

Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin III
Professor Dr. Wolfgang Herr
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Untersuchung des Einflusses einer COVID-19-Infektion auf den
Metabolismus einer T-Zelle**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jana Klitzke

2025

Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin III
Professor Dr. Wolfgang Herr
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Untersuchung des Einflusses einer COVID-19-Infektion auf den
Metabolismus einer T-Zelle**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jana Klitzke

2025

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. Peter Siska

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Barbara Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2026

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	11
1 Einleitung	12
1.1 Coronavirus disease 2019 (COVID-19)	12
1.2 Das Immunsystem	16
1.2.1 Abwehr bei Viruserkrankungen	16
1.3 T-Zell-Metabolismus	20
1.3.1 Glukosestoffwechsel der T-Zelle	20
1.3.2 Fettsäurenstoffwechsel der T-Zelle	20
1.3.3 Mitochondrialer Stoffwechsel der T-Zelle	21
2 Zielsetzung.....	24
3 Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.2 Methoden.....	36
3.2.1 Studienteilnehmer.....	36
3.2.2 Zellbiologische Methoden.....	37
3.2.2.1 Zentrifugation von Zellen.....	37
3.2.2.2 Erythrozytenlyse von frischen humanen Vollblutproben	37

3.2.2.3	Dichtegradientenzentrifugation.....	38
3.2.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
3.2.2.5	Bestimmung von Zellzahl, Zelldurchmesser, Zellvitalität.....	39
3.2.2.6	Kultivierung von Zellen	39
3.2.2.7	Polyklonale Stimulation von T-Zellen	39
3.2.2.8	Behandlung der PBMCs	40
3.2.2.9	Ernte der Zellen	40
3.2.2.10	Durchflusszytometrie	41
3.2.2.11	Vitalfärbung	41
3.2.2.12	Antikörperfärbung für die Durchflusszytometrie	42
3.2.2.13	2-NBDG-, BODIPY 500/510 C1, C12- und Cystine-FITC-Färbung...	46
3.2.2.14	DCFDA-Färbung	46
3.2.3	Auswertung der Durchflusszytometrie mit FlowJo.....	47
3.2.4	Einschränkungen in der Auswertung.....	48
3.2.5	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA).....	53
3.2.6	Statistische Auswertung	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Aktivierung der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen	54
4.2	Glukoseaufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen	58

4.3	Fettsäureaufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen	62
4.4	ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen	66
4.5	Effekt von Dexamethason auf T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	70
4.5.1	Effekt von Dexamethason auf die ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	70
4.5.2	Effekt von Dexamethason auf die Aktivierung der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	72
4.5.3	Effekt von Dexamethason auf die Glukose- und Fettsäureaufnahme der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen	74
4.6	Proliferation der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	77
4.7	Zytokinproduktion in PBMCs von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen	79
5	Diskussion	83
5.1	Eine COVID-19-Infektion beeinflusst die Aktivierung der T-Zellen	83
5.2	Eine COVID-19-Infektion führt zu einer metabolischen Dysregulation in T-Zellen.....	87
5.3	Eine COVID-19-Infektion führt zu vermehrtem oxidativem Stress in T-Zellen	89
5.4	Auswirkung von Dexamethason <i>in-vitro</i> auf T-Zell Aktivierung, Metabolismus, Zytokinproduktion und oxidativen Stress	91
6	Zusammenfassung.....	99

7	Literaturverzeichnis	101
8	Danksagung	116

Abkürzungsverzeichnis

2NBDG	2-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
Acetyl-CoA.....	Acetyl-Coenzym A
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
ARDS.....	Acute Respiratory Distress Syndrome
Arf6	ADP-ribosylation factor 6
ATP.....	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of Differentiation
CK.....	Kreatinkinase
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CRP	C-reaktives Protein
CRS	Cytokine Release Syndrome
Ctrl	Control
CypA.....	Cyclophilin A
DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate
Dexa	Dexamethason
DM	Diabetes mellitus
EDTA	ethylendiaminetetraacetic acid
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
EMMPRIN.....	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAO	Fettsäurenoxidation

FCS	fetal calf serum
FITC.....	Fluorothioisocyanat
GLUT1	Glukosetransporter 1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCC.....	Hepatozellulären Karzinom
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
IFN-γ.....	Interferon-gamma
IL	Interleukin
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA-1	Leukocyte-Associated Molecule-1
MCTs	Monocarboxylat-Transporter
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NK.....	Natürliche Killerzellen
O ₂ ⁻	Superoxid Anion
OH ⁻	Hydroxylradikale
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAMPs.....	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate buffered saline
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
ROS.....	reaktive Sauerstoff-Spezies
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus

SODsSuperoxiddismutasen

T_{FH}follikuläre T-Helferzellen

T_H.....T-Helferzellen

TMPRSS2.....Transmembrane Protease Serine Subtype 2

TNF- α Tumornekrosefaktor-alpha

T_{Reg} regulatorische T-Zellen

VEVorerkrankung

VEGFVascular Endothelial Growth Factor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Gatingstrategie mit FlowJo der <i>in-vitro</i> Experimente.	47
Abbildung 2. Darstellung des technischen Fehlers in der CD8 ⁺ Darstellung der frühen <i>in-vitro</i> Experimente.	49
Abbildung 3. Vergleich zwischen dem prozentualen Anteil von CD8 ⁺ T-Zellen im ROS-Panel und CD4 ⁺ T-Zellen im 2-NBDG- und BODIPY 500/510 C1, C12- Panel.	50
Abbildung 4. Darstellung repräsentativer Auswertungen von <i>in-vitro</i> Experimenten bei der Behandlung von T-Zellen mit 0,1 mM und 0,5 mM H ₂ O ₂	52
Abbildung 5. CD25-Expression auf T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	55
Abbildung 6. CD147-Expression auf T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	56
Abbildung 7. CD25-Expression nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	57
Abbildung 8. CD147-Expression nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	58
Abbildung 9. 2-NBDG-Aufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	59
Abbildung 10. 2-NBDG-Aufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten in Bezug auf Vorerkrankungen und das Alter.....	60
Abbildung 11. 2-NBDG-Aufnahme nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	61
Abbildung 12. BODIPY 500/510 C1, C12-Aufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	63

Abbildung 13. BODIPY 500/510 C1, C12-Aufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten in Bezug auf Vorerkrankungen und das Alter.....	64
Abbildung 14. BODIPY 500/510 C1, C12-Aufnahme nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19 Patienten.....	66
Abbildung 15. ROS-Produktion nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	68
Abbildung 16. Cystine-FITC-Aufnahme nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	69
Abbildung 17. ROS-Produktion nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an Tag 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	71
Abbildung 18. Cystine-FITC-Aufnahme nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an Tag 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	72
Abbildung 19. CD25-Expression nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an Tag 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	73
Abbildung 20. CD147-Expression nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an Tag 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	74
Abbildung 21. 2-NBDG-Aufnahme nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an Tag 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	75
Abbildung 22. BODIPY 500/510 C1, C12-Aufnahme nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an Tag 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.....	77

Abbildung 23. Proliferation der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen bei Behandlung mit Dexamethason.	78
Abbildung 24. Darstellung der Proliferation der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen bei Behandlung mit Dexamethason.....	79
Abbildung 25. IFN- γ -Produktion der PBMCs nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an den Tagen 2 und 6 von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	80
Abbildung 26. TNF- α -Produktion der PBMCs nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an den Tagen 2 und 6 von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	81
Abbildung 27. IL-6-Produktion der PBMCs nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an den Tagen 2 und 6 von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Geräte und Ausstattung	25
Tabelle 2. Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 3. Humane Blutprodukte	28
Tabelle 4. Reagenzien	28
Tabelle 5. Kits	31
Tabelle 6. FACS Waschpuffer	31
Tabelle 7. MACS-Puffer	32
Tabelle 8. T-Zell-Kulturmedium.....	33
Tabelle 9. T-Zell-Einfriermedium.....	33
Tabelle 10. ACK-Lyse-Puffer	34
Tabelle 11. Humane Antikörper für FACS	35
Tabelle 12. Software	36
Tabelle 13. Antikörper und Reagenzien für die Behandlung der humanen Vollblutproben nach Erythrozytenlyse	43
Tabelle 14. Antikörper und Reagenzien für die T-Zell Stimulationen der frühen Experimente	44
Tabelle 15. Antikörper und Reagenzien für die T-Zell Stimulationen der späteren Experimente	45

1 Einleitung

1.1 Coronavirus disease 2019 (COVID-19)

Im Dezember 2019 traten in Wuhan, China, vermehrt Pneumonien auf, die durch den neuen Coronavirus 2019-nCoV (heute als SARS-CoV-2 bekannt) ausgelöst wurden (1). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) 2 ist ein Coronavirus, welcher die COVID-19 Pandemie hervorgerufen hat. Zum aktuellen Zeitpunkt (Stand Juli 2025) gibt es über 778 Millionen bestätigte Fälle weltweit, davon 7 Millionen Todesfälle (2,3).

SARS-CoV-2 gehört zu den Coronaviren und teilt 79 % Sequenzhomologie mit SARS-CoV und 96 % mit einem Fledermaus Coronavirus (4). Es gibt Coronaviren, die eher den oberen Respirationstrakt infizieren und deshalb nur wenige Symptome verursachen. SARS-CoV-2 infiziert wie SARS-CoV und Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) den unteren Respirationstrakt und löst so vermehrt eine Pneumonie aus. Die Symptome sind vielfältig und reichen von Fieber, trockenem Husten, Myalgien, Fatigue und Dyspnoe bis zum akuten Lungenversagen (ARDS= Acute Respiratory Distress Syndrome) (1). In 70 % der Todesfälle wurde ein respiratorisches Versagen beschrieben, in 28 % der Fälle eine Sepsis aufgrund eines Zytokinsturms (5).

Bestimmte Patientengruppen weisen ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf auf. Zu den häufigsten Komorbiditäten bei COVID-19-Patienten gehört eine kardiale Vorerkrankung oder ein Diabetes mellitus (DM) (6). *Thomas* et al. beschrieben eine Hyperglykämie bei allen untersuchten COVID-19-Patienten (7). Die Hyperglykämie ist mit verlängerten Krankenhausaufenthalten, erhöhtem Risiko für Intubation und erhöhter Mortalität assoziiert (8,9). Die Hyperglykämie kann das Immunsystem beeinflussen. Bei DM Typ 2 Patienten mit COVID-19 zeigten sich erhöhte Interleukin 6 (IL-6) und C-reaktives Protein (CRP) Spiegel (10). *Wang* et al. beobachteten, dass COVID-19-Patienten mit schlecht eingestelltem DM-Typ 2 über verringerte CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verfügen (10).

Auch der Fettsäurenmetabolismus scheint eng verwoben mit einer COVID-19 Infektion. Bei jüngeren COVID-19-Patienten (<60 Jahre) ist Übergewicht ein erheblicher Risikofaktor für eine Hospitalisierung (11). *Thomas et al.* zeigten, dass sich in COVID-19-Patienten vermehrt freie Fettsäuren im Plasma befinden, die mit Entzündungswerten wie CRP, IL-6 korrelieren (7).

Umgekehrt können lipidsenkende Medikamente, wie Statine, die Mortalität von COVID-19-Patienten senken (12). COVID-19 Patienten, die mit Statinen behandelt wurden, zeigten eine niedrige Prävalenz der mechanischen Beatmung (12). Es lässt sich eine immunsuppressive Auswirkung von Statinen in COVID-19 vermuten, da Statine zu einer Reduktion von IL-6, CRP und Neutrophilenzahl führten (12).

Ebenfalls konnte neben relevanten Komorbiditäten auch das fortgeschrittene Alter als ein Risikofaktor für einen schweren Verlauf identifiziert werden. In einer klinischen Studie aus England mit 20.000 COVID-19-Patienten zeigte sich, dass das mediane Alter der Patienten bei über 70 Jahren lag, das mediane Alter bei Tod bei 80 Jahren (6). Die Mortalität bei intensivpflichtigen COVID-19-Patienten war bei älteren Patienten (>64 Jahre) wesentlich höher als bei jüngeren (13). Ältere Patienten wiesen bei SARS-CoV-2 Infektion eine erhöhte virale Replikation mit erhöhter Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine auf (14).

Kardial vorerkrankte Patienten wiesen bei COVID-19-Infektion ebenfalls eine schlechtere Prognose auf (15).

Viele Laborparameter, insbesondere Alanin-Aminotransferase (ALT), CRP, Laktatdehydrogenase (LDH), Kreatinkinase (CK), D-Dimere und Procalcitonin, die auf eine systemische Inflammation hindeuten, sind bei COVID-19-Patienten erhöht (16,17). Es kommt zu starken Blutbildveränderungen, bei denen besonders eine Lymphopenie und eine Leukozytose mit erhöhten neutrophilen Granulozyten hervorzuheben ist (16). Besonders bei schweren Verläufen sind die Lymphozyten und die NK-Zellen erniedrigt (17,18).

SARS-CoV-2 tritt wie SARS-CoV über den Rezeptor Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (ACE2) und die Serinprotease Transmembrane Protease Serine Subtype 2 (TMPRSS2) in den Wirt ein (19).

Da ACE2 auf Immunzellen kaum exprimiert wird, werden andere Infektionswege thematisiert (4,19,20). ACE und TMPRSS2 Expression konnten auf dem Großteil der T-Zellen, wie naiven oder Vorläuferzellen, nicht nachgewiesen werden. *Kuklina* diskutierte, ob die ACE2 /TMPRSS2 Expression nur bestimmten T-Zellsubpopulationen, z. B. im MALT, vorbehalten ist. Hier wäre möglicherweise eine Übertragung des ACE2 Rezeptor über Microvesikel von ACE2 Rezeptor tragenden Zellen, wie dem respiratorischen Epithel, möglich (21). Verschiedenste alternative Eintrittsmoleküle des SARS-CoV-2 Virus in eine T-Zelle wurden thematisiert. Leukocyte-Associated Molecule-1 (LFA-1) wurde von *Shen* et al. als alternatives Eintrittsmolekül von SARS-CoV-2 *in-vitro* in Jurkat T-Zelllinien vorgeschlagen (20). Als weitere mögliche Eintrittspforte wird auch eine Interaktion zwischen Cluster of Differentiation 4 (CD4) und dem Spikeprotein diskutiert (22). Einschränkend ist einerseits eine im Vergleich zu anderem Gewebe (Darmepithel) deutlich verringerte Infektionsrate der T-Zellen, andererseits konnte in CD8⁺ T-Zellen keine virale SARS-CoV-2 RNA nachgewiesen werden (20,22). Bisher erfolgten keine weiteren *in-vivo* Experimente, die dies bestätigten. Möglicherweise steht die direkte virale Infektion einer T-Zelle nicht im Vordergrund, eine beeinträchtigte Hämatopoese, Erschöpfung und Apoptose der T-Zellen, ein Zytokinsturm und eine Hyperlaktatämie werden unter anderem als Ursachen der Lymphopenie diskutiert (23).

CD147 kann auch als Eintrittspforte für SARS-CoV-2 dienen (24). Viele Zellen, die kein/kaum ACE2 exprimieren, wie T-Zellen, exprimieren CD147 (24). Es wird auch diskutiert, ob eine Interaktion zwischen Cyclophilin A (CypA) und CD147 ein mögliches Eindringen des Virus in den Wirt erleichtern könnte (25). CD147, auch als Basigin oder Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) bezeichnet, ist ein multifunktionales Transmembranglykoprotein mit verschiedensten Bindungspartnern (26). CD147 kann verschiedenen anderen Viren, wie Masern, Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) Zytomegalieviren und SARS-CoV, den Eintritt in die Wirtszelle ermöglichen (27–30). Interessanterweise wirkt eine Interaktion zwischen CypA und

CD147 auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen als chemotaktischer Stimulus für die Migration der T-Zellen zu einer entzündlichen Umgebung (31).

In-vitro konnte durch den CD147 Antikörper Meplazumab eine Inhibition der Replikation des SARS-CoV-2 Virus festgestellt werden (24). Aufgrund der möglichen Eintrittspforte von SARS-CoV-2 über CD147 und CypA wurde eine klinische Studie zur Effektivität des CD147 Antikörpers Meplazumab bei einer SARS-CoV-2 Infektion begonnen. In der DEFLECT Studie konnte durch Meplazumab eine verringerte Mortalität und eine Reduktion der Virus- und Zytokinlast beobachtet werden (32,33). 2025 erschien eine klinische Studie Phase 3 zu Meplazumab mit Nachweis einer verringerten Mortalität und Viruslast (34).

CD147 kann nicht nur Viren den Wirtseintritt ermöglichen, es spielt auch beim Energiestoffwechsel der Zellen eine Rolle. CD147 bindet direkt an Monocarboxylat-Transporter (MCTs), welche unter anderem Laktat, Pyruvat und Ketonkörper über die Zellmembran transportieren. Außerdem besitzt CD147 noch Verbindungen zum Glukosetransporter 1 (GLUT1) und CD98 (26). Neben CD147 und dessen Bedeutung, sowohl bei einer Virusinfektion als auch bei dem Zellstoffwechsel, stellt sich die weitere Frage, inwiefern sich der Stoffwechsel der Zellen oder auch der allgemeine Stoffwechsel eines Patienten auf die SARS-CoV-2 Infektion auswirkt und umgekehrt auch von ihr beeinflusst wird.

Eine erhöhte CD147-Expression findet sich z. B. bei DM, Übergewicht, steigendem Alter, welche alle als Risikofaktoren für einen schweren Verlauf einer COVID-19-Infektion gelten. CD147 wird verstärkt bei Übergewicht exprimiert (35). Im Plasma von übergewichtigen Diabetikern zeigte sich erhöhtes CD147, welches mit metabolischen und kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert ist (36). Erhöhte Glukosekonzentration im Plasma, wie bei DM zu finden, führten zu einer verstärkten CD147-Expression von Monozyten (37). In Zelllinien des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) führte eine vermehrte CD147-Expression zu einem Anstieg der Expression von GLUT1 und MCT1. Dies lässt auf einen engen Zusammenhang zwischen Glukosemetabolismus und CD147-Expression schließen (38).

Durch eine COVID-19-Infektion kann es zur Hypoxie mit Dyspnoe bis zum ARDS kommen (1). Besonders schwere Fälle einer COVID-19-Infektion werden zunehmend mit Dexamethason therapeutisch behandelt. Dexamethason gehört zu den Glukokortikoiden. Man kann endogene und exogene Glukokortikoide unterscheiden. Endogene Glukokortikoide werden von der Nebennierenrinde in Abhängigkeit der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse produziert. Exogene Glukokortikoide, wie Dexamethason, werden schon lange, z. B. bei Autoimmunerkrankungen, eingesetzt. Glukokortikoide binden an ihren intrazellulären Rezeptor und wirken über Veränderungen der Expressionen im Genom anti-entzündlich (39). Im RECOVERY Trial wurden COVID-19-Patienten 6 mg Dexamethason für bis zu 10 Tage verabreicht. Hier zeigte sich, dass besonders COVID-19-Patienten mit mechanischer Beatmung oder O₂-Bedarf eine verringerte 28-Tage-Mortalität aufwiesen. Patienten ohne Beatmung oder O₂-Unterstützung profitierten jedoch nicht von der Behandlung (40).

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem lässt sich in ein angeborenes (unspezifisches) und erworbenes (spezifisches) System unterteilen. Zum angeborenen Immunsystem gehören die Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen. Zum adaptiven Immunsystem gehören die T- und B-Zellen. B-Zellen bilden Antikörper, die z. B. extrazelluläre Erreger neutralisieren können. T-Zellen sind für die zelluläre Abwehr zuständig.

T-Zellen entwickeln sich im Thymus. Danach wandern sie als naive T-Zellen durch Blutbahn, Lymphbahn und sekundäre lymphatische Organe, wie Lymphknoten und Milz, auf der Suche nach ihrem passenden Antigen.

1.2.1 Abwehr bei Viruserkrankungen

Das Immunsystem ist wichtig für die Abwehr gegen Krankheitserreger wie Viren. Zur optimalen Bekämpfung erfordert es ein Zusammenspiel von angeborenem und erworbenem Immunsystem. Wie können Erreger wie Viren vom Immunsystem erkannt werden? Zellen des angeborenen Immunsystems können Antigene anhand ihrer Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) mit ihren

Mustererkennungsrezeptoren, wie den Toll-like-Rezeptoren, erkennen. Andere zytoplasmatische Rezeptoren erkennen auch Virusinfektionen. Um diese Antigene zu erkennen, benötigen die T-Zellen des erworbenen Immunsystems die Hilfe des angeborenen Immunsystems, welches die Antigene aufnimmt, aufbereitet und auf sogenannten Major Histocompatibility Complex Molekülen (MHC) als Peptide präsentiert. Der T-Zellrezeptor auf der T-Zelloberfläche interagiert hier mit dem MHC:Peptid-Komplex. Weitere Rezeptoren auf den T-Zellen sind CD4 und CD8. CD8⁺ T-Zellen können virusinfizierte Zellen direkt töten. CD4⁺ T-Zellen sind Helferzellen, die andere Effektorzellen des Immunsystems aktivieren (41).

Man unterscheidet zwischen MHC-1- und MHC-2-Molekülen, die von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden und auch unterschiedliche Arten von T-Zellen aktivieren. MHC-1-Moleküle werden von fast allen Körperzellen exprimiert. Wenn Viren kernhaltige Zellen infizieren und sich darin vermehren, kann die infizierte Zelle Virusbestandteile prozessieren und über MHC-1 den CD8⁺ T-Zellen präsentieren (41).

Über MHC-2 können nur antigenpräsentierende Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen) ihre Antigene präsentieren. Zu diesen gehören die dendritischen Zellen, welche über Makropinozytose Viruspartikel aus der Extrazellulärflüssigkeit aufnehmen können. Diese werden dann intern prozessiert und auf MHC-2-Molekülen den CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Gleichzeitig können dendritische Zellen von einigen Viren auch selbst infiziert werden und diese somit über MHC-1 den CD8⁺ T-Zellen präsentieren. Über Kreuzpräsentation können antigenpräsentierende Zellen abgestorbene virusinfizierte Zellen aufnehmen und über MHC-1 den CD8⁺ T-Zellen präsentieren, um diese zu aktivieren (41).

Wenn sie ein Antigen erkennen, wandern die dendritischen Zellen in das sekundärlymphatische Gewebe, um diese den T-Zellen zu präsentieren. Um die T-Zelle daraufhin zu aktivieren, benötigt es neben der Interaktion zwischen MHC:Peptid und T-Zellrezeptor zusätzlich kostimulatorische Rezeptoren. CD28 ist ein kostimulatorischer Rezeptor auf der T-Zelle, der an die kostimulatorischen Liganden B7.1 und B7.2 auf den antigenpräsentierenden Zellen bindet. Die Aktivierung der T-Zellen führt zur Differenzierung und Proliferation (41).

Die Aktivierung der T-Zelle führt zur Produktion von IL-2 und dem dazugehörigen Rezeptor CD25 (Alpha Kette des IL-2 Rezeptors), der für eine höhere Affinität des IL-2 Rezeptors sorgt. IL-2 ist entscheidend für die Expansion und Differenzierung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen (42). CD25 kann auch proteolytisch vom IL-2 Rezeptor an der Zellmembran abgespalten werden und somit als lösliches CD25 im Plasma detektiert werden (43). Naive regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) und stimulierte CD4⁺ T-Zellen können selbst ihr membranständiges CD25 abspalten (44).

Es folgt die Differenzierung in eine Effektorzelle. CD8⁺ T-Zellen differenzieren sich in zytotoxische T-Zellen, die viral befallene Zellen über Apoptose (programmierter Zelltod) abtöten (41).

CD4⁺ T-Zellen können sich in T-Helferzellen (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}), folliculäre T-Helferzellen (T_{FH}) und regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) differenzieren. T_{H1}-Zellen produzieren Interferon-gamma (IFN-γ) und aktivieren so beispielsweise Makrophagen, um intrazelluläre Erreger wie Viren abzutöten. T_{FH}-Zellen helfen B-Zellen im Antikörperswitch auf hochaffine IgG-Antikörper zu wechseln, die Viruspartikel im Blut abfangen können (41).

Die Kommunikation zwischen Immunzellen erfolgt mithilfe von Zytokinen. Man unterscheidet pro- und anti-inflammatorische Zytokine. Zytokine können sowohl von Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems produziert werden (41).

IL-6 gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und ist ein zentrales Zytokin im Cytokine Release Syndrome (CRS). IL-6 wird von unterschiedlichen Zelltypen, wie Endothelzellen, Makrophagen, Monozyten und Immunzellen wie T-Zellen, produziert. IL-6 induziert die Produktion von weiteren Akut-Phase-Proteinen wie CRP, systemisch kann es Fieber auslösen. Auf Zellebene führt IL-6 zur Produktion von Thrombozyten und Antikörpern, nimmt Einfluss auf Wachstum und Differenzierung von T-Zellen und beeinflusst die Gefäßpermeabilität durch Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (41,45).

