

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

Untersuchung der Aktivierung von Monozytensubpopulationen bei Patienten mit  
COVID-19

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin der  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
Charlotte Tiefenböck

2024



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

Untersuchung der Aktivierung von Monozytensubpopulationen bei Patienten mit  
COVID-19

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin der  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
Charlotte Tiefenböck

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	SARS-CoV-2 und COVID-19 .....	8
1.1.1	Allgemeine Informationen zur Familie der Coronaviren.....	8
1.1.2	Verlauf der SARS-CoV2-Pandemie und Epidemiologie (Stand: 18.05.2021).....	9
1.1.3	Symptome einer Erkrankung mit SARS-CoV-2 (Stand: 18.05.2021).....	10
1.1.4	Therapieansätze und Impfung (Stand: 18.05.2021).....	11
1.2	Monozyten.....	14
1.2.1	Der Hämatopoetische Stammbaum.....	14
1.2.2	Histologischer Aufbau und Subpopulationen .....	14
1.2.3	Aufgaben.....	15
1.2.4	Funktion im Immunsystem .....	15
1.2.4.1	Rezeptoren.....	15
1.2.4.2	Aktivierung.....	16
1.2.4.3	Sezernierte Substanzen und deren Funktion .....	17
1.3	Überlegungen, Ansätze und Ziele .....	19
2	Materialien und Methoden .....	20
2.1	Geräte und Labormaterialien .....	20
2.1.1	Geräte .....	20
2.1.2	Glas- und Kunststoffwaren .....	20
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Puffer .....	21
2.1.4	Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze .....	22
2.1.5	Antikörper für die extrazellulären Durchflusszytometrien .....	22
2.1.5.1	Antikörper Vollblutproben.....	22
2.1.5.2	Antikörper PBMCs.....	23
2.1.6	Zytokine und Antikörper für die Stimulationen.....	23
2.1.7	Material für die PBMC-ELISAs .....	24

2.1.8	Analyse- und Bearbeitungsprogramme.....	24
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Patientenkollektiv .....	24
2.2.1.1	Patientenrekrutierung und demographische Daten .....	24
2.2.1.2	Erhobene Patientendaten .....	25
2.2.1.3	Kontrollgruppe .....	25
2.2.2	Extrazelluläre FACS-Färbung und Durchflusszytometrie der Vollblutproben ...	25
2.2.3	Vollblutstimulation mit anschließender Färbung.....	28
2.2.4	PBMCs (peripheral blood mononuclear cells).....	29
2.2.4.1	Stimulation, extrazelluläre Färbung und Durchflusszytometrie .....	29
2.2.4.2	Zytokin-ELISA.....	31
2.2.5	Statistische Auswertung.....	33
2.2.5.1	Allgemeine statistische Auswertung .....	33
2.2.5.2	Werte des prädiktiven Scores .....	33
3	Ergebnisse .....	36
3.1	Patientendaten.....	36
3.1.1	Baseline-Charakteristika .....	36
3.1.2	Laborwerte .....	39
3.2	Viruspersistenz und T-Zell-Hyporeaktivität.....	40
3.3	Immunphänotypisierung von Vollblut.....	42
3.3.1	Allgemeine Beschreibung des Gatings .....	42
3.3.2	T-Zellen.....	43
3.3.2.1	CD4+-Zellen .....	43
3.3.2.1.1	Gatingstrategie für die CD4+-Zellen .....	43
3.3.2.1.2	Anzahl der CD4+-Zellen in den unterschiedlichen Patientengruppen .....	44
3.3.2.2	CD8+-Zellen .....	44
3.3.2.2.1	Gatingstrategie für die CD8+-Zellen .....	44

3.3.2.2.2	Anzahl der CD8+-Zellen in den unterschiedlichen Patientengruppen .....	45
3.3.3	Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs).....	46
3.3.3.1	Gatingstrategie für die pDCs.....	46
3.3.3.2	Anzahl der pDCs in den unterschiedlichen Patientengruppen .....	47
3.3.4	Basophile Granulozyten.....	48
3.3.4.1	Gatingstrategie für die basophilen Granulozyten.....	48
3.3.4.2	Anzahl der basophilen Granulozyten in den unterschiedlichen Patientengruppen.....	49
3.3.5	Neutrophile Granulozyten.....	50
3.3.5.1	Gatingstrategie für die neutrophilen Granulozyten.....	50
3.3.5.2	Anzahl der neutrophilen Granulozyten in den unterschiedlichen Patientengruppen.....	51
3.3.5.3	Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD11b auf neutrophilen Granulozyten.....	52
3.3.6	Monozyten .....	53
3.3.6.1	CD14+-Monozyten .....	53
3.3.6.1.1	Gatingstrategie für die CD14+-Monozyten .....	53
3.3.6.1.2	Anzahl der CD14+-Monozyten in den unterschiedlichen Patientengruppen .....	54
3.3.6.1.3	Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD169 auf CD14+-Monozyten .....	55
3.3.6.2	CD16+-Monozyten .....	56
3.3.6.2.1	Gatingstrategie für die CD16+-Monozyten .....	56
3.3.6.2.2	Anzahl der CD16+-Monozyten in den unterschiedlichen Patientengruppen .....	57
3.3.6.2.3	Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD169 auf CD16+-Monozyten .....	58
3.4	Vollblutstimulation.....	59

3.4.1	Basophile Granulozyten.....	60
3.4.2	Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs).....	61
3.4.3	CD14+-Monozyten .....	62
3.4.4	Neutrophile Granulozyten.....	63
3.5	PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) .....	64
3.5.1	Veränderung der Rezeptorexpressionen .....	64
3.5.1.1	Basophile Granulozyten .....	64
3.5.1.2	Monozyten.....	65
3.5.1.3	T-Zellen.....	66
3.5.1.3.1	CD4+-Zellen .....	66
3.5.1.3.2	CD8+-Zellen .....	67
3.5.2	Veränderung der Zytokinausschüttung bei unterschiedlichen Stimulationen .....	68
3.5.2.1	IL-3.....	68
3.5.2.2	GM-CSF.....	69
3.5.2.3	IFN- $\gamma$ .....	70
3.6	Prädiktiver Score .....	71
4	Diskussion .....	73
4.1	Patientendaten.....	73
4.2	Viruspersistenz .....	74
4.3	Immunphänotypisierung .....	74
4.4	Vollblutstimulation.....	78
4.5	PBMCs.....	79
4.6	Die Bedeutung des prädiktiven Scores .....	81
4.7	Bedeutung der Monozyten.....	82
5	Zusammenfassung .....	87
6	Tabellenverzeichnis.....	90
7	Abbildungsverzeichnis .....	91

8	Literaturverzeichnis.....	93
9	Danksagung	

# **1 Einleitung**

## **1.1 SARS-CoV-2 und COVID-19**

### **1.1.1 Allgemeine Informationen zur Familie der Coronaviren**

Das SARS-CoV-2-Virus gehört zur Familie der Coronaviridae. Diese Gruppe ist für etwa 15% aller Erkältungserkrankungen verantwortlich (1). Diese verlaufen meistens milde mit Symptomen wie Husten, Schnupfen oder Fieber. Allerdings sind zwischen 5-10% der stationär behandelten Infekte der unteren Atemwege auf Coronaviren zurückzuführen. Zudem können Coronaviren auch in geringerem Umfang gastrointestinale Erkrankungen auslösen. Sie werden über Aerosole und Tröpfcheninfektionen, seltener über Fäkalien oder Urin übertragen. Die Erreger sind gegenüber üblichen Desinfektionsmitteln und Hitze empfindlich. Der Nachweis von Coronaviren erfolgt in der Regel über eine RT-PCR (Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion) (2).

Die Familie der Coronaviren lässt sich in mehrere Genera unterteilen: Humanpathogene Formen sind entweder Alpha-Genus- oder Beta-Genus-Coronaviren. Zur letzteren Gruppe gehören unter anderem das SARS (severe acute respiratory syndrome)-Virus, das 2003 von Südchina ausgehend eine Epidemie mit etwa 8000 Erkrankten und mehr als 800 Toten auslöste, sowie das MERS (middle east respiratory syndrome)-Virus, das seit 2012 für schwere Atemwegsinfekte im Nahen und Mittleren Osten verantwortlich ist (2). SARS-CoV-2 und SARS-CoV zeigen große Übereinstimmungen in ihrer RNA (3). Sowohl SARS-CoV als auch MERS können wie SARS-CoV-2 ein schweres akutes respiratorisches Syndrom ("acute respiratory distress syndrome", ARDS) mit gravierenden Lungenschädigungen verursachen. Als natürliches Reservoir des MERS-Virus gelten Dromedare. Ein naher Verwandter von SARS-CoV wurde in Fledermäusen identifiziert und wahrscheinlich von dort ausgehend über Zwischenwirte auf den Menschen übertragen. Grundsätzlich lassen sich in Fledermäusen viele Coronaviren mit starker Ähnlichkeit zu humanpathogenen Formen finden, sodass eine erneute Übertragung von Tieren auf Menschen nicht unwahrscheinlich ist (2).

Coronaviren sind umhüllte, einzelsträngige Positivstrang-RNA-Viren mit helikalem Kapsid, deren Replikation im Zytoplasma stattfindet (2). Mit 30kb haben sie das größte bekannte RNA-Genom aller bekannten Viren. Für die Translation der viruseigenen Proteine wird zunächst der Genomabschnitt translatiert, der für die Replikase codiert. Diese erzeugt neue monocistronische mRNAs, von denen ausgehend die Strukturproteine erzeugt werden (1). Dazu gehören das Spikeglykoprotein, das Hüllprotein und das Membranprotein sowie bei

manchen Coronaviren das Hämagglutinin-Esterase-Protein und weitere zusätzliche Proteine, die Einfluss auf die Pathogenität haben. Unter dem Elektronenmikroskop zeigen die Coronaviren aufgrund dieser in die Hülle eingelagerten Glykoproteine ein typisches Erscheinungsbild, das an eine Krone erinnert (lat. "Corona") (2).

### 1.1.2 Verlauf der SARS-CoV2-Pandemie und Epidemiologie (Stand: 18.05.2021)

Am 31.12.2019 wurde das WHO (World Health Organization)-Landesbüro in China informiert, dass in der Region um die Stadt Wuhan vermehrt Fälle von Pneumonien unklarer Genese aufgetreten seien. Diese hingen mit dem lokalen Fisch- und Tiermarkt zusammen (4).

Am 09.01.2020 wurde ein neuartiges Coronavirus als Ursache dieser Erkrankung von den chinesischen Behörden identifiziert (5), das als severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) benannt wurde. Die dadurch ausgelöste Erkrankung wird als coronavirus disease 2019 (COVID-19) bezeichnet (6).

In den folgenden Wochen breitete sich das Virus sowohl in China als auch in weiteren Ländern sehr schnell aus. In vielen asiatischen Ländern, wie etwa Vietnam oder Taiwan, wurden zu diesem Zeitpunkt Kontrollmaßnahmen eingeführt, die größere Ausbrüche verhindern sollten (7). Ende Januar wurden die ersten Fälle in der Europäischen Union aus Frankreich gemeldet. In Deutschland wurden die ersten Erkrankungen am 28.01.2020 registriert (5). Aufgrund dieser raschen Ausbreitung, auch in den USA, wurde der SARS-CoV-2-Ausbruch am 11.03.2020 von der WHO als Pandemie eingestuft (7).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind weltweit etwa 163.212.500 Menschen mit dem Virus infiziert oder hatten sich in der Vergangenheit damit angesteckt. Bisher sind an die 3.384.000 Personen an COVID-19 verstorben. In Deutschland sind circa 3.600.000 Erkrankungsfälle und etwa 86.000 Todesfälle bestätigt worden (8).

SARS-CoV-2 wird überwiegend durch Tröpfchen beim Sprechen oder Husten übertragen. Dabei können Entfernungen bis zu 1,5m überwunden werden. Die Weitergabe über Aerosole beispielsweise im Rahmen einer Bronchoskopie ist möglich, aber eher selten und Infektionen über Fäkalien oder andere Sekrete des Magen-Darm-Traktes sind bisher nicht nachgewiesen worden. Das Virus repliziert sich im oberen Respirationstrakt schon vor dem Auftreten der ersten Symptome. Dadurch besteht die Möglichkeit der Weiterverbreitung des Erregers durch asymptomatisch oder wenig symptomatisch Infizierte. Zudem gibt es Hinweise auf eine Virusvermehrung im Gastrointestinaltrakt (7).

Der Mittelwert der Neuinfizierten, die sich an einem Erkrankten angesteckt haben, wird als Reproduktionszahl  $R_0$  bezeichnet. Diese kann durch die gezielte Betrachtung von Personengruppen und Rückverfolgung der Infektionskette abgeschätzt werden. Mit Kontaktbeschränkungen wurde versucht, die Reproduktionszahl unter den Wert 1 zu bringen und so eine weitere Ausbreitung einzudämmen (7).

Die Inkubationszeit lag bei den meisten Infizierten zwischen 2 Tagen und 2 Wochen (Median 5,7 Tage) (7).

Als Latenzzeit wird die Zeit bezeichnet, die zwischen der eigenen Infektion und dem Beginn der eigenen Infektiosität vergeht. Diese ist bei SARS-CoV-2 wahrscheinlich etwa einen Tag kürzer als die Inkubationszeit (7).

Bei der Analyse von Infektionsketten lässt sich das serielle Intervall bestimmen, das den zeitlichen Abstand zwischen zwei Infektionen innerhalb einer Übertragungskette beschreibt und in diesem Fall zwischen vier und sieben Tage beträgt (7).

### 1.1.3 Symptome einer Erkrankung mit SARS-CoV-2 (Stand: 18.05.2021)

Die Symptomatik bei den Betroffenen variiert, wie folgende Tabelle darstellt (9):

Symptom	Häufigkeit
Husten	40%
Fieber	27%
Schnupfen	29%
Störung des Geruchs- und/oder Geschmacks-sinns	22%
Pneumonie	1,0%

**Table 1 - Typische Symptome bei COVID-19**

Weitere beschriebene Symptome sind Halsschmerzen, Atemnot, gastrointestinale Beschwerden (Diarrhö, Erbrechen, Bauchschmerzen) und Kopf- und Gliederschmerzen (9).

Neben leichteren Erkältungsformen können auch fulminante Krankheitsbilder auftreten, wie ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), akutes Nierenversagen und neurologische Krankheitsbilder wie das Guillain-Barré-Syndrom. Das Risiko für thromboembolische Ereignisse mit entsprechenden Folgeschäden ist erhöht. Bei schweren Verläufen besteht das

Risiko eines Hyperinflammationssyndroms mit konsekutivem Multiorganversagen und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Ko-Infektionen mit bakteriellen Erregern und Pilzen (9).

Der Großteil der Infektionen verläuft unkompliziert, also asymptomatisch oder mit nur wenigen Beschwerden. Die Hospitalisierungsrate beträgt 4-7%. Von den hospitalisierten Patienten benötigt etwa ein Viertel eine intensivmedizinische Betreuung (7).

Eine Beobachtungsstudie von Karagiannidis et al. von etwa 10.000 COVID-19-Patienten in Deutschland zeigte, dass der Krankheitsverlauf sehr variabel ist (10).

Etwa ein Fünftel der stationär aufgenommenen Erkrankten musste invasiv beatmet werden. Während das Geschlechterverhältnis bei Patienten ohne Beatmung ausgeglichen war, zeigte sich in der beatmeten Gruppe, dass es dort etwa doppelt so viele Männer wie Frauen gab (10). Der Großteil der Erkrankten war zwischen 20 und 60 Jahre alt. Kinder waren seltener betroffen (7). Der Anteil der Patienten mit Komorbiditäten war bei Beatmungspflichtigen deutlich höher. Ungefähr ein Viertel der Beatmeten wurde dialysepflichtig und etwa 7% benötigten ein ECMO-Gerät (Extracorporeal membrane oxygenation). In der ECMO-Patientengruppe betrug die Mortalität circa 71% (10).

Insgesamt lag die Mortalität der hospitalisierten COVID-Patienten bei 22%. Es zeigten sich wesentliche Unterschiede zwischen den beatmeten und nicht-beatmeten Patienten: So verstarben in der nicht-beatmeten Gruppe 16%, in der beatmeten etwas über die Hälfte. Auch innerhalb dieser einzelnen Patientengruppen unterschieden sich die Sterberaten. Je älter der Erkrankte war, desto höher war die Sterbewahrscheinlichkeit. So war bei den Beatmeten die Mortalität in der Altersgruppe 18-59 Jahre 28%, bei den 80-Jährigen oder noch Älteren lag sie bei 72% (10).

Die Krankenhausliegezeiten variierten: die kürzesten Aufenthalte (einige Tage) hatten nicht-beatmete Patienten und längere Aufenthalte (mehrere Wochen) waren bei Erkrankten, bei denen die nicht-invasive Beatmung unzureichend wurde und die konsekutiv invasiv beatmet werden mussten, notwendig (10).

#### 1.1.4 Therapieansätze und Impfung (Stand: 18.05.2021)

Gegenwärtig existiert kein spezifisch auf SARS-CoV-2 abgestimmtes antivirales Medikament, das zur generellen Behandlung der Erkrankten empfohlen wird (11). Um dennoch auf die zum Teil sehr schwerwiegenden Krankheitsverläufe Einfluss nehmen zu können, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde auf bereits bekannte antivirale Substanzen zurückgegriffen und ihre Effizienz in der Behandlung von COVID-

Patienten überprüft (12, 13). Zum anderen wurden Informationen chemischer und molekularbiologischer Datenbanken benutzt, um weitere mögliche Behandlungsansätze, beispielsweise an Hormonrezeptoren, zu identifizieren (12, 14). Außerdem wurden gezielt auf genetische und biophysikalische Zielstrukturen von SARS-CoV-2 ausgerichtete Therapien erforscht (12, 15). Wichtig zu berücksichtigen ist, dass in vitro erzielte Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf Patienten übertragbar sind (12). Im Folgenden sollen einige therapeutische Ansätze beispielhaft vorgestellt werden.

Hydroxychloroquin wird zur Behandlung von Malaria eingesetzt und hat analgetische sowie anti-inflammatorische Eigenschaften (16). Beim therapeutischen Einsatz bei COVID-19-Patienten zeigten sich keine einheitlichen Ergebnisse. Bei den meisten Studien nahm zwar die Viruslast schneller ab und der Krankenhausaufenthalt war kürzer, aber es zeigte sich keine Verbesserung der Mortalität (17, 18). Andere Forschungsgruppen konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe feststellen (19). Daher sollte Hydroxychloroquin nur unterstützend eingesetzt werden (16).

Auch die Ergebnisse zum Einsatz und Nutzen von Kortikosteroiden variieren. So zeigte sich beim Einsatz von Methylprednisolon bei beatmeten Patienten, dass die Anzahl beatmungsfreier Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe höher war. Allerdings erwies sich der Unterschied in der Mortalität als nicht signifikant (20). Andererseits zeigte eine andere Studie, dass der Einsatz von Methylprednisolon bei stationären Patienten über 60 Jahren die Mortalität reduzierte, auch wenn bei der Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs insgesamt keine Verbesserung der Prognose erkennbar war (21). Der Einsatz von Dexamethason erwies sich als erfolgreicher. Insbesondere bei beatmeten Patienten war die Mortalität niedriger und das Risiko einer Verschlechterung des Zustandes geringer (22).

Remdesivir ist ein Adenosin-Analogon, das beim Einbau in die RNA zum vorzeitigen Kettenabbruch führt (23, 24). Studien bezüglich der Effektivität bei SARS-CoV-2 erbrachten uneinheitliche Ergebnisse. Bei einigen Anwendungen verbesserte sich die Sauerstoffversorgung der Patienten und sie erholten sich schneller (25). Bei anderen Erkrankten erbrachte Remdesivir keine statistisch signifikanten klinischen Vorteile (26).

Neben Medikamenten, die sich in ihrem Wirkmechanismus vor allem auf virale Strukturen konzentrieren, existieren auch Ansätze, deren Zielstruktur das menschliche Immunsystem ist.

Patienten, denen Rekonvaleszentenplasma, also Plasma von genesenen COVID-19-Erkrankten, verabreicht wurde, zeigten in mehreren Studien eine Verbesserung der Symptomatik und eine Abnahme der Viruslast (27).

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, wie Tocilizumab oder Eculizumab, bewirkte einen Rückgang von Entzündungsparametern wie CRP (C-reaktives Protein) (28, 29). Allerdings verschlechterten sich in einer Studie zwei Patienten nach Tocilizumab-Gabe (29). Zudem wurden ausgeprägte Nebenwirkungen dieses Ansatzes beschrieben (30).

Die Gabe von Typ 1-Interferonen (IFN-I) war ebenfalls mit einer Verbesserung des klinischen Bildes verbunden, insbesondere in Kombination mit anderen Behandlungsansätzen (27).

Die teilweise sehr variablen Ergebnisse zu den einzelnen Behandlungsansätzen sowie das Fehlen eines spezifischen Heilmittels für SARS-CoV-2 erschweren die Erstellung eines generell anwendbaren Therapieplans für COVID-19-Patienten.

Seit Dezember 2020 wurden die ersten Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 in Deutschland zugelassen (31).

Am 21.12.2020 erhielt der Impfstoff Comirnaty von BioNTech Manufacturing GmbH die Zulassung durch die Europäische Union (31, 32). Comirnaty ist ein mRNA-Impfstoff, der messenger-RNA enthält, die als Bauplan für ein Virus-Protein (Spikeprotein) von SARS-CoV-2 fungiert (32).

Der zweite zugelassene Impfstoff ist COVID-19 Vaccine Moderna des Zulassungsinhabers Moderna Biotech Spain, S.L. (31). Er wurde am 06.01.2021 durch die Europäische Union zugelassen (33). Wie Comirnaty ist auch COVID-19 Vaccine Moderna ein mRNA-Impfstoff. Somit wirkt auch er über das Spikeprotein von SARS-CoV-2, das anhand der verimpften messenger-RNA vom Körper des Empfängers erzeugt werden kann (34).

Ein weiterer Impfstoff ist COVID-19 Vaccine AstraZeneca von AstraZeneca AB (31). Er erhielt seine Marktzulassung durch die Europäische Union am 29.01.2021 (35). Dieser Impfstoff enthält Adenoviren, die so verändert wurden, dass sie das Gen für das Spikeprotein von SARS-CoV-2 beinhalten. Nach der Impfung beginnt der Körper des Geimpften anhand des Gens dieses Protein zu synthetisieren und entwickelt hierauf eine Immunantwort (36).

Der zuletzt (31) zugelassene Impfstoff ist COVID-19 Vaccine Janssen von Janssen-Cilag International NV. Er enthält ebenfalls modifizierte Adenoviren und erhielt seine Zulassung durch die Europäische Union am 11.03.2021 (37).

In Deutschland wurden bis jetzt etwa 9,55 Millionen Menschen vollständig geimpft (38).

## **1.2 Monozyten**

### 1.2.1 Der Hämatopoetische Stammbaum

Alle Blutzellen entwickeln sich aus omnipotenten Stammzellen auf zwei unterschiedlichen Wegen (39).

Der eine Weg ist die lymphoide Entwicklung (Lymphopoese), bei dem sich aus den omnipotenten Stammzellen über pluripotente Stammzellen die B- und T-Lymphozyten sowie die natürlichen Killerzellen entwickeln. Diese Zellen sind vor allem in der spezifischen Immunabwehr von Bedeutung (39).

Der andere Weg umfasst die myeloide Entwicklung (Myelopoese) (39). Hier entwickeln sich über eine myeloide Vorläuferzelle Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten. Die Myelopoese verläuft über weitere Zwischenstufen. Im Falle der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten ist diese Zwischenstufe die Granulozyten-Monozyten Vorläuferzelle (40).

Aus den Monozyten spezialisieren sich nach Einwanderung in das Gewebe die Gewebemakrophagen oder Histozyten (39).

### 1.2.2 Histologischer Aufbau und Subpopulationen

Monozyten sind Zellen mit einem nierenförmigen Kern, die dem mononukleär-phagozytärem System angehören. Sie besitzen zahlreiche Lysosomen, die mit ihrer umfangreichen Enzymausstattung einen wichtigen Beitrag zur Phagozytose liefern, sowie einen ausgeprägten Golgi-Apparat. Dieser Aufbau ist bei allen Monozyten grundsätzlich gleich (39).

Unterschiede ergeben sich hingegen bei der Ausstattung der Oberflächenproteine. Anhand dieser, insbesondere CD14 und CD16 (FcγRIII), lassen sich verschiedene Subpopulationen unterscheiden (41).

Der Großteil (90-95%) der Monozyten im Blut eines gesunden Menschen sind die  $CD14^{hi}CD16^{-}$ -Zellen, die aus diesem Grund als "klassische" Monozyten bezeichnet werden

(41, 42). Sie exprimieren als ein weiteres Unterscheidungsmerkmal größere Mengen an dem Oberflächenmolekül CCR2 (43).

Als "nicht-klassische" Monozyten bezeichnet man die  $CD14^+CD16^+$ -Subpopulation, die auch als Fc $\gamma$ RIII-positive Zellen bezeichnet werden (41, 44). Sie machen etwa 5-10% der Blutmonozyten aus und können sich in dendritische Zellen differenzieren (42, 45). Ihre Anzahl steigt bei einer Entzündung oder einer anderen systemischen Infektion an (41). Weitere für sie typische Oberflächenmarker sind die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und  $CX_3CR1$  (43, 46).

Es wird davon ausgegangen, dass diese unterschiedliche Ausstattung an Oberflächenproteinen nicht nur Einfluss auf die Funktion der Zelle, wie etwa die Migration in das Gewebe (43, 47), sondern auch auf die Empfindlichkeit gegenüber Infektionen hat (41, 48).

Zusätzlich zu dieser Unterteilung kann man Monozyten anhand ihrer Menge von CD64 (Fc $\gamma$ RI) (49) und ihrer Expression von CD56 (50, 51), einem Adhäsionsmolekül (52), einteilen und unterscheiden.

### 1.2.3 Aufgaben

Zu den Zellen des mononukleär-phagozytären Systems gehören die mobilen Blutmonozyten und die sich aus ihnen entwickelnden freien Exsudatmakrophagen und sessilen Gewebemakrophagen (53).

Ihre Aufgaben umfassen dabei im Wesentlichen drei Punkte. Zum einen vollziehen Makrophagen den Abbau von Zellresten und anderen Makromolekülen (53).

Zum anderen töten sie Krankheitserreger, wie etwa Bakterien, ab und bekämpfen Tumorzellen im körpereigenen Gewebe. In dieser Funktion erfüllen die Zellen des mononukleär-phagozytären Systems einen wichtigen Beitrag zur Abwehr des Körpers. Außerdem unterstützen diese Zellen die spezifische Immunabwehr, indem sie über die Antigenpräsentation und Ausschüttung von Zytokinen T-Helfer-Zellen stimulieren (53).

### 1.2.4 Funktion im Immunsystem

#### **1.2.4.1 Rezeptoren**

Mononukleäre Phagozyten besitzen eine Vielzahl an verschiedenen Rezeptoren, die ihnen ihre Funktion als Zellen des Immunsystems ermöglichen.

Eine Gruppe von Rezeptoren bindet die Fc-Abschnitte von IgG-Antikörpern. Dabei werden die einzelnen IgG-Subklassen von den unterschiedlichen Rezeptoren mit variablen Affinitäten gebunden. Diese Bindungsstellen werden als Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII (CD23) und Fc $\gamma$ RIII (CD16) bezeichnet (53).

Eine andere Gruppe bindet an die Bruchstücke von C3, einem Bestandteil des Komplementsystems. Der CR1-Rezeptor bindet das Bruchstück C3b und wird im CD-System als CD35 benannt. Der C3bi-Rezeptor besitzt eine Bindungsstelle für 3bi, einem Abbauprodukt von C3b. Er besteht aus zwei Untereinheiten: einer  $\alpha$ -Kette (CD11b) und einer  $\beta$ -Kette (CD18) (53).

Diese beiden Rezeptor-Gruppen vermitteln die durch die Opsonierung erleichterte Phagozytose (53).

Eine weitere Rezeptor-Klasse sind die Toll-like-Rezeptoren. Ihre Unterformen werden jeweils von unterschiedlichen Liganden aktiviert und ermöglichen so eine Differenzierung des jeweiligen Pathogens. Aus diesem Grund gehören sie zu den mustererkennenden Rezeptoren ("pattern recognition receptors", PRR). Eine Bindung eines Liganden bewirkt die Aktivierung der Zelle und die Ausschüttung von Molekülen der Immunabwehr sowie proinflammatorischen Zytokinen, die je nach Art des Liganden zur Stimulation unterschiedlicher Zelltypen führt. So werden etwa bei viralen Infektionen TH1-Zellen aktiviert, die wiederum zytotoxische T-Zellen aktivieren (53).

Ein intrazellulärer Rezeptortyp, der dementsprechend intrazelluläre Pathogene bindet, sind die NOD-Rezeptoren, die in Folge einer Bindung über die Stimulation des Inflammasoms die Freisetzung von aktivem IL-1 vermitteln (53).

