

Aus der Abteilung
für Nephrologie
Prof. Dr. Bernhard Banas
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19
Patienten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät Für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christine Müller

2024

Aus der Abteilung
für Nephrologie
Prof. Dr. Bernhard Banas
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19
Patienten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät Für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christine Müller

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Mack

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Barbara Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

09.04.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	COVID-19	8
1.1.1	Definition und Epidemiologie	8
1.1.2	SARS-CoV-2	8
1.1.3	Klinik/Symptome	9
1.1.4	Immunantwort	10
1.1.4.1	Immunzellen	10
1.1.4.2	Zytokine	13
1.1.5	Diagnostik	16
1.1.6	Allgemeine und spezifische Therapie (-ansätze)	17
1.1.7	Impfstoffe	20
1.2	IL-3 und IL-3 Rezeptor	22
1.2.1	Struktur und Signalweg	22
1.2.1.1	Struktur IL-3	22
1.2.1.2	Struktur IL-3 Rezeptor	22
1.2.1.3	Signalweg	23
1.2.2	Wirkung und Produktion von IL-3	24
1.2.3	Expression und Regulation von IL-3 Rezeptor	25
1.2.3.1	IL-3 abhängige Expression und Regulation	25
1.2.3.2	IL-3 unabhängige Expression und Regulation	27
1.3	Zielsetzung	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Material	29
2.1.1	Geräte und Arbeitswerkzeug	29

Inhaltsverzeichnis

2.1.2	Chemikalien	30
2.1.3	Antikörper für extrazelluläre FACS-Färbungen	31
2.1.4	Zytokine, Antikörper	31
2.1.5	Auswertungsprogramme	32
2.2	Methoden	32
2.2.1	Patienten- und Kontrollkollektiv	32
2.2.2	Vollblutstimulation	33
2.2.3	Zellkulturansätze	33
2.2.4	Durchflusszytometrie und extrazelluläre FACS-Färbung	34
2.2.5	Zytokin-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	35
2.2.6	Datensammlung und Auswertung	37
2.2.7	Statistische Analyse	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Patienten- und Kontrollkollektiv	38
3.1.1	Grunddaten	38
3.1.2	Laborparameter der Patienten	41
3.2	Vollblutanalyse	42
3.2.1	Analyse der Rezeptorregulation	42
3.2.1.1	IL-3R β c Regulation auf Basophilen	42
3.2.1.2	IL-3R α Regulation auf Monozyten	44
3.2.1.3	CD11b Regulation auf Neutrophilen	46
3.2.1.4	IL-3R β c Regulation auf pDCs	48
3.2.2	Zytokinexpression	48
3.2.2.1	IL-3	49
3.2.2.2	GM-CSF	50
3.2.2.3	IFN γ	51
3.2.3	Beispiele für die longitudinale Analyse von beatmeten COVID-19 Patienten	52
3.2.3.1	Patientenbeispiel 1	52
3.2.3.2	Patientenbeispiel 2	53
3.2.3.3	Patientenbeispiel 3	53
3.2.3.4	Patientenbeispiel 4	54

Inhaltsverzeichnis

3.2.3.5	Patientenbeispiel 5	55
3.2.3.6	Patientenbeispiel 6	56
3.2.4	Geschlechtsspezifische Analyse der Rezeptorregulation	57
3.2.4.1	Regulation von IL-3R β c auf Basophilen	57
3.2.4.2	Regulation von IL-3R α auf Monozyten	57
3.2.4.3	Regulation von CD11b auf Neutrophilen	58
3.2.4.4	Regulation von IL-3R β c auf pDCs	58
3.3	PBMC Analyse - Zytokinexpression	59
3.3.1	IL-3	59
3.3.2	GM-CSF	60
3.3.3	IFN γ	61
4	Diskussion	62
4.1	T-Zell Hyporeaktivität bei COVID-19 Patienten	62
4.1.1	Beeinträchtigte Regulation der Oberflächenmoleküle auf Basophilen, Neutrophilen, Monozyten und pDCs	62
4.1.2	Verminderte Zytokinexpression	63
4.2	Reversibilität der T-Zell Hyporeaktivität gezeigt an Patientenbeispielen	65
4.3	Überwindung der T-Zell Hyporeaktivität bei Schwerkranken als möglicher Therapieansatz	65
4.4	Geschlechtsspezifische IL-3R α Regulation auf Monozyten: Faktor für schwerwiegenden Verlauf bei Männern	66
4.5	Einfluss von IL-3 auf COVID-19	66
5	Zusammenfassung	68
6	Anhang	70
	Tabellenverzeichnis	70
	Abbildungsverzeichnis	71
7	Literaturverzeichnis	73
8	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aCD3	anti-CD3
ACE-II	Angiotensin-Converting-Enzym II
Ag	Antigen
AG	Arbeitsgruppe
Ak	Antikörper
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
β c	beta commun
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CD 123	IL-3 Rezeptor α -Kette
CD 131	IL-3 Rezeptor β -Kette
CK	Creatinkinase
COOH	Carboxyl-
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CT	Computertomographie
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
D2/3	Domäne 2/3
ECMO	Extrakorporale Membran Oxygenierung
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	European medicines agency
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FDA	Food and Drug Administration
Fn	Fibronectin
FSC	Forward Scatter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

Abkürzungsverzeichnis

GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HRP	Horseradish peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-3R α	Interleukin 3 Rezeptor α Kette
JAK2	Januskinase 2
JCI	Journal of Clinical Investigation
kB	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mitogen-activated protein (kinase)
MERS	Middle East respiratory syndrom
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MFI	mean fluorescence intensity (Mittlere Fluoreszenzintensität)
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natrium-Chlorid
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NH ₂	Amino-
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nM	nano Molar
NTD	N-terminal domain
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCT	Procalcitonin

Abkürzungsverzeichnis

pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PI/ PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RBD	receptor-binding domain
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SEM	Standardfehler/ mittlerer Fehler des Mittelwertes
SSC	Sideward Scatter
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 COVID-19

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Kein Thema war je so Mittelpunkt der weltweiten Forschung wie das Coronavirus SARS-CoV-2, welches COVID-19 (Coronavirus disease 2019), eine akute infektiöse Lungenerkrankung, beziehungsweise ein akutes respiratorisches Syndrom auslöst. Das klinische Bild ist unter anderem charakterisiert durch die Ausprägung einer akuten respiratorischen Symptomatik und/ oder den Verlust des Geruchs-/ Geschmackssinnes und/ oder den krankheitsbedingten Tod (Stand 23.12.2020) [42].

Erstmals ist das Virus im Dezember 2019 in Wuhan in der Volksrepublik China nachgewiesen worden. Bislang sind deutschlandweit 2.068.002 SARS-CoV-2 Infektionen dokumentiert und 48.770 Menschen an COVID-19 verstorben (Stand: 20.01.2021) [40]. Weltweit belaufen sich die Zahlen auf 94.124.612 bestätigte COVID-19 Fälle und 2.034.527 Verstorbene (Stand: 19.01.2021) [61]. Das Virus wird hauptsächlich über Aerosole übertragen. In Deutschland sind etwa gleich viele der Erkrankten weiblich und männlich, jedoch sterben Männer etwa doppelt so häufig an COVID-19 (Stand: 11.12.2020) [44]. Am 11.03.2020 hat die WHO COVID-19 als Pandemie eingestuft [43].

1.1.2 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2) gehört zu der Gattung der β -Coronaviridae. Dieser Gruppe angehörig ist auch das gleichnamige SARS-CoV-1, welches sich 2002/ 2003 ausgehend von China innerhalb weniger Wochen weltweit verbreitet hat und das MERS-CoV (Middle East respiratory syndrom coronavirus), welches 2012 erstmals in Saudi-

1 Einleitung

Arabien aufgetreten ist und weitgehend lokal verblieb, wie der auf die geografische Prävalenz zurückführende Name des Virus impliziert. Insgesamt sind, einschließlich des SARS-CoV-2, bislang sieben humanpathogene Coronaviren bekannt. In der Regel verursachen humane Coronaviren milde Erkrankungen des oberen Respirationstraktes. Jedoch gingen sowohl Infektionen mit SARS-CoV-1, als auch mit dem später aufgetretenen MERS-CoV mit einer erheblichen Pathogenität und Zahl an Todesfällen einher und die Erreger befielen vor allem die unteren Atemwege [44, 66]. Die hohe Letalität, Virulenz und Beteiligung des unteren Respirationstraktes trifft ebenso auf das neuartige SARS-CoV-2 zu. Allerdings ist das Virusgenom bei SARS-CoV-2 auch in beachtlicher Menge im Naso- und Oropharynx nachweisbar [39]. Die drei Virenspezies wurden bekannt für die schweren Lungenentzündungen bis akuten Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome; ARDS), die durch sie ausgelöst und schließlich auch namensgebend für das SARS-CoV-1, -2 und MERS-CoV wurden [44, 66].

Coronaviren sind behüllte plusstrang RNA-Viren und haben mit 30 kb das bislang größte dokumentierte Virusgenom. Das Genom ist von einem helikalen Kapsid ummantelt und von einer Lipidhülle umgeben [66]. Der Name der Virusfamilie ist auf das typische elektronenmikroskopische Aussehen, welches an einen Kranz beziehungsweise eine Krone (lat. Corona) erinnert, zurückzuführen [9, 66]. Grund für diese charakteristische Erscheinungsform sind in die Virushülle eingelagerte virale Glykorezeptorproteine, auch Spikes genannt, über welche die Adhäsion an die Wirtszelle erfolgt [66].

1.1.3 Klinik/Symptome

Nach bisherigem Erkenntnisstand beträgt die Inkubationszeit bis zu 14 Tage. Im Durchschnitt treten die ersten Anzeichen einer SARS-CoV-2 Infektion nach fünf bis sechs Tagen auf, wobei bereits ein bis zwei Tage davor das Virus ausgeschieden wird [44, 48]. Die Symptome der Erkrankung COVID-19 reichen von symptomlos bis hin zu schweren Pneumonien und akuter respiratorischer Insuffizienz bei Lungenversagen mit Todesfolge. Hauptsymptome sind Husten, Fieber, Glieder- und Kopfschmerzen. Ein Grund für den überwiegenden Befall des Respirationstraktes ist die hohe Dichte an ACE-II Rezeptoren, welche als Eintrittspforten für das SARS-CoV-2 in die Wirtszelle identifiziert wurden. Eine vermehrte Expression dieses Rezeptors findet sich zudem im Gastrointestinaltrakt, im Gefäßsystem, auf der Niere und dem Herzen. Ne-

1 Einleitung

ben der respiratorischen Symptomatik treten deshalb oftmals auch gastrointestinale Beschwerden, Gefäßstenosen/ -verschlüsse, pulmonale Mikrothrombi, Kardiomyopathien und eine gestörte Nierenfunktion bei einer Infektion auf [44]. Die Vielzahl an neurologischen Begleitsymptomen, wie Kopfschmerz, Somnolenz, Anosmie, Ageusie und der Nachweis des Virusgenom im Liquor spricht zudem für einen zentralnervösen Befall [37, 44]. Verstärkt wird diese Annahme durch das Auftreten von Enzephaliden, MS ähnlichen Veränderungen der Myelinscheiden, Halluzinationen und in seltenen Fällen Paranoia, welche im Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2 Infektion stehen. Ob diese schwerwiegenden neurologischen Veränderungen direkt durch das Virus oder indirekt über die Überreaktion des Immunsystems verursacht werden, ist noch nicht ausreichend geklärt (Stand 09/2020) [32].

1.1.4 Immunantwort

Die Immunreaktion des Körpers auf das Virus hat nach aktuellen Erkenntnissen maßgeblich Einfluss auf die Entwicklung, den Verlauf und die Dauer einer COVID-19 Erkrankung. Es wird eine maladaptive fulminante Immunantwort des Körpers auf das Virus als primär verantwortlich für Lungenschäden vermutet und nicht das Virus selbst als direkter Verursacher der entzündungsbedingten Schäden erachtet. In Studien wird sowohl die angeborene (unspezifische) Immunantwort, wie auch die adaptive beziehungsweise erworbene (spezifische) Immunabwehr als Einflussfaktor für die überschießende Entzündungsreaktion aufgrund von Dysfunktion und -regulation von Mediatoren und Zellen beurteilt [3, 48].

Das adaptive und das angeborene Immunsystem interagieren eng miteinander und bedienen sich jeweils humoraler und zellulärer Komponenten zur effizienten Immunabwehr. Die angeborene Immunabwehr reagiert sofort und weitgehendst unspezifisch auf Pathogene. Sie vermittelt über Freisetzung von Mediatoren, insbesondere von Zytokinen sowie über Antigenprozessierung und -präsentation die später einsetzende pathogenspezifische Immunantwort [30].

1.1.4.1 Immunzellen

Der Einfluss der Funktionalität von Immunzellen auf COVID-19 wird in vielen Studien beleuchtet. Erwähnung finden hierbei insbesondere T-Lymphozyten und Neutrophile Granulozyten.

1 Einleitung

T-Zellen sind neben den B-Lymphozyten Hauptakteure des erworbenen Immunsystems und können sich wesentlich in zwei Zelltypen differenzieren. Nach Reifung im Thymus weisen die T-Zellen entweder den Ko-Rezeptor für das MHC-II Molekül (CD4) auf, was die Kommunikation mit professionell Antigen präsentierenden Zellen ermöglicht oder exprimieren den Ko-Rezeptor für das MHC-I Molekül (CD8). CD4+ T-Zellen interagieren über Zell-Zell-Kontakt oder Zytokin-vermittelt mit anderen Immunzellen und werden auch als T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen) bezeichnet. CD8+ T-Zellen werden auch zytotoxische Zellen genannt. Der MHC-I Rezeptor wird von allen kernhaltigen Zellen ausgebildet. Über diesen Rezeptor werden der CD8+ T-Zelle intrazelluläre Genfragmente präsentiert. Bei Identifizierung viraler, entarteter oder fremder Antigene induziert die zytotoxische T-Zelle die Apoptose beziehungsweise Lyse der pathologischen Zelle [30].

CD4+ T-Zellen können sich weiter differenzieren, wobei die Differenzierung zu der letztendlichen T_H -Effektorzelle abhängig von der auf die naive T_H -Zelle einwirkende Zytokinkonstellation bei erstmaliger Aktivierung ist. So entwickelt sich die T_H1 -Zelle bei Anwesenheit von IL-12 und IFN γ , welche als Reaktion auf intrazelluläre Erreger sezerniert wurden. Die T_H1 -Zelle mobilisiert Zytokin-vermittelt (IL-2, IFN γ , u.a.) Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen zur Erregerelimination. Die Entstehung von T_H2 -Zellen wird von IL-4 induziert und spielt vor allem bei allergischen Reaktionen eine Rolle. Die Differenzierung zu T_H17 -Zellen wird durch die Wirkung von IL-1, IL-6 und IL-23 auf die naive CD4+ T-Zelle ausgelöst. Diese Effektorzelle produziert proinflammatorische Zytokine und ist stark entzündungsfördernd. Eine weitere Unterform der T_H -Zellen sind die regulatorischen T-Zellen. Diese sind für das Gleichgewicht von Toleranz und Abwehr zuständig und vermeiden über Hemmung von Makrophagen und dendritischen Zellen die Auslösung einer überschießenden Immunreaktion [30].

Charakteristischer Oberflächenmarker für alle T-Zellen ist CD 3. Das Molekül ist mit dem T-Zellantigenrezeptor assoziiert und für die Signaltransduktion zuständig [20].

Neutrophile Granulozyten sind, neben den zu den professionell Antigen-präsentierenden Zellen gehörenden Monozyten und Makrophagen, wichtige Vertreter der angeborenen Immunabwehr. Diese Zellen erkennen über spezielle Rezeptoren Pathogene, sind zur Phagozytose befähigt und tragen damit wesentlich zur Erregerelimination bei [30].

1 Einleitung

Bei schweren COVID-19 Verläufen wird häufig eine Lymphozytopenie und eine hohe Zahl an Neutrophilen Granulozyten beobachtet [29, 48, 49]. Im April 2020 bezeichnete eine Studie Neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten, speziell CD8+ T-Zellen, als wichtige prognostische Marker. Eine hohe Zahl an Neutrophilen und eine geringe Zahl an CD8+ T-Lymphozyten gingen mit einem schweren Krankheitsverlauf einher [29].

Die Ergebnisse einer relativ aktuellen Studie aus dem Jahr 2017 sind hierbei zu erwähnen. Die Studie hat an einem Mausmodell für eine schwere Infektion mit dem Influenzavirus gezeigt, dass eine CD11b (Mac-1) exprimierende Untergruppe von Neutrophilen eine Suppression von T-Zellen bewirken. CD11b defiziente Mäuse wiesen eine vermehrte Anzahl von T-Zellen und eine erhöhte Infiltration von Leukozyten in das Lungengewebe auf [55]. CD11b vermittelt über Leukozytenadhäsion und -migration Entzündungsreaktionen, wobei die Migration nur in kombinierter Expression von CD11b/CD18 stattfindet [35, 55].

Auf die CD11b+ Subpopulation der Neutrophilen und auf die T-Zellsubpopulationen wird auch in der COVID-19 Studie “Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19” eingegangen. Die Studie berichtet unter anderem von einer manifesten Hochregulation von CD11b auf Neutrophilen als Antwort auf eine SARS-CoV-2 Infektion und bringt dies mit der signifikanten Abnahme von zirkulierenden CD8+ T-Zellen und einer Beeinträchtigung der T-Zellfunktion in Verbindung [6].

Die Korrelation von der Anzahl an T-Lymphozyten und deren Funktionalität mit einem kritischeren Krankheitsverlauf erkläre unter anderem auch gewisse Risikofaktoren für eine schwere Erkrankung. Bekannte Risikofaktoren für einen schwereren COVID-19 Verlauf sind neben dem Alter, Transplantationen, Adipositas, kardiovaskuläre, pulmonale und renale Vorerkrankungen, Diabetes mellitus und immunsupprimierte Patienten [39]. Es sei bewiesen, dass Personen mit Adipositas vermindert abwehrstarke und eine geringere Zahl an T-Zellen haben. Auch Personen nach einer Transplantation, die Immunsuppressiva erhalten, Krebskranke und ältere Menschen besitzen weniger T-Zellen [14]. Ein Zusammenhang von solch individuellen Risikofaktoren und einer beeinträchtigten SARS-CoV-2 spezifischen T-Zellantwort wird durch weitere Studienergebnisse bestätigt [47]. Es ist anzunehmen, dass die Komorbiditäten zu einer gestörten T-Zellfunktion führen und somit einen schweren Krankheitsverlauf begünstigen [47].

1 Einleitung

Bestärkt wird der wesentliche Einfluss der T-Zellen auf einen komplizierten Krankheitsverlauf auch durch weitere Studien. Die Datenlage über die Aktivität beziehungsweise Funktionalität von T-Zellen bei COVID-19 ist aber widersprüchlich. So sprechen einige Studien von einer verminderten T-Zellantwort bei schweren COVID-19 Verläufen [18, 49], andere hingegen von einer verstärkten Aktivierung der T-Zellen [6, 63]. Eine der Studien zeigt grundsätzlich eine Aktivierung der T-Zellen, spricht allerdings letztlich von einer progredienten Erschöpfung jener bei schwerer Erkrankung [18]. Demgegenüber wird von einer Hyperaktivität insbesondere von zytotoxischen T-Zellen und proinflammatorischen CCR6+ T_H17 -Lymphozyten im Rahmen einer allgemeinen Überreaktion von T-Zellen berichtet und vermutet, dass diese überaktivierten T-Zellen maßgeblich an der Hyperinflammationsreaktion bei kritischen COVID-19 Patienten beteiligt sind [63].

Eine Anfang September im Science veröffentlichte Studie beleuchtet eine relativ kleine Population an Immunzellen, die plasmazytoiden dendritischen Zellen, eine Unterform von dendritischen Zellen. Die Forscher weisen auf die geringe Zahl und Funktionsstörung der plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) bei schweren COVID-19 Verlauf hin und folgern, dass die Beeinträchtigung der pDCs in ihrer Wirkungsweise die Entwicklung einer schweren COVID-19 Erkrankung begünstigt beziehungsweise mitverursacht. Es wird eine verminderte Interferonproduktion der pDCs als Grund für eine langsame, verminderte Viruselimination und die rapide Verschlechterung des Gesundheitszustands bei einer SARS-CoV-2 Infektion genannt [1].

Plasmazytoide dendritische Zellen gehören als professionell Antigen präsentierende Zellen zu dem angeborenen Immunsystem. Ihnen wird eine wesentliche Rolle bei der Viruseliminierung durch die erhebliche Produktion an Interferonen, insbesondere IFN α , bei Pathogenkontakt zugesprochen [21, 30].

1.1.4.2 Zytokine

In der Akut-Phase der SARS-CoV-2 Infektion treten erhöhte Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen auf, was bei schweren Verläufen bisweilen zu einem lebensbedrohlichen Zytokinsturm führen kann [3, 48, 49].

1 Einleitung

Zytokine sind lösliche Proteine, die insbesondere von Immunzellen produziert werden. Sie können eine endokrine, eine parakrine und/ oder autokrine Wirkung besitzen und dienen im Rahmen einer Immunantwort zur Kommunikation der Zellen untereinander beziehungsweise zur Eigenstimulation/-hemmung [36]. Zudem beeinflussen Zytokine die Proliferation und Differenzierung von Blutzellen, vor allem von Immunzellen. Überhaupt kommt den Zytokinen eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Immunsystems zuteil. Eine übermäßige Zytokinexpression oder deren Rezeptoren kann zu einer abnormalen Signaltransduktion führen, was letztlich pathologische Veränderungen beispielsweise im Sinne chronisch entzündlicher oder auch myeloisch leukämischer Erkrankungen auslösen kann [5]. Die Gruppe der Zytokine besteht zum Großteil aus den Interleukinen, den Hauptakteuren zwischen den Leukozyten-Subpopulationen, was auch den Namen "Interleukine" erklärt. Zu den Zytokinen zählen außerdem die Chemokine, Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), Interferone und der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) [36].

TNF α , IL-6 und IL-1 β sind Zytokine, die bei der Akut-Phase schwerwiegender SARS-CoV-2 Infektionen in großen Mengen auftreten. Bei Viruspenetration in die Zielzelle wird über zwei Signalwege, vermittelt über IFN und NF- κ B, eine Sekretion von TNF, IL-6 und IL-1 β induziert. Die Zytokine aktivieren zytotoxische T-Zellen und unterstützen über Stimulation von B-Zellen die Antikörperproduktion und darüber eine zusätzliche Viruselimination. Aufgrund von Überexpression der proinflammatorischen Zytokine wird bei kritisch Erkrankten jedoch eine überschießende Immunantwort in Form eines Zytokinsturms ausgelöst [48]. Maßgeblich werden IL-1 β , IL-6 und TNF α , neben aktivierten T-Zellen, von Monozyten und Makrophagen sezerniert [30]. Monozyten können bei Stimulation durch T_H1-Zellen zur IL-6 Produktion und Differenzierung in Gewebemakrophagen angeregt werden, was wiederum eine T-Zell Erschöpfung und einen Untergang von Gewebezellen verursachen kann [48]. IL-6, das auch dafür bekannt ist, die Akut-Phase Reaktion einzuleiten, welche sich in einem Anstieg von Akut-Phase Proteinen wie dem C-reaktiven Protein (CRP), einer verminderten Produktion von Transferrin, Albumin und anderen Proteinen sowie einem Anstieg der Leukozytenzahl äußert, korreliert besonders mit der Schwere der COVID-19 Erkrankung [25]. Je höher die IL-6 Konzentration, desto kritischer ist der Verlauf einer COVID-19 Erkrankung [3, 48].

Aber auch weitere Zytokine, darunter IL-12, IL-17 und IL-23, könnten beteiligte Mediatoren

1 Einleitung

ren bei der Entstehung und den Verlauf von COVID-19 sein, jedoch ist die Datenlage hierzu begrenzt und die Rolle der verschiedenen Zytokine bei COVID-19 noch weitgehendst unklar [48]. Es ist anzunehmen, dass die meisten Zytokine im Rahmen des Zytokinsturms erhöht sind. Auch GM-CSF und Interferone werden in diesem Zuge erwähnt [3].

COVID-19 Patienten mit ARDS weisen erhöhte Spiegel an GM-CSF im bronchoalveolären Sekret auf, wobei die hohen Konzentrationen vor allem in der Akut-Phase beobachtet werden konnten und eine progressive Abnahme des GM-CSF Spiegels mit zunehmender Erkrankungsdauer erfolgte [3]. GM-CSF gehört zu den Kolonie-stimulierenden Faktoren und ist als hämatopoetischer Wachstumsfaktor an der Proliferation von Monozyten und Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten und dendritischen Zellen beteiligt. GM-CSF hat auch maßgeblich Einfluss auf die Differenzierung von dendritischen Zellen und Makrophagen, darunter Alveolarmakrophagen und ist ein relevanter Mediator bei Entzündungsgeschehen im Körper. Es wird angenommen, dass GM-CSF lokal im inflammatorischen Gewebe produziert wird. Im Blutkreis eines Gesunden ist es so gut wie nicht nachzuweisen. Eine schnelle und signifikante Erhöhung von im Blutkreislauf befindlichen GM-CSF kann auf das Vorhandensein von Endotoxinen zurückgeführt werden oder durch proinflammatorischen Zytokine, darunter IL-1, IL-6 und TNF α induziert werden [2, 3].