IL-6 verschiebt die T_H17 -/ T_{Reg} -Balance zugunsten der T_H17 -Zellen. T_H17 -Zellen sind an diversen Autoimmunerkrankungen beteiligt, während T_{Reg} -Zellen eher eine überschießende Immunreaktion eindämmen (46). Des Weiteren kommt es zu einer vermehrten Differenzierung zu $CD8^+$ - und T_{FH} -Zellen (45).

IL-6 kann als pro-inflammatorisches Zytokin bei zu hohen Spiegeln zu Autoimmunerkrankungen führen. Der Antikörper gegen den Rezeptor von IL-6 Tocilizumab wurde für Autoimmunerkrankungen bereits erfolgreich eingesetzt (47).

IFN- γ ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches unter anderem von T-Zellen und NK-Zellen produziert wird. T_H1 -Zellen nutzen IFN- γ , um Makrophagen zu aktivieren, diese können dann aufgenommene Erreger besser bekämpfen (41).

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und wird von Makrophagen, Monozyten und T-Zellen produziert. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Infektabwehr und Autoimmunerkrankungen (48). TNF- α wurde als eines der zentralen Zytokine im Zytokinsturm beschrieben (49). TNF-Rezeptoren auf T-Zellen werden bei der Aktivierung der T-Zellen hochreguliert. TNF-Liganden können auch auf T-Zellen exprimiert werden für die Kommunikation zwischen T-Zellen. Auch NK-Zellen und T_{Reg} -Zellen können TNF-Rezeptoren ausbilden (50). TNF-Rezeptor-Ligand Interaktion wirken sich als kostimulatorisches Signal auf das Überleben, Zellwachstum und die Zytokinproduktion von unter anderem IFN- γ der Effektor T-Zellen aus. Es kann sich auch positiv auf andere Immunzellen, wie B-Zellen und NK-Zellen, auswirken (50). TNF kann in frühen Phasen der T-Zell-Aktivierung die Proliferation und Zytokinproduktion der T-Zellen erhöhen. TNF kann auch suppressiv auf die Differenzierung von T_{Reg} -Zellen wirken (51). Kommt es allerdings zu anhaltender TNF-Stimulation, kann es tatsächlich zu Apoptose der Effektor-T-Zellen kommen (51).

TNF- α -Inhibitoren werden bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Es existieren diverse Antikörper gegen TNF- α (Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Certolizumab, Vedolizumab, Etarnecept) (49).

1.3 T-Zell-Metabolismus

T-Zellen besitzen eine gewisse metabolische Flexibilität und bedienen sich je nach Aktivitätszustand verschiedener Substrate und Kreisläufe. Naive T-Zellen haben einen geringen metabolischen Bedarf, sie nutzen vorwiegend oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung (52).

Sobald eine T-Zelle auf ihr passendes Antigen trifft und aktiviert wird, kommt es zu einer metabolischen Reprogrammierung, die für ihre klonale Expansion und den damit einhergehenden erhöhten Bedarf an anabolischen Bausteinen wichtig ist (52,53).

1.3.1 Glukosestoffwechsel der T-Zelle

Durch die Aktivierung der T-Zelle kommt es über den kostimulatorischen Rezeptor CD28 zu einer erhöhten Glukoseaufnahme, Glukosetransporterexpression und Glykolyse. Glukose wird über den GLUT1-Transporter in die Zelle aufgenommen. Die Glukose kann über die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut werden und in den Mitochondrien über Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) in den Citratzyklus eingeschleust werden. In den Mitochondrien kann nun durch oxidative Phosphorylierung Adenosintriphosphat (ATP) hergestellt werden (54). Werden T-Zellen aktiviert, kommt es vermehrt zu einer aeroben Glykolyse, der Pentose-Phosphat-Weg wird aktiviert und Pyruvat wird vermindert in den Citratzyklus eingeschleust (53). Bei der aeroben Glykolyse, auch Warburg-Effekt genannt, wird der Großteil der Glukose jedoch nicht zu dem wesentlich ertragreicheren Pyruvat umgewandelt, sondern als Laktat von der Zelle sezerniert (55). Dennoch sind T-Zellen metabolisch flexibel und aerobe Glykolyse scheint nicht essentiell für ihre Aktivierung und für ihr Überleben zu sein, aber essentiell für ihre Proliferation (53,56).

1.3.2 Fettsäurenstoffwechsel der T-Zelle

Fettsäuren stellen eine mögliche Energiequelle für T-Zellen dar. Freie Fettsäuren werden über Transporter auf der Zellmembran aufgenommen und über die Fettsäureoxidation (FAO) in den Mitochondrien zur Energieproduktion verwendet (54). Die Abhängigkeit von der FAO hängt unter anderem auch vom jeweiligen Zelltyp ab. Allgemein bekannt nutzen T-Effektorzellen eher aerobe Glykolyse (57). Eine

Inhibierung der FAO bei aktivierten T-Zellen zeigte keine Auswirkungen auf die Proliferation (53). In einem Review von *Byersdorfer* et al. wird diskutiert, ob eine kontinuierliche oder verstärkte T-Zell-Stimulation zu einem metabolischen Switch von Glykolyse zu FAO führen kann (58). Eine erhöhte und prolongierte Antigenstimulation bei Effektor-T-Zellen führte zu einer deutlich erhöhten Aufnahme von Fettsäuren und FAO (59). *Byersdorfer* diskutierte, ob die jeweilige Umgebung der T-Zelle den metabolischen Phänotyp der Zelle prägt (59).

CD8⁺-Gedächtnis-T-Zellen haben, ähnlich wie die naiven T-Zellen, keinen anabolischen Stoffwechsel, da sie kaum proliferieren (52). Sie nutzen vorwiegend Fettsäureoxidation zur oxidativen Phosphorylierung (60). Ebenso ist auch in regulatorischen T-Zellen eine erhöhte Fettsäureoxidation zur Energiegewinnung beschrieben (61).

1.3.3 Mitochondrialer Stoffwechsel der T-Zelle

Glukose wird über Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen. Durch die Glykolyse entsteht aus der Glukose unter aeroben Bedingungen Pyruvat. Diese wird in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA oxidiert. Acetyl-CoA wird im Citratzyklus oxidiert, es entsteht neben ATP auch Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂). Die Elektronen von NADH und FADH₂ werden während der oxidativen Phosphorylierung auf Sauerstoff übertragen. Sauerstoff wird zu H₂O reduziert, die entstehende Energie wird für den Aufbau eines Protonengradienten verwendet, letztlich entsteht auf diese Weise durch die ATP-Synthase ATP. Hierbei können reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) entstehen. Als ROS werden Superoxid-Anion (O₂⁻), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Hydroxylradikale (OH[•]) bezeichnet (62). Im Rahmen der Atmungskette kann durch Elektronenreduktion ROS in Form von Superoxid entstehen. ROS kann oxidativen Stress auslösen (62).

Oxidativer Stress ist definiert durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und den anti-oxidativen Verteidigungsmechanismen (intrazelluläre Enzyme, Vitamine, extrazelluläre Bindungspartner). ROS sind freie, höchst reaktive Radikale, die z. B. mit Lipiden, Proteinen und DNA reagieren. Lipidperoxidation, DNA-Oxidation und Proteinoxidation sind die Folge. Intrazelluläre Enzyme, wie Superoxiddismutasen,

Catalasen und Glutathionperoxidasen, wirken als antioxidative Mechanismen (63). Superoxide aus der Atmungskette können durch Superoxiddismutasen (SODs) in H_2O_2 umgewandelt werden und über Peroxidasen und Katalasen in H_2O umgewandelt werden. Glutathionperoxidasen werden durch H_2O_2 oxidiert und benötigen Glutathion als Reduktion (64,65).

Glutathion gehört zu den antioxidativen Enzymen. Ein wichtiger Baustein zur Herstellung von Glutathion ist Cystein. Cystein liegt extrazellulär als oxidierte Form Cystin vor und wird intrazellulär in Cystein reduziert (66). Naive T-Zellen besitzen keinen xCT-Transporter für die Cystinaufnahme (67). Eine Aktivierung der T-Zellen führt zur Expression des xCT-Transporters, der Cystin in die Zelle aufnimmt (68). Hier wird Cystin in Cystein umgewandelt für die Glutathionsynthese. Glutathion selbst ist somit ein wichtiger Speicher von Cystein und wirkt antioxidativ auf die intrazelluläre ROS-Produktion (66). Vitamin E und C wirken ebenfalls antioxidativ in den Zellmembranen. Extrazellulär wirken Bindungspartner wie Transferrin, Lactoferrin und Caeruloplasmin antioxidativ (63).

ROS kann also einerseits oxidativen Stress auslösen und Zellen irreversibel schädigen. Andererseits aber ist ROS wichtig für die intrazelluläre Signalgebung, auch bei Immunzellen. T-Zellen benötigen mitochondriales ROS zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung (69,70). ROS ist beispielsweise wichtig für die Proliferation von Krebszellen. Es scheint also eine gewisse Balance wichtig zu sein. Zuviel ROS kann die Zellen abtöten. Zu wenig ROS kann die intrazelluläre Signalgebung behindern (62).

In COVID-19-Infektionen wird eine mitochondriale Dysfunktion mit verstärkter mitochondrialer ROS-Produktion als Ursache für den oxidativen Stress diskutiert (71). Es kommt über eine gesteigerte mitochondriale Permeabilität zu einer gesteigerten Ausschüttung von ROS (72). COVID-19-Patienten in Nigeria zeigten einen Mangel an antioxidativen Vitaminen (Vitamin E, C), Spurenelementen und antioxidativen Enzymen (Glutathion, Superoxiddismutase, Catalase). Die Autoren gehen von einem erhöhten Verbrauch der antioxidativen Substanzen bei erhöhtem oxidativem Stress durch ROS aus (73). Ein Mangel an Glutathion konnte in höherem Alter (über 65 Jahre) und bei chronischen Vorerkrankungen, wie DM-Typ 2 und Adipositas, festgestellt

werden. All dies sind auch Risikofaktoren für einen schweren Verlauf einer COVID-19-Infektion (74). Das Review von *Perla-Kaján* et al. fasste mehrere Studien zusammen, die eine verringerte Glutathion-Konzentration in COVID-19-Patienten mit Korrelation zu einer erhöhten Morbidität aufzeigen (75). Es konnten starke Schwankungen der Cystein-Spiegel in unterschiedlichen Studien festgestellt werden. Cystin zeigte sich im Plasma jedoch erhöht (75).

2 Zielsetzung

Im Dezember 2019 begann die COVID-19-Pandemie, hervorgerufen durch SARS-CoV-2 mit hoher Infektiosität und Mortalität. Metabolische Vorerkrankungen, wie Diabetes oder Adipositas, sind Risikofaktoren für einen schweren Verlauf. T-Zellen können möglicherweise auch infiziert werden, eine mögliche Eintrittspforte ist das multifunktionale Transmembranglykoprotein CD147, welches auch zentrale Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Zelle hat. Der Metabolismus des Patienten scheint also auch auf T-Zell-Ebene eine wichtige Rolle zu spielen. Des Weiteren wird vermehrter oxidativer Stress beschrieben. Im Rahmen der als Komplikation auftretenden Hypoxie profitieren viele Patienten von der Behandlung mit Dexamethason.

Den Ausgangspunkt für diese Arbeit bildete die Hypothese, dass eine Infektion mit SARS-CoV-2 die Frequenz, Funktion und den Metabolismus der T-Zellen beeinflusst.

Die Hauptziele dieser Arbeit sind daher die nachfolgend genannten Untersuchungen:

1. Durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps (CD3, CD4, CD8), der Aktivierung (CD25), des Metabolismus (Glukoseaufnahme, Fettsäureaufnahme), der CD147-Expression, ROS-Produktion und Cystin-Aufnahme der T-Zellen von Frischblutproben von 47 SARS-CoV-2 positiv getesteten Patienten und 16 gesunden Spendern.
2. Genauere Untersuchung des Metabolismus und der Zytokinproduktion unter Stimulation der T-Zellen von gesunden Spendern und SARS-CoV-2 positiv getesteten Patienten in einer *in-vitro* Kultur.
3. Auswirkungen von Dexamethason auf den T-Zell-Metabolismus und die Zytokinproduktion in einer *in-vitro* Kultur.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 1. Geräte und Ausstattung.

Verwendete Geräte	Hersteller, Ort
AMG Mikroskop EVOS XL	Thermon Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
BD FACS Celesta Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CASY Cell Counter	OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryo 1°C Freezing Container	NALGENE®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eppendorf Easypet 3 electronic pipettor	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubator HERAcell 150	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kühlschrank +5 °C	Bosch, Gerlingen, Deutschland
MACSiMAG™ Separator	Mytenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

Multipipette plus pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stickstofftank Saturn 3000	Tec-lab GmbH, Deutschland
Tiefkühlschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Ultratiefkühlgerät CryoCube F740hi	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
VARIOSKAN FLASH	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Vortex	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage LP1200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Tabelle 2. Verbrauchsmaterialien.

Verwendetes Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	FALCON®, Corning, Corning, NY, USA
5 ml Polystyrene Round Bottom Tube with cell-strainer cap	FALCON®, Corning, Corning, NY, USA

CELLSTAR® TUBES (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cryogenic Vial 2 ml	Corning, Corning, NY, USA
Dispenserspitzen für Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Costar®, Corning, Corning, NY, USA
ELISA-Plates (96 Wells), high binding, flat bottom	Costar®, Corning, Corning, NY, USA
PARAFILM®	Bemis Company, Neenah, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stericup 0,22 µm	Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland
Tissue culture plate, 96 well, U-bottom with low evaporation lid	FALCON®, Corning, Corning, NY, USA
Transfer-Pipette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 3. Humane Blutprodukte.

Verwendete Blutprodukte	Hersteller, Ort
Thrombozytenkegel	Transfusionsmedizin, Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Regensburg
Vollblutspenden COVID-19-Patienten	Patienten der Universitätsklinik Regensburg

Tabelle 4. Reagenzien.

Verwendete Reagenzien	Hersteller, Ort
2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3.diazol-4-yl) amino)-2deoxy-D-glucose (2-NBDG)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
AB-Serum, human (hitzeinaktiviert (56 °C, 30 min), steril filtriert in 0,22 µm)	Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, gemeinnützige GmbH
BODIPY™ 500/510 C1, C12 (4,4-Difluoro-5-Methyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Dodecanoic Acid)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

CASYton Isotonischer Puffer	OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
CASYclean	OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
CystineFITC	AG Siska (68)
DCGDA (D3883) 10 µm	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Dexamethason 4 mg	Jenapharm, mibe GmbH, Brehna, Deutschland
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dymethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Fetal calf serum (FCS) (hitzeinaktiviert (56 °C, 30 min), steril filtriert 0,22 µm)	Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland
Ficoll Zellseperationslösung	Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA
Fixable Viability Dye eFluor 506	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hanks' Balanced Salt Solution	Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA

L-ascorbic acid	Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA
L-Glutamine	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Nonessential amino acids	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
MEM vitamin solution	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pancoll human	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Sodium pyruvate	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β- Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid-Lösung 30 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland

Tabelle 5. Kits.

Kits	Hersteller, Ort
DuoSet ELISA IL-6, TNF- α , IFN- γ	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Dynabeads® Human T-Aktivator ® CD3/CD28	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 6. FACS Waschpuffer.

Substanz	Menge
PBS	500 ml
FCS	2 %

Tabelle 7. MACS-Puffer.

Substanz	Menge
PBS	500 ml
FCS	5 ml 1 %
EDTA	2 ml (0,5 M) 2 mM

Tabelle 8. T-Zell-Kulturmedium.

Substanz	Menge
RPMI 1640	500 ml
L-Glutamine	2 mM
Humanes AB-Serum	10 %
Penicillin/Streptomycin (50U/ml)	0,5 %
MEM nonessential amino acid solution 100x	1 %
β- Mercaptoethanol	0,1 %
MEM Sodium pyruvate	1 %
MEM vitamins	0,4 %

Tabelle 9. T-Zell-Einfriermedium.

Substanz	Menge
Humanes AB-Serum	80 %
DMSO	20 %

Tabelle 10. ACK-Lyse-Puffer.

Substanz	Menge (6-fach)
NH ₄ Cl	0,155 M
KHCO ₃	0,1 M
EDTA	0,1 mM

Tabelle 11. Humane Antikörper für FACS.

Antikörper	Konjugat	Isotyp	Klon	Volumen	Firma, Ort
CD3	Per-CP-Cy5.5	IgG2, α,κ	OKT3	2,5 µl/Test	eBioScience/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD25	PE-Cy7	IgG1, κ	M-A251	2,5 µl/Test	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
CD8	APC-H7	IgG1, κ	SK1	2 µl/Test	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
CD4	V450	IgG1, κ	RPA-T4	2,5 µl/Test	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
CD4	Per-CP	IgG1, κ	SK3	2,5 µl/Test	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD8	PE-CY7	IgG1, κ	SK1	3 µl/Test	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD3	APC-CY7	IgG1, κ	SK7	2,5 µl/Test	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
CD25	V450	IgG1, κ	M-A251	2,5 µl/Test	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
CD147	APC	IgG1, κ	8D12	2,5 µl/Test	eBioscience/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD3	BV510	IgG1, κ	SK7	2,5 µl/Test	Biolegend, San Diego, CA, USA

Tabelle 12. Software.

Verwendete Software	Hersteller, Ort
FlowJo	TREE STAR Data Analysis Software, USA
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Microsoft Office 2024 (Excel, Powerpoint, Word)	Microsoft Coroperation, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Studienteilnehmer

An der Studie nahmen zum Zeitpunkt der hier vorliegenden Datenerhebung 63 Probanden teil, davon 47 positiv getestete SARS-CoV-2-Patienten und 16 gesunde Kontrollen. Eine SARS-CoV-2-Infektion wurde durch nasopharyngeale oder respiratorische Proben mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) detektiert. Die Studie wurde von dem ethischen Komitee der Universitätsklinik Regensburg genehmigt (Nr. 20-1785-101) und entspricht den Prinzipien der Deklaration aus Helsinki. Asymptomatische, gesunde Individuen werden hier als „Control“ (Ctrl.) bezeichnet. Die Krankheitsschwere wurde wie bereits zuvor beschrieben eingeteilt (76). COVID-19-Patienten mit keinen/milden Symptomen ohne pulmonale Infiltrate wurden als „No symptoms/Mild“ gekennzeichnet. COVID-19-Patienten die als „Moderate“ bezeichnet wurden, zeigten respiratorische Symptome wie Husten, Kurzatmigkeit und pulmonale Infiltrate. Schwere Fälle (hier als „Severe/Critical“ bezeichnet) zeigten eine Tachypnoe ($>30/\text{min}$), Blutsauerstoffsättigung $<93\%$, einen Progress der pulmonalen Infiltrate innerhalb von 24 Stunden, eine respiratorische Insuffizienz oder Bedarf einer mechanischen

Ventilation. Untersucht wurden 15 Patienten mit einem milden/asymptomatischen Verlauf („No symptoms/Mild“), 5 Patienten mit einem Moderaten Verlauf („Moderate“) und 27 Patienten mit schweren Symptomen („Severe/Critical“).

Daten über die Klinik, das Labor, die Behandlung und den Behandlungserfolg der Patienten wurden aus elektronischen medizinischen Datenbanken nach Standardmethoden und unter Einhaltung der Schweigepflicht extrahiert. Routinemäßige Laboruntersuchungen enthielten ein Differentialblutbild und biochemische Tests (77).

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zentrifugation von Zellen

Sofern nicht anders beschrieben, erfolgte die Zentrifugation mit 1500 rpm bei Raumtemperatur für eine Dauer von 5 Minuten.

3.2.2.2 Erythrozytenlyse von frischen humanen Vollblutproben

Es wurde das Frischblut der an COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen bearbeitet. Die Blutröhrchen wurden gut geschwenkt und auf mehrere 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Es wurden dann 20 ml 1-fache ACK-Lösung zur Lyse der Erythrozyten dazugegeben, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dabei wiederholt gevortext. Anschließend wurden die Proben mit 30 ml phosphate buffered saline (PBS) aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Bei einer zweiten Lyse wurden weitere 10 ml ACK-Lösung pro Probe dazugegeben, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wiederholt gevortext. Die ACK-Lyse wurde wieder abgestoppt mittels 20 ml PBS, die Proben wurden zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in maximal 5 ml fluorescence-activated cell sorting (FACS) Waschpuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mithilfe eines „CASY Cell Counter“ gezählt. Sie wurden auf die verschiedenen Antikörperpanels aufgeteilt, sodass pro Panel nicht mehr als 1 Million Zellen verwendet wurden. Die Zellen wurden für die weitere Oberflächenfärbung noch einmal mit FACS Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Panels gefärbt wie unten beschrieben (s. Tabelle 13). Die Zellen wurden im Durchflusszytometer gemessen.

3.2.2.3 Dichtegradientenzentrifugation

Einige der Vollblutproben der COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen wurden ebenfalls für eine Kultivierung verwendet. Dazu wurden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert und anschließend eingefroren (s. 3.2.2.4). Das Blut aus Lithium-Heparin-Röhrchen wurde unter der Sterilbank in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Darauf wurde das Blut-PBS-Gemisch langsam auf 5 ml Lymphozytenseparationslösung in einem weiteren 15 ml Zentrifugenröhrchen getropft, damit sich zwei Schichten bilden konnten. Dieses Röhrchen wurde anschließend ohne Bremse bei 2200 rpm für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es bildete sich eine schwere Fraktion (Erythrozyten), eine Interphase (mononukleäre Zellen) und der Überstand. Danach wurde die Interphase mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt. Dieses wurde mit PBS auf 14 ml aufgefüllt und anschließend einmal zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 1 ml ACK (1-fach) behandelt. Dies wurde nach einer Minute mit 10 ml RPMI abgestoppt. Nach weiterem Zentrifugieren wurden die Zellen in 1 ml T-Zellmedium aufgenommen. Die Zellen wurden mit dem „CASY Cell Counter“ gezählt und anschließend eingefroren.

3.2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

PBMCs von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen wurden eingefroren. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in 1 ml T-Zellmedium aufgenommen. Dieses wurde vorsichtig und langsam mit 1 ml Einfriermedium (80 % humanes AB-Serum, 20 % DMSO) gemischt und in ein Kryoröhrchen gefüllt. Anschließend wurde das Einfrier Röhrchen zu einem stufenweisen Einfrieren (1 °C/min) in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß einige Tage bei -80 °C gelagert und dann in den Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen zuerst auf Eis gelagert, anschließend unter kaltem, fließendem Wasser langsam aufgetaut. Dann wurden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, mehrmals mit vorgewärmten T-Zellmedium gespült und in 10 ml vorgewärmten T-Zellmedium überführt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und 10 ml T-Zellmedium hinzugefügt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und die Zellen anschließend in 5 ml T-Zellmedium resuspendiert und mit „CASY Cell Counter“ gezählt.

3.2.2.5 Bestimmung von Zellzahl, Zelldurchmesser, Zellvitalität

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde der „CASY Cell Counter“ benutzt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension in 10 ml Casy-ton-Lösung gegeben und im Programm 19 (humanes Immunzellprogramm) gemessen. Das Gerät bestimmte neben der Zellzahl auch die Zellvitalität, den Zelldurchmesser, das Zellvolumen und den Anteil der T-Zellen.

3.2.2.6 Kultivierung von Zellen

Die Proben wurden aus dem Stickstofftank entnommen, aufgetaut und mit „CASY Cell Counter“ gezählt. Je nach Zellzahl konnten unterschiedlich viele Bedingungen (unstimuliert; stimuliert; stimuliert und Dexamethason, H₂O₂ oder Vitamin C) realisiert werden.

Die Zellen wurden in einer 96-Well-Round-Bottom-Platte ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die leeren Wells wurden mit PBS aufgefüllt, um ein Austrocknen der äußeren Wells zu verhindern.

3.2.2.7 Polyklonale Stimulation von T-Zellen

Die PBMCs wurden mit Dynabeads (Invitrogen), die Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD3 und CD28 gebunden haben, stimuliert. Die Zugabe der Stimulationsbeads erfolgte auf T-Zellzahl normiert, die vorher im „CASY Cell Counter“ bestimmt wurde. Der Anteil der T-Zellen innerhalb der PBMCs betrug durchschnittlich 61,7 % (Minimum bei 32 % und Maximum bei 87 %), wobei nie weniger als 50 % T-Zellen zur Berechnung der Stimulationsbeads verwendet wurden. Zuerst wurden die Dynabeads mit MACS-Puffer gewaschen und anschließend im Verhältnis ein

Stimulationsbead pro T-Zelle in das T-Zellmedium zugegeben. Bei der Ernte der Zellen wurden die Stimulationsbeads mit einem Handmagneten entfernt.