Monozyten und Makrophagen exprimieren zudem MHC-II-Moleküle, über die sie die T-Helfer-Zellen stimulieren können. Ihre Expression wird durch IFN- $\gamma$  und möglicherweise andere Zytokine verstärkt. Aus diesem Grund besitzen mononukleäre Phagozyten auch entsprechende Rezeptoren für diese aktivierenden Zytokine (53).

#### **1.2.4.2 Aktivierung**

Bei Makrophagen gibt es drei unterschiedliche Aktivierungsstufen.

Residente Gewebsmakrophagen haben phagozytotische Eigenschaften und sezernieren dauerhaft Lysozym. Ihre weiteren Aufgaben, wie die Antigenpräsentation, werden vom umliegenden Gewebe beeinflusst und sind je nach Lokalisation unterschiedlich (53).

Entzündungsmakrophagen reagieren auf Entzündungsreize in einer bestimmten Lokalisation und rekrutieren sich aus neu eingewanderten Blutmonozyten und bereits vorhandenen residenten Gewebsmakrophagen. Sie sind in der Lage, auf Zytokine zu reagieren und sezernieren Sauerstoffradikale sowie neutrale Proteasen. Ebenso ist ihre Fähigkeit zur rezeptorvermittelten Endozytose erhöht (53).

Zu aktivierten Makrophagen entwickeln sich Entzündungsmakrophagen unter Einwirkung von Zytokinen, die von TH1-Zellen sezerniert werden. Sie können intrazelluläre Erreger sowie Tumorzellen abtöten und produzieren vermehrt  $H_2O_2$ . Des Weiteren werden aktivierte Makrophagen durch  $IFN-\gamma$  angeregt, vermehrt MHC-II-Moleküle zu exprimieren und nehmen dadurch ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen in gesteigertem Ausmaß wahr (53).

Makrophagen können auf unterschiedlichen Wegen aktiviert werden. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung über bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Diese binden an einen Rezeptorkomplex aus CD14 (LPS-Rezeptor), toll-like-receptor 4 und MD2. Infolgedessen werden über Signalkaskaden die Gene für verschiedenen Zytokine transkribiert. Diese Substanzen sorgen unter anderem für die Induktion von Fieber und Akute-Phase-Proteinen sowie die Einwanderung von Leukozyten (54).

Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung über die Bindung einer TH1-Zelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor und CD40L an den MHC-II-Rezeptor und CD40 auf dem Makrophagen. Als Folge dieser Bindung schüttet die TH1-Zelle  $IFN-\gamma$  aus, das den Makrophagen aktiviert, sowie weitere Zytokine, die die Entwicklung von Monozyten im Knochenmark stimulieren und diese an die Infektionsstelle locken. Die aktivierten Phagozyten schütten selbst wiederum Zytokine und weitere Substanzen aus. Diese sollen im folgenden Abschnitt im Überblick vorgestellt werden (54).

#### ***1.2.4.3 Sezernierte Substanzen und deren Funktion***

<b>Substanz</b>	<b>Funktion</b>
IL-1	Produktion im Inflammasom, Induktion von Fieber, Induktion von Fibrinogen, Kollagenase und Prostaglandinen (55), Induktion von Akute-Phase-Proteinen, Expression von Selektinen und Liganden für Integrine auf dem Gefäßendothel (54)
IL-6	Reifung von B-Zellen, T-Zellaktivierung (53), Induktion von Fieber und Akute-Phase-Proteine (54)

IL-8	Chemotaktische Wirkung auf Neutrophile, Basophile und T-Zellen (54)
IL-10	Immuninhibitorische Wirkung: Hemmung der Aktivierung von TH1-Zellen und Makrophagen (53)
IL-12	Aktivierung des zytolytischen Potentials von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (54), Stimulation der Differenzierung von TH-1-Zellen (55)
IL-18	Produktion im Inflammasom, Stimulation von TH1-Zellen (55)
IL-33	Produktion im Inflammasom, Stimulation von TH2-Zellen (55)
TNF- $\alpha$	Förderung der Expression von Selektinen und Liganden für Integrine auf Endothelzellen, Förderung der Gerinnung, Induktion von Fieber und Akute-Phase-Proteinen (54), Immunregulatorische Wirkung, Rolle im septischen Schock (55)
M-CSF	(Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor) Reifung von Monozyten im Knochenmark (55)
G-CSF	(Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor) Reifung von Granulozyten (55)
TGF- $\beta$	Hemmung der T-Zell-Proliferation und Makrophagenaktivierung, Unterstützung der Bildung von IgA (53)
IFN- $\alpha$	Antivirale und immunmodulatorische Aktivität (53)
Komplementfaktoren	Initiierung des Komplementsystems mit folgender Opsonierung (55)
Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite	“Respiratory burst”, bakterizid (55)
Lysosomale saure Hydrolasen	Abbau diverser Makromoleküle (55)
Neutrale Proteasen	Abbau von Bindegewebe (55)
Lysozym	Abbau von bakteriellen Zellwänden (55)

***Tabelle 2 - Von aktivierten Makrophagen/Monozyten ausgeschüttete Substanzen***

### 1.3 Überlegungen, Ansätze und Ziele

Die unterschiedlichen klinischen Verläufe werfen die Frage auf, inwieweit zelluläre Prozesse vorliegen, die als mögliche Angriffspunkte für therapeutische Interventionen genutzt werden könnten.

Versuche am Mausmodell mit dem bereits bekannten SARS-CoV, das 2002/2003 eine Epidemie auslöste, wiesen auf die Bedeutung einer verspäteten IFN-I-Antwort und inflammatorischen Monozyten-Makrophagen (IMM) für schwere Verläufe mit Gewebeschäden hin. Dabei stand vor allem eine verstärkte Einwanderung von Monozyten in die betroffenen Organe und eine darauffolgende gesteigerte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen im Vordergrund. Die versuchsweise Depletion von IMM zeigte eine Verbesserung der Symptomatik bei den Mäusen und wies somit diesem System eine bedeutsame Rolle zu (56).

Auch die in den vorherigen Abschnitten beschriebene Rolle der Monozyten als wichtige Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität verweist auf die Bedeutung dieser Zellen bei der Bekämpfung von Pathogenen und der Entwicklung einer adäquaten Immunreaktion.

Meine Dissertation greift diese Beobachtungen auf und befasst sich mit der Frage, inwieweit das Monozyten-Makrophagen-System und seine Subpopulationen schwere Krankheitsverläufe mit SARS-CoV-2 beeinflussen oder selbst von diesem Virus beeinflusst und aktiviert werden. Zudem sollen mögliche klinische Marker für Verlauf und Ausgang des Krankheitsgeschehens in Form von Kombinationen verschiedener Zell-(Sub)-Typen erkannt und beschrieben werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Geräte und Labormaterialien

#### 2.1.1 Geräte

<b>Laborgeräte</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Hybrid-Mikroskop ECHO Rebel	Echo Laboratories, Inc., San Diego, USA
Platten-Reader infinite 200Pro	TECAN, Männedorf, Schweiz
Mikrotiterplatten-Washer Wellwash-Versa	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Multipette M4	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe "pipetus"	Hirschmann, Eberstadt
Pipetten 10/20/100/200/1000µl "pipetman"	Gilson International, Limburg
Transferpette	Brand, Dresden
Manuelle Pipet-Lite XLS - Adjustable Spacer-Mehrkanalpipette	Rainin by Mettler Toledo, Columbus, USA
Sterilbank Jouan MSC12	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Vortex Genie 2 Schüttelgerät bzw. Reax 2000	Scientific Industries, New York, USA bzw. Heidolph, Schwabach
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge (Megafuge 16R)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Absaugpumpe Flüssigkeiten	Duran, Wertheim/Main

***Tabelle 3 - Laborgeräte***

#### 2.1.2 Glas- und Kunststoffwaren

<b>Glas- und Kunststoffwaren</b>	<b>Hersteller</b>
Butterfly (Kanülen)	Sarstedt, Nürnberg
Combitips 0,5ml	Eppendorf, Hamburg
Li-Heparin-Plasmaröhrchen 7,5ml	Sarstedt, Nürnberg

Glas-Pasteurpipetten	Brand, Dresden
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Nerbe plus, Winsen
Pipettenspitzen mit Filter (200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen für Pipet-Lite XLS	Rainin by Mettler Toledo, Columbus, USA
Polystyrolröhrchen für FACS (5ml)	Falcon Brand Products, Corning, USA
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml; 5ml)	Sarstedt, Nürnbergrecht
Serologische Pipetten (10ml, 25ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
EVE Cell counting slide	NanoEnTek, Seoul, Korea
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nürnbergrecht
Deep-Well-Platte, 96 Well, U-Boden	Nerbe plus, Winsen
Mikroplate, 96 Well, Flachboden	Sarstedt, Nürnbergrecht
Mikroplate, 96 Well, V-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen

***Tabelle 4 - Glas- und Kunststoffwaren***

### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Counting Beads für FACS	Life technologies, Carlsbad, USA
FACS Lysing Solution, FACS Clean, FACS Flow, FACS Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Trypanblaulösung	NanoEnTek, Seoul, Korea
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Life technologies, Carlsbad, USA
TMB Substrat A und B	BioLegend, San Diego, USA
Streptavidin-HRP-B	R&D Systems, Abington, UK
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe

***Tabelle 5 - Chemikalien, Reagenzien und Puffer***

#### 2.1.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Zellkulturmedien und -zusätze	Hersteller
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium	Gibco by Life Sciences, Carlsbad, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Standard-Medium	500ml RPMI 1640, 50ml FCS, 5ml Penicillin-Streptomycin-Stammlösung, 5ml L-Glutamin

**Tabelle 6 - Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze**

#### 2.1.5 Antikörper für die extrazellulären Durchflusszytometrien

##### 2.1.5.1 *Antikörper Vollblutproben*

Antikörper	Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD3	APC-Cy7	SK7	Biologend	1:100
CD4	V500	RPA-T4	BD Biosciences	1:100
CD8	PE-Cy7	SK1	Biologend	1:100
CD11b	PE-Cy7	M1/70	Biologend	1:100
CD14	V500	MΦP8	BD Biosciences	1:100
CD16	Pacific Blue	3G8	Biologend	1:100
CD19	Pacific Blue; APC-Cy 7	HIB19; SJ25C1	Biologend; Biologend	1:100
CD116	FITC	4H1	Biologend; Invitrogen	1:40
CD123	PE-Cy5	9F5	BD Biosciences	1:20
CD131	PE	1C1	Biologend	1:100
CD169	PE	7-239	Miltenyi Biotec	1:22
CD193	APC-Cy7	5E8	Biologend	1:40
CD304	APC	12C2	Biologend	1:40
HLA-DR II	APC	G-46-6	BD Biosciences	1:100

**Tabelle 7 - Antikörper für die extrazelluläre Färbung der Vollblutproben**

### 2.1.5.2 Antikörper PBMCs

Antikörper	Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung
HLA-DR II	FITC	C243	Biologend	1:100
CD123	PE-Cy5	1C1	eBioscience	1:20
CD131	PE	9F5	BD Biosciences	1:100
CD25	APC	BC96	Biologend	1:40
CD11b	PE-Cy7	M1/70	Biologend	1:100
CD8	APC-Cy7	RPA-T8	Invitrogen, Biologend	1:40
CD16	Pacific Blue	3G8	Biologend	1:100
CD4	V500	RPA-T4	BD Biosciences	1:40

**Tabelle 8 - Antikörper für die extrazelluläre Färbung der PBMCs**

### 2.1.6 Zytokine und Antikörper für die Stimulationen

Zytokin	Hersteller
Anti CD3, Klon: OKT3	eBioscience, San Diego, USA
Rekombinantes humanes IL-2	Preprotech, Cranbury, USA
Rekombinantes humanes IL-3	Biologend, San Diego, USA
Rekombinantes humanes IL-4	Preprotech, Cranbury, USA
Rekombinantes humanes IL-5	Preprotech, Cranbury, USA
Rekombinantes humanes IL-6	Preprotech, Cranbury, USA
Rekombinantes humanes IL-15	Preprotech, Cranbury, USA
LPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rekombinantes humanes GM-CSF	Preprotech, Cranbury, USA
Rekombinantes humanes IFN- $\gamma$	Preprotech, Cranbury, USA
Rekombinantes humanes IFN- $\alpha$	Preprotech, Cranbury, USA
Rekombinantes humanes TNF- $\alpha$	Preprotech, Cranbury, USA

**Tabelle 9 - Zytokine und Antikörper für die Stimulationen**

### 2.1.7 Material für die PBMC-ELISAs

<b>Zytokin/Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-IL-3-AK	AG Mack
Rekombinantes IL-3	BioLegend, San Diego, USA
AK-13-HRP, Clone 13	AG Mack
Human GM-CSF DuoSet ELISA	R&D Systems, Abington, UK
Human IFN- $\gamma$ DuoSet ELISA	R&D Systems, Abington, UK

***Tabelle 10 - Material für die PBMC-ELISAs***

### 2.1.8 Analyse- und Bearbeitungsprogramme

<b>Programm/App</b>	<b>Firma</b>
FACS Diva Software	BD Biosciences, Heidelberg
ECHO Pro	Echo Laboratories, Inc., San Diego, USA
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
Tecan i-control	TECAN, Männedorf, Schweiz
Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA

***Tabelle 11 - Analyse- und Bearbeitungsprogramme***

## **2.2 Methoden**

Zunächst soll beschrieben werden, wie die Patienten und die Kontrollpersonen rekrutiert wurden. Dabei wird auf Ein- und Ausschlusskriterien eingegangen sowie auf das Erfassen der patientenbezogenen klinischen Daten.

### 2.2.1 Patientenkollektiv

#### ***2.2.1.1 Patientenrekrutierung und demographische Daten***

Die Blutproben für diese Dissertation stammten von Patienten, die am Universitätsklinikum Regensburg im Zeitraum vom 16.4.2020 bis 18.6.2020 einen stationären Aufenthalt und eine bestätigte SARS-CoV-2-Infektion hatten. Sie oder ihre gesetzlichen Betreuer wurden über die Teilnahme an der COVUR-THR-Studie, von der die Blutproben

bezogen wurden, aufgeklärt und gaben ihre Zustimmung. Infolgedessen wurden ihnen während ihres Verbleibs im Klinikum regelmäßig Lithium-Heparin-Blutproben abgenommen, die zur Auswertung herangezogen wurden. Im angegebenen Zeitraum ergaben sich so 188 Proben von 55 verschiedenen Patienten.

### **2.2.1.2 Erhobene Patientendaten**

Von den Erkrankten wurden anhand der klinikintern erfassten Labordaten und Arztbriefe pseudonymisierte Datensammlungen angelegt, um die Proben mit Laborwerten und der gesundheitlichen Entwicklung verknüpfen zu können. Die Patienten konnten anhand ihrer Beatmungspflichtigkeit in die Kategorien “nicht beatmet” beziehungsweise “beatmet” unterteilt werden. Für die Zuordnung der einzelnen Patientenproben galt dabei die am jeweiligen Probenstag geltende Situation. Die beatmeten Patienten wurden je nach Outcome weiter in die Untergruppen “beatmet - überlebend” und “beatmet - verstorben” aufgeteilt.

### **2.2.1.3 Kontrollgruppe**

Ergänzend zum Patientenkollektiv wurden insgesamt 42 Personen für die Kontrollgruppe rekrutiert, um die erlangten Werte der Patienten in Relation mit der gesunden Normalbevölkerung setzen zu können. Ihnen wurde jeweils eine Lithium-Heparin-Blutprobe abgenommen. Ausschlusskriterien für die Kontrollen waren Nikotinabusus sowie eine chronisch entzündliche Erkrankung, wie etwa Lupus erythematoses, Morbus Crohn oder Hashimoto-Thyreoiditis.

Außer ihrem Alter, ihrem Geschlecht und einer Aussage über ihren Nikotinkonsum sowie einer möglichen chronisch entzündlichen Erkrankung wurden keine weiteren Daten bei ihnen erhoben.

## **2.2.2 Extrazelluläre FACS-Färbung und Durchflusszytometrie der Vollblutproben**

Um die Leukozyten des abgenommenen Blutes beziehungsweise der PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) zu detektieren, zu sortieren und zu erfassen, wurden die jeweiligen Proben durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurden die Zellen vor- und aufbereitet, gegebenenfalls stimuliert und mit Antikörper-Mastermixen gefärbt. Diese der Durchflusszytometrie vorausgehenden Schritte werden in den nächsten Abschnitten genauer erläutert.

Die Antikörper, die für die Markierung der Zellen genutzt wurden, sind mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt und binden an zelleigenen Oberflächenstrukturen. Bei der FACS (fluorescence-activated cell sorting)-Analyse werden die gebundenen Farbstoffe durch die Laser angeregt, sodass aus dem entstehenden Streulichtmuster auf die Oberflächenproteine der Zelle geschlossen werden kann. Dabei ermöglicht eine gezielte Auswahl spezifischer Marker die Identifizierung des Zelltyps. Bei der Analyse durch das FACS-Gerät werden auch Größe und Granularität der Zellen erfasst, wobei ersteres durch den Forward Scatter (FSC) und letzteres durch den Sideward Scatter (SSC) dargestellt wird. Diese beiden Eigenschaften sind ebenfalls ein Mittel, um die Zellart weiter einzugrenzen (57).

Für die Färbung der Vollblutproben wurden drei Antikörper-Mastermixe angesetzt, die jeweils unterschiedliche Zelltypen gezielt nachweisen sollten.

Färbung 1 sollte hierbei vor allem plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs), basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Monozyten detektieren. Dabei wurden folgende Antikörper eingesetzt (Farbstoff sowie Verdünnungen stehen in Klammern):

- CD116 (FITC; 1:40)
- CD123 (PE-Cy5; 1:20)
- CD131 (PE; 1:100)
- CD304 (APC; 1:40)
- CD11b (PE-Cy7; 1:100)
- CD193 (APC-Cy7; 1:40)
- CD16 (Pacific Blue; 1:100)
- CD14 (V500; 1:100)

Färbung 2 diente hauptsächlich dem Nachweis von Lymphozyten sowie in geringerem Umfang dem von Monozyten. Hierzu wurden folgende Antikörper verwendet (Farbstoff sowie Verdünnungen stehen in Klammern):

- CD116 (FITC; 1:40)
- CD123 (PE-Cy5; 1:20)
- CD131 (PE; 1:100)
- HLA-DRII (APC; 1:100)
- CD8 (PE-Cy7; 1:100)
- CD3 (APC-Cy7; 1:100)

- CD19 (Pacific Blue; 1:100)
- CD4 (V500; 1:100)

Bei Färbung 3 lag der Schwerpunkt auf der Detektion von Monozyten. Der Nachweis von CD169 (Sialoadhesion) galt dabei als Aktivierungsfaktor (52). Für diesen Mastermix wurden folgende Antikörper benötigt (Farbstoff sowie Verdünnungen stehen in Klammern):

- CD116 (FITC; 1:40)
- CD169 (PE; 1:22)
- CD3 (APC-Cy7; 1:100)
- CD16 (Pacific Blue; 1:100)
- CD14 (V500; 1:100)

Aufgrund von Lieferengpässen ergab es sich, dass alle drei Färbungen zeitweise Abwandlungen unterworfen waren.

Bei allen Mixen, unabhängig davon, ob Original- oder Ersatzfärbung, wurde als Ausgleichsmedium 0,9%ige-Natriumchlorid-Lösung verwendet.

Bei jeder Patientenprobe wurde jeder der drei Mastermixe angewandt, sodass sich pro Probe drei Ansätze ergaben. Dabei wurden je 100µl Blut vorgelegt und dann 20µl der entsprechenden Antikörpermischung hinzugegeben. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Proben 20 Minuten bei 4 Grad Celsius im Dunkeln. Anschließend wurden sie mit 0,9%iger-Natriumchlorid-Lösung gewaschen, sieben Minuten bei 1600rpm und 4 Grad Celsius abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Mischung des verbliebenen Restes erfolgte die Zugabe von 1ml FACS-Lysing-Solution und Inkubation der Proben 10 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Bei diesem Schritt wurden die Erythrozyten in den Blutproben zerstört, damit die Detektion der Leukozyten später erleichtert wurde. Anschließend wurden die Proben erneut gewaschen, sieben Minuten bei 1600rpm und 4 Grad Celsius zentrifugiert, bis zum Ring des FACS-Röhrchens abgesaugt und 20µl Counting Beads dazu pipettiert. Vor der Aufnahme am FACS-Gerät wurden die Proben nochmal gut gemischt. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug "High" und die vorgegebene Zeitspanne 90 Sekunden.

### 2.2.3 Vollblutstimulation mit anschließender Färbung

Für die Stimulation der Vollblutproben wurden in FACS-Röhrchen jeweils 100µl der Lithium-Heparin-Blutprobe mit 200µl RPMI-Medium versetzt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 300µl ergab. Dem RPMI-Medium waren verschiedene Stimulantien beigelegt. Es ergaben sich somit verschiedene Ansätze, die in der nachfolgenden Aufzählung dargestellt werden. Die Konzentration der Stimulantien betrug jeweils 20 ng/ml.

- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium (ohne zusätzliches Stimulanz)
- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium mit IL-2
- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium mit IL-3
- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium mit IL-5
- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium mit IL-6
- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium mit IL-15
- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium mit GM-CSF
- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium mit IFN- $\gamma$
- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium mit IFN- $\alpha$
- 100µl Li-Heparin-Blut + 200µl Medium mit TNF- $\alpha$

Diese Ansätze wurden für 23,5 Stunden bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden je Probe 170µl Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Der Rest der Proben wurde mit 20µl des in der nachfolgenden Tabelle dargestellten Antikörpermastermixes gefärbt und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

<b>Antikörper</b>	<b>Farbe</b>	<b>Verdünnung</b>
CD116	FITC	1:40
CD123	PECy5	1:30
CD131	PE	1:100
CD304	APC	1:40
CD19	APC-Cy7	1:100
CD11b	PE-Cy7	1:100
CD16	Pacific Blue	1:100

CD14	V500	1:100
		Ausgleichsmedium 0,9%ige NaCl-Lösung

***Tabelle 12 - Antikörpermastermix für die Vollblutstimulation***

Die inkubierten Proben wurden mit 4ml 0,9%iger-NaCl-Lösung gewaschen und anschließend 7 Minuten bei 1600rpm bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde jeweils 1ml FACS-Lysing-Solution hinzugegeben, gut gemischt und diese Ansätze 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben erneut mit 3ml 0,9%iger-NaCl-Lösung gewaschen und wieder 7 Minuten bei 1600rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen der Proben bis zum Ring des FACS-Röhrchens erfolgte die Zugabe von jeweils 20µl Counting-Beads pro Probe. Vor der Durchflusszytometrie wurden die Ansätze gut gemixt und anschließend bei der Einstellung “High” 90 Sekunden lang aufgenommen.

#### 2.2.4 PBMCs (peripheral blood mononuclear cells)

##### ***2.2.4.1 Stimulation, extrazelluläre Färbung und Durchflusszytometrie***

Vor der Analyse der von der Abteilung für Mikrobiologie am Universitätsklinikum Regensburg aufbereiteten PBMCs der COVID-19-Patienten im FACS-Gerät, erfolgte die Stimulation dieser Zellen.

Dazu wurden die gefrorenen PBMCs im Wasserbad aufgetaut und in 14ml warmes RPMI-Medium mit 10% FCS überführt und anschließend 7 Minuten bei 1800rpm und 4 Grad Celsius zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 200µl Standardmedium (RPMI-Medium mit 10% FCS, Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin) resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden dann 10µl in einem Eppendorf-Cup mit 10µl Trypanblau gemischt und davon wiederum 10µl auf einen Objektträger zur Zellzählung gegeben. Hierfür wurde ein Mikroskop mit einem gekoppeltem iPad eingesetzt (ECHO Rebel), das die automatische Zellzählung ermöglicht. Mit der so ermittelten Zellzahl ließ sich eine entsprechende Verdünnung errechnen, sodass sich letztlich in 100µl jeweils 500.000 Zellen befanden.

Die Ausschüttung verschiedener Zytokine durch die PBMCs sollte unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht werden. Daher wurden 100µl der verdünnten Proben mit 200µl der unterschiedlichen Stimulanzen versetzt (Gesamtvolumen 300µl). Aufgrund der teilweise sehr

geringen Zellzahlen waren nicht immer alle Stimulationen möglich. Bei ausreichender Zellzahl konnten Dubletten angelegt werden. In diesen Fällen wurde zunächst immer eine Medium-Dublette angelegt. Bei ausreichend großer Probenmenge konnten weitere Zellen doppelt stimuliert werden.

Röhrchen	Stimulans	Verdünnung Stimulans
1	aCD3	5µg/ml
2	Medium	/
3	aCD3 + IL-2	5µg/ml (aCD3); 20ng/ml (IL-2)
4	IL-3	20ng/ml
5	LPS + IL-4	1µg/ml (LPS); 20ng/ml (IL-4)

***Tabelle 13 - Stimations-Schema der PBMCs***

Nach Mischung der Substanzen mit den Proben, wurden diese abgedeckt und für 23,5 Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert.

Nach Ablauf dieser Frist wurden 200µl Überstand abgenommen und bei -20 Grad Celsius eingefroren, um später für Zytokin-ELISAS zur Verfügung zu stehen. Die Durchführung dieser erfolgte zusammen mit meiner Laborpartnerin Christine Müller und wird im nächsten Unterpunkt genauer erläutert. Der verbliebene Rest der Proben wurde mit 18,15µl Mastermix für 20 Minuten bei 4 Grad Celsius im Dunkeln inkubiert.

Färbung PBMCs (Farbstoff und Verdünnung stehen in Klammern):

- HLA-DRII (FITC; 1:100)
- CD123 (PE-Cy5; 1:20)
- CD131 (PE; 1:100)
- CD25 (APC; 1:40)
- CD11b (PE-Cy7; 1:100)
- CD8 (APC-Cy7; 1:40)
- CD16 (Pacific Blue; 1:100)
- CD4 (V500; 1:40)

Anschließend wurden die Proben mit 0,9%iger-Natriumchlorid-Lösung gewaschen, bei 4 Grad Celsius und 1600 rpm 7 Minuten zentrifugiert und bis auf einen kleinen Rest abgesaugt.

Abschließend wurden 20µl Counting Beads hinzugegeben, die Proben gemixt und mit dem FACS-Gerät auf Stufe "High" 60 Sekunden lang aufgenommen.

#### **2.2.4.2 Zytokin-ELISA**

Um die von den stimulierten PBMCs ausgeschütteten Zytokine IL-3, GM-CSF und IFN- $\gamma$  nachweisen zu können, wurden die abgenommenen Überstände im Rahmen von ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay) analysiert. Die verwendete Variante war das Sandwich-ELISA.

Diese Form wird vor allem zur Detektion von löslichen Antigenen verwendet, indem diese zwischen dem Capture-Antikörper und dem Detection-Antikörper gebunden werden. Dafür wird eine Oberfläche zunächst mit dem Capture-Antikörper beschichtet, das Antigen zugegeben und schließlich der Detection-Antikörper hinzugefügt. Dieser kann entweder selber mit einem Enzym gekoppelt sein und dadurch eine nachweisbare Reaktion mit einem Substrat auslösen oder er muss selber durch einen weiteren Antikörper mit dieser Eigenschaft nachgewiesen werden (58).

Für den angewandten ELISA wurde für jedes Zytokin eine 96-Well-Flachbodenplatte über Nacht bei Raumtemperatur gecoatet. Dazu wurden in die Wells jeweils 60µl der Capture-Antikörper-Lösung (Capture-Antikörper für IFN- $\gamma$  und GM-CSF sowie der IL-3-Antikörper) gegeben. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte in PBS und die genauen Zusammensetzungen lassen sich der Tabelle am Ende dieses Abschnitts entnehmen.

Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit PBS/0,05% Tween gewaschen und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 100µl/well 1% BSA in PBS geblockt. Anschließend wurden sie erneut dreimal mit PBS/0,05% Tween gewaschen.

Parallel dazu wurden die eingefrorenen Überstände bei Raumtemperatur aufgetaut, in 96-Well-V-Boden-Platten überführt und mit 1% BSA in PBS vorverdünnt. Dabei erfolgte die Verdünnung der Proben für den Nachweis für IL-3 1:2, der Proben für den Nachweis von GM-CSF 1:5 und der Proben für den Nachweis von IFN- $\gamma$  1:30. Zudem wurden pro Platte zwei Standardreihen mit einer über jeweils sieben Wells laufenden Verdünnungsreihe des zu suchenden Zytokins in bekannter Konzentration angelegt. Das achte Well einer jeden Verdünnungsreihe enthielt keine Zytokine und ergab somit den Leerwert.