Bei kritisch bis schwer erkrankten Patienten kann auch ein erhöhter Spiegel des Zytokins IFN γ verzeichnet werden, welches vermutlich im Rahmen des Zytokinsturms zu der übermäßigen Entzündungsreaktion des Körpers beiträgt [3]. Jedoch wird eine verringerte Produktion an Typ-I-Interferonen beobachtet. Diesem Umstand zählen Forscher zunehmend eine wesentliche Bedeutung bei der COVID-19 Entstehung zu [1, 18]. Interferone induzieren nach Bindung an ihre Rezeptoren über verschiedenste Signalkaskaden intra- und interzelluläre immunmodulatorische und antivirale Effekte. Sie tragen hauptsächlich indirekt zur Viruselimination über ihren Einfluss auf virale RNA und Proteinsynthese bei. Interferone können in Typ-I-Interferone, wozu Interferon α (IFN α) und Interferon β (IFN β) zählen und Typ-II-Interferone, was letztlich Interferon γ (IFN γ) entspricht, unterteilt werden [23, 18]. Aktivierte T-Zellen sind maßgeblich an der Freisetzung von IFN γ beteiligt. IFN γ bewirkt eine gesteigerte Phagozytose über die Aktivierung von Makrophagen und eine vermehrte Antigenpräsentation [30].

1.1.5 Diagnostik

Stand: Dezember 2020

Der direkte Nachweis des Virusgenom erfolgt mit Hilfe einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) aus einem Abstrich des Naso- beziehungsweise Oropharynx. Sputum beziehungsweise Tracheobronchialsekret als Probenmaterial ist vor allem in späteren Stadien der COVID-19 Erkrankung indiziert, da hier die PCR aus dem Abstrich des oberen Respirationstraktes bereits wieder negativ hinsichtlich der Virus-RNA sein kann. Jedoch ist meist noch virales Genom in den unteren Atemwegen nachweisbar. Letztendlich ist aber ein negatives Testergebnis und selbst ein wiederholt negatives bei starkem klinischen Verdacht kein Anlass für den sicheren Ausschluss einer SARS-CoV-2 Infektion [39].

Eine relativ schnelle Möglichkeit auf das Virus zu testen, bieten Antigen (Ag)-Schnelltests, mittels denen virale Proteine in respiratorischen Materialien nachgewiesen werden können. Der Test eignet sich unter anderem in der Frühdiagnostik. Eine SARS-CoV-2 Infektion muss jedoch bei positivem Ag-Schnelltest stets durch eine PCR gesichert werden [39].

Die serologische Diagnostik spielt bislang eine untergeordnete, bei der Initialdiagnostik überhaupt keine Rolle [39]. Antikörper vom Ig M Typ entwickeln sich etwa im Zeitraum von einer bis zwei Wochen nach einer SARS-CoV-2 Infektion und zirkulieren bis zu 12 Wochen im Patientenblut. Ig G Antikörper treten etwa nach zwei Wochen auf [48].

Typische Laborbefunde bei einer COVID-19 Erkrankung sind erhöhte CRP-, Ferritin, IL-6 und Transaminase- und LDH-Werte. Zudem findet sich im Blutbild oftmals eine Leukozytopenie, Lymphozytopenie und Thrombozytopenie. Organspezifische Laborwerte geben Auskunft über SARS-CoV-2 verursachte Organschädigungen und Funktionsstörungen, wie Kardiomyopathien (erhöhtes Troponin), thromboembolische Komplikationen (erhöhtes D-Dimer), Leber- (erhöhte GOT-, GPT-, Bilirubinwerte) und Nierenschäden (erhöhtes Kreatinin) [39, 41].

Um initial differentialdiagnostisch eine bakterielle Infektion auszuschließen beziehungsweise im späteren Verlauf eine bakterielle Superinfektion frühzeitig zu diagnostizieren, sollten regelmäßig

1 Einleitung

Blutabnahmen für Blutkulturen und die Bestimmung des Procalcitoninwertes erfolgen. Ebenso soll eine Urinprobe und respiratorisches Material auf bakterielle Erreger untersucht werden [39].

Bei circa 85% der Erkrankten sind im CT-Bild milchglasartige Infiltrate und uni- beziehungsweise bilaterale Verdichtungen sichtbar. In der konventionellen Bildgebung ist bei mehr als der Hälfte der Fälle eine pathologische Veränderung im Röntgenbild zu erkennen [39].

1.1.6 Allgemeine und spezifische Therapie (-ansätze)

Stand: Dezember 2020

Zu den allgemeinen therapeutischen Maßnahmen bei stationärer Behandlung gehören eine Flüssigkeitsrestriktion zur Optimierung der Oxygenierung, die regelmäßige Kontrolle der Vitalparameter und der Laborwerte (Entzündungsparameter, Nieren-, Leber- und Gerinnungswerte), konsequente Thromboseprophylaxe, Sauerstoffgabe nach Bedarf und eine regelmäßige Überprüfung, entsprechend nach WHO-Empfehlung alle zwei bis vier Tage, von viralen und bakteriellen Sekundärinfektionen.

Bei schweren Krankheitsverläufen ist eine frühzeitige Sauerstofftherapie mit Bauchlagerung sowie eine nicht-invasive oder invasive Beatmung erforderlich und bei Bedarf eine extrakorporeale Oxygenierung (ECMO) sicher zu stellen. Neben der Vorbeugung und Kontrolle von Ko- und Superinfektionen und anderweitigen, beispielsweise thromboembolischen Komplikationen, ist eine Sepsis-Therapie nach aktueller deutscher S3-Leitlinie indiziert [39].

Eine prophylaktische und therapeutische Antikoagulation verringert nach aktueller Studienlage die Mortalität, wobei die Datenlage hierzu nicht einstimmig ist. Laut Experten sollte dennoch mit stationärer Aufnahme mindestens eine Thromboseprophylaxe, bei schwerer Erkrankung mit gegebenenfalls thromboembolischen Komplikationen eine therapeutische Antikoagulation erfolgen. Eine Orientierung an den D-Dimerwert zur individuellen Anpassung der Antikoagulationstherapie könne hilfreich sein [39].

Bei Verdacht auf eine bakterielle Superinfektion und/ oder Sepsis sollte frühzeitig eine kalkulierte Antibiotikatherapie nach Leitlinie erfolgen. Bleibt ein Erregernachweis und ein Anstieg

1 Einleitung

des PCT aus, so sollte die Antibiose wieder beendet werden. Eine prophylaktische Antibiotikagabe bei COVID-19 Patienten ist nicht indiziert [39].

Aufgrund der Aktualität und Neuartigkeit dieses Virus sind derzeit nur wenig spezifische Therapiemöglichkeiten vorhanden. Jedoch wird an vielen verschiedenen Präparaten geforscht. Bislang wurden das antiviral wirksame Remdesivir und immunmodulatorische Kortikosteroid-Arzneimittel für die Behandlung von COVID-19 genehmigt, wobei beide mit Einschränkungen bei der Behandlung verbunden sind. Weitere therapeutische Ansätze sind antiviral wirksame monoklonale Antikörper, sowie ein immunmodulatorischer Januskinase-Inhibitor [39].

Seit dem 03.Juli.2020 ist in der Europäischen Union der virale RNA-Polymerase-Inhibitor Remdesivir unter dem Namen Veklury zur Behandlung von COVID-19 Erkrankten genehmigt. Die Zulassung dessen ist jedoch mit Bedingungen im Sinne der Durchführung und Auswertung weiterführender Studien zu dem Präparat verbunden [39]. Das Medikament blockiert die Replikation des Virusgenoms und hindert somit die Virusvermehrung [30]. Voraussetzung für die Therapie mit Veklury ist ein Mindestalter der Patienten von zwölf Jahren und eine diagnostizierte Pneumonie mit Sauerstoffpflichtigkeit. Zudem sollte bei Therapiebeginn die Symptombdauer unter sieben Tagen liegen und eine positive SARS-CoV-2 PCR innerhalb der letzten 48 Stunden vorliegen. Eine permanente Überwachung der Nieren- und Leberwerte während der Therapie und ein Behandlungsstopp bei einem Anstieg der Leberwerte und/ oder bei einem Abfall der GFR unter 30 ml/min ist erforderlich. Dies gilt auch bei Anzeichen einer Unverträglichkeit. Es sollte keine Komedikation mit Hydrochloroquin aufgrund einer möglichen Wirkungsbeeinträchtigung von Remdesivir erfolgen. Seit dem 20.11.2020 rät die WHO offiziell eher von der Anwendung von Remdesivir ab und begründet dies durch einen fehlenden positiven Effekt auf die Mortalität. Die WHO-Empfehlung stützt sich hierbei auf die Ergebnisse der eigens durchgeführten "SOLIDARITY" Studie und einer Metaanalyse aller bisherigen Studiendaten zu dem Präparat [39].

Kortikosteroid-Arzneimittel werden in der Medizin zur Behandlung von Entzündungsreaktionen durch Suppression des Immunsystems und Reduktion einer überschießenden Immunantwort verwendet. Bei eindeutiger Indikation dürfen die Substanzen bei COVID-19 Erkrankten therapeutisch eingesetzt werden. Basierend auf den Daten einer RECOVERY-Studie, welche im Juli 2020 im New England Journal for Medicine veröffentlicht wurde, ist eine Gabe von Dexamethason

1 Einleitung

bei invasiv beatmeten COVID-19 Patienten mit einer Mindestliegezeit von sieben Tagen indiziert [39]. Die Studie zeigte bei COVID-19 Patienten, die das Kortikosteroid Dexamethason erhielten, gegenüber Patienten mit der üblichen medizinischen Versorgung, eine signifikante Senkung der 28 Tage Mortalität und schnellere Genesung, vor allem bei invasiv beatmeten Patienten mit einer Liegezeit von über einer Woche. Bei sauerstoffpflichtigen und nicht-invasiv beatmeten Patienten konnte ebenfalls eine verringerte Mortalität verzeichnet werden, jedoch in vergleichsweise geringerer Ausprägung. Für Patienten ohne Bedarf einer Sauerstoffzufuhr konnten keine positiven Effekte einer Therapie mit Dexamethason festgestellt werden [56]. Eine im September im JAMA veröffentlichte Meta-Analyse bestätigt den positiven Effekt einer Kortikosteroidtherapie bei Patienten mit schwer bis kritischen Krankheitsverlauf auf die Senkung der 28-Tage Mortalität [39, 62].

Eine spezifische Therapie gegen das SARS-CoV-2 bieten direkt antiviral wirksame monoklonale Antikörper. Wichtig bei diesen Substanzen ist eine frühzeitige Gabe nach Infektion [39]. Die Antikörper binden an das Spike-Protein des SARS-CoV-2 und verhindern somit den Eintritt des Virus in die Wirtszelle [15]. Aktuell werden verschiedene Antikörper in Studien untersucht. Für den Antikörper Bamlanivimab (Ly-CoV 555) und die Kombination Casirivimab plus Imdevimab wurden bereits vielversprechende Ergebnisse in randomisierten Placebokontrollierten Phase-II-Studien präsentiert. Die Daten zeigen für beide Präparate eine Reduktion von schwerwiegenderen Krankheitsverläufen im Sinne verminderter Krankenhauseinweisungen und Notfallaufnahmen bei Risikopatienten. Es profitierten COVID-19 Patienten mit leichten bis mäßigen Krankheitsverlauf von der Therapie. Für COVID-19 Patienten in einem späteren Erkrankungsstadium konnte kein Benefit bei einer Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern gezeigt werden [15, 39].

Die FDA veranlasste bereits eine Notfallzulassung für Bamlanivimab (09.11.2020) und die Kombination Casirivimab plus Imdevimab (21.12.2020). Indikation für die Therapie mit den Präparaten ist eine Infektion mit SARS-CoV-2 im Anfangsstadium mit bis dahin milden Krankheitsverlauf. Die infizierten Patienten müssen zudem zu der Risikogruppe für einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf gehören. Aufgrund der mangelnden Studienlage ist eine Therapie mit den monoklonalen Antikörper in Deutschland bislang weder vertretbar, noch sind die Präparate verfügbar [39].

1 Einleitung

Ein weiterer Behandlungsansatz ist der Januskinase-Inhibitor Baricitinib, welcher in Europa bereits zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen ist. Baricitinib wirkt immunmodulierend und entzündungshemmend. Das Präparat wird derzeit in Studien untersucht. Erste Ergebnisse zeigen eine verkürzte Liegezeit und schnellere Genesung bei schwerer erkrankten COVID-19 Patienten bei Behandlung mit Baricitinib in Verbindung mit Remdesivir. Auf Grundlage dieser Daten hat die FDA am 19.11.2020 eine Notfallzulassung für die Kombinationstherapie Baricitinib plus Remdesivir für COVID-19 Patienten mit mindestens Sauerstoffbedürftigkeit erteilt. In Deutschland ist die Anwendung von Baricitinib zur Behandlung von SARS-CoV-2 Patienten nicht angezeigt [15, 39].

Die Gabe von Rekonvaleszentenplasma ist ein weiterer Therapieversuch. Eine sicherer Wirkungsnachweis steht jedoch noch aus, weshalb die Verabreichung kritisch betrachtet wird [39].

Auch die Verwendung von IL-6-Rezeptor Antagonisten wurde als Behandlungsoption untersucht. Bei einigen Patienten verursacht die Infektion mit SARS-CoV-2 eine überschießende Immunantwort in Form eines Zytokinsturms mit hohen Spiegeln an IL-6 und Ferritin. Eine Blockade des IL-6 Rezeptors sollte diese fulminante Entzündungsreaktion des Körpers vermindern. Eine Studie zu dem IL-6-Rezeptor Antagonist Tozilizumab konnte in einer Phase 3 Studie außer einer Verkürzung der Liegezeit keine positiven Effekte bezüglich Mortalität und Gesundheitszustand gegenüber einer Placebobehandlung zeigen. Eine Gabe außerhalb von klinisch kontrollierten Studien kann somit nicht gerechtfertigt werden [8, 39].

1.1.7 Impfstoffe

Stand: Januar 2021

Erfolg versprechende Mittel gegen COVID-19 sind die innerhalb eines Jahres entwickelten Impfstoffe mit dem Ziel Erkrankungen zu verhindern. Die Impfstoffe induzieren die Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern gegen das Spike Protein des SARS-CoV-2 Virus beziehungsweise Teilbereiche dessen (rezeptor binding domain, RBD) [13, 22].

Es sind viele verschiedene Impftypen in der Entwicklung, darunter die Nukleinsäure basierten

1 Einleitung

Impfstoffe, welche bislang am vielversprechendsten sind. Speziell aus dieser Impfstoffklasse hervorzuheben sind die mRNA basierten Impfstoffe von BioNTech/ Pfizer und Moderna/ NIAID, welche eine Wirksamkeit von etwa 95% aufweisen. Ein weiterer Impfstoffkandidat, entwickelt von University of Oxford/ Astra Zeneca, verwendet virale Vektoren zur Induktion einer schützenden Immunantwort [22].

Der Impfstoffkandidat von BioNTech/ Pfizer wurde am 21.12.2020 in der EU zugelassen und befindet sich seit 27.12.2020 in der klinischen Anwendung [13]. Da die Forschungsdaten von Beginn an die Zulassungsbehörden übermittelt wurden, die Nachbeobachtungszeit nur zwei Monaten entspricht, in denen jedoch der Großteil möglicher Nebenwirkungen und Komplikationen erfasst werden kann und die drei Phasen der klinischen Prüfung fließend ineinander übergangen beziehungsweise zu 1/2 und 2/3 zusammengezogen wurden, wurde eine schnelle und dennoch kontrollierte Zulassung ermöglicht. Um einen ausreichenden Schutz zu schaffen, sind zwei Impfungen notwendig [22].

Seit 06.01.2021 ist auch der mRNA Impfstoff von Moderna/ NIAID in der EU zugelassen. Die EMA prüft derzeit zudem den Impfstoff von Astra Zeneca/ University of Oxford, für welchen am 12.01.2021 eine Zulassung beantragt wurde [13].

Mögliche Nebenwirkungen sind überwiegend mild bis mäßig. In etwa ein fünftel der durchgeführten Impfungen treten unerwünschte lokale (Schwellung, Rötung, Schmerz, Druckempfindlichkeit) und systemische (Fieber, Gelenk-, Muskel-, Kopfschmerz, Müdigkeit, Magen-Darm-Symptome) Nebenwirkungen auf. In 0,3% kam es zu einer Lymphadenopathie. Diese Reaktionen sind auf die impfinduzierte Zytokinausschüttung zurückzuführen. Die oben beschriebenen Nebenwirkungen werden bei allen drei Nukleinsäure basierten Impfstoffen genannt [22].

Aktuell sind noch Fragen zu den Impfstoffen offen. Da die Nachbeobachtungszeit nur zwei Monate umfasst, sind potenzielle Langzeitkomplikationen bislang nicht erfasst. Ebenso ist die Dauer der Immunität sowie die Frage nach der Verhinderung einer Reinfektion, asymptomatischen Infektionen und der Infektiosität nicht abschließend geklärt. Zudem sind mögliche seltene Nebenwirkungen und Komplikationen bisher nicht identifiziert [22].

1.2 IL-3 und IL-3 Rezeptor

1.2.1 Struktur und Signalweg

1.2.1.1 Struktur IL-3

IL-3 gehört zu den kurzkettigen Typ-I-Zytokinen, ist 152 Aminosäuren lang, etwa 17 kDa schwer und besitzt die für diese Zytokine typische dreidimensionale Struktur, die aus vier α Helices (A, B, C, D) besteht. Jede Helix umfasst etwa 15 Aminosäuren. Die ersten beiden Helices (A, B) verlaufen dabei von der NH₂ zur COOH terminalen Richtung, die anderen beiden (C, D) entgegengesetzt. Die beiden gleichgerichteten Helix sind je durch eine Schleife verbunden. Die AB-Schleife befindet sich dabei unter der CD-Schleife und beide weisen eine β -Konformation auf [10, 28, 52]. Die IL-3 codierende Gensequenz ist lokalisiert auf dem Chromosomenabschnitt 5q31.1 [52].

1.2.1.2 Struktur IL-3 Rezeptor

Der Rezeptor für das IL-3 besteht aus einer α - und β -Kette. Der heterodimere Rezeptor weist die gleiche β Untereinheit wie der IL-5- und GM-CSF-Rezeptor auf, weshalb man IL-3, IL-5 und GM-CSF zu der Familie der β_c (commun)-Zytokine zusammenfasst [4]. CD131 ist der β -Kette entsprechende Oberflächenmarker auf Zellen. Die Rezeptor- α -Kette ist für jedes der Zytokine spezifisch. Für die IL-3-Rezeptor- α -Kette (IL3R α) ist CD123 das immunphänotypische Oberflächenmolekül [20]. Beide Untereinheiten weisen eine extrazelluläre, Transmembran- und zytoplasmatische Domäne auf [4].

IL-3R α ist ein Protein, das 378 Aminosäuren lang ist und eine Masse von etwa 43 kDa besitzt. Codiert ist es auf den Chromosomenbereichen Xp22.3 und Yp13.3 [53]. Die extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit besteht aus drei Fibronectin (Fn) Typ III Anteilen, genauer aus einer Immunglobulin-ähnlichen-N-terminalen Fibronectin III (NTD) Region, einer Fn-Domäne 2 (D2) und einer Fn-Domäne (D3), welche über Gelenkregionen miteinander verbunden sind und zusammen eine schlüsselschlüssel-Konformation aufweisen. Die NTD ist vor IL-3 Bindung sehr flexibel und erleichtert die IL-3-IL-3R α Interaktion auf diesem Weg. Die schlüsselschlüssel-Konformation der drei Fn III Domänen umschließt die vier helikale Gestalt des IL-3. Die IL-3-IL-3R α Bindung findet in Form von Ausbildung wechsel-wirksamer Wasserstoffbrücken,

1 Einleitung

Salzbrücken und Van-der-Waals-Anziehungskräften statt. Es gibt auch eine physiologisch vorkommende Spleißvariante des IL-3R α , wobei diese Isoform nicht die NTD aufweist (SP2). Die Isoform mit der Immunglobulin-ähnliche-N-terminale Ektodomäne wird als SP1 bezeichnet [4, 10, 33].

Der β c-Rezeptor ist ein Protein mit einer Masse von etwa 97 kDa und einer Länge von 897 Aminosäuren. Die codierende Gensequenz liegt auf dem Chromosomenabschnitt 22q12.3 [51]. Er gehört zu den Zytokin-Klasse-I-Rezeptoren. Der Wachstumsrezeptor ist ein stabiles, ineinander verschlungenes Homodimer. Die beiden β c-Untereinheiten, die den β c-Rezeptor bilden, bestehen aus je vier Domänen, die eine Fn III Topologie aufweisen. Verbunden ist das Homodimer durch die Domäne eins der einen und Domäne drei der anderen Untereinheit [4, 34, 7].

1.2.1.3 Signalweg

Bei IL-3 Bindung an den IL-3-Rezeptor findet erst nach Zusammenbau einer Signaltransduktionseinheit die Signalübertragung statt. Die IL-3 Rezeptor-Dimerisierung von α - und β - Untereinheit ist hierbei ein wesentlicher Bestandteil, die IL-3 Rezeptor α -Kette hat dabei primär die Aufgabe das IL-3 zu binden, die β -Untereinheit ist verantwortlich für die Induktion der Signalweiterleitung. Der von der IL-3, IL-5 und GM-CSF gemeinsamen β c-Kette induzierte Signalweg erklärt auch, wieso das GM-CSF, IL-3 und IL-5 ähnliche Wirkungsweisen auf gemeinsamen Zielzellen aufzeigen [4, 11].

Ausgangspunkt ist die Bindung des IL-3 an die IL-3-R α -Kette. Mit einer Dissoziationskonstante von 100-200 nM hat IL-3 eine relativ geringe Bindungsaffinität an IL-3R α . Der IL-3R α ist mit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) assoziiert. Die IL-3-IL-3R α Interaktion bewirkt eine Phosphorylierung der β c-Kette. Es kommt zur Assemblierung der β -Untereinheiten mit der IL-3 gebundenen α -Kette, was bewirkt, dass das IL-3 hochaffin gebunden wird. Die membranproximale und die membrandistale Domäne der β c-Kette leiten unterschiedliche Signalwege ein. Die membranproximale Region aktiviert nach Assemblierung die mit der β c-Kette assoziierte Janus (tyrosin-) kinase 2 (JAK2), das signalwandelnde und Transkription-aktivierende Protein STAT5 und den Transkriptionsfaktor c-myc, der Zellwachstum und -differenzierung reguliert. Dies bewirkt ein Voranschreiten des Zellzyklus und die DNA-Synthese in der Zytokin-stimulierten Zelle.

1 Einleitung

Daneben erfolgt auch über PI-3 und MAP eine Signaltransduktion. Über den von der distalen Region der β c-Kette initiierte Ras-Signalübertragungsweg wird die Apoptose der Zelle inhibiert. Über diese Wege vermittelt IL-3 die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen [10, 11].

1.2.2 Wirkung und Produktion von IL-3

Interleukin 3 wird wie die Kolonie stimulierenden Faktoren zu den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gezählt. Es ist auch unter dem Namen Multi-CSF bekannt, da es pleiotrop wirksam und für die Entstehung vieler Blutzell-Linien zuständig ist, darunter Granulozyten, Makrophagen/Monozyten, dendritische Zellen, Erythrozyten und Thrombozyten. Interleukin 3 ist erforderlich für die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen [2, 10, 16, 54]. Obwohl IL-3 maßgeblich an dem hämatopoetischen Prozess beteiligt ist, zeigen Experimente am Mausmodell jedoch, dass IL-3 Defizienz nicht mit einer ersichtlichen Beeinträchtigung der Hämatopoese einhergeht [2, 10].

IL-3 ist proinflammatorisch wirksam und spielt eine Rolle bei der Regulation der Immunantwort. Es fördert die Bildung von GM-CSF, M-CSF und G-CSF und die Expression deren Rezeptoren. Bei IL-3 Exposition von B- und T-Lymphozyten kann eine vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine derer beobachtet werden [38]. IL-3 bewirkt die Modulation von Oberflächenproteine einiger Immunzellen. Besonderen Einfluss hat es auf die basophilen Granulozyten und deren Aktivierung und Rezeptorexpression [33, 54].

Eine wesentliche Rolle wird IL-3 auch bei der Sepsis zugesprochen. Ein Maus-Experiment zur abdominalen Sepsis identifizierte 2015 IL-3 als ein Zytokin, das verantwortlich für die Auslösung des Zytokinsturms bei Sepsis ist. Es wurde festgestellt, dass eine IL-3 Defizienz vor Sepsis schützte, wohingegen ein hoher Spiegel an IL-3 mit einer hohen Mortalitätsrate einherging [60].

Hauptsächlich wird IL-3 von aktivierten T-Zellen produziert [12, 54]. Aber auch Makrophagen, natürliche Killerzellen, Mastzellen und Eosinophile Granulozyten können IL-3 sezernieren [54].

1 Einleitung

Die Synthese des proinflammatorischen IL-3 wird durch bestimmte Medikamente unterdrückt. Über indirekte Hemmung von dem Transkriptionsfaktor nuclear factor of activated T-cells (NFAT) verhindert beispielsweise Cyclosporin die Produktion von IL-3 und anderer entzündungsfördernder Zytokine [23].

