2-Impfungen konstant oder stieg sogar leicht. Auch zur Rolle von IgG2 im Kampf gegen die Viren müssen in Zukunft weitere Studien Erkenntnisse liefern.

### **4.2. Die Fc-Glykosylierung von IgG1 variiert im Zeitverlauf nach zweifacher Impfung mit BNT162b2**

Die Fc-Glykosylierung von IgG1-Antikörpern hat einen Einfluss auf deren Effektorfunktionen. Im Zeitverlauf bis zu 27–35 Tage nach der zweiten Impfung und damit 70 Tage nach der ersten Immunisierung mit BNT162b2 wurden unterschiedliche IgG1 Fc-Glykosylierungsmuster beobachtet.

#### **4.2.1. Keine langfristige F0-IgG1-Antwort nach Impfung mit BNT162b2**

Antigenspezifisches afukosyliertes (F0)-IgG1 wurde bislang im Kontext von alloimmunen Reaktionen gegen Erythrozyten und Thrombozyten, parasitären Infektionen mit *Plasmodium falciparum* (der auslösende Parasit von *Malaria tropica*), viralen Infektionen mit dem Dengue-Virus, HIV, CMV, HBV, Masernvirus und Mumpsvirus und attenuierten Lebendimpfungen gegen Masern und Mumps nachgewiesen (Larsen, de Graaf et al., 2021; Oosterhoff et al., 2022; Van Coillie, Pongracz, Šuštić et al., 2023). Gemeinsam ist allen diesen Immunreaktionen, dass die Antigene, gegen die F0-IgG1-Antikörper gebildet werden, in eine Membran eingebettet vorliegen (Oosterhoff et al., 2022). Larsen, de Graaf et al. (2021) stellten die Hypothese auf, dass membrangebundene Oberflächen-Proteine eine spezifische B-Zell-Antwort auslösen könnten, die zur Produktion von F0-IgG führt. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese würde das translatierte transmembrane SARS-CoV-2-S-Protein, das im BNT162b2-mRNA-Impfstoff kodiert ist, ebenfalls diese Bedingungen für eine F0-IgG1-Antwort erfüllen. Daher wäre nach einer SARS-CoV-2-Impfung die Bildung von anti-Spike-F0-IgG1-Antikörpern zu erwarten gewesen.

Ein S-spezifischer F0-IgG1 Gipfel (bis zu 17 %) konnte kurzfristig nach der ersten Immunisierung mit BNT162b2 bei NGs nachgewiesen werden, jedoch nicht nach einer zweiten Immunisierung (siehe auch Buhre et al., 2023; Lixenfeld et al., 2021; Van Coillie, Pongracz, Šuštić et al., 2023). Nach der zweiten Impfung blieben die F0-IgG1-Level auch in Folgeuntersuchungen bis 270 Tage nach der ersten Immunisierung bei 2 % (Buhre et al., 2023). Offensichtlich reichte das durch die mRNA kodierte und auf körpereigenen Membranen präsentierte S-Protein aus, um kurzfristige, aber nicht langfristige F0-IgG1 Level zu generieren.

Stattdessen lag der langfristige anti-S F0-IgG1-Anteil der VGs auch in Folgeuntersuchungen bis Tag 270 nach der ersten Immunisierung konstant (4 %) über dem der NGs (s. *Abbildung 12*) (Buhre et al., 2023; Van Coillie, Pongracz, Rahmöller et al., 2023). Das SARS-CoV-2 erfüllt offensichtlich, wenn auch begrenzt, besser die Kriterien für die Generierung von langfristigen anti-S F0-IgG1. Beim Impfstoff könnte im Gegensatz zu einer natürlichen SARS-CoV Infektion ein Ko-Stimulus fehlen, der eine nachhaltige F0-IgG1 Keimzentrumsreaktion auslöst.

Die Funktion von F0-IgG1 wird im Allgemeinen als pathogen beschrieben (T. T. Wang, 2019). Auf molekularer Ebene erhöht die fehlende Kern-Fukosylierung am Fc-Teil von IgG1 die Affinität zu aktivierenden FcγRs, insbesondere FcγRIIIa. Dadurch können FcγRIIIa-medierte Eigenschaften, wie ADCC durch NK-Zellen und, in geringerem Umfang, ADCP durch Monozyten/Makrophagen leichter ausgelöst werden (Golay et al., 2022; Oosterhoff et al., 2022). Einige Studien weisen zudem darauf hin, dass F0-IgG1-vermittelte Zellaktivierung zu einer schnelleren und stärkeren Freisetzung von Zytokinen führt (Golay et al., 2022). Im Kontext der COVID-19 Pandemie wurden besonders hohe initiale F0-IgG1-Titer bei Intensivpatient\*innen nachgewiesen (Chakraborty et al., 2021; Hoepel et al., 2021; Oosterhoff et al., 2022) und waren mit der Produktion inflammatorischer Zytokine assoziiert (Chakraborty et al., 2022). Allerdings muss dazu erwähnt werden, dass neben dem Auftreten von F0-IgG1-Antikörpern weitere ungünstige Faktoren bei diesen Komplikationen auftraten. Im Rahmen von schweren COVID-19 Verläufen wurde auch eine starke Degalaktosylierung (Pongracz et al., 2022) und eine autoreaktive Wirkung (Woodruff et al., 2020, 2022) von IgG1-Antikörpern beschrieben. Daher könnte eine Kombination aus Afukosylierung, Agalaktosylierung und Autoreaktivität zu den starken entzündlichen Effekten bei schwerem COVID-19 beitragen.

Auf der anderen Seite gilt F0-IgG1 bei der Bekämpfung von HIV (Ackerman et al., 2013) und Plasmodium falciparum (Larsen, Lopez-Perez et al., 2021) als protektiv. F0-IgG1-Antikörper gewinnen bei der Bekämpfung von Tumoren ebenfalls an Bedeutung, da ihnen im Vergleich zu fukosylierten IgG1-Antikörpern eine höhere Effektivität, zum Beispiel bei der Aktivierung von NK-Zellen über FcγRIIIa, zugeschrieben wurde (Cohen Saban et al., 2023; Junttila et al., 2010; Pereira et al., 2018).

## Diskussion

---

Zusammenfassend mag in bestimmten Konstellationen die Induktion von F0-IgG1-Antikörpern gefährlich sein, allerdings scheint generell die Induktion von stark pathogenen F0-IgG1-Antikörpern ein erstrebenswertes Ziel für die Bekämpfung von Infektionen zu sein.

Zukünftige Impfstrategien und optimierte mRNA-Technologien könnten darauf ausgerichtet werden, eine langfristige F0-IgG1-Antwort zu erzielen, welche durch den mRNA-Impfstoff nicht erreicht wurde, wohl aber bei Personen beobachtet werden konnten, die vor der ersten Impfung eine SARS-CoV-2 Infektion durchgemacht hatten. Entsprechend müssen zukünftige Arbeiten zeigen, wie F0-IgG1-Antikörper gezielt induziert werden können.

### 4.2.2. Bisection-IgG

Kurz nach der Impfung mit BNT162b2 konnten bei NGs und VGs sinkende anti-S Bisection-IgG1-Anteile beobachtet werden, welche wenige Tage nach der zweiten Impfung ihr Minimum erreichten und bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes wieder anstiegen (*s. Abbildung 13*). Folgeuntersuchungen (Buhre et al., 2023) zeigten einen weiter steigenden Trend bis Tag 270 nach der ersten Impfung (entsprechend bis circa 235 Tage nach der zweiten Impfung). Dabei blieben die anti-S Bisection-IgG1-Anteile der NGs im Mittel unter denen der VGs.

Die Dynamik und insbesondere die Funktion von Bisection-IgG1 ist noch wenig erforscht. Bei der Immunantwort auf Pathogene zeigte sich im Rahmen von Impfungen gegen Influenza und Tetanus ebenfalls eine transiente Abnahme des antigenspezifischen Bisection-IgG1 (Selman et al., 2012; Vestrheim et al., 2014).

Im Kontext von COVID-19 zeigten andere Studien ebenfalls eine wellenförmige Dynamik, mit kurzfristigem Abfall von antigenspezifischem Bisection-IgG1 nach Infektion oder Impfung, die über die Zeit wieder anstieg. Diese im Laufe der Immunantwort unterschiedlich glykosylierten Antikörper könnten von verschiedenen Plasmazellpopulationen generiert worden sein und verschiedene Rollen einnehmen. Die Bedeutung der wellenförmigen Dynamik und der Einfluss von Bisection auf die Funktion von IgG1 bleibt insgesamt noch unklar und sollte weiter erforscht werden.

### 4.2.3. Dynamische Galaktosylierung und Sialylierung des IgG1 nach Impfungen: Ausdruck unterschiedlicher Herkünfte und verschiedener Funktionen

Die Galaktosylierung und Sialylierung des anti-S1 IgG1 folgte im Beobachtungszeitraum einer spiegelbildlichen wellenförmigen Dynamik im Vergleich zum Bisecting. Der Gal- und Sial-IgG1-Anteil stieg kurzfristig nach der ersten Impfung, sank danach wieder, stieg nach der zweiten Impfung erneut an und fiel daraufhin wieder ab (Van Coillie, Pongracz, Rahmüller et al., 2023). Diese Wellenformen wurden in Folgeuntersuchen bis Tag 270 nach der ersten Impfung deutlicher (Buhre et al., 2023, 2024). Die Verläufe der NGs und VGs wiesen dabei keine signifikanten Unterschiede auf (*s. Abbildung 14*) (Buhre et al., 2023; Van Coillie, Pongracz, Rahmüller et al., 2023). Ähnliche dynamische Gal- und Sial-IgG Verläufe konnten auch ansatzweise nach Impfungen gegen Influenza (Selman et al., 2012; T. T. Wang et al., 2015) und Tetanus (Selman et al., 2012) und vor allem nach Immunisierungen von Mäusen (Bartsch et al., 2020) nachgewiesen werden.

Diese wechselnden Glykosylierungsmuster könnten durch eine unterschiedliche Herkunft der Antikörper erklärt werden. Dabei könnten die stark galaktosylierten und sialylierten IgG-Antikörper von extrafollikulären kurzlebigen PCs abstammen, während die G0- und S0-IgG1-Antikörper im späteren Verlauf nach einer Impfung von langlebigen PCs aus der Keimzentrumsreaktion stammen könnten.

Die unter Umständen durch verschiedene PC-Populationen produzierten, verschieden galaktosylierten und sialylierten IgG-Antikörper könnten bei der Bekämpfung von Pathogenen unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Einige Studien sprechen dafür, dass frühe Gal- und Sial-IgG1-Antikörper besser NK-Zellen zu aktivieren scheinen (Zytotoxizität/ADCC) (Boudreau et al., 2023; Jennewein et al., 2019). Außerdem begünstigt Gal-IgG1 (> Sial-IgG1 > G0-IgG1) die IgG1-Hexamerbildung und damit die Interaktion mit dem Sechs-Arm-C1q-Molekül (Farkash et al., 2021; van Osch et al., 2021; Wei et al., 2021). Ferner fördern frühe Sial-IgG1-Antikörper die Affinitätsreifung von IgG, indem sie den Transport von Antigenen in das Keimzentrum begünstigen und über CD23 den inhibierenden FcγRIIb auf B-Zellen hochregulieren, sodass die Aktivierungsschwelle erhöht wird und sich nur noch hochaffine B-Zellen differenzieren können (Lofano et al., 2018; T. T.

## Diskussion

---

Wang et al., 2015). Stattdessen scheinen späte G0- und S0-IgG1-Antikörper, wie bei inflammatorischen Autoimmunerkrankungen, Neutrophile besser aktivieren zu könnten (Clauder et al., 2021; Epp et al., 2018). Dabei scheint eine IgG Afukosylierung eine dominante Wirkung im Vergleich zum Grad der Sialylierung zu haben (T. Li et al., 2017; Saldova et al., 2008; Scallon et al., 2007; Vicente et al., 2022).

In der Einleitung beschriebene widersprüchlich Effekte von Gal- und Sial-IgG1 versus G0-IgG1 im Zusammenhang mit schützenden Effekten gegen Pathogene könnten durch verschiedene zeitliche Analysen des dynamischen Verlaufs der Galaktosylierung und Sialylierung nach jeder Impfung erklärt werden. Antikörper-Analysen von frühen Proben nach einer Impfung geben andere Ergebnisse als späte Proben. Tatsächlich fällt bei der zeitlichen Einordnung von Publikationen zur anti-S IgG1 Glykosylierung auf, dass die jeweiligen Beobachtungen zu dieser Arbeit passen. Kurz nach Infektion und Impfung mit BNT162b2 zeigten sich höhere anti-S IgG1 Sial- und Gal-Anteile, welche daraufhin wieder sanken (Chakraborty et al., 2022; Larsen, de Graaf et al., 2021; Pongracz et al., 2022).

Generell könnten kurz nach einer Impfung oder auch einer Infektion stets der antigenspezifische Gal- und Sial-IgG1-Anteil überwiegen. Diese wahrscheinlich extrafollikulär produzierten IgG1-Antikörper könnten zum einen die Keimzentrumsreaktion anregen, sodass im späteren Verlauf vermehrt affineres, kampfstärkeres IgG1 entsteht. Tatsächlich ließ sich auch noch zwölf Wochen nach der zweiten Immunisierung mit BNT162b2 eine anhaltende Keimzentrumsreaktion nachweisen (Turner et al., 2021). Zum anderen könnten frühe Gal- und Sial-IgG1-Antikörper NK-Zellen und Komplement über C1q aktivieren, was zur akuten Zytotoxizität beitragen könnte.