Nach dem Blocken und Waschen der gecoateten Rundbodenplatten wurden sowohl die vorverdünnten Proben als auch die Standardreihen mit 60µl/well auf diese Platten überführt und inkubierten dort 2 Stunden lang bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf dieser Frist wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und anschließend der Detection-Antikörper für GM-CSF, IFN-γ beziehungsweise AK-13-HRP für IL-3 mit 60µl/well hinzugegeben. Die Dauer der Inkubation dieser Ansätze betrug eine Stunde beziehungsweise anderthalb Stunden bei dem Nachweis von IL-3 im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Im nächsten Schritt wurden die Platten wieder dreimal gewaschen. Bei den Platten, die dem Nachweis von IL-3 dienen, wurde gleich die TMB-Substrate-A&B-Lösung mit 100µl/well hinzugegeben. Dieser Ansatz inkubierte für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Bei den Platten für den Nachweis von IFN-γ und GM-CSF wurde nach dem Waschen zunächst die Streptavidin-HRP-B-Lösung mit 60µl/well in die Wells pipettiert. Die Ansätze inkubierten 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur und wurden anschließend dreimal gewaschen. Danach wurden ebenfalls 100µl/well von der TMB-Substrate-A&B-Lösung hinzugegeben und der Ansatz inkubierte erneut 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Reaktionen auf allen Platten mit 12,5%iger Schwefelsäure-Lösung (Menge: 50µl/well) abgestoppt.

Die Rundbodenplatten wurden in den Platten-Reader infinite 200Pro bei einer Wellenlänge von 450nm eingelesen. Die Referenzwellenlänge betrug 540nm. Die Auswertung der Werte erfolgte über den Vergleich der einzelnen Farbintensitäten mit der Standardkurve in Excel, die durch die Standardreihe ermittelt wurde.

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Coatinglösung IL-3	5µg/ml anti-IL-3 in PBS
Coatinglösung GM-CSF/ IFN-γ	2µg/ml anti-CM-CSF/anti-IFN-γ in PBS
Standardreihe IL-3 (Verdünnungsreihe)	Startkonzentration 500 pg/ml; Verdünnung in 1% BSA in PBS
Standardreihe GM-CSF/ IFN-γ (Verdünnungsreihe)	Startkonzentration 1000 pg/ml; Verdünnung in 1% BSA in PBS
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	Substrat A und Substrat B im Verhältnis 1:1

***Tabelle 14 - Verdünnungen der Ansätze für die PBMC-ELISAs***

## 2.2.5 Statistische Auswertung

### 2.2.5.1 *Allgemeine statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm Prism 8 der Firma GraphPad. Für die statistischen Unterschiede zwischen mehr als zwei Patientenkohorten oder Zellstimulationen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt und entsprechend in den Abbildungen dargestellt. Unter einer einfaktorischen Varianzanalyse versteht man ein statistisches Modell, das mehrere Mittelwerte bezüglich einer Zielgröße miteinander vergleicht (59). Die Bonferroni-Korrektur soll die Häufigkeit von  $\alpha$ -Fehlern (oder auch Fehler 1. Art genannt) verringern. Dieser Fehler bezeichnet in der Statistik die fälschliche Annahme der Alternativhypothese, obwohl in Wirklichkeit die Nullhypothese korrekt ist, und kumuliert bei Mehrfachtestungen. Die Bonferroni-Korrektur lässt nur die Werte als signifikant gelten, bei denen der p-Wert unterhalb des Quotienten aus Annahmewahrscheinlichkeit und Anzahl der Tests liegt (60).

Für die Vergleiche von zwei Gruppen wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben durchgeführt und in den Abbildungen dargestellt. Dieser ermittelt, ob der Unterschied in den Werten der zwei Gruppen zufällig oder signifikant ist (61).

Grundsätzlich gilt, dass alle p-Werte, die kleiner als 0,05 waren, als signifikant gewertet wurden. Sie werden auf den Abbildungen mit einem Sternchen markiert. P-Werte kleiner als 0,01 erhalten zwei Sternchen und p-Werte kleiner 0,001 werden mit drei Sternchen gekennzeichnet.

### 2.2.5.2 *Werte des prädiktiven Scores*

Für den prädiktiven Score, der schwere Verläufe mit Todesfolge bei beatmeten COVID-19-Patienten vorhersagen soll, wurden drei Parameter allein oder in Kombination berücksichtigt. Für die kombinierten Scores galt, dass alle darin erfassten Parameter zutreffen mussten.

Der erste in die Scores aufgenommene Wert ist die Basophilen-Anzahl im Vollblut. Werte unter 25/ $\mu$ l wurden als "Low Baso count", also als niedrige Basophilen-Anzahl

gewertet.

Die beiden anderen Kenngrößen waren die Hochregulation von CD123 auf CD14+-Monozyten und die Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten. Diese wurden in Form des Verhältnisses aus der Expression der Oberflächenmarker unter anti-CD3-Stimulation und der Expression ohne Stimulation festgelegt. Eine Hochregulation unter 130% galt als schwache Hochregulation und wird mit "Weak upregulation" in der Abbildung bezeichnet. Die Stimulation der Blutproben wurde durch meine Laborpartnerin Christine Müller durchgeführt und im Rahmen ihrer Dissertation "Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19-Patienten" genauer dargestellt.

Für diese drei Parameter konnte auf eine Probenmenge von 77 Proben, die von 21 unterschiedlichen, beatmeten COVID-19-Patienten stammten, zurückgegriffen werden. Von diesen Patienten konnten 17 (69 Proben) von der Intensivstation entlassen werden und vier Patienten verstarben auf der Intensivstation (8 Proben).

Für die statistische Auswertung wurden verschiedene Größen bestimmt. Die ersten beiden Größen sind die richtig und die falsch Positiven. Unter einem falsch positiven Wert versteht man einen Wert, für den der gewählte Test oder Score zutrifft, die Testentscheidung also positiv ist, obwohl er in Wirklichkeit nicht der Aussage des Tests oder Scores entspricht (62). Im Fall der hier angewandten prädiktiven Scores wäre das ein Patient, der die Intensivstation lebend verlassen hat, aber laut seinen Laborwerten und dem daraus resultierenden Score einen fatalen Verlauf gehabt haben müsste.

Des Weiteren wurde die Test-Sensitivität (Sens.) bestimmt. Diese beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient mit fatalem Verlauf einen positiven Score (Aussage "fataler Verlauf") hat (62). Sie berechnet sich folgendermaßen:

$$Sens. = \frac{\text{Zahl der Patienten mit Score-Aussage "fataler Verlauf"}}{\text{Zahl der tatsächlich Verstorbenen}} \quad (62)$$

Sie gibt die Empfindlichkeit des Scores an. Bei einer hohen Sensitivität werden schwere Verläufe mit Todesfolge kaum übersehen (62).

Die Spezifität (Spe.) des Scores umschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass die Patienten, die die Intensivstation lebend verlassen, auch die entsprechende Aussage vom Score erhalten (kein fataler Verlauf) (62). Diese Größe wird nach folgender Formel für diesen Score berechnet:

$$Spe. = \frac{\text{Zahl der Patienten mit Score-Aussage "kein fataler Verlauf"}}{\text{Zahl der Patienten, die die Intensivstation lebend verlassen haben}} \quad (62)$$

Sie gibt die Treffsicherheit des Scores an. Ist die Spezifität hoch, wird kaum einem Patienten, der die Intensivstation lebend verlässt, die Prognose eines fatalen Verlaufs zugeordnet (62).

Für die Berechnung des negativen prädiktiven Werts (NPV) und des positiven prädiktiven Werts (PPV) wurde eine Todes-Prävalenz bei den beatmeten Patienten von 19% (4 tote Patienten auf 21 beatmete Patienten insgesamt) verwendet.

Der negative prädiktive Wert gibt bei den Scores die Wahrscheinlichkeit an, die Intensivstation lebend zu verlassen, wenn der Score "kein fataler Verlauf" aussagt, also negativ ist (62). Er lässt sich durch folgende Formel bestimmen:

$$NPV = \frac{\text{Zahl der Patienten mit negativem Score-Ergebnis, die überlebt haben}}{\text{Zahl aller Patienten mit negativem Score-Ergebnis}} \quad (62)$$

Beim negativen prädiktiven Wert sinkt der Wert, wenn die Prävalenz steigt. Der Zusammenhang von negativem prädiktiven Wert, Sensitivität, Spezifität und Prävalenz wird mit Hilfe des Satzes von Bayes dargestellt (62):

$$NPV = \frac{\text{Spezifität} \times (1 - \text{Prävalenz})}{\text{Spezifität} \times (1 - \text{Prävalenz}) + (1 - \text{Sensitivität}) \times \text{Prävalenz}} \quad (62)$$

Der positive prädiktive Wert beschreibt hingegen die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient mit einem positiven Score-Wert ("fataler Verlauf") tatsächlich verstirbt. Dieser Wert spiegelt also die diagnostische Kraft des Scores wider (62) und wird durch folgende Formel ausgedrückt:

$$PPV = \frac{\text{Zahl der Verstorbenen mit positivem Score-Ergebnis}}{\text{Zahl aller Patienten mit positivem Score-Ergebnis}} \quad (62)$$

Beim positiven prädiktiven Wert gilt, dass der Wert steigt, je höher die Prävalenz ist. Auch hier lässt sich der Zusammenhang zwischen positivem prädiktiven Wert, Sensitivität, Spezifität und Prävalenz mit Hilfe des Satzes von Bayes ausdrücken (62):

$$PPV = \frac{\text{Sensitivität} \times \text{Prävalenz}}{\text{Sensitivität} \times \text{Prävalenz} + (1 - \text{Spezifität}) \times (1 - \text{Prävalenz})} \quad (62)$$

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientendaten

##### 3.1.1 Baseline-Charakteristika

	Healthy	Covid-19 all	Covid-19 non- ventilated	Covid-19 ventilated all	Covid-19 ventilated survived	Covid-19 ventilated dead
Number of patients (n)	42	55	25	30	23	7
<b>Demographics:</b>						
Mean age (Years, min-max)	37.8 *** (19-78)	56.8 (19-78)	55.1 (19-78)	58.3 (31-73)	57.7 (31-73)	60.1 (51-68)
Sex (% male)	15 (36%) **	37 (67%)	13 (52%)	24 (80%) *	17 (74%)	7 (100%)
<b>Virus persistence:</b>						
mean, days		20	10	28 ***	29	23
<b>Comorbidities n (%):</b>						
Smoking		5 (9%)	4 (16%)	1 (3%)	1 (4%)	0
Hypertension		28 (51%)	11 (44%)	17 (57%)	12 (52%)	5 (71%)
Diabetes mellitus		15 (27%)	6 (24%)	9 (30%)	6 (26%)	3 (43%)
Cardiovascular disease		5 (9%)	4 (16%)	1 (3%)	1 (4%)	0
Lung disease		12 (22%)	6 (24%)	6 (20%)	3 (13%)	3 (43%)
Immunosuppression		7 (13%)	5 (20%)	2 (7%)	1 (4%)	1 (14%)
<b>Intercurrent events n (%):</b>						
Bact. superinfection		31 (56%)	5 (20%)	26 (87%) ***	20 (87%)	6 (86%)
ECMO		10 (18%)	0	10 (33%) **	8 (35%)	2 (29%)
Thromboembolic complications		14 (25%)	1 (4%)	13 (43%) ***	11 (48%)	2 (29%)
<b>Treatment n (%):</b>						
Hydroxychloroquine		2 (4%)	0	2 (7%)	2 (9%)	0
Lopinavir/Ritonavir		1 (2%)	0	1 (3%)	1 (4%)	0
Convalescent plasma		23 (42%)	5 (20%)	18 (60%) **	12 (52%)	6 (86%)
Glucocorticoids		17 (31%)	5 (20%)	12 (40%)	9 (39%)	3 (43%)
Antibiotics		38 (69%)	9 (36%)	29 (97%) ***	23 (100%)	6 (86%)

**Tabelle 15 - Demographische und klinische Informationen zu den Studienpatienten und den Kontrollpersonen**

COVID-19-Patienten wurden in die Untergruppen "nicht-beatmet" ("non-ventilated") und "beatmet" ("ventilated") eingeteilt. Nicht-beatmete Patienten wurden auf der Normalstation aufgenommen und erhielten bei Bedarf Sauerstoff über eine Nasenbrille. Beatmete Patienten wurden auf der Intensivstation behandelt und dort mechanisch beatmet. Sie wurden weiter in "Survived" ("Überlebend") und "Dead" ("Verstorben") eingeteilt. Als überlebend galten jene Patienten, die von der Intensivstation entlassen werden konnten und als verstorben galten die Patienten, die dort verstarben. Die Viruspersistenz wurde als Zeitspanne zwischen den ersten klinischen Symptomen und dem letzten positiven PCR-Test

bestimmt. Bei der Analyse der statistischen Unterschiede zwischen den Beatmeten ("Ventilated") und den Nicht-Beatmeten ("Non-ventilated") sowie der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Die insgesamt 55 COVID-19-Patienten wurden, wie bereits in Abschnitt 2.2.1.2 *Erhobene Patientendaten* beschrieben, in verschiedene Beatmungskategorien unterteilt. In der Gruppe "nicht beatmet" befanden sich 25 und in der Gruppe "beatmet" 30 Patienten. Die letztere Gruppe wurde weiter differenziert in "beatmet - überlebend" mit 23 Patienten und "beatmet - verstorben" mit 7 Personen.

Von den Patienten waren 38 männlich (Anteil: 68%) und 18 weiblich (Anteil: 32%). Insgesamt setzt sich der höhere Anteil an männlichen Personen in den einzelnen Unterkategorien fort. Besonders signifikant war dies bei den Beatmeten mit einer absoluten Anzahl von 24 Männern. Dies entspricht 80% der Gesamtgruppe "beatmet". Bei den überlebenden Beatmeten waren 17 von 23 Personen männlich, also 74% und bei verstorbenen Beatmeten betrug der Anteil an Männern 100%. In der Kategorie "nicht-beatmet" ist das Geschlechterverhältnis ausgeglichener. Hier sind 13 von 25 Patienten männlich, was einem Anteil von 52% entspricht.

Das Durchschnittsalter betrug 56,8 Jahre und die Altersspanne reichte von 19 bis 78 Jahren. Es wurde bei der Erfassung des Alters immer das Alter aufgenommen, das am Tag der Probenabnahme gültig war. Bei einigen Patienten mit einem längeren stationären Aufenthalt wurden bei unterschiedlichen Proben unterschiedliche Lebensalter erfasst, da sie innerhalb der Zeitspanne zwischen den Blutabnahmen Geburtstag hatten. Das Durchschnittsalter lag in allen Subgruppen zwischen 55,1 Jahren und 60,1 Jahren, wobei die Gruppe "beatmet - verstorben" mit 60,1 Jahren den höchsten Altersdurchschnitt hatte. Diese Beobachtung ist nicht signifikant.

Bei allen Erkrankten wurde neben den bereits erwähnten demographischen Parametern Alter und Geschlecht auch die Variable Viruspersistenz erhoben. Diese definiert sich aus der Zeitspanne zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und dem letzten positiven PCR-Nachweis von SARS-CoV-2. Im Durchschnitt betrug sie 20 Tage und unterschied sich stark zwischen den Nicht-Beatmeten und den Beatmeten. Die beatmeten Patienten hatten mit 28 Tagen eine signifikant längere Viruslast als die Nicht-Beatmeten mit 10 Tagen.

Zusätzlich wurden Komorbiditäten erfasst. Diese umfassten Rauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, kardiovaskuläre und pulmonale Erkrankungen sowie Immunsuppression. Die Verteilung war in den untersuchten Untergruppen nahezu gleich und zeigte somit keinen signifikanten Unterschied zwischen beatmeten und nicht-beatmeten Patienten.

Außerdem wurden neuauftretene klinische Ereignisse während des Klinikaufenthalts erfasst. Als solche galten: bakterielle Superinfektionen, die Notwendigkeit einer ECMO-Anlage sowie thromboembolische Komplikationen. Diese kritischen Situationen waren bei beatmeten Patienten signifikant häufiger als bei nicht-beatmeten Erkrankten. So entwickelten 87% der Beatmeten eine bakterielle Superinfektion. Bei den Nicht-Beatmeten lag dieser Anteil nur bei 20%.

Auch verschiedene Therapieansätze während des stationären Aufenthaltes wurden in die Datensammlung miteinbezogen. Dazu gehörten Behandlungsversuche mit Hydroxychloroquin, Lopinavir/Ritonavir, COVID-19-Rekonvaleszentenplasma, Glukokortikoiden und/oder mit Antibiotika. Hier zeigte sich, dass vor allem die Antibiotika- und Rekonvaleszentenplasmagabe beim beatmeten Kollektiv deutlich höher war. Auf Antibiotika waren 97% der Patienten mit Beatmung angewiesen und Rekonvaleszentenplasma erhielten 60% aus dieser Gruppe. Bei den Erkrankten ohne Beatmung betragen diese Anteile nur 36% (Antibiotika) beziehungsweise 20% (Rekonvaleszentenplasma).

Bei den Kontrollpersonen betrug das Durchschnittsalter 37,8 Jahre und die Altersspanne umfasste Personen von 19 bis 78 Jahren. Es gab 15 männliche (Anteil: 36%) und 27 weibliche (Anteil: 64%) Kontrollen.

### 3.1.2 Laborwerte

	Healthy	Covid-19 all	Covid-19 non- ventilated	Covid-19 ventilated all	Covid-19 ventilated survived	Covid-19 ventilated dead
<b>Laboratory values: (demographics)</b>						
Number of samples (n)	42	188	68	120	101	19
Number of patients (n)	42	55	39 #	30	23	7
<b>Laboratory values: (mean)</b>						
Procalcitonin (ng/ml)		1.6	1.1	1.7	1.1	4.5 **
CRP (mg/l)		69.6	35.6	86.1 ***	76.1	141.2 **
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		340.2	273.9	370.6***	361.1	423.3
ALAT (U/L)		75.0	62.9	80.7	74.0	116,6 *
Bilirubin (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
Leucocytes (/nl)		13.0	11.4	13.8	11.5	25.8 ***

# 14 patients were sampled on ventilation and also after weaning.

#### ***Tabelle 16 - Klinische Laborparameter von COVID-19-Patienten und den Kontrollpersonen***

*COVID-19-Patienten wurden in die Kategorien beatmet ("ventilated") und nicht-beatmet ("non-ventilated") aufgeteilt. Die beatmeten Patienten wurden weiter in überlebende ("survived") und verstorbene ("dead") Patienten aufgeteilt. Bei den Meisten waren mehrere aufeinanderfolgende Blutproben verfügbar. Bei 14 Patienten erfolgte eine Blutabnahme während der Beatmung und auch nach der Entwöhnung von der Beatmung. Bei der Analyse der statistischen Unterschiede zwischen den Beatmeten ("Ventilated") und den Nicht-Beatmeten ("Non-ventilated") sowie der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )*

Insgesamt wurden 188 Blutproben von 55 Patienten untersucht. Bei der Unterteilung der Patienten in die Untergruppen "beatmet" und "nicht-beatmet" wurden 14 Personen beiden Gruppen zugeordnet, da sie nicht durchgehend beatmet und ihnen Blutproben sowohl während der Beatmung als auch nach dem Weaning abgenommen wurden.

Zu jeder Blutprobe wurden folgende Laborparameter registriert:

- PCT (ng/ml)
- CRP (mg/l)
- IL-6 (pg/ml)

- Ferritin (ng/ml)
- LDH (U/L)
- ALAT (GPT) (U/L)
- Bilirubin (mg/dl)
- CK (U/L)
- D-Dimer (mg/l)
- Leukozyten (/nl)

Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Gruppe der Beatmeten und der Nicht-Beatmeten besonders bei den Durchschnittswerten von vier Parametern: dem C-reaktiven Protein (CRP), der Laktatdehydrogenase (LDH), dem Bilirubin und dem D-Dimer. Insgesamt ergaben sich bei der beatmeten Gruppe Laborbefunde, bei denen die Entzündungszeichen (CRP, IL-6), die Marker für Leber- und Muskeldysfunktion (LDH, Bilirubin, CK) und die intravaskuläre Gerinnung (D-Dimer) erhöht waren.

Bei den beatmeten Patienten, die verstorben sind, waren im Vergleich zu der überlebenden Subgruppe die Entzündungswerte Procalcitonin, CRP, IL-6 und Ferritin besonders erhöht. Zudem wiesen sie die deutlich erhöhten Leberwerte ALAT (= Alaninaminotransferase) und Bilirubin auf. Ihre Leukozytenzahl war signifikant erhöht.

### 3.2 Viruspersistenz und T-Zell-Hyporeaktivität

	Virus persistence in days (mean +/- SEM)	Persistence of T cell hyporeactivity in days (mean +/- SEM), measured by CD123 upregulation on monocytes	Persistence of T cell hyporeactivity in days (mean +/- SEM), measured by CD11b upregulation on neutrophils
Patients with virus persistence < 15 days	5.8 (± 1.1)	5.3 (± 2.7)	10.6 (± 3.3)
Patients with virus persistence ≥ 15 days	31.0 *** (± 3.1)	24.0 ** (± 4.8)	23.9 * (± 4.6)

**Tabelle 17 - Korrelation zwischen der Persistenz von SARS-CoV-2-Replikation und der Persistenz der T-Zell-Hyporeaktivität**

Als Viruspersistenz galt der Zeitraum zwischen dem Auftreten der ersten klinischen Symptome und dem letzten positiven RT-PCR-Test. Die Patienten wurden je nach Viruspersistenz in zwei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe mit einer Dauer <15 Tage (18 Patienten) und eine Gruppe mit einer Dauer ≥15 Tage (25 Patienten). Die T-Zell-Reaktivität wurde über die Hochregulation von CD123 auf Monozyten oder von CD11b auf neutrophilen Granulozyten als Ausdruck des Verhältnisses

*zwischen der Oberflächenmarkerexpression nach 24-stündiger Stimulation der Vollblutproben mit Anti-CD3 und der Oberflächenmarkerexpression ohne Stimulation dargestellt. Bei beiden Oberflächenmarkern wurde eine Hochregulation <300% als T-Zell-Hyporeaktivität gewertet. Die Persistenz der T-Zell-Hyporeaktivität wurde als Zeitraum zwischen den ersten klinischen Symptomen und dem letzten Tag der T-Zell-Hyporeaktivität festgelegt. Bei der Analyse der statistischen Unterschiede wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )*

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen einer T-Zell-Hyporeaktivität und der Viruspersistenz im Patienten identifizieren zu können, wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe umfasste die Personen, deren Viruspersistenz unter 15 Tagen lag, die andere Gruppe diejenigen mit einem Zeitraum von 15 Tagen oder mehr. Die T-Zell-Hyporeaktivität wurde einerseits über die Hochregulation von CD123 auf Monozyten und andererseits über die Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten festgelegt. Die Beschreibung und Interpretation der Hochregulierung sowie der T-Zell-Hyporeaktivität wird in detaillierterem Umfang in der Dissertation “Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19-Patienten” meiner Laborpartnerin Christine Müller zu finden sein.

Die genauen Grenzwerte der Hochregulation von CD123 beziehungsweise CD11b zur T-Zell-Hyporeaktivität sowie der Umfang der beiden Gruppen können der Tabellenbeschriftung entnommen werden.

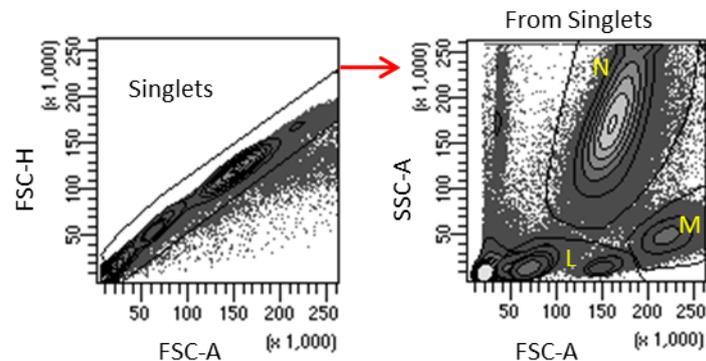
Die Angabe der Werte in der Tabelle 17 erfolgt als Mittelwert (Mean) zusammen mit dem Standardfehler (SEM).

In der Gruppe der Patienten mit einer Viruspersistenz von unter 15 Tagen lag diese im Durchschnitt bei nahezu sechs Tagen. Die Dauer der T-Zell-Hyporeaktivität wies je nach Kategorisierungsform unterschiedliche Mittelwerte auf. Bei der Einteilung nach der Hochregulation von CD123 auf Monozyten betrug die Persistenz der T-Zell-Hyporeaktivität im Mittel 5,3 Tage. Bei der Kategorisierung nach der Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten betrug dieser Wert mit durchschnittlich 10,6 Tagen etwa das Doppelte.

In der Gruppe der Patienten, bei denen das Virus 15 Tage oder länger nachweisbar war, lag die Viruspersistenz bei durchschnittlich 31,0 Tagen und damit signifikant höher als in der anderen Gruppe. Die durchschnittliche Dauer der T-Zell-Hyporeaktivität bei den Patienten mit der längeren Viruspersistenz war ebenfalls signifikant höher. Sie lag sowohl bei der Einteilung nach der Hochregulation von CD123 auf Monozyten als auch bei der Einteilung nach der Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten bei durchschnittlich etwa 24 Tagen.

### 3.3 Immunphänotypisierung von Vollblut

#### 3.3.1 Allgemeine Beschreibung des Gatings



**Abbildung 1 - Gating-Strategie zur Detektion wichtiger Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie**

Um die einzelnen Zelltypen im unstimulierten Frischblut unterscheiden zu können, wurden diese mit Hilfe verschiedener Färbungen und der Durchflusszytometrie genauer kategorisiert.

Dazu wurden von allen vom Durchflusszytometer registrierten Ereignissen die Einzelzellen (Singlets) gezielt herausgenommen und genauer betrachtet. Hierfür wurden sie anhand des Forward und Sideward Scatters nach Größe und Granularität aufgeteilt, sodass sich drei größere Gruppen ergaben:

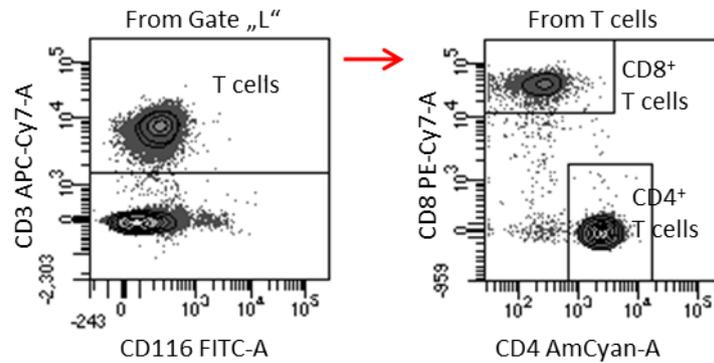
- Gruppe "L" mit überwiegend lymphozytären Zellen
- Gruppe "M" mit überwiegend monozytären Zellen
- Gruppe "N" mit überwiegend granulozytären Zellen

Diese Gruppen konnten anhand des Färbeverhaltens der einzelnen Zellpopulationen weiter unterteilt werden. Dies wird nachfolgend bei jeder dieser Populationen genauer beschrieben.

### 3.3.2 T-Zellen

#### 3.3.2.1 CD4+-Zellen

##### 3.3.2.1.1 Gating-Strategie für die CD4+-Zellen



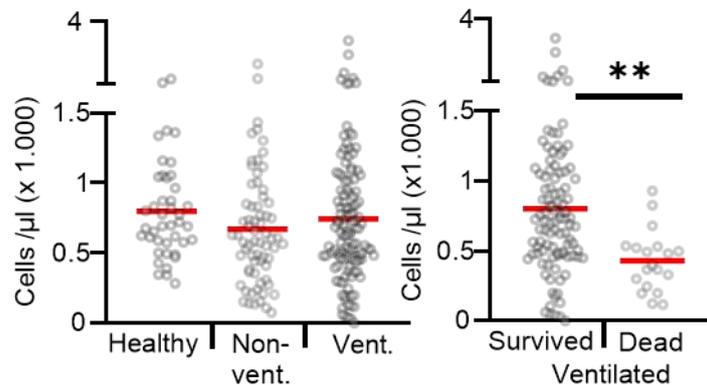
**Abbildung 2 - Gating-Strategie zur Detektion der T-Zell-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie**

Zum Nachweis der CD4+-Zellen in den Frischblutproben wurden die Zellen der Gruppe L (siehe auch Abschnitt 3.3.1 *Allgemeine Beschreibung des Gateings*) anhand der Antikörperfärbungen weiter unterschieden.

Dazu wurden zunächst die T-Zellen isoliert. Dies geschah über die Menge an CD3, welches mit APC-Cy-7 angefärbt wurde. CD3 fungiert als ein Teil des T-Zellrezeptors (63).

Diese Zellpopulation wurde weiter aufgeteilt. Die CD4+-Zellen zeichneten sich durch eine erhöhte Expression von CD4 (angefärbt mit V500) bei gleichzeitig geringer Darstellung von CD8 (nachgewiesen mit PE-Cy-7) aus.

### 3.3.2.1.2 Anzahl der CD4+-Zellen in den unterschiedlichen Patientengruppen



**Abbildung 3 - CD4+-T-Zell-Zahlen in Vollblutproben**

Es wurden die Zellzahlen von CD4+-T-Zellen in nicht-stimulierten Vollblutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 39 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 68 Proben) und 30 beatmeten ("Vent."; 120 Proben) COVID-19-Patienten analysiert. Die beatmeten Patienten wurden zudem in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 101 Proben) und in "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten; 19 Proben) unterteilt. Jede Probe wird durch einen Punkt in der Graphik repräsentiert und der Mittelwert ist rot markiert. Für die Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Bei der Betrachtung der CD4+-Zell-Anzahl in den COVID-19-Patientengruppen "Nicht-beatmet" (Non-vent.) und "Beatmet" (Vent.) sowie der Kontrollpersonen-Gruppe (Healthy) zeigte sich, dass sich dieser Wert nicht wesentlich zwischen den Gruppen unterschied.