1.2.3 Expression und Regulation von IL-3 Rezeptor

1.2.3.1 IL-3 abhängige Expression und Regulation

Die AG Mack hat in eigenen Studien gezeigt, dass IL-3 bei IL-3 sensitiven Immunzellen eine vermehrte Expression des IL-3R α (CD123), sowie insbesondere eine Runterregulation des IL-3R β c (CD131) bewirkt. CD123 und CD131 Expression auf der Oberfläche dieser Zellen können somit auch als Maß für T-Zellaktivität fungieren, da diese bekanntlich die Hauptquelle für IL-3 sind [12, 54].

Besonders ist dieser Effekt bei den IL-3 empfindlichen Basophilen Granulozyten zu beobachten. Basophile exprimieren beide Ketten des IL-3R in hohen Leveln und regulieren insbesondere die Expression des CD131 stark IL-3 abhängig. Sie können somit auch als zuverlässiger Marker für T-Zellaktivität betrachtet werden [10, 64]. Die Rezeptoren für GM-CSF und IL-5 sind auf den Basophilen nur gering ausgeprägt [10].

Die Abbildung zeigt die Regulation der IL-3- β c - Kette abhängig von der Zytokinexposition der Basophilen Granulozyten. Ganz links von der Abbildung ist die CD131 Expression von unstimulierten Basophilen als Ausgangsbasis dargestellt. Es ist zu sehen, dass der CD131 Oberflächenmarker bei Stimulation mit IL-3 signifikant herunterreguliert wird und es ist ersichtlich, dass die Basophilen im Vergleich gegenüber anderen Zytokinen am empfindlichsten gegenüber der IL-3 Exposition reagieren.

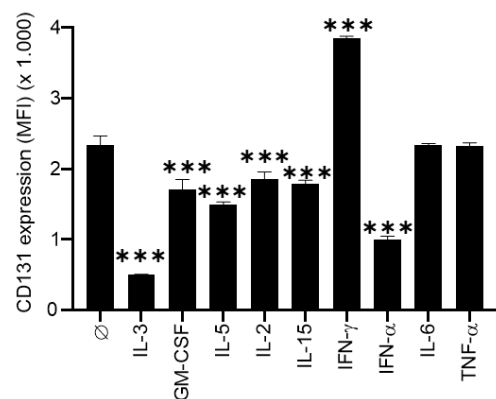


Abb. 1.1: CD131 Regulation auf Basophilen in Abhängigkeit der Zytokinexposition. Aus Tiefenböck, C., (2024), Untersuchung der Aktivierung von Monozytensubpopulationen bei Patienten mit COVID-19 [57]

1 Einleitung

Auch pDCs exprimieren den IL-3R. IL-3 stimuliert die pDCs, was sich mitunter in einer Hochregulation der IL-3R- α -Kette äußert und exprimieren die T-Zell-Co-Stimulatoren. Die aktivierten pDCs sind befähigt eine T-Zell vermittelte Immunantwort auszulösen und eine vermehrte IL-3, IL-4 und IL-10 Sekretion der T-Lymphozyten zu induzieren [10, 21]. Da die T-Zelle insbesondere bei entzündlichen Prozessen wiederum Hauptquelle für IL-3 ist, kann die Aktivität von pDCs, die anhand der Expression des IL3R auf pDCs gemessen werden kann, Rückschlüsse auf die T-Zellaktivität geben [10]. Plasmazytoide dendritische Zellen exprimieren neben dem IL-3R auch den Rezeptor für GM-CSF, jedoch nur gering den IL-5R.

In der nebenstehenden Abbildung ist die Regulation der IL-3 β c-Kette auf plasmazytoiden dendritischen Zellen in Abhängigkeit der Zytokinexposition zu sehen. Ganz links von der Abbildung ist die CD131 Expression von unstimulierten pDCs als Ausgangsbasis dargestellt. Es ist zu sehen, dass der CD131 Oberflächenmarker bei Stimulation mit IL-3 signifikant herunterreguliert wird. Maßgeblich Einfluss auf die Herunterregulation des CD131 hat auch GM-CSF.

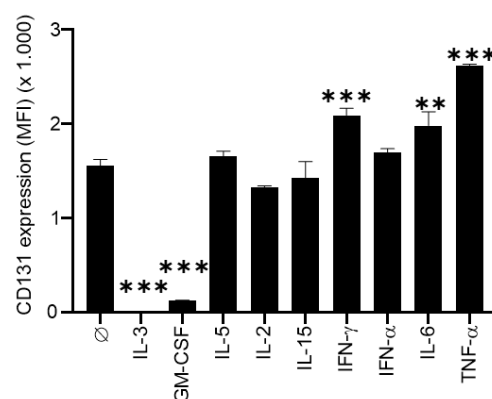


Abb. 1.2: CD131 Regulation auf pDCs in Abhängigkeit der Zytokinexposition. Aus Tiefenböck, C., (2024), Untersuchung der Aktivierung von Monozytensubpopulationen bei Patienten mit COVID-19 [57]

Eine IL-3R Expression kann auch für aktivierten T_H -Lymphozyten beobachtet werden. Im naiven Zustand weisen die CD4+ T-Zellen keinen IL-3R auf, jedoch wird die Translokation dessen auf die Zelloberfläche nach Antigenkontakt induziert und kann durch IL-4 zusätzlich verstärkt werden. Die aktivierten IL-3R+ CD4+ Lymphozyten sind meist ein T_H2 -Zelltyp. IL-3 erhöht deren Effektorfunktion in Form einer vermehrten Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13. Eine Hochregulation von CD123 kann zudem bei Proliferation der CD4+, CD8+ T-Zellen und B-Zellen beobachtet werden [27, 38].

Für Eosinophile Granulozyten wurde ebenfalls bei IL-3 Exposition eine starke Hochregulation von CD123 beobachtet. Auch GM-CSF und IL-5 zeigen einen positiven Effekt auf die IL-3R α Expression, jedoch hat IL-3 die größte Wirkung. Man vermutet eine wesentliche Rolle des IL-3 bei der lokalen Aktivierung von Eosinophilen Granulozyten [17, 64, 65].

1 Einleitung

1.2.3.2 IL-3 unabhängige Expression und Regulation

Monozyten exprimieren die IL-3R- α -Kette. Eine vermehrte Translokation der IL-3R- α -Kette auf die Zelloberfläche ist Zeichen einer erhöhten Monozytenaktivität [31]. In vorangegangenen Studien konnte die AG Mack zeigen, dass die CD123 Hochregulation auf der Zelloberfläche von Monozyten auch Zeichen erhöhter T-Zellaktivität ist.

Abbildung 1.3 zeigt die Regulation der IL-3 α -Kette auf Monozyten in Abhängigkeit der Zytokinexposition. Ganz links von der Abbildung ist die CD123 Expression von unstimulierten Monozyten als Ausgangsbasis dargestellt. Es ist zu sehen, dass IL-3 zwar Einfluss auf die Hochregulation des CD123 auf Monozyten hat, aber dies auch viele andere Zytokine bewirken. So haben GM-CSF und IL-15 eine stärkere Wirkung als IL-3 auf die Translokation des IL-3R α auf die Zelloberfläche und auch IL-2 und Interferone können wesentlich dazu beitragen.

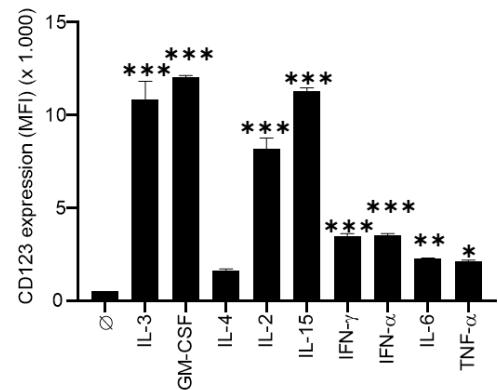


Abb. 1.3: CD123 Regulation auf Monozyten in Abhängigkeit der Zytokinexposition. Aus Tiefenböck, C., (2024), Untersuchung der Aktivierung von Monozytensubpopulationen bei Patienten mit COVID-19 [57]

CD123 und dessen Expression auf leukämischen Stammzellen hat zudem in der Onkologie als Biomarker an Wert gewonnen. Auf leukämischen Stammzellen ist er stark ausgeprägt und maligne Zellen können über die starke IL-3R α Expression identifiziert werden [4, 10, 50].

1.3 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, die IL-3 Konzentration im Blut von COVID-19 Patienten und die Expression des IL-3-Rezeptor zu untersuchen, wobei eine Kohorte gesunder Probanden als Kontrollbeziehungsweise Vergleichsbasis dient.

Vor allem bei schweren COVID-19 Erkrankungen ist eine dysregulierte, überschießende Immunantwort im Sinne eines Zytokinsturms zu beobachten, die Ähnlichkeiten zu der Entzündungsre-

1 Einleitung

aktion des Körpers bei Sepsis aufweist [39, 19]. In einem Mausmodell zur Sepsis wurde 2015 das Interleukin 3 als ein Zytokin identifiziert, das am Anfang der Entzündungskaskade steht und es wird als Auslöser der überschießenden Immunantwort bezeichnet [60].

Diese Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass das IL-3 bei einer COVID-19 Erkrankung eine wesentliche Rolle spielt. Anhand der durchgeführten Versuche soll ein potenzieller Zusammenhang des IL-3 Blutspiegels mit der Erkrankungsschwere beleuchtet werden.

Die Analyse der Expression des IL-3 Rezeptors auf Immunzellen, darunter pDCs, Monozyten, Basophile und Neutrophile Granulozyten, soll Aufschluss darauf geben, ob die Translokation des IL-3 Rezeptors auf die Zelloberfläche in Korrelation mit der Schwere der COVID-19 Erkrankung steht. Im Rahmen der Arbeit wird zudem die Expression anderer Rezeptoren (CD11b) auf den Immunzellen mit untersucht.

Um mögliche, von der Infektionsschwere abhängige, Unterschiede in der zellulären und humoralen Immunantwort zu erfassen, werden Versuche mit unstimuliertem und mit anti-CD3 stimuliertem Patientenvollblut durchgeführt. Zur Untersuchung des Einflusses von IL-3 auf die Immunreaktion erfolgen zudem Versuche mit und ohne Beigabe eines anti-IL-3 Antikörpers.

Die Zugabe des T-Zell stimulierenden Antikörpers anti-CD3 lässt zugleich Aussagen über die T-Zellaktivität beziehungsweise -reaktivität bei den Patienten zu. Da die Datenlage diesbezüglich bei COVID-19 Patienten derzeit noch widersprüchlich ist, ist der Ansatz mit anti-CD3 Stimulation zur Untersuchung der T-Zellreaktivität ein zusätzlicher interessanter Punkt.

Darüber hinaus sollen neben IL-3 auch die Konzentrationen von GM-CSF und IFN γ betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Arbeitswerkzeug

Laborgeräte/ Arbeitswerkzeug	Hersteller
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg
Platten-Reader infinite 200Pro	TECAN, Männedorf, Schweiz
Mikrotiterplatten-Washer WEIIWASH-VERSA	Thermo Scientific, Waltham, USA
Multipette M4	Eppendorf, Hamburg
Aufsätze Multipette 0,5/25/50 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10/20/100/200/1000) μ l	Gilson International, Nimburg
Transferpette	Brand, Dresden
Manuelle Pipet-Lite XLS - Adjustable Spacer - Mehrkanalpipette	Rainin by Mettler Toledo, Columbus, USA
Pipettenspitzen für Pipet-Lite XLS	Rainin by Mettler Toledo, Columbus, USA
Glas Pasteurpipette	Brand, Dresden
Absaugpumpe Flüssigkeiten	Duran, Wertheim/Main
Sterilbank Jouan MSC 12	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge (Megafuge 16R)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2 Schüttelgerät	Scientific Industries, Bohemia, New York
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn

2 Material und Methoden

Laborgeräte/ Arbeitswerkzeug	Hersteller
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf, Hamburg
serologische Pipette (5/ 10 / 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10/ 200/ 1000 μ l)	nerbe plus, Winsen
Pipettenspitzen m. Filter (200/ 1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg
Deep-Well-Platte, 96-Well, U-Boden	nerbe plus, Winsen
Microplate, 96-Well, Flachboden	Sarstedt, Nürnberg
Mikroplate, 96-Well, V-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polystyrolröhrchen für FACS (5ml)	Falcon Brand Products, Corning, USA
Falcon (15/ 50 ml); Tubes (0,5/ 1,5/ 2,0 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Butterfly (Kanülen)	Sarstedt, Nürnberg
S-Monovetten 7,5 ml LH	Sarstedt, Nürnberg

Tab. 1: Geräte und Arbeitswerkzeug

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Counting beads	Life technologies, Carlsbad, USA
FACS Lysing Solution	BD Bioscience, Heidelberg
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS)	Life technologies, Carlsbad, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium	gibco by Life technologies, Carlsbad, USA
TMB Substrat A und B	BioLegend, Fell
Streptavidin-HRP-B	R&D Systems, Abington, UK
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe

Tab. 2: Chemikalien

2.1.3 Antikörper für extrazelluläre FACS-Färbungen

Antikörper	Konjugat	Klon	Hersteller/Firma	Verdünnung
CD14	V500	MφP9	BD Bioscience	1:100
CD16	Pacific Blue	3G8	Biologend	1:100
CD193	APC-Cy7	5E8	Biologend	1:40
CD11b	PE-Cy7	M1/70	Biologend	1:100
CD304	APC	12C2	Biologend	1:40
CD131	PE	1C1	Biologend	1:100
CD123	PerCP	9F5	BD Bioscience	1:20
CD116	FITC	4H1	Biologend/ Invitrogen	1:40

Tab. 3: Antikörper für extrazelluläre FACS-Färbung

2.1.4 Zytokine, Antikörper

Zytokin/Antikörper	Hersteller
Anti-Hu CD3, Klon OKT3	eBioscience, San Diego, USA
Anti-IL-3 Ak	AG Mack
Mouse IgG κ isotype control (MOPC-21)	BioXCell, West Lebanon, USA
rekombinates humanes IL-3	BioLegend, Fell
AK-13-HRP, Clone 13	AG Mack
Human GM-CSF DuoSet ELISA	R&D Systems, Abington, UK
Human IFN γ DuoSet ELISA	R&D Systems, Abington, UK

Tab. 4: Antikörper und Zytokine

2.1.5 Auswertungsprogramme

Auswertungsprogramm	Hersteller
FACS DIVA	BD Bioscience, Heidelberg
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
Tecan i-control	TECAN, Männedorf, Schweiz
Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA

Tab. 5: Auswertungsprogramme

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

Im Zeitraum vom März 2020 bis Juli 2020 wurden Patientenblutproben erhalten. Die Aufklärung des Patienten, beziehungsweise bei beatmeten Patienten des rechtlichen Betreuers, erfolgte im Rahmen einer größeren COVID-19 (COVUR-THR) Studie durch die Stationsärzte. Beteiligte Stationen der Uniklinik Regensburg waren die Intensivstationen 90, 91 und 93, auf welchen die schweren COVID-19-Fälle behandelt wurden, sowie die Normalstation 11, auf welcher die Patienten mit mildereren Verläufen einer SARS-CoV-2 Infektion, wie auch Patienten mit Verdacht auf COVID-19 lagen. Bei einigen Erkrankten wurden Blutproben über einen längeren Zeitraum gesammelt. Dies ermöglicht neben einer Gesamtbetrachtung auch Unterschiede im Krankheitsverlauf zu analysieren und zu beurteilen. Insgesamt belief sich die Anzahl an Blutproben auf 188 von 55 verschiedenen Patienten. Zudem wurde von 42 Kontrollprobanden Blut abgenommen, um eine Vergleichsbasis zu schaffen. Es erfolgte eine Einteilung der Personen in die drei Gruppen: „gesund“ (Kontrollgruppe), „nicht-beatmet“ und „beatmet“, wobei die letzte Gruppe wiederum nach dem Outcome in „überlebend“ und „verstorben“ eingeteilt wurde. Patienten von denen mehrmals Blut erhalten wurde und im Verlauf eine Änderung bezüglich dem Einteilungskriterium Beatmung stattgefunden hat, wurden in beiden Gruppen erfasst (insgesamt 14).

2.2.2 Vollblutstimulation

Von dem erhaltenem Vollblut wurden für jeden Patienten jeweils vier Ansätze in einem FACS-Röhrchen gemacht. Zu Beginn des Proben Tages wurden FACS-Röhrchen mit anti-CD3 gecoatet (beschichtet). Hierfür wurde in jedes Röhrchen 300 μ l anti-CD3 (5 μ g/ml in RPMI-Medium) gegeben und für 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach diesen 4 Stunden wurden die Röhrchen einmal mit 0,9 % NaCl gewaschen. Für jeden Patienten wurden zwei der beschichteten Röhrchen, sowie zwei unbeschichtete verwendet. In jedes der insgesamt vier Röhrchen pro Patient wurde 100 μ l Patientenblut vorgelegt und mit verschiedenen Reagenzien versetzt. In je ein gecoatetes und unbeschichtetes Röhrchen wurde 200 μ l reines RPMI-Medium beziehungsweise 200 μ l anti-IL-3 Ak (10 μ g/ml in RPMI-Medium) zugegeben. Der anti-IL-3 Ak ist ein von der AG Mack eigen entwickelter blockierender Antikörper gegen das IL-3. Die Ansätze wurden gevortext, mit Aluminiumfolie abgedeckt und schließlich für 23,5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Überstand abgenommen, die Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.3 Zellkulturansätze

Es konnten von 26 nicht-beatmeten (insgesamt 37 Proben) und von 18 beatmeten (insgesamt 40 Proben) Patienten PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) gesammelt werden. Die Gruppe der beatmeten Patienten wurde wie bei den Vollblutuntersuchungen in die Subgruppen „überlebend“ (16, insgesamt 37 Proben) und „verstorben“ (2, insgesamt 3 Proben) unterteilt. Die PBMCs wurden bereits von einem Team der Mikrobiologie aus dem Vollblut isoliert und eingefroren. Zu den mononukleären Zellen des peripheren Blutes gehören vor allem Monozyten und Lymphozyten, sowie zu einem geringen Teil dendritische Zellen [24].

Von den isolierten Immunzellen wurden mit verschiedenen Stimulanzien versetzte Zellkulturen angesetzt und nach eintägiger Inkubation die Überstände abgenommen und der Zellrest durchflusszytometrisch analysiert.

Die Versuchsreihe zu den PBMC wurde zusammen mit meiner Kommilitonin Charlotte Tiefenböck erarbeitet. Da diese die Zellkulturen angesetzt hat, wird nur ein kurzer Überblick zu diesem Teil der Arbeit geschaffen.

Vorgesehen waren 10 Zellkulturansätze pro Patient. Es sollte je eine Stimulation mit aCD3, aCD3 + IL-2, IL-3 und LPS + IL-4 sowie ein Ansatz nur mit dem Medium erfolgen und zudem Doppelwerte erhoben werden. Aufgrund der geringen Zellzahl in einigen Proben konnten jedoch oftmals nur weniger Ansätze erfolgen. Bei dem Fall, dass die Zellzahl nur für einen Ansatz reichte, wurde mit aCD3 stimuliert.

Die Abnahme des Überstands nach eintägiger Inkubation der Proben im Brutschrank bei 37°C und die Zytokin-ELISA aus den Überständen, welche wie bei den Vollblutstimulation vorerst eingefroren wurden, ist Bestandteil dieser Arbeit.

2.2.4 Durchflusszytometrie und extrazelluläre FACS-Färbung

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die Leukozyten hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker und Größe sortiert und gezählt. Das dazu verwendete FACS (fluorescence-activated cell sorter) misst die Streulichteigenschaften der Zellen. Hierbei unterscheidet man das Forward Scatter (FSC), was Aussagen zur Zellgröße zulässt und das Sideward Scatter (SSC), was Informationen zur Zellgranularität liefert. Die Zugabe von fluoreszierenden Antikörper, welche an die Zellen koppeln, erlaubt die Charakterisierung der Oberflächenproteine und somit die Zuordnung zu den jeweiligen Zelltypen. Ein Mastermix aus acht verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern, welcher bei den Vollblutproben verwendet wurde, ermöglicht vor allem die Identifizierung von pDCs, Basophilen, sowie Neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie die Beurteilung der Expression der IL-3R- α - und β -Kette auf den Immunzellen.

Um die Leukozyten erfolgreich zu detektieren, wurden die Vollblutansätze für 20 Minuten mit dem zubereiteten Mastermix im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Vor der Zugabe der Antikörpermischung wurden jedoch erst je 130 μ l Überstand der Patientenproben der Vollblutstimulation beziehungsweise 200 μ l bei den PBMC-Proben von den 300 μ l Ausgangsvolumen abpipettiert und in Tubes eingefroren, um damit zu einem späteren Zeitpunkt Zytokin-ELISAs durchzuführen. Im Anschluss an die Färbung wurden die Proben mit 0,9 % NaCl abgestoppt und gewaschen. Der Waschgang besteht aus der Zugabe des NaCl, der Zentrifugation der Probe bei 4°C für 7 Minuten und dem Absaugen bis zu einem Restvolumen der Probe von etwa 300 μ l. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Proben der Vollblutstimulation anschließend für 10 Minuten mit

FACS-Lysing-Solution bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und anschließend wiederholt mit 0,9 % NaCl abgestoppt und gewaschen. Bei den PBMC-Proben war der Lyse-Schritt nicht erforderlich. Das Endvolumen von etwa 300 μ l ist abschließend mit je 20 μ l Counting-beads versetzt worden. Diese fluoreszierenden Teilchen ermöglichen die Zellzahlbestimmung in den Proben [46].

Die Ergebnisse bezüglich der Leukozytenzahlen werden in der Doktorarbeit von Charlotte Tiefenböck präsentiert, da sie in ihren Versuchen die Zellsubtypen näher spezifiziert hat.

2.2.5 Zytokin-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Mithilfe von ELISAs (enzyme-linked Immunosorbent-Assay) wurden die eingefrorenen Überstände hinsichtlich der Menge an dem in den Proben enthaltenem IL-3, GM-CSF und IFN γ untersucht.

Enzyme-linked Immunosorbent Assays basieren auf einer Antikörper-vermittelten enzymatischen Farbreaktion. Die Durchführung der ELISAs erfolgte in Form von Sandwich-ELISAs. Hierbei wird die Probe auf eine Oberfläche gegeben, die mit einem gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten Erstantikörper (Capture-Antikörper) gecoatet ist. Anschließend wird ein Zweitantikörper (Detection-Antikörper) zugegeben, der wiederum an das zu bestimmende Zytokin bindet. Wenn dieser Zweitantikörper bereits mit einem Enzym konjugiert ist, wird nach Zugabe eines bestimmten Substrates die Farbreaktion ausgelöst. Meist ist jedoch ein zusätzlicher Schritt erforderlich, in dem die Konjugation des Enzyms an den Detection-Antikörper über ein unspezifisch an die Zweitantikörper bindendes Enzym-gekoppeltes Protein vermittelt wird[26].

Für die ELISA wurde für jedes der drei Zytokine eine 96-Well-Flachbodenplatte mit 60 μ l/ Well des jeweiligen Capture-Antikörpern über Nacht gecoatet. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit PBS. Am Durchführungstag der ELISAs sind zuerst die eingefrorenen Überstände zum Auftauen aus dem Gefrierschrank geholt und die Flachbodenplatten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 100 μ l 1 % BSA in PBS pro Well für eine Stunde geblockt worden. Die Überstände wurden mit 1 % BSA in PBS in 96-Well-V-Bodenplatten vorverdünnt, die für den GM-CSF ELISA 1:5, die für den IFN γ ELISA 1:30. Die Proben für den IL-3 ELISA

2 Material und Methoden

wurden 1:2 verdünnt, wobei hier zuvor der Antikörper MOPC-21 (100 $\mu\text{g/ml}$) in dem zur Verdünnung verwendeten 1 % BSA in PBS gelöst und die Überstände dann eine Stunde präinkubiert worden sind. Der zugegebene Antikörper blockiert Bindestellen anderer Plasmaproteine (z.B. von heterophilen Antikörpern, die gegen Maus-Immunglobuline gerichtet sind), die ansonsten durch Bindung an den Capture- und Detection-Antikörper zu einem fälschlich hohen Betrag an IL-3 in der Probe führen würden.

Um letztlich die Zytokinkonzentrationen in den Überständen bestimmen zu können, wurde jede der Platten mit einer doppelten Standardreihe versehen. Der Standard ist eine Verdünnungsreihe über sieben Wells bekannter Konzentration des Zielmoleküls. Das letzte, achte Well der Standardreihe dient als Kontrollwert, da sich kein Zytokin darin befindet und somit unspezifischer Bindungen überprüft werden können.

Nach dem Blocken wurden die Flachbodenplatten wiederholt gewaschen, die vorverdünnten Proben und die Standards mit je 60 μl Well auf die Platten pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschgang und daraufhin die Inkubation der Proben mit 60 μl Well des jeweiligen Detection-Antikörpers für eine Stunde beziehungsweise bei IL-3 für eineinhalb Stunden im Dunklen bei Raumtemperatur. Bei den GM-CSF und IFN γ Flachbodenplatten wurde schließlich nach nochmaligem Waschen für 20 Minuten 60 μl Well Streptavidin-HRP-B, ein Enzym-gekoppeltes Protein, pipettiert. Nach wiederholtem dreimaligen Waschen der Platten wurden die Proben mit 100 μl Well TMB (Tetramethylbenzidin)-Substrat A und B versetzt, was je nach Zytokinmenge unterschiedlich starke Farbreaktionen auslöste. Nach etwa 20 Minuten wurde die Reaktion mit 50 μl Well Schwefelsäure (H_2SO_4) abgestoppt.