Auf der anderen Seite könnten späte G0-IgG1-Antikörper dafür verantwortlich sein, das Immunsystem bei Antigenkontakt, zum Beispiel über Neutrophile, zu aktivieren und dadurch zu einer Homöostase beizutragen. Interessanterweise haben weitere Studien gezeigt, dass nach einer dritten SARS-CoV-2-Impfung die Galaktosylierungs- und Sialylierungslevel von IgG1 erneut steigen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Reaktivierung von IgG<sup>+</sup> Gedächtniszellen schnell wieder zur Bildung kurzlebiger Plasmazellen führt (Buhre et al., 2024). Um die genaue Bedeutung der IgG(1)-Galaktosylierung und -Sialylierung zu verstehen, sollten zukünftige Studien insbesondere deren Rolle bei verschiedenen Immunaktivierungen untersuchen.

Zusammenfassend lieferten die Untersuchungen einen ersten Einblick in die Auswirkungen der mRNA-Impfung auf die Fc-Glykosylierung von anti-S IgG1-Antikörpern, was dazu beitragen kann, Impfungen zu verstehen und zu verbessern.

### **4.3. Die zweifache Impfung mit BNT162b2 generiert Spike-spezifische Plasmazellen und auch potenzielle B-Gedächtniszellen**

Wie oben beschrieben, werden kurzlebige IgG-Antikörper wahrscheinlich von extrafollikulären Plasmazellen (PCs) und lang-anhaltende IgG-Titer von keimzentrumsabhängigen langlebigen PCs generiert. Zusätzlich gehört zu einer erfolgreichen Impfung der Generierung von IgG B-Gedächtniszellen (Dörner und Radbruch, 2007; Murphy und Weaver, 2018d; Struck et al., 2021).

Hier wurden frühe Spike-spezifische PCs und B-Gedächtniszellen identifiziert und die PCs zusätzlich charakterisiert.

#### **4.3.1. Frühe PCs und potenzielle B-Gedächtniszellen**

Zunächst konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass die Impfung mit BNT162b2 S1-spezifische B-Zellen induziert, welche vor der Impfung bei den NGs noch nicht nachzuweisen waren (*s. Abbildungen 15 und 16*). Schon circa drei Wochen nach der ersten Immunisierung wurden S1-spezifische CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-/int</sup> potenzielle B-Gedächtniszellen bei den NGs und VGs gefunden. Passend zu der Vermutung, dass es sich bei dieser B-Zell Population um Gedächtniszellen handelt, konnte bei den Vorinfizierten circa drei bis vier Wochen nach der ersten Impfung (t1) ein mehr als doppelt hoher S1-spezifischer IgG<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-/int</sup> Zell-Anteil nachgewiesen werden als bei den NGs (*s. Abbildung 16D*). Durch einen vorherigen Kontakt zum SARS-CoV-2 verfügten diese Individuen wahrscheinlich schon über antigenerfahrene B-Zellen, welche durch die einmalige Impfung zur Expansion und/oder Differenzierung zu B-Gedächtniszellen angeregt wurden. Auch Brewer et al. (2022) konnten drei Wochen nach einmaliger BNT162b2-Immunisierung eine Zunahme IgG<sup>+</sup> SARS-CoV-2-spezifischer B-Gedächtniszellen bestätigen. Die Induktion von B-Gedächtniszellen ist neben der Induktion langlebiger PCs eine Voraussetzung des humoralen immunologischen Gedächtnisses (Sette und Crotty, 2021), um einen langfristigen Schutz gegen COVID-19 aufrechtzuerhalten. Tatsächlich konnten weitere Studien auch noch bis zu sechs Monate nach zweifacher Impfung mit BNT162b2 B-

## Diskussion

---

Gedächtniszellen im Blut von NGs in vergleichbarer Anzahl zu natürlich Infizierten nachweisen (Fryer et al., 2022; Kim et al., 2022), sodass von einer nachhaltigen Immunantwort ausgegangen werden kann.

PCs sind in der Regel nur vorübergehend in der Zirkulation zu finden (Schultz, 2022). Passend dazu konnten 7–14 Tage nach der ersten Impfung ( $t1^*$ ) und 5–8 Tage nach der zweiten Impfung ( $t3$ ) jeweils S1-spezifische  $CD19^{int/+}CD38^{++}$  PCs nachgewiesen werden (s. *Abbildung 17*), während 27–35 Tage nach der zweiten Impfung ( $t4$ ) kaum noch PCs im Blut zu finden waren (nicht gezeigt). Wahrscheinlich handelt es sich hierbei überwiegend um kurzlebige PCs. Die langlebigen PCs verweilen in sogenannten Überlebensnischen, darunter das Knochenmark und die rote Pulpa der Milz (Khodadadi et al., 2019; Lightman et al., 2019; Manz et al., 1997). Nach der zweiten Immunisierung konnte bei den NGs eine Zunahme an  $IgG^+$  PCs verzeichnet werden (s. *Abbildung 17*). Die vermehrte Differenzierung von S1-spezifischen  $IgM$  B-Zellen zu  $IgG^+$  PCs könnte den Anstieg erklären.

Die Sequenzierung des B-Zell-Rezeptors zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung mit BNT162b2 zeigte im Verlauf einen Switch kreuzreaktiver  $IgM$  B-Zellen zu spezifischeren  $IgG^+$  und  $IgA^+$  B-Zellen. (Kramer et al., 2022). Zusätzlich könnte im Rahmen eines zweiten Kontaktes mit dem S1 Antigen (zweite Impfung) ein Teil der  $IgG$  B-Gedächtniszellen zu kurzlebigen, nachweisbaren  $IgG^+$  PCs differenziert sein.

Zusammenfassend führte die Impfung mit BNT162b2 zur Induktion von S1-spezifischen PCs und B-Gedächtniszellen.

### 4.3.2. Stammen $CD27^+$ PCs von B-Gedächtniszellen ab?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die potenziell kurzlebigen  $CD19^{int/+}CD38^{++}$  PCs weiter in vier Subpopulationen unterteilt, die die Oberflächenmarker  $CD27$  und  $CD138$  unterschiedlich stark exprimierten.

Dabei fiel auf, dass VGs insbesondere nach der ersten Impfung einen höheren Anteil an  $CD27^+IgG^+S1^+$  PCs aufwiesen, während die NGs vorwiegend  $CD27^{-/int}CD138^{-/int}IgG^+S1^+$  PCs zeigten (s. *Abbildung 18*). Die unterschiedliche Expression der Marker könnte auf eine unterschiedliche Herkunft dieser PC-Subgruppen hindeuten. Da die VGs bereits im Rahmen ihrer zurückliegenden SARS-CoV-2 Infektion Kontakt zu dem S1-Protein hatten, konnten sich dabei bereits B-Gedächtniszellen ausbilden (s. *Abbildung 16*), welche generell überwiegend

in Keimzentrumsreaktionen entstehen (Viant et al., 2021; Weisel et al., 2016). Durch die von BNT162b2 erneut hervorgerufene Stimulation mit dem S-Antigen könnte ein Teil dieser Zellen womöglich re-aktiviert werden, um dann zu potenziell kurzlebigen PCs zu differenzieren. Interessanterweise wird CD27 in der Literatur insbesondere als Gedächtnismarker beschrieben (Agematsu et al., 2000; Grimsholm, 2023; Sanz et al., 2008). Eine von Tang et al. (2021) bei VGs im Vergleich zu NGs beschriebene höhere Antikörper-Affinität gegenüber RBD, Teil des SARS-CoV-2-S-Proteins, könnte von Keimzentrums-generierten langlebigen PCs als auch von reaktivierten Keimzentrums-abhängigen kurzlebigen PCs ausgehen.

Alternativ könnte es sich bei den höheren Anteilen an CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>S1<sup>+</sup> PC bei VGs um langlebige PCs handeln, die nach erneutem Antigenkontakt aus Ihren Nischen in die Blutzirkulation abgegeben werden. Beide Möglichkeiten schließen sich außerdem nicht gegenseitig aus, so dass die CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>S1<sup>+</sup> PC auch aus beiden Quellen stammen könnten.

### 4.3.3. CD138<sup>+</sup> PCs als Produzenten von Sial-IgG?

Die Glykoanalysen der anti-S IgG1-Antikörper haben den dynamischen Verlauf der Galaktosylierung und Sialylierung gezeigt, mit höheren Gal- und Sial-IgG1-Anteilen kurz nach einer Impfung, die über die Zeit abnahmen. Im Folgenden war es wichtig zu verstehen, welche PC-Subpopulationen Sial-IgG1 generieren. Aktuelle Fachliteratur schlägt vor, dass verschiedene PC-Subpopulationen IgG- und IgG1-Glykane unterschiedlich prozessieren und so antigenspezifische, aber auch zwischen den Menschen variierende Glykosylierungsmuster erklären könnten (Omtvedt et al., 2006; J. Wang et al., 2011). Durch variable Expression der für die Modifikation der Zuckerketten zuständigen Enzyme könnten diverse IgG-Glykomuster entstehen.

ST6GAL1 katalysiert die Sialylierung der Zuckerkette am Fc-Teil von IgG. Die höchste ST6GAL1-Expression wurde bei allen Proband\*innen-Gruppen zu allen Zeitpunkten in der CD27<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> PC-Gruppe nachgewiesen. Die zweithöchste ST6GAL1-Expression fand sich in der CD27<sup>-/int</sup>CD138<sup>+</sup> PC-Subpopulation (*s. Abbildung 19*). Nahe liegt die Vermutung, dass vor allem CD138-positive PCs für die Produktion hoch sialylierter Antikörper zuständig sind. Um diese Hypothese zu bestätigen, könnte man in Zukunft diese Zellen isolieren und deren sezernierte Antikörper untersuchen.

## Diskussion

---

Wie bereits in Kapitel 1.2.3.4. erwähnt, wird aktuell über den Ort der IgG-Sialylierung diskutiert. Einerseits könnte IgG durch eine lösliche ST6GAL1 B-Zell unabhängig sialyliert werden (Jones et al., 2016; Oswald et al., 2022), was jedoch durch Werner und Nimmerjahn (2022) angezweifelt wurde. Zunehmende Befunde sprechen für eine B-Zell-intrinsische Sialylierung (Hess et al., 2013; Nimmerjahn et al., 2023; Schaffert et al., 2020; T. T. Wang, 2019).

Die hier generierten Daten sprechen für die Möglichkeit, dass CD138<sup>+</sup> PCs insbesondere für die Generierung von Sial-IgG1 verantwortlich sind.

### 5. Zusammenfassung

Im Rahmen der COVID-19 Pandemie wurden die ersten mRNA-Impfstoffe, darunter BNT162b2, Ende 2020/ Anfang 2021 für den Menschen zugelassen. BNT162b2 kodiert für das SARS-CoV-2-Spike- (S-) Protein und wird intramuskulär verabreicht. Um einen effektiven und nachhaltigen humoralen Schutz gegen das SARS-CoV-2 zu gewährleisten, sollte das Vakzin spezifische Antikörper und B-Gedächtniszellen generieren.

Neben der neutralisierenden Fab-vermittelten Effektorfunktion von Immunglobulin G (IgG) Antikörpern, wird die Fc-vermittelte Effektorfunktion von IgG-Antikörpern von deren Subklasse (IgG1–4) und deren Art der Fc-N-Glykosylierung beeinflusst. Die konservierte Glykan-Kernstruktur am Asparagin 297 im Fc-Teil kann durch Anknüpfung von Fukose, Bisection N-Acetylglucosamin, Galaktose und Sialinsäure modifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die initiale anti-S IgG-Subklassenantwort und die anti-S IgG1 Fc-Glykosylierung sowie die S-spezifische B-Zell-Antwort bis zu einem Monat nach der zweiten mRNA-Vakzinierung zu untersuchen. Ein besonderer Fokus sollte dabei auf die IgG-Subklassenverteilung, die Entstehung von nicht-fukosylierten IgG-Antikörpern, die ein großes pathogenes Potenzial durch Ihre hohe Affinität zu aktivierenden Fc-gamma-Rezeptoren (FcγRs), zum Beispiel auf NK-Zellen, besitzen, und die Entstehung verschiedener S-spezifischer Plasmazellpopulationen und B-Gedächtniszellen gelegt werden.

Hierzu wurden im Studienzeitraum Anfang 2021 von insgesamt **i)** 25 Naiven Geimpften (keine SARS-CoV-2 Infektion vor der ersten Impfung), **ii)** neun Vorinfizierten Geimpften und **iii)** zwei SARS-CoV-2 Vorinfizierten Ungeimpften zu mehreren Zeitpunkten, und zur Kontrolle von **iv)** sechs akut Infizierten Ungeimpften und **v)** 26 Naiven Ungeimpften Serum-, Vollblut- und Speichelproben untersucht.

Für die Bestimmung der anti-S IgG-Subklassen-Level im Serum und der anti-S IgG-Level im Speichel wurden spezifische ELISA-Protokolle entwickelt. Die anti-S IgG-Glykopeptidanalyse erfolgte in Kooperation über LC-MS (Liquid chromatography-mass spectrometry). Für die S-spezifische B-Zell-Analyse aus Vollblut wurde ein S-spezifisches Färbeprotokoll für die Analyse im Durchflusszytometer entwickelt, das auch die Bestimmung des

## Zusammenfassung

---

Expressionslevels der alpha-2,6-Sialyltransferase (ST6GAL1) in Plasmazellen ermöglichte, welche Sialinsäure an IgG-Antikörper knüpft.