Bei der Aufteilung der beatmeten Gruppe (Ventilated) nach dem jeweiligen Outcome der Patienten in "Überlebend" (Survived) und "Verstorben" (Dead) wurde allerdings ein signifikanter Abfall der CD4+-Zell-Zahlen bei Verstorbenen deutlich.

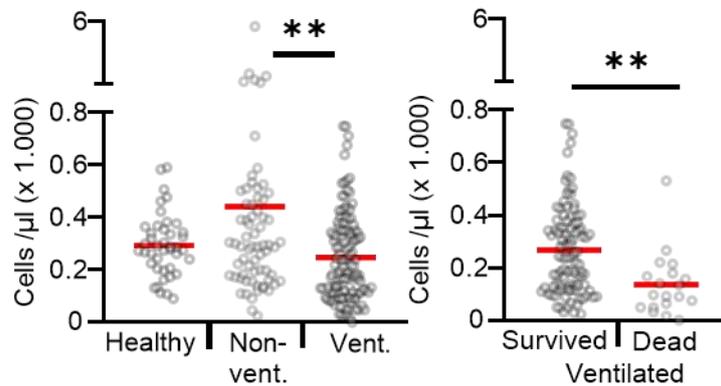
### 3.3.2.2 CD8+-Zellen

#### 3.3.2.2.1 Gatingstrategie für die CD8+-Zellen

Der Nachweis der CD8+-Zellen in den Frischblutproben erfolgte zunächst analog zu dem der CD4+-Zellen (siehe auch Abbildung 2).

Das bedeutet, dass auch für diese Zellpopulation in der Gruppe L anhand der CD3-Expression die T-Zellen identifiziert wurden. Diese wurden mit Hilfe der Ausprägungen von CD4 und CD8 weiter unterschieden.

### 3.3.2.2.2 Anzahl der CD8+-Zellen in den unterschiedlichen Patientengruppen



**Abbildung 4 - CD8+-T-Zell-Zahlen in Vollblutproben**

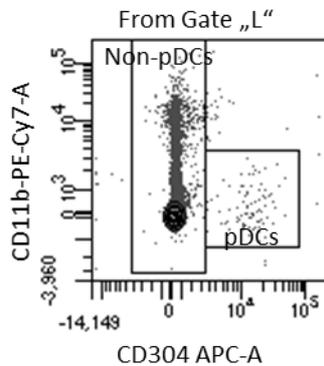
Es wurden die Zellzahlen von CD8+-T-Zellen in nicht-stimulierten Vollblutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 39 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 68 Proben) und 30 beatmeten ("Vent."; 120 Proben) COVID-19-Patienten analysiert. Die beatmeten Patienten wurden zudem in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 101 Proben) und in "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten; 19 Proben) unterteilt. Jede Probe wird durch einen Punkt in der Graphik repräsentiert und der Mittelwert ist rot markiert. Für die Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Bei den CD8+-Zellen unterschieden sich die Zellzahlen zwischen der Kontrollgruppe (Healthy) und dem beatmeten Patientenkollektiv (Vent.) kaum. Die nicht-beatmeten Erkrankten wiesen hingegen eine signifikante Erhöhung der CD8+-Zell-Anzahl im Vergleich zu der beatmeten Kategorie auf.

Auch bei den CD8+-Zellen zeigte sich ähnlich wie bei den CD4+-Zellen ein deutlicher Abfall der Zellmenge bei den Verstorbenen (Dead) der beatmeten Gruppe (Ventilated) im Vergleich zu den Überlebenden (Survived) der selben Gruppe.

### 3.3.3 Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs)

#### 3.3.3.1 *Gatingstrategie für die pDCs*

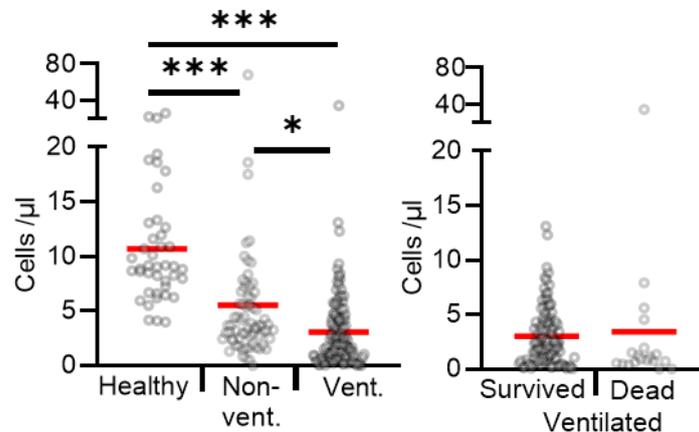


**Abbildung 5 - Gating-Strategie zur Detektion von plasmazytoiden dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie**

Für das Gating der plasmazytoiden dendritischen Zellen wurde die Gruppe L (siehe 3.3.1 *Allgemeine Beschreibung des Gatings*) genauer analysiert. Dazu wurden die Zellen aus dieser Gruppe nach ihrer Expression von CD11b (gefärbt mit PE-Cy-7) und von CD304 (gefärbt mit APC) aufgetragen.

Die Zellen, die viel CD304 aber nur wenig CD11b exprimierten, wurden als plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) klassifiziert.

### 3.3.3.2 Anzahl der pDCs in den unterschiedlichen Patientengruppen



**Abbildung 6 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

Es erfolgte die Analyse von Blutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 39 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 68 Proben) und von 30 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten ("Vent."; 120 Proben). Die beatmeten Patienten wurden weiter in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 101 Proben) und "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten, 19 Proben) unterteilt. Darstellung der absoluten Anzahl an plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC).

Jede Probe wird auf der Abbildung durch einen Punkt repräsentiert und der Durchschnitt ist rot markiert. Für die Analyse der gesunden Kontrollproben ("Healthy"), der nicht-beatmeten ("Non-vent.") und beatmeten ("Vent.") COVID-19-Patientenproben wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

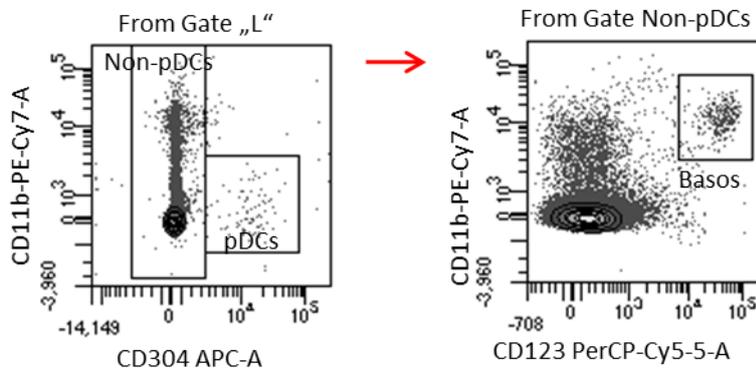
Die Anzahl der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) wurde in den unterschiedlichen Kollektiven der Studie betrachtet. Diese waren zum einen die Kontrollgruppe (Healthy) und zum anderen die Erkrankten, die sich in die nicht-beatmeten Patienten (Non-vent.) und die beatmeten Patienten (Vent.) aufteilten.

Die Kontrollgruppe hatte die höchste Anzahl an pDCs. Bei der Gruppe der Nicht-Beatmeten ließen sich deutlich weniger Zellen dieses Typs nachweisen und die Beatmeten hatten nochmal signifikant niedrigere Werte als die Nicht-Beatmeten. So ließ sich ein relevanter Abfall der Zellanzahl der plasmazytoiden dendritischen Zellen von dem Wert der Kontrollgruppe über den der Nicht-Beatmeten bis hin zu dem niedrigsten Wert der Beatmeten verfolgen.

Unterteilt man allerdings die Gruppe mit der kleinsten Anzahl an pDCs, also die beatmeten Patienten (Ventilated), nach ihrem Outcome, so zeigt sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Überlebenden (Survived) und den Verstorbenen (Dead).

### 3.3.4 Basophile Granulozyten

#### 3.3.4.1 Gatingstrategie für die basophilen Granulozyten

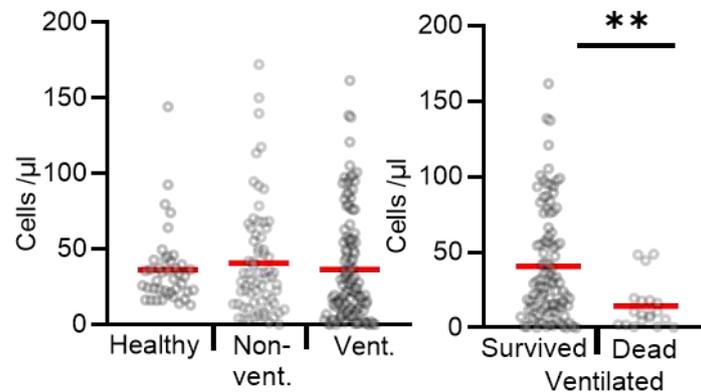


**Abbildung 7 - Gating-Strategie zur Detektion von basophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie**

Auch für das Gating der basophilen Granulozyten wurden die Zellen der Gruppe L (siehe auch 3.3.1 *Allgemeine Beschreibung des Gatings*) genauer analysiert. Diese wurden wie bei der Analyse der pDCs anhand ihrer Expression von CD304 und von CD11b aufgetragen. Alle Zellen, die kein CD304 exprimierten, wurden unabhängig von ihrer CD11b-Ausprägung der Gruppierung “Nicht-pDCs” (Non-pDCs) zugeordnet.

Die “Nicht-pDCs” wurden weiter anhand ihrer Ausprägung der Oberflächenmarker CD123 und CD11b sortiert. Als basophile Granulozyten (Basos) wurde dabei die Zellgruppe identifiziert, die hohe Werte von CD123 und CD11b aufweisen konnte.

### 3.3.4.2 Anzahl der basophilen Granulozyten in den unterschiedlichen Patientengruppen



**Abbildung 8 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

Es erfolgte die Analyse von Blutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 39 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 68 Proben) und von 30 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten ("Vent."; 120 Proben). Die beatmeten Patienten wurden weiter in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 101 Proben) und "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten, 19 Proben) unterteilt. Darstellung der absoluten Anzahl an basophilen Granulozyten.

Jede Probe wird auf der Abbildung durch einen Punkt repräsentiert und der Durchschnitt ist rot markiert. Für die Analyse der gesunden Kontrollproben ("Healthy"), der nicht-beatmeten ("Non-vent.") und beatmeten ("Vent.") COVID-19-Patientenproben wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

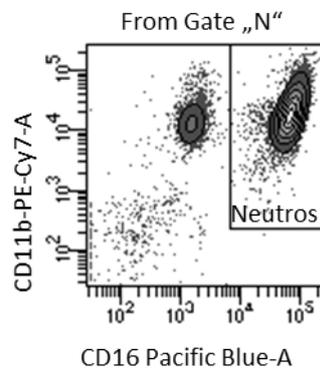
Wie bereits bei den plasmazytoiden dendritischen Zellen dargestellt, wurden auch bei den basophilen Granulozyten die Zellzahlen in den unterschiedlichen Personengruppen verglichen.

Dabei zeigte sich, dass sich die Anzahl zwischen den Kontrollpersonen (Healthy), den nicht-beatmeten Patienten (Non-vent.) und den beatmeten Erkrankten (Vent.) nicht wesentlich unterschied.

Beim Vergleich der nach Outcome aufgeteilten Gruppe der Beatmeten (Ventilated) ergab sich allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenden (Survived) und den Verstorbenen (Dead), bei dem die Anzahl der basophilen Granulozyten bei den Verstorbenen deutlich reduziert war.

### 3.3.5 Neutrophile Granulozyten

#### 3.3.5.1 Gatingstrategie für die neutrophilen Granulozyten

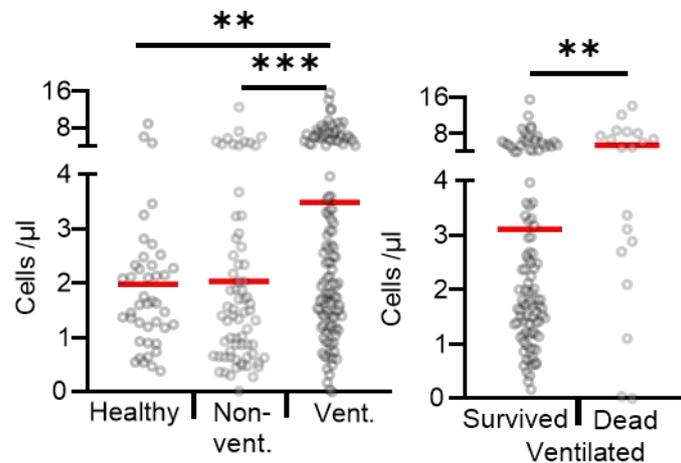


**Abbildung 9 - Gating-Strategie zur Detektion neutrophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie**

Das Gating der neutrophilen Granulozyten erfolgte von der Gruppe N ausgehend (siehe auch 3.3.1 *Allgemeine Beschreibung des Gatings*).

Die Zellen dieser Gruppe wurden anhand ihrer Expression von CD16 (angefärbt mit Pacific Blue) und von CD11b (angefärbt mit PE-Cy-7) unterteilt. Als neutrophile Granulozyten wurden die Zellen klassifiziert, die sowohl viel CD16 als auch CD11b exprimierten.

### 3.3.5.2 Anzahl der neutrophilen Granulozyten in den unterschiedlichen Patientengruppen



**Abbildung 10 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

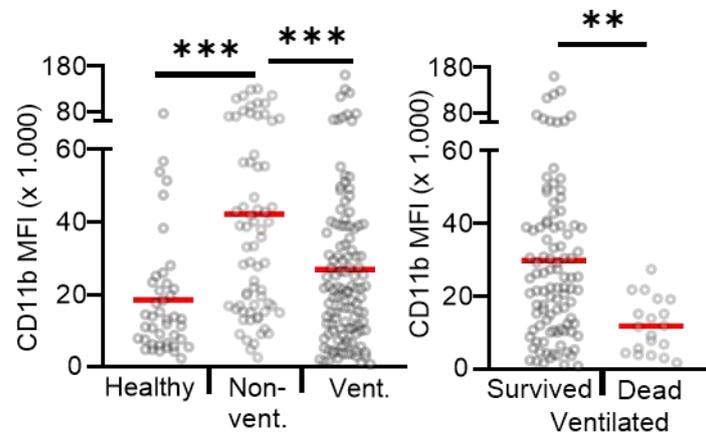
Es erfolgte die Analyse von Blutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 39 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 68 Proben) und von 30 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten ("Vent."; 120 Proben). Die beatmeten Patienten wurden weiter in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 101 Proben) und "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten, 19 Proben) unterteilt. Darstellung der absoluten Anzahl von neutrophilen Granulozyten.

Jede Probe wird auf der Abbildung durch einen Punkt repräsentiert und der Durchschnitt ist rot markiert. Für die Analyse der gesunden Kontrollproben ("Healthy"), der nicht-beatmeten ("Non-vent.") und beatmeten ("Vent.") COVID-19-Patientenproben wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Beim Vergleich der Kontrollgruppe (Healthy), der nicht-beatmeten (Non-vent.) und der beatmeten (Vent.) Patientengruppe zeigte sich, dass Personen der beatmeten Gruppe signifikant höhere Anzahlen an neutrophilen Granulozyten als die Erkrankten der nicht-beatmeten Gruppe besaßen. Die letzteren hatten vergleichbare Werte wie die Angehörigen der Kontrollgruppe, so dass sich zusammenfassen lassen kann, dass sich bei den Beatmeten deutlich mehr neutrophile Granulozyten in den Blutproben nachweisen ließen als in den anderen beiden Gruppierungen.

Innerhalb der beatmeten Patienten (Ventilated) ließ sich bezüglich der Anzahl der neutrophilen Granulozyten eine weitere Abstufung erkennen. Bei der Unterteilung in Überlebende (Survived) und Verstorbene (Dead) dieser Patientengruppe wiesen die Verstorbenen wesentlich höhere Zellzahlen als die Überlebenden auf.

### 3.3.5.3 Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD11b auf neutrophilen Granulozyten



**Abbildung 11 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

Es erfolgte die Analyse von Blutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 39 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 68 Proben) und von 30 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten ("Vent."; 120 Proben). Die beatmeten Patienten wurden weiter in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 101 Proben) und "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten, 19 Proben) unterteilt. Darstellung der Expression von CD11b auf neutrophilen Granulozyten, angegeben als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI).

Jede Probe wird auf der Abbildung durch einen Punkt repräsentiert und der Durchschnitt ist rot markiert. Für die Analyse der gesunden Kontrollproben ("Healthy"), der nicht-beatmeten ("Non-vent.") und beatmeten ("Vent.") COVID-19-Patientenproben wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

CD11b ist ein Oberflächenmarker der neutrophilen Granulozyten und spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen Aufgaben dieses Zelltyps wie der Adhäsion, der Chemotaxis oder der Auswanderung aus Gefäßen (52).

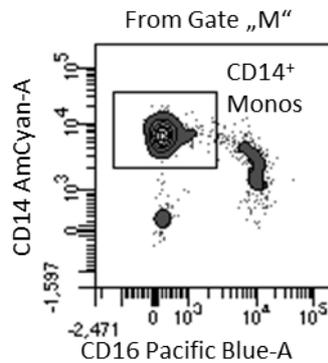
Die Expression von CD11b auf den neutrophilen Granulozyten der Blutproben der Studie wurde ähnlich wie schon bei der Anzahl dieses Zelltyps zwischen den verschiedenen Personenkollektiven verglichen. Dabei zeigte sich, dass die nicht-beatmeten Patienten (Non-vent.) deutlich mehr CD11b auf ihren neutrophilen Granulozyten darstellten als Personen aus dem Kontrollkollektiv (Healthy). Gleichzeitig war die Ausprägung von CD11b bei Nicht-Beatmeten signifikant höher als bei beatmeten Erkrankten (Vent.).

In der Gruppe der Beatmeten (Ventilated) war eine weitere Abstufung nachweisbar. Personen aus dieser Kategorie, die überlebten (Survived), zeigten eine wesentlich höhere CD11b-Expression auf ihren neutrophilen Granulozyten als solche, die verstarben (Dead).

### 3.3.6 Monozyten

#### 3.3.6.1 *CD14+-Monozyten*

##### 3.3.6.1.1 *Gatingstrategie für die CD14+-Monozyten*

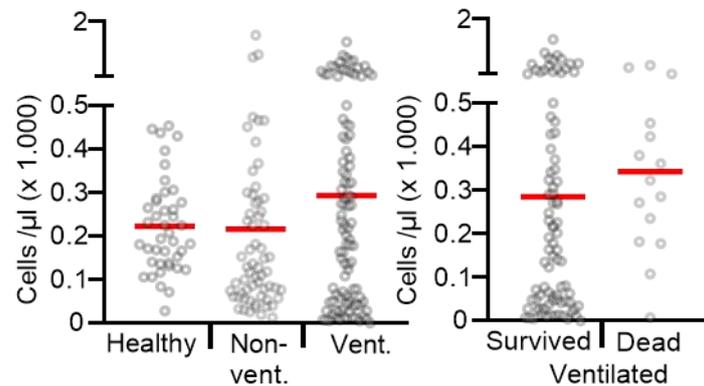


**Abbildung 12 - Gating-Strategie zur Detektion von CD14+-Monozyten mittels Durchflusszytometrie**

Das Gating für die CD14+-Monozyten erfolgte in der Zellgruppe M (siehe auch 3.3.1 *Allgemeine Beschreibung des Gatings*).

Als CD14+-Monozyten wurden die Zellen identifiziert, die bei einer Auftragung nach der Expression von CD14 (angefärbt mit V500) und CD16 (angefärbt mit Pacific Blue) viel CD14 und zugleich wenig CD16 exprimierten.

### 3.3.6.1.2 Anzahl der CD14+-Monozyten in den unterschiedlichen Patientengruppen



**Abbildung 13 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

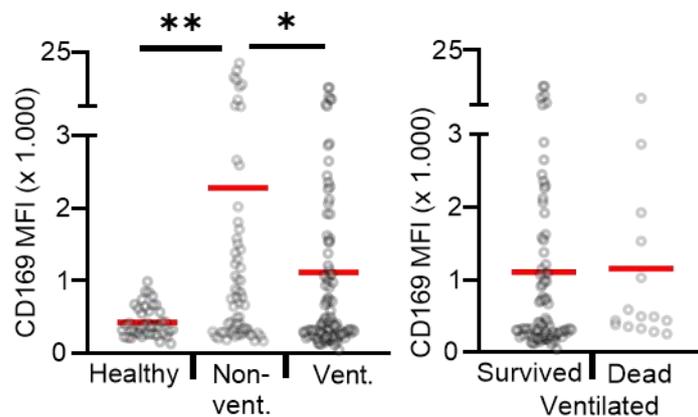
Es erfolgte die Analyse von Blutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 38 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 62 Proben) und von 30 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten ("Vent."; 102 Proben). Die beatmeten Patienten wurden weiter in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 87 Proben) und "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten, 15 Proben) unterteilt. Die Anzahl der Proben ist niedriger als bei den vorherigen Analysen, da die Antikörper für diese Nachweise zeitweise nicht verfügbar waren. Darstellung der absoluten Anzahl von CD14++CD16- - Monozyten.

Jede Probe wird auf der Abbildung durch einen Punkt repräsentiert und der Durchschnitt ist rot markiert. Für die Analyse der gesunden Kontrollproben ("Healthy"), der nicht-beatmeten ("Non-vent.") und beatmeten ("Vent.") COVID-19-Patientenproben wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Der Vergleich der Zellanzahlen von CD14+-Monozyten in den Blutproben der Kontrollgruppe (Healthy), der nicht-beatmeten (Non-vent.) und der beatmeten (Vent.) Patientengruppe zeigte keinen großen Unterschied zwischen diesen einzelnen Gruppierungen. Lediglich die Beatmeten hatten einen leicht höheren Wert, der allerdings nicht signifikant war.

Auch der Vergleich der Zellmenge von CD14+-Monozyten zwischen den nach Outcome aufgeteilten beatmeten Patienten (Ventilated) zeigte keine wesentlichen Differenzen, auch wenn der Wert der Verstorbenen (Dead) etwas höher lag als der der überlebenden Beatmeten (Survived).

### 3.3.6.1.3 Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD169 auf CD14+-Monozyten



**Abbildung 14 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

Es erfolgte die Analyse von Blutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 38 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 62 Proben) und von 30 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten ("Vent."; 102 Proben). Die beatmeten Patienten wurden weiter in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 87 Proben) und "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten, 15 Proben) unterteilt. Die Anzahl der Proben ist niedriger als bei den vorherigen Analysen, da die Antikörper für diese Nachweise zeitweise nicht verfügbar waren. Darstellung der Expression von CD169 auf der Oberfläche von CD14++CD16-- Monozyten, angegeben als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI).

Jede Probe wird auf der Abbildung durch einen Punkt repräsentiert und der Durchschnitt ist rot markiert. Für die Analyse der gesunden Kontrollproben ("Healthy"), der nicht-beatmeten ("Non-vent.") und beatmeten ("Vent.") COVID-19-Patientenproben wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

CD169, auch als Siglec-1 bezeichnet, gilt als einer der am stärksten durch das Typ-I-Interferon-System regulierten Oberflächenmarker (64). Er wird auf Monozyten und Makrophagen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Zellen untereinander oder mit dem Gewebe sowie möglicherweise für die Phagozytose (52).

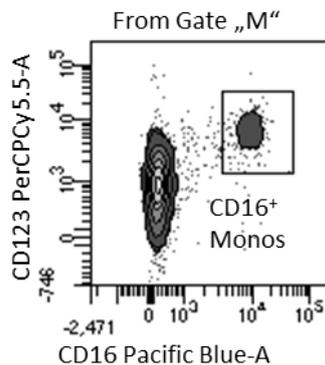
Beim Vergleich der Expression dieses Oberflächenmarkers zwischen der Kontrollgruppe (Healthy) und den Patientengruppen, die in "beatmet" (Vent.) und "nicht-beatmet" (Non-vent.) aufgeteilt wurden, ergaben sich mehrere signifikante Unterschiede. Bei der Gegenüberstellung der Werte der gesunden Kontrollpersonen und der nicht-beatmeten Patienten zeigte sich eine deutlich vermehrte Ausbildung von CD169 auf den Monozyten der Nicht-Beatmeten. Auch beim Vergleich der Menge von Siglec-1 auf den Monozyten zwischen der beatmeten und der nicht-beatmeten Gruppe ergab sich eine ähnlich ausgeprägte

Differenz, bei der die Beatmeten wesentlich weniger dieses Oberflächenmarkers exprimierten. Insgesamt wies die nicht-beatmete Gruppe die höchsten Werte an CD169 auf.

Innerhalb der beatmeten Gruppe (Ventilated) wurden die Mengen an Siglec-1 der Überlebenden (Survived) mit denen der Verstorbenen (Dead) verglichen. Dabei ergab sich kein Unterschied in der Expression.

### 3.3.6.2 *CD16+-Monozyten*

#### 3.3.6.2.1 *Gatingstrategie für die CD16+-Monozyten*

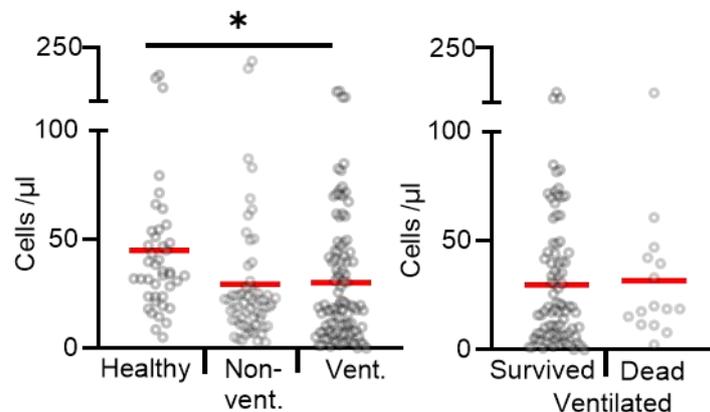


**Abbildung 15 - Gating-Strategie zur Detektion von CD16+-Monozyten mittels Durchflusszytometrie**

Auch das Gating der CD16+-Monozyten erfolgte von der Gruppe M ausgehend (siehe auch 3.3.1 *Allgemeine Beschreibung des Gatings*).

Hierfür wurden die Zellen nach ihrer Expression von CD123 (angefärbt mit PE-Cy-5) und von CD16 (nachgewiesen mit Pacific Blue) aufgetragen. Als CD16+-Monozyten wurden solche Zellen gewertet, die sowohl viel CD123 als auch CD16 auf ihrer Oberfläche exprimierten.

### 3.3.6.2.2 Anzahl der CD16+-Monozyten in den unterschiedlichen Patientengruppen



#### **Abbildung 16 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

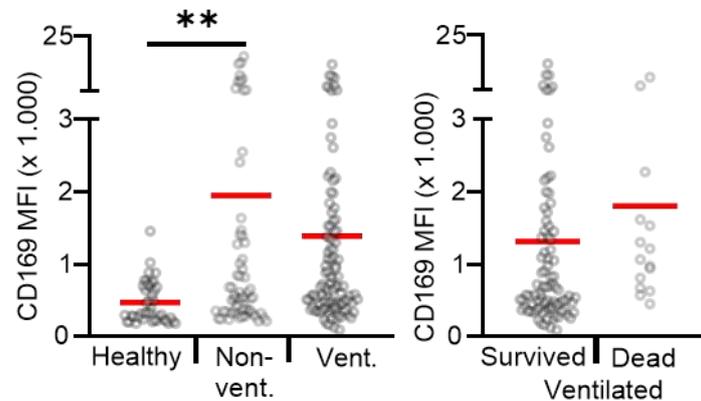
Es erfolgte die Analyse von Blutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 38 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 62 Proben) und von 30 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten ("Vent."; 102 Proben). Die beatmeten Patienten wurden weiter in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 87 Proben) und "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten, 15 Proben) unterteilt. Die Anzahl der Proben ist niedriger als bei den vorherigen Analysen, da die Antikörper für diese Nachweise zeitweise nicht verfügbar waren. Darstellung der absoluten Anzahl von CD16+-Monozyten.

Jede Probe wird auf der Abbildung durch einen Punkt repräsentiert und der Durchschnitt ist rot markiert. Für die Analyse der gesunden Kontrollproben ("Healthy"), der nicht-beatmeten ("Non-vent.") und beatmeten ("Vent.") COVID-19-Patientenproben wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Wie bei den CD14+-Monozyten wurden auch bei den CD16+-Monozyten die Zellzahlen zwischen der Kontrollgruppe (Healthy), den nicht-beatmeten (Non-Vent.) und den beatmeten (Vent.) Patienten verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Kontrollpersonen eine signifikant höhere Anzahl an Zellen dieser Monozytenpopulation aufwiesen als das Patientenkollektiv. Der Vergleich der Zellzahl zwischen den beatmeten und den nicht-beatmeten Patienten ergab keinen wesentlichen Unterschied.