Mit Hilfe eines ELISA Plattenreader wurde bei einer Absorbtionswellenlänge von 450 nm und einer Referenz von 540 nm die Farbintensität der einzelnen Wells bestimmt.

Die Auswertung erfolgte über Excel anhand der Standard-Eichkurve.

2 Material und Methoden

Lösungen	Zusammensetzung
Verdünnungs- und Blockpuffer	1% BSA in PBS
Coatinglösung IL-3	Anti IL-3 Coat (5 µg/ml Anti-IL-3 Ak in PBS)
Coatinglösung GM-CSF, IFN γ	Anti GM-CSF Coat (2 µg/ml Anti-GM-CSF Ak in PBS) Anti IFN γ Coat (2 µg/ml Anti-IFN γ Ak in PBS)
Waschpuffer	1xPBS + 0,05% Tween 20
Detection-Ak-Lösung IL-3	400 ng/ml in 1% BSA in PBS
Detection-Ak-Lösung GM-CSF, IFN γ	75 ng/ml in 1% BSA in PBS
Streptavidin-HRP-B-Lösung	40-fache Verdünnung in 1% BSA in PBS
TMB-Substrat-Lösung	1:1 TMB A + TMB B
Stopplösung	12,5% Schwefelsäure
Standard-Verdünnungsreihe IL-3	500 pg/ml - 7,8 pg/ml IL-3 in 1% BSA in PBS
Standard-Verdünnungsreihe GM-CSF, IFN γ	1000 pg - 15,6 pg GM-CSF, IFN γ in 1% BSA in PBS

Tab. 6: Lösungen und deren Zusammensetzung für den IL-3, GM-CSF und IFN γ ELISA

2.2.6 Datensammlung und Auswertung

Die klinischen und demografischen Daten der Patienten und Kontrollprobanden wurden in Excel in Listenform erfasst. Mittels der Arztbriefe wurden die Patientendaten gesammelt. Die Zytokinexpression wurde mit Hilfe der TECAN Software analysiert und die Ergebnisse mittels Excel dargestellt. Auch die Ergebnisse der extrazellulären Zellanalysen wurden in Excel aufgenommen und mit den Patienten und den entsprechenden Daten der Zytokinexpression korreliert. Für die Auswertung der extrazellulären FACS-Analyse wurde die FACS-DIVA-Software verwendet.

2.2.7 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse und für die Darstellung der Ergebnisse in Form von Diagrammen wurde die GraphPad Prism 8 Software verwendet. Statistische Unterschiede der Mittelwerte mehrerer Gruppen (Zelltypen; Patienten) wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur berechnet. Der Zweistichproben-t-Test wurde für den Vergleich von Mittelwerten zweier Gruppen verwendet. Signifikanzwerte (p-Werte) unter 0,05 wurden mit einem Stern (*p<0,05), unter 0,01 mit zwei Sternen (**p<0,01) und unter 0,001 mit drei Sternen (**p<0,001) markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

3.1.1 Grunddaten

Im Zeitraum vom März 2020 bis Juli 2020 wurden Blutproben von im Uniklinikum Regensburg behandelten Patienten mit einer gesicherten SARS-CoV2 Infektion gesammelt. Die SARS-CoV-2 Diagnostik erfolgte mittels RT-PCR und vorwiegend aus dem Trachealsekret der Patienten. Insgesamt belief sich die Anzahl an Blutproben auf 188 von 55 unterschiedlichen Patienten. Es erfolgte eine Einteilung der Personen in die drei Gruppen „gesund“ (Kontrollgruppe), „nicht-beatmet“ und „beatmet“, wobei die letzte Gruppe wiederum nach dem Outcome in „überlebend“ und „verstorben“ eingeteilt wurde. Die Zuteilung zu „nicht-beatmet“ und „beatmet“ wurde danach entschieden, ob der Patient auf eine mechanische Beatmung angewiesen war. Patienten von denen mehrmals Blut erhalten wurde und im Verlauf eine Änderung bezüglich dem Einteilungskriterium Beatmung stattgefunden hat, wurden in beiden Gruppen erfasst (insgesamt 14). Außerdem wurde von 42 Kontrollprobanden Blut abgenommen, um eine Vergleichsbasis zu schaffen.

Klinische und demografische Charakteristika der Patienten und Kontrollen sind in Tabelle 7 aufgezeigt. Männliche Patienten haben im Vergleich zu weiblichen häufiger einen kritischeren Krankheitsverlauf (80% der Beatmeten sind männlich). Beatmete Patienten haben im Gegensatz zu nicht beatmeten mit 28 zu 10 Tagen eine verminderte Viruseliminierung. Die Viruspersistenz umfasst den Zeitraum ab dem Auftreten der ersten Symptome bis zu der letzten positiven SARS-CoV-2 RT-PCR. Komorbiditäten sind in beiden Gruppen ähnlich ausgeprägt. Bakterielle Superinfektionen, Bedarf einer extrakorporalen Oxygenierung (ECMO) und thromboembolische Komplikationen treten häufiger in der Gruppe der beatmeten COVID-19 Patienten auf.

3 Ergebnisse

	gesund	Covid-19-Erkrankte				
		gesamt	nicht beatmet	beatmet		
				gesamt	überlebend	verstorben
Patientenzahl n	42	55	25	30	23	7
Demografie:						
Durchschnittsalter (Altersspanne)	37,8*** (19-78)	56,8 (19-78)	55,1 (19-78)	58,3 (31-73)	57,7 (31-73)	60,1 (51-68)
Geschlecht (% männlich)	15** (38%)	37 (67%)	13 (52%)	24* (80%)	17 (74%)	7 (100%)
Viruspersistenz:						
Median, Tage		20	10	28 ***	29	23
Comorbidität: n (%):						
Rauchen		5 (9%)	4 (16%)	1 (3%)	1 (4%)	0
Hypertonie		28 (51%)	11 (44%)	17 (57%)	12 (52%)	5 (71%)
Diabetes mellitus		15 (27%)	6 (24%)	9 (30%)	6 (26%)	3 (43%)
cardiovasculär		5 (9%)	4 (16%)	1 (3%)	1 (4%)	0
pulmonal		12 (22%)	6 (24%)	6 (20%)	3 (13%)	3 (43%)
immunsuppressiv		7 (13%)	5 (20%)	2 (7%)	1 (4%)	1 (14%)
Komplikationen: n (%)						
bakterielle Superinfektionen		31 (56%)	5 (20%)	26 (87%)***	20 (87%)	6 (86%)
ECMO		10 (18%)	0	10 (33%)***	8 (35%)	2 (29%)
thromboembolische		14 (25%)	1 (4%)	13 (43%)***	11 (48%)	2 (29%)

Tab. 7: Patienten- und Kontrollkollektiv - demografische & klinische Daten. COVID-19 Patienten wurden unterteilt in nicht-beatmete und beatmete Patienten. Nicht-beatmete Patienten wurden auf Normalstation behandelt und erhielten bei Bedarf Sauerstoff über eine Nasensonde. Beatmete Patienten wurden auf Intensivstation behandelt und mechanisch beatmet. Die beatmeten Patienten wurden zudem unterteilt in die Untergruppen „überlebend“, wenn die Patienten von der Intensivstation entlassen wurden und „verstorben“, wenn der Patient verstorben ist. Viruspersistenz wurde definiert für die Zeitspanne ab dem Tag der erstmals aufgetretenen Symptome bis zu dem Tag der letzten positiven SARS-CoV-2 RT-PCR. Der Zweistichproben-t-Test wurde verwendet um statistische Unterschiede zwischen nicht-beatmeten und beatmeten Patienten, sowie zwischen „Überlebenden“ und „Verstorbenen“ zu erfassen. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3 Ergebnisse

In der folgenden Tabelle (Tab. 8) sind ergänzenden zur obigen Tabelle (Tab.7) die medikamentösen Interventionen beziehungsweise die Therapieansätze zur Behandlung der COVID-19 Patienten aufgeführt.

Aufgrund der vermehrt auftretenden bakteriellen Superinfektionen in der Gruppe der Beatmeten (Tab. 7), wurden in dieser Gruppe sehr häufig Antibiotika eingesetzt (97%). Zudem wurde bei den schwer erkrankten COVID-19 Patienten vermehrt mit Rekonvaleszentenplasma/ Immunplasma (60%) und Glukokortikoiden (40%) therapiert. Bei zwei Patienten (4%) wurde eine Therapie mit Hydroxychloroquine durchgeführt. Nur ein Patient (2%) wurde mit dem antiviral wirksame Medikament Lopinavir/ Ritonavir behandelt (Tab. 8).

	gesund	Covid-19-Erkrankte				
		gesamt	nicht beatmet	beatmet		
				gesamt	überlebend	verstorben
Behandlung: n (%)						
Hydroxychloroquine		2 (4%)	0	2 (7%)	2 (9%)	0
Lopinavir/ Ritonavir		1 (2%)	0	1 (3%)	1 (4%)	0
Immunplasma		23 (42%)	5 (20%)	18 (60%)**	12 (52%)	6 (86%)
Glukokortikoide		17 (30%)	5 (20%)	12 (40%)	9 (39%)	3 (43%)
Antibiotika		38 (69%)	9 (36%)	29 (97%***	23 (100%)	6 (86%)

Tab. 8: Patienten- und Kontrollkollektiv - medikamentöse COVID-19 Behandlung. COVID-19 Patienten wurden unterteilt in nicht-beatmete und beatmete Patienten. Nicht-beatmete Patienten wurden auf Normalstation behandelt und erhielten bei Bedarf Sauerstoff über eine Nasensonde. Beatmete Patienten wurden auf Intensivstation behandelt und mechanisch beatmet. Beatmete Patienten wurden zudem unterteilt in die Untergruppen „überlebend“, wenn die Patienten von der Intensivstation entlassen wurden und „verstorben“, wenn der Patient verstorben ist. Die medikamentöse Behandlung wurde auf Basis der Arztbriefe erfasst. Der Zweistichproben-t-Test wurde verwendet um statistische Unterschiede zwischen nicht-beatmeten und beatmeten Patienten, sowie zwischen „Überlebenden“ und „Verstorbenen“ zu erfassen. (** p<0,01, *** p<0,001).

3.1.2 Laborparameter der Patienten

Schwer erkrankte Patienten zeigen höhere Spiegel an proinflammatorischen Markern auf, darunter CRP und IL-6. D-Dimere als Parameter für intravasale Koagulation sind zudem häufig erhöht. Auch LDH, Bilirubin und CK sind bei der Gruppe der Beatmeten höher, was auf Leber- und Muskeldysfunktion zurückzuführen ist.

	gesund	Covid-19-Erkrankte				
		gesamt	nicht beatmet	beatmet		
				gesamt	überlebend	verstorben
Patientenzahl	42	55	39#	30	23	7
Probenanzahl	42	188	68	120	101	19
Laborwerte (Durchschnitt)						
PCT (ng/ml)		1,6	1,1	1,7	1,1	4,5***
CRP (ml/l)		69,9	35,6	86,1***	76,1	141,2**
Plasma-IL-6 (pg/ml)		85,0	23,9	94,3*	71,1	216,4***
Ferritin (ng/ml)		2721,9	1158,2	3018,5	1561,6	10950,4***
LDH (U/L)		340,2	273,9	370,6***	361,1	423,3
GPT (U/L)		75	62,9	80,7	74,0	116,6*
Billirubin (mg/dl)		2,2	0,9	2,8*	0,9	12,5***
CK (U/L)		125,7	65,5	153,1*	156,7	132,6
D-Dimer (mg/L)		8,2	4,0	8,6*	9,0	6,4
Leukozyten (/nl)		13,0	11,4	13,8	11,5	25,8***

Tab. 9: Patienten- und Kontrollkollektiv - Laborwerte. COVID-19 wurden in nicht-beatmetet und beatmete Patienten unterteilt. Die Beatmeten wurden zudem nach Outcome in die Gruppen „überlebend“ und „verstorben“ eingeteilt. Bei den meisten Patienten konnten mehrere aufeinanderfolgende Blutproben gesammelt werden. 14 Patienten waren zuerst beatmet, wechselten aber im Laufe der Studienzeit zu der Gruppe der Nicht-beatmeten. Diese Patienten wurden in beiden Gruppen erfasst. Der Zweistichproben-t-Test wurde verwendet um statistische Unterschiede zwischen nicht-beatmeten und beatmeten, sowie zwischen den „überlebenden“ und „verstorbenen“ Patienten zu erfassen. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

#14 Patienten wechselten während der Studie von „beatmet“ zu „nicht-beatmet“

3.2 Vollblutanalyse

3.2.1 Analyse der Rezeptorregulation

3.2.1.1 IL-3R β c Regulation auf Basophilen

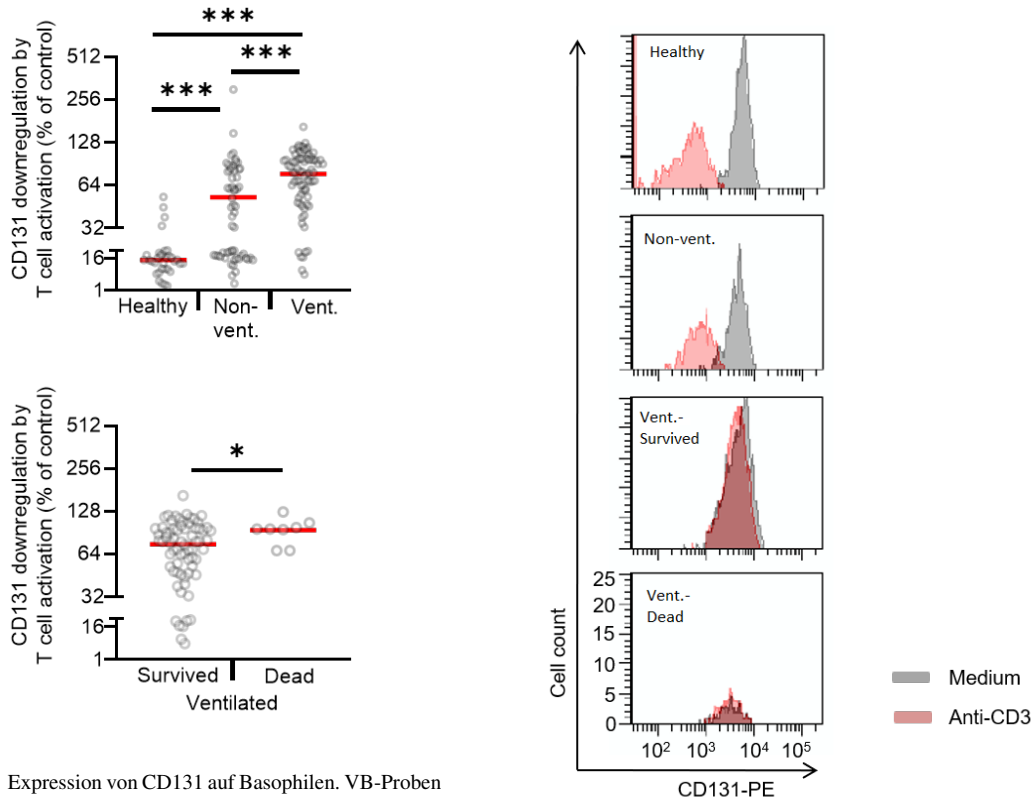


Abb. 3.1: Expression von CD131 auf Basophilen. VB-Proben von 38 Gesunden (Healthy; 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non-vent.; 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent.; Proben) Patienten wurden für 24 h mit und ohne immobilisierten anti-CD3 inkubiert. Beatmete Patienten wurden unterteilt in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben). Die Expression von CD131 wurde mittels FACS quantifiziert. Die Werte bilden das Verhältnis von CD131 Expression mit anti-CD3 und CD131 Expression ohne anti-CD3. Jede Probe ist als Punkt dargestellt und der Mittelwert ist rot markiert. CD131 Regulation auf Basophilen ist ein Maß für T-Zellaktivität (y-Achse). Statistische Unterschiede wurden mittels der einfaktorieller Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur (oberes Diagramm) und den Zweistichproben-t-Test (unteres Diagramm) erfasst. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Abb. 3.2: Repräsentatives FACS Histogramm der VB-Stimulation für Basophile Granulozyten. Vollblut von Gesunden, nicht-beatmeten und beatmeten COVID-19 Patienten wurde für 24 h mit (rot) oder ohne (grau) immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Die Beatmeten COVID-19 Patienten wurden nochmals in die Untergruppen „überlebend“ (survived) und „verstorben“ (dead) unterteilt. Die Expression des Oberflächenmarkers CD131 bei Basophilen Granulozyten wurde mittels FACS quantifiziert. Horizontal ist die CD131 Expression, vertikal die Basophilenanzahl abgebildet

Abbildung 3.1 zeigt signifikante Unterschiede in der CD 131 Regulation auf der Oberfläche

3 Ergebnisse

Basophiler in Abhängigkeit des Gesundheitszustands der Patienten. Die Kontrollgruppe reguliert CD131 nach anti-CD3 Stimulation stark herunter (auf 13%). Bei der Gruppe der Beatmeten dagegen kann nur eine schwache Herabregulation des CD131 Oberflächenmarkers auf 77% beobachtet werden. Der Wert der nicht-beatmeten COVID-19 Patienten liegt zwischen dem der Kontrollgruppe und dem der Beatmeten. Betrachtet man die Gruppe der Beatmeten näher ist ersichtlich, dass in den beiden Untergruppen „überlebend“ und „verstorben“ die Reaktion der Basophilen gering ist, die der letztlich Verstorbenen ist etwas schlechter.

Das in Abbildung 3.2 dargestellte Histogramm verbildlicht die Unterschiede in der Rezeptorregulation. Die Gesunden und die nicht-beatmeten COVID-19 Patienten zeigen eine Herabregulation von CD131 bei anti-CD3 Stimulation auf. Die beiden Untergruppen der Beatmeten weisen keine ersichtliche Reaktion auf den Stimulationsreiz auf. Vermerken kann man jedoch eine deutlich verminderte Zahl an Basophilen der Verstorbenen gegenüber den anderen Gruppen, insbesondere gegenüber den beatmeten „Überlebenden“.

Abbildung 3.3 zeigt insbesondere bei der Kontrollgruppe, dass die Herunterregulation des CD131 auf Basophilen fast ausschließlich IL-3 abhängig ist. Nach Zugabe von anti-IL3 ist der herunterregulierende Effekt von CD131 auf Basophilen annähernd kompensiert.

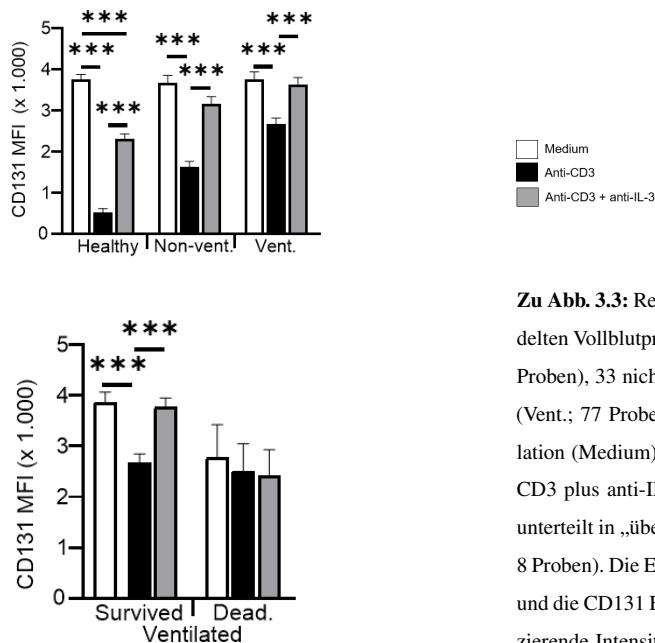


Abb. 3.3: Regulation von CD131 auf Basophilen in anti-IL-3 behandelten VB-Proben

Zu Abb. 3.3: Regulation von CD131 auf Basophilen in anti-IL-3 behandelten Vollblutproben. Proben von 38 gesunden Probanden (Healthy; 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non-vent.; 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent.; 77 Proben) COVID-19 Patienten wurden für 24 h ohne Stimulation (Medium), immobilisierten anti-CD3 oder immobilisiertem anti-CD3 plus anti-IL-3 (10 µg/ml) inkubiert. Beatmete Patienten wurden unterteilt in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben). Die Expression von CD131 wurde mittels FACS quantifiziert und die CD131 Expression auf Basophilen ist als MFI (mittlerer fluoreszierende Intensität) dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert +/- dem Standardfehler (SEM). Statistische Unterschiede wurden mittels der einfaktoriellem Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur erfasst. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3.2.1.2 IL-3R α Regulation auf Monozyten

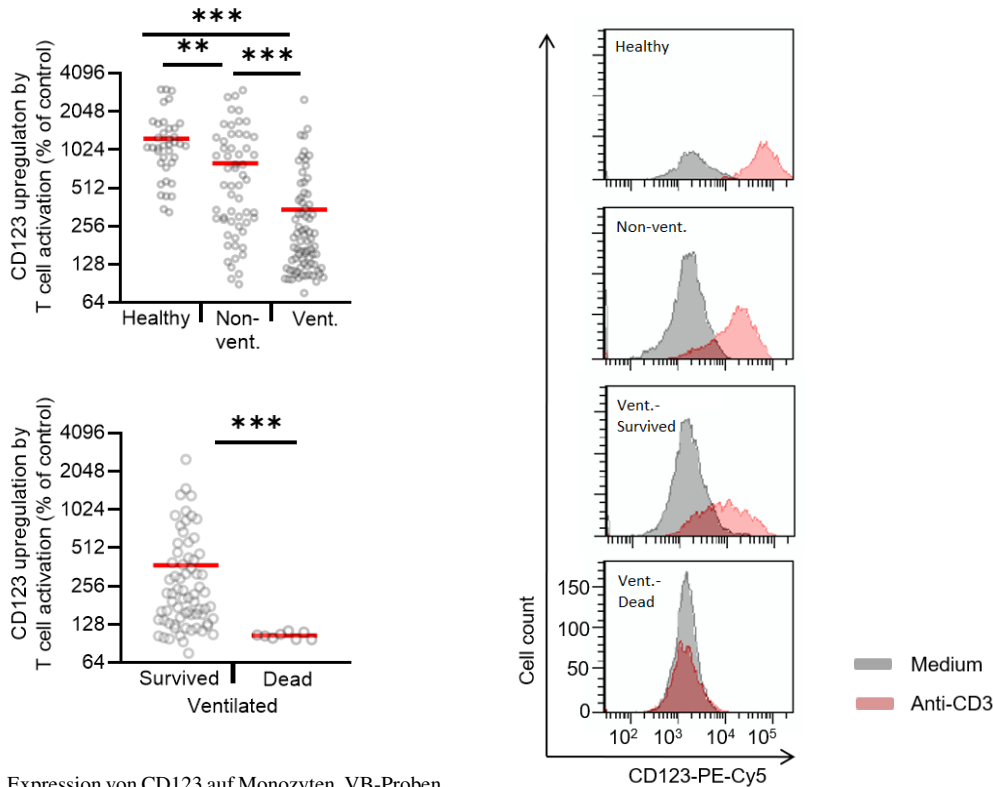


Abb. 3.4: Expression von CD123 auf Monozyten. VB-Proben von 38 Gesunden (Healthy; 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non-vent.; 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent.; Proben) COVID-19 Patienten wurden für 24 h mit und ohne immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Beatmete Patienten wurden unterteilt in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben). Die Expression von CD123 wurde mittels FACS quantifiziert. Die Werte bilden das Verhältnis von CD123 Expression mit und ohne anti-CD3. Jede Probe ist als Punkt dargestellt und der Mittelwert ist rot markiert. CD123 Regulation auf Monozyten ist ein Maß für T-Zellaktivität (y-Achse). Statistische Unterschiede wurden mittels der einfaktoriellem Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur (oberes Diagramm) und den Zweistichproben-t-Test (unteres Diagramm) erfasst. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Abb. 3.5: Repräsentatives FACS Histogramm der VB-Stimulation für Monozyten. Vollblut von Gesunden, nicht-beatmeten und beatmeten COVID-19 Patienten wurde für 24 h mit (rot) oder ohne (grau) immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Die beatmeten COVID-19 Patienten wurden nochmals in die Untergruppen „überlebend“ (survived) und „verstorben“ (dead) unterteilt. Die Expression des Oberflächenmarkers CD123 auf Monozyten wurde mittels FACS quantifiziert. Die x-Achse des Punktdiagramms zeigt die CD123 Expression, die y-Achse die Monozytenanzahl.

Die Abbildung 3.4 zeigt signifikante Unterschiede in der CD123 Regulation auf Monozyten. Mit zunehmender Krankheitsschwere ist ein vermindertes Ansprechen der Monozyten auf die anti-CD3 Stimulation zu sehen. Gesunde regulieren CD123 auf 1225% hoch. Dieser Effekt ist bei den COVID-19 Patienten signifikant abgeschwächt. Bei der Gruppe der Beatmeten kann nur eine

3 Ergebnisse

schwache Hochregulation von CD123 beobachtet werden (auf 345%). Die anti-CD3 induzierte Hochregulation auf etwa 800% bei nicht-beatmeten COVID-19 Patienten liegt dazwischen. Bei Betrachtung der Untergruppen "überlebend" (survived) und "verstorben" (dead) ist auch hier ein signifikanter Unterschied zu sehen. Die Verstorbenen weisen annähernd keine Hochregulation des CD123 mehr auf, wohingegen bei den Patienten, die nicht an COVID-19 verstorben sind, eine Hochregulation des IL-3R α in abgeschwächter Form zu sehen ist.