Nach jeder Impfung dominierten sowohl bei den Naiven Geimpften als auch bei den Vorinfizierten Geimpften im Serum die kampfstarken Subklassen IgG1 und IgG3, die über eine hohe Affinität zu aktivierenden FcγRs und dem Komplementprotein C1q potente Effektorfunktionen auslösen können. Die anti-S IgG2 Level waren niedriger und anti-S IgG4 trat nur in geringen Mengen nach der zweiten Impfung auf. Im Speichel konnte in beiden Impfgruppen kurz nach der zweiten Impfung ebenfalls S-spezifisches IgG nachgewiesen werden.

Nur bei den Naiven Geimpften zeigte sich vorübergehend nach der ersten Immunisierung ein erhöhter Anteil (circa 8 %, mit einem Maximum von 16,3 %) an nicht- (a)fukosyliertem (F0) anti-S IgG1, der nach der zweiten Impfung konstant bei etwa 2 % lag. Vorinfizierte Geimpfte wiesen hingegen einen stabilen konstanten Anteil von circa 4 % afukosyliertem anti-S IgG1 auf.

Die Anteile an galaktosyliertem und sialyliertem anti-S IgG1 waren in beiden Impfgruppen kurz nach jeder Impfung sehr hoch, fielen jedoch nach der zweiten Impfung über die Zeit tendenziell ab. In Kombination mit Impfdaten aus Mäusestudien könnte dies darauf hindeuten, dass stärker galaktosylierte und sialylierte IgG1-Antikörper von frühen extrafollikulären Plasmazellen stammen, während weniger galaktosylierte und sialylierte IgG1-Antikörper langlebigen Plasmazellen zuzuordnen sind. Dies legt nahe, dass kurz- und langlebige, unterschiedlich glykosylierte IgG-Antikörper möglicherweise verschiedene Funktionen erfüllen.

In beiden Impfgruppen konnten IgG-positive S-spezifische Plasmazellen (CD19<sup>int/+</sup>CD38<sup>++</sup>) und B-Gedächtniszellen (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-/int</sup>) im Blut detektiert werden. Ein bis zwei Wochen nach der ersten Impfung wiesen die S-spezifischen Plasmazellen bei Naiven Geimpften vor allem einen CD27<sup>-/int</sup>CD138<sup>-/int</sup> Phänotyp, während sie bei Vorinfizierten Geimpften einen CD27<sup>+</sup>CD138<sup>-/int</sup> Phänotyp zeigten. Zukünftige Untersuchungen sollten klären, ob CD27<sup>+</sup> Plasmazellen von B-Gedächtniszellen stammen könnten. Die höchste ST6GAL1-Expression wurde in CD138<sup>+</sup> Plasmazellen festgestellt, die daher für die Generierung sialylierter IgG1-Antikörper verantwortlich sein könnten. Auch dies sollte weiter erforscht werden.

## **Zusammenfassung**

---

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur initialen humoralen Immunantwort auf den mRNA-Impfstoff BNT162b2 könnten dazu beitragen, in Zukunft neue effektive Impfstoffstrategien zu entwickeln, beispielsweise unter der Einbeziehung der Generierung von F0-IgG1-Antikörpern.

### 6. Literaturverzeichnis

Ackerman ME, Crispin M, Yu X, Baruah K, Boesch AW, Harvey DJ, Dugast A-S, Heizen EL, Ercan A, Choi I, Streeck H, Nigrovic PA, Bailey-Kellogg C, Scanlan C, Alter G (2013). Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 123, 2183–2192.

Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A (2000). CD27: A memory B-cell marker. *Immunology Today*, 21, 204–206.

Alameh M-G, Tombácz I, Bettini E, Lederer K, Ndeupen S, Sittplangkoon C, Wilmore JR, Gaudette BT, Soliman OY, Pine M, Hicks P, Manzoni TB, Knox JJ, Johnson JL, Laczkó D, Muramatsu H, Davis B, Meng W, Rosenfeld AM, Strohmeier S, Lin PJC, Mui BL, Tam YK, Karikó K, Jacquet A, Krammer F, Bates P, Cancro MP, Weissman D, Luning Prak ET, Allman D, Igyártó BZ, Locci M, Pardi N (2021). Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity*, 54, 2877-2892.e7.

Altmann DM, Boyton RJ (2022). COVID-19 vaccination: The road ahead. *Science*, 375, 1127–1132.

Alu A, Chen L, Lei H, Wei Y, Tian X, Wei X (2022). Intranasal COVID-19 vaccines: From bench to bed. *EBioMedicine*, 76, 103841.

Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, Ravetch JV (2011). Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature*, 475, 110–113.

Azzi L, Dalla Gasperina D, Veronesi G, Shallak M, Ietto G, Iovino D, Baj A, Gianfagna F, Maurino V, Focosi D, Maggi F, Ferrario MM, Dentali F, Carcano G, Tagliabue A, Maffioli LS, Accolla RS, Forlani G (2022). Mucosal immune response in BNT162b2 COVID-19 vaccine recipients. *EBioMedicine*, 75, 103788.

Bartsch YC, Eschweiler S, Leliavski A, Lunding HB, Wagt S, Petry J, Lilienthal G-M, Rahmöller J, de Haan N, Hölscher A, Erapanedi R, Giannou AD, Aly L, Sato R, de Neef LA, Winkler A, Braumann D, Hobusch J, Kuhnigk K, Krémer V, Steinhaus M, Blanchard V, Gemoll T, Habermann JK, Collin M, Salinas G, Manz RA, Fukuyama H, Korn T, Waisman A, Yogev N, Huber S, Rabe B, Rose-John S, Busch H, Berberich-Siebelt F, Hölscher C, Wuhrer M, Ehlers M (2020). IgG Fc sialylation is regulated during the germinal center reaction following immunization with different adjuvants. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146, 652-666.e11.

Bashirova AA, Zheng W, Akdag M, Augusto DG, Vince N, Dong KL, O’hUigin C, Carrington M (2021). Population-specific diversity of the immunoglobulin constant heavy G chain (IGHG) genes. *Genes & Immunity*, 22, 327–334.

Biswas S, Mandal G, Payne KK, Anadon CM, Gatenbee CD, Chaurio RA, Costich TL, Moran C, Harro CM, Rigolizzo KE, Mine JA, Trillo-Tinoco J, Sasamoto N, Terry KL, Marchion D, Buras A, Wenham RM, Yu X, Townsend MK, Tworoger SS, Rodriguez PC, Anderson AR, Conejo-Garcia JR (2021). IgA transcytosis and antigen recognition govern ovarian cancer immunity. *Nature*, 591, 7850.

Boudreau CM, Burke JS, Yousif AS, Sangesland M, Jastrzebski S, Verschoor C, Kuchel G, Lingwood D, Kleanthous H, De Bruijn I, Landolfi V, Sridhar S, Alter G (2023). Antibody-mediated NK cell activation as a correlate of immunity against influenza infection. *Nature Communications*, 14, 5170.

Boune S, Hu P, Epstein AL, Khawli LA (2020). Principles of N-Linked Glycosylation Variations of IgG-Based Therapeutics: Pharmacokinetic and Functional Considerations. *Antibodies*, 9, 2.

Bournazos S, Vo HTM, Duong V, Auerswald H, Ly S, Sakuntabhai A, Dussart P, Cantaert T, Ravetch JV (2021). Antibody fucosylation predicts disease severity in secondary dengue infection. *Science (New York, N.Y.)*, 372, 1102–1105.

Brewer RC, Ramadoss NS, Lahey LJ, Jahanbani S, Robinson WH, Lanz TV (2022). BNT162b2 vaccine induces divergent B cell responses to SARS-CoV-2 S1 and S2. *Nature Immunology*, 23, 33–39.

Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daëron M (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113, 3716–3725.

Buhre JS, Becker M, Ehlers M (2022). IgG subclass and Fc glycosylation shifts are linked to the transition from pre- to inflammatory autoimmune conditions. *Frontiers in Immunology*, 13, 1006939.

Buhre JS, Pongracz T, Geisen UM, Schubert M, Wang W, Nouta J, Obara M, Lehrian S, Rahmüller J, Petry J, Tran F, Schreiber S, Sümbül M, Berner D, Gerdes S, Schirmer J, Longardt AC, Hoff P, Kalinke U, Ludwig RJ, Bartsch YC, Hoyer BF, Wuhler M, Ehlers M (2024). Anti-TNF therapy impairs both short- and long-term IgG responses after repeated vaccination. *Allergy*.

Buhre JS, Pongracz T, Künsting I, Lixenfeld AS, Wang W, Nouta J, Lehrian S, Schmelter F, Lunding HB, Dühning L, Kern C, Petry J, Martin EL, Föh B, Steinhaus M, von Kopylow V, Sina C, Graf T, Rahmüller J, Wuhler M, Ehlers M (2023). mRNA vaccines against SARS-CoV-2 induce comparably low long-term IgG Fc galactosylation and sialylation levels but increasing long-term IgG4 responses compared to an adenovirus-based vaccine. *Frontiers in Immunology*, 13, 1020844.

Burki T (2023). First shared SARS-CoV-2 genome: GISAID vs virological.org. *The Lancet. Microbe*, 4, e395.

Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, Bos NA, Johnsen HE, Orfao A, Perez-Andres M (2010). Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138– and CD138+ plasma cells. *Haematologica*, 95, 1016–1020.

Chakraborty S, Gonzalez J, Edwards K, Mallajosyula V, Buzzanco AS, Sherwood R, Buffone C, Kathale N, Providenza S, Xie MM, Andrews JR, Blish CA, Singh U, Dugan H, Wilson PC, Pham TD, Boyd SD, Nadeau KC, Pinsky BA, Zhang S, Memoli MJ, Taubenberger JK, Morales T, Schapiro JM, Tan GS, Jagannathan P, Wang TT (2021). Proinflammatory IgG Fc structures in patients with severe COVID-19. *Nature Immunology*, 22, 67–73.

Chakraborty S, Gonzalez JC, Sievers BL, Mallajosyula V, Chakraborty S, Dubey M, Ashraf U, Cheng BY-L, Kathale N, Tran KQT, Scallan C, Sinnott A, Cassidy A, Chen ST, Gelbart T, Gao F, Golan Y, Ji X, Kim-Schulze S, Pahl M, Gaw SL, Gnjjatic S, Marron TU, Merad M, Arunachalam PS, Boyd SD, Davis MM, Holubar M, Khosla C, Maecker HT, Maldonado Y, Mellins ED, Nadeau KC, Pulendran B, Singh U, Subramanian A, Utz PJ, Sherwood R, Zhang S, Jagannathan P, Tan GS, Wang TT (2022). Early non-neutralizing, afucosylated antibody responses are associated with COVID-19 severity. *Science Translational Medicine*, 14, eabm7853.

Chen Z, Gao X, Yu D (2022). Longevity of vaccine protection: Immunological mechanism, assessment methods, and improving strategy. *VIEW*, 3, 20200103.

## Anhänge

---

Clauder A-K, Kordowski A, Bartsch YC, Köhl G, Lilienthal G-M, Almeida LN, Lindemann T, Petry J, Rau CN, Gramalla-Schmitz A, Dühring L, Elbracht C, Kenno S, Tillmann J, Wuhrer M, Ludwig RJ, Ibrahim SM, Bieber K, Köhl J, Ehlers M, Manz RA (2021). IgG Fc N-Glycosylation Translates MHCII Haplotype into Autoimmune Skin Disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 141, 285–294.

Clemente-Suárez VJ, Navarro-Jiménez E, Moreno-Luna L, Saavedra-Serrano MC, Jimenez M, Simón JA, Tornero-Aguilera JF (2021). The Impact of the COVID-19 Pandemic on Social, Health, and Economy. *Sustainability*, 13, 11.

Cobb BA (2020). The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiology*, 30, 202–213.

Cohen Saban N, Yalin A, Landsberger T, Salomon R, Alva A, Feferman T, Amit I, Dahan R (2023). Fc glycoengineering of a PD-L1 antibody harnesses Fcγ receptors for increased antitumor efficacy. *Science Immunology*, 8, eadd8005.

Collin M, Ehlers M (2013). The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. *Experimental Dermatology*, 22, 511–514.