3.2.2.8 Behandlung der PBMCs

Die PBMCs der Covid-19-Patienten und gesunden Spender wurden stimuliert und zusätzlich mit 100 nM und 500 nM Dexamethason (Stammlösung 10 mM, gelöst in T-Zellmedium) behandelt. Die gesunden Spender wurden zusätzlich mit 0,1 mM, 0,5 mM H₂O₂ (30 %, Stammlösung 9800 mM) und 0,5 mM Vitamin C (Stammlösung 100 mM, gelöst in T-Zellmedium) behandelt.

Für die Behandlung mit Dexamethason (Stammlösung 10 mM) wurde zuerst 1:1000 mit T-Zellmedium vorverdünnt (10 µM Endkonzentration). Anschließend wurde von der vorverdünnten Dexamethason-Stammlösung jeweils 2 µl pro Well (100 nM Endkonzentration) und 10 µl pro Well (500 nM Endkonzentration) in die Wells mit einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Well hinzugefügt.

Für die Behandlung mit Vitamin C wurde L-ascorbic acid in Pulverform abgewogen und mit T-Zellmedium auf eine Konzentration von 100 mM vorverdünnt und anschließend 1:200 in T-Zellmedium verdünnt für eine Endkonzentration von 0,5 mM Vitamin C pro Well.

Für die Behandlung mit H₂O₂ wurde die H₂O₂-Stammlösung (30 %, 9800 mM) 1:100 mit RPMI vorverdünnt (98 mM). Anschließend wurde von der vorverdünnten H₂O₂-Stammlösung jeweils 1 µl pro Well (0,5 mM Endkonzentration) und 0,2 µl pro Well (0,1 mM Endkonzentration) in die Wells mit einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Well hinzugefügt.

3.2.2.9 Ernte der Zellen

Die kultivierten Zellen wurden jeweils an Tag 2 bzw. 3 und Tag 5 bzw. 6 oder 7 geerntet. Dazu wurden die Zellen aus den Wells entnommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Stimulationsbeads wurden mit einem Handmagneten entfernt, um eine mögliche Störung am „CASY Cell Counter“ oder auch am FACS Celesta zu umgehen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand wurde in 1,5 ml

Mikroreaktionsgefäße für eine spätere Zytokinbestimmung abgefüllt und bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend in T-Zellmedium resuspendiert und im „CASY Cell Counter“ gezählt.

3.2.2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Detektion von zellgebundenen Farbstoffen und liefert phänotypische Aussagen über die gefärbten Zellen. Zellgebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper werden in der Durchflusszytometrie detektiert und bestimmen so den Phänotyp einer Zelle. Dabei passieren die Zellen durch einen Flüssigkeitsstrom einen fokussierten Laserstrahl. Die Lichtstreuung durch die einzelnen Zellen wird hierbei detektiert und ermöglicht Rückschlüsse auf die Größe (Vorwärts-Streulicht) und die Granularität (Seitwärts-Streulicht) einer Zelle. Das Durchflusszytometer FACS Celesta besitzt 3 Laser, es ist möglich, bis zu 14 Parameter zu messen. Es wurden die Farbstoffkonjugate Fluorothioisocyanat (FITC), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), Allophycocyanin (APC), PE-Cy7, APC-H7/APC-Cy, V450/BV421 und BV510 verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software.

3.2.2.11 Vitalfärbung

In den frühen Versuchen wurde keine Vitalfärbung durchgeführt, es folgte nach zweimaligem Waschen mit FACS-Waschpuffer die Oberflächenfärbung wie in Tabelle 14 aufgeführt. In den späteren Versuchen wurden die Zellen vor der Oberflächenfärbung zusätzlich mit einer Vitalfärbung (Live/Dead) behandelt (s. Tabelle 15). Hierzu wurden die Zellen zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Jede Probe wurde mit einer Mischung, bestehend aus 0,5 ml PBS und 0,5 µl Vitalfarbstoff, gefärbt und anschließend für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert und einmal mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Oberflächenfärbung.

3.2.2.12 Antikörperfärbung für die Durchflusszytometrie

Die Zellen aus der T-Zell-Kultur und auch die Zellen der frischen Vollblutproben wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Antigene gefärbt. Die humanen Vollblutproben wurden, wie oben beschrieben, zuerst mit ACK-Lösung lysiert und im „CASY Cell Counter“ gezählt und zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden sie mit den Antikörpern aus Tabelle 13 gefärbt.

Die Zellen aus der T-Zell-Kultur wurden jeweils an Tag 0, an Tag 2 (3) und Tag 5 (6,7) mit Antikörpern gefärbt und anschließend im FACS Celesta gemessen. Nachdem die Zellen mit „CASY Cell Counter“ gezählt wurden, konnten sie auf verschiedene FACS-Röhrchen verteilt werden.

Der Oberflächenfärbung folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen mit 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate (DCFDA), BODIPY 500/510, C1, C2, 2-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) oder Cystine-FITC gefärbt. Nach den Färbungen wurden die Proben in 300 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen und umgehend im FACS Celesta gemessen.

Tabelle 13. Antikörper und Reagenzien für die Behandlung der humanen Vollblutproben nach Erythrozytenlyse.

Panel	FITC	PE	PerCP	APC	PE-CY7	APC-H7/ Cy7	V450/ BV421/ PB	BV510
3	2-NBDG	-	IgA	CD147	CD38	IgG	CD56	CD20
			5 µl	2,5 µl	2 µl	2 µl	2,5 µl	2,5 µl
4	2-NBDG	-	CD11b	CD147	CD25	CD8	CD4	CD3
			0,63 µl	2,5 µl	2,5 µl	2 µl	5 µl	2,5 µl
5	BODIPY 500/510 C1, C2	-	CD11b	CD147	CD25	CD8	CD4	CD3
			0,63 µl	2,5 µl	2,5 µl	2 µl	5 µl	2,5 µl
6	-	-	CD11b	CD147	CD25	CD8	CD4	CD3
			0,63 µl	2,5 µl	2,5 µl	2 µl	5 µl	2,5 µl

Tabelle 14. Antikörper und Reagenzien für die T-Zell Stimulationen der frühen Experimente.

Panel	FITC	PE	PerCP	APC	PE-CY7	APC-H7/ Cy7	V450/ BV421/PB	BV510
4	2-NBDG	-	CD11b	CD147	CD25	CD8	CD4	CD3
			0,63 µl	2,5 µl	2,5 µl	2 µl	5 µl	2,5 µl
5	BODIPY 500/510 C1, C2	-	CD11b	CD147	CD25	CD8	CD4	CD3
			0,63 µl	2,5 µl	2,5 µl	2 µl	5 µl	2,5 µl
12	DCFDA	-	CD3	CD147	CD8	CD98	CD66	CD14
			2,5 µl	2,5 µl	3 µl	5 µl	1 µl	3 µl

Tabelle 15. Antikörper und Reagenzien für die T-Zell Stimulationen der späteren Experimente.

Panel	FITC	PerCP	APC	PE-Cy7	APC-H7/Cy7	V450/ BV421	BV510
2-NBDG	2-NBDG	CD3	-	CD25	CD8	CD4	Live/ Dead
		2,5 µl		2,5 µl	2 µl	2,5 µl	
BODIPY	BODIPY 500/510 C1, C2	CD4	-	CD8	CD3	CD25	Live/ Dead
		2,5 µl		3 µl	2,5 µl	2,5 µl	
ROS	DCFDA	CD4	CD147	CD8	CD3	CD56	Live/ Dead
		2,5 µl	2,5 µl	3 µl	2,5 µl	2,5 µl	
Cystin	Cystine-FITC	-	CD147	CD8	CD3	CD4	Live/ Dead
			2,5 µl	3 µl	2,5 µl	2,5 µl	

3.2.2.13 2-NBDG-, BODIPY 500/510 C1, C12- und Cystine-FITC-Färbung

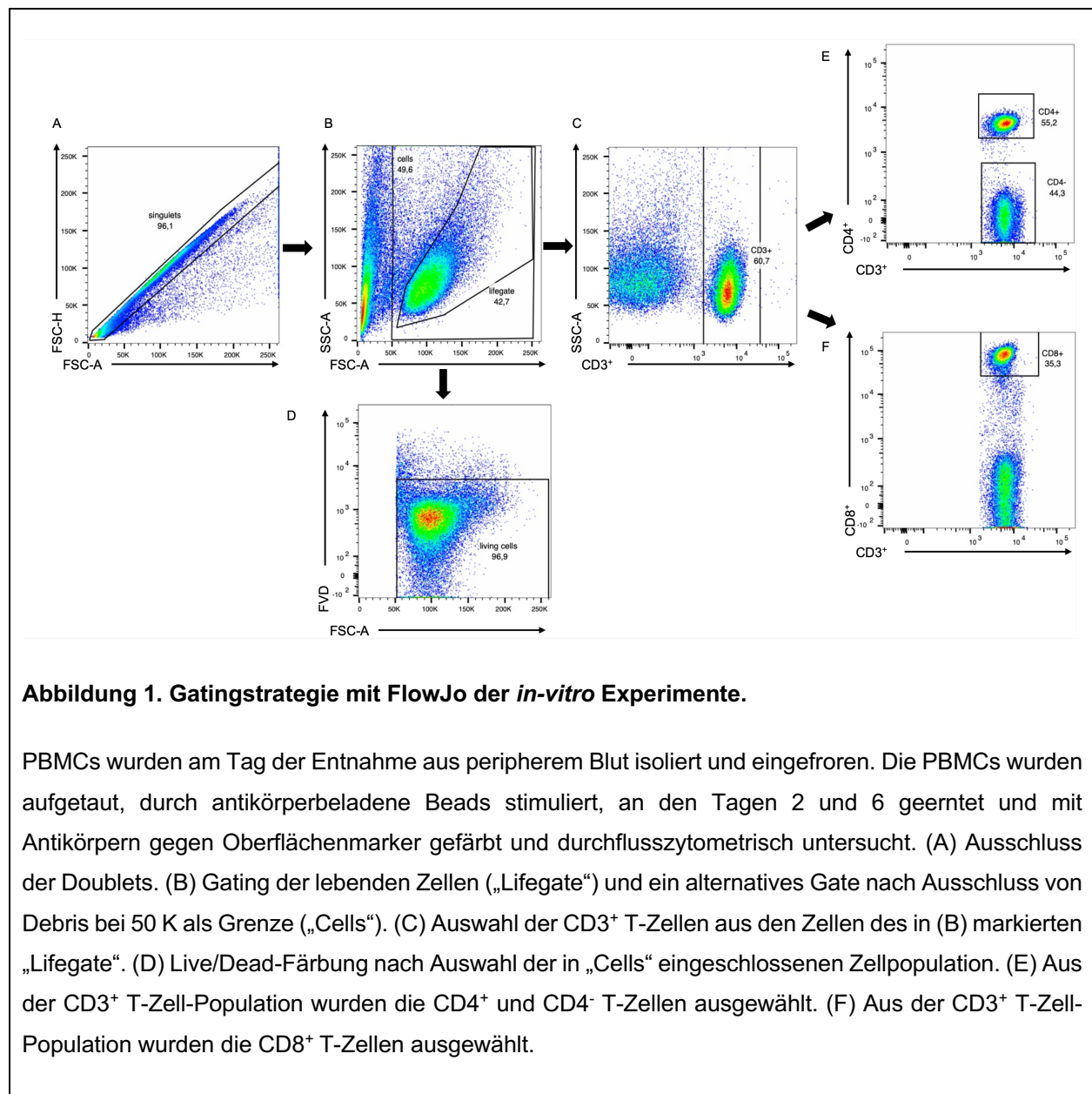
Nach der Oberflächenfärbung wurden die Proben jeweils zweimal mit Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) gewaschen.

8,55 µl 2-NBDG wurde in 5 ml vorgewärmten HBSS gelöst und anschließend 200 µl auf die jeweiligen Proben pipettiert. 1 µl BODIPY 500/510 C1, C12 wurde in 10 ml vorgewärmten HBSS gelöst und anschließend 200 µl auf die zugehörigen Zellen pipettiert. 3,33 µl Cystine-FITC wurde in 10 ml vorgewärmten HBSS gelöst und anschließend 200 µl auf die Proben pipettiert. Die Inkubationszeit bei 37 °C betrug für BODIPY 500/510 C1, C12 und Cystine-FITC 20 Minuten und für 2-NBDG 45 Minuten. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und schließlich in 300 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert, anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

3.2.2.14 DCFDA-Färbung

Nach der Oberflächenfärbung wurden die Proben einmal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und anschließend in je 500 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert. DCFDA wurde 1:50 in RPMI verdünnt und je 12,5 µl davon wurde auf jede Probe pipettiert und anschließend mit Parafilm luftdicht verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37 °C wurden die Proben mit je 3 ml kalten PBS aufgefüllt und einmal zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 300 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert und am FACS Celesta gemessen.

3.2.3 Auswertung der Durchflusszytometrie mit FlowJo



Die von FACS Celesta gewonnenen Daten wurden mittels der FlowJo Software ausgewertet. Bei allen Panels wurden zuerst mögliche Doublets ausgeschlossen (Abb. 1A). Anschließend wurde ein enges Gate („Lifegate“) gesetzt, um tote Zellen und Zelldebris auszuschließen (Abb. 1B). Aus der in „Lifegate“ eingeschlossenen Zellpopulation wurden bei allen Panels die CD3⁺ T-Zellen bestimmt (Abb. 1C). Aus der CD3⁺ T-Zell-Population wurden die CD4⁺, CD4⁻ (Abb. 1E) und CD8⁺ T-Zellen (Abb. 1F) bestimmt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der mean fluorescence intensity

(MFI) von 2-NBDG, BODIPY 500/510 C1, C12, ROS, Cystine-FITC, CD25 und CD147 der CD4⁺, CD4⁻ und CD8⁺ T-Zellen.

In den späteren Experimenten wurde zusätzlich ein Zellvitalitätsfarbstoff („Live/Dead“) gefärbt. Hier wurde zusätzlich separat nach dem Ausschluss der Doublets und des Zelldebris (Gate „Cells“) die Zellvitalität bestimmt (Abb. 1 D).

3.2.4 Einschränkungen in der Auswertung

In den frühen *in-vitro* Experimenten (s. Tabelle 14) konnte CD8 in den Panels 2-NBDG und BODIPY 500/510 C1, C12 aufgrund eines technischen Fehlers mit Störung in der Kompensation nicht richtig dargestellt werden. Hierzu wird in Abbildung 2 ein Vergleich zwischen dem tatsächlich prozentual gemessenen Anteil der CD8⁺ T-Zellen in dem ROS-Panel (Abb. 2B, D, F, H) und dem falsch niedrig gemessenen Anteil der CD8⁺ T-Zellen im 2-NBDG und BODIPY 500/510 C1, C12 Panel (Abb. 2A, C, E, G) dargestellt. Aus diesem Grund wurden die Werte ausgeschlossen.

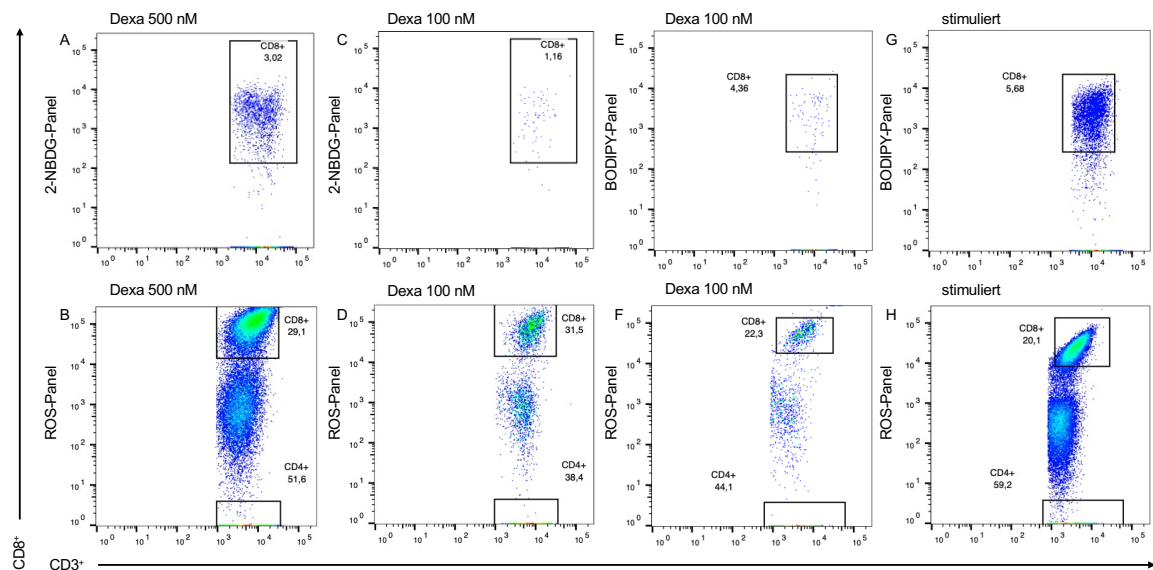


Abbildung 2. Darstellung des technischen Fehlers in der CD8⁺ Darstellung der frühen *in-vitro* Experimente.

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus peripherem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert, an den Tagen 2 und 6 geerntet und mit Antikörpern gegen CD8⁺ gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Der prozentuale Anteil von CD8⁺ gefärbten T-Zellen innerhalb eines Experiments wurde jeweils miteinander verglichen. Unterschiedliche Experimente wurden dargestellt. Panel 2-NBDG (A) und ROS (B) verglichen die Untersuchungsbedingung Dexa 500 nM. Panel 2-NBDG (C) und ROS (D) verglichen die Untersuchungsbedingung Dexa 100 nM. Panel BODIPY 500/510 C1, C12 (E) und ROS (F) verglichen die Untersuchungsbedingung Dexa 100 nM. Panel BODIPY 500/510 C1, C12 (G) und ROS (H) verglichen die Untersuchungsbedingung stimuliert.

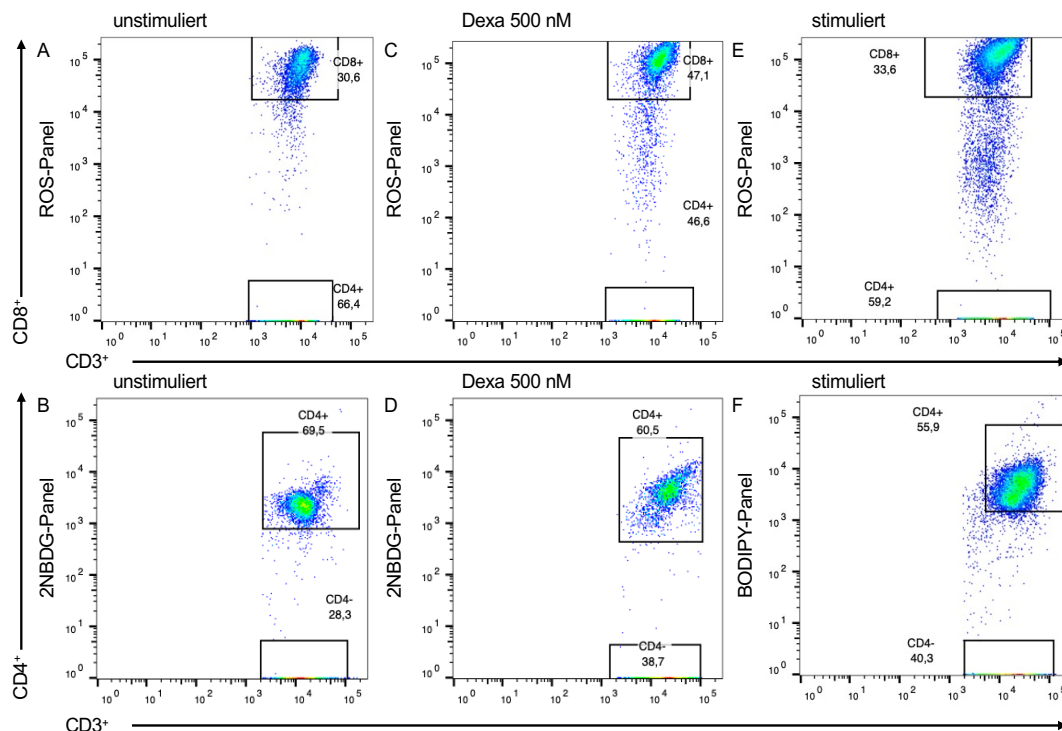


Abbildung 3. Vergleich zwischen dem prozentualen Anteil von CD8⁺ T-Zellen im ROS-Panel und CD4⁺ T-Zellen im 2-NBDG- und BODIPY 500/510 C1, C12- Panel.

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus peripherem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert, an den Tagen 2 und 6 geerntet und mit Antikörpern gegen CD8⁺ und CD4⁺ gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Es erfolgte der Vergleich des prozentualen Anteils von CD8⁺ (in A, C, E als CD4⁺ deklariert) und CD4⁺ gefärbten T-Zellen innerhalb eines Experiments. Panel ROS (A) und 2-NBDG (B) verglichen die Untersuchungsbedingung unstimuliert. Panel ROS (C) und 2-NBDG (D) verglichen die Untersuchungsbedingung Dexa 500 nM. Panel ROS (E) und BODIPY 500/510 C1, C12 (F) verglichen die Untersuchungsbedingung stimuliert.

Im ROS-Panel wurde in den frühen Experimenten (s. Tabelle 14) noch kein Antikörper gegen CD4 für die Oberflächenfärbung verwendet. Daher konnte man in diesem Panel die CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nicht direkt darstellen. Stattdessen wurden hier CD3⁺CD8⁺ T-Zellen bestimmt, um diese mit den CD3⁺CD4⁺ T-Zellen gleichzusetzen. Der prozentuale Anteil der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen im ROS-Panel der frühen Experimente wurde mit dem prozentualen Anteil der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen im 2-NBDG- und BODIPY

500/510 C1, C12-Panel der frühen Experimente miteinander verglichen (Abbildung 3). Da die Frequenz der CD3⁺CD8⁻ T-Zellen im ROS-Panel überwiegend mit der Frequenz von CD3⁺CD4⁺ T-Zellen in den anderen (2-NBDG/ BODIPY 500/510 C1, C12) Panels der frühen Experimente übereinstimmte, wurden die CD3⁺CD8⁻ als CD3⁺CD4⁺ T-Zellen ausgewertet. Es wurde beschlossen, die CD3⁺CD8⁻ T-Zellen aus dem ROS-Panel der frühen Experimente (s. Tabelle 14) zusammen mit den CD3⁺CD4⁺ T-Zellen aus dem ROS-Panel der späteren Experimente (s. Tabelle 15) als gemeinsame CD3⁺CD4⁺ T-Zell-Population darzustellen.

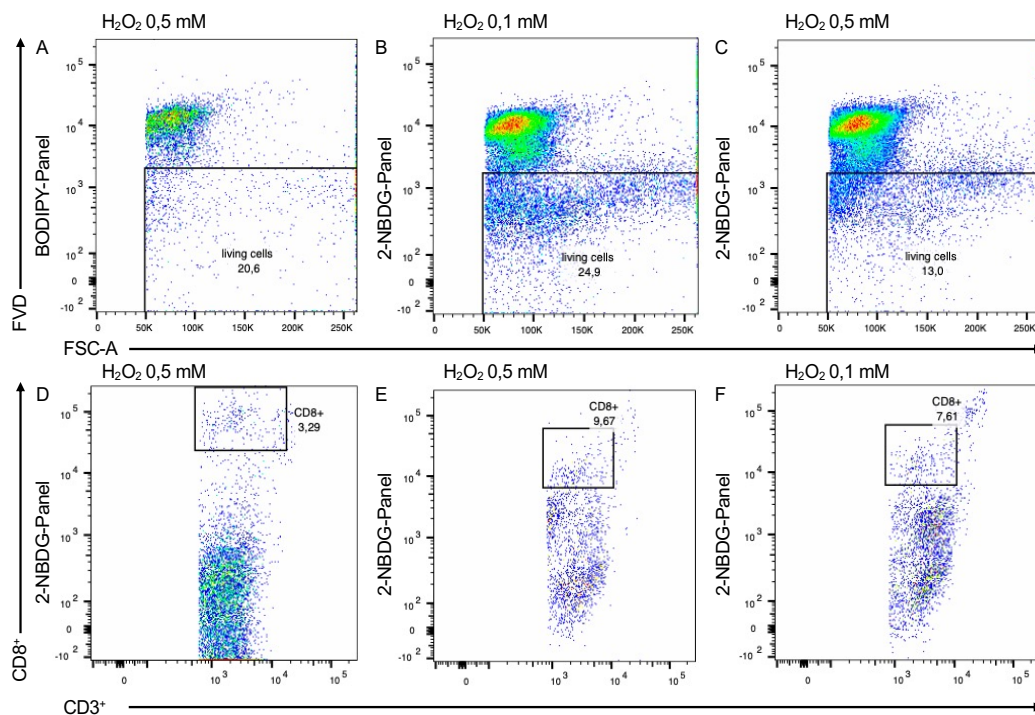


Abbildung 4. Darstellung repräsentativer Auswertungen von *in-vitro* Experimenten bei der Behandlung von T-Zellen mit 0,1 mM und 0,5 mM H_2O_2 .