In Abbildung 3.5 ist die Expression des IL-3R α c auf Monozyten von unstimulierten (grau) und anti-CD3 stimulierten (rot) Patienten- und Kontrollblutproben mittels Histogrammen dargestellt. Man erkennt bei den anti-CD3 stimulierten Vollblutproben (rot) deutlich die zunehmend verminderte CD123 Expression auf der Zelloberfläche von Gesunden zu den COVID-19 Patienten mit fatalem Outcome.

Abbildung 3.6 zeigt, dass IL-3 nicht alleine für die Hochregulation des IL-3R α auf Monozyten verantwortlich ist. In Vollblutproben, die mit anti-IL-3 behandelt wurden, ist annähernd die gleiche Hochregulation des IL-3R α zu sehen wie ohne IL-3 Inhibitor.

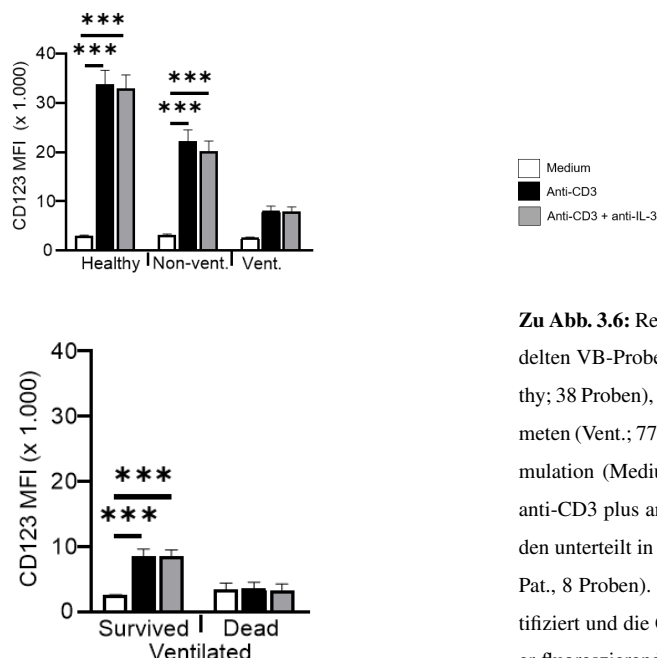


Abb. 3.6: Regulation von CD123 auf Monozyten in anti-IL-3 behandelten VB-Proben

Zu Abb. 3.6: Regulation von CD123 auf Monozyten in anti-IL-3 behandelten VB-Proben. Vollblut-Proben von 38 gesunden Probanden (Healthy; 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non-vent.; 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent.; 77 Proben) COVID-19 Patienten wurden für 24 h ohne Stimulation (Medium), immobilisiertem anti-CD3 oder immobilisiertem anti-CD3 plus anti IL-3 (10 μ g/ml) inkubiert. Beatmete Patienten wurden unterteilt in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben). Die Expression von CD123 wurde mittels FACS quantifiziert und die CD123 Expression auf Monozyten ist als MFI (mittlerer fluoreszierende Intensität) dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM). Es wurde die einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur zur Erfassung von statistischen Unterschieden verwendet. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.2.1.3 CD11b Regulation auf Neutrophilen

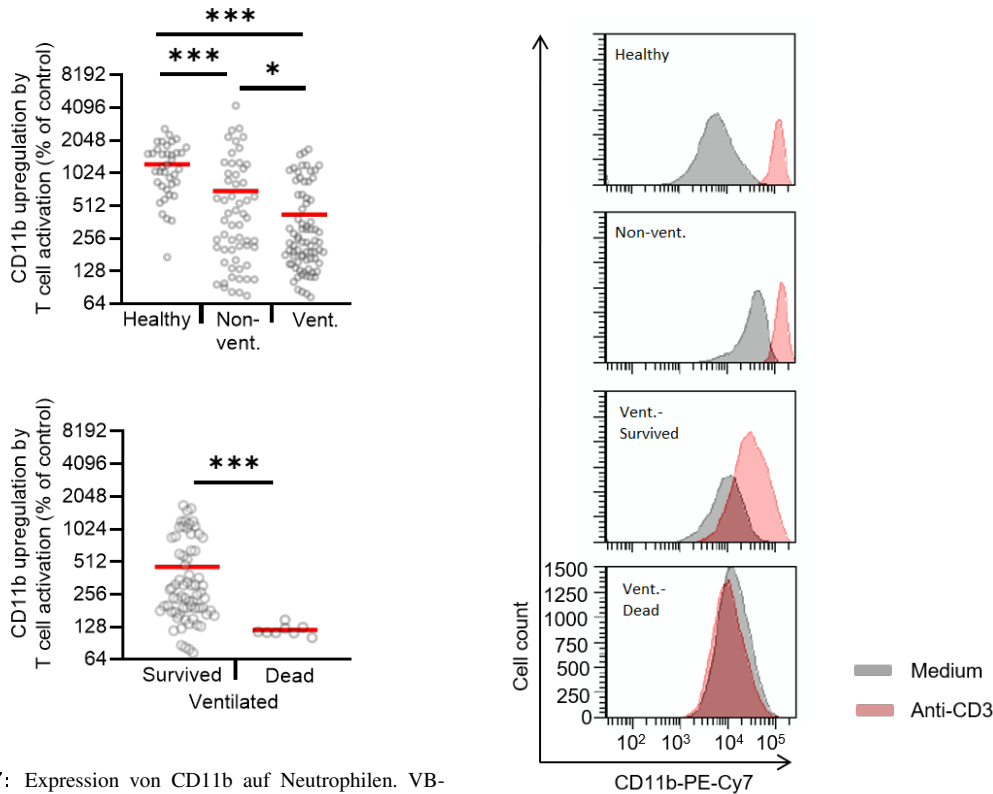


Abb. 3.7: Expression von CD11b auf Neutrophilen. VB-Proben von 38 Gesunden (Healthy; 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non-vent.; 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent.; Proben) Patienten wurden für 24 h mit und ohne immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Beatmete Patienten wurden unterteilt in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben). Die Expression von CD11b wurde mittels FACS quantifiziert. Die Werte zeigen das Verhältnis von CD11b Expression mit und ohne anti-CD3. Jede Probe ist als Punkt dargestellt und der Mittelwert ist rot markiert. CD11b Regulation auf Neutrophilen ist ein Maß für T-Zellaktivität (y-Achse). Statistische Unterschiede wurden mittels der einfaktoriellem Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur (oberes Diagramm) und den Zweistichproben-t-Test (unteres Diagramm) erfasst. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Abb. 3.8: Repräsentatives FACS Histogramm der VB-Stimulation für Neutrophile. Vollblut von Gesunden, nicht-beatmeten und beatmeten Patienten wurde für 24 h mit (rot) oder ohne (grau) immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Die beatmeten COVID-19 Patienten wurden nochmals in die Untergruppen „überlebend“ (survived) und „verstorben“ (dead) unterteilt. Die Expression des Oberflächenmarkers CD11b bei Neutrophilen wurde mittels FACS quantifiziert. Die x-Achse des Punktdiagramms zeigt die CD11b Expression, die y-Achse die Neutrophilenanzahl.

In Abbildung 3.7 sind signifikante Unterschiede bezüglich der CD11b Regulation auf der Zelloberfläche von Neutrophilen in Abhängigkeit der Krankheitsschwere und des Outcomes der Patienten zu sehen. Die Kontrollgruppe reguliert den Oberflächenmarker auf 1232% hoch. Bei der Gruppe der Beatmeten kann man nur eine schwache Hochregulation des CD11b auf 424%

3 Ergebnisse

beobachten. Nicht-beatmete COVID-19 Patienten zeigen eine Hochregulation auf etwa 600%-700%. Betrachtet man die Untergruppen „überlebend“ und „verstorben“ näher, ist auch hier ein signifikanter Unterschied zu sehen. Während bei den Patienten, die letztlich von der Intensiv- auf die Normalstation wechseln konnten, eine Reaktion der Neutrophilen im Sinne einer Hochregulation des CD11b auf ihrer Zelloberfläche zu vermerken ist, ist bei den Patienten mit tödlichem COVID-19 Krankheitsverlauf annähernd keine Reaktion der Neutrophilen auf die anti-CD3 Stimulation zu erkennen.

In Abbildung 3.8 ist die Expression des CD11b auf Neutrophilen von unstimulierten und anti-CD3 stimulierten Vollblut mittels Histogrammen dargestellt. Betrachtet man die stimulierten Vollblutproben (rot), sieht man von oben (gesunde Kontrollgruppe) nach unten (verstorbene Patienten) eine abnehmende reaktive CD11b Hochregulation auf Neutrophilen. Zudem kann eine Zunahme der Neutrophilenzahl von oben nach unten verzeichnet werden.

Die untenstehende Abbildung (Abb. 3.9) zeigt, dass IL-3 nicht alleine für die Hochregulation des Oberflächenmarkers CD11b auf Neutrophilen verantwortlich ist. Neutrophile im Vollblut mit anti-IL-3 zeigen die gleiche Hochregulation des CD11b auf wie ohne IL-3 Inhibitor.

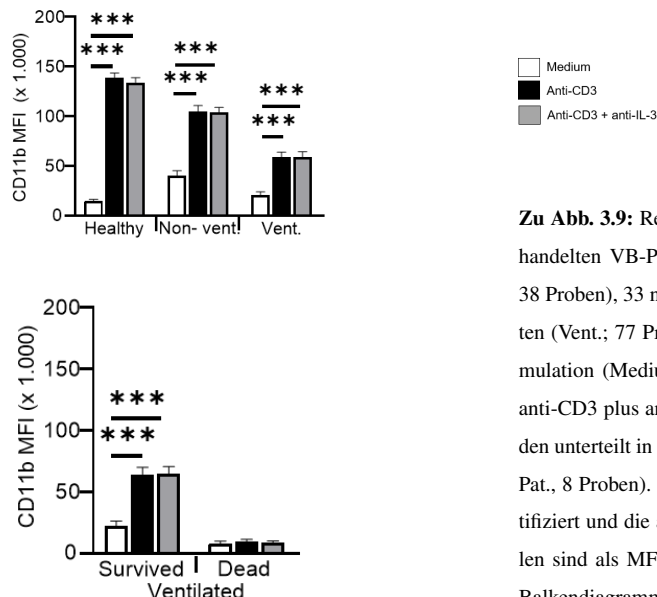


Abb. 3.9: Regulation von CD11b auf Neutrophilen in anti-IL-3 behandelten VB-Proben

Zu Abb. 3.9: Regulation von CD11b auf Neutrophilen in anti-IL-3 behandelten VB-Proben. Proben von 38 gesunden Probanden (Healthy; 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non-vent.; 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent.; 77 Proben) COVID-19 Patienten wurden für 24 h ohne Stimulation (Medium), immobilisiertem anti-CD3 oder immobilisiertem anti-CD3 plus anti-IL-3 (10 µg/ml) inkubiert. Beatmete Patienten wurden unterteilt in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben). Die Expression von CD11b wurde mittels FACS quantifiziert und die absoluten Werte der CD11b Expression auf Neutrophilen sind als MFI (mittlerer fluoreszierende Intensität) dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert +/- Standardfehler (SEM). Es wurde die einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur verwendet, um statistische Unterschiede zu erfassen. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3 Ergebnisse

3.2.1.4 IL-3R β c Regulation auf pDCs

Abbildung 3.10 zeigt die CD131 Expression auf plasmazytoiden dendritischen Zellen. Bei den Gesunden ist eine signifikante Herabregulation des CD131 auf der Oberfläche der pDCs als Reaktion auf die anti-CD3 Stimulation zu sehen. Bei den nicht-beatmeten COVID-19 Patienten ist die Reaktion etwas abgeschwächt, bei beatmeten Patienten ist die Herabregulation von CD131 sehr gering. Betrachtet man die „Überlebenden“ und „verstorbenen“ so ist wiederum bei den letztlich verstorbenen Patienten eine verminderte Reaktion der pDCs gegenüber den Patienten mit nicht tödlichem Krankheitsverlauf zu sehen.

Vor allem bei der Gruppe der Gesunden kann man erkennen, dass der herunterregulierende Effekt durch anti-IL-3 partiell aufgehoben wird.

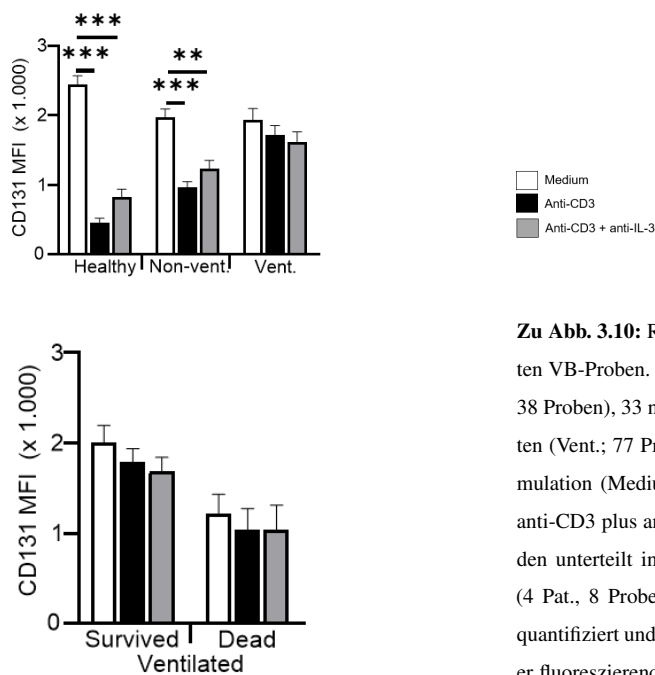


Abb. 3.10: Regulation von CD131 auf pDCs in anti-IL-3 behandelten VB-Proben

Zu Abb. 3.10: Regulation von CD131 auf pDCs in anti-IL-3 behandelten VB-Proben. Vollblut-Proben von 38 gesunden Probanden (Healthy; 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non-vent.; 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent.; 77 Proben) COVID-19 Patienten wurden für 24 h ohne Stimulation (Medium), immobilisiertem anti-CD3 oder immobilisiertem anti-CD3 plus anti-IL-3 (10 μ g/ml) inkubiert. Beatmete Patienten wurden unterteilt in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben). Die Expression von CD131 wurde mittels FACS quantifiziert und die CD131 Expression auf pDCs wird als MFI (mittlerer fluoreszierende Intensität) dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Zum Erfassen statistischer Unterschiede wurde die einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur verwendet. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.2.2 Zytokinexpression

Mittels ELISA wurden die Überstände der anti-CD3 stimulierten und unstimulierten Vollblutproben hinsichtlich der T-Zell abgeleiteten IL-3, GM-CSF und IFN γ Expression analysiert.

3 Ergebnisse

3.2.2.1 IL-3

In Abbildung 3.11 ist die IL-3 Expression in den unstimulierten (blau) und anti-CD3 stimulierten (rot) Überständen der VB-Proben dargestellt. Es ist ein signifikanter Unterschied von anti-CD3 induzierter IL-3 Expression von Gesunden und nicht-beatmeten Patienten zu beatmeten COVID-19 Patienten zu sehen. Bei den Beatmeten ist im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen, bei denen eine anti-CD3 induzierte erhöhte Expression des IL-3 beobachtet wird, kein erhöhter IL-3 Spiegel nach Stimulation zu sehen. Bei Patienten mit und ohne tödlichen Krankheitsverlauf ist die IL-3 Expression etwa gleichermaßen beeinträchtigt und kein statistisch signifikanter Unterschied zu erfassen. Das gleiche gilt für die Gesunden im Vergleich zu den nicht-beatmeten Patienten.

Bei Betrachtung der IL-3 Konzentration in unstimulierten Vollblutproben (blau) sind keine großen Unterschiede zwischen den Gruppen zu vermerken. Gesunde, nicht-beatmete und beatmete „überlebende“ Patienten weisen tendenziell einen höheren IL-3 Plasmaspiegel auf als die Verstorbenen.

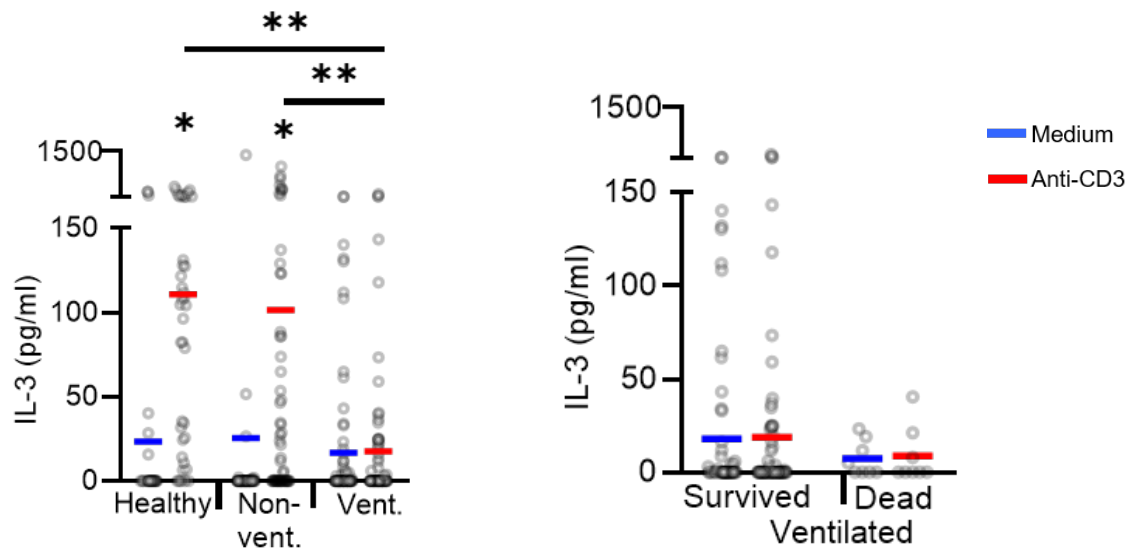


Abb. 3.11: IL-3 Expression in VB-Proben. VB von 38 Gesunden (Healthy, 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non.-vent., 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent., 77 Proben) COVID-19 Patienten wurde für 24 h mit oder ohne immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Beatmete Patienten wurden in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben) unterteilt. Die Konzentration von IL-3 in den Überständen wurde mittels ELISA gemessen. Jede Probe ist mit einem Punkt dargestellt und der Mittelwert ist in blau (Medium) oder rot (anti-CD3) markiert. Statistische Unterschiede wurden mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur (linkes Diagramm) und den Zweistichproben-t-Test (rechtes Diagramm) erfasst. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.2.2.2 GM-CSF

Abbildung 3.12 zeigt die Expression von GM-CSF im Überstand der unstimulierten (blau) und anti-CD3 stimulierten (rot) Vollblutproben von Gesunden, nicht-beatmeten und beatmeten COVID-19 Patienten, sowie die Gruppierung der Beatmeten in COVID-19 Patienten mit und ohne tödlichem Verlauf. Die Kontrollgruppe und die nicht-beatmeten COVID-19 Patienten zeigen eine anti-CD3 induzierte erhöhte GM-CSF Ausschüttung. Betrachtet man die beatmeten COVID-19 Patienten, so ist keine Reaktion der T-Zellen auf die Stimulation im Sinne einer erhöhten GM-CSF Expression zu beobachten. Der Unterschied der GM-CSF Expression in stimulierten Plasma von Gesunden und nicht-beatmeten zu den beatmeten Patienten ist signifikant. Jedoch ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beatmeten Untergruppen zu erfassen.

Betrachtet man die GM-CSF Konzentration in unstimuliertem Patienten- und Kontrollblut, kann bei den Nicht-beatmeten gegenüber den Gesunden ein erhöhter Spiegel an GM-CSF verzeichnet werden.

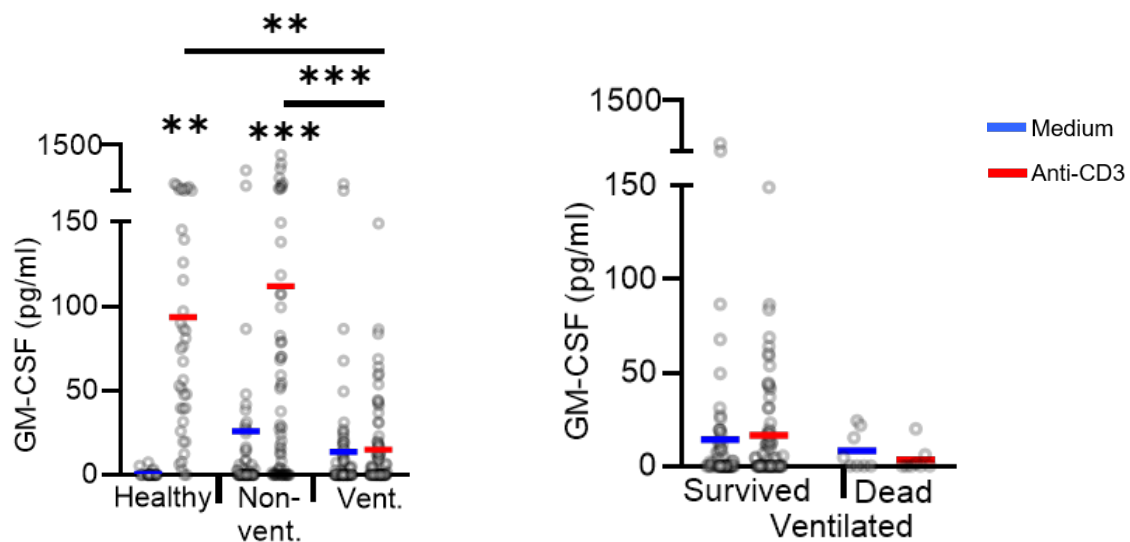


Abb. 3.12: GM-CSF Expression in VB-Proben. VB von 38 Gesunden (Healthy, 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non.-vent., 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent., 77 Proben) COVID-19 Patienten wurde für 24 h mit oder ohne immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Beatmete Patienten wurden in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben) unterteilt. Die Konzentration von GM-CSF in den Überständen wurde mittels ELISA gemessen. Jede Probe ist mit einem Punkt dargestellt und der Mittelwert ist in blau (Medium) oder rot (anti-CD3) markiert. Statistische Unterschiede wurden mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur (linkes Diagramm) und den Zweistichproben-t-Test (rechtes Diagramm) erfasst. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.2.2.3 IFN γ

Die Expression von IFN γ in den unstimulierten (blau) und anti-CD3 stimulierten (rot) Vollblutproben wird in Abbildung 3.13 dargestellt. Man sieht, dass die IFN γ Konzentration bei den Gesunden und den „Nicht-Beatmeten“ als Reaktion der T-Zellen auf die anti-CD3 Stimulation steigt. Bei den beatmeten COVID-19 Patienten mit und ohne tödlichem Krankheitsverlauf fehlt die anti-CD3 induzierte verstärkte IFN γ Expression gleichermaßen.

Die Abbildung zeigt für IFN γ signifikante Unterschiede der einzelnen Gruppen bezüglich den Ausgangskonzentrationen (IFN γ Konzentrationen im unstimulierten Blut). Es ist ein zunehmender IFN γ Spiegel mit zunehmender Krankheitsschwere zu vermerken, mit der Ausnahme, dass die an COVID-19 Verstorbenen eine verminderte IFN γ Expression im Vergleich zu den nicht-beatmeten und beatmeten „überlebenden“ Patienten aufweisen. Auch im unstimulierten Vollblut der Gesunden ist fast kein IFN γ nachzuweisen. Die Beatmeten, die sich letztlich wieder von COVID-19 erholt haben, weisen die höchsten IFN γ Plasmawerte der unstimulierten VB-Proben auf.

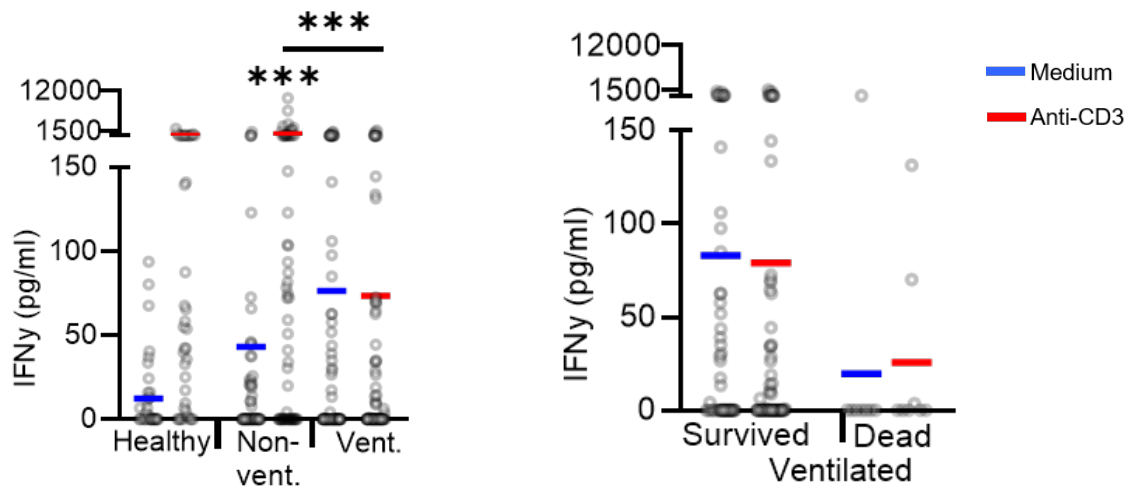


Abb. 3.13: IFN γ Expression in VB-Proben. VB von 38 Gesunden (Healthy, 38 Proben), 33 nicht-beatmeten (Non.-vent., 58 Proben) und 21 beatmeten (Vent., 77 Proben) COVID-19 Patienten wurde für 24 h mit oder ohne immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Beatmete Patienten wurden in „überlebend“ (17 Pat., 69 Proben) und „verstorben“ (4 Pat., 8 Proben) unterteilt. Die Konzentration von IFN γ in den Überständen wurde mittels ELISA gemessen. Jede Probe ist mit einem Punkt dargestellt und der Mittelwert ist in blau (Medium) oder rot (anti-CD3) markiert. Statistische Unterschiede wurden mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur (linkes Diagramm) und den Zweistichproben-t-Test (rechtes Diagramm) erfasst. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.)