Cossarizza A, Chang H, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, Bacher P, Barnaba V, Battistini L, Bauer WM, Baumgart S, Becher B, Beisker W, Berek C, Blanco A, Borsellino G, Boulais PE, Brinkman RR, Büscher M, Busch DH, Bushnell TP, Cao X, Cavani A, Chattopadhyay PK, Cheng Q, Chow S, Clerici M, Cooke A, Cosma A, Cosmi L, Cumano A, Dang VD, Davies D, Biasi S, Del Zotto G, Della Bella S, Dellabona P, Deniz G, Dessing M, Diefenbach A, Di Santo J, Dieli F, Dolf A, Donnenberg VS, Dörner T, Ehrhardt GRA, Endl E, Engel P, Engelhardt B, Esser C, Everts B, Dreher A, Falk CS, Fehniger TA, Filby A, Fillatreau S, Follo M, Förster I, Foster J, Foulds GA, Frenette PS, Galbraith D, Garbi N, García-Godoy MD, Geginat J, Ghoreschi K, Gibellini L, Goettlinger C, Goodyear CS, Gori A, Grogan J, Gross M, Grützkau A, Grummitt D, Hahn J, Hammer Q, Hauser AE, Haviland DL, Hedley D, Herrera G, Herrmann M, Hiepe F, Holland T, Hombrink P, Houston JP, Hoyer BF, Huang B, Hunter CA, Iannone A, Jäck H, Jávega B, Jonjic S, Juelke K, Jung S, Kaiser T, Kalina T, Keller B, Khan S, Kienhöfer D, Kroneis T, Kunkel D, Kurts C, Kvistborg P, Lannigan J, Lantz O, Larbi A, LeibundGut-Landmann S, Leipold MD, Levings MK, Litwin V, Liu Y, Lohoff M, Lombardi G, Lopez L, Lovett-Racke A, Lubberts E, Ludewig B, Lugli E, Maecker HT, Martrus G, Matarese G, Maueröder C, McGrath M, McInnes I, Mei HE, Melchers F, Melzer S, Mielenz D, Mills K, Mirrer D, Mjösberg J, Moore J, Moran B, Moretta A, Moretta L, Mosmann TR, Müller S, Müller W, Münz C, Multhoff G, Munoz LE, Murphy KM, Nakayama T, Nasi M, Neudörfl C, Nolan J, Nourshargh S, O'Connor J, Ouyang W, Oxenius A, Palankar R, Panse I, Peterson P, Peth C, Petriz J, Philips D, Pickl W, Piconese S, Pinti M, Pockley AG, Podolska MJ, Pucillo C, Quataert SA, Radstake TRDJ, Rajwa B, Rebhahn JA, Recktenwald D, Remmerswaal EBM, Rezvani K, Rico LG, Robinson JP, Romagnani C, Rubartelli A, Ruckert B, Ruland J, Sakaguchi S, Sala-de-Oyanguren F, Samstag Y, Sanderson S, Sawitzki B, Scheffold A, Schiemann M, Schildberg F, Schimisky E, Schmid SA, Schmitt S, Schober K, Schüler T, Schulz AR, Schumacher T, Scotta C, Shankey TV, Shemer A, Simon A, Spidlen J, Stall AM, Stark R, Stehle C, Stein M, Steinmetz T, Stockinger H, Takahama Y, Tarnok A, Tian Z, Toldi G, Tornack J, Traggiai E, Trotter J, Ulrich H, Der Braber M, Lier RAW, Veldhoen M, Vento-Asturias S, Vieira P, Voehringer D, Volk H, Volkman K, Waisman A, Walker R, Ward MD, Warnatz K, Warth S, Watson JV, Watzl C, Wegener L, Wiedemann A, Wienands J, Willimsky G, Wing J, Wurst P, Yu L, Yue A, Zhang Q, Zhao Y, Ziegler S, Zimmermann J (2017). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies \*. *European Journal of Immunology*, 47, 1584–1797.

Davies, J., Jiang, L., Pan, L. Z., LaBarre, M. J., Anderson, D., Reff, M (2001). Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnology and Bioengineering*, 74, 288-294.

de Haan N, Reiding KR, Krištić J, Hipgrave Ederveen AL, Lauc G, Wuhrer M (2017). The N-Glycosylation of Mouse Immunoglobulin G (IgG)-Fragment Crystallizable Differs Between IgG Subclasses and Strains. *Frontiers in Immunology*, 8, 608.

de Jong RN, Beurskens FJ, Verploegen S, Strumane K, Kampen MD van, Voorhorst M, Horstman W, Engelberts PJ, Oostindie SC, Wang G, Heck AJR, Schuurman J, Parren PWHI (2016). A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLOS Biology*, 14, e1002344.

Dekkers G, Rispens T, Vidarsson G (2018). Novel Concepts of Altered Immunoglobulin G Galactosylation in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9, 553.

Dekkers G, Treffers L, Plomp R, Bentlage AEH, de Boer M, Koeleman CAM, Lissenberg-Thunnissen SN, Visser R, Brouwer M, Mok JY, Matlung H, van den Berg TK, van Esch WJE, Kuijpers TW, Wouters D, Rispens T, Wuhrer M, Vidarsson G (2017). Decoding the Human Immunoglobulin G-Glycan Repertoire Reveals a Spectrum of Fc-Receptor- and Complement-Mediated-Effector Activities. *Frontiers in Immunology*, 8, 877.

Dolgin E (2021). The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*, 597, 318–324.

Dörner T, Radbruch A (2007). Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity*, 27, 384–392.

Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler A-K, Rizzi M (2014). B cell Biology: An Overview. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14, 434.

Epp A, Hobusch J, Bartsch YC, Petry J, Lilienthal G-M, Koeleman CAM, Eschweiler S, Möbs C, Hall A, Morris SC, Braumann D, Engellenner C, Bitterling J, Rahmüller J, Leliavski A, Thurmann R, Collin M, Moremen KW, Strait RT, Blanchard V, Petersen A, Gemoll T, Habermann JK, Petersen F, Nandy A, Kahlert H, Hertl M, Wuhrer M, Pfützner W, Jappe U, Finkelman FD, Ehlers M (2018). Sialylation of IgG antibodies inhibits IgG-mediated allergic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 141, 399-402.e8.

Falck D, Jansen BC, de Haan N, Wuhrer M (2017). High-Throughput Analysis of IgG Fc Glycopeptides by LC-MS. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1503, 31–47.

Farkash I, Feferman T, Cohen-Saban N, Avraham Y, Morgenstern D, Mayuni G, Barth N, Lustig Y, Miller L, Shouval DS, Biber A, Kirgner I, Levin Y, Dahan R (2021). Anti-SARS-CoV-2 antibodies elicited by COVID-19 mRNA vaccine exhibit a unique glycosylation pattern. *Cell Reports*, 37, 110114.

Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. (1990). IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 9, 16-24.

Ferrara C, Brünker P, Suter T, Moser S, Püntener U, Umaña P (2006). Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: Influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 851–861.

Fink K (2012). Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Frontiers in Immunology*, 3, 78.

Flevaris K, Kontoravdi C (2022). Immunoglobulin G N-glycan Biomarkers for Autoimmune Diseases: Current State and a Glycoinformatics Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 9.

## Anhänge

---

Fryer HA, Hartley GE, Edwards ESJ, O’Hehir RE, van Zelm MC (2022). Humoral immunity and B-cell memory in response to SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Biochemical Society Transactions*, 50, 1643–1658.

Golay J, Andrea AE, Cattaneo I (2022). Role of Fc Core Fucosylation in the Effector Function of IgG1 Antibodies. *Frontiers in Immunology*, 13, 929895.

Goulet DR, Atkins WM (2020). Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 109, 74–103.

Grimsholm O (2023). CD27 on human memory B cells-more than just a surface marker. *Clinical and Experimental Immunology*, 213, 164–172.

Gudelj I, Lauc G, Pezer M (2018). Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology*, 333, 65–79.

Guerra ENS, de Castro VT, Amorim dos Santos J, Acevedo AC, Chardin H (2022). Saliva is suitable for SARS-CoV-2 antibodies detection after vaccination: A rapid systematic review. *Frontiers in Immunology*, 13, 1006040.

Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V (2022). SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1716.

Hardenbrook NJ, Zhang P (2022). A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Current Opinion in Virology*, 52, 123–134.

Hess C, Winkler A, Lorenz AK, Holeccka V, Blanchard V, Eiglmeier S, Schoen A-L, Bitterling J, Stoehr AD, Petzold D, Schommartz T, Mertes MMM, Schoen CT, Tiburzy B, Herrmann A, Köhl J, Manz RA, Madaio MP, Berger M, Wardemann H, Ehlers M (2013). T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. *The Journal of Clinical Investigation*, 123, 3788–3796.

Hodoniczky J, Zheng YZ, James M David C (2005). Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnology Progress*, 21, 1644–1652.

Hoepel W, Chen H-J, Geyer CE, Allahverdiyeva S, Manz XD, de Taeye SW, Aman J, Mes L, Steenhuis M, Griffith GR, Bonta PI, Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K, Golebski K, Jonkers RE, Larsen MD, Linty F, Nouta J, van Roomen CPAA, van Baarle FEHP, van Drunen CM, Wolbink G, Vlaar APJ, de Bree GJ, Sanders RW, Willemsen L, Neele AE, van de Beek D, Rispens T, Wuhler M, Bogaard HJ, van Gils MJ, Vidarsson G, de Winther M, den Dunnen J (2021). High titers and low fucosylation of early human anti-SARS-CoV-2 IgG promote inflammation by alveolar macrophages. *Science Translational Medicine*, eabf8654.

Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews. Microbiology*, 19, 141–154.

Irrgang P, Gerling J, Kocher K, Lapuente D, Steininger P, Habenicht K, Wytopil M, Beileke S, Schäfer S, Zhong J, Ssebyatika G, Krey T, Falcone V, Schülein C, Peter AS, Nganou-Makamdop K, Hengel H, Held J, Bogdan C, Überla K, Schober K, Winkler TH, Tenbusch M (2023). Class switch toward noninflammatory, spike-specific IgG4 antibodies after repeated SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Science Immunology*, 8, eade2798.

Jackson KJL, Wang Y, Collins AM (2014). Human immunoglobulin classes and subclasses show variability in VDJ gene mutation levels. *Immunology & Cell Biology*, 92, 729–733.

- Jain S, Venkataraman A, Wechsler ME, Peppas NA (2021). Messenger RNA-based vaccines: Past, present, and future directions in the context of the COVID-19 pandemic. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 179, 114000.
- Jansen BC, Falck D, de Haan N, Hipgrave Ederveen AL, Razdorov G, Lauc G, Wuhrer M (2016). LaCyTools: A Targeted Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Data Processing Package for Relative Quantitation of Glycopeptides. *Journal of Proteome Research*, 15, 2198–2210.
- Jennewein MF, Goldfarb I, Dolatshahi S, Cosgrove C, Noelette FJ, Krykbaeva M, Das J, Sarkar A, Gorman MJ, Fischinger S, Boudreau CM, Brown J, Cooperrider JH, Aneja J, Suscovich TJ, Graham BS, Lauer GM, Goetghebuer T, Marchant A, Lauffenburger D, Kim AY, Riley LE, Alter G (2019). Fc Glycan-Mediated Regulation of Placental Antibody Transfer. *Cell*, 178, 202–215.e14.
- Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P (2000). Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 52, 240–248.
- Jones MB, Oswald DM, Joshi S, Whiteheart SW, Orlando R, Cobb BA (2016). B-cell-independent sialylation of IgG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 7207–7212.
- Junttila TT, Parsons K, Olsson C, Lu Y, Xin Y, Theriault J, Crocker L, Pabonan O, Baginski T, Meng G, Totpal K, Kelley RF, Sliwkowski MX (2010). Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Cancer Research*, 70, 4481–4489.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R (2002). Effector and memory T-cell differentiation: Implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 2, 4.
- Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 313, 670–673.
- Kapur R, Kustiawan I, Vestrheim A, Koeleman CAM, Visser R, Einarsdottir HK, Porcelijn L, Jackson D, Kumpel B, Deelder AM, Blank D, Skogen B, Killie MK, Michaelsen TE, de Haas M, Rispens T, van der Schoot CE, Wuhrer M, Vidarsson G (2014). A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood*, 123, 471–480.
- Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, McDonald JU, Orr SJ, Berger M, Petzold D, Blanchard V, Winkler A, Hess C, Reid DM, Majoul IV, Strait RT, Harris NL, Köhl G, Wex E, Ludwig R, Zillikens D, Nimmerjahn F, Finkelman FD, Brown GD, Ehlers M, Köhl J (2012). Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nature Medicine*, 18, 9.
- Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F (2019). The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 721.
- Kiaie SH, Majidi Zolbanin N, Ahmadi A, Bagherifar R, Valizadeh H, Kashanchi F, Jafari R (2022). Recent advances in mRNA-LNP therapeutics: Immunological and pharmacological aspects. *Journal of Nanobiotechnology*, 20, 276.
- Kim W, Zhou JQ, Horvath SC, Schmitz AJ, Sturtz AJ, Lei T, Liu Z, Kalaidina E, Thapa M, Alsoussi WB, Haile A, Klebert MK, Suessen T, Parra-Rodriguez L, Mudd PA, Whelan SPJ, Middleton WD, Teefey SA, Pusic I, O’Halloran JA, Presti RM, Turner JS, Ellebedy AH (2022). Germinal centre-driven maturation of B cell response to mRNA vaccination. *Nature*, 604, 141–145.

## Anhänge

---

King HAD, Dussupt V, Mendez-Rivera L, Slike BM, Tran U, Jackson ND, Barkei E, Zemil M, Tourtellott-Fogt E, Kuklis CH, Soman S, Ahmed A, Porto M, Kitajewski C, Spence B, Benetiene D, Wiczorek L, Kar S, Gromowski G, Polonis VR, Krebs SJ, Modjarrad K, Bolton DL (2023). Convalescent human IgG, but not IgM, from COVID-19 survivors confers dose-dependent protection against SARS-CoV-2 replication and disease in hamsters. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1138629.

Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, *85*, 104502.