Auch bei der Gegenüberstellung der nach Outcome aufgeteilten beatmeten Erkrankten (Ventilated) wurde keine Differenz deutlich. Sowohl Überlebende (Survived) als auch Verstorbene (Dead) wiesen eine ähnliche Anzahl an CD16+-Monozyten auf.

### 3.3.6.2.3 Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD169 auf CD16+-Monozyten



**Abbildung 17 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

Es erfolgte die Analyse von Blutproben von 42 gesunden Kontrollpersonen ("Healthy"; 42 Proben), von 38 nicht-beatmeten ("Non-vent."; 62 Proben) und von 30 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten ("Vent."; 102 Proben). Die beatmeten Patienten wurden weiter in "überlebend" ("Survived"; 23 Patienten, 87 Proben) und "verstorben" ("Dead"; 7 Patienten, 15 Proben) unterteilt. Die Anzahl der Proben ist niedriger als bei den vorherigen Analysen, da die Antikörper für diese Nachweise zeitweise nicht verfügbar waren. Darstellung der Expression von CD169 auf der Oberfläche von CD16+-Monozyten, angegeben als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI).

Jede Probe wird auf der Abbildung durch einen Punkt repräsentiert und der Durchschnitt ist rot markiert. Für die Analyse der gesunden Kontrollproben ("Healthy"), der nicht-beatmeten ("Non-vent.") und beatmeten ("Vent.") COVID-19-Patientenproben wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Bei der Analyse der Proben der überlebenden ("Survived") und verstorbenen ("Dead") Beatmeten wurde ein t-Test für zwei unverbundene Stichproben angewandt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Ähnlich wie bei den CD14+-Monozyten ist CD169 (Siglec-1) als Oberflächenmarker der Makrophagen und Monozyten an wesentlichen Aufgaben der CD16+-Monozyten beteiligt (siehe auch 3.3.6.1.3 Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD169 auf CD14+-Monozyten) (52).

Beim Vergleich der Expression von Siglec-1 zwischen den gesunden Kontrollpersonen (Healthy), den nicht-beatmeten (Non-vent.) und den beatmeten (Vent.) Patienten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gesunden und den Nicht-Beatmeten, bei dem die letzteren einen deutlich höheren Wert aufwiesen. Die Beatmeten exprimierten etwas geringere Mengen an CD169 im Vergleich zu den nicht-beatmeten Patienten. Diese Differenz war aber nicht signifikant.

Auch bei den CD16+-Monozyten wurde die Gruppe der beatmeten Erkrankten (Ventilated) in Überlebende (Survived) und Verstorbene (Dead) unterteilt und ihre jeweilige Expression von Siglec-1 verglichen. Dabei wiesen die verstorbenen Patienten leicht höhere Werte auf, die allerdings nicht signifikant waren.

### **3.4 Vollblutstimulation**

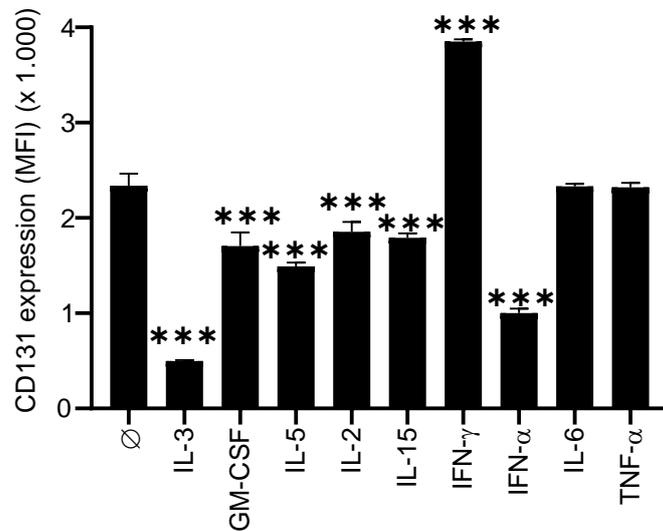
In einem Vorversuch mit heparinisiertem Vollblut wurde getestet, welche Zytokine signifikante Auswirkungen auf die Expression von bestimmten Oberflächenmarkern gewisser Zellpopulationen haben. Die Ergebnisse aus diesem Vorversuch dienten als Basis für die Stimulation der PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) und der Stimulation der Patienten-Vollblutproben. Die Ergebnisse sowie die Diskussion des letzteren Punktes wird in der Dissertation “Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19-Patienten” meiner Laborpartnerin Christine Müller genauer ausgeführt.

Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um basophile Granulozyten, plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs), CD14+-Monozyten sowie neutrophile Granulozyten.

Neben einem unstimulierten Ansatz wurde die Stimulation mit folgenden Zytokinen durchgeführt:

- IL-3
- GM-CSF
- IL-5
- IL-2
- IL-15
- IFN- $\gamma$
- IFN- $\alpha$
- IL-6
- TNF- $\alpha$

### 3.4.1 Basophile Granulozyten



**Abbildung 18 - Zytokin-induzierte Veränderungen von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblutproben**

Für die Analyse wurden die Vollblutproben eines gesunden Spenders in Dubletten für 24 Stunden bei 37°C ohne oder mit Stimulanzien (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-15, GM-CSF, IFN-γ, IFN-α und TNF-α; Konzentration je 20 ng/ml) angesetzt. Darstellung der Expression von CD131 auf basophilen Granulozyten, angegeben als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI).

Die Daten geben den Mittelwert +/- der Standardabweichung an. Statistische Unterschiede zwischen der unstimulierten Probe ("Medium") und den verschiedenen Zytokin-Proben wurden über eine einfaktorielles Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur berechnet. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

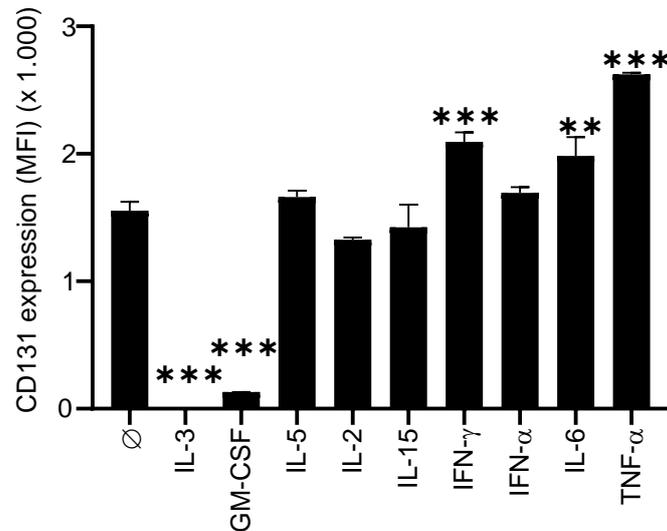
Bei den basophilen Granulozyten wurde die Expression des Oberflächenmarkers CD131 nach Zugabe der verschiedenen Zytokine analysiert.

CD131 ist Bestandteil der IL-3-, IL-5- und GM-CSF-Rezeptoren und dort das Schlüssel-molekül der Signalweiterleitung (52).

Eine signifikante Herunterregulation dieses Moleküls nach Zugabe der Zytokine im Vergleich zum nicht stimulierten Ansatz wurde vor allem durch IL-3 und etwas weniger ausgeprägt durch IFN-α erreicht. Auch GM-CSF, IL-2, IL-5 und IL-15 bewirkten eine signifikante Verminderung der CD131-Expression, allerdings in geringerem Umfang.

Die Zugabe von IFN-γ zu den Ansätzen führte zu einer signifikanten Hochregulation des Oberflächenmarkers.

### 3.4.2 Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs)



**Abbildung 19 - Zytokin-induzierte Veränderungen von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblutproben**

Für die Analyse wurden die Vollblutproben eines gesunden Spenders in Dubletten für 24 Stunden bei 37°C ohne oder mit Stimulanzen (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-15, GM-CSF, IFN-γ, IFN-α und TNF-α; Konzentration je 20 ng/ml) angesetzt. Darstellung der Expression von CD131 auf plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs), angegeben als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI).

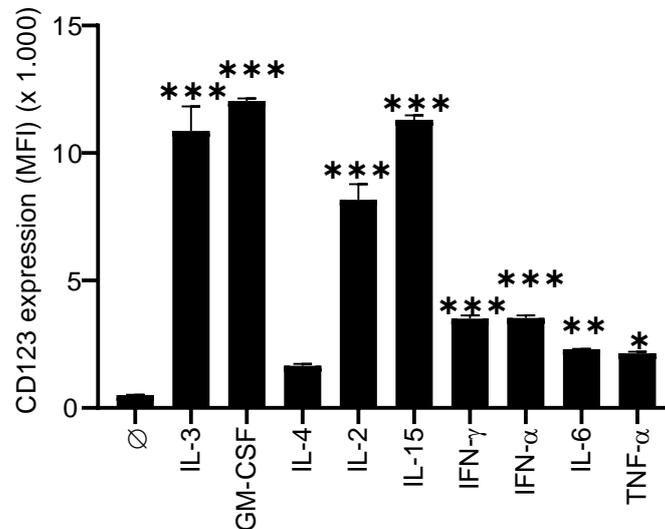
Die Daten geben den Mittelwert +/- der Standardabweichung an. Statistische Unterschiede zwischen der unstimulierten Probe ("Medium") und den verschiedenen Zytokin-Proben wurden über eine einfaktorielles Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur berechnet. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Auch bei den plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) wurde die Expression des Oberflächenmarkers CD131 als Bestandteil des IL-3-, IL5- und GM-CSF-Rezeptors (52) nach Zugabe der Zytokine untersucht.

Eine sehr ausgeprägte, signifikante Herunterregulation von CD131 im Vergleich zum nicht-stimulierten Ansatz erfolgte nach Zugabe von IL-3 und GM-CSF.

Eine signifikant vermehrte Expression dieses Oberflächenmarkers konnte durch die Zugabe von IFN-γ, IL-6 und TNF-α erreicht werden.

### 3.4.3 CD14+-Monozyten



**Abbildung 20 - Zytokin-induzierte Veränderungen von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblutproben**

Für die Analyse wurden die Vollblutproben eines gesunden Spenders in Dubletten für 24 Stunden bei 37°C ohne oder mit Stimulanzen (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-15, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ ; Konzentration je 20 ng/ml) angesetzt. Darstellung der Expression von CD123 auf CD14+-Monozyten, angegeben als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI).

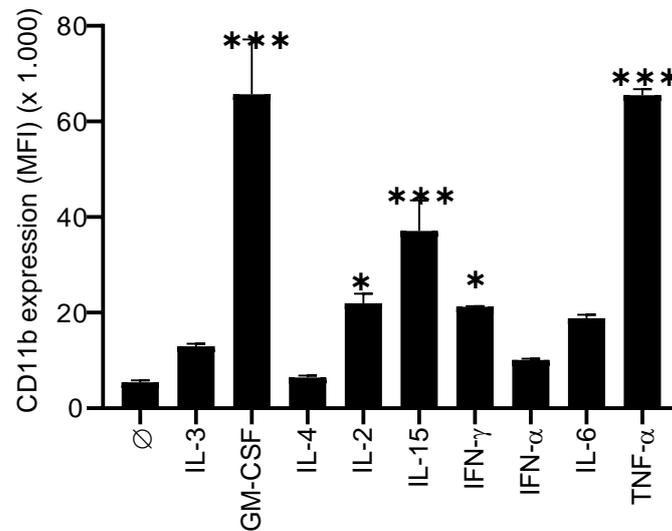
Die Daten geben den Mittelwert +/- der Standardabweichung an. Statistische Unterschiede zwischen der unstimulierten Probe ("Medium") und den verschiedenen Zytokin-Proben wurden über eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur berechnet. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Nach Zugabe der Zytokine und der erfolgten Stimulation wurde bei den CD14+-Monozyten die Expression des Oberflächenmarkers CD123 untersucht.

CD123 ist ein mit geringer Affinität bindender Teil des IL-3-Rezeptors und damit Bestandteil eines Zytokin- beziehungsweise Chemokin-Rezeptors (52).

Ohne Stimulation wurde CD123 auf Monozyten nur wenig exprimiert. Eine besonders ausgeprägte, signifikante Hochregulation erfolgte nach Zugabe der Stimulanzen IL-3, GM-CSF, IL-15 und IL-2. Eine signifikant erhöhte Ausprägung dieses Oberflächenmarkers konnte auch durch IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha$  erreicht werden. Sie war allerdings niedriger als die Expression bei den zuerst genannten Zytokinen. Eine ebenfalls signifikante Hochregulation konnte durch IL-6 und TNF- $\alpha$  erzielt werden. Diese war aber von allen erwähnten signifikanten Hochregulationen am geringsten ausgeprägt.

### 3.4.4 Neutrophile Granulozyten



**Abbildung 21 - Zytokin-induzierte Veränderungen von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblutproben**

Für die Analyse wurden die Vollblutproben eines gesunden Spenders in Dubletten für 24 Stunden bei 37°C ohne oder mit Stimulanzen (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-15, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ ; Konzentration je 20 ng/ml) angesetzt. Darstellung der Expression von CD11b auf neutrophilen Granulozyten, angegeben als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI).

Die Daten geben den Mittelwert +/- der Standardabweichung an. Statistische Unterschiede zwischen der unstimulierten Probe ("Medium") und den verschiedenen Zytokin-Proben wurden über eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur berechnet. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Bei den neutrophilen Granulozyten wurde die Expression des Oberflächenmarkers CD11b nach Zugabe der Stimulanzen untersucht.

CD11b vermittelt die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an Fibrinogen und die Endotheloberfläche sowie Auswanderung aus dem Gefäß, Chemotaxis und Apoptose (52).

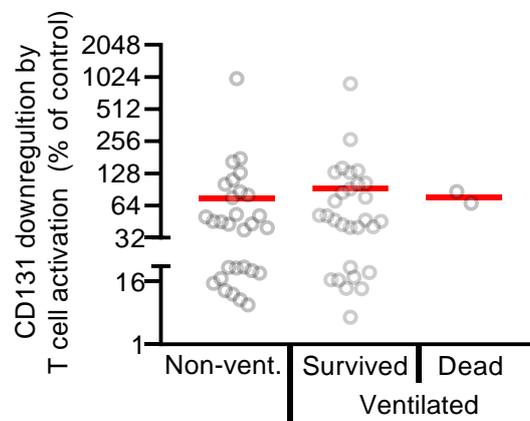
Bei fehlender Stimulation wurde CD11b auf neutrophilen Granulozyten nur in geringem Umfang exprimiert. Eine besonders stark ausgeprägte, signifikante Hochregulation wurde durch die Zugabe der Zytokine GM-CSF und TNF- $\alpha$  erzielt. Ebenfalls signifikant, aber weniger stark, war die erhöhte Expression nach Zugabe von IL-15 und noch etwas geringer nach der Stimulation mit IL-2 und IFN- $\gamma$ .

### 3.5 PBMCs (peripheral blood mononuclear cells)

#### 3.5.1 Veränderung der Rezeptorexpressionen

Die PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) wurden unter anderem mit Anti-CD3 für 24 Stunden kultiviert. Hierdurch sollten die in diesen Proben enthaltenen T-Zellen stimuliert und ihre Auswirkungen auf die in der Immunantwort nachgeschalteten Zelltypen analysiert werden. Da in den PBMCs keine neutrophilen Granulozyten mehr enthalten waren, konnten diese hierbei nicht analysiert werden. Zudem waren durch das Probenhandling zu wenig pDCs vorhanden, um diese aussagekräftig untersuchen zu können.

##### 3.5.1.1 *Basophile Granulozyten*



#### **Abbildung 22 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten**

PBMCs von 25 nicht-beatmeten COVID-19-Patienten ("Non-vent."; 36 Proben), von 14 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten, die von der Intensivstation entlassen werden konnten ("Ventilated Survived"; 39 Proben) und von 2 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten, die auf der Intensivstation verstorben sind ("Ventilated Dead"; 3 Proben) wurden mit oder ohne Anti-CD3 (5µg/ml) für 24 Stunden angesetzt. Basophile Granulozyten konnten nicht in allen Proben analysiert werden, weil ihre Anzahl teilweise zu niedrig war. Die Quantifizierung der untersuchten Oberflächenmarker erfolgte über Durchflusszytometrie. Darstellung der Expression des Oberflächenmarkers CD131 auf basophilen Granulozyten.

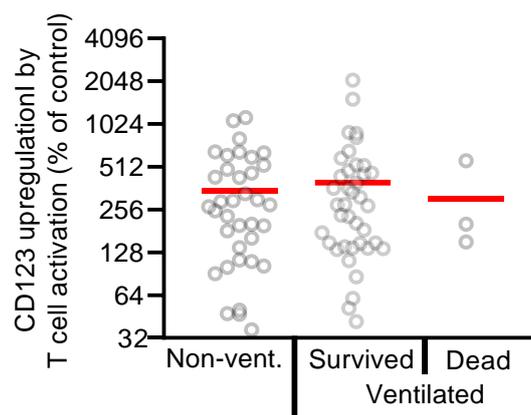
Die dargestellten Werte geben das Verhältnis der Oberflächenmarker-Expression mit einer Stimulation mit Anti-CD3 und der Oberflächenmarker-Expression ohne eine Stimulation mit Anti-CD3 in Prozent an.

Für die Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Bei den basophilen Granulozyten wurde die Herunterregulation des Oberflächenrezeptors CD131 durch die T-Zell-Aktivierung untersucht. Das Ergebnis wurde in Prozent der nicht stimulierten Kontrollprobe angegeben. CD131 gilt als eines der wesentlichen Moleküle zur Signalweiterleitung an den IL-3-, IL-5- und GM-CSF-Rezeptoren (52).

Die untersuchten Gruppen waren zum einen die nicht-beatmeten Patienten (Non-vent.) und zum anderen die beatmeten Erkrankten (Ventilated). Die letztere Kategorie wurde noch weiter in Überlebende (Survived) und Verstorbene (Dead) unterteilt. Der Vergleich der Veränderung der Expression von CD131 zeigte, dass sich diese in allen drei Gruppen nicht wesentlich unterschied.

### 3.5.1.2 Monozyten



**Abbildung 23 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten**

PBMCs von 25 nicht-beatmeten COVID-19-Patienten ("Non-vent."; 36 Proben), von 14 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten, die von der Intensivstation entlassen werden konnten ("Ventilated Survived"; 39 Proben) und von 2 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten, die auf der Intensivstation verstorben sind ("Ventilated Dead"; 3 Proben) wurden mit oder ohne Anti-CD3 (5µg/ml) für 24 Stunden angesetzt. Die Quantifizierung der untersuchten Oberflächenmarker erfolgte über Durchflusszytometrie. Darstellung der Expression des Oberflächenmarkers CD123 auf CD14+-Monozyten

Die dargestellten Werte geben das Verhältnis der Oberflächenmarker-Expression mit einer Stimulation mit Anti-CD3 und der Oberflächenmarker-Expression ohne eine Stimulation mit Anti-CD3 in Prozent an.

Für die Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Bei der Untersuchung der Monozyten in den PBMC-Proben wurde im Gegensatz zu den basophilen Granulozyten nicht die Herunterregulation, sondern die Hochregulation der Oberflächenstruktur untersucht. Diese wurde als Verhältnis in Prozent des Werts in der mit Anti-CD3 stimulierten Probe zum Wert in der nicht-stimulierten Probe angegeben. Der untersuchte Oberflächenmarker war CD123.

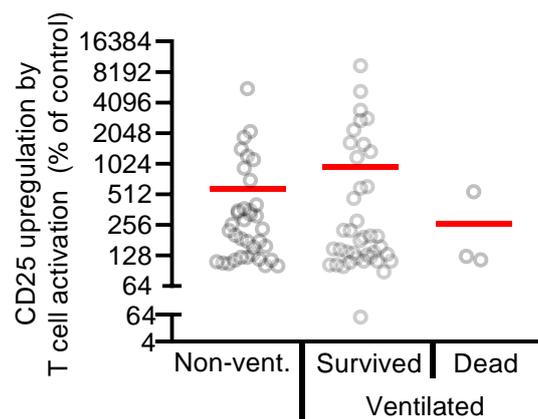
CD123 ist Teil der bindenden Untereinheit des IL-3-Rezeptors (52).

Bei der Analyse der PBMCs wurden die Patientenproben in Nicht-Beatmete (Non-vent.) und Beatmete (Ventilated) unterteilt. Die letztere Gruppe wurde je nach Outcome weiter in

Überlebende (Survived) und Verstorbene (Dead) differenziert. Ähnlich wie bei den basophilen Granulozyten (siehe auch 3.5.1.1 *Basophile Granulozyten*) wurden beim Vergleich der Hochregulation des CD123-Oberflächenmarkers keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppierungen gefunden.

### 3.5.1.3 T-Zellen

#### 3.5.1.3.1 CD4<sup>+</sup>-Zellen



**Abbildung 24 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten**

PBMCs von 25 nicht-beatmeten COVID-19-Patienten ("Non-vent."; 36 Proben), von 14 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten, die von der Intensivstation entlassen werden konnten ("Ventilated Survived"; 39 Proben) und von 2 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten, die auf der Intensivstation verstorben sind ("Ventilated Dead"; 3 Proben) wurden mit oder ohne Anti-CD3 (5µg/ml) für 24 Stunden angesetzt. Die Quantifizierung der untersuchten Oberflächenmarker erfolgte über Durchflusszytometrie. Darstellung der Expression des Oberflächenmarkers CD25 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

Die dargestellten Werte geben das Verhältnis der Oberflächenmarker-Expression mit einer Stimulation mit Anti-CD3 und der Oberflächenmarker-Expression ohne eine Stimulation mit Anti-CD3 in Prozent an.

Für die Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

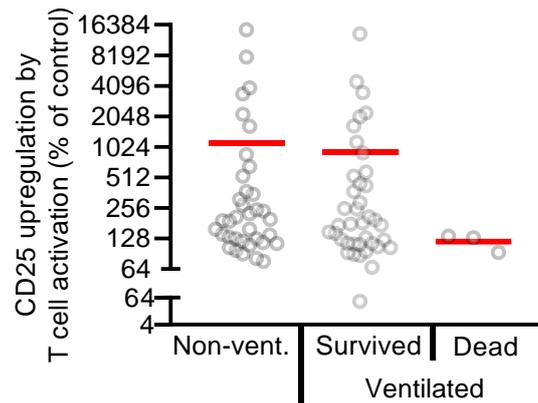
Bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurde die Hochregulation des Oberflächenmarkers CD25 nach Stimulation der T-Zellen mit Anti-CD3 betrachtet. Diese Hochregulation wurde als Verhältnis der Expression in der stimulierten Probe zu der Expression in der nicht-stimulierten Probe in Prozent angegeben.

CD25 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors und tritt auf aktivierten T-Zellen auf (52).

Bei den CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden ähnlich wie bei den basophilen Granulozyten und den Monozyten die Patienten nach ihrer Beatmungspflichtigkeit in Nicht-Beatmete (Non-vent.) und Beatmete (Ventilated) aufgeteilt, wobei letztere Gruppe je nach Outcome noch weiter in Verstorbene (Dead) und Überlebende (Survived) unterteilt wurde.

Bei der Betrachtung der Hochregulation von CD25 zeigte sich, dass die Überlebenden der beatmeten Gruppe ähnlich hohe Werte wie die Nicht-Beatmeten aufwiesen. Die Verstorbenen der beatmeten Gruppe zeichneten sich allerdings durch einen niedrigeren Wert als die anderen beiden Gruppen aus.

### 3.5.1.3.2 CD8+-Zellen



**Abbildung 25 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten**

PBMCs von 25 nicht-beatmeten COVID-19-Patienten ("Non-vent."; 36 Proben), von 14 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten, die von der Intensivstation entlassen werden konnten ("Ventilated Survived"; 39 Proben) und von 2 mechanisch beatmeten COVID-19-Patienten, die auf der Intensivstation verstorben sind ("Ventilated Dead"; 3 Proben) wurden mit oder ohne Anti-CD3 (5µg/ml) für 24 Stunden angesetzt. Die Quantifizierung der untersuchten Oberflächenmarker erfolgte über Durchflusszytometrie. Darstellung der Expression des Oberflächenmarkers CD25 auf CD8+-T-Zellen.

Die dargestellten Werte geben das Verhältnis der Oberflächenmarker-Expression mit einer Stimulation mit Anti-CD3 und der Oberflächenmarker-Expression ohne eine Stimulation mit Anti-CD3 in Prozent an.

Für die Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Bei den CD8+-T-Zellen wurde analog zu den CD4+-T-Zellen die Hochregulation des CD25-Oberflächenmarkers als T-Zell-Aktivierungsmarker (52) untersucht. Die Angabe der Hochregulation erfolgte wieder als Prozentangabe des Verhältnisses des Werts der mit Anti-CD3 stimulierten Probe zu dem Wert der nicht-stimulierten Probe.

Die Analyse der Hochregulation in den einzelnen Blutproben der Patienten erfolgte ebenfalls wie bei den CD4+-Zellen aufgeteilt in Nicht-Beatmete (Non-vent.) und Beatmete (Ventilated), letzteres wieder unterteilt in Überlebende (Survived) und Verstorbene (Dead). Die CD25-Hochregulation war bei den nicht-beatmeten Erkrankten und den beatmeten, überlebenden Patienten gleich hoch. Der Wert der beatmeten, verstorbenen Patienten lag allerdings deutlich unterhalb des Niveaus der anderen beiden Gruppierungen.

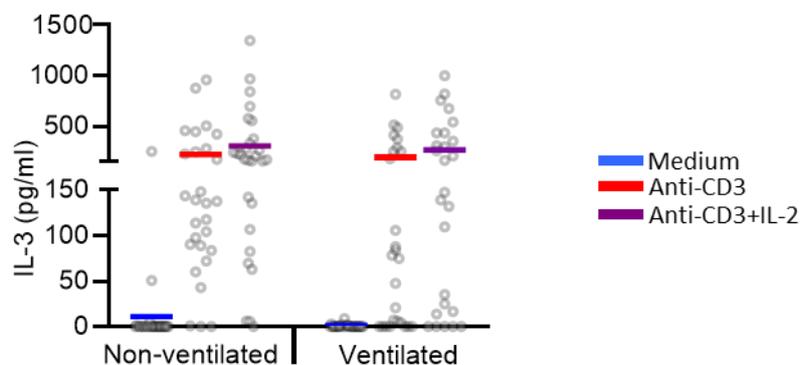
### 3.5.2 Veränderung der Zytokinausschüttung bei unterschiedlichen Stimulationen

Es wurde versucht, eine angenommene verringerte Aktivierbarkeit der T-Zellen durch Stimulation der PBMCs mit Anti-CD3 allein oder mit Anti-CD3 und IL-2 in Kombination zu überwinden.

IL-2 spielt eine bedeutende Rolle bei der korrekten Entwicklung von T-Zellen, indem es die Reifung und das Wachstum dieses Zelltyps initiiert (55).

Für diesen Teil der Studie wurden die bereits erwähnten Stimulationsansätze mit einem Ansatz mit Medium ohne Zusätze verglichen. Analysiert wurden via ELISA die ausgeschütteten Zytokine IL-3, GM-CSF und IFN- $\gamma$ .

#### 3.5.2.1 *IL-3*



#### **Abbildung 26 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten**

Es wurden PBMCs von 22 nicht-beatmeten COVID-19-Patienten ("Non-ventilated"; 28 Proben) und von 12 beatmeten COVID-19-Patienten ("Ventilated"; 26 Proben) nur mit Medium, mit Anti-CD3 oder mit der Kombination Anti-CD3 und IL-2 (20 ng/ml) für 24 Stunden angesetzt. Die Konzentrationen von IL-3 wurden im Überstand der Ansätze mittels ELISA gemessen. Jede Probe wird durch einen Punkt und der Durchschnittswert in blau (Medium), in rot (Anti-CD3) und in violett (Anti-CD3 und IL-2) dargestellt.

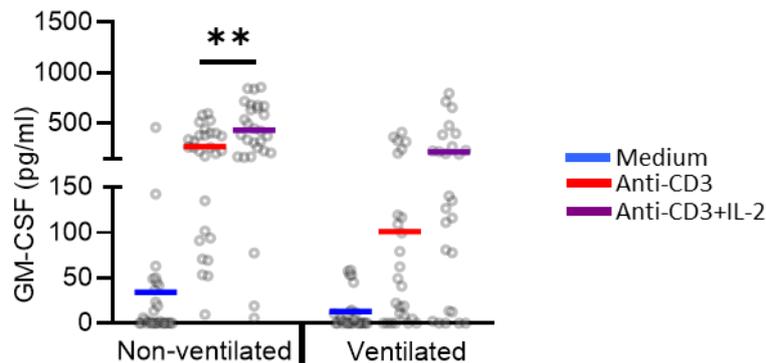
Für die Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

IL-3 ist ein Zytokin, das unter anderem von aktivierten T-Zellen gebildet und ausgeschüttet wird und als koloniestimulierender Faktor die Bildung und Entwicklung von Leukozyten beeinflusst (55, 65).