3.2.3 Beispiele für die longitudinale Analyse von beatmeten COVID-19 Patienten

3.2.3.1 Patientenbeispiel 1

Folgende Abbildung (Abb. 3.14) zeigt anhand der Rezeptorregulation auf Monozyten und Neutrophilen das verbesserte Wiederansprechen der Immunzellen auf die anti-CD3 Stimulation im Zuge der klinischen Verbesserung eines beatmeten Patienten (66 Jahre, männlich). Die Zeitspanne in der der Patient beatmet wurde, reicht bis Tag 64 und ist mit Vent. markiert. Non-vent. markiert den Zeitraum, in dem der Patient nicht mehr beatmungsbedürftig war und sich sein klinischer Zustand besserte. Tag 1 entspricht dem Tag der ersten aufgetretenen Symptome.

Es ist ersichtlich, dass die wiedererlangte Zellreaktivität der klinischen Verbesserung vorausgeht. Bereits am Tag 55 kennzeichnet sich eine Hochregulation von CD11b auf Neutrophilen und CD123 auf Monozyten ab. Am Tag 59 ist dann ein deutlich verbessertes Ansprechen der Monozyten auf die Stimulation zu sehen. Am Tag 64 erfolgt die Extubation. Die CD123 Hochregulation auf Monozyten beziehungsweise CD11b auf Neutrophilen ist bei der zuletzt erhaltenen Probe (Tag 87) vor Entlassung des Patienten am ausgeprägtesten.

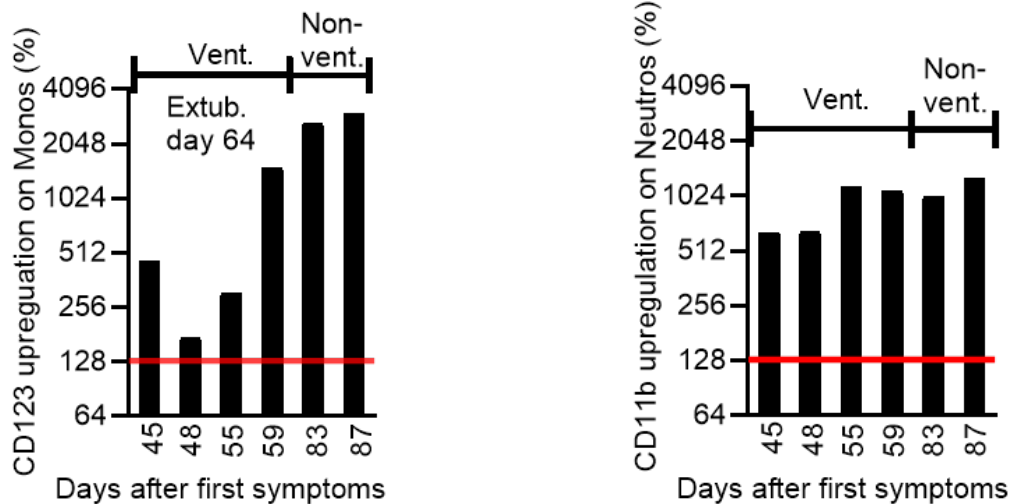


Abb. 3.14: Patientenbeispiel 1. Hochregulation von CD123 auf Monozyten und CD11b auf Neutrophilen in 24h-VB-Kulturen mit immobilisierten anti-CD3. Die Werte bilden das Verhältnis von CD11b beziehungsweise CD123 Expression mit und ohne anti-CD3. Bei Patient 1 konnte die mechanische Beatmung abgesetzt werden. Der Zeitraum der mechanischen Beatmung ist mit Vent., der Zeitraum ohne mechanische Beatmung mit Non-vent. beschriftet. Die rote Linie markiert eine Hochregulation von 130%.

3.2.3.2 Patientenbeispiel 2

In Abbildung 3.15 ist die longitudinale Analyse von Monozyten und Neutrophilen hinsichtlich der Expression von CD123 beziehungsweise CD11b eines beatmeten Patienten (68 Jahre, weiblich) dargestellt, der sich während der Studienzeit klinisch verbesserte und schließlich ab Tag 29 auf keine unterstützende Beatmung mehr angewiesen war. Der Beatmungszeitraum ist mit Vent. markiert, der Zeitraum nach Extubation mit Non-vent. und der Tag der ersten aufgetretenen Symptome ist mit Tag 1 datiert.

Auch hier ist die Tendenz eines vermehrten Ansprechens der Immunzellen auf den Stimulationsreiz bereits am Tag vor der Extubation zu erkennen und zeigt, dass die Wiedererlangung der Zellfunktion der klinischen Besserung vorangeht. Drei Tage nach Extubation (Tag 32) zeigt sich eine starke Hochregulation von CD123 und CD11b auf den Immunzellen, welche erst nochmal abnimmt (Tag 42), aber in den darauffolgenden Tagen wieder zunimmt.

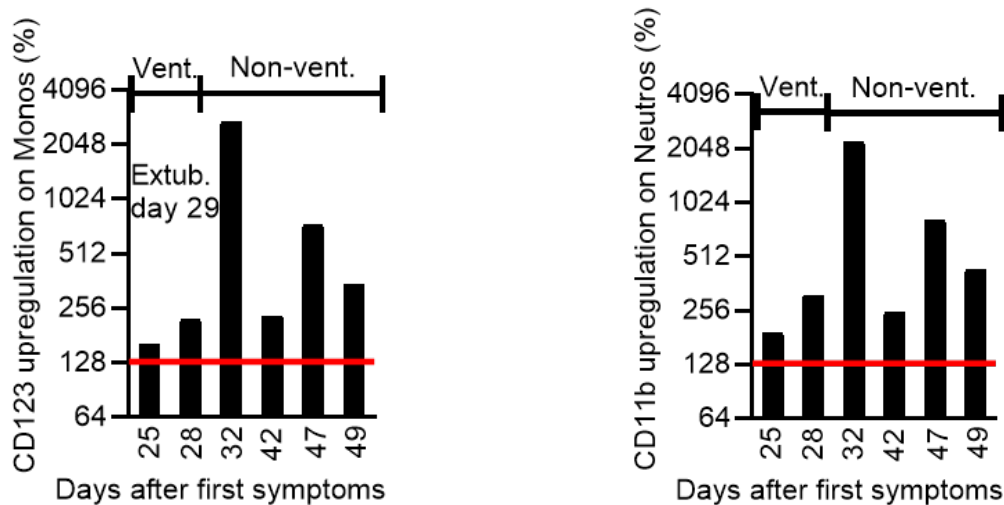


Abb. 3.15: Patientenbeispiel 2. Hochregulation von CD123 auf Monozyten und CD11b auf Neutrophilen in 24 h-VB-Kulturen mit immobilisiertem anti-CD3. Die Werte bilden das Verhältnis von CD11b beziehungsweise CD123 Expression mit und ohne anti-CD3. Bei Patient 2 konnte die mechanische Beatmung abgesetzt werden. Der Zeitraum der mechanischen Beatmung ist mit Vent., der Zeitraum ohne mechanische Beatmung mit Non-vent. beschriftet. Die rote Linie markiert eine Hochregulation von 130%.

3.2.3.3 Patientenbeispiel 3

Abbildung 3.16 zeigt die über 58 Tage verlaufende zeitliche Analyse der Rezeptorregulation von Monozyten und Neutrophilen eines beatmeten Patienten (64 Jahre, weiblich). Der Patient konnte im Laufe der Studienzeit extubiert werden (Tag 46). Vent. markiert den Zeitraum der

3 Ergebnisse

mechanischen Beatmung, Non-vent. den Zeitraum nach Extubation. Tag 1 bezeichnet den Tag der erstmals aufgetretenen Symptome.

An Tag 22 und 25 ist die beeinträchtigte Zellfunktion anhand fehlender anti-CD3 induzierter Hochregulation der Oberflächenmoleküle zu sehen. Aber bereits etwa zehn Tage vor Extubation (Tag 32) ist eine wiedererlangte Reaktion auf den Stimulationsreiz zu verzeichnen. Die CD123 beziehungsweise CD11b Hochregulation nimmt in der darauffolgenden Woche tendenziell nochmal ab, jedoch zeigen die Proben nach Extubation eine ausgeprägte anti-CD3 induzierte Hochregulation von CD123 und CD11b und spricht für eine Wiedererlangung der Neutrophilen- und Monozytenfunktion.

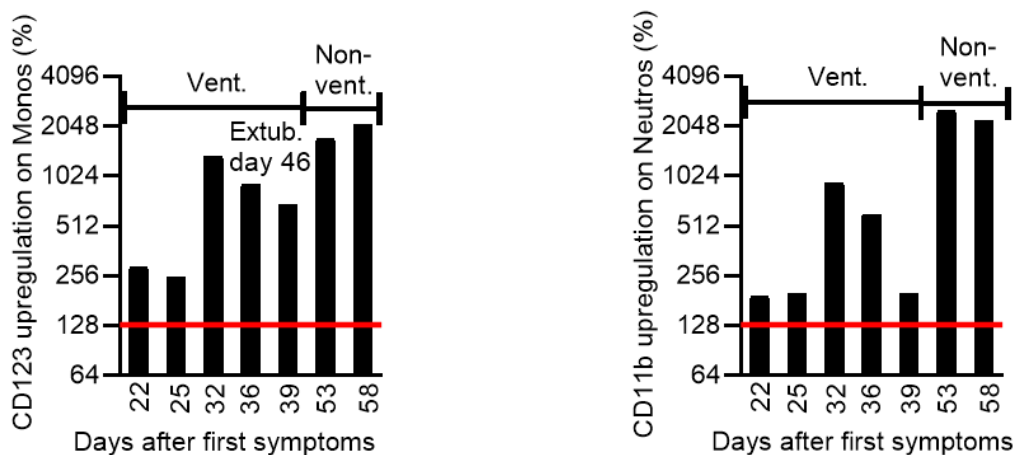


Abb. 3.16: Patientenbeispiel 3. Hochregulation von CD123 auf Monozyten und CD11b auf Neutrophilen in 24 stündigen VB-Kulturen mit immobilisiertem anti-CD3. Die Werte bilden das Verhältnis von CD11b beziehungsweise CD123 Expression mit und ohne anti-CD3. Bei Patient 3 konnte die mechanische Beatmung abgesetzt werden. Der Zeitraum der mechanischen Beatmung ist mit Vent., der ohne mechanische Beatmung mit Non-vent. beschriftet. Die rote Linie markiert eine Hochregulation von 130%.

3.2.3.4 Patientenbeispiel 4

Die folgende Abbildung 3.17 gehört zu einem Patienten (46 Jahre, männlich), der ebenfalls während der Studienzeit extubiert werden konnte. Die Regulation der Oberflächenproteine auf Neutrophilen und Monozyten als Reaktion auf die anti-CD3 Stimulation wurde über einen Gesamtzeitraum von 25 Tagen analysiert. Der Zeitraum in dem der Patient beatmet wurde, umfasst 22 Tage und ist mit Vent. markiert. Non-vent. markiert den Zeitraum, in dem der Patient nicht mehr beatmungsbedürftig war. Tag 1 entspricht dem Tag der ersten aufgetretenen Symptome.

3 Ergebnisse

Bei den Monozyten ist eine verstärkte Hochregulation des CD123 nach Extubation zu verzeichnen. Betrachtet man die CD11b Regulation auf den Neutrophilen, so kann man hier wie bei den vorherigen Patientenbeispielen sehen, dass die Neutrophilen bereits an dem Tag vor der Extubation verbessert auf den Stimulationsreiz ansprechen und mit einer CD11b Hochregulation reagieren.

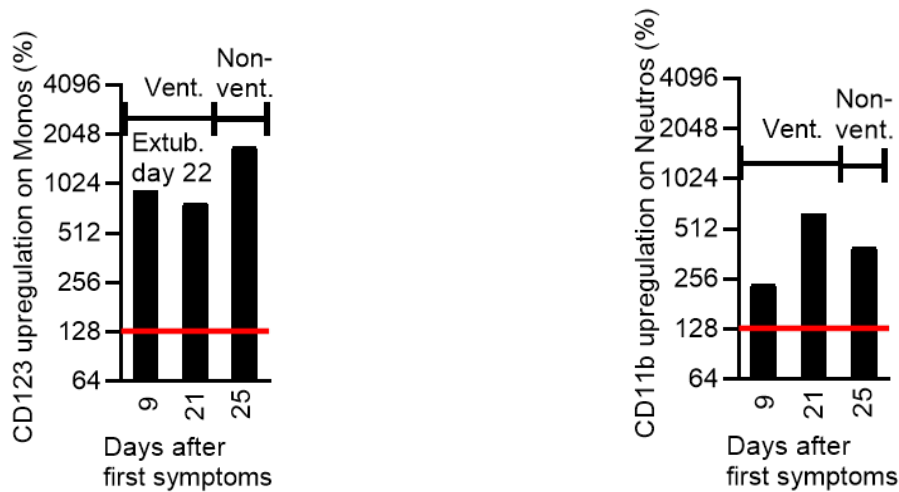


Abb. 3.17: Patientenbeispiel 4. Hochregulation von CD123 auf Monozyten und CD11b auf Neutrophilen in 24 stündigen VB-Kulturen mit immobilisiertem anti-CD3. Die Werte bilden das Verhältnis von CD11b beziehungsweise CD123 Expression mit und ohne anti-CD3. Bei Patient 4 konnte die mechanische Beatmung abgesetzt werden. Der Zeitraum der mechanischen Beatmung ist mit Vent., der Zeitraum ohne mechanische Beatmung mit Non-vent. beschriftet. Die rote Linie markiert eine Hochregulation von 130%.

3.2.3.5 Patientenbeispiel 5

In Abbildung 3.18 ist die über 40 Tage verlaufende zeitliche Analyse der Rezeptorregulation von Monozyten und Neutrophilen eines beatmeten Patienten (68 Jahre, männlich) dargestellt, der schließlich am Tag 40 an COVID-19 verstorben ist. Tag 1 entspricht dem Tag der ersten aufgetretenen Symptome.

Man sieht, dass die Immunzellen nicht auf die Stimulation mit anti-CD3 reagieren. CD11b auf Neutrophilen beziehungsweise CD123 auf Monozyten wird nicht über einen Wert von 130% hochreguliert (rote Linie).

3 Ergebnisse



Abb. 3.18: Patientenbeispiel 5. Hochregulation von CD123 auf Monozyten und CD11b auf Neutrophilen in 24 h-VB-Kulturen mit immobilisiertem anti-CD3. Die Werte bilden das Verhältnis von CD11b beziehungsweise CD123 Expression mit und ohne anti-CD3. Patient 5 ist verstorben. Der Zeitraum der mechanischen Beatmung ist mit Vent. beschriftet. Die rote Linie markiert eine Hochregulation von 130%.

3.2.3.6 Patientenbeispiel 6

Abbildung 3.19 zeigt die longitudinale Analyse von Monozyten und Neutrophilen hinsichtlich der Expression von CD123 beziehungsweise CD11b eines beatmeten Patienten (68 Jahre, männlich), der am Tag 53 nach Symptombeginn (Tag 1) an der SARS-CoV-2 Infektion verstorben ist.

Die Oberflächenmoleküle CD11b und CD123 auf Neutrophilen beziehungsweise Monozyten zeigen keine wesentliche Hochregulation nach anti-CD3 Stimulation.

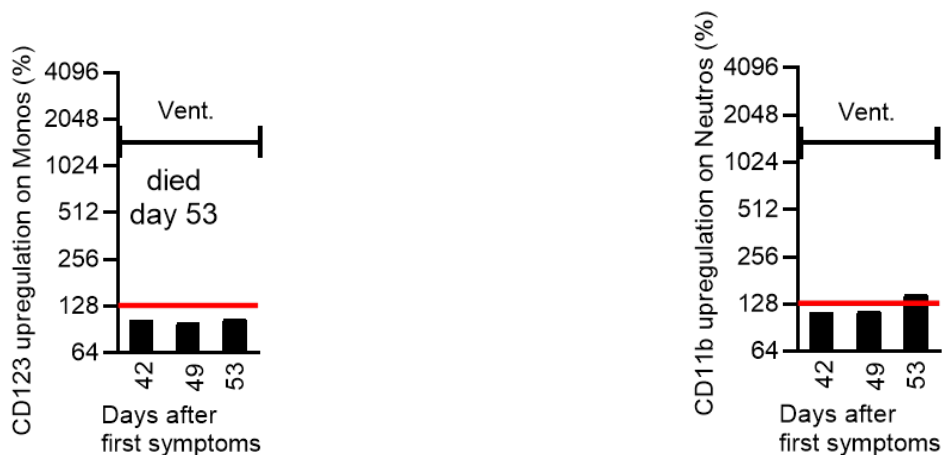


Abb. 3.19: Patientenbeispiel 6. Hochregulation von CD123 auf Monozyten und CD11b auf Neutrophilen in 24h-VB-Kulturen mit immobilisiertem anti-CD3. Die Werte bilden das Verhältnis von CD11b beziehungsweise CD123 Expression mit und ohne anti-CD3. Patient 6 ist verstorben. Der Zeitraum der mechanischen Beatmung ist mit Vent. beschriftet. Die rote Linie markiert eine Hochregulation von 130%.

3.2.4 Geschlechtsspezifische Analyse der Rezeptorregulation

3.2.4.1 Regulation von IL-3R β c auf Basophilen

Die Abbildung 3.20 zeigt die CD131 Expression auf Basophilen aufgetrennt in die beiden Geschlechter Mann (M) und Frau (F). Es sind keine statistisch signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Rezeptorregulation bei anti-CD3 Stimulation zu erkennen. Jedoch kann man hier, wie bereits in Abbildung 3.1, 3.2 und 3.3 gezeigt wurde, die mit Erkrankungsschwere zunehmend verminderte CD131 Regulation auf Basophilen bei beiden Geschlechtern erkennen.

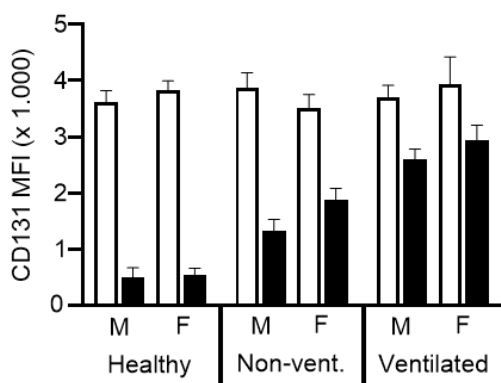


Abb. 3.20: Geschlechtsspezifische Analyse der CD131 Regulation auf Basophilen. VB Proben von Gesunden (Healthy; männlich: 14 Pat./14

Proben; weiblich: 24 Pat./ 24 Proben), nicht beatmeten COVID-19 Patienten (Non-vent.; männlich: 16 Pat./ 27 Proben; weiblich: 17 Pat./ 31 Proben) und beatmeten COVID-19 Patienten (Ventilated; männlich: 16 Pat./ 62 Proben; weiblich: 5 Pat./ 15 Proben) wurde für 24 h ohne Stimulanz (Medium) oder mit immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Die Expression von CD131 auf Basophilen wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die CD131 Expression ist als MFI dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SEM. Die einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur wurde zur Erfassung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Geschlechtern verwendet.

3.2.4.2 Regulation von IL-3R α auf Monozyten

Abbildung 3.21 zeigt die Expression von CD123 auf Monozyten spezifisch für Mann (M) und Frau (F). Betrachtet man die Kontrollkohorte, so ist ein signifikanter Unterschied der CD123 Expression bei Frauen und Männern zu beobachten. Die Monozyten der männlichen Probanden reagieren stärker in Form einer vergleichsweise zu den Frauen vermehrten Translokation des CD123 auf die Zelloberfläche auf die Stimulation mit anti-CD3.

Dieser geschlechtsspezifische Unterschied in der anti-CD3 induzierten Hochregulation des CD123 ist auch bei nicht-beatmeten COVID-19 Patienten in verringertem Ausmaß zu sehen. Bei den beatmeten COVID-19 Patienten ist die Hochregulation bei Mann und Frau gleichermaßen beeinträchtigt.

3 Ergebnisse

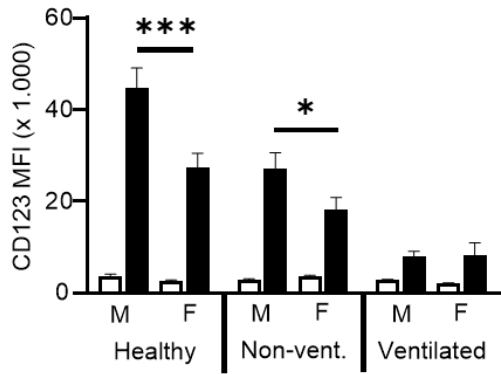


Abb. 3.21: Geschlechtsspezifische Analyse der CD123 Regulat-

ion auf Monozyten. VB Proben von Gesunden (Healthy; männlich: 14 Pat./ 14 Proben; weiblich: 24 Pat./ 24 Proben), nicht beatmeten COVID-19 Patienten (Non-vent.; männlich: 16 Pat./ 27 Proben; weiblich: 17 Pat./ 31 Proben) und beatmeten COVID-19 Patienten (Ventilated; männlich: 16 Pat./ 62 Proben; weiblich: 5 Pat./ 15 Proben) wurde für 24 h ohne Stimulanz (Medium) oder mit immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Die Expression von CD123 auf Monozyten wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die CD123 Expression ist als MFI dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert +/- SEM. Die einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur wurde zur Erfassung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Geschlechtern verwendet. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

3.2.4.3 Regulation von CD11b auf Neutrophilen

Abbildung 3.22 zeigt die CD11b Expression auf Neutrophilen vergleichend für männliche (M) und weibliche (F) Gesunde und Patienten. Es sind keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Rezeptorregulation bei anti-CD3 Stimulation zu erkennen. Das verminderte Ansprechen der Neutrophilen auf den Stimulus mit zunehmender Erkrankung ist bei beiden Geschlechtern gleichermaßen zu beobachten.

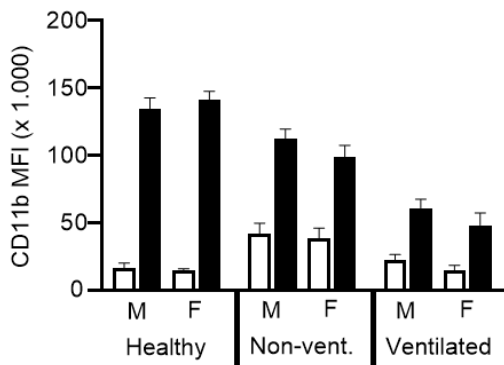


Abb. 3.22: Geschlechtsspezifische Analyse der CD11b Regulation auf Neutrophilen. VB Proben von Gesunden (Healthy; männlich: 14 Pat./ 14

Proben; weiblich: 24 Pat./ 24 Proben), nicht beatmeten COVID-19 Patienten (Non-vent.; männlich: 16 Pat./ 27 Proben; weiblich: 17 Pat./ 31 Proben) und beatmeten COVID-19 Patienten (Ventilated; männlich: 16 Pat./ 62 Proben; weiblich: 5 Pat./ 15 Proben) wurde für 24 h ohne Stimulanz (Medium) oder mit immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Die Expression von CD11b auf Neutrophilen wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die CD11b Expression ist als MFI dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert +/- SEM. Die einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur wurde zur Erfassung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Geschlechtern verwendet.

3.2.4.4 Regulation von IL-3R β c auf pDCs

Abbildung 3.23 zeigt die CD131 Expression auf pDCs separat für Mann (M) und Frau (F). Es sind keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Rezeptorregulation bei

3 Ergebnisse

anti-CD3 Stimulation zu erkennen. Es ist jedoch bei beiden Geschlechtern zu sehen, dass ein vermindertes Ansprechen der pDCs auf den Stimulationsreiz mit zunehmender Erkrankung einhergeht.