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus peripherem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert, mit H_2O_2 in den Konzentrationen 0,1 mM und 0,5 mM behandelt, an den Tagen 2 und 6 geerntet und mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellviabilität wurde mit dem Zellvitalitätsfarbstoff "Live/Dead" in Abb. A, B und C bei unterschiedlichen Konzentrationen von H_2O_2 dargestellt. Der prozentuale Anteil der CD8⁺ T-Zellen wurde in Abb. D, E und F bei unterschiedlichen Konzentrationen von H_2O_2 dargestellt.

Weiterhin erfolgte die Behandlung der T-Zellen von gesunden Spendern mit H_2O_2 . Die T-Zellen zeigten unter der Gabe von H_2O_2 eine verminderte Zellviabilität (Abb. 4A, B, C), eine weitere Auswertung war aufgrund der deutlich reduzierten Zellzahl von insbesondere CD8⁺ T-Zellen nicht möglich (Abb. 4D, E, F).

3.2.5 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)

Aus den gewonnen Überständen der T-Zellkultur wurden die Zytokine TNF- α , IL-6, IFN- γ mittels eines industriell hergestellten ELISA Kits bestimmt. Dazu bindet das Antigen auf einem Capture-Antikörper, der mit einer festen Oberfläche verbunden ist. Der Detektionsantikörper bindet daraufhin an das Antigen und ist gekoppelt an ein Enzym, welches ein Substrat zu Farbstoff umwandelt. Die Analyse der Zytokine erfolgte mit dem DuoSet ELISA laut Herstellerprotokoll. Die Messungen wurden mit Variskan Flash (Thermo Scientific) durchgeführt.

3.2.6 Statistische Auswertung

Im Verlauf erfolgten spätere Experimente (s. Tabelle 15) mit einer neuen Kompensation am FACS Celesta und teilweise neuen Antikörpern. Um die späteren Experimente (s. Tabelle 15) mit den früheren Experimenten (s. Tabelle 14) vergleichen zu können, wurden die MFI von CD147, CD25, ROS, 2-NBDG, BODIPY 500/510 C1, C12 und Cystine-FITC jeweils normalisiert auf Tag 0, Tag 2 stimuliert und Tag 6 stimuliert.

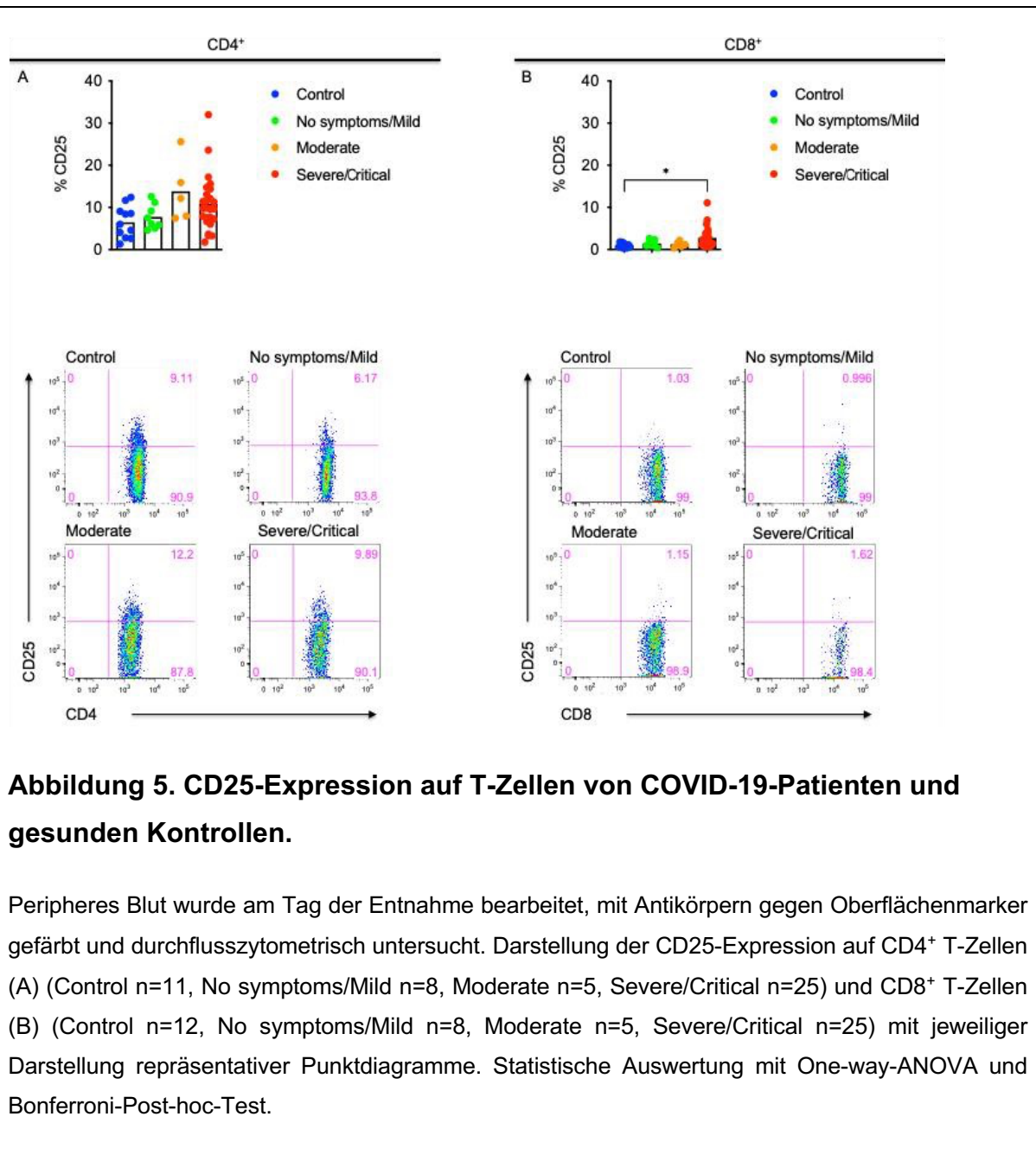
Für die statistische Auswertung wurde die Software Graphpad Prism verwendet. Wenn 2 Gruppen miteinander verglichen wurden, erfolgte die Auswertung mit dem unpaired t-Test, Signifikanzgrenze bei $p < 0,05$. Wenn mehr als 2 Gruppen miteinander verglichen wurden, erfolgte die Auswertung mit dem One-way-ANOVA-Test und Bonferroni-Post-Test, Signifikanzgrenze bei $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

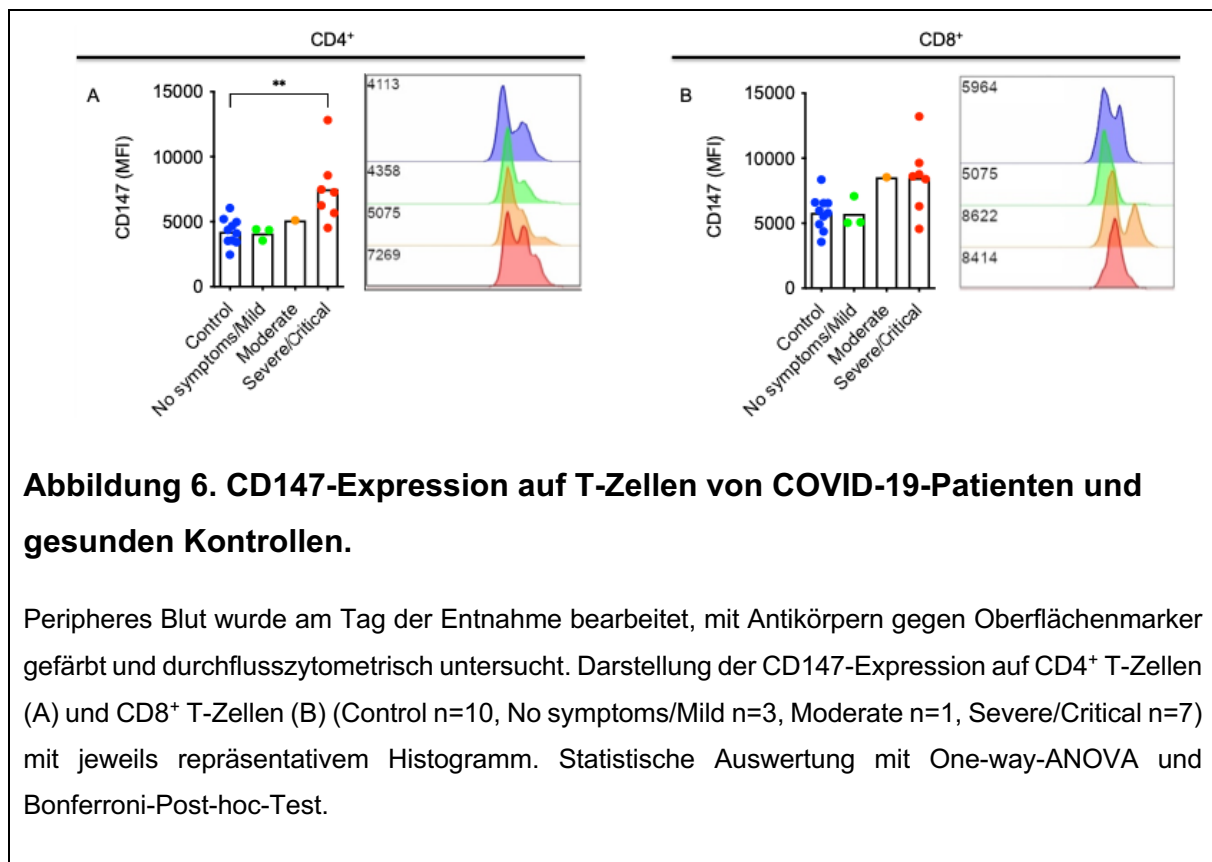
4.1 Aktivierung der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

COVID-19-Infektionen können unterschiedlich schwer verlaufen, besonders schwere Verläufe können letal enden. Neben respiratorischem Versagen als Todesursache wurde auch eine Sepsis aufgrund eines Zytokinsturms beschrieben (5). Neben erhöhten proinflammatorischen Zytokinen wie CRP wurde auch eine Hyperaktivität der T-Zellen von mehreren Quellen diskutiert. CD25 ist ein Oberflächenmarker auf T-Zellen, der besonders bei Aktivierung und Proliferation steigt. Es soll die Frage untersucht werden, ob es einen Unterschied zwischen der CD25-Expression auf T-Zellen bei unterschiedlicher Schwere der COVID-19-Erkrankung gibt. Hierzu wurde die CD25-Expression auf T-Zellen von COVID-19-Patienten mit unterschiedlicher Erkrankungsschwere mit gesunden Kontrollen verglichen. Die CD4⁺ T-Zellen zeigten eine trendhaft erhöhte CD25-Expression (Abbildung 5A).

Bei den CD8⁺ T-Zellen der COVID-19-Patienten in der Gruppe „Severe/Critical“ konnte eine erhöhte CD25-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen („Control“) festgestellt werden (Abbildung 5B).



Auch CD147 wird auf aktivierten Zellen vermehrt exprimiert. Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, ob sich die CD147-Expression auf T-Zellen bei einer COVID-19-Infektion verändert. Es konnte eine erhöhte CD147-Expression bei schwerem Krankheitsverlauf („Severe/Critical“) einer COVID-19-Infektion in CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 6A) beobachtet werden. In CD8⁺ T-Zellen zeigte sich ein Trend zu einer vermehrten CD147-Expression von COVID-19-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen („Control“) (Abbildung 6B).



Um genauer zu untersuchen, wie sich die Aktivierung einer T-Zelle von COVID-19-Patienten in einer inflammatorischen Umgebung auswirkt, wurden die Zellen durch antikörperbeladene Beads stimuliert und an den Tagen 2 und 6 durchflusszytometrisch gemessen.

Es wurde an den Tagen 2 und 6 der Stimulation bei gesunden Kontrollen und bei COVID-19-Patienten eine trendhaft erhöhte CD25-Expression der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu unstimulierten Bedingungen (Abbildung 7A) beobachtet. Bei den CD8⁺ T-Zellen kam es durch die Stimulation nur bei den COVID-19-Patienten zu einem signifikanten Anstieg der CD25-Expression an den Tagen 2 und 6 (Abbildung 7B).

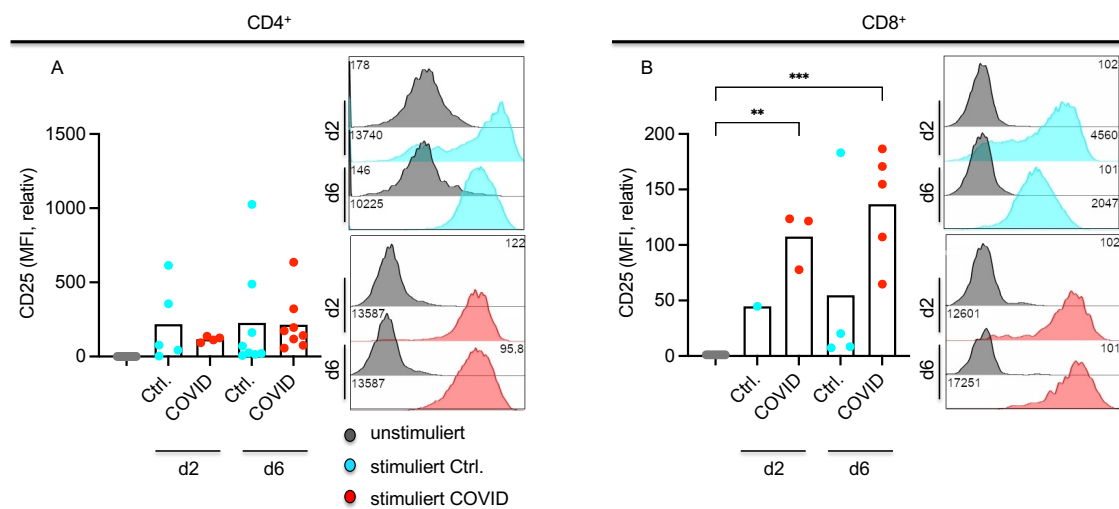
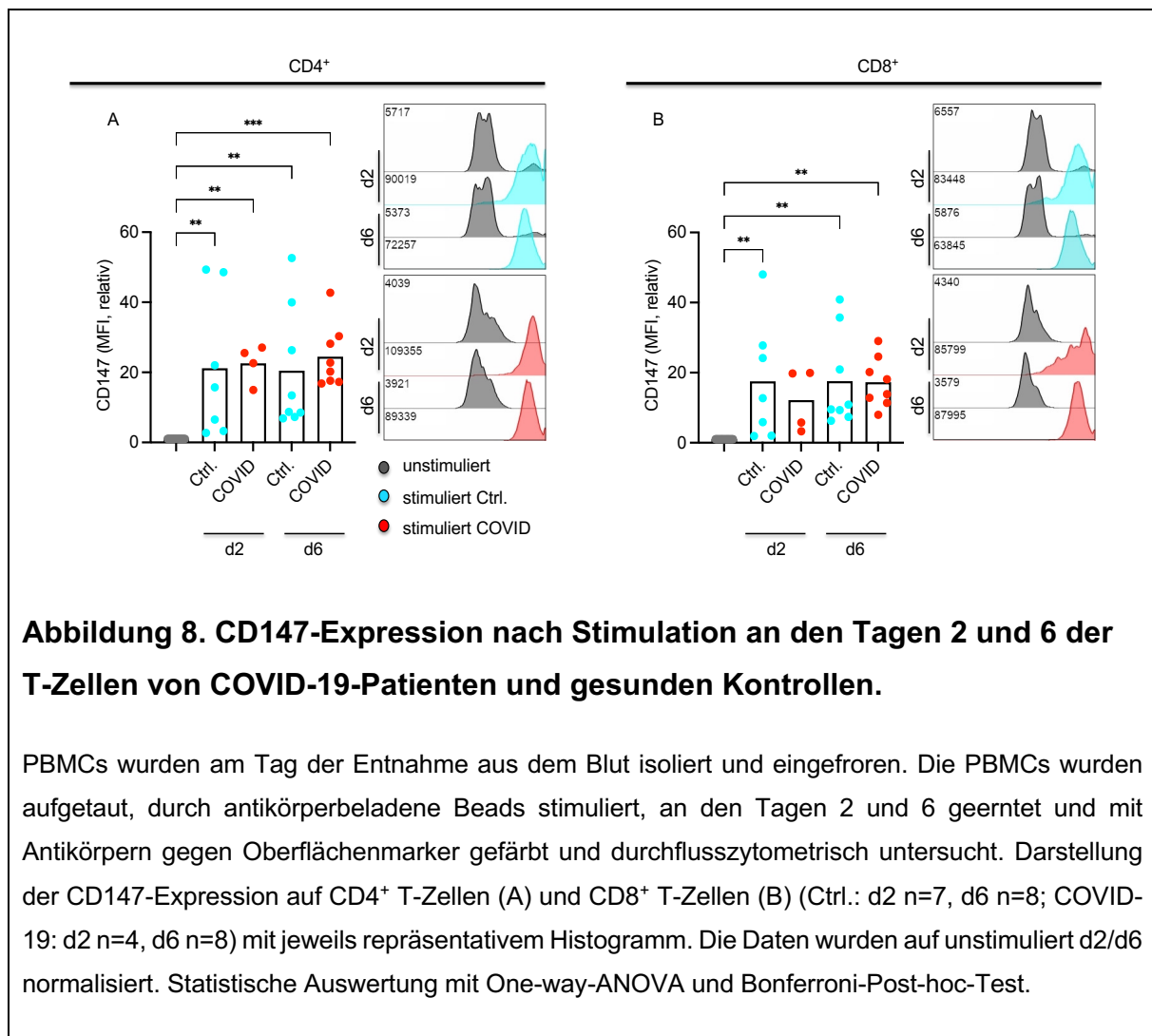


Abbildung 7. CD25-Expression nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus dem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert, an den Tagen 2 und 6 geerntet und mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. (A) Darstellung der CD25-Expression auf CD4⁺ T-Zellen (Ctrl.: d2 n=5, d6 n=8; COVID-19: d2 n=4, d6 n=8) und (B) CD8⁺ T-Zellen (Ctrl.: d2 n=1, d6 n=4; COVID-19: d2 n=3, d6 n=5) mit jeweils repräsentativem Histogramm. Die Daten wurden auf unstimuliert d2/d6 normalisiert. Statistische Auswertung mit One-way-ANOVA und Bonferroni-Post-hoc-Test.

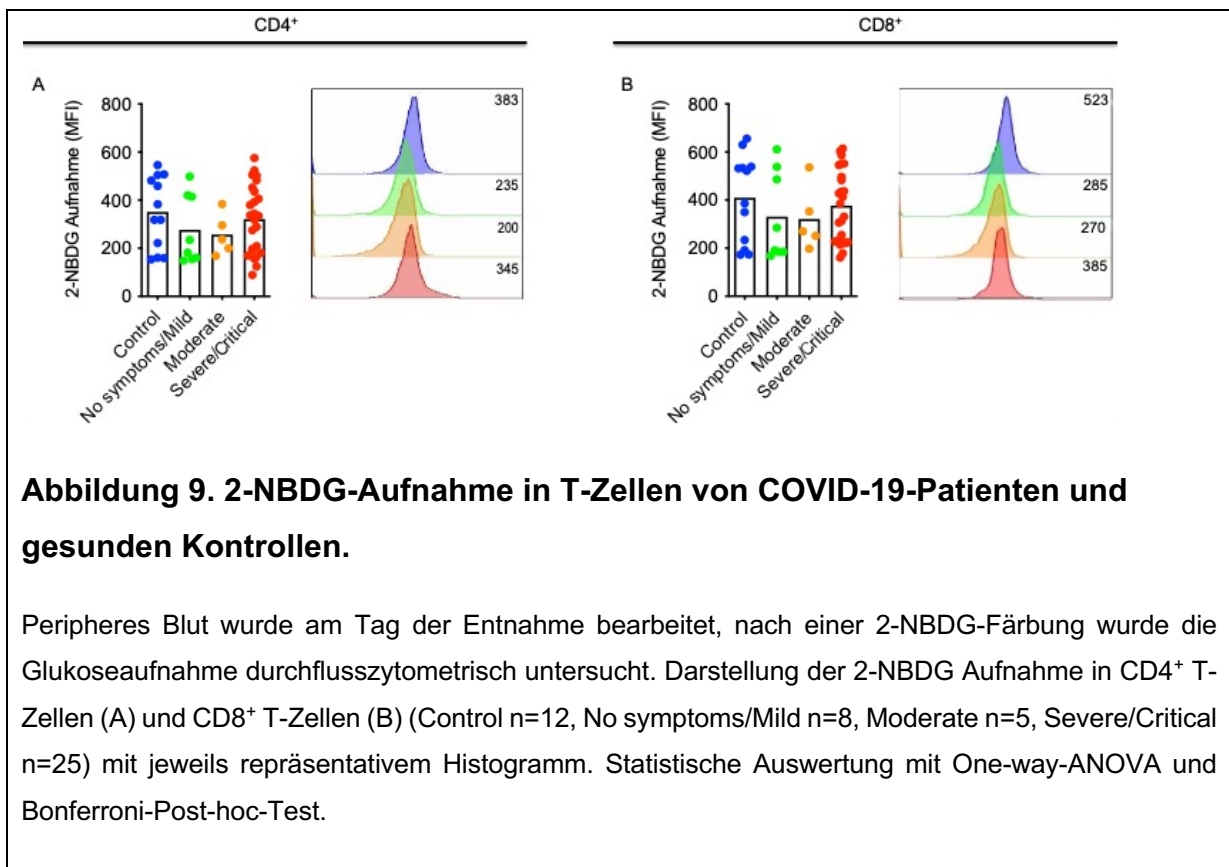
Durch die Stimulation stiegen bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten die CD147-Expression an den Tagen 2 und 6 (Abbildung 8).



4.2 Glukoseaufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

In den T-Zellen der COVID-19-Patienten konnte also eine erhöhte Expression von CD25 und CD147 beobachtet werden. Eine Aktivierung der T-Zellen führt physiologisch zu einer vermehrten Aufnahme von Glukose, damit die Zellen proliferieren und ihre Effektorfunktion ausüben können. Deshalb wurde untersucht, ob sich der Metabolismus der T-Zelle während einer COVID-19-Infektion an die erhöhte Aktivierung der Zellen anpassen kann. Dazu wurde die Glukoseaufnahme in den T-Zellen mit der 2-NBDG-Färbung untersucht. Hier ergab sich kein wesentlicher Unterschied in der Glukoseaufnahme von CD4⁺ (Abbildung 9A) und CD8⁺ T-Zellen der

COVID-19-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen („Control“) (Abbildung 9B).



Die Daten streuen allerdings stark, weshalb sich die Frage stellte, ob eine Subgruppierung der COVID-19-Patienten den Glukosemetabolismus der T-Zellen genauer darstellen könnte. Viele Patienten haben prognostisch relevante Vorerkrankungen oder ein erhöhtes Alter, beide Risikofaktoren können zu einem schweren Verlauf führen. So wurden als Nächstes die COVID-19-Patienten nach metabolischer Vorerkrankung (definiert als DM und/oder Adipositas), kardiovaskulärer Vorerkrankung und der Altersgrenze 60 Jahre unterteilt. Bei metabolischer Vorerkrankung zeigte sich bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine verringerte Glukoseaufnahme (Abbildung 10A und B). Eine kardiovaskuläre Vorerkrankung (VE) beeinflusste dagegen die Glukoseaufnahme der T-Zellen nicht (Abbildung 10C und D). Ebenfalls schien eine Unterteilung nach Alter keinen Einfluss auf die Glukoseaufnahme zu nehmen (Abbildung 10E und F).