Die Ausschüttung von IL-3 durch die PBMCs wurde in den Patientengruppen "nicht-beatmet" (Non-ventilated) und "beatmet" (Ventilated) untersucht. In jeder dieser Kategorien wurden die Werte der nicht-stimulierten, also mit Medium angesetzten Proben, und der mit Anti-CD3 und mit der Kombination aus Anti-CD3 und IL-2 stimulierten Proben aufgetragen.

Dabei zeigte sich im Vergleich der nicht-beatmeten zur beatmeten Gruppe ein sehr ähnliches Bild. Bei beiden Gruppierungen waren die IL-3-Werte der unstimulierten Proben sehr gering. Im Gegensatz dazu waren die Werte der stimulierten Proben deutlich höher. Diejenigen von ihnen, die mit der Kombination aus Anti-CD3 und IL-2 stimuliert worden waren, wiesen dabei etwas mehr IL-3-Ausschüttung auf als diejenigen, die nur mit Anti-CD3 versetzt worden waren. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant.

### 3.5.2.2 GM-CSF



**Abbildung 27 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten**

Es wurden PBMCs von 22 nicht-beatmeten COVID-19-Patienten ("Non-ventilated"; 28 Proben) und von 12 beatmeten COVID-19-Patienten ("Ventilated"; 26 Proben) nur mit Medium, mit Anti-CD3 oder mit der Kombination Anti-CD3 und IL-2 (20 ng/ml) für 24 Stunden angesetzt. Die Konzentrationen von GM-CSF wurden im Überstand der Ansätze mittels ELISA gemessen. Jede Probe wird durch einen Punkt und der Durchschnittswert in blau (Medium), in rot (Anti-CD3) und in violett (Anti-CD3 und IL-2) dargestellt.

Für die Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

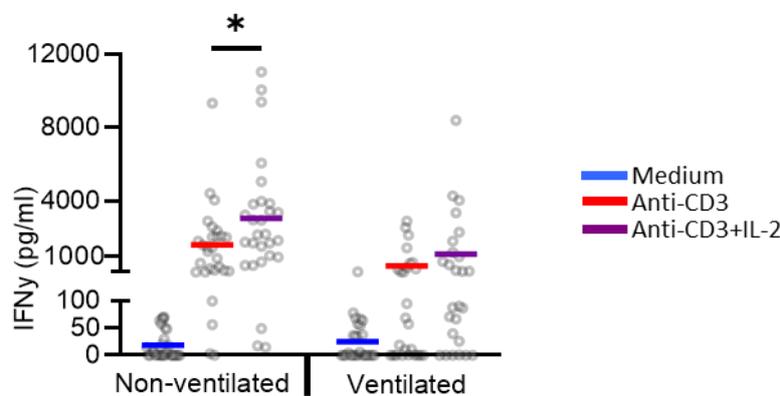
GM-CSF wird von T-Zellen gebildet und bewirkt die Ausreifung von Makrophagen und Granulozyten aus dem Knochenmark. GM-CSF bedeutet Granulozyten/Makrophagen-Kolonienstimulierender Faktor (55).

Der Vergleich der GM-CSF-Ausschüttung der PBMCs wurde wie bereits in Abschnitt 3.5.2.1 IL-3 beschrieben nach Beatmungspflichtigkeit der Patienten in "nicht-beatmet" (Non-ventilated) und "beatmet" (Ventilated) aufgeteilt. In jeder dieser Gruppen wurden die Werte nach unstimuliert (nur Medium), nur mit Anti-CD3 stimuliert und mit der Kombination aus Anti-CD3 und IL-2 stimuliert differenziert.

Dabei ergab sich, dass bei den Nicht-Beatmeten und bei den Beatmeten die Ausschüttung in der Medium-Probe am niedrigsten war. Die Proben mit Anti-CD3 und der Kombination

Anti-CD3 und IL-2 wiesen deutlich höhere Werte auf. Die stärkste Ausschüttung wurde durch die Stimulation mit Anti-CD3 und IL-2 hervorgerufen. Dieser Unterschied zur einfachen Stimulation mit Anti-CD3 war bei den Nicht-Beatmeten signifikant und bei den beatmeten Patienten besonders deutlich ausgeprägt, vor allem da bei letzterem Personenkollektiv die Stimulation mit Anti-CD3 allein nicht so starke Effekte bewirkte wie bei den Nicht-Beatmeten.

### 3.5.2.3 *IFN- $\gamma$*



**Abbildung 28 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten**

Es wurden PBMCs von 22 nicht-beatmeten COVID-19-Patienten ("Non-ventilated"; 28 Proben) und von 12 beatmeten COVID-19-Patienten ("Ventilated"; 26 Proben) nur mit Medium, mit Anti-CD3 oder mit der Kombination Anti-CD3 und IL-2 (20 ng/ml) für 24 Stunden angesetzt. Die Konzentrationen IFN- $\gamma$  wurden im Überstand der Ansätze mittels ELISA gemessen. Jede Probe wird durch einen Punkt und der Durchschnittswert in blau (Medium), in rot (Anti-CD3) und in violett (Anti-CD3 und IL-2) dargestellt.

Für die Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

IFN- $\gamma$  wird von T-Zellen produziert und übernimmt eine bedeutende Position im Immunsystem, indem es die Expression von MHC II-Molekülen auf Zellen anregt, ein sehr starker Makrophagen-Aktivator ist, natürliche Killerzellen in ihrer Aktivität unterstützt und TH2-Zellen hemmt (55).

Auch bei IFN- $\gamma$  erfolgte die Darstellung der Ausschüttung wie bei den bereits zuvor beschriebenen Zytokinen IL-3 und GM-CSF aufgeteilt nach dem Status der Patienten in "nicht-beatmet" (Non-ventilated) und "beatmet" (Ventilated). Zudem wurde sie wieder nach nicht-stimuliert (nur Medium), nur mit Anti-CD3 stimuliert und mit der Kombination Anti-CD3 und IL-2 stimuliert aufgetragen.

Es zeigte sich dabei, dass sowohl bei den Nicht-Beatmeten als auch bei den Beatmeten die Werte für IFN- $\gamma$  bei fehlender Stimulation niedrig waren. Durch die Stimulation mit Anti-CD3 allein konnten diese Werte gesteigert werden. Dabei war diese Steigerung bei den Nicht-Beatmeten geringfügig stärker. Durch die Kombination Anti-CD3 und Il-2 konnte der größte Anstieg an IFN- $\gamma$  erzielt werden. Dieser war bei den Nicht-Beatmeten signifikant höher als der Wert, der durch eine alleinige Stimulation mit Anti-CD3 erzielt wurde. Etwas geringer ausgeprägt war die Steigerung bei den Beatmeten, aber auch hier lag der Wert der kombinierten über dem der alleinigen Stimulation.

### 3.6 Prädiktiver Score

<b>Stimulated blood:</b>						
	Right positive (of 8 dead)	False Positive (of 69 survived)	Sens.	Spe.	NPV	PPV
<b>77 complete data sets of ventilated patients</b>						
Weak upregulation of CD123 on Monos + weak upregulation of CD11b on Neutros + low Basophil count	6	0	75%	100%	94%	100%
Weak upregulation of CD11b on Neutros + low Basophil count	6	1	75%	99%	94%	93%
Weak upregulation of CD123 on Monos + weak upregulation of CD11b on Neutros	7	3	88%	96%	97%	83%
Weak upregulation of CD123 on Monos + low Basophil count	7	6	88%	92%	97%	71%
Weak upregulation of CD11b on Neutros	7	7	88%	90%	97%	67%
Weak upregulation of CD123 on Monos	8	15	100%	80%	100%	52%
Low Basophil count	7	32	88%	54%	95%	31%

**Tabelle 18 - Prädiktiver Score für den fatalen Verlauf mit Todesfolge bei beatmeten COVID-19- Patienten**

Drei Parameter wurden einzeln oder in Kombination eingesetzt, um fatale Verläufe bei beatmeten COVID-19-Patienten vorherzusagen. Ein Parameter war die absolute Anzahl an basophilen Granulozyten im frischen Vollblut. Eine Anzahl <25/ $\mu$ l wurde als niedrige Anzahl gewertet ("Low Baso count"). Die anderen Parameter waren die Hochregulation von CD123 auf CD14+-Monozyten und die Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten, die als Verhältnis aus Oberflächenmarkerexpression mit Anti-CD3-Stimulation und Oberflächenmarkerexpression ohne Stimulation ausgedrückt wurden. Eine Hochregulation <130% wurde als schwache Hochregulation ("Weak upregulation") festgelegt. Bei den kombinierten Scores galt, dass alle einbezogenen Parameter erfüllt sein mussten. Für die drei Parameter wurden 77 Datensätze von 21 beatmeten COVID-19-Patienten einbezogen. 17 Patienten davon konnten von der Intensivstation entlassen werden ("survived"; 69 Proben). 4 Patienten verstarben auf der Intensivstation ("dead"; 8 Proben). Die Tabelle zeigt die Anzahl an richtig und falsch positiven Ergebnissen, die Testsensitivität (Sens.), die Testspezifität (Spe.) und den negativen (NPV) und den positiven prädiktiven Wert (PPV) für die Vorhersage des fatalen Verlaufs mit Todesfolge.

Der prädiktive Score wurde anhand von 77 Datensätzen von beatmeten Patienten erstellt, deren Blutproben stimuliert worden waren. Die Stimulation und Auswertung dieser Proben

wird in der Dissertation “Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19-Patienten” meiner Laborpartnerin Christine Müller dargelegt.

Analysierte Kriterien waren die niedrige Anzahl der basophilen Granulozyten (Low Baso count/low Basophil count), die schwache Hochregulation von CD123 auf Monozyten (Weak upregulation of CD123 on Monos) und die schwache Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten (Weak upregulation of CD11b on Neutros). Bei der Erstellung des Scores wurden die Parameter einzeln, als Zweierkombination oder alle drei zusammen betrachtet.

Dabei zeigte sich, dass die Einzelwerte recht hohe negative prädiktive Werte (NPV) und hohe Sensitivitäten aufwiesen, aber der positive prädiktive Wert (PPV) aufgrund des hohen Anteils an falsch Positiven eher niedrig lag. Die Spezifität war bis auf den Wert der basophilen Granulozyten ebenfalls hoch.

Bei der Kombination von zwei Parametern stieg der positive prädiktive Wert an, ebenso in etwas geringerem Ausmaß die Sensitivität. Die anderen Parameter blieben im Vergleich zu den Einzelwerten relativ unverändert.

Den höchsten positiv prädiktiven Wert (100%) mit einer Anzahl von null falsch Positiven wies die Dreifachkombination aus niedriger Anzahl von basophilen Granulozyten, einer schwachen Hochregulation von CD123 auf Monozyten und einer schwachen Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten auf. Die Spezifität dieser Kombination betrug ebenfalls 100%. Der negative prädiktive Wert betrug 94% und die Sensitivität dieses Scores 75%.

## **4 Diskussion**

Im Rahmen der Diskussion sollen die zuvor beschriebenen Ergebnisse interpretiert und mithilfe aktueller Literatur (Stand: 18.05.2021) in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet werden.

In den folgenden Abschnitten wird dabei auf die im Rahmen dieser Studie erkenntlich gewordene T-Zell-Hyporeaktivität Bezug genommen. Der Nachweis dieser Hyporeaktivität erfolgte über Stimulation der Blutproben mit Anti-CD3 und die Messung der Veränderung von Oberflächenrezeptoren auf Zellen, die den T-Zellen nachgeordnet sind, sowie der Messung von ausgeschütteten Zytokinen und Chemokinen. Als T-Zell-Hyporeaktivität wird dabei eine Hochregulation  $<300\%$  der Oberflächenmarker CD123 auf Monozyten oder CD11b auf neutrophilen Granulozyten als Ausdruck des Verhältnisses zwischen der Oberflächenmarkerexpression nach 24-stündiger Stimulation der Vollblutproben mit Anti-CD3 und der Oberflächenmarkerexpression ohne Stimulation gewertet. Die genaue Erläuterung, Präsentation und Diskussion dieser Ergebnisse wird in der Promotion “Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19-Patienten” meiner Laborpartnerin Christine Müller dargestellt und daher hier nicht weiter erläutert.

### **4.1 Patientendaten**

Bei der Analyse der Patientendaten zeigte sich, dass der Anteil an männlichen Patienten insgesamt und insbesondere in der Gruppe der beatmeten Patienten höher als der Anteil der weiblichen Patientinnen war.

Dies könnte darauf hinweisen, dass das männliche Geschlecht als Risikofaktor für COVID-19 und dabei auch für schwere Verläufe fungieren könnte.

Graselli et al. wiesen in ihrer Studie ebenfalls auf einen erhöhten Anteil an männlichen COVID-19-Patienten und deren erhöhtes Risiko besonders im höheren Alter hin (66). Die Annahme, dass Männer eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen gravierenderen Verlauf haben, wird auch durch Erkenntnisse mehrerer Metaanalysen gestützt, die das männliche Geschlecht als Risikofaktor für schwere Verläufe und eine erhöhte Mortalität einschätzen (67, 68).

Die Laborwerte der in dieser Studie untersuchten Patienten wiesen ebenfalls Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Verlaufsformen der Erkrankung auf. Im Vordergrund standen dabei besonders Entzündungswerte (C-reaktives Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6))

sowie Marker für die Funktion von Leber und Muskulatur (Laktatdehydrogenase (LDH), Bilirubin, Kreatinkinase (CK)) und die intravaskuläre Gerinnung (D-Dimer), die bei den beatmeten Patienten erhöht waren.

Dies könnte ein Hinweis sein, dass Patienten mit schweren Verläufen tendenziell ausgeprägtere Entzündungsreaktionen, Organschädigungen und Gerinnungsstörungen aufweisen als Erkrankte mit einem milden Verlauf.

Unterstützt wird diese Annahme durch die Daten von Metaanalysen zu Risikofaktoren von COVID-19. Tian et al. zeigten in ihrer Metaanalyse, dass CRP, IL-6, LDH, Gesamt-Bilirubin, CK und D-Dimer bei verstorbenen COVID-19-Patienten signifikant höher waren als bei Überlebenden (67). Auch Ou et al. wiesen in ihrer Arbeit auf eine erhöhte Laktatdehydrogenase und ein erhöhtes CRP bei Patienten mit schweren Verläufen hin (69).

## **4.2 Viruspersistenz**

Bei der Analyse der Viruspersistenz in unserer Studie zeigte sich, dass Patienten, bei denen das Virus 15 Tage oder länger nachweisbar war, auch eine signifikant längere T-Zell-Hyporeaktivität aufwiesen. Diese längere Hyporeaktivität war sowohl bei der Kategorisierung nach der Hochregulation von CD123 auf Monozyten als auch bei der Kategorisierung nach der Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten nachweisbar.

Auch Wang et al. wiesen bei Patienten mit schweren Verläufen überwiegend über einen längeren Zeitraum Virus-RNA nach als bei Patienten mit mildereren Verläufen (70).

SARS-CoV-2 könnte über eine Erzeugung von T-Zell-Hyporeaktivität in das spezifische Immunsystem der Erkrankten eingreifen. Dadurch ließe sich auch die verlängerte Virusreplikation erklären, die wiederum zu den bereits im vorherigen Absatz (siehe Absatz 4.1. *Patientendaten*) angesprochenen, stärker ausgeprägten Entzündungen und Organschädigungen führen könnte.

## **4.3 Immunphänotypisierung**

Bei der Analyse der Anzahl der T-Zellen zeigte sich, dass die CD4+-T-Zell-Anzahl sich zwischen Gesunden, beatmeten und nicht-beatmeten Patienten nicht wesentlich unterschied. Auch bei den CD8+-Zellen war die Anzahl dieses Zelltyps bei den Kontrollpersonen und den beatmeten Erkrankten gleich. In dieser Kategorie wiesen nur die nicht-beatmeten Patienten signifikant höhere CD8+-T-Zellzahlen auf. Bei beiden T-Zell-Typen hatten nur die

Verstorbenen der beatmeten Gruppe eine signifikant niedrigere Anzahl am jeweiligen T-Zell-Typ.

Auch in weiteren Studien konnten bei Personen mit schweren COVID-19-Verläufen insgesamt niedrigere T-Zellzahlen, insbesondere von CD8+-T-Zellen, nachgewiesen werden (71–73).

Carissimo et al. konnten in ihrer Studie ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von CD4+-T-Zellen zwischen Gesunden und Erkrankten nachweisen. Zudem zeigte sich bei ihnen ein genereller Abfall der CD8+-T-Zell-Anzahl bei Erkrankten im Vergleich zu Gesunden (74). Möglicherweise kommt dieser Unterschied zu unseren Ergebnissen dadurch zustande, dass die Einteilung der Patienten und die Definition des Schweregrades der Erkrankung anhand unterschiedlicher Kriterien gewählt wurde, sodass gewisse Details nur bedingt vergleichbar sind.

Sattler et al. zeigten, dass Patienten, die während der Studie verstarben, mit einer größeren Häufigkeit T-Zellen besaßen, die sich nicht stimulieren ließen. Zudem zeigte sich in ihrer Untersuchung, dass Patienten auf der Intensivstation im Vergleich zu genesenen Patienten und zu Patienten, die nicht intensivpflichtig waren, eine höhere Anzahl an antigen-spezifischen T-Zellen aufwiesen (75).

Diese Daten sprechen gegen die Annahme, dass eine Hyporeaktivität der T-Zellen allein durch eine verringerte Anzahl dieser Zellen hervorgerufen wird. Ein weiteres Argument für diese These ist, dass auch beatmete Patienten in unserer Studie Zeichen einer T-Zell-Hyporeaktivität aufwiesen, aber ähnliche T-Zellzahlen wie gesunde Kontrollpersonen hatten.

Diese verminderte Aktivität von T-Zellen bei COVID-19-Patienten konnte allerdings nicht in allen Studien nachgewiesen werden.

So legten Peng et al. in ihrer Studie dar, dass COVID-19-Erkrankte mit schwerem Verlauf stärker ausgeprägte T-Zell-Antworten aufwiesen im Vergleich zu weniger schwer Erkrankten (76). Dieser Unterschied könnte möglicherweise durch die Verwendung von PBMCs bei Peng et al. (76) im Vergleich zu Vollblut bei unserer Studie (siehe auch Abschnitt 4.5 *PBMCs*) sowie der unterschiedlichen Definition der T-Zell-Reaktivität erklärt werden.

Die Anzahl der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) nahm im untersuchten Patientenkollektiv von den gesunden Kontrollpersonen ausgehend über die nicht-beatmeten bis zu den beatmeten Patienten hin immer weiter signifikant ab. Innerhalb der beatmeten

Patienten ließ sich allerdings zwischen den Überlebenden und den Verstorbenen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der pDCs nachweisen.

Auch Carissimo et al. konnten diesen Abfall der plasmazytoiden dendritischen Zellen mit steigender Krankheitsschwere nachweisen (74).

Die Abnahme der pDCs ließe sich einerseits über eine möglicherweise verstärkte Migration aus dem Blut in die angrenzenden Gewebe erklären.

Eine andere mögliche Erklärung ist hingegen, die verminderte Anzahl der pDCs als Ausdruck der T-Zell-Hyporeaktivität zu sehen. IL-3 und GM-CSF gelten als wichtige schützende und aktivierende Faktoren von pDCs (77). Diese Faktoren werden wiederum von T-Zellen ausgeschüttet (55). Bei einer Hyporeaktivität der T-Zellen würden weniger IL-3 und GM-CSF ausgeschüttet werden und somit wären die pDCs weniger geschützt. Infolgedessen würde ihre Anzahl abnehmen.

Bei den basophilen Granulozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl zwischen den Kontrollpersonen, den nicht-beatmeten und den beatmeten Patienten, aber innerhalb der Gruppe der Beatmeten wiesen die Verstorbenen eine signifikant niedrigere Menge an basophilen Granulozyten auf.

Ein Erklärungsansatz für die verringerte Anzahl an basophilen Granulozyten bei verstorbenen, beatmeten COVID-19-Patienten könnte, ähnlich wie bei den pDCs, eine verstärkte Migration aus dem Blut in das Gewebe sein.

Allerdings gilt auch hier, dass die verringerte Anzahl von basophilen Granulozyten ein Hinweis auf eine Hyporeaktivität der T-Zellen sein kann. Ähnlich wie bei den pDCs gilt IL-3 als schützender Faktor der basophilen Granulozyten (78). Zudem steigert IL-3 die Proliferation von basophilen Granulozyten (79). Wie bereits bei den pDCs beschrieben, schütten T-Zellen IL-3 aus (55). Somit ließe sich auch hier folgern, dass eine verringerte Ausschüttung von IL-3 durch hyporeaktive T-Zellen zu einem verringerten Überleben sowie einer verminderten Proliferation der basophilen Granulozyten und dadurch zu der beobachteten, verringerten Anzahl bei den verstorbenen Beatmeten führen könnte.

Die neutrophilen Granulozyten waren bei den Beatmeten und in dieser Gruppe insbesondere bei den Verstorbenen signifikant erhöht. Diese erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten bei schweren Verläufen konnte auch durch Liu et al. gezeigt werden (72).

Des Weiteren zeigte sich bei unseren Daten eine Abstufung in der Expression des Oberflächenmarkers CD11b. So wiesen Erkrankte insgesamt eine höhere Expression als gesunde Kontrollpersonen auf. Innerhalb der Gruppe der Erkrankten war eine weitere Abstufung zu erkennen: Nicht-Beatmete exprimierten mehr CD11b als Beatmete und überlebende Beatmete mehr als verstorbene Beatmete.

Carissimo et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Anzahl der neutrophilen Granulozyten nur bei einzelnen Erkrankten erhöht war. Zudem zeigten sie, dass bei akut Erkrankten CD11b auf neutrophilen Granulozyten verstärkt exprimiert wurde (74). Diese Abweichungen zu unseren Ergebnissen könnten sich, ähnlich wie bereits bei den T-Zellen, dadurch erklären lassen, dass Carissimo et al. bei der Betrachtung dieses Zelltyps eine andere Einteilung des Schweregrades der Erkrankung gewählt haben. Dadurch lassen sich einige Details nicht exakt miteinander vergleichen. So wurden bei Carissimo et al. die Patienten bei der Analyse der Anzahl der neutrophilen Granulozyten anhand der Kriterien Pneumonie, Hypoxie und Intensivpflichtigkeit eingeteilt und bei der Analyse der Expression von CD11b erfolgte die Differenzierung in gesunde und akut erkrankte Personen (74). Dahingegen war bei unserer Studie die Beatmung das entscheidende Kriterium.

CD11b spielt bei den Funktionen der neutrophilen Granulozyten, wie der Adhäsion, der Chemotaxis oder der Auswanderung aus dem Gefäßsystem, eine wichtige Rolle (52). Eine vermehrte Expression dieses Oberflächenmarkers würde somit für eine verstärkte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten bei COVID-19-Erkrankten sprechen. Die verminderte Expression von CD11b auf neutrophilen Granulozyten bei schweren Verläufen wäre somit ein Hinweis auf eine verminderte Aktivierung dieses Zelltyps. Da neutrophile Granulozyten auch von T-Zellen aktiviert werden (55), könnte diese verminderte Expression durch hyporeaktive T-Zellen zustande kommen und die verringerte CD11b-Expression somit einen möglichen Marker für die T-Zell-Hyporeaktivität darstellen.

Bei den Monozyten zeigte sich, dass die Anzahl der CD14+-Monozyten im Vergleich zwischen gesunden Kontrollpersonen, nicht-beatmeten und beatmeten Erkrankten keine signifikanten Unterschiede aufwies. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der CD16+-Monozyten im Vergleich zwischen Gesunden und Erkrankten bei den Erkrankten unabhängig von der Krankheitsschwere vermindert.

Eine Abnahme der Monozyten-Anzahl bei Patienten mit erhöhtem Krankheitsgrad wurde durch Carissimo et al. beschrieben (74). Liu et al. konnten bei ihrem Datensatz keine

signifikanten Unterschiede in der Monozyten-Anzahl im Vergleich zwischen milden und schweren Krankheitsverläufen erkennen (72). Da bei dieser Studie allerdings keine Differenzierung in CD14+- und CD16+-Monozyten und kein Vergleich mit einer gesunden Kontrollpopulation erfolgte, ist es möglich, dass der von uns beschriebene Abfall von CD16+-Monozyten bei Erkrankten im Vergleich zu Gesunden nicht erfasst worden ist.

Eine mögliche Erklärung für die verringerte Anzahl der CD16+-Monozyten in den Blutproben der Erkrankten im Vergleich zu den Gesunden wäre die verstärkte Migration dieses Zelltyps in das Gewebe.

Bei der Analyse der Expression des Oberflächenmarkers CD169 auf den beiden Monozytensubtypen ergab sich, dass bei den CD14+-Monozyten die Expression bei den nicht-beatmeten Erkrankten sowohl im Vergleich zu den Gesunden als auch im Vergleich zu den beatmeten Erkrankten signifikant erhöht war. Bei den CD16+-Monozyten zeigte sich diese signifikante Erhöhung ebenfalls bei den nicht-beatmeten Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen und eine, wenn auch nicht signifikante, Abnahme hin zu den Beatmeten.

Carissimo et al. untersuchten ebenfalls die Expression von CD169 auf Monozyten und zeigten, dass bei Patienten auf der Intensivstation die Expression vermindert war, auch wenn dieses Ergebnis nicht signifikant war (74).

CD169 wird auch als Siglec-1 bezeichnet und ist bedeutsam für die Interaktion der Monozyten untereinander und mit dem Gewebe sowie möglicherweise für die Phagozytose (52). Siglec-1 ist eines der am stärksten durch das Typ-I-Interferon-System regulierten Gene (64). Eine verminderte Expression von CD169 auf Monozyten von beatmeten Patienten im Vergleich zu den Nicht-Beatmeten weist somit auf eine eingeschränkte Produktion von Typ-I-Interferonen bei diesem Patientenkollektiv hin. Diese Hypothese wird durch die von Hadjadj et al. beschriebene, eingeschränkte Typ-I-Interferon-Aktivität bei schwer erkrankten COVID-19-Patienten gestützt (80).

#### **4.4 Vollblutstimulation**

Die Vollblutstimulation von Lithium-Heparin-Blut eines gesunden Spenders diente als Basis für die in der Studie durchgeführte Stimulation der PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) sowie der Stimulation der Patienten-Vollblutproben, wobei letzteres durch meine Laborpartnerin Christine Müller durchgeführt wurde.

Basophile Granulozyten zeigten eine besonders ausgeprägte Herunterregulation des Oberflächenrezeptors CD131 durch IL-3.

Auch bei den pDCs (plasmazytoide dendritische Zellen) wurde die Veränderung der Expression von CD131 untersucht. Dieser Oberflächenmarker wurde besonders ausgeprägt durch IL-3 und GM-CSF herunterreguliert.

CD131 ist als Schlüsselmolekül der Signalweiterleitung Bestandteil der IL-3-, IL-5- und GM-CSF-Rezeptoren (52). Da vor allem IL-3, aber auch die anderen Zytokine, von T-Zellen ausgeschüttet werden (55), kann die Veränderung der Expression von CD131 auf basophilen Granulozyten und pDCs als Marker der T-Zell-Aktivität gewertet werden.

CD14+-Monozyten und neutrophile Granulozyten reagierten auf zahlreiche Zytokine mit einer Hochregulation der Oberflächenmarker CD123 (Monozyten) beziehungsweise CD11b (neutrophile Granulozyten).

CD123 ist ein mit geringer Affinität bindender Bestandteil des IL-3-Rezeptors und CD11b spielt eine wichtige Rolle bei der Funktion von neutrophilen Granulozyten (52). Die Zytokine, die die Hochregulation dieser Oberflächenmarker bewirkten, umfassten beispielsweise GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-2 und IFN- $\gamma$  neben einigen anderen Botenstoffen und werden zu großen Teilen von T-Zellen ausgeschüttet (55). Somit integrieren Monozyten und neutrophile Granulozyten mehrere von T-Zellen ausgehende Signale. Daher lässt sich auch bei diesen beiden Zelltypen die Veränderung der Expression der Oberflächenmarker mit der Reaktivität der T-Zellen in Verbindung setzen.

Die Erkenntnisse aus diesem Vorversuch ermöglichten es, die in der Studie gesammelten Expressionsmuster von Oberflächenrezeptoren auf verschiedenen Zelltypen zu interpretieren und in einen Zusammenhang mit einer möglichen T-Zell-Hyporeaktivität setzen zu können.

#### **4.5 PBMCs**

Bei der Analyse der Hochregulation bestimmter Oberflächenrezeptoren der verschiedenen Zellgruppen vor und nach Stimulation der PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) mit Anti-CD3 zeigten sich nur bei den T-Zellen, nicht aber bei den basophilen Granulozyten und den Monozyten, signifikante Unterschiede. Sowohl bei den CD4+- als auch bei den CD8+-T-Zellen entwickelten die Verstorbenen der beatmeten Gruppe nach Stimulation der Zellen mit Anti-CD3 eine deutlich geringer ausgeprägte Hochregulation des Oberflächenmarkers CD25 im Vergleich zu den Nicht-Beatmeten und den überlebenden Beatmeten.