Kobashi Y, Shimazu Y, Kawamura T, Nishikawa Y, Omata F, Kaneko Y, Kodama T, Tsubokura M (2022). Peak IgG antibody titers against SARS-CoV-2 spike protein following immunization with the Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccine. *Fukushima Journal of Medical Science*, *68*, 67–70.

Kramer KJ, Wilfong EM, Voss K, Barone SM, Shiakolas AR, Raju N, Roe CE, Suryadevara N, Walker LM, Wall SC, Paulo A, Schaefer S, Dahunsi D, Westlake CS, Crowe JE, Carnahan RH, Rathmell JC, Bonami RH, Georgiev IS, Irish JM (2022). Single-cell profiling of the antigen-specific response to BNT162b2 SARS-CoV-2 RNA vaccine. *Nature Communications*, *13*, 3466.

Kurosaki T, Kometani K, Ise W (2015). Memory B cells. *Nature Reviews. Immunology*, *15*, 149–159.

Lamb YN (2021). BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. *Drugs*, *81*, 495–501.

Lapunte D, Winkler TH, Tenbusch M (2024). B-cell and antibody responses to SARS-CoV-2: Infection, vaccination, and hybrid immunity. *Cellular and Molecular Immunology*, *21*, 144–158.

Larsen MD, de Graaf EL, Sonneveld ME, Plomp HR, Nouta J, Hoepel W, Chen H-J, Linty F, Visser R, Brinkhaus M, Šuštić T, de Taeye SW, Bentlage AEH, Toivonen S, Koeleman CAM, Sainio S, Kootstra NA, Brouwer PJM, Geyer CE, Derksen NIL, Wolbink G, de Winther M, Sanders RW, van Gils MJ, de Bruin S, Vlaar APJ, Amsterdam UMC COVID-19, biobank study group, Rispens T, den Dunnen J, Zaaijer HL, Wuhrer M, Ellen van der Schoot C, Vidarsson G (2021). Afucosylated IgG characterizes enveloped viral responses and correlates with COVID-19 severity. *Science*, *371*, eabc8378.

Larsen MD, Lopez-Perez M, Dickson EK, Ampomah P, Tuikue Ndam N, Nouta J, Koeleman CAM, Ederveen ALH, Mordmüller B, Salanti A, Nielsen MA, Massougbody A, van der Schoot CE, Ofori MF, Wuhrer M, Hviid L, Vidarsson G (2021). Afucosylated Plasmodium falciparum-specific IgG is induced by infection but not by subunit vaccination. *Nature Communications*, *12*, 1.

Li T, DiLillo DJ, Bournazos S, Giddens JP, Ravetch JV, Wang L-X (2017). Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*, 3485–3490.

Li W, Liang L, Liao Q, Li Y, Zhou Y (2022). CD38: An important regulator of T cell function. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *153*, 113395.

Lightman SM, Utley A, Lee KP (2019). Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Frontiers in Immunology*, *10*, 965.

Lilienthal G-M, Rahmüller J, Petry J, Bartsch YC, Leliavski A, Ehlers M (2018). Potential of Murine IgG1 and Human IgG4 to Inhibit the Classical Complement and Fcγ Receptor Activation Pathways. *Frontiers in Immunology*, *9*, 958.

- Lixenfeld AS, Künsting I, Martin EL, Kopylow V von, Lehrian S, Lunding HB, Buhre JS, Quack J, Steinhaus M, Graf T, Ehlers M, Rahmüller J (2021). The BioNTech / Pfizer vaccine BNT162b2 induces class-switched SARS-CoV-2-specific plasma cells and potential memory B cells as well as IgG and IgA serum and IgG saliva antibodies upon the first immunization. *medRxiv*.
- Lofano G, Gorman MJ, Yousif AS, Yu W-H, Fox JM, Dugast A-S, Ackerman ME, Suscovich TJ, Weiner J, Barouch D, Streeck H, Little S, Smith D, Richman D, Lauffenburger D, Walker BD, Diamond MS, Alter G (2018). Antigen-specific antibody Fc glycosylation enhances humoral immunity via the recruitment of complement. *Science Immunology*, 3, eaat7796.
- Madsen JR, Holm BE, Pérez-Alós L, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Fogh K, Pries-Heje MM, Møller DL, Hansen CB, Heftdal LD, Hasselbalch RB, Hamm SR, Frikke-Schmidt R, Hilsted L, Nielsen SD, Iversen KK, Bundgaard H, Garred P (2023). Short-Lived Antibody-Mediated Saliva Immunity against SARS-CoV-2 after Vaccination. *Microbiology Spectrum*, 11, e04947-22.
- Mahan AE, Jennewein MF, Suscovich T, Dionne K, Tedesco J, Chung AW, Streeck H, Pau M, Schuitemaker H, Francis D, Fast P, Laufer D, Walker BD, Baden L, Barouch DH, Alter G (2016). Antigen-Specific Antibody Glycosylation Is Regulated via Vaccination. *PLoS Pathogens*, 12, e1005456.
- Manz RA, Thiel A, Radbruch A (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*, 388, 6638.
- Markewitz R, Pauli D, Dargvainiene J, Steinhagen K, Engel S, Herbst V, Zapf D, Krüger C, Sharifzadeh S, Schomburg B, Leyboldt F, Rupp J, Görg S, Junker R, Wandinger K-P (2022). The temporal course of T- and B-cell responses to vaccination with BNT162b2 and mRNA-1273. *Clinical Microbiology and Infection*, 28, 701–709.
- Matsuzaki K, Sugimoto N, Islam R, Hossain ME, Sumiyoshi E, Katakura M, Shido O (2020). Salivary Immunoglobulin A Secretion and Polymeric Ig Receptor Expression in the Submandibular Glands Are Enhanced in Heat-Acclimated Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 815.
- Mehta AS, Long RE, Comunale MA, Wang M, Rodemich L, Krakover J, Philip R, Marrero JA, Dwek RA, Block TM (2008). Increased levels of galactose-deficient anti-Gal immunoglobulin G in the sera of hepatitis C virus-infected individuals with fibrosis and cirrhosis. *Journal of Virology*, 82, 1259–1270.
- Melis JPM, Strumane K, Ruuls SR, Beurskens FJ, Schuurman J, Parren PWHI (2015). Complement in therapy and disease: Regulating the complement system with antibody-based therapeutics. *Molecular Immunology*, 67, 117–130.
- Meng X, Wang F, Gao X, Wang B, Xu X, Wang Y, Wang W, Zeng Q (2022). Association of IgG N-glycomics with prevalent and incident type 2 diabetes mellitus from the paradigm of predictive, preventive, and personalized medicine standpoint. *EPMA Journal*, 14, 1–20.
- Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A (2022). The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*, 375, 1122–1127.
- Monzon-Posadas WO, Zorn J, Peters K, Baum M, Proksch H, Schlüter CB, Menting T, Pušnik J, Streeck H (2023). Longitudinal monitoring of mRNA-vaccine-induced immunity against SARS-CoV-2. *Frontiers in Immunology*, 14, 1066123.
- Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ (2010). Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical and Experimental Immunology*, 162, 271–279.
- Murphy K, Weaver C (2018a). Grundbegriffe der Immunologie. In: Murphy K, Weaver C (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 9. Aufl., 3–46, Springer, Berlin.

## Anhänge

---

- Murphy K, Weaver C (2018b). Die T-Zell-vermittelte Immunität. In: Murphy K, Weaver C (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 9. Aufl., 443–504, Springer, Berlin.
- Murphy K, Weaver C (2018c). Die humorale Immunantwort. In: Murphy K, Weaver C (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 9. Aufl., 517–570, Springer, Berlin.
- Murphy K, Weaver C (2018d). Die Dynamik der angeborenen und adaptiven Immunantwort. In: Murphy K, Weaver C (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 9. Aufl., 581–630, Springer, Berlin.
- Murphy K, Weaver C (2018e). Antigenerkennung durch B-Zell- und T-Zell-Rezeptoren. In: Murphy K, Weaver C (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 9. Aufl., 177–213, Springer, Berlin.
- Murphy K, Weaver C (2018f). Die Entstehung von Antigenrezeptoren in Lymphozyten. In: Murphy K, Weaver C (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 9. Aufl., 221–263, Springer, Berlin.
- Murphy K, Weaver C (2018g). Das mucosale Immunsystem. In: Murphy K, Weaver C (Hrsg.): *Janeway Immunologie*. 9. Aufl., 641–681, Springer, Berlin.
- Nicholson LB (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60, 275–301.
- Nimmerjahn F, G V, Ms C (2023). Effect of posttranslational modifications and subclass on IgG activity: From immunity to immunotherapy. *Nature Immunology*, 24, 1244–1255.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8, 1.
- Omtvedt LA, Royle L, Husby G, Sletten K, Radcliffe CM, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM (2006). Glycan analysis of monoclonal antibodies secreted in deposition disorders indicates that subsets of plasma cells differentially process IgG glycans. *Arthritis and Rheumatism*, 54, 3433–3440.
- Oosterhoff JJ, Larsen MD, van der Schoot CE, Vidarsson G (2022). Afucosylated IgG responses in humans – structural clues to the regulation of humoral immunity. *Trends in Immunology*, 43, 800–814.
- Oswald DM, Lehoux SD, Zhou JY, Glendenning LM, Cummings RD, Cobb BA (2022). ST6Gal1 in plasma is dispensable for IgG sialylation. *Glycobiology*, 32, 803–813.
- Pereira NA, Chan KF, Lin PC, Song Z (2018). The „less-is-more“ in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *mAbs*, 10, 693–711.
- Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, Fiebiger B-M, Ravetch JV (2014). Type-I and Type-II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature immunology*, 15, 707–716.
- Pinilla YT, Heinzel C, Caminada L-F, Consolaro D, Esen M, Kreamsner PG, Held J, Kreidenweiss A, Fendel R (2021). SARS-CoV-2 Antibodies Are Persisting in Saliva for More Than 15 Months After Infection and Become Strongly Boosted After Vaccination. *Frontiers in Immunology*, 12, 798859.
- Pitoiset F, Cassard L, El Soufi K, Boselli L, Grivel J, Roux A, Klatzmann D, Chaput N, Rosenzweig M (2018). Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses. *Cytometry Part A*, 93, 793–802.
- Pongracz T, Nouta J, Wang W, Meijgaarden KE van, Linty F, Vidarsson G, Joosten SA, Ottenhoff THM, Hokke CH, Vries JJC de, Arbous SM, Roukens AHE, Wuhrer M (2022). Immunoglobulin G1 Fc glycosylation as an early hallmark of severe COVID-19. *eBioMedicine*, 78, 103957.

- Pulendran B, S. Arunachalam P, O'Hagan DT (2021). Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20, 6.
- Quast I, Keller CW, Maurer MA, Giddens JP, Tackenberg B, Wang L-X, Münz C, Nimmerjahn F, Dalakas MC, Lünemann JD (2015). Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *The Journal of Clinical Investigation*, 125, 4160–4170.
- Randall TD, Brewer JW, Corley RB (1992). Direct evidence that J chain regulates the polymeric structure of IgM in antibody-secreting B cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 18002–18007.
- Rastawicki W, Gierczyński R, Zasada AA (2023). Comparison of Kinetics of Antibody Avidity and IgG Subclasses' Response in Patients with COVID-19 and Healthy Individuals Vaccinated with the BNT162B2 (Comirnaty, Pfizer/BioNTech) mRNA Vaccine. *Viruses*, 15, 970.
- Ravi V, Saxena S, Panda PS. (2022). Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 40, 182–186.
- Recke A, Sitaru C, Vidarsson G, Evensen M, Chiriac MT, Ludwig RJ, Zillikens D (2010). Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: Induction of dermal-epidermal separation. *Journal of Autoimmunity*, 34, 435–444.
- Recke A, Trog LM, Pas HH, Vorobyev A, Abadpour A, Jonkman MF, van Zandbergen G, Kauderer C, Zillikens D, Vidarsson G, Ludwig RJ (2014). Recombinant human IgA1 and IgA2 autoantibodies to type VII collagen induce subepidermal blistering ex vivo. *Journal of Immunology*, 193, 1600–1608.
- Regev-Yochay G, Lustig Y, Joseph G, Gilboa M, Barda N, Gens I, Indenbaum V, Halpern O, Katz-Likovnik S, Levin T, Kanaaneh Y, Asraf K, Amit S, Rubin C, Ziv A, Koren R, Mandelboim M, Tokayer NH, Meltzer L, Doolman R, Mendelson E, Alroy-Preis S, Kreiss Y (2023). Correlates of protection against COVID-19 infection and intensity of symptomatic disease in vaccinated individuals exposed to SARS-CoV-2 in households in Israel (ICoFS): A prospective cohort study. *The Lancet Microbe*, 4, e309–e318.
- Saldova R, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM (2008). Glycosylation Changes on Serum Glycoproteins in Ovarian Cancer May Contribute to Disease Pathogenesis. *Disease markers*, 25, 219–232.
- Salvagno GL, Henry BM, di Piazza G, Pighi L, de Nitto S, Bragantini D, Gianfilippi GL, Lippi G (2021). Anti-spike S1 IgA, anti-spike trimeric IgG, and anti-spike RBD IgG response after BNT162b2 COVID-19 mRNA vaccination in healthcare workers. *Journal of Medical Biochemistry*, 40, 327–334.
- Sanz I, Wei C, Lee FE-H, Anolik J (2008). Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology*, 20, 67–82.
- Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cai AN, Raju TS (2007). Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular Immunology*, 44, 1524–1534.
- Schaffert A, Hanić M, Novokmet M, Zaytseva O, Krištić J, Lux A, Nitschke L, Peipp M, Pezer M, Hennig R, Rapp E, Lauc G, Nimmerjahn F (2020). Minimal B Cell Extrinsic IgG Glycan Modifications of Pro- and Anti-Inflammatory IgG Preparations in vivo. *Frontiers in Immunology*, 10, 3024.
- Schroeder HW, Cavacini L (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125, 41–52.
- Schultz C (2022). The Plasma Cell. *General Internal Medicine and Clinical Innovations*, 7.