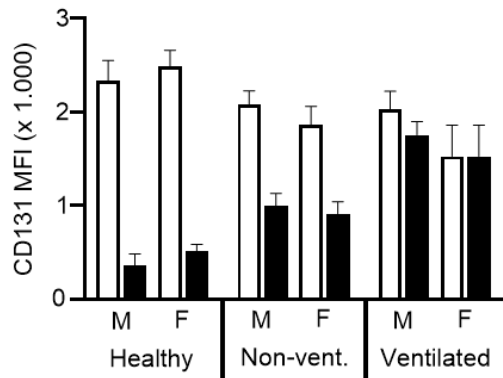


Abb. 3.23: Geschlechtsspezifische Analyse der CD131 Regulat-

ion auf pDCs. VB Proben von Gesunden (Healthy; männlich: 14 Pat./ 14 Proben; weiblich: 24 Pat./ 24 Proben), nicht beatmeten COVID-19 Patienten (Non-vent.; männlich: 16 Pat./ 27 Proben; weiblich: 17 Pat./ 31 Proben) und beatmeten COVID-19 Patienten (Ventilated; männlich: 16 Pat./ 62 Proben; weiblich: 5 Pat./ 15 Proben) wurde für 24 h ohne Stimulanz (Medium) oder mit immobilisiertem anti-CD3 inkubiert. Die Expression von CD131 auf pDCs wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die CD131 Expression ist als MFI dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert +/- SEM. Die einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur wurde zur Erfassung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Geschlechtern verwendet.

3.3 PBMC Analyse - Zytokinexpression

3.3.1 IL-3

In Abbildung 3.24 ist die IL-3 Konzentration in den Überständen von unstimulierten (blau) und anti-CD3 stimulierten (rot) PBMC Proben dargestellt. Es werden vergleichend die nicht-beatmeten (Non-vent.), beatmeten „überlebenden“ (Ventilated Survived) und beatmeten „verstorbenen“ (Ventilated Dead) COVID-19 Patienten betrachtet.

In den unstimulierten Proben ist bei allen drei Gruppen annähernd kein IL-3 messbar. In den anti-CD3 stimulierten Probenüberständen ist bei den beiden Gruppen ohne tödlichen Krankheitsverlauf gleichermaßen eine signifikant verstärkte IL-3 Expression zu messen. Bei den Verstorbenen ist hingegen nur eine eingeschränkte Erhöhung des IL-3 Spiegels zu verzeichnen.

3 Ergebnisse

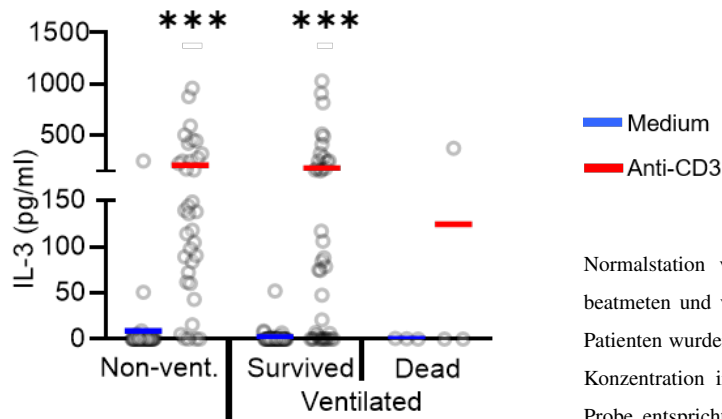


Abb. 3.24: IL-3 Expression in anti-CD3 stimulierten PBMCs. PBMCs von 26 nicht-beatmeten (Non-vent.; 36 Proben), 14 beatmeten und auf

Normalstation verlegten (Ventilated Survived; 39 Proben) und 2 beatmeten und verstorbenen (Ventilated Dead; 3 Proben) COVID-19 Patienten wurden für 24 h mit oder ohne anti-CD3 inkubiert. Die IL-3 Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Jede Probe entspricht einem Punkt. Der Mittelwert ist in blau (Medium) oder rot (anti-CD3) markiert. Die einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur wurde zum Erfassen statistisch signifikanter Unterschiede verwendet. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.3.2 GM-CSF

Abbildung 3.25 zeigt die GM-CSF Expression in unstimulierten (blau) und anti-CD3 stimulierten (rot) PBMC Proben von COVID-19 Patienten in unterschiedlichen Erkrankungsstadien.

In den unstimulierten Proben ist die Tendenz einer abnehmenden GM-CSF Konzentration mit zunehmender Krankheitsschwere zu erkennen, jedoch ist bei allen drei Gruppen annähernd kein GM-CSF detektierbar. In den anti-CD3 stimulierten Probenüberständen ist bei den nicht-beatmeten ein signifikant höherer Spiegel an GM-CSF messbar. Bei den Verstorbenen ist wiederum nur ein geringer Anstieg zu beobachten.

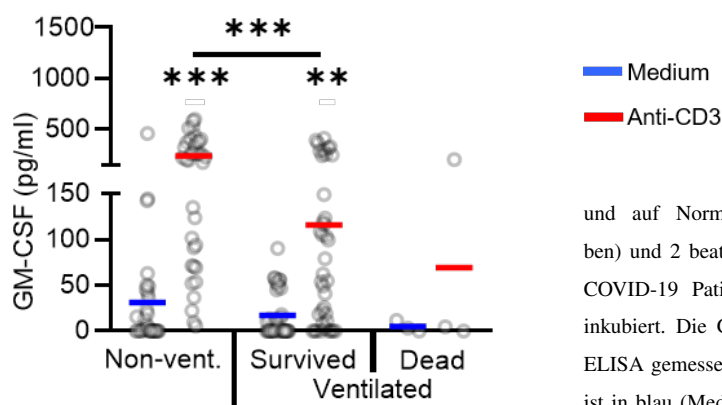


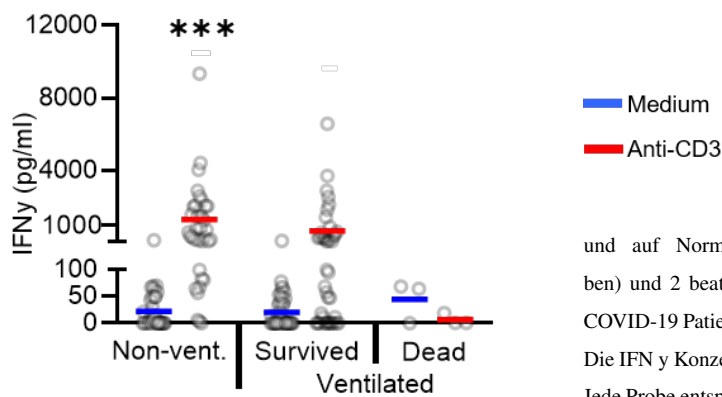
Abb. 3.25: GM-CSF Expression in anti-CD3 stimulierten PBMCs. PBMCs von 26 nicht-beatmeten (Non-vent.; 36 Proben), 14 beatmeten

und auf Normalstation verlegten (Ventilated Survived; 39 Proben) und 2 beatmeten und verstorbenen (Ventilated Dead; 3 Proben) COVID-19 Patienten wurden für 24 h mit oder ohne anti-CD3 inkubiert. Die GM-CSF Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Jede Probe entspricht einem Punkt. Der Mittelwert ist in blau (Medium) oder rot (anti-CD3) markiert. Die einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur wurde zum Erfassen statistisch signifikanter Unterschiede verwendet. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.3.3 IFN γ

In Abbildung 3.26 ist die IFN γ Plasmakonzentration in den Überständen von unstimulierten (blau) und anti-CD3 stimulierten (rot) von nicht-beatmeten, beatmeten „überlebenden“ und beatmeten „verstorbenen“ COVID-19 Patienten zu sehen.

Betrachtet man die unstimulierten Proben sieht man nur eine schwache IFN γ Expression bei allen drei Gruppen. Die Verstorbenen weisen hierbei eine tendenziell höhere IFN γ Konzentration auf. Bei anti-CD3 Stimulation kann eine signifikante Erhöhung des IFN γ Spiegels bei nicht-beatmeten COVID-19 Patienten beobachtet werden. Eine gesteigerte IFN γ Expression als Reaktion auf die Stimulanz kann auch bei den beatmeten „Überlebenden“ vermerkt werden. Annähernd kein IFN γ wird in den stimulierten Proben der letztlich Verstorbenen detektiert.



und auf Normalstation verlegten (Ventilated Survived; 39 Proben) und 2 beatmeten und verstorbenen (Ventilated Dead; 3 Proben) COVID-19 Patienten wurden für 24 h mit oder ohne anti-CD3 inkubiert. Die IFN γ Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Jede Probe entspricht einem Punkt. Der Mittelwert ist in blau (Medium) oder rot (anti-CD3) markiert. Die einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur wurde zum Erfassen statistisch signifikanter Unterschiede verwendet. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Abb. 3.26: IFN γ Expression in anti-CD3 stimulierten PBMCs. PBMCs von 26 nicht-beatmeten (Non-vent.; 36 Proben), 14 beatmeten

4 Diskussion

4.1 T-Zell Hyporeaktivität bei COVID-19 Patienten

4.1.1 Beeinträchtigte Regulation der Oberflächenmoleküle auf Basophilen, Neutrophilen, Monozyten und pDCs

Die T-Zellaktivität kann anhand nachgeschalteter Effekte auf andere Immunzellen, darunter Basophile, Neutrophile, Monozyten und plasmazytoide dendritische Zellen, gemessen werden. In der Einleitung wurde bereits angesprochen, dass die Herabregulation von CD131 auf Basophilen und pDCs ein Zeichen vermehrter T-Zellaktivität ist. Die CD131 Expression ist bei den beiden Zellen, insbesondere bei den Basophilen, stark IL-3 abhängig (Abb.1.1, 1.2, 3.3, 3.10). Da IL-3 hauptsächlich von T-Zellen produziert wird [12], lässt sich über die Aktivität von Basophilen und pDCs auf die der T-Zellen zurückschließen. Ableiten lässt sich der Aktivierungszustand der T-Zellen auch von der Rezeptorregulation auf Monozyten und Neutrophilen. Monozyten reagieren auf eine gesteigerte T-Zellaktivität mit einer Hochregulation von dem Oberflächenmarker CD123. Die Monozyten werden unter anderem Zytokin-vermittelt, einschließlich IL-3, GM-CSF, IL-15, IFN γ , IFN α , IL-2 und TNF- α , von T-Zellen aktiviert [30] und regulieren reaktiv auf die Stimuli CD123 hoch (Abb. 1.3). Von der AG Mack durchgeführte Vorversuche zeigen, dass eine Hochregulation von CD11b auf Neutrophilen ebenfalls für eine gesteigerte Tätigkeit der T-Zellen spricht.

CD3 ist ein T-Zell spezifisches Oberflächenmolekül. Es ist mit dem T-Zellantigenrezeptor assoziiert und für die Signaltransduktion zuständig [12]. Die Stimulation von T-Zellen mit anti-CD3 sollte somit zu einer vermehrten Ausprägung der oben genannten Effekte auf Basophile, pDCs, Monozyten und Neutrophile führen. Diese Effekte lassen sich über die Analyse der Rezeptorexpression auf den Immunzellen quantifizieren und Aussagen zu der T-Zellaktivität zu.

4 Diskussion

Wie die Ergebnisse zeigen, ist bei den COVID-19 Patienten gegenüber der Kontrollgruppe ein vermindertes Ansprechen der Zellen auf die anti-CD3 Stimulation zu sehen. Selbst bei den „Nicht-Beatmeten“ ist bereits eine deutliche Beeinträchtigung der Regulation der Oberflächenmoleküle auf den Immunzellen im Vergleich zu den Gesunden zu vermerken. Die Verstorbenen weisen wiederum gegenüber den beatmeten „Überlebenden“ deutliche Unterschiede in der Stärke der Regulation der Oberflächenmoleküle bei Reizexposition auf. Die Gruppe der Verstorbenen zeigt kaum eine Reaktion. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei allen untersuchten Zellpopulationen zu vermerken (Abb. 3.1- Abb. 3.10).

Da die fehlende Reaktion der Immunzellen für eine fehlende T-Zellreaktion auf den gesetzten anti-CD3 Reiz spricht, kann man sagen, dass eine zunehmend ausgeprägte T-Zell Hyporeaktivität mit einem zunehmend schwereren Krankheitsverlauf einhergeht und dieser Effekt bereits bei milderer, nicht-beatmungsbedürftiger Erkrankung zu erkennen ist.

4.1.2 Verminderte Zytokinexpression

Die Ergebnisse der VB-ELISA, wie auch der PBMC-ELISA sprechen ebenso für die T-Zell Hyporeaktivität. Da die PBMC-Analyse weniger aussagekräftig als die Vollblutanalyse ist, wird sich im weiteren nur auf die VB-ELISA bezogen. Die geringere Sensitivität der PBMC-Analyse gegenüber der VB-Analyse erkennt man unter anderem an den Ergebnissen des ELISAs. Betrachtet man den VB-IL-3-ELISA (Abb. 3.11) und den PBMC-IL-3-ELISA (Abb. 3.24) so ist der Unterschied in den einzelnen Gruppen bezüglich der gemessenen IL-3 Konzentration in den VB-Versuchen eindeutiger zu sehen. Auch Tiefenböck, C. zeigt vergleichend für VB- und PBMC-Untersuchungen eine Unterlegenheit der PBMC-Versuche [57].

Bei den VB-ELISA ist mit Zunahme der Erkrankungsschwere eine Beeinträchtigung der Zytokinausschüttung zu verzeichnen (Abb. 3.11-3.13).

In den unstimulierten Proben weisen alle Gruppen eine geringe IL-3 Expression auf, die letztlich Verstorbenen tendenziell die niedrigste. Hinsichtlich GM-CSF zeigen die nicht-beatmeten COVID-19 Patienten die höchste Expression auf, die anderen Gruppen nur eine geringe (Beatmete) bis keine (Gesunde). Laut Bonaventura et al. weisen COVID-19 Patienten vor allem in der

4 Diskussion

Akut-Phase erhöhte GM-CSF Spiegel auf. Mit zunehmender Krankheitsdauer sinkt die GM-CSF Konzentration [3]. Die vermehrte Expression von GM-CSF bei nicht-beatmeten COVID-19 Patienten und schwächere GM-CSF Expression bei Patienten in einem späteren Erkrankungsstadium könnte demnach die Krankheitsdauer der Patienten widerspiegeln, da die Beatmeten im Durchschnitt bereits länger infiziert sind beziehungsweise eine längere Viruspersistenz aufweisen (10 zu 28) (Tabelle 7). Allerdings ist vermutlich auch die T-Zell Hyporeaktivität ein wesentlicher Faktor für die niedrigere GM-CSF Konzentration bei beatmeten COVID-19 Patienten. Die höchste IFN γ Konzentration zeigt sich bei der Gruppe der Beatmeten. Auch die Nicht-Beatmeten exprimieren gegenüber den Gesunden vermehrt IFN γ . Bei differenzierter Betrachtung der Gruppe der Beatmeten fällt auf, dass bei den letztlich Verstorbenen für IFN γ nur geringe Spiegel zu verzeichnen sind. Dies lässt sich mit der vorliegenden T-Zelldysfunktion und einhergehender beeinträchtigter Zytokinausschüttung erklären. Die Ergebnisse bestätigen vorangegangene Studien, welche von einer erhöhten IFN γ Konzentration bei COVID-19 Patienten im Zuge des Zytokinsturms sprechen [3, 29], jedoch auch von einer verminderten bei kritischen Patienten [18].

In den stimulierten VB-Proben ist die Beeinträchtigung der Zytokinexpression bei schwerwiegender erkrankten SARS-CoV-2 Infizierten deutlicher zu erkennen. Während die Gesunden und „Nicht-Beatmeten“ auf die anti-CD3 Stimulation mit einer massiven Zytokinausschüttung reagieren, fehlt diese Reaktion bei schwerer Erkrankten gänzlich (Abb. 3.11 - 3.13).

Die ELISA-Ergebnisse spiegeln alles in allem die T-Zell-Hyporeaktivität wieder, welche maßgeblich an der Produktion von IL-3, GM-CSF und IFN γ beteiligt sind [12]. Insgesamt bestätigen obige Ergebnisse vorangegangene Studien, welche unter anderem von einer funktionellen Erschöpfung von T-Lymphozyten im Rahmen einer SARS-CoV-2 Infektion sprechen [18, 47, 49].

Zu beachten ist, dass Medikamente die Zytokinexpression beeinflussen können. Ein Beispiel dafür ist in der Einleitung für IL-3 beschrieben (S.25). Ein Einfluss von immunsuppressiven Therapeutika auf die Zytokinexpression, insbesondere auf die stark verminderten Expression bei den letztlich Verstorbenen, ist hier jedoch unwahrscheinlich. Aus der Tabelle 7 geht hervor, dass prozentual keine größeren und relevanten Abweichungen zwischen den Gruppen (Nicht-beatmete 20%; Beatmete 7 %) hinsichtlich einer immunsuppressiven Therapie vorliegen. Immunsuppressive Therapeutika werden hier somit nicht als Störfaktor für die Versuchsergebnisse bewertet.

4.2 Reversibilität der T-Zell Hyporeaktivität gezeigt an Patientenbeispielen

Die longitudinalen Zellanalysen zeigen ein vermehrtes Wiederansprechen der Neutrophilen und Monozyten auf den anti-CD3 Stimulationsreiz im Zuge der Verbesserung des Gesundheitszustandes von Beatmeten. Dies spricht für eine Wiedererlangung der Aktivität der T-Zellen im Laufe der Genesung.

Wie die Ergebnisse zeigen, ist im Zeitraum der Beatmung kaum ein Ansprechen der Zellen auf den Reiz zu vermerken. Mit zunehmender Genesung wird tendenziell jedoch sowohl der CD123 auf Monozyten wie auch der CD11b auf Neutrophilen wieder verstärkt reaktiv nach oben reguliert. Eine zunehmende Reaktivität ist hier bereits ein paar Tage vor der Extubation des Patienten zu erkennen (Abb. 3.14 - 3.17). Somit geht eine wiedererlangte Reaktivität und Funktionalität der T-Zellen der klinischen Besserung von Patienten voraus.

Hingegen zeigen die Beispiele der beiden verstorbenen Patienten, dass eine Reaktion der Zellen auf den Stimulationsreiz bis zuletzt ausbleibt (Abb. 3.18 - 3.19). Die fortdauernde Dysfunktion der T-Zellen und die somit maßgebliche Beeinträchtigung des Immunsystems führt vermutlich letztendlich zum tödlichen Krankheitsverlauf.

4.3 Überwindung der T-Zell Hyporeaktivität bei Schwerkranken als möglicher Therapieansatz

Wie im obigen Unterpunkt erwähnt wird, folgt einer fortbestehenden T-Zell Hyporeaktivität letztendlich der Tod (Abb. 3.18 - 3.19). Eine Wiedererlangung der T-Zellfunktion geht hingegen mit einer klinischen Besserung der Patienten einher (Abb. 3.14 - 3.17). Die bisherige immunsuppressive Therapie könnte kombiniert mit Medikamenten, die eine Überwindung der T-Zell Hyporeaktivität bewirken, ein neuer Therapieansatz für kritische COVID-19 Patienten sein. Tiefenböck, C. präsentiert hierzu ihrer Arbeit einen Ansatz mit Interleukin 2 [57].

Das Präparat CD24Fc, das sich derzeit in der Untersuchung für die Behandlung von COVID-19 befindet, bewirkt vermutlich unter anderem eine Stärkung von T-Zellen. Der Immunmodulator

wird aktuell in einer randomisierten, kontrollierten, doppelverblindeten Phase-III-Studie untersucht (Stand 05.01.2021). Präklinische Modelle zu diesem Präparat zeigten laut Forscher einen positiven Effekt auf die Anzahl und Funktionalität von T-Zellen [59].

4.4 Geschlechtsspezifische IL-3R α Regulation auf Monozyten: Faktor für schwerwiegenderen Verlauf bei Männern

Die Untersuchungen ergaben, dass Männer im Vergleich zu Frauen den CD123 auf Monozyten bei Stimulation signifikant stärker hochregulieren (Abb. 3.21). Das heißt, bei Männern erfolgt eine stärkere Monozytenaktivierung bei Reizexposition.

Wie Tiefenböck, C. in ihrer Doktorarbeit „Untersuchung der Aktivierung von Monozyten-subpopulation bei Patienten mit COVID-19“ im Ergebnisteil präsentiert, sind Monozyten an der fulminanten Entzündungsreaktion des Körpers beteiligt [57]. Die gesteigerte Aktivität der Monozyten und die damit einhergehenden gesteigerten Zytokinsekretion (insbesondere IL-6, IL-1, TNF α) bei Männern könnte ein Faktor für den meist kritischeren COVID-19 Verlauf bei Männern sein und erklären, warum trotz annähernd gleicher Infektionsgeschehen in den beiden Geschlechtern prozentual mehr Männer beatmet werden und an COVID-19 versterben (Tabelle 7) [44]. Bei den anderen untersuchten Immunzellen (pDCs, Basophile, Neutrophile) sind keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zu beobachten (Abb. 3.20, Abb. 3.22, Abb. 3.23).

4.5 Einfluss von IL-3 auf COVID-19

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle von IL-3 bei COVID-19 basierend auf den Studienergebnissen beleuchtet werden.

Die Ergebnisse des VB-IL-3 ELISAs (Abb. 3.11) zeigen, dass letztlich Verstorbene COVID-19 Patienten nur gering IL-3 exprimieren. Dies kann als Zeichen der T-Zell Hyporeaktivität aufgefasst werden, da diese Zellen bekanntlich als Hauptquelle für IL-3 gelten [12, 52].

Die verminderte IL-3 Produktion erklärt den Umstand, dass letztlich verstorbene COVID-19

4 Diskussion

Patienten deutlich verringerte Zahlen an Basophilen und pDCs aufweisen, für welche IL-3 einen wesentlicher Faktor für die Proliferation, Aktivität und das Überleben ist [30, 54]. Die Vollblut-Versuche mit und ohne anti-IL-3 Ak stellen die Abhängigkeit der Basophilen und pDC Aktivität von der IL-3 Konzentration dar (Abb. 3.3, Abb. 3.10). Abbildung 3.2 verbildlicht die verringerte Basophilenzahl der Gruppe der Verstorbenen verglichen zu den anderen Gruppen. Umfangreichere Ergebnisse zu den Zellzahlen präsentiert Charlotte Tiefenböck in ihrer Arbeit. Ihre Ergebnisse zeigen deutlich reduzierte Zellzahlen für pDCs und Basophile bei den Verstorbenen COVID-19 Patienten [57]. Eine Studie, die im Oktober 2020 im Nature publiziert wurde und ebenso eine Vollblut-Immunphänotypisierung durchgeführt hat, bestätigt die Ergebnisse hinsichtlich der Zellzahlen [6]. Eine vermehrte Infiltration der Zellen ins Gewebe könnte zudem zu den verminderten Zellzahlen im Blutkreislauf beitragen.

Beatmete ohne tödlichen Krankheitsverlauf weisen im Vergleich zu den Verstorbenen tendenziell einen etwas höheren IL-3 Spiegel auf (Abb. 3.11), was mit einer mildereren Hyporeaktivität der T-Zellen zu erklären ist sowie eine deutlich erhöhte Zahl an Basophilen und pDCs (Abb. 3.2) [57]. Die Korrelation von IL-3 Expression und der Zellzahl von Basophilen und pDCs spiegelt sich hier somit wieder. Jedoch weisen die Zahlen ein kleines Missverhältnis auf. So ist vergleichsweise zu den Verstorbenen nur eine gering erhöhte IL-3 Konzentration im Blut zu messen, jedoch deutlich erhöhte Zellzahlen. Eine Erklärung hierfür wäre eine schnelle Aufnahme des IL-3 in Zielzellen, was eventuell größere Mengen an vorhanden IL-3 maskiert. So könnte es sein, dass IL-3 hier in höheren Konzentrationen vorkommt, als mittels dem ELISA letztlich gemessen wird.

IL-3 ist ein relevanter Faktor für die Aktivierung, Proliferation und Ausdifferenzierung von Monozyten [45, 58]. Das IL-3 bei der Aktivierung von Monozyten mitwirkt, zeigt auch der Vorversuch von Tiefenböck, C. (Abb. 1.3). In ihrer Arbeit zeigt Tiefenböck, C. zudem eine wesentliche Beteiligung von Monozyten bei SARS-CoV-2 bedingten Entzündungsprozessen [57]. Im Zuge einer Migration von IL-3 produzierender Zellen ins inflammatorische Gewebe wäre eine lokale Produktion von IL-3 möglich. Über Bereitstellung von einer großen Zahl an Monozyten und Makrophagen und einer Aktivierung derer, könnte IL-3 eine verstärkte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokine, darunter vor allem IL-6, IL-1 und TNF α bewirken und somit zu dem Zytokinsturm und darüber zu einer ausgeprägten Akut-Phase Reaktion beitragen [60].

5 Zusammenfassung

Primäres Ziel der Arbeit ist es, die Expression von IL-3 und seinem Rezeptor auf der Oberfläche von Immunzellen bei COVID-19 Patienten zu analysieren. Zu den untersuchten Immunzellen gehören Basophile Granulozyten, Neutrophile Granulozyten, plasmazytoide dendritische Zellen und Monozyten. Es soll ein potenzieller Zusammenhang von IL-3 Konzentration beziehungsweise IL-3 Rezeptorexpression und der Erkrankungsschwere SARS-CoV-2 infizierter Patienten untersucht werden. Zusätzliches Ziel ist es die T-Zellaktivität der Patienten zu beurteilen. Zudem werden die Konzentration von GM-CSF und IFN γ betrachtet.