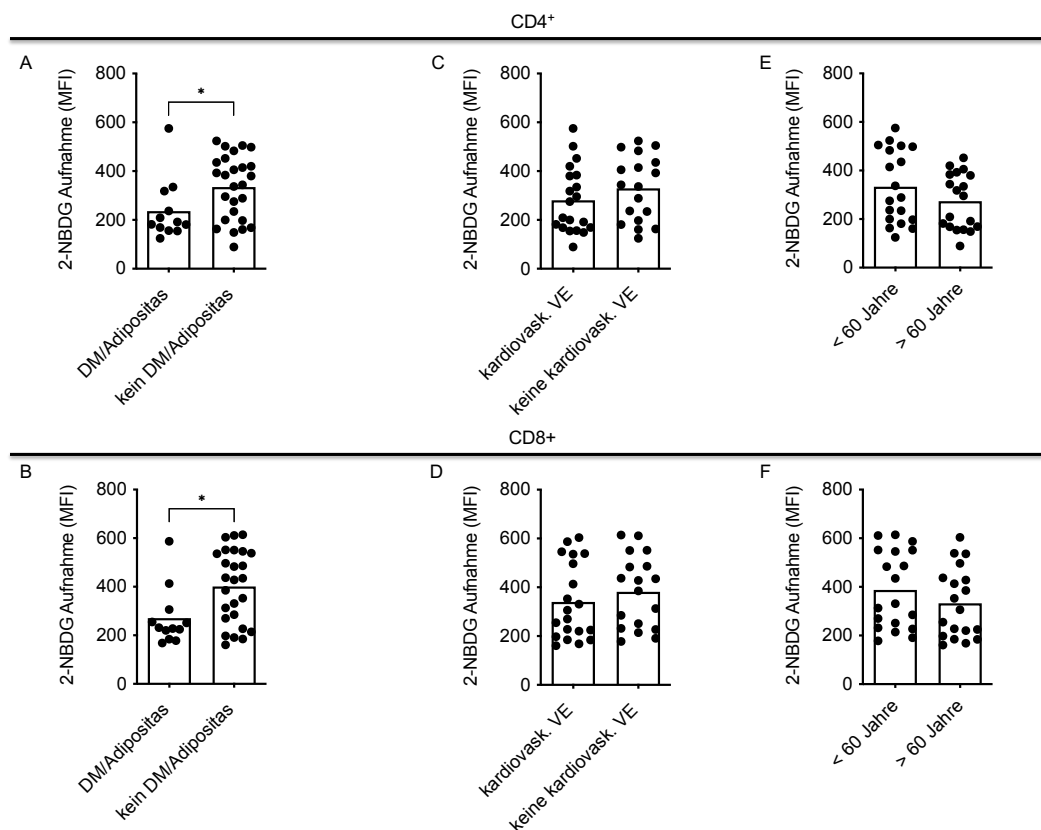
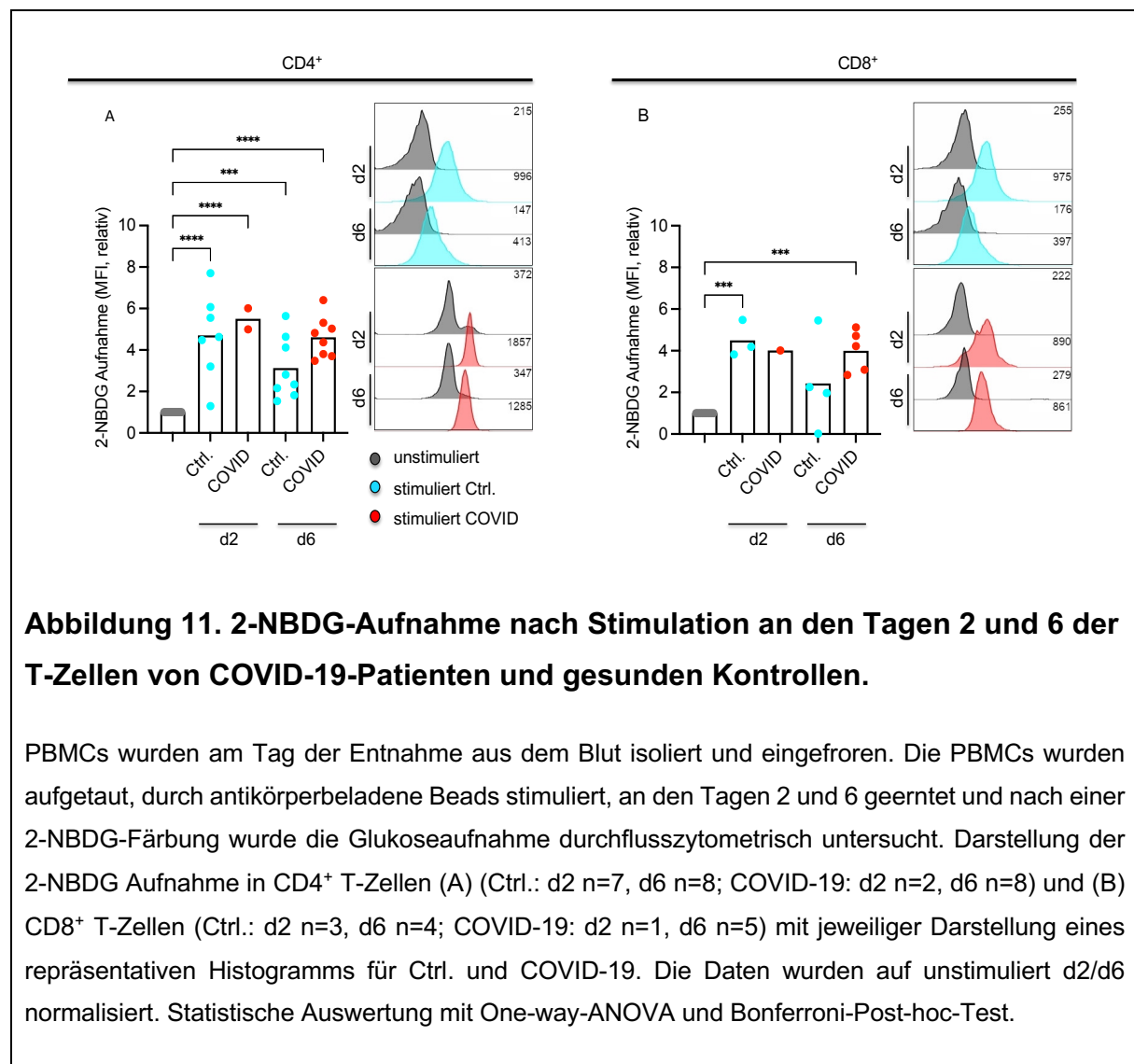


Abbildung 10. 2-NBDG-Aufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten in Bezug auf Vorerkrankungen und das Alter.

Peripheres Blut wurde am Tag der Entnahme bearbeitet, nach einer 2-NBDG-Färbung wurde die Glukoseaufnahme durchflusszytometrisch untersucht. Darstellung der 2-NBDG Aufnahme in CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) mit oder ohne DM/Adipositas (mit DM/Adipositas n=12, ohne DM/Adipositas n=26). Darstellung der 2-NBDG Aufnahme der CD4⁺ (C) und CD8⁺ (D) T-Zellen von COVID-19-Patienten mit oder ohne kardiovaskulärer Vorerkrankung (mit kardiovask. VE n=20, ohne kardiovask. VE n=18). Darstellung der 2-NBDG Aufnahme der CD4⁺ (E) und CD8⁺ (F) T-Zellen von COVID-19-Patienten unter oder über 60 Jahre (unter 60 Jahre n=19, über 60 Jahre n=19). Statistische Auswertung mit Unpaired T-Test.

Die Glukoseaufnahme hängt von dem Aktivierungszustand der Zelle ab. Es wurde eine Stimulation der T-Zellen durchgeführt, um zu erkennen, ob die Glukoseaufnahme sich hierunter verändert. Hierzu wurden T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen durch antikörperbeladene Beads stimuliert und jeweils an den Tagen 2 und 6 mit 2-NBDG die Glukoseaufnahme untersucht.

Hier kommt es an den Tagen 2 und 6 bei den CD4⁺ T-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Glukoseaufnahme (Abbildung 11A). Bei den CD8⁺ T-Zellen steigt an Tag 2 vor allem die Glukoseaufnahme der gesunden Kontrollen an, während es an Tag 6 zu einer erhöhten Glukoseaufnahme bei den COVID-19-Patienten kommt (Abbildung 11B). Diese Analyse zeigte sich jedoch durch eine niedrige „n“ Zahl limitiert. In den Histogrammen der Abbildung 11 zeigt sich eine erhöhte Glukoseaufnahme der unstimulierten CD4⁺ T-Zellen von COVID-19-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.



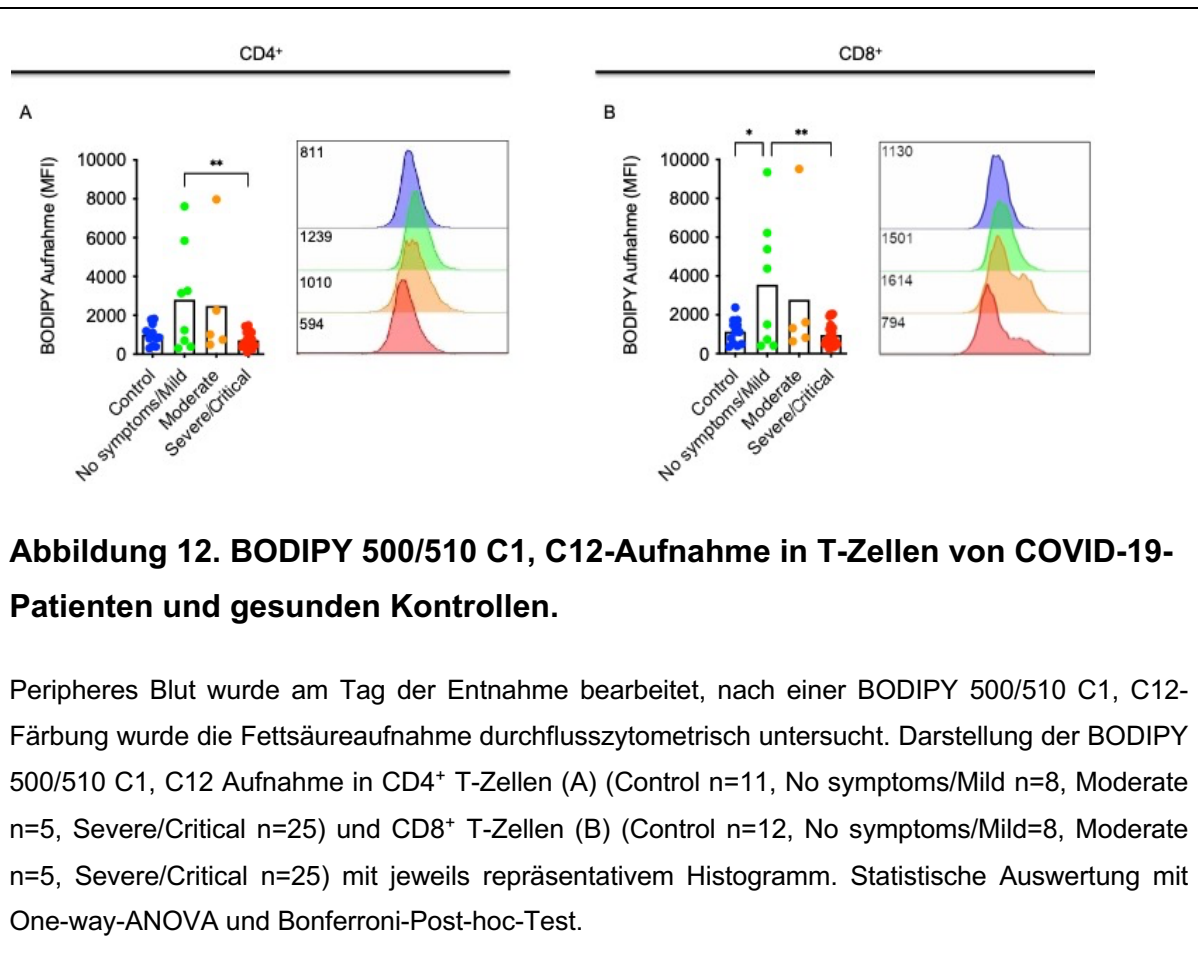
Zusammenfassend lässt sich über die Glukoseaufnahme der T-Zellen von COVID-19-Patienten sagen: Ein direkter Unterschied in der Glukoseaufnahme der T-Zellen bei unterschiedlicher Krankheitsschwere konnte nicht beobachtet werden. Es besteht

jedoch eine starke Streuung zwischen den Patienten. COVID-19-Patienten mit metabolischer Vorerkrankung zeigen eine niedrigere Glukoseaufnahme in den T-Zellen. Eine Stimulation der T-Zellen führt sowohl bei COVID-19-Patienten als auch gesunden Kontrollen zu einer Erhöhung der Glukoseaufnahme.

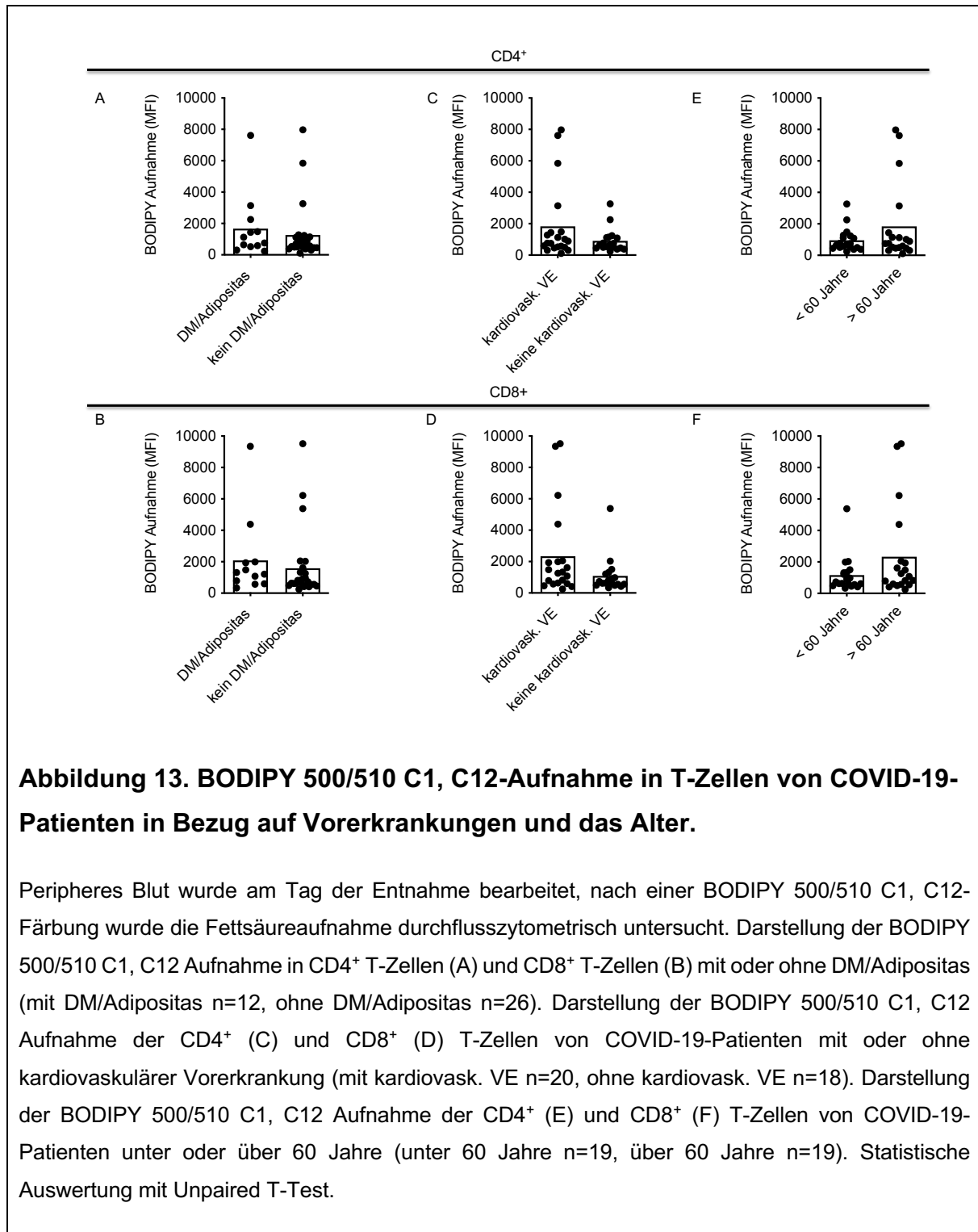
4.3 Fettsäureaufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

Eine Aktivierung der T-Zellen kann neben einer vermehrten Aufnahme von Glukose auch zur Aufnahme von Fettsäuren führen. Wie in Abbildung 5 dargestellt, konnte bereits in den Frischblutproben eine erhöhte basale CD25-Expression bei schwerem Krankheitsverlauf der COVID-19-Patienten („Severe/Critical“) im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt werden. Deshalb wurde untersucht, ob sich die Fettsäureaufnahme der T-Zellen bei einer COVID-19-Infektion an die erhöhte Aktivierung anpassen kann.

Eventuell könnten die T-Zellen bei erhöhter Aktivierung den erhöhten Bedarf mit einer vermehrten Fettsäureaufnahme kompensieren. Es zeigte sich eine erhöhte Fettsäureaufnahme in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei mildem/asymptomatischem Verlauf („No symptoms/Mild“) einer COVID-19-Infektion (Abbildung 12).



Auch hier stellte sich die Frage, ob relevante Risikofaktoren, wie Alter und Vorerkrankungen, einen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme der T-Zellen nehmen. Hier zeigte sich, dass metabolische, kardiovaskuläre Vorerkrankungen und ein erhöhtes Alter die Fettsäureaufnahme nicht beeinflussten (Abbildung 13).



Die Expression der Oberflächenmoleküle der T-Zellen von COVID-19-Patienten deuten insgesamt auf eine Aktivierung hin, die metabolischen Messungen zeigen jedoch eher eine metabolische Dysregulation an. Aus diesem Grund bietet es sich an, den Fettsäure-Metabolismus einer T-Zelle von COVID-19-Patienten *in-vitro* genauer zu untersuchen, da eine Re-Stimulation möglicherweise zusätzliche Informationen über den Metabolismus liefert. Dazu wurden T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen durch antikörperbeladene Beads stimuliert und jeweils an den Tagen 2 und 6 mit BODIPY 500/510 C1, C12 auf ihre Fettsäureaufnahme untersucht. Hier konnte in den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von COVID-19-Patienten ein signifikanter Anstieg der Fettsäureaufnahme durch Stimulation an den Tagen 2 und 6 beobachtet werden (Abbildung 14A, B).

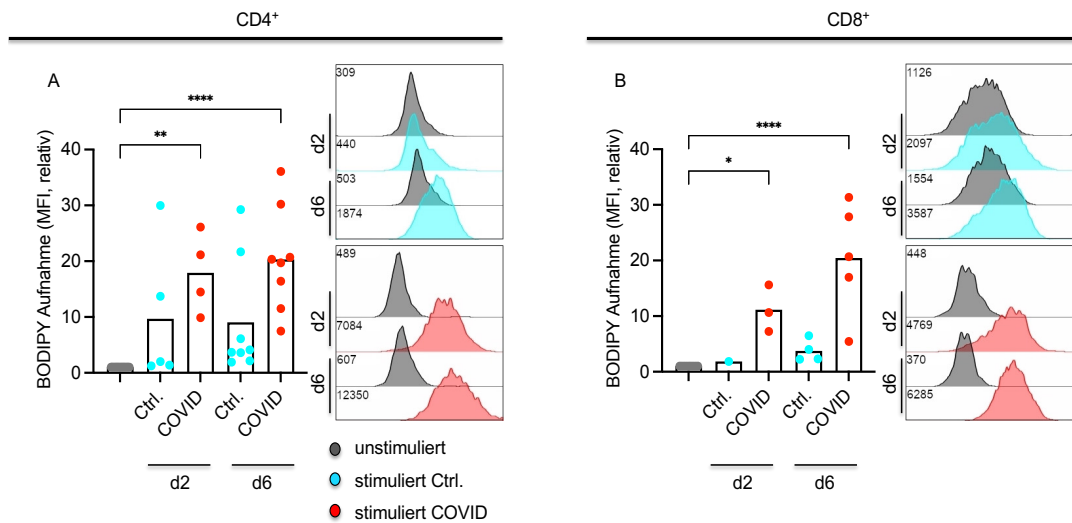


Abbildung 14. BODIPY 500/510 C1, C12-Aufnahme nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19 Patienten.

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus dem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert, an den Tagen 2 und 6 geerntet und nach einer BODIPY 500/510 C1, C12-Färbung wurde die Fettsäureaufnahme durchflusszytometrisch untersucht. Darstellung der BODIPY 500/510 C1, C12 Aufnahme in CD4⁺ T-Zellen (A) (Ctrl.: d2 n=5, d6 n=8; COVID-19: d2 n=4, d6 n=8) und CD8⁺ T-Zellen (B) (Ctrl.: d2 n=1, d6 n=4; COVID-19: d2 n=3, d6 n=5) mit jeweils repräsentativem Histogramm. Die Daten wurden auf unstimuliert d2/d6 normalisiert. Statistische Auswertung mit One-way-ANOVA und Bonferroni-Post-hoc-Test.

Zusammenfassend lässt sich über die Fettsäureaufnahme von T-Zellen von COVID-19-Patienten Folgendes sagen: Milde Verläufe sind gekennzeichnet durch eine gesteigerte Fettsäureaufnahme. Vorerkrankungen scheinen keinen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme zu nehmen. Durch Stimulation kam es vor allem bei den T-Zellen von COVID-19-Patienten zu einer vermehrten Fettsäureaufnahme.

4.4 ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

Allgemein führt eine Aktivierung der T-Zellen zu einer vermehrten Aufnahme von Glukose und Fettsäuren. Glukose wird über die Glykolyse abgebaut, in den

Citratzyklus und in die Atmungskette in den Mitochondrien geschleust, um ATP zu produzieren. Zudem findet auch die FAO in den Mitochondrien statt. Mitochondrien sind also ein essenzieller Baustein der Zellen und ein Bindeglied des Stoffwechsels. Mitochondriales ROS entsteht physiologisch als Nebenprodukt der Atmungskette und somit auch im Rahmen der Aktivierung. Bei COVID-19-Patienten ist oxidativer Stress mit vermehrter ROS-Bildung beschrieben.

Vor diesem Hintergrund wäre es auch interessant, den oxidativen Stress in den Zellen zu bestimmen. Hierzu wurden *in-vitro* T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten durch antikörperbeladene Beads stimuliert und danach die intrazelluläre ROS-Produktion und Cystine-FITC Aufnahme durchflusszytometrisch an den Tagen 2 und 6 bestimmt. Die Aufnahme von Cystine-FITC kann einen indirekten Marker für oxidativen Stress darstellen, da Cystin intrazellulär in Cystein umgewandelt wird und ein wichtiger Baustein von Glutathion ist. Glutathion wirkt antioxidativ auf die intrazelluläre ROS-Produktion (66).

Eine Stimulation der CD4⁺ T-Zellen führte bei COVID-19-Patienten zu einer erhöhten intrazellulären ROS-Produktion an den Tagen 2 und 6 (Abbildung 15A). Bei den CD8⁺ T-Zellen wurde erst an Tag 6 eine erhöhte intrazelluläre ROS-Produktion bei COVID-19-Patienten festgestellt (Abbildung 15B).

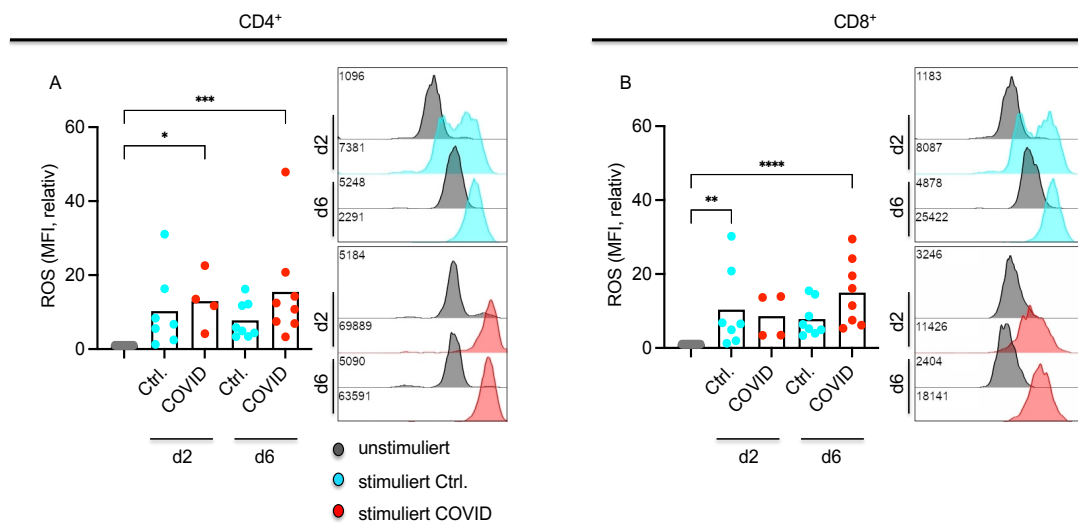


Abbildung 15. ROS-Produktion nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus dem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert, an den Tagen 2 und 6 geerntet und nach einer DCFDA-Färbung wurde die ROS-Produktion durchflusszytometrisch untersucht. Darstellung der ROS-Produktion in CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) (Ctrl.: d2 n=7, d6 n=8; COVID-19: d2 n=4, d6 n=8) mit jeweils repräsentativem Histogramm. Die Daten wurden auf unstimuliert d2/d6 normalisiert. Statistische Auswertung mit One-way-ANOVA und Bonferroni-Post-hoc-Test.