## Anhänge

---

Selman MHJ, de Jong SE, Soonawala D, Kroon FP, Adegnika AA, Deelder AM, Hokke CH, Yazdanbakhsh M, Wuhrer M (2012). Changes in Antigen-specific IgG1 Fc N-glycosylation Upon Influenza and Tetanus Vaccination. *Molecular & Cellular Proteomics*, *11*, M111.014563.

Selman MHJ, McDonnell LA, Palmblad M, Ruhaak LR, Deelder AM, Wuhrer M (2010). Immunoglobulin G Glycopeptide Profiling by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *82*, 1073–1081.

Sette A, Crotty S (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, *184*, 861–880.

Sheikh AA, Groom JR (2020). Transcription tipping points for T follicular helper cell and T-helper 1 cell fate commitment. *Cellular & Molecular Immunology*, *18*, 3.

Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 3466–3473.

Siddiqui S, Alhamdi HWS, Alghamdi HA (2022). Recent Chronology of COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Public Health*, *10*, 778037.

Siekman SL, Pongracz T, Wang W, Nouta J, Kremsner PG, da Silva-Neto PV, Esen M, Kreidenweiss A, Held J, Trapé ÁA, Fendel R, de Miranda Santos IKF, Wuhrer M, ImmunoCovid Consortium, Amorim AP de, Argolo JGM, Barbieri R de CC, Dias-Baruffi M, Bastos VAF, Bonat VLD, Cardoso CR de B, Carmona-Garcia I, Carvalho JCS de, Constant LF, Degiovani AM, Dias CFSL, Faccioli LH, Feitosa MR, Feres O, Fernandes APM, Fernandes TM, Fraga-Silva TFC, Fuzo C, Guarneri IC, Milanezi CM, Garbato CT, Gaspar GG, Júnior ÁAF, Maruyama SR, Nepomuceno DC, Neto NT, Oliveira CNS, Ostini FM, Parra RS, Pérez MM, Pimentel VE, Porcel G da S, Rocha JJR da, Rodrigues LC, Russo EMS, Silva DP da, Silva RC da, Sorgi CA, Souza COS, Toro DM, Viana AL, Vilar FC, Xavier AC, Zapparoli K (2022). The IgG glycome of SARS-CoV-2 infected individuals reflects disease course and severity. *Frontiers in Immunology*, *13*, 993354.

Skorupa M, Szczepanek J, Goroncy A, Jarkiewicz-Tretyn J, Ptaszyńska B, Rajewski P, Koper W, Pałgan K, Tretyn A (2022). The Dynamics of Changes in the Concentration of IgG against the S1 Subunit in Polish Healthcare Workers in the Period from 1 to 12 Months after Injection, Including Four COVID-19 Vaccines. *Vaccines*, *10*, 506.

Sondermann P, Pincetic A, Maamary J, Lammens K, Ravetch JV (2013). General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*, 9868–9872.

St. Germain R, Bossard EL, Corey L, Sholukh AM (2023). Serum concentration of antigen-specific IgG can substantially bias interpretation of antibody-dependent phagocytosis assay readout. *iScience*, *26*, 107527.

Struck F, Schreiner P, Staschik E, Wochinz-Richter K, Schulz S, Soutschek E, Motz M, Bauer G (2021). Vaccination versus infection with SARS-CoV-2: Establishment of a high avidity IgG response versus incomplete avidity maturation. *Journal of Medical Virology*, *93*, 6765–6777.

Tang J, Grubbs G, Lee Y, Huang C, Ravichandran S, Forgacs D, Golding H, Ross TM, Khurana S (2021). Antibody affinity maturation and cross-variant activity following SARS-CoV-2 mRNA vaccination: Impact of prior exposure and sex. *EBioMedicine*, *74*, 103748.

Temming AR, Dekkers G, van de Bovenkamp FS, Plomp HR, Bentlage AEH, Szittner Z, Derksen NIL, Wuhrer M, Rispens T, Vidarsson G (2019). Human DC-SIGN and CD23 do not interact with human IgG. *Scientific Reports*, *9*, 9995.

Teo A, Tan HD, Loy T, Chia PY, Chua CLL (2023). Understanding antibody-dependent enhancement in dengue: Are afucosylated IgG1s a concern? *PLOS Pathogens*, *19*, e1011223.

Thomann M, Schlothauer T, Dashivets T, Malik S, Avenal C, Bulau P, Rüger P, Reusch D (2015). In Vitro Glycoengineering of IgG1 and Its Effect on Fc Receptor Binding and ADCC Activity. *PLOS ONE*, *10*, e0134949.

To KK-W, Sridhar S, Chiu KH-Y, Hung DL-L, Li X, Hung IF-N, Tam AR, Chung TW-H, Chan JF-W, Zhang AJ-X, Cheng VC-C, Yuen K-Y (2021). Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. *Emerging Microbes & Infections*, *10*, 507–535.

Turner JS, Benet ZL, Grigorova IL (2020). Signals 1, 2 and B cell fate or: Where, when and for how long? *Immunological Reviews*, *296*, 9–23.

Turner JS, O'Halloran JA, Kalaidina E, Kim W, Schmitz AJ, Zhou JQ, Lei T, Thapa M, Chen RE, Case JB, Amanat F, Rauseo AM, Haile A, Xie X, Klebert MK, Suessen T, Middleton WD, Shi P-Y, Krammer F, Teefey SA, Diamond MS, Presti RM, Ellebedy AH (2021). SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature*, *596*, 109–113.

Bundesministerium für Gesundheit (2023). Impfdashboard.de.: *Übersicht zum Impfstatus*. <https://impfdashboard.de/> (Tag des Zugriffs: 27.11.2024).

Vaccari M, Gordon SN, Fourati S, Schifanella L, Liyanage NPM, Cameron M, Keele BF, Shen X, Tomaras GD, Billings E, Rao M, Chung AW, Dowell KG, Bailey-Kellogg C, Brown EP, Ackerman ME, Vargas-Inchaustegui DA, Whitney S, Doster MN, Binello N, Pegu P, Montefiori DC, Foulds K, Quinn DS, Donaldson M, Liang F, Loré K, Roederer M, Koup RA, McDermott A, Ma Z-M, Miller CJ, Phan TB, Forthal DN, Blackburn M, Caccuri F, Bissa M, Ferrari G, Kalyanaraman V, Ferrari MG, Thompson D, Robert-Guroff M, Ratto-Kim S, Kim JH, Michael NL, Phogat S, Barnett SW, Tartaglia J, Venzon D, Stablein DM, Alter G, Sekaly R-P, Franchini G (2016). Adjuvant-dependent innate and adaptive immune signatures of risk of SIVmac251 acquisition. *Nature medicine*, *22*, 762–770.

Van Coillie J, Pongracz T, Rahmöller J, Chen H-J, Geyer CE, van Vught LA, Buhre JS, Šuštić T, van Osch TLJ, Steenhuis M, Hoepel W, Wang W, Lixenfeld AS, Nouta J, Keijzer S, Linty F, Visser R, Larsen MD, Martin EL, Künsting I, Lehrian S, von Kopylow V, Kern C, Lunding HB, de Winther M, van Mourik N, Rispens T, Graf T, Slim MA, Minnaar RP, Bomers MK, Sikkens JJ, Vlaar APJ, van der Schoot CE, den Dunnen J, Wuhrer M, Ehlers M, Vidarsson G, Antinori S, Bassoli C, Bestetti G, Corbellino M, Covizzi A, Lupo A, Milazzo L, Schiuma M, Torre A, Appelman B, van de Beek D, Bomers MK, de Brabander J, Brouwer MC, Buis DTP, Chekrouni N, van Gils MJ, de Jong MD, Lavell AHA, van Mourik N, Olie SE, Peters EJG, Reijnders TDY, Schinkel M, Schuurman AR, Sikkens JJ, Slim MA, Smulders YM, Vlaar APJ, van Vught LA, Wiersinga JW (2023). The BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccine induces transient afucosylated IgG1 in naive but not in antigen-experienced vaccinees. *eBioMedicine*, *87*, 104408.

Van Coillie J, Pongracz T, Šuštić T, Wang W, Nouta J, Le Gars M, Keijzer S, Linty F, Cristianawati O, Keijzer JBD, Visser R, van Vught LA, Slim MA, van Mourik N, Smit MJ, Sander A, Schmidt DE, Steenhuis M, Rispens T, Nielsen MA, Mordmüller BG, Vlaar APJ, Ellen van der Schoot C, Roozendaal R, Wuhrer M, Vidarsson G (2023). Comparative analysis of spike-specific IgG Fc glycoprofiles elicited by adenoviral, mRNA, and protein-based SARS-CoV-2 vaccines. *iScience*, *26*, 107619.

van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T, Rombouts Y (2016). The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *The Journal of Immunology*, *196*, 1435–1441.

## Anhänge

---

van Osch TLJ, Nouta J, Derksen NIL, van Mierlo G, van der Schoot CE, Wuhrer M, Rispens T, Vidarsson G (2021). Fc Galactosylation Promotes Hexamerization of Human IgG1, Leading to Enhanced Classical Complement Activation. *The Journal of Immunology*, 207, 1545–1554.

Velounias RL, Tull TJ (2022). Human B-cell subset identification and changes in inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 210, 201–216.

Verbeke R, Lentacker I, De Smedt SC, Dewitte H (2021). The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *Journal of Controlled Release*, 333, 511–520.

Vestrheim AC, Moen A, Egge-Jacobsen W, Reubsæet L, Halvorsen TG, Bratlie DB, Paulsen BS, Michaelsen TE (2014). A pilot study showing differences in glycosylation patterns of IgG subclasses induced by pneumococcal, meningococcal, and two types of influenza vaccines. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2, 76–91.

Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M (2018). Understanding modern-day vaccines: What you need to know. *Annals of Medicine*, 50, 110–120.

Viant C, Wirthmiller T, ElTanbouly MA, Chen ST, Kara EE, Cipolla M, Ramos V, Oliveira TY, Stamatatos L, Nussenzweig MC (2021). Germinal center–dependent and –independent memory B cells produced throughout the immune response. *The Journal of Experimental Medicine*, 218, e20202489.

Vicente MM, Alves I, Gaifem J, Rodrigues CS, Fernandes Â, Dias AM, Štambuk J, Petrović T, Oliveira P, Ferreira-da-Silva F, Soares A, Seixas N, Teixeira T, Malheiro L, Abreu MM, Lauc G, Sarmiento E Castro R, Pinho SS (2022). Altered IgG glycosylation at COVID-19 diagnosis predicts disease severity. *European Journal of Immunology*, 52, 946–957.

Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 5, 520.

Wahl I, Wardemann H (2022). Sterilizing immunity: Understanding COVID-19. *Immunity*, 55, 2231.

Wang G, de Jong RN, van den Bremer ETJ, Beurskens FJ, Labrijn AF, Ugurlar D, Gros P, Schuurman J, Parren PWHI, Heck AJR (2016). Molecular Basis of Assembly and Activation of Complement Component C1 in Complex with Immunoglobulin G1 and Antigen. *Molecular Cell*, 63, 135–145.

Wang J, Balog CIA, Stavenhagen K, Koeleman CAM, Scherer HU, Selman MHJ, Deelder AM, Huizinga TWJ, Toes REM, Wuhrer M (2011). Fc-Glycosylation of IgG1 is Modulated by B-cell Stimuli. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10, M110.004655.

Wang K, Wei G, Liu D (2012). CD19: A biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology*, 1, 36.

Wang TT (2019). IgG Fc Glycosylation in Human Immunity. *Current topics in microbiology and immunology*, 423, 63–75.

Wang TT, Maamary J, Tan GS, Bournazos S, Davis CW, Krammer F, Schlesinger SJ, Palese P, Ahmed R, Ravetch JV (2015). Anti-HA Glycoforms Drive B Cell Affinity Selection and Determine Influenza Vaccine Efficacy. *Cell*, 162, 160–169.

Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Barnes CO, Finkin S, Schaefer-Babajew D, Cipolla M, Gaebler C, Lieberman JA, Oliveira TY, Yang Z, Abernathy ME, Huey-Tubman KE, Hurley A, Turroja M, West KA, Gordon K, Millard KG, Ramos V, Silva JD, Xu J, Colbert RA, Patel R, Dizon J, Unson-O’Brien C, Shimeliovich I, Gazumyan A, Caskey M, Bjorkman PJ, Casellas R, Hatziioannou T, Bieniasz PD,

Nussenzweig MC (2021). mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature*, 592, 616–622.

Wei B, Gao X, Cadang L, Izadi S, Liu P, Zhang H-M, Hecht E, Shim J, Magill G, Pabon JR, Dai L, Phung W, Lin E, Wang C, Whang K, Sanchez S, Oropeza Jr J, Camperi J, Zhang J, Sandoval W, Zhang YT, Jiang G (2021). Fc galactosylation follows consecutive reaction kinetics and enhances immunoglobulin G hexamerization for complement activation. *mAbs*, 13, 1893427.