Wie bereits erwähnt (siehe auch 3.5.1.3 *T-Zellen*), ist CD25 ein Oberflächenmarker, der auf T-Zellen vor allem nach deren Aktivierung verstärkt exprimiert wird (52).

Die verringerte Fähigkeit der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der verstorbenen Beatmeten nach der Stimulation mit Anti-CD3 CD25 zu exprimieren ist somit ein Hinweis auf eine mögliche Hyporeaktivität der T-Zellen bei Patienten mit fatalem Outcome.

Zusätzlich zur Untersuchung der Hochregulation der Oberflächenrezeptoren wurde die Ausschüttung der Zytokine IL-3, GM-CSF und IFN- $\gamma$  nach Stimulation der PBMCs mit Anti-CD3 allein oder mit der Kombination aus Anti-CD3 und IL-2 untersucht und mit einem Ansatz, der nur mit Medium versetzt war, verglichen. IL-3, GM-CSF und IFN- $\gamma$  sind drei Zytokine, die von T-Zellen gebildet werden (55). Dabei zeigte sich, dass durch die Kombination IL-2 und Anti-CD3 eine signifikant stärkere Ausschüttung von GM-CSF und IFN- $\gamma$  erreicht wurde.

Die höheren Ausschüttungsraten von GM-CSF und IFN- $\gamma$  durch die kombinierte Stimulation im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Anti-CD3 sowohl bei den nicht-beatmeten als auch bei den beatmeten Patienten weisen auf die Möglichkeit hin, dass IL-2 in der Lage sein könnte, die T-Zell-Hyporeaktivität bei schwer kranken Patienten zumindest teilweise aufzuheben.

Auch eine Studie von Zhu et al. weist auf positive Effekte von rekombinantem IL-2 bei schweren Verläufen von COVID-19-Erkrankten hin. Dazu zählen der Anstieg der Lymphozytenzahl und das Absinken des CRPs (C-reaktives Protein), auch wenn letzteres nicht signifikant war (81).

Allerdings sind unseren Erkenntnissen nach PBMCs Vollblutstimulationen unterlegen. Dies liegt zum einen daran, dass bei PBMCs nicht alle Leukozytensubpopulationen enthalten sind. So fehlen etwa die neutrophilen Granulozyten und die Anzahl der pDCs (plasmazytoide dendritische Zellen) war verringert. Zum anderen ist die Reaktivität der Monozyten und basophilen Granulozyten im Vergleich zur Vollblutstimulation verringert (siehe auch die Ergebnisse der Vollblutstimulation in der Promotion “Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19-Patienten” meiner Laborpartnerin Christine Müller).

Die fehlenden neutrophilen Granulozyten und die verringerte Anzahl an pDCs könnten sich durch den Verlust bei der Aufbereitung der PBMCs erklären lassen. Ein weiterer

Erklärungsansatz ist die von Hodge et al. untersuchte erhöhte Apoptoserate der Zellen bei PBMCs im Vergleich zu Vollblutproben (82).

Außerdem wurde von Appay et al. gezeigt, dass es bei PBMCs im Vergleich zu Vollblutstimulationen zu einer Beeinflussung von Subpopulationen, insbesondere bei CD8+-T-Zellen, kommen kann (83). Auch dieser Effekt könnte die aus PBMCs erlangten Ergebnisse verfälschen.

Trotz dieser Einschränkungen unterstützen die durch die PBMCs erlangten Ergebnisse die Theorie der T-Zell-Hyporeaktivität und erlauben weitere Denk- und Forschungsansätze. So sollte die partielle Reversibilität der T-Zell-Hyporeaktivität durch IL-2 durch weitere Studien, idealerweise auch mit Vollblut, untersucht werden, da dies einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellen könnte.

#### **4.6 Die Bedeutung des prädiktiven Scores**

Der prädiktive Score setzt sich zusammen aus einer geringen Anzahl von basophilen Granulozyten, einer schwachen Hochregulation von CD123 auf Monozyten und einer schwachen Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten. Er hat den höchsten positiven prädiktiven Wert, wenn alle drei Werte als Kombination berücksichtigt werden.

Die schwachen Hochregulationen spiegeln dabei die T-Zell-Hyporeaktivität wider. Allerdings können die Werte von Monozyten und neutrophilen Granulozyten nicht gegeneinander ausgetauscht werden, da diese beiden Zelltypen unterschiedlich von den T-Zellen aktiviert werden (55).

Im Verlauf der Pandemie sind zahlreiche Scores entwickelt worden, die eine Vorhersage des Krankheitsverlaufs und damit dem medizinischen Personal eine bessere Entscheidungsgrundlage ermöglichen sollten. Dabei wurden unterschiedliche Parameter analysiert. Dazu gehörten Auffälligkeiten in radiologischen Aufnahmen des Thorax, Laborwerte, demographische Daten und Symptome der Erkrankten, von denen jeweils unterschiedlich viele in den jeweiligen Score miteinbezogen wurden (84–86).

Die Vorteile unseres prädiktiven Scores sind die geringe Anzahl und die Untersucherunabhängigkeit der Parameter. Vermutlich ließe sich durch eine höhere Anzahl an eingeschlossenen Parametern eine differenziertere Kategorisierung ermöglichen.

Allerdings sind die Möglichkeiten isolierte Patienten zu untersuchen oft eingeschränkt oder in kleineren Kliniken fehlen die Ressourcen dafür. Auch ist es fraglich, ob in Entscheidungssituationen eine große Anzahl an Werten rechtzeitig ermittelt werden kann. Blutabnahmen ließen sich dagegen unkompliziert durchführen. Basophile Granulozyten werden bereits standardmäßig bestimmt und da die Hochregulationen der Oberflächenmarkerexpressionen nicht als absolute, sondern als relative Veränderungen gewertet werden, würden auch für diesen Schritt keine standardisierten Werte benötigt. Da diese Untersuchungen mittlerweile auch maschinell möglich sind, würde das Risiko für eine Beeinflussung durch verschiedene Untersucher, wie das beispielsweise bei der Bewertung von Röntgenaufnahmen der Fall ist, verringert.

Allerdings muss einschränkend angemerkt werden, dass unser Score auf der Basis relativ geringer Patientenzahlen ermittelt wurde und somit in weiteren Studien mit höheren Patientenzahlen bestätigt werden müsste, bevor er im klinischen Alltag eingesetzt werden könnte.

Da er über die eingeschränkte Hochregulation der Oberflächenrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten auch auf die T-Zell-Hyporeaktivität hinweist, wäre es über unseren Score auch möglich, Patienten zu identifizieren, die von Therapien gegen diese Hyporeaktivität profitieren könnten.

#### **4.7 Bedeutung der Monozyten**

Der Schwerpunkt dieser Doktorarbeit soll auf der Rolle der Monozyten und ihrer Subpopulationen liegen. Daher werden im Folgenden die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse zu den Monozyten in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet und ihre Bedeutung durch einen vergleichenden Überblick mit anderen Erkrankungen herausgestellt.

Um die Bedeutung der Monozyten-Subpopulationen (CD14<sup>+</sup>-Monozyten und CD16<sup>+</sup>-Monozyten) zu erfassen, wurde ihre Anzahl und ihre Expression des Oberflächenmarkers CD169 durch Immunphänotypisierung in der Durchflusszytometrie bestimmt. Da CD169 ein Oberflächenmarker der Monozyten/Makrophagen ist, der bei zahlreichen Funktionen und Aktionen dieses Zelltyps involviert ist (52), und stark durch das Typ-I-Interferon-System reguliert wird (64), kann er als Aktivierungsmarker für diese Zellen und als Kennzeichen für die Typ-I-Interferon-Produktion des Erkrankten gewertet werden. Typ-I-Interferone (IFN- $\alpha$

und IFN- $\beta$ ) werden unter anderem von Leukozyten und Fibroblasten produziert, sind somit Zytokine der angeborenen Immunabwehr und initiieren antivirale Reaktionen und stimulieren NK-Zellen (54, 55).

Bei der Analyse der Zellzahlen zeigte sich, dass sich Anzahl der CD14<sup>+</sup>-Monozyten nicht wesentlich zwischen Gesunden, nicht-beatmeten und beatmeten Erkrankten unterschied. Dahingegen war bei den CD16<sup>+</sup>-Monozyten die Anzahl bei den Erkrankten, unabhängig ob beatmet oder nicht, signifikant verringert. Dies könnte durch eine verstärkte Migration dieses Zelltyps aus der Blutbahn in das Gewebe verursacht werden.

Bei der Expression von CD169 zeigte sich, dass bei beiden Monozytensubtypen die Expression bei Erkrankten grundsätzlich erhöht war. Allerdings ergab sich bei den CD14<sup>+</sup>-Monozyten eine signifikant niedrigere Expression von CD169 bei den Beatmeten, was für eine eingeschränkte Produktion von Typ-I-Interferonen in diesem Patientenkollektiv und eine dadurch verminderte Regulation dieses Oberflächenmarkers spricht. Bei den CD16<sup>+</sup>-Monozyten existierte eine ähnliche, allerdings nicht signifikante Tendenz. Insgesamt zeigte sich also bei beiden Monozytensubpopulationen eine verstärkte Aktivierung durch die Erkrankung, auch wenn diese bei schwereren Verläufen teilweise eingeschränkt war.

Zusammenfassend bedeutet das für die Monozytensubpopulationen, dass sowohl CD14<sup>+</sup>-Monozyten als auch CD16<sup>+</sup>-Monozyten durch COVID-19 aktiviert werden und möglicherweise den CD16<sup>+</sup>-Monozyten durch eine wahrscheinlich verstärkte Auswanderung in das Gewebe eine besondere Rolle bei den dort lokalisierten Entzündungsprozessen zukommt.

Im Rahmen der Promotion “Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19-Patienten” meiner Laborpartnerin Christine Müller wurden die Blutproben mit Anti-CD3 stimuliert. Dabei wurde für die Monozyten die Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD123 untersucht. CD123 ist ein mit geringer Affinität bindender Teil des IL-3-Rezeptors (52). Wie bereits in Abschnitt 4.4 *Vollblutstimulation* dargestellt, reagieren Monozyten auf zahlreiche Signale und Botenstoffe, wie beispielsweise GM-CSF, IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die von T-Zellen ausgeschüttet werden, mit der Hochregulation dieses Rezeptors (55). Bei beatmeten Patienten, die in Folge der Erkrankung verstarben, war die Hochregulation von CD123 auf Monozyten nach Stimulation mit Anti-CD3 im Vergleich zu den beatmeten, überlebenden Patienten beinahe nicht vorhanden. Zudem zeigte die Gruppe der Beatmeten insgesamt eine eingeschränkte Hochregulation von CD123. Dies

spricht für eine eingeschränkte Aktivierung der Monozyten durch hyporeaktive T-Zellen. Somit können Monozyten und ihre Oberflächenmarkerexpression als Kennzeichen für einen schweren Verlauf herangezogen werden.

Eine besonders starke Hochregulation von CD123 auf Monozyten konnte bei gesunden und nicht-beatmeten Männern beobachtet werden. Dies weist auf eine besonders ausgeprägte Verbindung zwischen T-Zellen und Monozyten beim männlichen Geschlecht hin.

Die Literatur zur Rolle von Monozyten bei COVID-19 stützt die Annahme, dass Monozyten/Makrophagen wesentlich in das Krankheitsgeschehen eingreifen.

Zhou et al. wiesen in Blutproben eine Abnahme von Monozyten bei Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nach. Des Weiteren zeigten sie, dass der Monozytensubtyp CD14+CD16+, der selten bei Proben von gesunden Kontrollen vorkam, bei schwer Erkrankten stark vermehrt auftrat und zudem zur Hyperinflammation über die Produktion von Zytokinen beitrug (87).

Giamarellos-Bourboulis et al. wiesen auf den Zusammenhang zwischen der Abnahme von HLA-DR auf CD14-Monozyten und dem Auftreten von schwerem respiratorischen Atemversagen im Rahmen einer Immundysregulation bei COVID-19 hin (88).

Weitere Studien zeigten, dass in der Lunge vermehrt aktivierte Makrophagen in einem proinflammatorischen Milieu auftraten, die auch aus den Blutmonozyten rekrutiert worden waren (89, 90). Diese Ergebnisse stützen unsere These, dass die Abnahme der CD16+-Monozyten mit einer Migration aus dem Blut in das Gewebe zu erklären ist.

Monozyten und ihre Subpopulationen wurden bereits bei anderen Erkrankungen als wichtige Faktoren im Krankheitsgeschehen beschrieben. Daher sollen zur besseren Einordnung der Bedeutung der Monozyten bei COVID-19 einige Beispiele aufgezeigt werden.

Eine Erkrankung, bei der Monozyten sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Reaktionen beeinflussen, ist die Multiple Sklerose. Nach Gjelstrup et al. kommt es bei dieser Erkrankung zu einer Verschiebung der Monozytensubpopulationen weg von den klassischen Monozyten hin zu den nicht-klassischen CD16+-Monozyten (91).

Bei rheumatoider Arthritis und systemischen Lupus erythematodes wird den Monozyten eine wichtige Rolle beim Fortschreiten der jeweiligen Erkrankung zugeschrieben (92).

Auch bei Krebserkrankungen wurde die Rolle von Monozyten untersucht. Sie können sowohl Funktionen übernehmen, die gegen den Tumor gerichtet sind, als auch Funktionen, die tumorfördernd wirken (93).

Bei Tuberkulose werden den unterschiedlichen Monozytensubpopulationen in einer Studie von Balboa et al. jeweils unterschiedliche Fähigkeiten zur Bekämpfung des *Mycobacterium tuberculosis* zugeordnet, bei der die CD16<sup>-</sup>-Monozyten zur antibakteriellen Immunantwort beitragen, während CD16<sup>+</sup>-Monozyten ein Umfeld schaffen, in dem die Bakterien besser überleben (94).

Somit fungieren Monozyten bei zahlreichen Erkrankungen als Schaltstück zwischen Krankheitsprogress und Krankheitsbekämpfung.

Zusammenfassend weisen damit sowohl die in der Literatur beschriebenen als auch unsere eigenen Ergebnisse auf eine bedeutende Position der Monozyten und ihrer Subpopulationen bei Krankheiten allgemein und bei COVID-19 im Speziellen hin.

Während die Aktivierung von Monozyten durch T-Zellen bei schweren Verläufen eingeschränkt war, stieg die Expression von CD169 als Aktivierungsmarker des angeborenen Immunsystems bei Erkrankten an. Obwohl dieser Marker bei den CD14<sup>+</sup>-Monozyten der Beatmeten im Vergleich zu den Nicht-Beatmeten abnahm, war er dennoch gegenüber den Werten der gesunden Kontrollpersonen erhöht. Dies erlaubt die Vermutung, dass bei schweren Verläufen zum einen eine Hyporeaktivität der T-Zellen auftritt, die, wie bereits in Abschnitt 4.2 *Viruspersistenz* dargestellt, mit einer längeren Viruspersistenz korreliert. Zum anderen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Monozyten in dieser Situation der verlängerten Viruspersistenz stärker durch Komponenten des angeborenen Immunsystems aktiviert werden. Diese verstärkte Aktivierung könnte zur Hyperinflammation und zu den Schädigungen im Gewebe führen. Auch die Abnahme der Anzahl von CD16<sup>+</sup>-Monozyten im Blut und die daraus gefolgerte, verstärkte Migration dieses Zelltyps in die umliegenden Gewebe, sprechen für die Bedeutung der Monozyten bei den pathologischen Vorgängen bei COVID-19. Diese Theorien sollten durch weitere Studien bestätigt und weiter differenziert werden. So müsste die Rolle der einzelnen Monozytensubpopulationen, insbesondere von CD16<sup>+</sup>-Monozyten als aktivierte, auswandernde Zellen, sowie die Verbindung zwischen T-Zellen und Monozyten genauer erforscht werden. Hinsichtlich möglicher Therapieansätze wäre dabei vor allem die unterschiedlich stark ausgeprägte Verbindung zwischen T-Zellen und Monozyten bei den verschiedenen Geschlechtern von Interesse.

Dennoch erlauben diese Überlegungen bereits einen Ausblick auf zwei denkbare Ansatzpunkte für Therapiemöglichkeiten. Der erste wäre die Aufhebung oder Abmilderung der T-Zell-Hyporeaktivität und der zweite Ansatz würde die Suppression der Aktivierung der Monozyten durch Komponenten des angeborenen Immunsystems beinhalten. Dadurch wäre es möglich, die Gewebeschädigungen durch hyperinflammatorische Vorgänge bei schwer erkrankten COVID-19-Patienten zu reduzieren.

## **5 Zusammenfassung**

Seit Anfang des Jahres 2020 beeinflusst SARS-CoV-2 und die durch dieses Virus ausgelöste Erkrankung COVID-19 das Weltgeschehen durch zahlreiche Erkrankungs- und Todesfälle.

Ziel dieser Dissertation war es, die Aktivierung von Monozytensubpopulationen bei Patienten mit dieser Erkrankung zu untersuchen. Dabei sollte ein Zusammenhang zwischen Krankheitsschwere und Aktivierungsgrad der jeweiligen Monozytensubpopulation herausgearbeitet werden. Zusätzlich erfolgte die Analyse weiterer Zelltypen, wie den plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs), den basophilen und neutrophilen Granulozyten sowie den CD4+- und CD8+-T-Zellen, um die Rolle der Monozyten in der Immunantwort auf das Krankheitsgeschehen besser nachvollziehen zu können.

Dafür wurden Lithium-Heparin-Vollblutproben von insgesamt 55 COVID-19-Patienten und 42 gesunden Kontrollpersonen mit drei verschiedenen Antikörper-Mastermixen angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die auf diese Weise untersuchten Zelltypen waren plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs), basophile Granulozyten, CD4+-T-Zellen, CD8+-T-Zellen, neutrophile Granulozyten (CD11b), CD14+-Monozyten (CD169) und CD16+-Monozyten (CD169) sowie die bei den letzten drei Zelltypen in Klammern angegebenen Oberflächenmarker. Diese Marker dienten als Kennzeichen für den Aktivierungsgrad des jeweiligen Zelltyps.

Zusätzlich wurden die Vollblutproben mit Stimulanzen versetzt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde ihre Zytokinausschüttung sowie die Regulation spezifischer Oberflächenrezeptoren der einzelnen Zelltypen gemessen. Dies wurde im Rahmen der Promotion "Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19-Patienten" meiner Laborpartnerin Christine Müller durchgeführt und wird daher in ihrer Promotion dargestellt.

Ein Vorversuch legte die Basis für diese Vollblutstimulationen und die Stimulationen der aus einigen Patientenproben aufbereiteten PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), indem er die Regulationsfähigkeit der Oberflächenrezeptoren der verschiedenen Zelltypen auf unterschiedliche Zytokinstimulationen untersuchte.

Die PBMCs wurden zunächst aufgetaut, aufbereitet und auf eine vergleichbare Zellkonzentration eingestellt. Damit die Ausschüttung verschiedener Zytokine durch die PBMCs analysiert werden konnte, wurden die Proben jeweils mit verschiedenen

Stimulanzen (unter anderem Anti-CD3 und Anti-CD3 + IL-2) sowie Medium versetzt und 23,5 Stunden inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA auf die Zytokine IL-3, GM-CSF und IFN- $\gamma$  untersucht. Die verbliebenen Zellen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Erkrankten wurden in verschiedene Schweregrade eingeteilt: nicht-beatmet, beatmet - überlebend und beatmet - verstorben.

Bei der Analyse der Patientendaten zeigte sich, dass die beatmeten Patienten erhöhte Entzündungszeichen aufwiesen. Zugleich ließen sich in der Immunphänotypisierung bei schweren Verläufen deutlich weniger pDCs, basophile Granulozyten und CD16+-Monozyten in den Blutproben nachweisen, während bei den CD14+-Monozyten kein Unterschied zu finden und die Anzahl der neutrophilen Granulozyten erhöht war. Die niedrigere Anzahl der erwähnten Zelltypen ließe sich durch eine verstärkte Migration dieser in das erkrankte Gewebe erklären.

Bei der Analyse der Oberflächenmarker CD11b auf neutrophilen Granulozyten und CD169 auf Monozyten, die für ihren jeweiligen Zelltyp als Aktivierungsmarker fungierten, zeigte sich, dass die Expression von CD11b bei Erkrankten insgesamt erhöht war, aber innerhalb dieser Gruppe mit zunehmender Krankheitsschwere stetig abnahm. Die grundsätzlich stärkere Expression von CD11b spricht für eine stärkere Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, die aber mit zunehmender Schwere der Erkrankung abnimmt. Dies könnte möglicherweise mit einer schwächeren Stimulation durch hyporeaktive T-Zellen zu erklären sein. Der Oberflächenmarker CD169 wurde bei beiden Monozytensubpopulationen bei den Erkrankten ausgeprägter exprimiert, was für eine Aktivierung dieser Zellen spricht. Die Expression nahm aber bei den CD14+-Monozyten zu den Beatmeten hin signifikant ab. Diese Abnahme ließe sich durch eine geringere Produktion von Typ-I-Interferonen in dieser Patientengruppe erklären.

Im Rahmen der Promotion "Untersuchung der Expression von IL-3 und seinem Rezeptor bei COVID-19-Patienten" meiner Laborpartnerin Christine Müller wurde eine T-Zell-Hyporeaktivität bei schweren Verläufen festgestellt, die sich in einer schwachen Hochregulation der Oberflächenrezeptoren CD11b auf neutrophilen Granulozyten und CD123 auf Monozyten nach Stimulation der Blutproben sowie einer niedrigen Anzahl an basophilen Granulozyten äußerte. Dass diese Hyporeaktivität nicht allein durch eine erniedrigte Anzahl an T-Zellen ausgelöst wurde, zeigte sich in der Immunphänotypisierung:

die Anzahl der T-Zellen unterschied sich bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zwischen gesunden Kontrollpersonen, Nicht-Beatmeten und Beatmeten nicht und bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wiesen nur die Nicht-Beatmeten signifikant höhere Werte auf, während die Anzahl bei Gesunden und Beatmeten vergleichbar war. Bei beiden T-Zell-Populationen zeigten nur die verstorbenen Beatmeten signifikant erniedrigte Zellzahlen.

Bei der Analyse der T-Zell-Hyporeaktivität und der Viruspersistenz zeigte sich, dass bei Patienten mit längerer Viruspersistenz eine längere T-Zell-Hyporeaktivität nachgewiesen werden konnte. Eine Erklärung für diese Korrelation wäre eine Induktion der Hyporeaktivität durch SARS-CoV-2, was eine längere Virusreplikation ermöglichen würde. Im Rahmen dieser würde durch die nicht von der Hyporeaktivität betroffenen Immunzellen, wie den auch durch das angeborene Immunsystem stimulierbaren, bei Erkrankten ausgeprägter aktivierten Monozyten, eine verstärkte Entzündungsreaktion mit nachfolgender Gewebeschädigung initiiert werden.

Die erlangten Ergebnisse ermöglichten die Entwicklung eines prädiktiven Scores, der anhand der schwachen Hochregulation von CD11b auf neutrophilen Granulozyten, der schwachen Hochregulation von CD123 auf Monozyten und einer geringen Anzahl an basophilen Granulozyten eine Vorhersage für schwere Verläufe ermöglichen könnte.

Die Analyse der Daten der PBMCs unterstützte die These der Hyporeaktivität der T-Zellen, da die T-Zellen der Verstorbenen der beatmeten Gruppe nach Stimulation eine deutlich geringer ausgeprägte Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD25 zeigten. Zudem ließen sich bei der Analyse der Zytokin-ELISAs Hinweise finden, dass die zusätzliche Stimulation mit IL-2 zumindest eine teilweise Aufhebung der T-Zell-Hyporeaktivität ermöglicht. Aufgrund des Verlusts einiger Leukozytensubpopulationen bei der Aufbereitung der PBMCs sowie einer schwächeren Reaktivität einiger Zellgruppen, ist die Verwendung von PBMCs der Verwendung von Vollblutproben unterlegen, sodass die Ergebnisse unter Vorbehalt betrachtet werden müssen und weitere Studien zu den erlangten Erkenntnissen erforderlich scheinen.

So lässt sich zusammenfassen, dass die Monozyten und ihre Subpopulationen bei COVID-19 eine wichtige Rolle im Krankheitsgeschehen spielen. Sie lassen sich einerseits als Marker für die T-Zell-Hyporeaktivität einsetzen und andererseits als mögliche Ursache für die ausgeprägten Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigungen bei schwereren Krankheitsverläufen heranziehen.

## **6 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 - Typische Symptome bei COVID-19 .....	10
Tabelle 2 - Von aktivierten Makrophagen/Monozyten ausgeschüttete Substanzen .....	18
Tabelle 3 - Laborgeräte .....	20
Tabelle 4 - Glas- und Kunststoffwaren .....	21
Tabelle 5 - Chemikalien, Reagenzien und Puffer .....	21
Tabelle 6 - Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze .....	22
Tabelle 7 - Antikörper für die extrazelluläre Färbung der Vollblutproben .....	22
Tabelle 8 - Antikörper für die extrazelluläre Färbung der PBMCs .....	23
Tabelle 9 - Zytokine und Antikörper für die Stimulationen .....	23
Tabelle 10 - Material für die PBMC-ELISAs .....	24
Tabelle 11 - Analyse- und Bearbeitungsprogramme .....	24
Tabelle 12 - Antikörpermastermix für die Vollblutstimulation .....	29
Tabelle 13 - Stimations-Schema der PBMCs .....	30
Tabelle 14 - Verdünnungen der Ansätze für die PBMC-ELISAs .....	33
Tabelle 15 - Demographische und klinische Informationen zu den Studienpatienten und den Kontrollpersonen .....	36
Tabelle 16 - Klinische Laborparameter von COVID-19-Patienten und den Kontrollpersonen .....	39
Tabelle 17 - Korrelation zwischen der Persistenz von SARS-CoV-2-Replikation und der Persistenz der T-Zell-Hyporeaktivität .....	40
Tabelle 18 - Prädiktiver Score für den fatalen Verlauf mit Todesfolge bei beatmeten COVID-19- Patienten .....	71

## **7 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 - Gating-Strategie zur Detektion wichtiger Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie.....	42
Abbildung 2 - Gating-Strategie zur Detektion der T-Zell-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie.....	43
Abbildung 3 - CD4+-T-Zell-Zahlen in Vollblutproben.....	44
Abbildung 4 - CD8+-T-Zell-Zahlen in Vollblutproben.....	45
Abbildung 5 - Gating-Strategie zur Detektion von plasmazytoiden dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	46
Abbildung 6 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen .....	47
Abbildung 7 - Gating-Strategie zur Detektion von basophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie.....	48
Abbildung 8 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen .....	49
Abbildung 9 - Gating-Strategie zur Detektion neutrophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie.....	50
Abbildung 10 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen .....	51
Abbildung 11 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen .....	52
Abbildung 12 - Gating-Strategie zur Detektion von CD14+-Monozyten mittels Durchflusszytometrie.....	53
Abbildung 13 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen .....	54
Abbildung 14 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen .....	55
Abbildung 15 - Gating-Strategie zur Detektion von CD16+-Monozyten mittels Durchflusszytometrie.....	56
Abbildung 16 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen .....	57
Abbildung 17 - Immunphänotypisierung von Vollblutproben bei COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollpersonen .....	58

Abbildung 18 - Zytokin-induzierte Veränderungen von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblutproben .....	60
Abbildung 19 - Zytokin-induzierte Veränderungen von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblutproben .....	61
Abbildung 20 - Zytokin-induzierte Veränderungen von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblutproben .....	62
Abbildung 21 - Zytokin-induzierte Veränderungen von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblutproben .....	63
Abbildung 22 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten .	64
Abbildung 23 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten .	65
Abbildung 24 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten .	66
Abbildung 25 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten .	67
Abbildung 26 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten .	68
Abbildung 27 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten .	69
Abbildung 28 - Analyse von T-Zell-Reaktivität mittels PBMCs von COVID-19- Patienten .	70