Zudem führte eine Stimulation der CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen bei COVID-19-Patienten zu einer statistisch signifikanten Cystine-FITC-Aufnahme an Tag 6 (Abbildung 16A, B). Die Analyse am Tag 2 war bei niedriger „n“ Zahl nicht statistisch auswertbar.

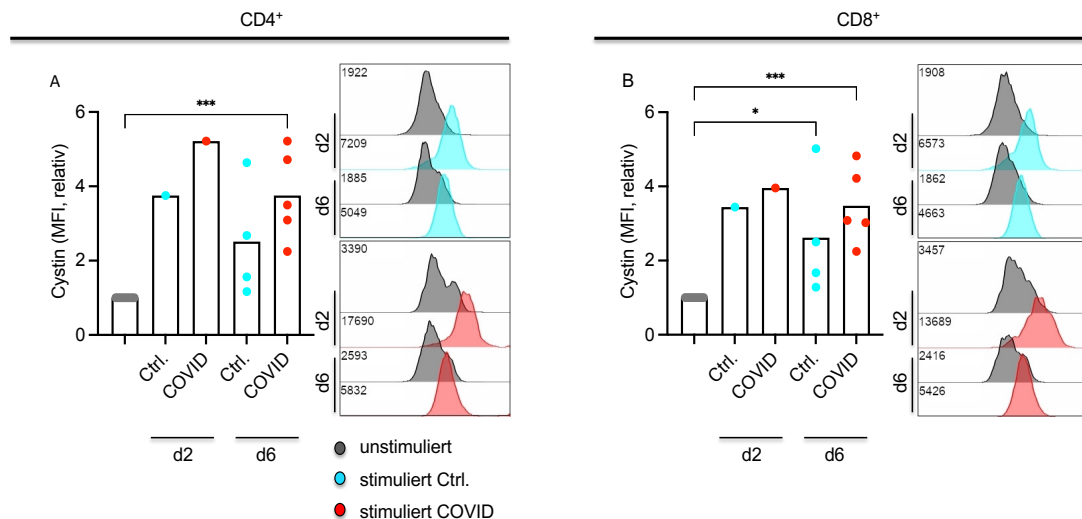


Abbildung 16. Cystine-FITC-Aufnahme nach Stimulation an den Tagen 2 und 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus dem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert, an den Tagen 2 und 6 geerntet und nach einer Cystine-FITC-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Darstellung der Cystine-FITC-Aufnahme in CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) (Ctrl.: d2 n=1, d6 n=4; COVID-19: d2 n=1, d6 n=5) mit jeweils repräsentativem Histogramm. Die Daten wurden auf unstimuliert d2/d6 normalisiert. Statistische Auswertung mit One-way-ANOVA und Bonferroni-Post-hoc-Test.

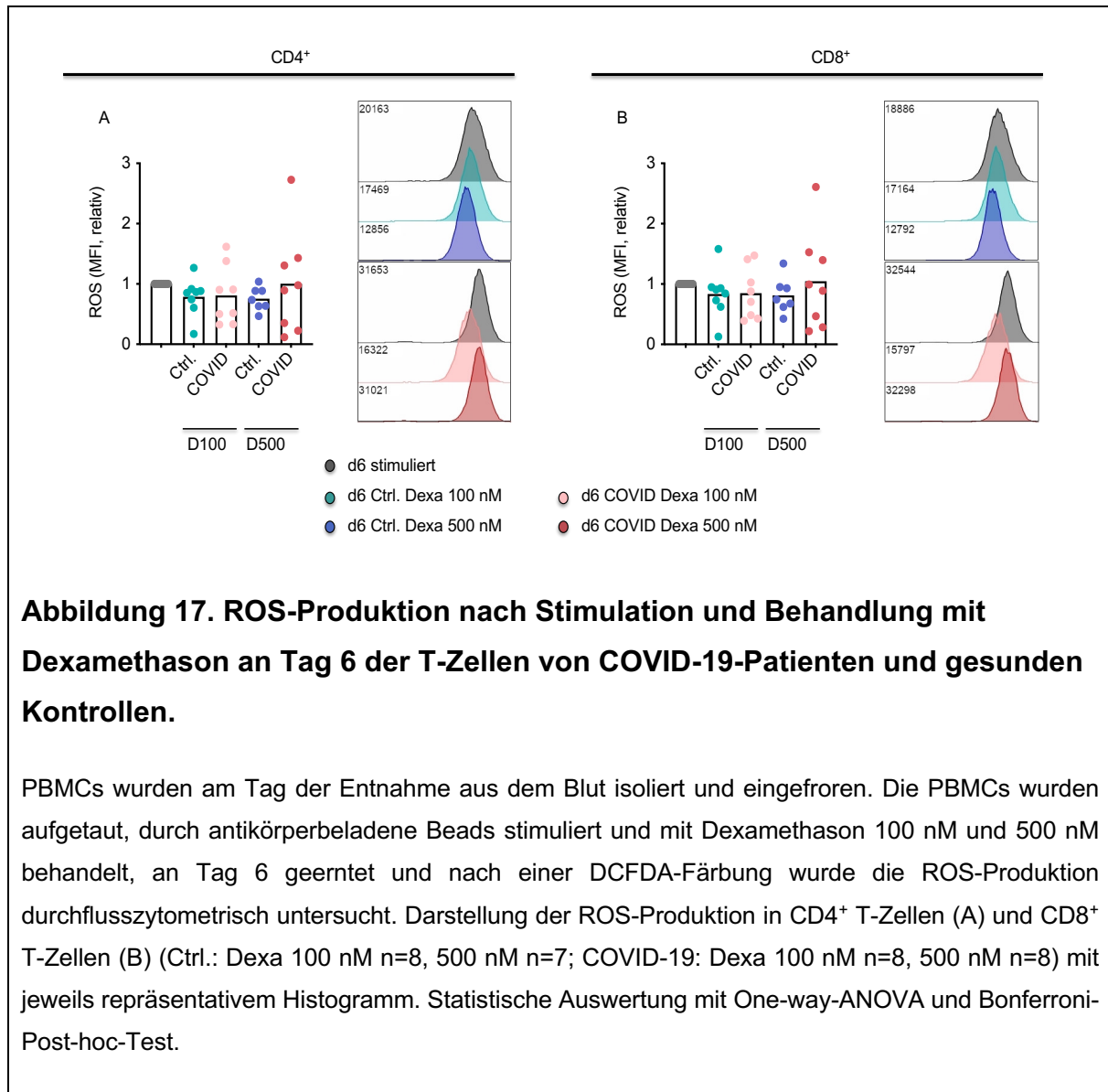
Zusammenfassend ist der Aktivierungszustand der T-Zellen besonders in schweren Verläufen von COVID-19-Patienten erhöht. Trotz erhöhtem Aktivierungszustand kam es eher zu einer verminderten Aufnahme von wichtigen Nährstoffen, wie Glukose und Fettsäuren. Außerdem zeigte sich, dass T-Zellen von COVID-19-Patienten durch eine Stimulation vermehrt ROS produzieren und Cystin aufnehmen, hinweisgebend auf vermehrten oxidativen Stress. Oxidativer Stress kann durch Hypoxie ausgelöst werden, was viele schwere Verläufe einer COVID-19-Infektion charakterisiert. Dexamethason gilt als wichtige Therapieoption bei COVID-19, klinische Effekte zeigen sich vor allem bei Patienten, die unter einer Hypoxie leiden und beatmet werden.

4.5 Effekt von Dexamethason auf T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

4.5.1 Effekt von Dexamethason auf die ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

Es stellt sich die Frage, ob Dexamethason auch einen Effekt auf die ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme in den T-Zellen der COVID-19-Patienten hat. Dazu wurden die T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten durch antikörperbeladene Beads stimuliert und dann mit Dexamethason (Dexa) in den Konzentrationen 100 nM und 500 nM kultiviert und an Tag 6 durchflusszytometrisch die intrazelluläre ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme bestimmt.

Es konnte keine Veränderung der ROS-Produktion in den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten nach Behandlung mit Dexamethason festgestellt werden (Abbildung 17A, B). Die Aufnahme von Cystine-FITC in die T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen wurde durch die Behandlung mit Dexamethason nicht beeinflusst (Abbildung 18A, B).



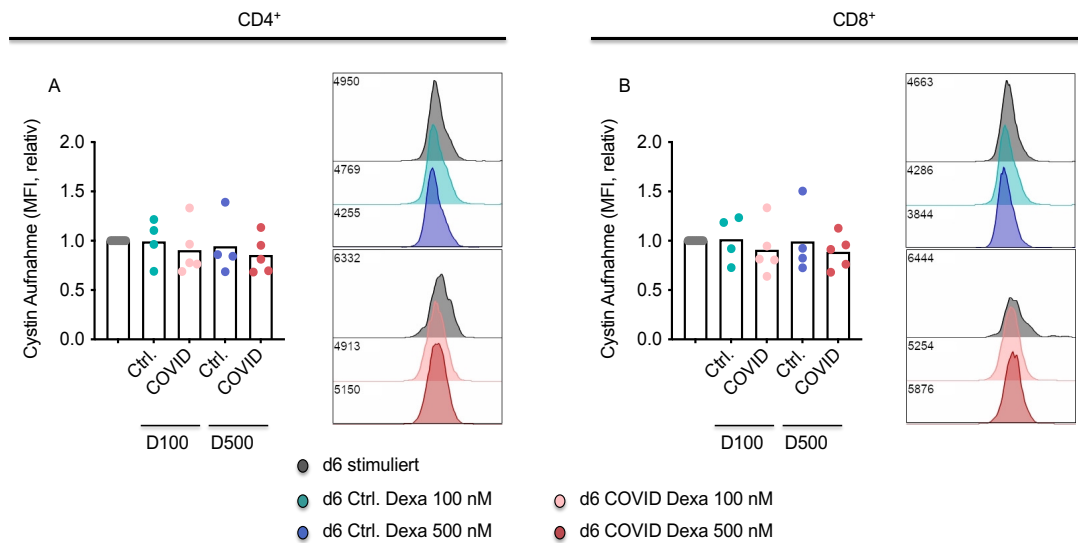


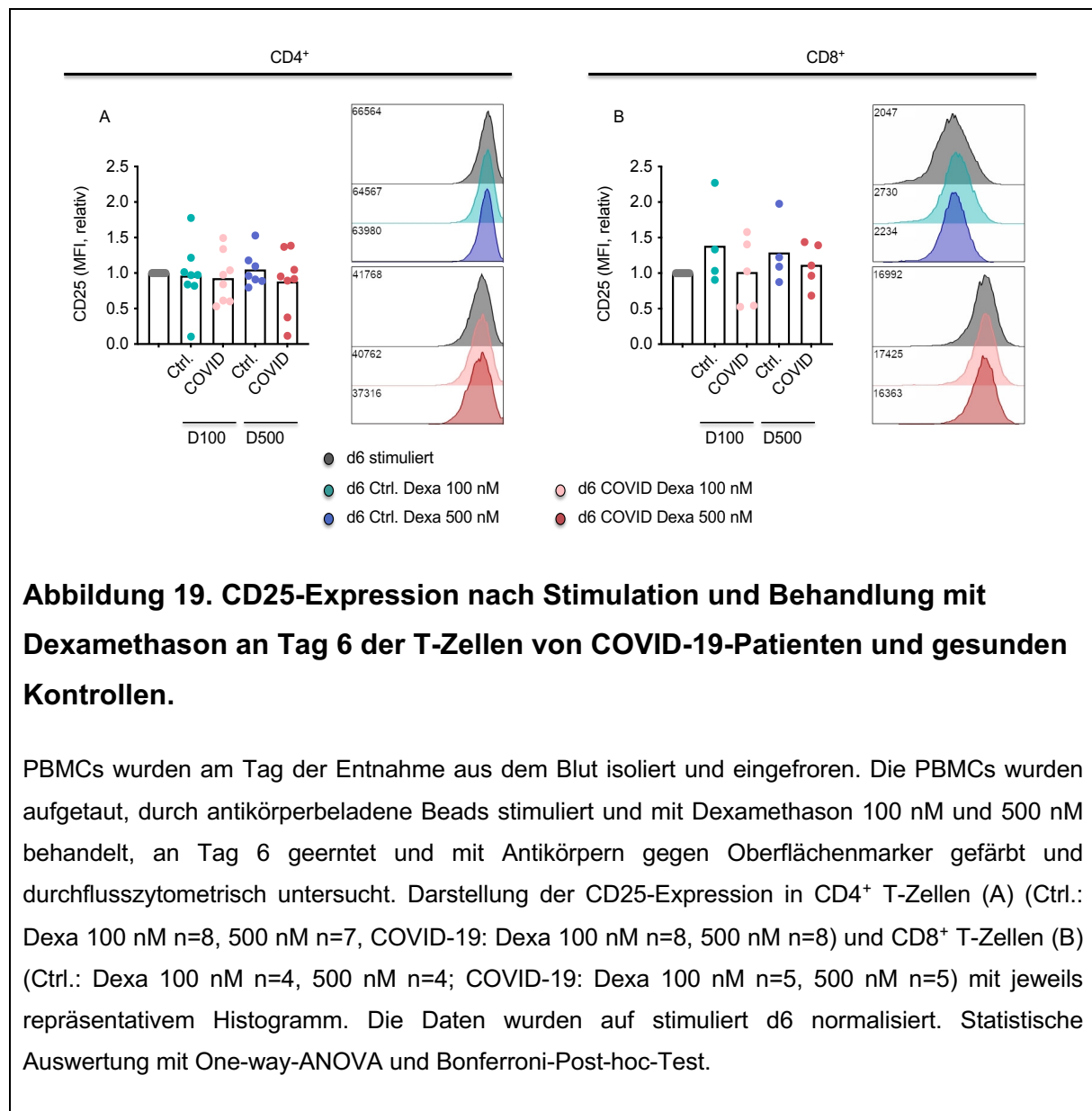
Abbildung 18. Cystine-FITC-Aufnahme nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an Tag 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus dem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert und mit Dexamethason 100 nM und 500 nM behandelt, an Tag 6 geerntet und nach einer Cystine-FITC-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Darstellung der Cystine-FITC Aufnahme in CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) (Ctrl.: Dexa 100 nM n=4, 500 nM n=4; COVID-19: Dexa 100 nM n=5, 500 nM n=5) mit jeweils repräsentativem Histogramm. Die Daten wurden auf stimuliert d6 normalisiert. Statistische Auswertung mit One-way-ANOVA und Bonferroni-Post-hoc-Test.

4.5.2 Effekt von Dexamethason auf die Aktivierung der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

Der Aktivierungszustand der T-Zellen ist besonders in schweren Verläufen von COVID-19-Patienten erhöht. Kortison und seinen Derivaten wird oft eine immunsuppressive Wirkung zugesprochen. Um den Effekt von Dexamethason auf die Aktivierung der T-Zellen zu testen, wurden die T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten durch antikörperbeladene Beads stimuliert und dann mit

Dexamethason in den Konzentrationen 100 nM und 500 nM kultiviert und an Tag 6 durchflusszytometrisch die CD25- und CD147-Expression bestimmt.



Dexamethason führte zu keiner veränderten CD25-Expression bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen (Abbildung 19A und B).

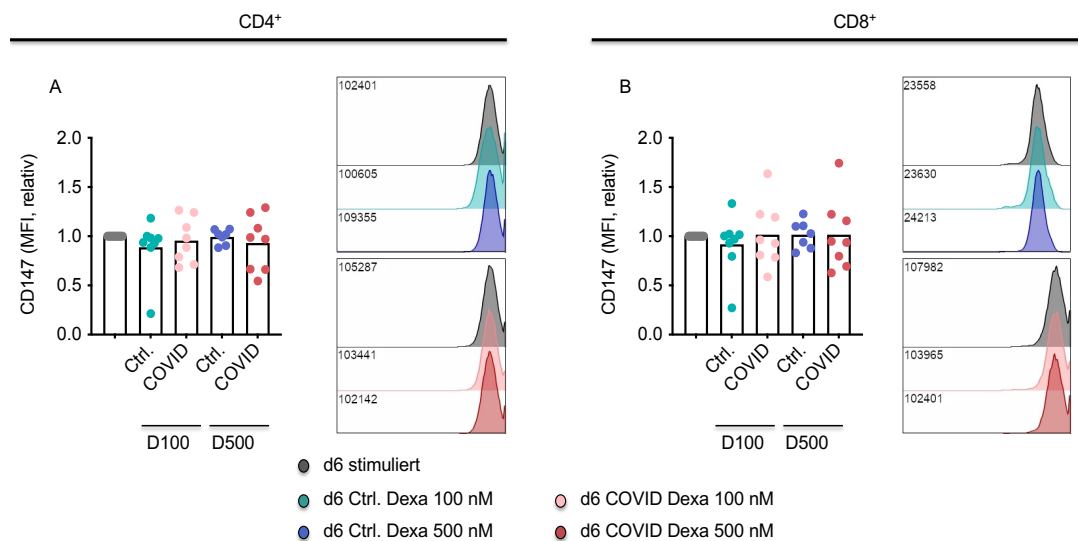


Abbildung 20. CD147-Expression nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an Tag 6 der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus dem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert und mit Dexamethason 100 nM und 500 nM behandelt, an Tag 6 geerntet und mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Darstellung der CD147-Expression in CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) (Ctrl.: Dexa 100 nM n=8, 500 nM n=7; COVID-19: Dexa 100 nM n=8, 500 nM n=8) mit jeweils repräsentativem Histogramm. Die Daten wurden auf stimuliert d6 normalisiert. Statistische Auswertung mit One-way-ANOVA und Bonferroni-Post-hoc-Test.

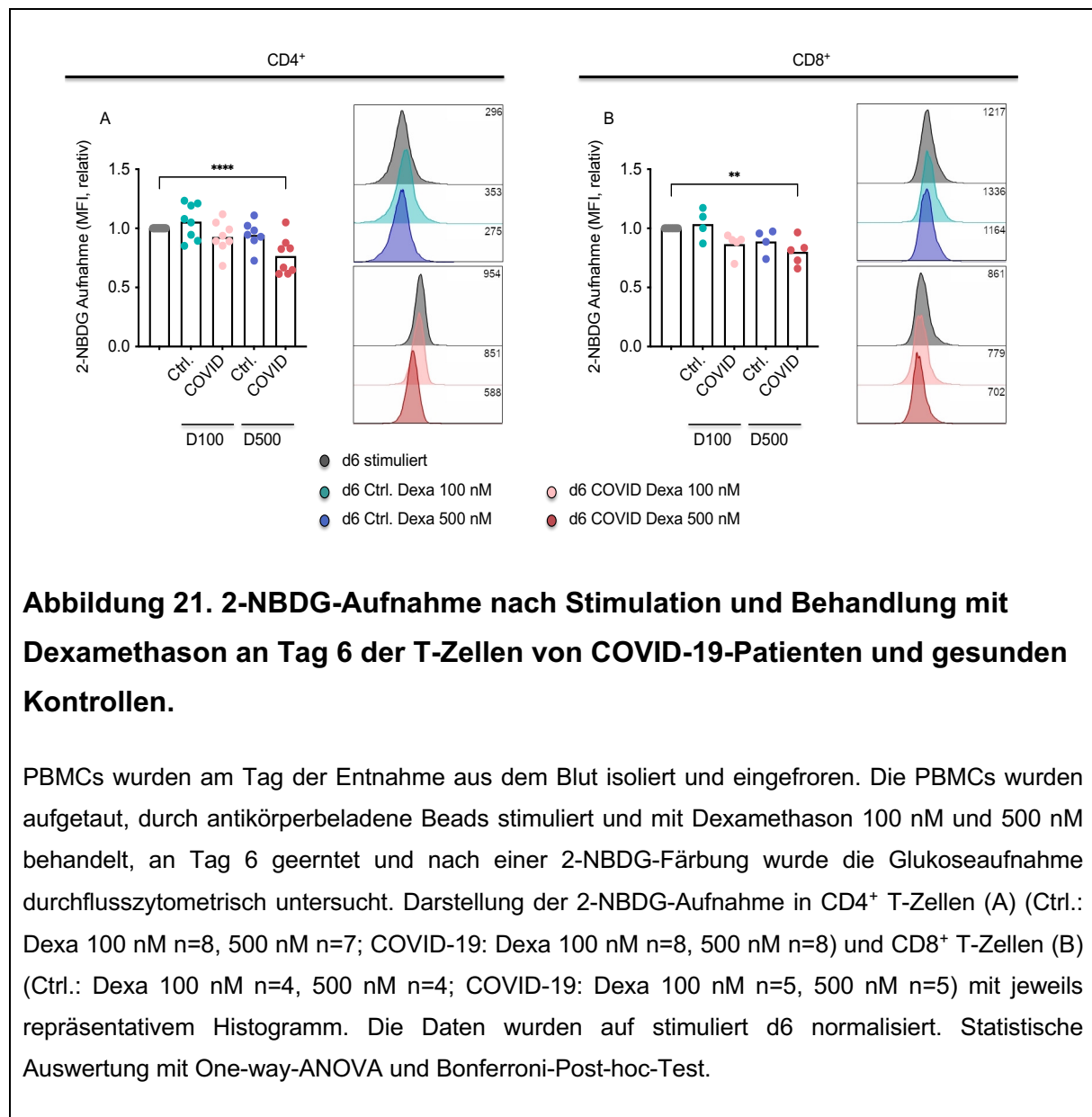
Außerdem konnte kein Effekt von Dexamethason auf die CD147-Expression in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten beobachtet werden (Abbildung 20A und B).

4.5.3 Effekt von Dexamethason auf die Glukose- und Fettsäureaufnahme der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

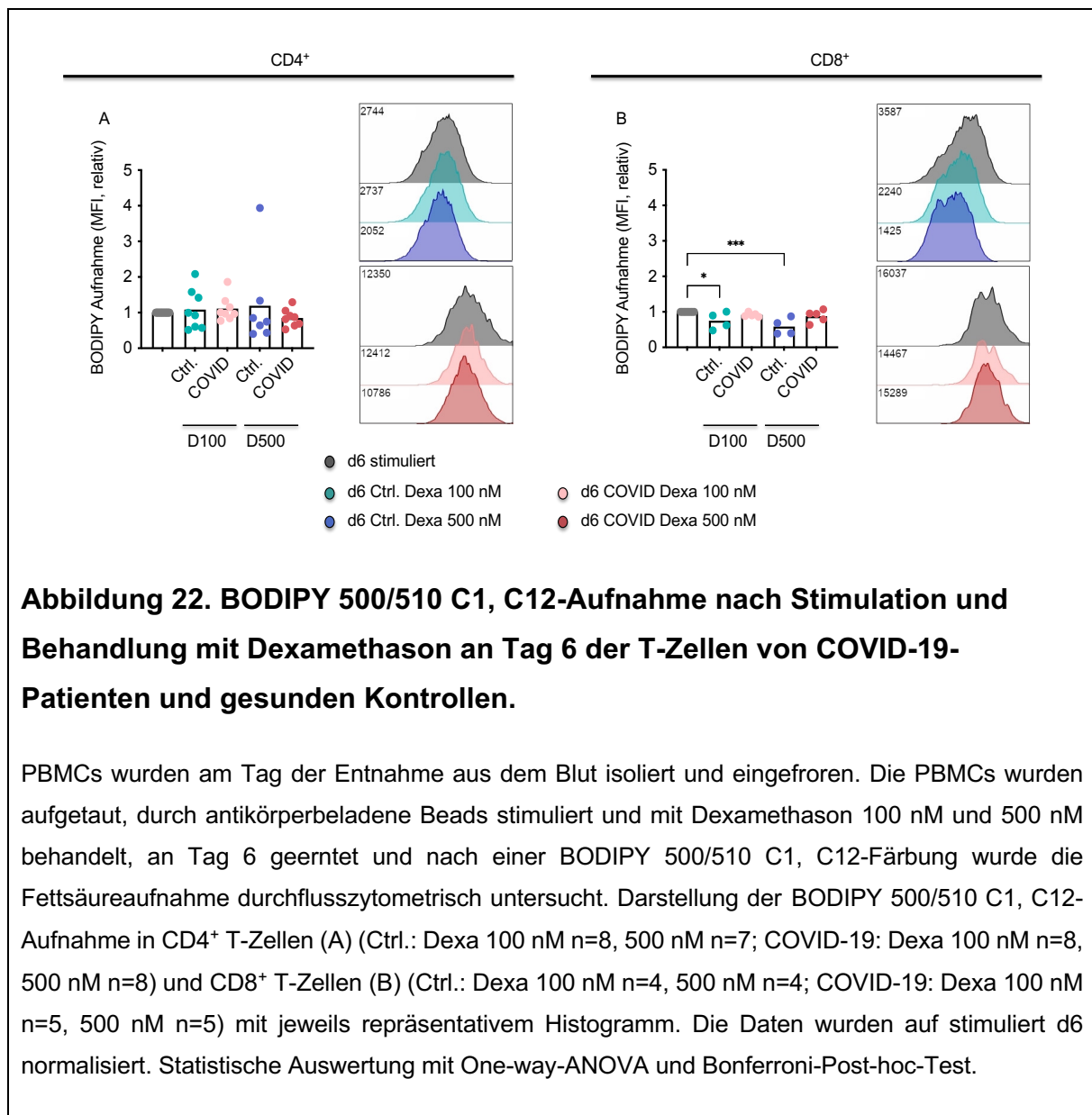
Im Rahmen der verstärkten Aktivierung der T-Zellen während einer COVID-19-Infektion konnte keine adäquate Zunahme der Nährstoffaufnahme nachgewiesen werden. Vielleicht hat Dexamethason keinen direkten Effekt auf die Zellaktivierung, verbessert aber die Fitness der Zelle, in dem die Nährstoffaufnahme beeinflusst wird.