Weisel FJ, Zuccarino-Catania GV, Chikina M, Shlomchik MJ (2016). A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity*, 44, 116–130.

Werner A, Nimmerjahn F (2022). Response to Oswald et al.: ST6Gal1 in plasma is dispensable for IgG sialylation. *Glycobiology*, 32, 917–918.

Woodruff MC, Ramonell RP, Haddad NS, Anam FA, Rudolph ME, Walker TA, Truong AD, Dixit AN, Han JE, Cabrera-Mora M, Runnstrom MC, Bugrovsky R, Hom J, Connolly EC, Albizua I, Javia V, Cashman KS, Nguyen DC, Kyu S, Singh Saini A, Piazza M, Tipton CM, Khosroshahi A, Gibson G, Martin GS, Maier CL, Esper A, Jenks SA, Lee FE-H, Sanz I (2022). Dysregulated naive B cells and de novo autoreactivity in severe COVID-19. *Nature*, 611, 139–147.

Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS, Ley AM, Kyu S, Howell JC, Ozturk T, Lee S, Suryadevara N, Case JB, Bugrovsky R, Chen W, Estrada J, Morrison-Porter A, Derrico A, Anam FA, Sharma M, Wu HM, Le SN, Jenks SA, Tipton CM, Staitieh B, Daiss JL, Ghosn E, Diamond MS, Carnahan RH, Crowe JE, Hu WT, Lee FE-H, Sanz I (2020). Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nature Immunology*, 21, 1506–1516.

World Health Organization (2020). *WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19*. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (Tag des Zugriffs: 27.11.2024).

World Health Organization (2024a). *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c> (Tag des Zugriffs: 27.11.2024).

World Health Organization (2024b). *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c> (Tag des Zugriffs: 27.11.2024).

World Health Organization (2024c). *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. <https://data.who.int/dashboards/covid19/vaccines?n=c> (Tag des Zugriffs: 27.11.2024).

Yu J, Song Y, Tian W (2020). How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *Journal of Hematology & Oncology*, 13, 45.

Zhang Z, Mateus J, Coelho CH, Dan JM, Moderbacher CR, Gálvez RI, Cortes FH, Grifoni A, Tarke A, Chang J, Escarrega EA, Kim C, Goodwin B, Bloom NI, Frazier A, Weiskopf D, Sette A, Crotty S (2022). Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines. *Cell*, 185, 2434-2451.e17.

Zhang Z, Shah B, Richardson J (2019). Impact of Fc N-glycan sialylation on IgG structure. *mAbs*, 11, 1381–1390.

# Anhänge

## 7. Anhänge

### 7.1. Proband\*innen

Tabelle A1: Übersicht über alle Studienteilnehmer\*innen und Probeentnahme-Zeitpunkte

Proband*in	Alter (Jahre) am 01.01. 2021	Geschlecht	SARS-CoV-2 positiv	Tage zwischen 1. und 2. Impfung	Tage der Serum- und Vollblut-Entnahme nach 1. (2.) Impfung	Tage der Speichel-Entnahme nach 1. (2.) Impfung
<b>Naive Geimpfte (NGs)</b>						
1	31-40	männlich	nein	35	-2, 22, 40 (5), 70 (35)	36 (1)
2	21-30	weiblich	nein	35	0, 24, 41 (6), 65 (30)	36 (1)
3	41-50	weiblich	nein	35	0, 23, 31, 41 (5), 64 (28)	/
4	21-30	weiblich	nein	35	0, 23, 42 (7), 64 (29)	/
5	31-40	weiblich	nein	35	0, 23, 41 (6), 64 (29)	36 (1)
6	21-30	weiblich	nein	35	0, 31, 41 (6), 64 (29)	/
7	31-40	weiblich	nein	35	0, 31, 42 (7)	36 (1)
8	21-30	männlich	nein	35	0, 24, 41 (6), 64 (29)	36 (1)
9	41-50	männlich	nein	35	0, 23, 42 (7), 64 (29)	/
10	31-40	männlich	nein	35	0, 23, 41 (6), 64 (29)	36 (1)
11	51-60	männlich	nein	34	0, 23, 42 (8), 64 (30)	35
12	21-30	weiblich	nein	35	0, 41 (6), 63 (28)	35
13	41-50	männlich	nein	35	0, 23, 41 (6), 63 (28)	35
14	31-40	männlich	nein	35	0, 23, 40 (5), 64 (29)	35
15	21-30	männlich	nein	35	0, 23, 43 (8), 64 (29)	35
16	51-60	männlich	nein	35	0, 30, 41 (6), 63 (28)	/
17	21-30	weiblich	nein	/	4, 14, 21	20
18	21-30	weiblich	nein	34	9, 17, 24, 37 (3), 50 (16)	17
19	21-30	weiblich	nein	/	6, 12	6
20	41-50	männlich	nein	/	13 (nur Vollblut)	/
21	41-50	weiblich	nein	/	13 (nur Vollblut)	/

<b>22</b>	31-40	männlich	nein	/	13 (nur Vollblut)	/
<b>23</b>	31-40	weiblich	nein	/	10, 14 (nur Vollblut)	/
<b>24</b>	21-30	weiblich	nein	/	11 (nur Vollblut)	/
<b>25</b>	11-20	männlich	nein	/	10 (nur Vollblut)	/
<i>Anzahl:</i> <i>hl:</i> <i>25</i>	<i>34,8</i>	<i>48,0 %</i> <i>männlich</i>				<i>Anzahl: 14</i>
<b>Vorinfizierte Geimpfte (VGs)</b>						
<b>26</b>	21-30	männlich	ja (> 150 Tage vor 1. Impfung)	35	-2, 22, 29, 40 (5), 62 (27)	35
<b>27</b>	21-30	weiblich	ja (> 150 Tage vor 1. Impfung)	35	0, 22, 30, 40 (5), 63 (28)	35
<b>28</b>	31-40	weiblich	ja (> 150 Tage vor 1. Impfung)	/	10 (nur Vollblut)	/
<b>29</b>	51-60	männlich	ja (> 150 Tage vor 1. Impfung)	/	9 (nur Vollblut)	/
<b>30</b>	51-60	weiblich	ja (> 150 Tage vor 1. Impfung)	35	40 (5) (nur Vollblut)	/
<b>31</b>	61-70	männlich	ja (> 150 Tage vor 1. Impfung)	32	40 (8) (nur Vollblut)	/
<b>32</b>	71-80	weiblich	ja (> 150 Tage vor 1. Impfung)	/	8 (nur Vollblut)	/
<b>33</b>	41-50	männlich	ja (> 150 Tage vor 1. Impfung)	/	7 (nur Vollblut)	/
<b>34</b>	31-40	weiblich	ja (> 150 Tage vor 1. Impfung)	/	7 (nur Vollblut)	/
<i>Anzahl:</i> <i>hl: 9</i>	<i>Durchschnitt:</i> <i>49,3</i>	<i>44,4 %</i> <i>männlich</i>				<i>Anzahl: 2</i>
<b>Vorinfizierte Ungeimpfte (VUs)</b>						
<b>35</b>	21-30	weiblich	ja	/	25 Tage nach positiver PCR	/
<b>36</b>	21-30	weiblich	ja	/	30 Tage nach positiver PCR	/

## Anhänge

<i>Anza</i> <i>hl: 2</i>	<i>Durchs</i> <i>chnitt:</i> <i>27</i>	<i>0 %</i> <i>männlich</i>				
<b>Akut Infizierte Ungeimpfte (IUs)</b>						
<b>37</b>	81-90	männlich	ja (2 Tage vor Blutentnahme)	/	2 Tage nach positiver PCR	/
<b>38</b>	71-80	weiblich	ja (11 Tage vor Blutentnahme)	/	11 Tage nach positiver PCR	/
<b>39</b>	51-60	weiblich	ja (2 Tage vor Blutentnahme)	/	2 Tage nach positiver PCR	/
<b>40</b>	51-60	männlich	ja (12 Tage vor Blutentnahme)	/	12 Tage nach positiver PCR	/
<b>41</b>	71-80	weiblich	ja (13 Tage vor Blutentnahme)	/	13 Tage nach positiver PCR	/
<b>42I</b>	61-70	männlich	ja (13 Tage vor Blutentnahme)	/	13 Tage nach positiver PCR	/
<i>Anza</i> <i>hl: 6</i>	<i>69,8</i>	<i>50 %</i> <i>männlich</i>				
<b>Naive Ungeimpfte (NUs)</b>						
<b>43</b>	21-30	weiblich	nein	/	zu jedem Vollblut-Entnahme Zeitpunkt	einmalige Speichel-abnahme
<b>44</b>	21-30	weiblich	nein	/	einmalige Vollblutabnahme	/
<b>45</b>	21-30	männlich	nein	/	einmalige Vollblutabnahme	/
<b>46</b>	21-30	weiblich	nein	/	einmalige Vollblutabnahme	/
<b>47</b>	21-30	weiblich	nein	/	einmalige Vollblutabnahme	/
<b>48</b>	11-20	weiblich	nein	/	einmalige Vollblutabnahme	/
<b>49</b>	31-40	männlich	nein	/	einmalige Vollblutabnahme	/
<b>50</b>	31-40	weiblich	nein	/	einmalige Vollblutabnahme	/

## Anhänge

<b>51</b>	21-30	männlich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>52</b>	51-60	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>53</b>	41-50	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>14</b>	21-30	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>55</b>	31-40	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>56</b>	21-30	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>57</b>	51-60	männlich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>58</b>	31-40	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>59</b>	31-40	männlich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>60</b>	21-30	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>61</b>	21-30	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>62</b>	61-70	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>63</b>	21-30	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme

## Anhänge

<b>64</b>	21-30	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>65</b>	21-30	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>66</b>	21-30	männlich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>67</b>	31-40	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<b>68</b>	21-30	weiblich	nein	/	/	einmalige Speichel- abnahme
<i>An- zahl: 26</i>	<i>Durchs chnitt: 31,7</i>	<i>23,1 % männlich</i>			<i>Anzahl: 7</i>	<i>Anzahl: 19</i>
<b><i>Ins- ge- samt : 68</i></b>						<i>Insgesamt: 35</i>

## 7.2. Materialien

### 7.2.1. Geräte

Tabelle A2: Übersicht aller verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Kern ABS WB1000157 Electronic Balance	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Autoklav VX-75	Systemec (Linden)
Brutschrank INCU-Line®	VWR (Radnor, PA, USA)
Durchflusszytometer Attune Nxt	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Einkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Elektronische Waage	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Mehrkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg) VWR (Radnor, PA, USA)
Mikroskop Primovert	Zeiss (Oberkochen)
Multipette Stream	Eppendorf (Hamburg)
Photometer Microplate-Photometer Spectra Max iD3	Molecular Devices (San José, CA, USA)
<b>Photometer Infinite® 200 PRO</b>	Tecan Trading AG (Schweiz)
Pipette Multi-channel Eppendorf Xplorer® plus	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe Pipetboy Accu 2	Integra Bioscience (Zizers, Schweiz)
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Plattformschüttler (Behring Shaker Optoelectronic control)	Pharma Medizintechnik GmbH (Lübeck)
Reinstwassersystem Barnstead GenePure Pro (ddH <sub>2</sub> O)	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Sterile Werkbank BioGARD Hood	The Baker Company, Inc. (Sanford, ME, USA)
Tischzentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer Advanced Vortex Mixer ZX3	VELP Scientifica (Usmate, Italien)
Vortexer Vortex Genie 2.0	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Vortexer Vortex ZX3	VELP Scientifica (Usmate, Italien)
Zentrifuge 5424R	Eppendorf (Hamburg)

## Anhänge

---

Zentrifuge HERAEUS Multifuge X3R	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Zentrifuge Mega Star 3.0R	VWR (Radnor, PA, USA)

7.2.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle A3: Übersicht aller verwendeter Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
26 G Kanülen 0.45x13/25mm	Braun (Melsungen)
96-Well Conical Btm (PP Plt Natural 0,45mL)	Thermo Fisher (Rochester, NY, USA)
96 Well Microplate Non bindung v-shaped	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Cryo-Boxen	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen)
Cryo-Röhrchen (2mL)	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen)
Einwegspritzen (1, 2, 5, 10 mL)	Braun (Melsungen)
ELISA-Mikrotiterplatten (Costar Assay plates (96-Well, Clear, Flat Bottom, High-Binding, No Lid, Polystyrene))	Corning (Kennebunk, ME, USA)
FACS tubes (5 mL), 75x12mm, PS	Sarstedt (Sarstedt)
Falcon™, konische Zentrifugenröhrchen (15, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Hautdesinfektionsmittel Softasept N	Braun (Melsungen)
Injektionspflaster (1,7 x 4 cm)	Gothaplast Verbandpflasterfabrik GmbH (Gotha)
Mikroskop Objektträger Superfrost	Menzel Gläser (Braunschweig)
Multi Safe Kanülenabwurfbehälter (1,8 L)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
ORACOL+ Saliva Collection Device	Malvern Medical Developments (Worcester, England)
PCR 8er SoftStrips (0,2 mL)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch-Oldendorf)
Pipettenspitzen mit oder ohne Filter (10, 20, 100, 200, 1000, 1250 µl)	Sarstedt (Sarstedt)
Pur-Zellin Zellstofftupfer	PAUL HARTMANN GmbH (Wiener Neudorf, Österreich)
Rastereinsätze für Cryo-Boxen	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen)
Reagiergefäße (0,5, 1,5, 2 mL)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
Safety-Multifly-Kanüle (21 G x 3/4“, grün, 200 mm Schlauchlänge)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 mL)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)