## 8 Literaturverzeichnis

1. Coronaviren. In: Brock Mikrobiologie. München: Pearson; 2020. p. 383–4. German.
2. Ziebuhr J. Coronaviren. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SH, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 479–82. German.
3. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J, Xing F, Liu J, Yip CC-Y, Poon RW-S, Tsoi H-W, Lo SK-F, Chan K-H, Poon VK-M, Chan W-M, Ip JD, Cai J-P, Cheng VC-C, Chen H, Hui CK-M, Yuen K-Y. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*. 2020;395(10223):514–23. doi:10.1016/S0140-6736(20)30154-9
4. Robert-Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 02 / 2020. 2020;26. German. doi:10.25646/6451
5. ECDC. Outbreak of acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus, China: third update [Internet] [cited 2020 Aug 22]. Available from: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/novel-coronavirus-risk-assessment-china-31-january-2020\\_0.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/novel-coronavirus-risk-assessment-china-31-january-2020_0.pdf)
6. Spiteri G, Fielding J, Diercke M, Campese C, Enouf V, Gaymard A, Bella A, Sognamiglio P, Sierra Moros MJ, Riutort AN, Demina YV, Mahieu R, Broas M, Bengnér M, Buda S, Schilling J, Filleul L, Lepoutre A, Saura C, Mailles A, Levy-Bruhl D, Coignard B, Bernard-Stoecklin S, Behillil S, van der Werf S, Valette M, Lina B, Riccardo F, Nicastrì E, Casas I, Larrauri A, Salom Castell M, Pozo F, Maksyutov RA, Martin C, van Ranst M, Bossuyt N, Siira L, Sane J, Tegmark-Wisell K, Palmérus M, Broberg EK, Beauté J, Jorgensen P, Bundle N, Pereyaslov D, Adlhoch C, Pukkila J, Pebody R, Olsen S, Ciancio BC. First cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the WHO European Region, 24 January to 21 February 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(9). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000178
7. Salzberger B, Buder F, Lampl B, Ehrenstein B, Hitzenbichler F, Hanses F. Epidemiologie von SARS-CoV-2-Infektion und COVID-19. *Der Internist*. 2020;61(8):782–8. German. doi:10.1007/s00108-020-00834-9
8. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [Internet]. 2021 [updated 2021 May 18; cited 2021 May 18]. Available from: <https://covid19.who.int/>

9. RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - SARS-CoV-2 Steckbrief zur Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) [Internet]. 2021 [updated 2021 Feb 25; cited 2021 Mar 11]. Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Steckbrief.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html) German.
10. Karagiannidis C, Mostert C, Hentschker C, Voshaar T, Malzahn J, Schillinger G, Klauber J, Janssens U, Marx G, Weber-Carstens S, Kluge S, Pfeifer M, Grabenhenrich L, Welte T, Busse R. Case characteristics, resource use, and outcomes of 10 021 patients with COVID-19 admitted to 920 German hospitals: an observational study. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020. doi:10.1016/S2213-2600(20)30316-7
11. Kluge S, Janssens U, Welte T, Weber-Carstens S, Schälte G, Spinner CD, Malin JJ, Gastmeier P, Langer F, Wepler M, Westhoff M, Pfeifer M, Rabe KF, Hoffmann F, Böttiger BW, Weinmann-Menke J, Kersten A, Berlit P, Krawczyk M, Nehls W, Haase R, Nothacker M, Marx G, Karagiannidis C. S3-Leitlinie - Empfehlungen zur stationären Therapie von Patienten mit COVID-19 [Internet]. 2021 [updated 2021 May 17; cited 2021 May 18]; [76 p.]. Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/113-001LGI\\_S3\\_Empfehlungen-zur-stationaeren-Therapie-von-Patienten-mit-COVID-19\\_\\_2021-05.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/113-001LGI_S3_Empfehlungen-zur-stationaeren-Therapie-von-Patienten-mit-COVID-19__2021-05.pdf) German.
12. Lu H. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV). *BioScience Trends*. 2020;14(1):69–71. doi:10.5582/bst.2020.01020
13. Kim Y, Liu H, Galasiti Kankanamalage AC, Weerasekara S, Hua DH, Groutas WC, Chang K-O, Pedersen NC. Reversal of the Progression of Fatal Coronavirus Infection in Cats by a Broad-Spectrum Coronavirus Protease Inhibitor. *PLoS Pathog*. 2016;12(3):e1005531. doi:10.1371/journal.ppat.1005531
14. Channappanavar R, Fett C, Mack M, Eyck PP ten, Meyerholz DK, Perlman S. Sex-Based Differences in Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J Immunol*. 2017;198(10):4046–53. doi:10.4049/jimmunol.1601896
15. Zumla A, Chan JFW, Azhar EI, Hui DSC, Yuen K-Y. Coronaviruses - drug discovery and therapeutic options. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(5):327–47. doi:10.1038/nrd.2015.37

16. Drożdżal S, Rosik J, Lechowicz K, Machaj F, Kotfis K, Ghavami S, Łos MJ. FDA approved drugs with pharmacotherapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) therapy. *Drug Resist Updat.* 2020;53100719. doi:10.1016/j.drup.2020.100719
17. Gao J, Tian Z, Yang X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *BioScience Trends.* 2020;14(1):72–3. doi:10.5582/bst.2020.01047
18. Gautret P, Lagier J-C, Parola P, van Hoang T, Meddeb L, Mailhe M, Doudier B, Courjon J, Giordanengo V, Vieira VE, Tissot Dupont H, Honoré S, Colson P, Chabrière E, La Scola B, Rolain J-M, Brouqui P, Raoult D. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;56(1):105949. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105949
19. Tang W, Cao Z, Han M, Wang Z, Chen J, Sun W, Wu Y, Xiao W, Liu S, Chen E, Chen W, Wang X, Yang J, Lin J, Zhao Q, Yan Y, Xie Z, Li D, Yang Y, Liu L, Qu J, Ning G, Shi G, Xie Q. Hydroxychloroquine in patients with mainly mild to moderate coronavirus disease 2019: open label, randomised controlled trial. *BMJ.* 2020;369m1849. doi:10.1136/bmj.m1849
20. Nelson BC, Laracy J, Shoucri S, Dietz D, Zucker J, Patel N, Sobieszczyk ME, Kubin CJ, Gomez-Simmonds A. Clinical Outcomes Associated with Methylprednisolone in Mechanically Ventilated Patients with COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2020. doi:10.1093/cid/ciaa1163
21. Jeronimo CMP, Farias MEL, Val FFA, Sampaio VS, Alexandre MAA, Melo GC, Safe IP, Borba MGS, Abreu-Netto RL, Maciel ABS, Neto JRS, Oliveira LB, Figueiredo EFG, Dinelly KMO, Rodrigues MGdA, Brito M, Mourão MPG, Pivoto João GA, Hajjar LA, Bassat Q, Romero GAS, Naveca FG, Vasconcelos HL, Tavares MdA, Brito-Sousa JD, Costa FTM, Nogueira ML, Baía-da-Silva D, Xavier MS, Monteiro WM, Lacerda MVG. Methylprednisolone as Adjunctive Therapy for Patients Hospitalized With COVID-19 (Metcovid): A Randomised, Double-Blind, Phase IIB, Placebo-Controlled Trial. *Clin Infect Dis.* 2020. doi:10.1093/cid/ciaa1177
22. Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, Staplin N, Brightling C, Ustianowski A, Elmahi E, Prudon B, Green C, Felton T, Chadwick D, Rege K, Fegan C, Chappell LC, Faust SN, Jaki T, Jeffery K, Montgomery A, Rowan K,

- Juszczak E, Baillie JK, Haynes R, Landray MJ. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(8):693–704. doi:10.1056/NEJMoa2021436
23. Ko W-C, Rolain J-M, Lee N-Y, Chen P-L, Huang C-T, Lee P-I, Hsueh P-R. Arguments in favour of remdesivir for treating SARS-CoV-2 infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;55(4):105933. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105933
24. Warren TK, Jordan R, Lo MK, Ray AS, Mackman RL, Soloveva V, Siegel D, Perron M, Bannister R, Hui HC, Larson N, Strickley R, Wells J, Stuthman KS, van Tongeren SA, Garza NL, Donnelly G, Shurtleff AC, Retterer CJ, Gharaibeh D, Zamani R, Kenny T, Eaton BP, Grimes E, Welch LS, Gomba L, Wilhelmsen CL, Nichols DK, Nuss JE, Nagle ER, Kugelman JR, Palacios G, Doerffler E, Neville S, Carra E, Clarke MO, Zhang L, Lew W, Ross B, Wang Q, Chun K, Wolfe L, Babusis D, Park Y, Stray KM, Trancheva I, Feng JY, Barauskas O, Xu Y, Wong P, Braun MR, Flint M, McMullan LK, Chen S-S, Fearn R, Swaminathan S, Mayers DL, Spiropoulou CF, Lee WA, Nichol ST, Cihlar T, Bavari S. Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature.* 2016;531(7594):381–5. doi:10.1038/nature17180
25. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, Hohmann E, Chu HY, Luetkemeyer A, Kline S, Lopez de Castilla D, Finberg RW, Dierberg K, Tapson V, Hsieh L, Patterson TF, Paredes R, Sweeney DA, Short WR, Touloumi G, Lye DC, Ohmagari N, Oh M-D, Ruiz-Palacios GM, Benfield T, Fätkenheuer G, Kortepeter MG, Atmar RL, Creech CB, Lundgren J, Babiker AG, Pett S, Neaton JD, Burgess TH, Bonnett T, Green M, Makowski M, Osinusi A, Nayak S, Lane HC. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med.* 2020. doi:10.1056/NEJMoa2007764
26. Wang Y, Zhang D, Du G, Du R, Zhao J, Jin Y, Fu S, Gao L, Cheng Z, Lu Q, Hu Y, Luo G, Wang K, Lu Y, Li H, Wang S, Ruan S, Yang C, Mei C, Wang Y, Ding D, Wu F, Tang X, Ye X, Ye Y, Liu B, Yang J, Yin W, Wang A, Fan G, Zhou F, Liu Z, Gu X, Xu J, Shang L, Zhang Y, Cao L, Guo T, Wan Y, Qin H, Jiang Y, Jaki T, Hayden FG, Horby PW, Cao B, Wang C. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet.* 2020;395(10236):1569–78. doi:10.1016/S0140-6736(20)31022-9

27. Mansourabadi AH, Sadeghalvad M, Mohammadi-Motlagh H-R, Rezaei N. The immune system as a target for therapy of SARS-CoV-2: A systematic review of the current immunotherapies for COVID-19. *Life Sci.* 2020;258:118185. doi:10.1016/j.lfs.2020.118185
28. Diurno F, Numis FG, Porta G, Cirillo F, Maddaluno S, Ragozzino A, Negri P de, Di Gennaro C, Pagano A, Allegorico E, Bressy L, Bosso G, Ferrara A, Serra C, Montisci A, D'Amico M, Lo Schiano Morello S, Di Costanzo G, Tucci AG, Marchetti P, Di Vincenzo U, Sorrentino I, Casciotta A, Fusco M, Buonerba C, Berretta M, Ceccarelli M, Nunnari G, Diessa Y, Cicala S, Facchini G. Eculizumab treatment in patients with COVID-19: preliminary results from real life ASL Napoli 2 Nord experience. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(7):4040–7. doi:10.26355/eurrev\_202004\_20875
29. Luo P, Liu Y, Qiu L, Liu X, Liu D, Li J. Tocilizumab treatment in COVID-19: A single center experience. *J Med Virol.* 2020;92(7):814–8. doi:10.1002/jmv.25801
30. Fontana F, Alfano G, Mori G, Amurri A, Tei L, Ballestri M, Leonelli M, Facchini F, Damiano F, Magistroni R, Cappelli G. COVID-19 pneumonia in a kidney transplant recipient successfully treated with tocilizumab and hydroxychloroquine. *Am J Transplant.* 2020;20(7):1902–6. doi:10.1111/ajt.15935
31. COVID-19-Impfstoffe [Internet]. 2021 [updated 2021 May 14; cited 2021 May 18]. Available from: <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoffe/covid-19/covid-19-node.html;jsessionid=76B216439BA1D6570DE2C93F2B4E6561.intranet232> German.
32. CHMP. Comirnaty, INN-COVID-19 mRNA Vaccine (nucleoside-modified) [Internet] [cited 2021 Feb 9]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/comirnaty-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/comirnaty-epar-medicine-overview_en.pdf)
33. COVID-19 Vaccine Moderna | European Medicines Agency [Internet]. 2021 [updated 2021 Mar 4; cited 2021 Mar 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/covid-19-vaccine-moderna#assessment-history-section>
34. European Medicines Agency. CHMP summary of positive opinion for COVID-19 Vaccine Moderna [Internet] [cited 2021 Feb 9]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/chmp-summary-positive-opinion-covid-19-vaccine-moderna\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/chmp-summary-positive-opinion-covid-19-vaccine-moderna_en.pdf)

35. COVID-19 Vaccine AstraZeneca | European Medicines Agency [Internet]. 2021 [updated 2021 Mar 2; cited 2021 Mar 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/covid-19-vaccine-astrazeneca>
36. EMA MedWrit AS. Medicine overview\_ COVID-19 Vaccine AstraZeneca [Internet] [cited 2021 Feb 9]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/sites/default/files/documents/2021/01/29/positive\\_opinion\\_-\\_covid-19\\_vaccine\\_astrazeneca\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/sites/default/files/documents/2021/01/29/positive_opinion_-_covid-19_vaccine_astrazeneca_en.pdf)
37. COVID-19 Vaccine Janssen | European Medicines Agency [Internet]. 2021 [updated 2021 Mar 11; cited 2021 Mar 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/covid-19-vaccine-janssen>
38. RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - Tabelle mit den gemeldeten Impfungen bundesweit und nach Bundesland sowie nach STIKO-Indikation (8.2.2021, Tabelle wird werktäglich aktualisiert) [Internet]. 2021 [updated 2021 May 18; cited 2021 May 18]. Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Daten/Impfquotenmonitoring.html;jsessionid=5C22A8ED08DE1924A2609C94CDDC8825.internet061?nn=13490888](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Daten/Impfquotenmonitoring.html;jsessionid=5C22A8ED08DE1924A2609C94CDDC8825.internet061?nn=13490888) German.
39. Kaufmann SHE. Zellen des Immunsystems. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SH, Schulz TF, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 41–4. German.
40. Das Immunsystem. In: Neumann J, editor. *Immunbiologie: Eine Einführung*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 1–28. German.
41. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82(2):244–52. doi:10.1189/jlb.0307191
42. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*. 1993;23(9):2053–8. doi:10.1002/eji.1830230902
43. Weber C, Belge KU, Hundelshausen P v., Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of leukocyte biology*. 2000;67(5):699–704. doi:10.1002/jlb.67.5.699

44. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 1996;87(1):373–7. doi:10.1182/blood.V87.1.373.373
45. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med*. 2002;196(4):517–27. doi:10.1084/jem.20011608
46. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity*. 2003;19(1):71–82. doi:10.1016/S1074-7613(03)00174-2
47. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med*. 2003;197(12):1701–7. doi:10.1084/jem.20022156
48. Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debré P, Théodorou I, Combadière C. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*. 2000;287(5461):2274–7. doi:10.1126/science.287.5461.2274
49. Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H-D, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+ / CD16+ blood monocytes. *Eur J Immunol*. 2001;31(1):48–56. doi:10.1002/1521-4141(200101)31:1<48:AID-IMMU48>3.0.CO;2-5
50. Grip O, Bredberg A, Lindgren S, Henriksson G. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(5):566–72. doi:10.1002/ibd.20025
51. Sconocchia G, Keyvanfar K, El Ouriaghli F, Grube M, Rezvani K, Fujiwara H, McCoy JP, Hensel N, Barrett AJ. Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte. *Leukemia*. 2005;19(1):69–76. doi:10.1038/sj.leu.2403550
52. Cruse JM, Lewis RE, Wang H. CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS. *Immunology Guidebook*. 2004;47–124. doi:10.1016/B978-012198382-6/50027-3

53. Kaufmann SHE. Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SH, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 93–100. German.
54. Effektorreaktionen von angeborener und erworbener Immunität. In: Neumann J, editor. Immunbiologie: Eine Einführung. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 137–80. German.
55. Kaufmann SHE. T-Zellen. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SH, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 79–92. German.
56. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, Perlman S. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host & Microbe*. 2016;19(2):181–93. doi:10.1016/j.chom.2016.01.007
57. Gompf A. Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, editor. Zelluläre Diagnostik und Therapie. Berlin/Boston: De Gruyter; 2016. p. 1–28. German.
58. Stanker LH, Hnasko RM. A Double-Sandwich ELISA for Identification of Monoclonal Antibodies Suitable for Sandwich Immunoassays. In: Hnasko R, editor. ELISA: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 69–78.
59. Weiß C. Varianzanalysen. In: Weiß C, editor. Basiswissen Medizinische Statistik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 169–84. German.
60. Weiß C. Prinzip eines statistischen Tests. In: Weiß C, editor. Basiswissen Medizinische Statistik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 125–40. German.
61. Weiß C. Lagetests. In: Weiß C, editor. Basiswissen Medizinische Statistik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 141–54. German.
62. Bedingte Wahrscheinlichkeiten und diagnostische Tests. In: Hilgers R-D, Scheiber V, Bauer P, editors. Einführung in die Medizinische Statistik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 79–101. German.
63. Entwicklung und Aktivierung von T-Zellen. In: Neumann J, editor. Immunbiologie: Eine Einführung. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 87–114. German.

64. Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün JR, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M, Häupl T, Rudwaleit M, Riemekasten G, Radbruch A, Hiepe F, Burmester G-R, Grützkau A. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(4):1136–45. doi:10.1002/art.23404
65. Dotsika EN, Sanderson CJ. Interleukin-3 production as a sensitive measure of T-lymphocyte activation in the mouse. *Immunology* [Internet]. 1987;62(4):665–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3501400>
66. Grasselli G, Greco M, Zanella A, Albano G, Antonelli M, Bellani G, Bonanomi E, Cabrini L, Carlesso E, Castelli G, Cattaneo S, Cereda D, Colombo S, Coluccello A, Crescini G, Forastieri Molinari A, Foti G, Fumagalli R, Iotti GA, Langer T, Latronico N, Lorini FL, Mojoli F, Natalini G, Pessina CM, Ranieri VM, Rech R, Scudeller L, Rosano A, Storti E, Thompson BT, Tirani M, Villani PG, Pesenti A, Cecconi M. Risk Factors Associated With Mortality Among Patients With COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy. *JAMA Intern Med*. 2020;180(10):1345–55. doi:10.1001/jamainternmed.2020.3539
67. Tian W, Jiang W, Yao J, Nicholson CJ, Li RH, Sigurslid HH, Wooster L, Rotter JJ, Guo X, Malhotra R. Predictors of mortality in hospitalized COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*. 2020;92(10):1875–83. doi:10.1002/jmv.26050
68. Zheng Z, Peng F, Xu B, Zhao J, Liu H, Peng J, Li Q, Jiang C, Zhou Y, Liu S, Ye C, Zhang P, Xing Y, Guo H, Tang W. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J Infect*. 2020;81(2):e16-e25. doi:10.1016/j.jinf.2020.04.021
69. Ou M, Zhu J, Ji P, Li H, Zhong Z, Li B, Pang J, Zhang J, Zheng X. Risk factors of severe cases with COVID-19: a meta-analysis. *Epidemiology and Infection*. 2020;148:e175. doi:10.1017/S095026882000179X
70. Wang Y, Zhang L, Sang L, Ye F, Ruan S, Zhong B, Song T, Alshukairi AN, Chen R, Zhang Z, Gan M, Zhu A, Huang Y, Luo L, Mok CKP, Al Gethamy MM, Tan H, Li Z, Huang X, Li F, Sun J, Zhang Y, Wen L, Li Y, Chen Z, Zhuang Z, Zhuo J, Chen C, Kuang L, Wang J, Lv H, Jiang Y, Li M, Lin Y, Deng Y, Tang L, Liang J, Huang J,

- Perlman S, Zhong N, Zhao J, Malik Peiris JS, Li Y, Zhao J. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *J Clin Invest*. 2020;130(10):5235–44. doi:10.1172/JCI138759
71. Luo M, Liu J, Jiang W, Yue S, Liu H, Wei S. IL-6 and CD8+ T cell counts combined are an early predictor of in-hospital mortality of patients with COVID-19. *JCI Insight*. 2020;5(13). doi:10.1172/jci.insight.139024
  72. Liu J, Li S, Liu J, Liang B, Wang X, Wang H, Li W, Tong Q, Yi J, Zhao L, Xiong L, Guo C, Tian J, Luo J, Yao J, Pang R, Shen H, Peng C, Liu T, Zhang Q, Wu J, Xu L, Lu S, Wang B, Weng Z, Han C, Zhu H, Zhou R, Zhou H, Chen X, Ye P, Zhu B, Wang L, Zhou W, He S, He Y, Jie S, Wei P, Zhang J, Lu Y, Wang W, Zhang L, Li L, Zhou F, Wang J, Dittmer U, Lu M, Hu Y, Yang D, Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. 2020;55:102763. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102763
  73. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, Song S, Ma Z, Mo P, Zhang Y. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis*. 2020;221(11):1762–9. doi:10.1093/infdis/jiaa150
  74. Carissimo G, Xu W, Kwok I, Abdad MY, Chan Y-H, Fong S-W, Puan KJ, Lee CY-P, Yeo NK-W, Amrun SN, Chee RS-L, How W, Chan S, Fan BE, Andiappan AK, Lee B, Röttschke O, Young BE, Leo Y-S, Lye DC, Renia L, Ng LG, Larbi A, Ng LFP. Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. *Nature Communications*. 2020;11(1):5243. doi:10.1038/s41467-020-19080-6
  75. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, Heim KM, Khadzhynov D, Treskatsch S, Halleck F, Kreis ME, Kotsch K. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest*. 2020;130(12):6477–89. doi:10.1172/JCI140965
  76. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, Dejnirattisai W, Rostron T, Supasa P, Liu C, López-Camacho C, Slon-Campos J, Zhao Y, Stuart DI, Paesen GC, Grimes JM, Antson AA, Bayfield OW, Hawkins DEDP, Ker D-S, Wang B, Turtle L, Subramaniam K, Thomson P, Zhang P, Dold C, Ratcliff J, Simmonds P, Silva T de, Sopp P, Wellington D, Rajapaksa U, Chen Y-L, Salio M, Napolitani G, Paes W, Borrow P, Kessler BM, Fry JW, Schwabe NF, Semple MG, Baillie JK, Moore SC,

- Openshaw PJM, Ansari MA, Dunachie S, Barnes E, Frater J, Kerr G, Goulder P, Lockett T, Levin R, Zhang Y, Jing R, Ho L-P, Cornall RJ, Conlon CP, Klenerman P, Sreaton GR, Mongkolsapaya J, McMichael A, Knight JC, Ogg G, Dong T. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1336–45. doi:10.1038/s41590-020-0782-6
77. Ghirelli C, Zollinger R, Soumelis V. Systematic cytokine receptor profiling reveals GM-CSF as a novel TLR-independent activator of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2010;115(24):5037–40. doi:10.1182/blood-2010-01-266932
78. Didichenko SA, Spiegl N, Brunner T, Dahinden CA. IL-3 induces a Pim1-dependent antiapoptotic pathway in primary human basophils. *Blood.* 2008;112(10):3949–58. doi:10.1182/blood-2008-04-149419
79. Dougan M, Dranoff G, Dougan SK. GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation. *Immunity.* 2019;50(4):796–811. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.022
80. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, Péré H, Charbit B, Bondet V, Chenevier-Gobeaux C, Breillat P, Carlier N, Gauzit R, Morbieu C, Pène F, Marin N, Roche N, Szwebel T-A, Merklings SH, Treluyer J-M, Veyer D, Mouthon L, Blanc C, Tharaux P-L, Rozenberg F, Fischer A, Duffy D, Rieux-Laucat F, Kernéis S, Terrier B. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* 2020;369(6504):718–24. doi:10.1126/science.abc6027
81. Zhu M-E, Wang Q, Zhou S, Wang B, Ke L, He P. Recombinant interleukin-2 stimulates lymphocyte recovery in patients with severe COVID-19. *Exp Ther Med.* 2021;21(3):227. doi:10.3892/etm.2021.9658
82. Hodge G, Hodge S, Han P. Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: relevance to cytokine production. *Cytokine.* 2000;12(12):1763–8. doi:10.1006/cyto.2000.0790
83. Appay V, Reynard S, Voelter V, Romero P, Speiser DE, Leyvraz S. Immunomonitoring of CD8+ T cells in whole blood versus PBMC samples. *Journal of Immunological Methods.* 2006;309(1-2):192–9. doi:10.1016/j.jim.2005.11.007
84. Liang W, Liang H, Ou L, Chen B, Chen A, Li C, Li Y, Guan W, Sang L, Lu J, Xu Y, Chen G, Guo H, Guo J, Chen Z, Zhao Y, Li S, Zhang N, Zhong N, He J. Development

- and Validation of a Clinical Risk Score to Predict the Occurrence of Critical Illness in Hospitalized Patients With COVID-19. *JAMA Intern Med.* 2020;180(8):1081–9. doi:10.1001/jamainternmed.2020.2033
85. Ji D, Zhang D, Xu J, Chen Z, Yang T, Zhao P, Chen G, Cheng G, Wang Y, Bi J, Tan L, Lau G, Qin E. Prediction for Progression Risk in Patients With COVID-19 Pneumonia: The CALL Score. *Clin Infect Dis.* 2020;71(6):1393–9. doi:10.1093/cid/ciaa414
86. Vieceli T, Oliveira Filho CM de, Berger M, Saadi MP, Salvador PA, Anizelli LB, Crivelaro, Pedro Castilhos de Freitas, Butzke M, Zappelini RdS, Seligman, Beatriz Graeff dos Santos, Seligman R. A predictive score for COVID-19 diagnosis using clinical, laboratory and chest image data. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2020;24(4):343–8. doi:10.1016/j.bjid.2020.06.009
87. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, Sun R, Tian Z, Xu X, Wei H. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *National Science Review.* 2020;7(6):998–1002. doi:10.1093/nsr/nwaa041
88. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, Damoraki G, Gkavogianni T, Adami M-E, Katsaounou P, Ntaganou M, Kyriakopoulou M, Dimopoulos G, Koutsodimitropoulos I, Velissaris D, Koufargyris P, Karageorgos A, Katrini K, Lekakis V, Lupse M, Kotsaki A, Renieris G, Theodoulou D, Panou V, Koukaki E, Koulouris N, Gogos C, Koutsoukou A. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host & Microbe.* 2020;27(6):992-1000.e3. doi:10.1016/j.chom.2020.04.009
89. Chua RL, Lukassen S, Trump S, Hennig BP, Wendisch D, Pott F, Debnath O, Thürmann L, Kurth F, Völker MT, Kazmierski J, Timmermann B, Twardziok S, Schneider S, Machleidt F, Müller-Redetzky H, Maier M, Krannich A, Schmidt S, Balzer F, Liebig J, Loske J, Suttorp N, Eils J, Ishaque N, Liebert UG, Kalle C v., Hocke A, Witzernath M, Goffinet C, Drosten C, Laudi S, Lehmann I, Conrad C, Sander L-E, Eils R. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol.* 2020;38(8):970–9. doi:10.1038/s41587-020-0602-4

90. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, Cheng L, Li J, Wang X, Wang F, Liu L, Amit I, Zhang S, Zhang Z. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):842–4. doi:10.1038/s41591-020-0901-9
91. Gjelstrup MC, Stilund M, Petersen T, Møller HJ, Petersen EL, Christensen T. Subsets of activated monocytes and markers of inflammation in incipient and progressed multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(2):160–74. doi:10.1111/imcb.1025
92. Hirose S, Lin Q, Ohtsuji M, Nishimura H, Verbeek JS. Monocyte subsets involved in the development of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Int Immunol*. 2019;31(11):687–96. doi:10.1093/intimm/dxz036
93. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *Journal of leukocyte biology*. 2019;106(2):309–22. doi:10.1002/JLB.4RI0818-311R
94. Balboa L, Barrios-Payan J, González-Domínguez E, Lastrucci C, Lugo-Villarino G, Mata-Espinoza D, Schierloh P, Kviatcovsky D, Neyrolles O, Maridonneau-Parini I, Sánchez-Torres C, Del Sasiain MC, Hernández-Pando R. Diverging biological roles among human monocyte subsets in the context of tuberculosis infection. *Clin Sci (Lond)*. 2015;129(4):319–30. doi:10.1042/CS20150021

## **9 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an die zahlreichen Personen richten, die mich während der Erarbeitung, der Entwicklung und der Anfertigung meiner Dissertation, trotz der aufgrund der Pandemie teilweise eingeschränkten Möglichkeiten des persönlichen Austausches, begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Mack für die Möglichkeit der Promotion in der Abteilung Nephrologie der Klinik für Innere Medizin II, die Bereitstellung des sehr aktuellen und interessanten Forschungsthemas und die sehr gute Betreuung während meiner Zeit im Labor und danach beim Verfassen der Dissertation danken.

Ein besonderer Dank gebührt auch Frau PD Dr. Kerstin Renner und ihrer herausragenden Betreuung zu jeder Zeit, sowohl bei der Arbeit im Labor als auch beim Verfassen der Dissertation. Ohne ihre Unterstützung, ihren Rat und ihre fachkundige Hilfe wäre diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt ebenso den Mitgliedern des Teams der AG Mack. Besonders danke ich Frau Sophia Neumayer für die Einarbeitung und die Unterstützung im Labor. Auch Frau Yvonne Talke, Frau Simone Buchtler, Frau Frederike Winter, Frau Kathrin Schmidbauer, Herr Jan-Niklas Salewski und Herr Saidou Balam haben mich bei jeglicher Fragestellung unterstützt. Ich habe mich bei ihnen im Labor stets gut aufgehoben und wohl gefühlt. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Laborpartnerin Christine Müller, für ihre Begleitung und Unterstützung danken. Ihr Rückhalt war mir eine große Hilfe bei der Erstellung meiner Dissertation.