Hierzu wurde der Einfluss von Dexamethason auf die Glukose- und Fettsäureaufnahme der T-Zelle untersucht. Dazu wurden die T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten durch antikörperbeladene Beads stimuliert und dann mit Dexamethason in den Konzentrationen 100 nM und 500 nM kultiviert und an Tag 6 durchflusszytometrisch die Glukoseaufnahme mit 2-NBDG, sowie die Fettsäureaufnahme mit BODIPY 500/510 C1, C12 bestimmt.

Durch eine Behandlung mit 500 nM Dexamethason wurde die Glukoseaufnahme der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in COVID-19-Patienten reduziert (Abbildung 21A, B).



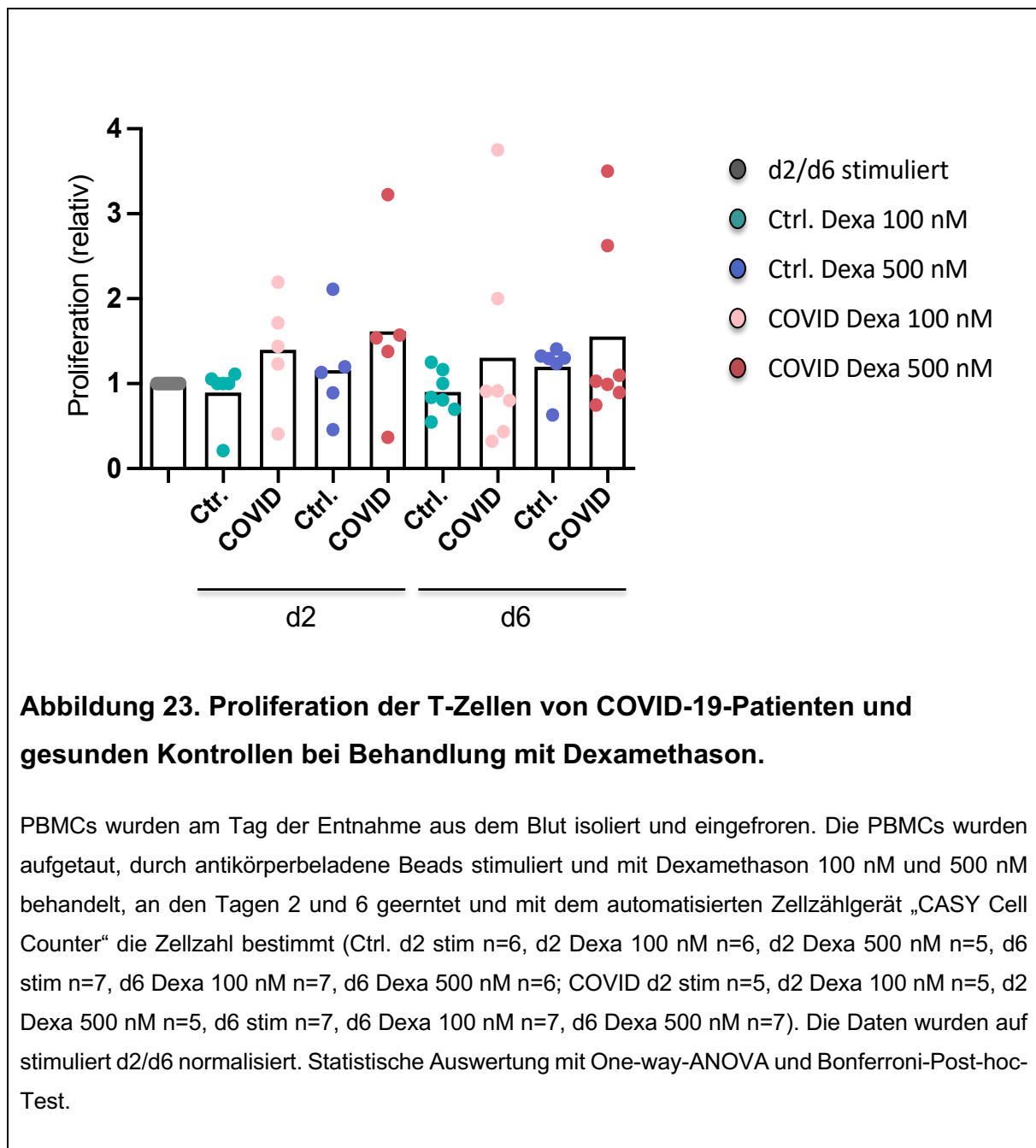
In den CD4⁺ T-Zellen konnte die Behandlung mit Dexamethason die Fettsäureaufnahme bei gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten nicht beeinflussen (Abbildung 22A). In den CD8⁺ T-Zellen zeigte sich interessanterweise eine verringerte Fettsäureaufnahme durch eine steigende Konzentration von Dexamethason bei den gesunden Kontrollen (Abbildung 22B).



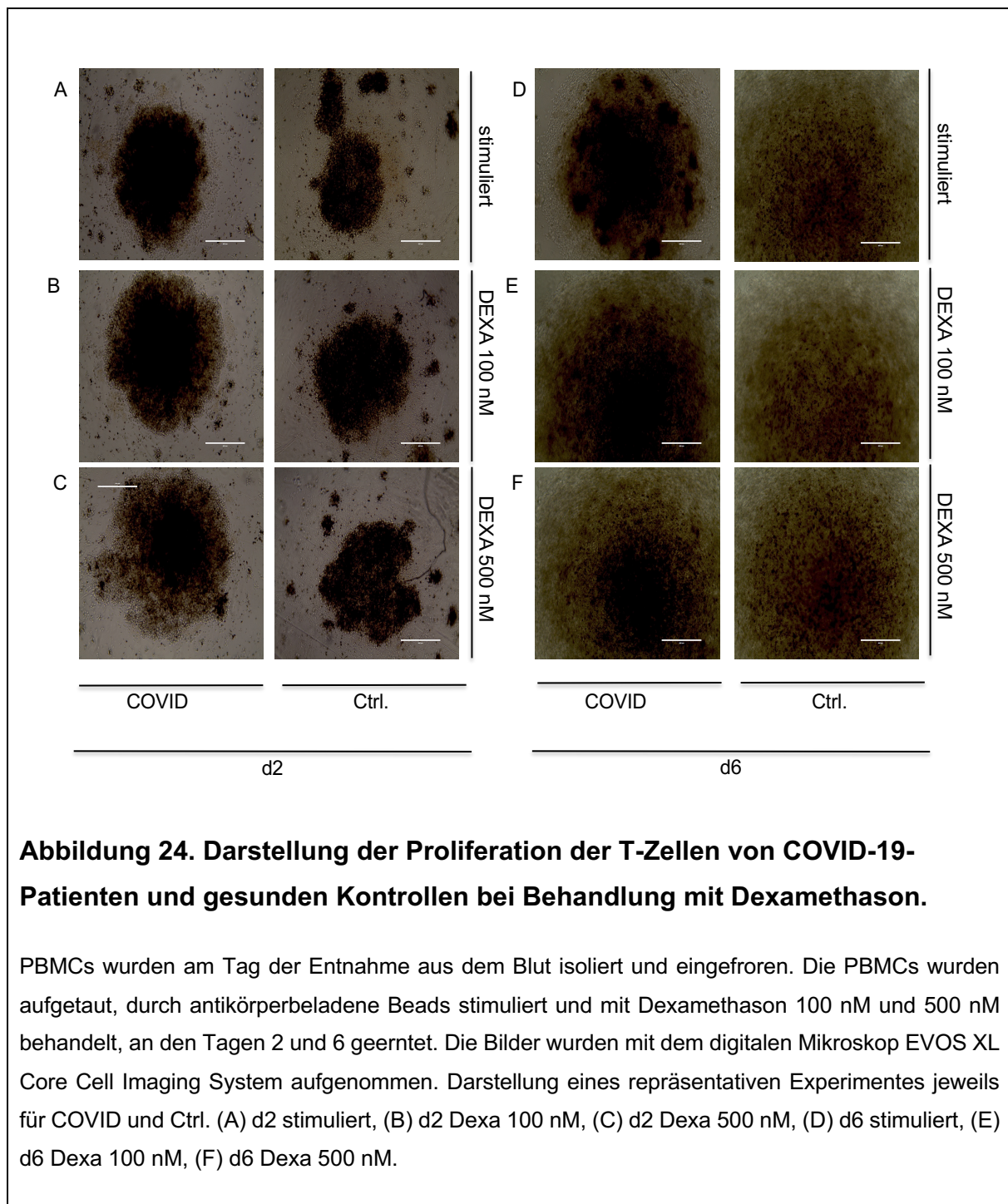
4.6 Proliferation der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

In COVID-19 kommt es besonders in schweren Fällen zu einer Lymphopenie. Die Gabe von Dexamethason führte im RECOVERY Trial zu einer verminderten Mortalität und Morbidität. Es stellte sich die Frage, ob Dexamethason die Lymphozytenzahl beeinflussen kann. Hierzu wurden die T-Zellen von gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten durch antikörperbeladene Beads stimuliert und dann mit Dexamethason in den Konzentrationen 100 nM und 500 nM kultiviert. Die T-Zellen wurden jeweils an den Tagen 2 und 6 geerntet, die Anzahl wurde mit einem automatisierten Zellzählgerät „CASY Cell Counter“ bestimmt. Die Proliferation der T-Zellen wurde in den gesunden

Kontrollen und COVID-19-Patienten nicht durch Dexamethason beeinflusst (Abbildung 23).



In Abbildung 24 wurden hierzu repräsentative Experimente mit dem digitalen Mikroskop dargestellt.

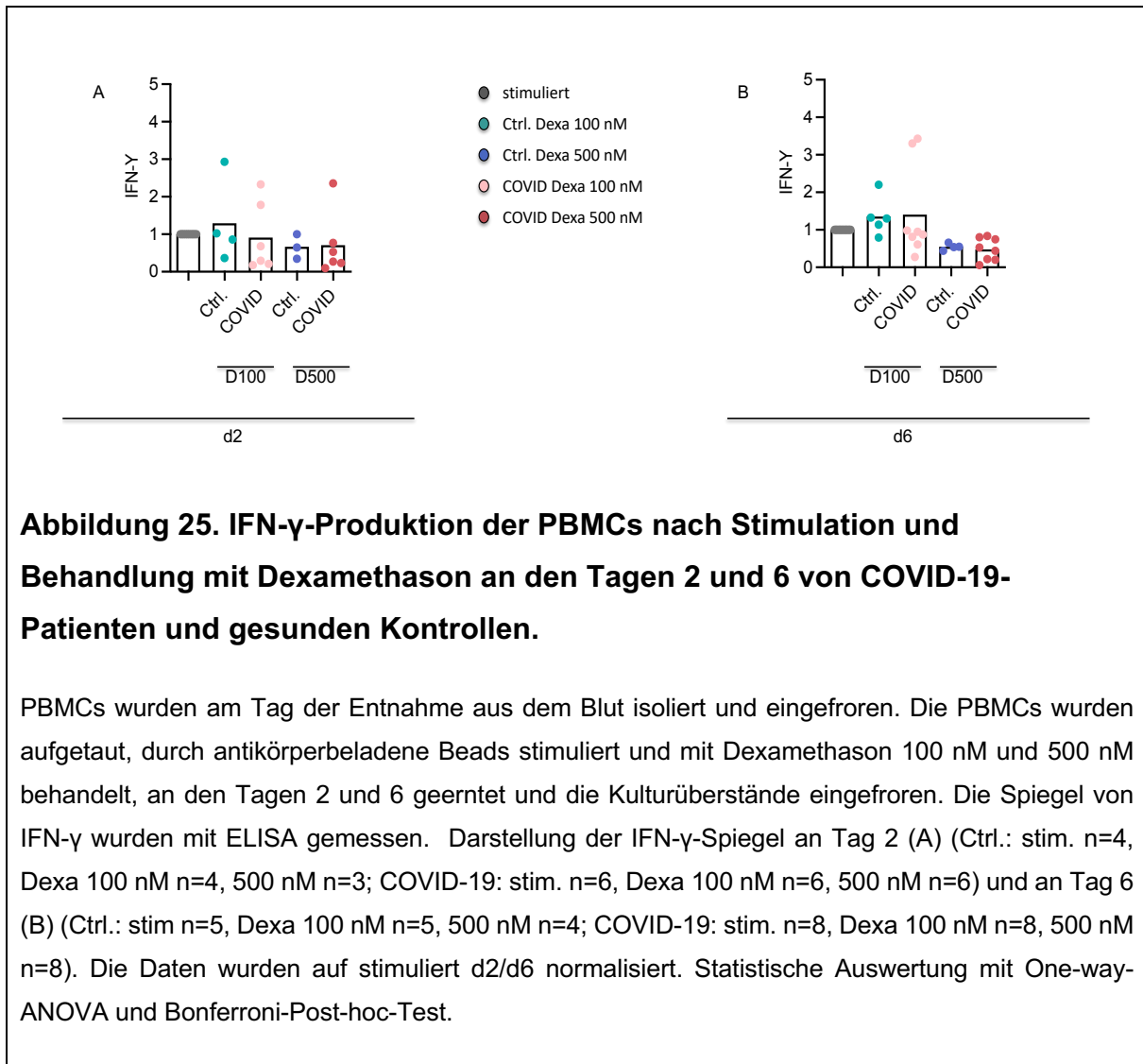


4.7 Zytokinproduktion in PBMCs von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen

In COVID-19-Infektionen kann es in schweren Fällen zu einem Zytokinsturm kommen. Deshalb wurde im Folgenden die Auswirkung von Dexamethason auf die Produktion

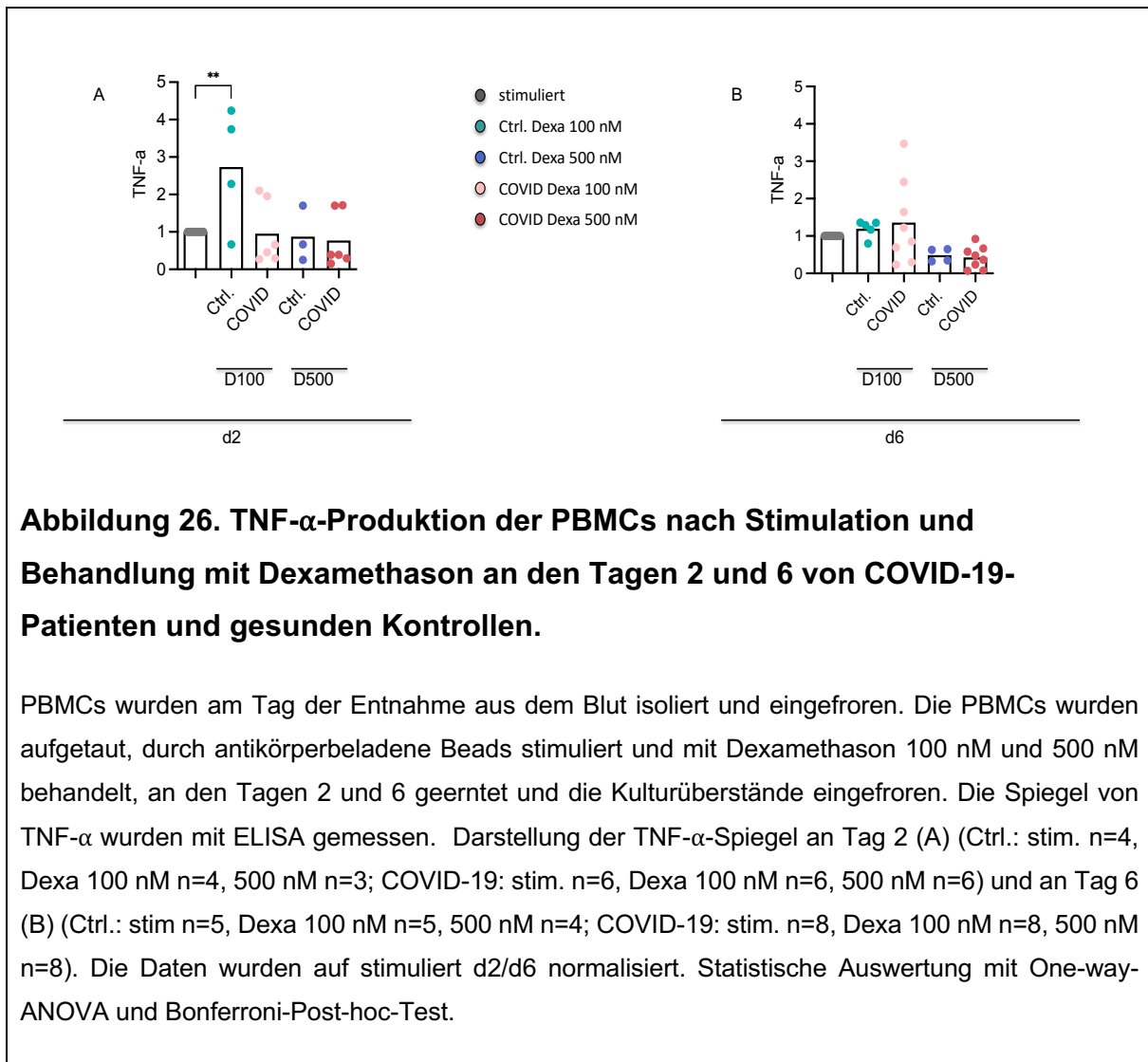
pro-inflammatorischer Zytokine untersucht. Hierzu wurden die Überstände der kultivierten Zellen von den COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen eingefroren und dann mittels ELISA die Zytokinproduktion von IFN- γ , TNF- α und IL-6 bestimmt.

Im Vergleich zu reiner Stimulation zeigte sich eine tendenzielle, nicht signifikante Senkung des IFN- γ -Spiegels durch 500 nM Dexamethason in gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten (Abbildung 25A und B).



In einem nächsten Schritt wurde der TNF- α -Spiegel bestimmt. Hier konnte in den gesunden Kontrollen an Tag 2 ein Anstieg des TNF- α -Spiegels durch Dexamethason beobachtet werden (Abbildung 26A). Des Weiteren zeigte sich tendenziell eine nicht

signifikante Senkung des TNF- α -Spiegels durch die Behandlung mit 500 nM Dexamethason an Tag 6 in gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten.



Zuletzt wurde der IL-6-Spiegel in den Kulturüberständen bestimmt. Eine Behandlung mit Dexamethason 500 nM führte zu einer Reduktion des IL-6-Spiegels der COVID-19-Patienten an Tag 6 (Abbildung 27B).

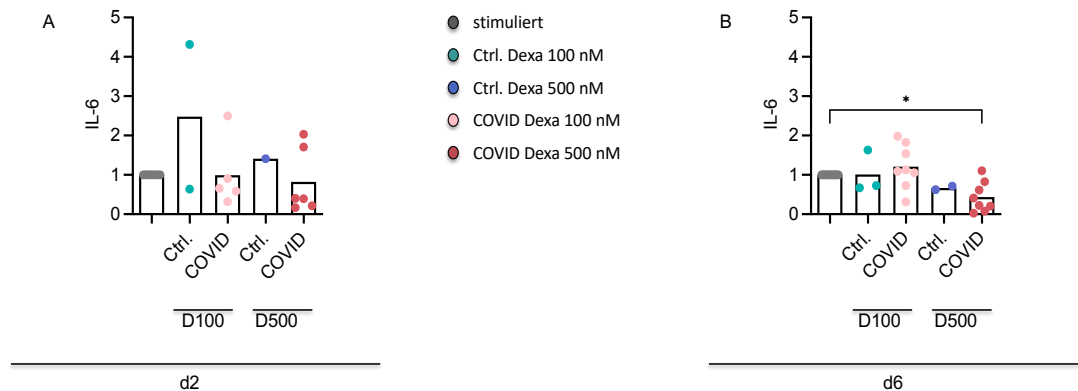


Abbildung 27. IL-6-Produktion der PBMCs nach Stimulation und Behandlung mit Dexamethason an den Tagen 2 und 6 von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen.

PBMCs wurden am Tag der Entnahme aus dem Blut isoliert und eingefroren. Die PBMCs wurden aufgetaut, durch antikörperbeladene Beads stimuliert und mit Dexamethason 100 nM und 500 nM behandelt, an den Tagen 2 und 6 geerntet und die Kulturüberstände eingefroren. Die Spiegel von IL-6 wurden mit ELISA gemessen. Darstellung der IL-6-Spiegel an Tag 2 (A) (Ctrl.: stim. n=2, Dexa 100 nM n=2, 500 nM n=1; COVID-19: stim. n=6, Dexa 100 nM n=5, 500 nM n=6) und an Tag 6 (B) (Ctrl.: stim n=3, Dexa 100 nM n=3, 500 nM n=2; COVID-19: stim. n=8, Dexa 100 nM n=8, 500 nM n=8). Die Daten wurden auf stimuliert d2/d6 normalisiert. Statistische Auswertung mit One-way-ANOVA und Bonferroni-Post-hoc-Test.

5 Diskussion

Die COVID-19-Pandemie, ausgelöst durch SARS-CoV-2, führt zu einer erhöhten Mortalität und Morbidität. Im Vordergrund der Pathogenese steht ein Ungleichgewicht der Immunantwort und eine Hypoxie, die die Schwere der Erkrankung bestimmen. Der Immunzellmetabolismus wurde in diesem Zusammenhang noch nicht ausführlich untersucht. Kortikosteroide wie Dexamethason werden zunehmend bei schweren Fällen als Therapieoption eingesetzt. Die Hypothese dieser Arbeit bestand darin, dass eine Infektion mit SARS-CoV-2 die Frequenz, die Funktion und den Metabolismus der T-Zellen beeinflusst. Dazu erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps (CD3, CD4, CD8), der Aktivierung (CD25, CD147), des Stoffwechsels (Glukoseaufnahme, Fettsäureaufnahme) und der ROS-Produktion der T-Zellen von Frischblutproben von 47 SARS-CoV-2-positiv-getesteten Patienten und 16 gesunden Spendern. Um den Metabolismus und die Zytokinproduktion genauer zu untersuchen, erfolgte eine *in-vitro*-Kultivierung mit Stimulation der T-Zellen von beiden Vergleichsgruppen. Zudem wurden die Auswirkungen von Dexamethason auf den Metabolismus und die Zytokinproduktion der T-Zellen von gesunden Spendern und SARS-CoV-2-positiven Patienten in der *in-vitro*-Kultur untersucht.

5.1 Eine COVID-19-Infektion beeinflusst die Aktivierung der T-Zellen

Um einen Virus zu eliminieren, ist eine adäquate Immunantwort wichtig. Diese besteht auch aus der Aktivierung des adaptiven Immunsystems, insbesondere der T-Zellen. Durch eine Aktivierung der T-Zelle kommt es zu einer vermehrten CD25-Expression als Teil des IL-2-Rezeptors. In den untersuchten Frischblutproben konnte eine erhöhte CD25-Expression bei schwerer COVID-19-Erkrankung in CD8⁺ T-Zellen und tendenziell in CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden (Abbildung 5). In der bisherigen Literatur wird über den Aktivierungszustand der T-Zelle während einer COVID-19-Infektion diskutiert. Xie et al. postulierten, dass CD8⁺ T-Zellen von COVID-19-Patienten eine erhöhte CD25-Aktivierung besitzen und diese mit einer vermehrten Viruspersistenz und somit kontinuierlicher Stimulation der T-Zellen verbunden ist (78). Auch Kalfaoglu et al. beschrieben einen hyperaktiven CD25-Phänotyp von CD4⁺ T-Zellen in COVID-19-Patienten mit schwerer Erkrankung. Diese CD25⁺ T-Zellen waren

vermehrt aktivierte T-Zellen und keine T_{Regs} (79). Des Weiteren konnte bei COVID-19-Patienten erhöhtes lösliches CD25 festgestellt werden (80). Dies ist bei COVID-19-Patienten assoziiert mit einem schwereren Verlauf mit erhöhten Entzündungsparametern, erhöhtem Risiko von ARDS, Leber- und Milzbeteiligung (78). Die erhöhte Konzentration des löslichen IL-2-Rezeptors könnte eine Ursache für die Lymphopenie in SARS-CoV-2 darstellen (80). Das erhöhte lösliche CD25 führte zu einer reduzierten IL-2-abhängigen T-Zell-Proliferation (43,44). *Kalfaoglu* et al. nahmen an, dass dieses vor allem von den hyperaktiven CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen in einer COVID-19-Infektion stammt (79). Hier würde sich ein negativer Feedback-Mechanismus ergeben, der die Proliferation der hyperaktiven CD4⁺ T-Zellen einschränkt.