## Anhänge

Serum MiniCollect Tube	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
S-Monovette (K3 EDTA, 7,5 mL)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
S-Monovette (Serum, 7,5 mL)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
Sterilium	PAUL HARTMANN GmbH (Wiener Neudorf, Österreich)
Verschlussfolie ROTILABO® für PCR-Platten	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)

### 7.2.3. Reagenzien

**Tabelle A4: Übersicht aller verwendeter Reagenzien**

Reagenz	Hersteller
Alexa Fluor™ 488 Antibody Labeling Kit	Thermo Fisher / Invitrogen (Waltham, MA, USA)
BD OptEIA (TMB-Substrat)	BD Bioscience (San Diego, CA, USA)
Biocoll Trennlösung	Bio&Sell GmbH (Feucht / Nürnberg)
Bovines Serum Albumin (BSA)	GE Healthcare (Little Chalfont, Vereinigtes Königreich)
Carbonat-Bicarbonat-Kapseln	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Cytofix/Cytoperm	BD Bioscience (San Diego, CA, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Focusing Fluid	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt)
Saponin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
SARS-CoV-2-S1 (his-tag)	ACROBiosystems (Newark, DE, USA)
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Streptavidin (APC-gekoppelt)	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Trizma®-Base (Tris)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)

## 7.2.4. Puffer

Tabelle A5: Übersicht aller verwendeter Puffer

Puffer	Zusammensetzung
HL-Coating-Puffer	50 mM Carbonat/Bicarbonatpuffer in Reinstwasser
HL-Waschpuffer	0,05 % Tween® 20 in 1 x PBS (PBST)
HL-Sample-Puffer	0,05 % Tween® 20 und 3 % BSA in 1 x PBS
HL-Stopplösung	4,2 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in Reinstwasser
FACS-Puffer	0,5 % BSA 0,05 % Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) 10 mM EDTA in 1 x PBS
PermWash	0,05 x PBS 0,1 % BSA 0,05 % Saponin 0,01 % Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) in Reinstwasser

## 7.2.5. Testkits

Tabelle A6: Übersicht aller verwendeter Testkits

Testkit	Hersteller
Anti-SARS-CoV-2-NCP IgG ELISA	EUROIMMUN (Lübeck)
Anti-SARS-CoV-2-S1 IgG ELISA	EUROIMMUN (Lübeck)

## Anhänge

### 7.2.6. Antikörper

Tabelle A7: Übersicht verwendeter Antikörper im ELISA

Antikörper	Klon	Hersteller	Konzentration	Verdünnung	Anwendung
<b>HRP-coupled polyclonal goat anti-human IgG Fc</b>	A80-104P	Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA)	1,0 mg/ml (unverdünnt) 0,05 µg/mL (final)	1:20000	ELISA
<b>HRP-coupled monoclonal anti-human IgG1</b>	HP-6001	Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)	0,5 mg/mL (unverdünnt)	1:20000	ELISA
<b>HRP-coupled monoclonal anti-human IgG2</b>	HP-6014	Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)	0,55 mg/mL	1:5000	ELISAS
<b>HRP-coupled monoclonal Anti-human IgG3</b>	HP-6050	Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)	0,35 mg/mL	1:20000	ELISA
<b>HRP-coupled monoclonal anti-human IgG4</b>	HP-6025	Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)	0,5 mg/mL	1:5000	ELISA
<b>Anti-human Kollagen 7 IgG1-4 und IgA1,2</b>	/	UKSH Lübeck, Dermatologie	Final: 1 µg/ml		Spezifitäts-ELISA
<b>Anti-human Kollagen 7 IgG1</b>	/	UKSH Lübeck, Dermatologie	0,32 mg/ml	1:320	Spezifitäts-ELISA
<b>Anti-human Kollagen 7 IgG2</b>	/	UKSH Lübeck, Dermatologie	0,3 mg/ml	1:300	Spezifitäts-ELISA

<b>Anti-human Kollagen 7 IgG3</b>	/	UKSH Lübeck, Dermatologie	0,25 mg/ml	1:250	Spezifitäts- ELISA
<b>Anti-human Kollagen 7 IgG4</b>	/	UKSH Lübeck, Dermatologie	0,6 mg/ml	1:600	Spezifitäts- ELISA
<b>Anti-human Kollagen 7 IgA1</b>	/	UKSH Lübeck, Dermatologie	1,42 mg/ml	1:1420	Spezifitäts- ELISA
<b>Anti-human Kollagen 7 IgA2</b>	/	UKSH Lübeck, Dermatologie	1,2 mg/ml	1:1200	Spezifitäts- ELISA

## Anhänge

Tabelle A8: Übersicht verwendeter Antikörper im FACS

Marker	Klon oder Cat.	Hersteller	Konzentration (unverdünnt)	Verdünnung	Fluorochrom	Staining
Anti-human IgA FC	IS11-8E10	Miltenyi	50 µg/ml	1:75	PE-Vio770	extra + intra
Anti-human IgG FC	M1310G05	BioLegend (San Diego, CA, USA)	25 µg/ml	1:30	PE	Extra + Intra
Anti-human CD19	HIB19	BioLegend (San Diego, CA, USA)	50 µg/ml	1:40	BV510	Extra
Anti-human CD27	O323	BioLegend (San Diego, CA, USA)	100 µg/ml	1:100	BV785	Extra
Anti-human CD38	HIT2	BioLegend (San Diego, CA, USA)	50 µg/ml	1:50	BV421	Extra
Anti-human CD138	MI15	BioLegend (San Diego, CA, USA)	50 µg/ml	1:50	BV711	Extra
Anti-human ST6GAL1 and Isotype control		R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)	200 µg/ml	1:70	AF488	Intra 1
Anti-human FUT8 and isotype-control		R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)	200 µg/ml	1:50	AF488	Intra 1
Biotinylated SARS-CoV-2-S protein, His,Avitag™	Cat: S1N-C82E8	Acro Biosystems (Newark, DE, USA)	200 µg/ml	1:40		Intra 1
Streptavidin-APC		invitrogen	1mg/mL	1:100	APC	Intra 2

### 8. Danksagungen

Obwohl mein Name auf dieser Arbeit steht, wäre sie wohl ohne euch nie entstanden:

Danke zunächst an meinen Doktorvater Marc Ehlers, dass du mir die Welt der Immunologie eröffnet hast, bei Fragen immer ein offenes Ohr für mich hattest und mich auch nach Monaten im Ausland nicht vergessen hast. Vielen Dank auch an meine Betreuer\*innen JR, für deine Hilfe bei der Etablierung des FACS-Protokolls, und JB, für deine Anleitung, Betreuung und Feedback. Ohne dich wäre ich was Statistikfragen und die Nutzung von Graphpad angeht gänzlich aufgeschmissen gewesen.

Ebenfalls möchte ich der AG Ehlers danken, insbesondere meinen Mitdotorandinnen SL, HL, LD, sowie EM und IK, die mir einige Daten, Beratung und Zeit zur Bewältigung meiner aufwändigen Experimente zur Verfügung gestellt haben.

Bei Prof. Dr. Manfred Wuhrer und seinem Team am LUMC möchte ich für die Durchführung der Glykoanalysen danken, die einen wichtigen Teil meiner Daten darstellen. Weiterhin danke an die Universität zu Lübeck für die finanzielle Unterstützung durch das Promotionsstipendium „Lübecker Exzellenzmedizin“, welche mir die Freiheit gegeben hat, mich ganz auf meine Forschung zu konzentrieren, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets ermutigt und unterstützt haben, meine akademischen Ziele zu verfolgen und nebenbei das eine oder andere Semester obenauf für die Doktorarbeit ermöglicht haben. Dazu möchte ich auch meiner zweiten Familie in Mölln danken, dass ihr mir euer Zuhause als Arbeitsplatz geöffnet habt.

Zuletzt möchte ich meinen Freundinnen VK, HR, LW und MM danken. Für das Opfern Eurer Freizeit, um mir bei meinen Versuchen unter die Arme zu greifen, Euer Zuhören und für das Aufbauen an anstrengenden Tagen. Dasselbe trifft auch auf meinen Freund zu. Danke für viele gemeinsame Arbeitsstunden, deine IT-Unterstützung und deinen unermüdbaren Glaube an mich!

Diese Doktorarbeit ist das Ergebnis einer gemeinsamen Anstrengung und Unterstützung von vielen Menschen, und ich bin dankbar für jeden Einzelnen von euch. Euer Vertrauen und eure Unterstützung haben mich dazu inspiriert, mein Bestes zu geben und mein Projekt voranzutreiben. Ohne euch wäre dies nicht möglich gewesen.

# Lebenslauf

---

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Anne Sophie Lixenfeld

### Schulbildung

07/2017 Abitur-Baccalauréat (Lycée Georges Duby, Luynes, Frankreich)

### Hochschulstudium

10/2017 – 11/2024 Studium der Humanmedizin (Universität zu Lübeck)

04/2023 – 10/2023 Freisemester zur schriftlichen Ausarbeitung der Promotion

04/2022 – 10/2022 Erasmus-Semester (Università degli Studi, Parma, Italien)

10/2020 – 04/2021 Freisemester, praktischer Teil der Promotion unter dem Promotionsstipendium Lübecker Exzellenzmedizin

### Berufliche Erfahrung

09/2020 – 03/2024 Studienassistentin (KLB Gesundheitsforschung Lübeck GmbH)

03/2020 – 08/2022 Famulaturen in Allgemeinmedizin, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Onkologie, Thoraxchirurgie, Radiologie, Plastische Chirurgie und Neonatologie

03/2020 – 10/2020 Studentische Hilfskraft (ELISA-Studie, Lübecker Längsschnittuntersuchung zu Infektionen mit SARS-CoV-2)

08/2018 – 03/2019 Pflegepraktika (St. Elisabeth Krankenhaus Salzgitter; Helios Klinikum Salzgitter)

03/2018 Sozialpraktikum (CVJM Schulkindbetreuung an der Paul-Klee-Schule, Lübeck)

## 10. Publikationen

Buhre JS, Pongracz T, Künsting I, **Lixenfeld AS**, Wang W, Nouta J, Lehrian S, Schmelter F, Lunding HB, Dühring L, Kern C, Petry J, Martin EL, Föh B, Steinhaus M, von Kopylow V, Sina C, Graf T, Rahmöller J, Wuhrer M, Ehlers M (2023).

**mRNA vaccines against SARS-CoV-2 induce comparably low long-term IgG Fc galactosylation and sialylation levels but increasing long-term IgG4 responses compared to an adenovirus-based vaccine.**

*Frontiers in Immunology*, 13, 1020844. (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1020844>).

Van Coillie J, Pongracz T, Rahmöller J, Chen H-J, Geyer CE, van Vught LA, Buhre JS, Šuštić T, van Osch TLJ, Steenhuis M, Hoepel W, Wang W, **Lixenfeld AS**, Nouta J, Keijzer S, Linty F, Visser R, Larsen MD, Martin EL, Künsting I, Lehrian S, von Kopylow V, Kern C, Lunding HB, de Winther M, van Mourik N, Rispens T, Graf T, Slim MA, Minnaar RP, Bomers MK, Sikkens JJ, Vlaar APJ, van der Schoot CE, den Dunnen J, Wuhrer M, Ehlers M, Vidarsson G, in collaboration with the Fatebenefratelli-Sacco Infectious Diseases Physicians group and UMC COVID-19 S3/HCW study group (2023).

**The BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccine induces transient afucosylated IgG1 in naive but not in antigen-experienced vaccinees.**

*eBioMedicine*, 87, 104408. (<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104408>).

Schmelter F, Föh B, Mallagaray A, Rahmöller J, Ehlers M, Lehrian S, von Kopylow V, Künsting I, **Lixenfeld AS**, Martin E, Ragab M, Meyer-Saraei R, Kreutzmann F, Eitel I, Taube S, Käding N, Jantzen E, Graf T, Sina C, und Günther UL (2021).

**Metabolic and Lipidomic Markers Differentiate COVID-19 From Non-Hospitalized and Other Intensive Care Patients.**

*Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 737039.

(<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.737039>).

## Publikationen

---

Borsche M, Reichel D, Fellbrich A, **Lixenfeld AS**, Rahmöller J, Vollstedt E-J, Föh B, Balck A, Klein C, Ehlers M und Moser A (2021).

**Persistent cognitive impairment associated with cerebrospinal fluid anti-SARS-CoV-2 antibodies six months after mild COVID-19.**

**Neurological Research and Practice**, 3, 34. (<https://doi.org/10.1186/s42466-021-00135-y>).

**Lixenfeld AS**, Künsting I, Martin EL, Kopylow V von, Lehrian S, Lunding HB, Buhre JS, Quack J, Steinhaus M, Graf T, Ehlers M, Rahmöller J (2021).

**The BioNTech / Pfizer vaccine BNT162b2 induces class-switched SARS-CoV-2-specific plasma cells and potential memory B cells as well as IgG and IgA serum and IgG saliva antibodies upon the first immunization.**

**medRxiv.** (<https://doi.org/10.1101/2021.03.10.21252001>).