Untersuchungsmaterialien waren Vollblutproben von COVID-19 Patienten, sowie zu einem kleineren Teil PBMC-Proben der gleichen Patientengruppe. Von einigen Patienten konnten über einen längeren Zeitraum Blutproben gesammelt werden. Zudem wurde von gesunden Probanden Blut abgenommen, um eine Vergleichsbasis zu schaffen. Die Zellanalyse hinsichtlich der Rezeptorexpression und Zelltypisierung erfolgte durchflusszytometrisch, die Messung der Zytokinexpression mittels ELISA.

Für jeden Patienten wurden vier Vollblutansätze in FACS-Röhrchen, zwei unbeschichteten und zwei mit anti-CD3 beschichteten, zubereitet. In ein beschichtetes und ein unbeschichtetes wurde RPMI Medium gemixt mit anti-IL-3-Ak zu dem Vollblut gegeben, in das andere Paar reines RPMI Medium zum Blut hinzugefügt. Anschließend wurden die Ansätze für 24 h inkubiert.

Die PBMC-Versuchsreihe ist hauptsächlich Bestandteil der Arbeit von Charlotte Tiefenböck. Die Versuchsvorbereitung und Durchführung dazu ist in ihrer Ausarbeitung beschrieben.

Die Vollblutansätze ermöglichen es, die Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei den Erkrankten im Vergleich zu den Gesunden zu erfassen und zu analysieren, welche Auswirkungen

5 Zusammenfassung

die Zugabe des anti-IL-3-Ak hat. Zudem kann die Reaktion von T-Zellen auf den anti-CD 3 Stimulus und Unterschiede zwischen den Erkrankten und Gesunden bezüglich der zellulären Immunantwort analysiert werden. Rückschlüsse auf die T-Zellaktivität lassen sich durch die Untersuchung der Zytokinexpression und mittels Analyse der Expression von dem IL-3 Rezeptor auf Basophilen (CD131), pDCs (CD131) und Monozyten (CD123), sowie der Expression des Aktivitätsmarkers CD11b auf Neutrophilen ziehen.

Die in den Proben enthaltenen Zellen wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich Rezeptorexpression und Größe und Granularität, was eine Zelltypisierung ermöglicht, analysiert. Dazu wurden die Zellen gewaschen und mit Hilfe fluoreszierender Antikörper gefärbt. Die abgenommenen Überstände der Ansätze wurden hinsichtlich der Konzentration an IL-3, IFN γ und GM-CSF mittels ELISA untersucht.

Die Ergebnisse der ELISA Untersuchungen und der durchflusszytometrischen Analyse zeigen eine ausgeprägte T-Zell Hyporeaktivität bei den Verstorbenen. Im Rahmen dieser weisen die Patienten annähernd keine Erhöhung der IL-3, IFN γ und GM-CSF Expression bei Reizexposition auf. Die Hyporeaktivität der T-Zellen äußert sich zudem in einer, vergleichsweise zu den gesunden Probanden, stark verminderten reaktiven Rezeptorregulation auf Monozyten, Neutrophilen, Basophilen und pDCs infolge einer T-Zell-Stimulierung mit aCD3. Bereits bei milderen Krankheitsverläufen kann gegenüber der Kontrollgruppe eine verminderte T-Zellreaktivität beobachtet werden. Eine zunehmende Dysfunktion der T-Zellen geht mit zunehmend schwereren klinischen Symptomen einher.

Longitudinale Analysen von beatmeten Patienten sprechen für eine Reversibilität der T-Zell Hyporeaktivität, wobei eine Wiedererlangung der T-Zellreaktivität der klinischen Besserung vorausgeht.

Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung kann bei den Männern im Vergleich zu den Frauen eine verstärkte Reaktion der Monozyten auf den anti-CD3 Stimulus beobachtet werden. Dies könnte ein Faktor für den häufig schwerwiegenderen Krankheitsverlauf bei Männern sein.

6 Anhang

Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Geräte und Arbeitswerkzeug	30
Tab.2:	Chemikalien	30
Tab.3:	Antikörper für extrazelluläre FACS-Färbung	31
Tab.4:	Antikörper und Zytokine	31
Tab.5:	Auswertungsprogramme	32
Tab.6:	Lösungen und deren Zusammensetzung für den IL-3, GM-CSF und IFN γ ELISA	37
Tab.7:	Patienten- und Kontrollkollektiv - demografische & klinische Daten	39
Tab.8:	Patienten- und Kontrollkollektiv - medikamentöse COVID-19 Behandlung	40
Tab.9:	Patienten- und Kontrollkollektiv - Laborwerte	41

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1:	CD131 Regulation auf Basophilen in Abhängigkeit der Zytokinexposition . .	25
Abb.1.2:	CD131 Regulation auf pDCs in Abhängigkeit der Zytokinexposition	26
Abb.1.3:	CD123 Regulation auf Monozyten in Abhängigkeit der Zytokinexposition . .	27
Abb.3.1:	Expression von CD131 auf Basophilen	42
Abb.3.2:	Repräsentatives FACS Histogramm für VB-Stimulation - Basosphile	42
Abb.3.3:	Regulation von CD131 auf Basophilen in anti-IL-3 behandelten VB-Proben	43
Abb.3.4:	Expression von CD123 auf Monozyten	44
Abb.3.5:	Repräsentatives FACS Histogramm für VB-Stimulation - Monozyten	44
Abb.3.6:	Regulation von CD123 auf Monozyten in anti-IL-3 behandelten VB-Proben .	45
Abb.3.7:	Expression von CD11b auf Neutrophilen	46
Abb.3.8:	Repräsentatives FACS Histogramm für VB-Stimulation - Neutrophile	46
Abb.3.9:	Regulation von CD11b auf Neutrophilen in anti-IL-3 behandelten VB-Proben	47
Abb.3.10:	Regulation von CD131 auf pDCs in anti-IL-3 behandelten VB-Proben	48
Abb.3.11:	IL-3 Expression in VB-Proben	49
Abb.3.12:	GM-CSF Expression in VB-Proben	50
Abb.3.13:	IFN γ Expression in VB-Proben	51
Abb.3.14:	Patientenbeispiel 1	52
Abb.3.15:	Patientenbeispiel 2	53
Abb.3.16:	Patientenbeispiel 3	54
Abb.3.17:	Patientenbeispiel 4	55
Abb.3.18:	Patientenbeispiel 5	56
Abb.3.19:	Patientenbeispiel 6	56
Abb.3.20:	Geschlechtsspezifische Analyse der CD131 Regulation auf Basophilen	57
Abb.3.21:	Geschlechtsspezifische Analyse der CD123 Regulation auf Monozyten	58
Abb.3.22:	Geschlechtsspezifische Analyse der CD11b Regulation auf Neutrophilen . . .	58

Abbildungsverzeichnis

Abb.3.23: Geschlechtsspezifische Analyse der CD131 Regulation auf pDCs	59
Abb.3.24: IL-3 Expression in anti-CD3 stimulierten PBMCs	60
Abb.3.25: GM-CSF Expression in anti-CD3 stimulierten PBMCs	60
Abb.3.26: IFN γ Expression in anti-CD3 stimulierten PBMCs	61

7 Literaturverzeichnis

- [1] ARUNACHALAM, P. S. (2020, 4. September), Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans [Research Article]. *Science* , 369 (6508) : 1210-1220. Verfügbar unter: [10.1126/science.abc6261](https://doi.org/10.1126/science.abc6261) [abgerufen am 29.09.2020].
- [2] BECHER, B., TUGUES, S., GRETER, M. (2016). GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation [Review]. *Immunity*, 45 (5) : 963-973. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026> [abgerufen am 02.10.2020].
- [3] BONAVENTURA, A. ET AL. (2020, 3. Juli). Targeting GM-CSF in COVID-19 Pneumonia: Rationale and Strategies [Review]. *Frontiers in Immunology*, 11 : 1625. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01625> [abgerufen am 13.10.2020].
- [4] BROUGHTON, S., HERCUS, TR., NERO, T. ET AL (2018). A dual role for the N-terminal domain of the IL-3 receptor in cell signalling [Article]. *Nature Communications*, 9 (386) . Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02633-7> [abgerufen am 06.10.2020].
- [5] BROUGHTON, S.E., DHAGAT, U., HERCUS, T.R., NERO, T.L., GRIMBALDESTON, M.A., BONDER, C.S., LOPEZ, E.F, PARKER, M.W. (2012). The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling [Review]. *Immunological Reviews*, Sonderausgabe: Insights into Immune Structure, Recognition, and Signaling, 250 (1) : 277-302. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01164.x> [abgerufen am 07.10.2020].
- [6] CARISSIMO, G., XU, W., KWOK, I. ET AL. (2020, 16. Oktober). Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19 [Article]. *Nature Communications*, 11: 5243. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19080-6> [abgerufen am 04.01.2021].

- [7] CARR, P. D. ET AL. (2001). Structure of the Complete Extracellular Domain of the Common β Subunit of the Human GM-CSF, IL-3, and IL-5 Receptors Reveals a Novel Dimer Configuration [Article]. *Cell*, 104 (2) : 291-300. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00213-6) [abgerufen am 12.10.2020].
- [8] DEUTSCHES AERZTEBLATT (2020, 29. Juli). COVID-19: Tocilizumab bleibt in Phase-3-Studie erfolglos. Verfügbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/115110/COVID-19-Tocilizumab-bleibt-in-Phase-3-Studie-erfolglos> [abgerufen am 15.09.2020].
- [9] DEUTSCHES ZENTRUM FÜR INFEKTIONSFORSCHUNG (2020). Coronavirus. Verfügbar unter: <https://www.dzif.de/de/glossar/coronavirus> [abgerufen am 22.08.2020].
- [10] DOUGAN, M., DRANOFF, G., DOUGAN, S. (2019). GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation [Review]. *Immunity*, 50 (4) : 796-811. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.022> [abgerufen am 18.10.2020].
- [11] DR. HARA, T., MIYAJIMA, A. (1996). Function and Signal Transduction Mediated by the Interleukin 3 Receptor System in Hematopoiesis [Concise Review]. *Stem Cells Journals*, 14 (6) : 605-618. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/stem.140605> [abgerufen am 10.10.2020].
- [12] DR PARKIN, J., COHEN, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357 (9270) : 1777 : 1789. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7) [abgerufen am 05.01.2020].
- [13] EMA (2020). COVID-19: latest updates. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-latest-updates> [zuletzt aktualisiert am 19.01.2021; abgerufen am 20.01.2021].
- [14] ESANUM (2020, 11. Juni). Killer-T-Zellen und Neutrophile als entscheidende Marker. Verfügbar unter: <https://www.esanum.de/today/posts/prognose-ueber-covid-19-verlauf-laesst-sich-anhand-von-blutwerten-treffen> [abgerufen am 27.09.2020].
- [15] EUA (2020). The COVID-19 Treatment Guidelines Panel's Statement on the Emergency Use Authorization of the Casirivimab Plus Imdevimab Combination for the Treatment of COVID-19. Verfügbar unter:

7 Literaturverzeichnis

- <https://files.covid19treatmentguidelines.nih.gov/guidelines/archive/covid19treatmentguidelines-12-17-2020.pdf> [aktualisiert am 17.12.2020; abgerufen am 31.12.2020].
- [16] FRENDEL, G. (1992). Interleukin 3: From colony-stimulating factor to pluripotent immunoregulatory cytokine. *International Journal of Immunopharmacology*, 14 (3) : 421-430. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90172-H](https://doi.org/10.1016/0192-0561(92)90172-H) [abgerufen am 22.08.2020].
- [17] GREGORY, B., KIRCHEM, A., PHIPPS, S., GEVAERT, P., PRIDGEON, C., RANKIN, S. M., ROBINSON, D. S. (2003). Differential Regulation of Human Eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF Receptor α -Chain Expression by Cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF Down-Regulate IL-5 Receptor α Expression with Loss of IL-5 Responsiveness, but Up-Regulate IL-3 Receptor α Expression [Article]. *The Journal of Immunology*, 170 (11) : 5359-5366 . Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5359> [abgerufen am 16.10.2020].
- [18] HADJADJ, J. ET AL. (2020, 7. August). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients [Report]. *Science*, 369 (6504) : 718-724. Verfügbar unter: <https://science.sciencemag.org/content/369/6504/718> [abgerufen am 13.10.2020].
- [19] HUI, LI ET AL. (2020, 17. April). SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses[Hypothesis]. *THE LANCET*, 395 (10235) : 1517-1520. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30920-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30920-X) [abgerufen am 23.10.2020].
- [20] IMMUNDEFEKT.DE. CD Nomenklatur. Verfügbar unter: <https://www.immundefekt.de/immunologische-tabellen/cd-nomenklatur> [abgerufen am 01.10.2020].
- [21] JANKE, M., WITSCH, E. J., MAGES, H. W., HUTLOFF, A., KROCZEK, R. A. (2006). Eminent role of ICOS costimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells. *Immunology*, 118 (3) : 353–360. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02379.x> [abgerufen am 17.10.2020].
- [22] JILG, W. (2020, 15.Dezember). Impfen gegen SARS-CoV-2: wo stehen wir im Moment? [Online-Vortrag]. Infoveranstaltung der AG Impfen – Fachschaft Humanmedizin Regensburg e.V. [zuletzt aktualisiert 23.12.2020].

- [23] KAROW, T., LANG-ROTH, R. (2020, 1. Januar). Immunsuppressiva [Buchkapitel]. In: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie (28. Auflage). Köln: Karow/Lang. S. 929 - 960.
- [24] KLEIVELAND, C. R. (2015). Peripheral Blood Mononuclear Cells [book chapter]. In: Verhoeckx K. et al. (eds) The Impact of Food Bioactives on Health. Cham : Springer. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15 [abgerufen am 22.08.2020].
- [25] KOHSE, K. P. (2019): Klinische Chemie und Hämatologie [Taschenlehrbuch]. Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG. S. 400 - 407, 413.
- [26] KRAMER, D. K. (2013). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Verfügbar unter: <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1246/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/> [abgerufen am 23.08.2020].
- [27] KUMAR, A., RANI, L., MHASKE, S. T., POTE, S. T., BEHERA, S., MISHRA, G. C., WANI, M. R. (2020, 15. Februar). IL-3 Receptor Expression on Activated Human Th Cells Is Regulated by IL-4, and IL-3 Synergizes with IL-4 to Enhance Th2 Cell Differentiation. The Journal of Immunology, 204 (4) 819-831. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801629> [abgerufen am 16.10.2020].
- [28] LEONARD W. J. (2003). Type I Cytokines: Structural Considerations [book chapter]. In: Fundamental Immunology von PAUL W. E. (5. Auflage). Lippincott Williams & Wilkins. Verfügbar unter: [http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/FundamentalImmunology/ramiCOMMANDapplyStylesheet\(interface.xsl,pau@CH023S0201.pub\)&p_useridpau.html](http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/FundamentalImmunology/ramiCOMMANDapplyStylesheet(interface.xsl,pau@CH023S0201.pub)&p_useridpau.html) [abgerufen am 10.10.2020].
- [29] LIU, J. ET AL. (2020, 29. April). Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients [Research Paper]. THE LANCET, 55 (102763). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763> [abgerufen am 13.10.2020].
- [30] LUELLMANN-RAUCH, R. (2019). Taschenlehrbuch Histologie [Taschenlehrbuch]. Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG. S. 322 - 337.

- [31] LÉVÊQUE, C., GRAFTE, S., PAYSANT, J., SOUTIF, A., LENORMAND, B., VASSE, M., SORIA, C., VANNIER, J. P. (1998). Regulation of interleukin 3 receptor alpha chain (IL-3R alpha) on human monocytes by interleukin (IL)-4, IL-10, IL-13, and transforming growth factor beta (TGF-beta) [Article]. *Cytokine*, 10 (7) : 487-494. Verfügbar unter: 10.1006/cyto.1997.0324 [abgerufen am 17.10.2020].
- [32] MARSHALL, M. (2020, 15. September). How COVID-19 can damage the brain [Article]. *Nature*, 585 : 342-343. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02599-5> [abgerufen am 28.09.20].
- [33] MIRZA, S., CHEN, J., WEN, B., EWENS, C. L., DAI, J., MURPHY, J. M., YOUNG, I.G. (2010). Two Modes of β -Receptor Recognition Are Mediated by Distinct Epitopes on Mouse and Human Interleukin-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (29) : 22370-22381. Verfügbar unter: <https://www.jbc.org/content/285/29/22370> [abgerufen am 15.10.2020].
- [34] MURPHY, J. M., YOUNG, I. G. (2006). IL-3, IL-5, and GM-CSF Signaling: Crystal Structure of the Human Beta-Common Receptor [book chapter]. In: *Vitamins & Hormones: Interleukins* von LITWACK G. , 74 : 1-30. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74001-8](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74001-8) [abgerufen am 12.10.2020].
- [35] NOVUS BIOLOGICALS (2011). CD11b Expression, Leukocyte Adhesion and the Innate Immune System. Verfügbar unter: <https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/cd11b-expression-and-the-innate-immune-system> [abgerufen am 28.09.2020].
- [36] OFFERMANN, S. (2012). Zytokine [Buchkapitel]. In: *Pharmakologie & Toxikologie*. Berlin, Heidelberg : Springer. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-642-12354-2_22 [abgerufen am 28.09.2020].
- [37] RAMANI, A. ET AL. (2020, 23. September). SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids. *The EMBO Journal*, 39 (20) : e106230. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.15252/emj.2020106230> [abgerufen am 11.09.2020].

7 Literaturverzeichnis

- [38] RENNER, K. ET AL. (2018). Expression of IL-3 receptors and impact of IL-3 on human T and B cells. *Cellular Immunology* 334 : 49-60. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.09.005> [abgerufen am 16.10.2020].
- [39] RKI (2020, April). Hinweise zu Erkennung, Diagnostik und Therapie von Patienten mit COVID-19. Verfügbar unter: www.rki.de/covid-19-therapie-stakob [aktualisiert am 30.12.2020; abgerufen am 03.01.2021].
- [40] RKI (2020). COVID-19: Fallzahlen in Deutschland und weltweit. unter: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html [zuletzt aktualisiert 20.01.2021; abgerufen am 20.01.2021].
- [41] RKI (2020, Juli). Hyperinflammationssyndrom bei COVID-19. Verfügbar unter: DOI 10.25646/7037 [abgerufen am 15.10.2020].
- [42] RKI (2020, Mai). Falldefinition Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) (SARS-CoV-2). Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Falldefinition [zuletzt aktualisiert am 23.12.2020; abgerufen am 20.01.2021].
- [43] RKI (2020). Risikobewertung zu COVID-19. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Risikobewertung.html [zuletzt aktualisiert am 30.12.2020; abgerufen am 22.08.2020].
- [44] RKI (2020). SARS-CoV-2 Steckbrief zur Coronavirus-Krankheit. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html [zuletzt aktualisiert am 08.01.2021; abgerufen am 22.08.2020].
- [45] ROTH, J., RITTER, J. (2006). Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen [Buchkapitel]. In: Gadner H., Gaedicke G., Niemeyer C., Ritter J. (eds) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Berlin, Heidelberg : Springer. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/3-540-29036-2_19 [abgerufen am 25.10.2020].
- [46] ROY J. CARVER BIOTECHNOLOGIE CENTER (CBC). Cell Counting. Verfügbar unter: <https://biotech.illinois.edu/flowcytometry/protocols/cell-counting> [abgerufen am 22.08.2020].

- [47] SATTLER, A. ET AL. (2020, 24. August). SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition [Research Article]. *The Journal of Clinical Investigation*, 130 (12) : 6477–6489. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/JCI140965> [abgerufen am 27.09.2020].
- [48] SCHOEN, M. P. ET AL. (2020, 21. August). COVID-19 und Immunregulation - von grundlegenden und translationalen Aspekten zu klinischen Implikationen [Review]. *Journal of the German Society of Dermatology*, 18 (8) : 795-809. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1111/ddg.14169_g [abgerufen am 11.10.2020].
- [49] SCHUB, D. ET AL. (2020, 16. September). High levels of SARS-CoV-2 specific T-cells with restricted functionality in severe course of COVID-19 [Article]. *JCI insight*, 5 (20) : e142167. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142167> [abgerufen am 27.09.2020].
- [50] SHI, M., SU, R. J., PARMAR, K., CHAUDHRY, R., SUN, K., RAO, J., CHEN, M. (2019). CD123: A Novel Biomarker for Diagnosis and Treatment of Leukemia [Review]. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, 19 (3) : 195-204. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31244444/> [abgerufen am 17.10.2020].
- [51] SINO BIOLOGICAL. CD131 Proteins, Antibodies, cDNA Clones Research Reagents. Verfügbar unter: <https://www.sinobiological.com/category/cd131> [abgerufen am 05.01.2021].
- [52] SINO BIOLOGICAL. IL3 Information: IL3 Protein, IL3 Antibody and IL3 Gene. Verfügbar unter: <https://www.sinobiological.com/resource/il3> [abgerufen am 05.01.2021].
- [53] SINO BIOLOGICAL. IL3RA-Informationen: IL3RA-Protein, IL3RA-Antikörper und IL3RA-Gen. Verfügbar unter: <https://www.sinobiological.com/resource/il3ra> [abgerufen am 05.01.2021].
- [54] SINO BIOLOGICAL. Interleukin Function / Function of Interleukin. Verfügbar unter: <https://www.sinobiological.com/research/cytokines/interleukin-function#IL-3> [abgerufen am 05.01.2021].
- [55] TAK, T. ET AL. (2017). Neutrophil-mediated Suppression of Influenza-induced Pathology Requires CD11b/CD18 (MAC-1) [Article]. *American Journal of Respiratory Cell and*

7 Literaturverzeichnis

- Molecular Biology, 58 (4) : 492-499. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0021OC> [abgerufen am 17.10.2020].
- [56] THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP (2020, 17. Juli). Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 [Preliminary Report]. The new england journal of medicine. Verfügbar unter: [10.1056/NEJMoa2021436](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436) [abgerufen am 15.09.2020].
- [57] TIEFENBOECK, C. (2024). Untersuchung der Aktivierung von Monozytensubpopulationen bei Patienten mit COVID-19 [Dissertation, Medizin].
- [58] UNGEFROREN, H., RUHNKE, M., KREMER, B., FÄNDRICH, F. (2005). Die in vitro Differenzierung von postmitotischen Monozyten in Zelltypen anderer histogenetischer Herkunft beruht auf einer durch M-CSF und IL-3-induzierten partiellen Dedifferenzierung [Buchkapitel]. In: Rothmund M., Jauch KW., Bauer H. (Hrsg.) Chirurgisches Forum. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Band 34. Berlin, Heidelberg : Springer. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/3-540-26560-0_127 [abgerufen am 25.10.2020].
- [59] U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (2020, 20. März). CD24Fc as a Non-antiviral Immunomodulator in COVID-19 Treatment (SAC-COVID). Verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04317040> [zuletzt aktualisiert am 24.11.2020; abgerufen am 05.01.2021].
- [60] WEBER, G. F. ET AL. (2015). Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis [Report]. Science, 347 (6227) :1260-1265. Verfügbar unter: <https://science.sciencemag.org/content/347/6227/1260> [abgerufen am 22.08.2020].
- [61] WHO (2020). Pandemie der Coronavirus-Krankheit (COVID-19). Verfügbar unter: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> [zuletzt aktualisiert am 19.01.2020; abgerufen am 20.01.2020].
- [62] WHO RAPID EVIDENCE APPRAISAL FOR COVID-19 THERAPIES (REACT) WORKING GROUP (2020, 2. September). Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19 [Meta-Analyse]. JAMA, 324 (13) : 1330-1341. Verfügbar unter: [10.1001/jama.2020.17023](https://doi.org/10.1001/jama.2020.17023) [abgerufen am 03.01.2021] .

7 Literaturverzeichnis

- [63] XU, Z., SHI, L., WANG, Y. ET AL. (2020, 18. Februar). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome [Case Report]. *THE LANCET Respiratory Medicine*, 8 (4) : 420-422. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X) [abgerufen am 17.10.2020].
- [64] YAMADA, T. ET AL. (1998). IL-3, IL-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor α -subunit, and common β -subunit expression by peripheral leukocytes and blood dendritic cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101 (5) : 677-682. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70177-0](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70177-0) [abgerufen am 16.10.2020].
- [65] YOSHIMURA-UCHIYAMA, C. ET AL. (2003). Changing expression of IL-3 and IL-5 receptors in cultured human eosinophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309 (1) : 26-31. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01526-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01526-2) [abgerufen am 16.10.2020].
- [66] ZIEBUHR, J. (2016). Coronaviren [Buchkapitel]. In: Suerbaum S., Burchard GD., Kaufmann S., Schulz T. (eds) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg : Springer. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-662-48678-8_58 [abgerufen am 09.09.2020].

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung und Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Mack bedanken für die Möglichkeit in der Inneren Medizin II, Abteilung Nephrologie, zu promovieren, für die Bereitstellung des überaus interessanten und aktuellen Forschungsthemas und für die Unterstützung bei der Umsetzung dessen.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. Kerstin Renner für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Arbeit. Dank Ihrer enormen Unterstützung wurde die Umsetzung der Arbeit erst ermöglicht.

Bedanken möchte ich mich zudem bei dem Team der AG Mack. Allen voran bei Frau Sophia Neumayer für die Einarbeitung und Beantwortung jeglicher Fragen. Gleicher Dank gilt Frau Yvonne Talke, Frau Simone Buchtler, Frau Frederike Winter, Frau Kathrin Schmidbauer, Herrn Jan-Niklas Salewski und Herrn Saidou Balam.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Laborpartnerin Charlotte Tiefenböck für die tolle Zusammenarbeit und meiner Familie und Freunden für das Korrekturlesen bedanken.