In COVID-19 kommt es oft im Gewebe zu hypoxischen Bedingungen. Interessanterweise konnte unter pathologisch-hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) eine deutlich erhöhte CD25-Expression in stimulierten CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Andererseits konnte hier IL-2 von der Zelle nicht aufgenommen werden. Die Autoren postulierten eine gestörte IL-2-Rezeptor-Signalachse mit konsekutiv erhöhter CD25-Expression als Rückkopplungsschleife (81). Dies impliziert eine vermehrte CD25-Expression ohne funktionelle Aktivierung. Besonders intensivpflichtige COVID-19-Patienten zeigten eher eine Ermüdung/Erschöpfung der T-Zellen über eine vermehrte PD-1-Expression (18).

In der *in-vitro*-Stimulation konnte bei den CD4⁺ T-Zellen keine signifikante CD25-Expression der COVID-19-Patienten festgestellt werden (Abbildung 7A). CD8⁺ T-Zellen der COVID-19-Patienten hingegen wiesen hier eine vermehrte CD25-Expression auf (Abbildung 7B). Dabei ist jedoch einschränkend die geringe Stichprobengröße, insbesondere der gesunden Kontrollen der CD8⁺ T-Zellen, zu berücksichtigen. Basierend auf der CD25-Hochregulation der T-Zellen von COVID-19-Patienten in Frischblutproben wäre eigentlich auch unter *in-vitro*-Stimulation eine gesteigerte CD25-Expression zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung könnte in den hier vorliegenden Kulturbedingungen liegen: Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen kultiviert, während die Frischblutproben der besonders schweren COVID-19-Verläufe möglicherweise eine hypoxische Umgebung

widerspiegeln. Diese Hypoxie könnte *in-vivo* eine Ursache der verstärkten CD25-Expression darstellen.

In weiteren Experimenten sollte man zukünftig PD-1 und lösliches CD25 bestimmen, um den Aktivierungs- und Erschöpfungszustand der T-Zellen besser zu beurteilen. Eine Kultivierung der T-Zellen unter unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen könnte den Einfluss einer Hypoxie auf die CD25-Expression gezielter untersuchen.

Neben CD25 gibt es alternative transmembrane Zellrezeptoren, wie CD147, die zunehmend das Interesse im Rahmen der COVID-19-Infektion geweckt haben. CD147 wird in unterschiedlichen Zelltypen von COVID-19-Patienten exprimiert (35). CD147 wird auch verstärkt auf Immunzellen, wie T-Zellen, exprimiert (35). Bei COVID-19-Patienten mit schwerem Verlauf konnte eine erhöhte CD147-Expression in CD4⁺ und trendhaft in CD8⁺ T-Zellen in den Frischblutproben beobachtet werden (Abbildung 6). Die vermehrte Expression von CD147 auf T-Zellen bei schweren COVID-19-Fällen zeigte sich auch auf der transkriptionellen Ebene in unserer Publikation. Insbesondere COVID-19-Patienten mit DM/Adipositas wiesen eine vermehrte CD147-Expression auf (77). In weiterführenden Experimenten konnte eine Verminderung der CD147-Expression bei Genesung nachgewiesen werden (77). Die *in-vitro*-Stimulation der T-Zellen führte zu einer, wie bereits vorbeschrieben, verstärkten Induktion der CD147-Expression in COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen (Abbildung 8) (31). In unserer Publikation konnte unter hypoxischen Bedingungen (O₂ 0,5 %) eine vermehrte CD147-Expression und auch erhöhtes mitochondriales ROS in T-Zellen induziert werden (77). Die Zellen in der hier zugrunde gelegten *in-vitro*-Kultur wurden unter normoxischen Bedingungen kultiviert, während die Frischblutproben der besonders schweren COVID-19-Verläufe möglicherweise eine hypoxische Umgebung widerspiegeln. Diese Hypoxie könnte *in-vivo* die verstärkte CD147-Expression bei schweren COVID-19 Fällen bedingen.

CD147 wird auch als Eintrittspforte für SARS-CoV-2 diskutiert (24). In einer Studie konnte keine direkte Interaktion zwischen CD147 und dem SARS-CoV-2-Spike-Protein festgestellt werden (82). In einer anderen Studie wurde der Viruseintritt von einem SARS-CoV-2-Pseudovirus über CD147-Arf6-abhängige Endozytose (ADP-

ribosylation factor 6) nachgewiesen (83). *Geng et al.* konnten CD147 als Rezeptor für die Omicron-Variante nachweisen (84). Es wird auch diskutiert, ob eine Interaktion zwischen CypA und CD147 ein mögliches Eindringen des Virus in den Wirt erleichtern könnte (25). In unserer Publikation konnte eine mögliche Verbindung zwischen dem SARS-CoV-2-Spike-Protein, dem Liganden CypA und dem Rezeptor CD147 mit einer vermehrten ROS-Produktion beobachtet werden (77).

CD147 kann nicht nur Viren den Wirtseintritt ermöglichen, es spielt auch beim Energiestoffwechsel der Zellen eine Rolle. In einem Review von *Carpene et al.* konnte in mehreren Studien festgestellt werden, dass ein erhöhter Laktatspiegel in COVID-19-Patienten mit der Schwere der Erkrankung und der Mortalität korrelierte. Allerdings zeigten sich im Vergleich zu anderem schweren Erkrankungen (ARDS/Pneumonie anderer Genese) niedrigere Laktatspiegel (85). Erhöhtes Laktat kann z. B. im Rahmen der aeroben Glykolyse oder auch bei Hypoxie entstehen. Die aerobe Glykolyse wird von vielen Tumoren, aber auch von T-Zellen während der Aktivierung und Differenzierung in Effektorzellen genutzt (86). Um Laktat aus der Zelle zu entfernen, gibt es Monocarboxylat-Transporter (MCT). Tumore benötigen MCTs für das Überleben. CD147 als Chaperonprotein der MCTs scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen (87). In T-Zellen konnten ebenfalls MCTs für den Export von Laktat aus der Zelle nachgewiesen werden (88). Eine vermehrte CD147-Expression mit assoziierter MCT-Expression wurde neben Tumoren unterschiedlichster Genese auch bei Autoimmunerkrankungen, wie Psoriasis, festgestellt (86). Interessanterweise konnte bei Patienten mit septischen Schock eine Assoziation zwischen einer mitochondrialen Dysfunktion in Lymphozyten und dem erhöhtem Laktatspiegel festgestellt werden (89). Dies deutet auf einen engen Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion, Laktatanstieg und CD147 als Chaperon des Laktattransporters MCT hin. Insgesamt stellt sich hier die Frage, ob CD147 bei COVID-19 protektiv wirkt, indem es während der aeroben Glykolyse das Laktat aus den T-Zellen entfernt. In unserer Publikation zeigte sich eine vermehrte Genexpression des Laktattransporters MCT1 in T-Zellen von schwerkranken COVID-19-Patienten (77). Einschränkend ist in dieser Untersuchung der geringe Stichprobenumfang in den Frischblutproben mit „No symptoms/Mild“ (n=1) und „Moderate“ (n=3) in der CD147-Expression zu

berücksichtigen. In weiterführenden Experimenten sollte auch der Laktatspiegel bestimmt werden.

5.2 Eine COVID-19-Infektion führt zu einer metabolischen Dysregulation in T-Zellen

Eine Aktivierung der T-Zelle benötigt eine vermehrte Aufnahme von Nährstoffen, wie Glukose, um Bausteine für das Zellwachstum und ATP zur Energiegewinnung zu produzieren. Hierbei wird im Rahmen der aeroben Glykolyse Glukose in Laktat umgewandelt und von der Zelle sezerniert. Da schwer kranke COVID-19-Patienten sowohl eine erhöhte Expression von CD25 als Aktivierungsmarker als auch CD147 als Chaperon für die Laktattransporter aufweisen, könnte dies auf einen gesteigerten Glukosestoffwechsel hinweisen. Überraschenderweise konnte jedoch keine gesteigerte Glukoseaufnahme in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der COVID-19-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen festgestellt werden (Abbildung 9). Nach Unterteilung der Patienten in Risikofaktoren für einen schweren Verlauf konnte bei Patienten mit vorbekanntem DM/Adipositas sogar eine verringerte Glukoseaufnahme CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von COVID-19-Patienten beobachtet werden (Abbildung 10). Eine kardiovaskuläre Vorerkrankung und ein erhöhtes Alter zeigten keinen Einfluss auf die Glukoseaufnahme der T-Zellen (Abbildung 10). In einer *in-vitro*-Kultivierung führte eine Stimulation zu einer vermehrten Glukoseaufnahme in gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten (Abbildung 11). Hier zeigte sich eine bereits basal erhöhte Glukoseaufnahme der unstimulierten CD4⁺ T-Zellen von COVID-19-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass für diese Proben der COVID-19 Patienten keine Angaben zu metabolischen Vorerkrankungen vorlagen. Möglicherweise wurden in dieser Abbildung nur COVID-19-Patienten ohne metabolische Vorerkrankungen dargestellt.

Die Datenlage der Glukoseaufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten ist in der Literatur widersprüchlich. *Gurshaney* et al. beobachteten eine vermehrte GLUT-1 Transporter Expression bei CD8⁺ T-Zellen (90). Im Gegensatz dazu beschrieben *Liu* et al. bei aktivierten CD8⁺ T-Zellen von COVID-19-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine reduzierte Glukoseaufnahme (91). *Thomas* et al. konnten eine Hyperglykämie bei allen untersuchten COVID-19-Patienten feststellen (7). Dies könnte

möglicherweise durch eine gestörte Glukoseaufnahme begründet sein. Eine Insulinresistenz wurde zuvor auch bei T-Zellen beschrieben. *Lau et al.* zeigten, dass sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen bei Patienten mit DM-Typ 2 eine deutlich verminderte Glukoseaufnahmekapazität in Form einer Insulinresistenz aufwiesen (92). Die Glukoseaufnahme der T-Zellen von COVID-19-Patienten war bei metabolischer Vorerkrankung reduziert. Die gesunden Kontrollproben stammen von Blutspendern, bei denen laut Zulassungskriterien keine chronischen Erkrankungen, wie z. B. DM, vorlagen (93). In weiterführenden Experimenten könnte man die Glukoseaufnahme von Nicht-COVID-19-Patienten und COVID-19-Patienten mit metabolischer Vorerkrankung miteinander vergleichen, um zu erkennen, ob eine COVID-19-Infektion die Insulinresistenz der T-Zellen verstärken kann.

Es wurde eine altersbedingte Reduktion von T-Zellen in COVID-19-Patienten > 60 Jahre festgestellt (18). Das Alter, als Risikofaktor für einen schweren Verlauf, zeigte in diesen Experimenten keine Auswirkung auf die Glukoseaufnahme der T-Zellen in COVID-19 Patienten (Abbildung 10). *Nian et al.* beobachteten eine verminderte Glykolysekapazität in $CD4^+$ T-Zellen von älteren Patienten bei Aktivierung (94). Die hier verwendeten Frischblutproben wurden nicht unter stimulierten Bedingungen untersucht, deshalb könnte der Effekt auf stimulierte T-Zellen begrenzt sein.

Insgesamt konnte im Rahmen der erhöhten Aktivierung bei schwer kranken COVID-19-Patienten keine vermehrte Glukoseaufnahme nachgewiesen werden. Hier stellte sich die Frage, ob stattdessen auf andere Nährstoffe, wie z. B. Fettsäuren, als Energiequelle verwendet werden. Des Weiteren sind viele COVID-19-Patienten hypoxisch (95). Hypoxie und Hypoglykämie in einer Tumorumgebung kann zu einem metabolischen Switch der $CD8^+$ T-Zellen zur vermehrten Fettsäureaufnahme und Fettsäureoxidation führen (96). Bei COVID-19-Patienten zeigte sich nur bei mildem/asymptomatischen Verlauf („No symptoms/Mild“) eine erhöhte Fettsäureaufnahme in T-Zellen (Abbildung 12). In schweren Verläufen („Severe/Critical“) konnte eine verminderte Fettsäureaufnahme trotz erhöhter Aktivierung beobachtet werden (Abbildung 12). DM/Adipositas, kardiovaskuläre Vorerkrankungen und ein erhöhtes Alter nahmen keinen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme der T-Zellen in COVID-19 Patienten (Abbildung 13). Es wäre

möglich, dass bei schweren Fällen aufgrund einer gestörten mitochondrialen Funktion die Fettsäureoxidation und somit konsekutiv die Fettsäureaufnahme gestört wird (77). In einer metabolomischen Analyse von COVID-19-Plasmen wurden erhöhte freie Fettsäuren festgestellt. Gleichzeitig zeigten sich Hinweise für oxidativen Stress in Form von vermehrtem oxidiertem Cystin und vermindertem reduziertem Cystein, möglicherweise als Zeichen einer verminderten mitochondrialen FAO (7). Guntur et al. beschrieben einen veränderten mitochondrialen Lipidstoffwechsel mit gestörter Fettsäureoxidation bei Post-COVID-Patienten (97). Patienten mit Post-COVID-Syndrom zeigten während körperlicher Belastung eine verminderte Fettsäureoxidation und eine vermehrte Laktatansammlung, hinweisgebend auf eine eingeschränkte mitochondriale Funktion (98). In unserer Publikation konnte bei einer Familie mit milden COVID-19-Symptomen im Verlauf der Rekonvaleszenz eine kontinuierliche abnehmende Fettsäureaufnahme bei initial erhöhter Fettsäureaufnahme festgestellt werden (77). Die erhöhte Fettsäureaufnahme korrelierte negativ mit einer geringen CD147-Expression in milden Fällen („No symptoms/Mild“). Umgekehrt zeigte sich bei schweren Fällen („Severe/Critical“) eine erniedrigte Fettsäureaufnahme mit erhöhter CD147-Expression (77). In HCC führte die CD147-Expression zur de-novo-Lipogenese und Hemmung der FAO (99).

In einer *in-vitro*-Kultivierung konnte interessanterweise nach Stimulation eine erhöhte Fettsäureaufnahme in T-Zellen von COVID-19-Patienten festgestellt werden (Abbildung 14). Hierbei ist einschränkend die geringe Stichprobenzahl, insbesondere in den CD8⁺ T-Zellen der gesunden Kontrollen, zu erwähnen. Im Rahmen der gestörten mitochondrialen Funktion könnte es auch kompensatorisch zu einer erhöhten Fettsäureaufnahme kommen, ohne dass die Fettsäuren wirklich oxidiert werden.

5.3 Eine COVID-19-Infektion führt zu vermehrtem oxidativem Stress in T-Zellen

Durch die Aktivierung von T-Zellen und die damit verbundene Glukoseaufnahme und vermehrte OXPHOS (Oxidative Phosphorylierung) kann auch ROS entstehen, welches pro-apoptotisch wirken kann (100). Eine physiologische Menge an mitochondrialem ROS ist wichtig für die T-Zell-Aktivierung und -Funktion.

Mitochondrialer Metabolismus kann auch in Abwesenheit von Glukose die T-Zell-Viabilität und -Aktivierung aufrechterhalten (101). ROS kann aber auch oxidativen Stress auslösen (62). Oxidativer Stress ist definiert durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und den anti-oxidativen Verteidigungsmechanismen (intrazelluläre Enzyme, Vitamine, extrazelluläre Bindungspartner). Im Rahmen der mit der Doktorarbeit zusammenhängenden Publikation wurden weitere Experimente durchgeführt, die zeigten, dass ROS vor allem in T-Zellen von schwerkranken COVID-19-Patienten („Severe/Critical“) anstieg. Es zeigte sich bei Genesung ein Abfall der ROS-Spiegel (77). In der hier behandelten *in-vitro*-Kultivierung führte die Stimulation der T-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der ROS-Produktion in COVID-19-Patienten (Abbildung 15).

Warum steigt die ROS-Produktion durch die Stimulation der T-Zellen von COVID-19 Patienten? Auch eine mitochondriale Schädigung kann zu einer vermehrten ROS-Induktion führen. Bereits oben wurde als mögliche Ursache für die verminderte Fettsäureaufnahme eine verminderte FAO aufgrund einer mitochondrialen Dysfunktion diskutiert (Abschnitt 5.2). In COVID-19-Infektionen wird eine mitochondriale Dysfunktion mit verstärkter mitochondrialer ROS-Produktion als Ursache für den oxidativen Stress thematisiert (71). Es kommt über eine gesteigerte mitochondriale Permeabilität zu einer gesteigerten Ausschüttung von ROS (72). *Liu et al.* beschrieben eine gestörte mitochondriale Funktion der T-Zellen von COVID-19-Patienten (91). *Thompson et al.* beschrieben ebenfalls eine spezielle T-Zell-Subpopulation bei COVID-19-Patienten, charakterisiert durch eine von mitochondrialer Dysfunktion ausgelösten Apoptose (102). Auch in unserer Publikation zeigte sich eine erhöhte mitochondriale Masse und mitochondriale Defekte in T-Zellen von schwerkranken COVID-19-Patienten („Severe/Critical“) (77).

Das erhöht gemessene intrazelluläre ROS in den hier vorliegenden Experimenten könnte auch von NOX produziert werden. NOX sind Bestandteile von NADPH-Oxidasen und produzieren ROS. In einer Studie führte Dexamethason in Mikroglia über die Hemmung von NOX zur konsekutiv verminderten ROS-Produktion (103). In unserer Publikation zeigte sich eine Erhöhung von einem NOX-Aktivator in CD4⁺ T-Zellen. Hier konnte die NOX-Inhibition die ROS-Spiegel in T-Zellen senken (77).

Ebenso kann eine direkte Infektion mit SARS-CoV-2 ROS induzieren. In unserer Publikation wurden weitere Experimente durchgeführt, die zeigten, dass sowohl CypA als auch SARS-CoV-2-Spike-Protein eine ROS-Produktion in T-Zellen induzieren können (77). Interessanterweise zeigten *Shen* et al., dass es zu einer ACE-2-Rezeptor-unabhängigen Infektion mit SARS-CoV-2 von CD4⁺ T-Zellen kommen kann. Die SARS-CoV-2-Infektion triggerte die T-Zell-Apoptose verbunden mit vermehrter Genexpression von Markern, die mit oxidativem Stress assoziiert sind (20).

Da Cystin anti-oxidativ wirkt und ein indirekter Marker von oxidativem Stress darstellt, wurde untersucht, wie sich die Cystin-Aufnahme in den T-Zellen von COVID-19-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen verhält. Cystin wird intrazellulär zu Cystein umgewandelt; als Baustein für Glutathion wirkt es einer vermehrten ROS-Produktion entgegen. Eine vermehrte Aufnahme von Cystin könnte auf vermehrtes intrazelluläres ROS hindeuten. Eine reduzierte Aufnahme von Cystin könnte wiederum zu einer vermehrten ROS-Produktion führen (68).

Da bei Stimulation die ROS-Produktion in T-Zellen von COVID-19-Patienten wesentlich anstieg, zeigte sich in diesem Zusammenhang auch eine vermehrte Cystine-FITC Aufnahme (Abbildung 16). Einschränkend ist in den hier durchgeführten Experimenten jedoch die geringe Stichprobenzahl an Tag 2 zu erwähnen. In COVID-19-Patienten zeigte sich ein verminderter Cystin-Spiegel im Serum, der nach Zusammenschau der Befunde aufgrund eines vermehrten Verbrauchs von Cystin entstehen könnte (104). Da Cystin ein wichtiger Baustein von Glutathion ist, konnten deutlich verminderte Glutathion-Konzentrationen bei sogar jungen COVID-19-Patienten festgestellt werden (105). Eine orale Therapie mit N-Acetyl-Cystein konnte die Mortalität von COVID-19-Patienten senken (106).

5.4 Auswirkung von Dexamethason *in-vitro* auf T-Zell Aktivierung, Metabolismus, Zytokinproduktion und oxidativen Stress

In COVID-19 kommt es zu Hypoxie, viele Patienten sind initial asymptomatisch bei bereits deutlich reduzierter Sauerstoffsättigung im Blut (107). Unter pathologisch hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) zeigte sich in einer früheren Studie bei aktivierten T-Zellen eine verminderte Proliferation (81). Sowohl unter physiologisch-hypoxischen

Bedingungen (5 % O₂) und Normoxämie kam es in *in-vitro* bei Stimulation von T-Zellen initial zu einem intrazellulärem ROS-Anstieg, der aber im Verlauf abfiel. Dieser wurde im Rahmen der Aktivierung als physiologisch gesehen. Bei pathologisch-hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) kam es zu einem langsamen und kontinuierlichen Anstieg des intrazellulärem ROS, der nicht abfiel (81). Im Rahmen der mit der Doktorarbeit zusammenhängenden Publikation wurden weitere Experimente durchgeführt, die zeigten, dass in Hypoxie kultivierten T-Zellen vermehrt ROS und CD147 induziert wird (77). Es gibt Hinweise, dass Glukokortikoide ihre Wirkung besonders in einer hypoxischen Umgebung entfalten können. Bei renalen Epithelzellen des proximalen Tubulus führt eine Hypoxie zu einer verstärkten Glukokortikoidrezeptorinduktion (108). Im RECOVERY Trial profitierten vor allem COVID-19-Patienten mit Beatmung von Dexamethason, hinweisgebend, dass sich auch klinisch die Wirkung vor allem in einer hypoxischen Situation entfaltet (40). In einer Studie zeigte sich sogar eine deutlich erhöhte Mortalität der hospitalisierten, nicht sauerstoffpflichtigen COVID-19-Patienten durch Dexamethasongabe (109). Deshalb wurde untersucht, inwiefern sich Dexamethason auf die CD147-Expression und ROS-Induktion der T-Zellen von COVID-19-Patienten auswirkt. In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich kein Einfluss von Dexamethason auf die CD147-Expression, ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunde Kontrollen (Abbildungen 17,18, 20).

In weiterführenden Experimenten in unserer Publikation zeigte sich bei COVID-19-Patienten, die laut RECOVERY Trial *in-vivo* Dexamethason erhalten hatten, keine erhöhte ROS-Produktion oder CD147-Expression. Hier konnte Dexamethason *in-vitro* die ROS-Produktion und CD147-Expression in T-Zellen der gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten signifikant senken. Warum kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen in den hier durchgeführten Untersuchungen? In diesen Experimenten unterschied sich das Patientenkollekt. Die Patienten aus den Experimenten dieser Doktorarbeit hatten im Rahmen der 1. Kohorte noch kein Dexamethason *in-vivo* erhalten. Die untersuchten Patienten in unserer Publikation hatten bereits *in-vivo* Dexamethason laut RECOVERY Trial erhalten. Dementsprechend waren die T-Zellen hier bereits mit Dexamethason vorbehandelt. Des Weiteren erfolgte in den Untersuchungen in unserer Publikation bereits nach 72 h die *in-vitro* Auswertung, die

hier vorliegenden T-Zellen aus den Experimenten dieser Doktorarbeit wurden für insgesamt 5 Tage mit Dexamethason behandelt. Hier könnten die T-Zellen schon herausproliferiert sein (77).

Glukokortikoide wie Dexamethason haben pleiotrope Effekte auf das Immunsystem. So wirken sie sich negativ auf die Leukozytenmobilisierung zu einem Infektionsort und die Reifung von antigenpräsentierenden Zellen, wie den dendritischen Zellen, aus. T-Zell-Rezeptor-Signale werden bei Aktivierung von Glukokortikoiden über verschiedene Mechanismen negativ beeinflusst (39). Auch die Differenzierung von T-Zellen werden von Glukokortikoiden zugunsten eines eher immunsuppressiven Phänotyps beeinflusst. Insgesamt wurde eine vermehrte Differenzierung von T-Zellen zu T_H2 und T_{Reg} s beschrieben (39). In einem Mausmodell wurden durch die Gabe von Dexamethason vor allem die $CD4^+CD25$ regulatorischen T_{Reg} s stimuliert (110). Eine Behandlung mit Dexamethason bei COVID-19-Patienten führte zu einer veränderten Dynamik der Entzündungsparameter PCT, CRP und LDH (111).

Die Proliferation der T-Zellen kann durch Glukokortikoide unterschiedlich beeinflusst werden. Einerseits können Glukokortikoide dosisabhängig die Zellzahl der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in einem Mausmodell reduzieren (110). Dexamethason blockiert in $CD3/CD80$ -stimulierten T-Zellen (*in-vitro* und *in-vivo* im murinen Modell) über die vermehrte Expression von CTLA-4 und auch PD-1 den Zellzyklus, dies betrifft vor allem naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (112). Andererseits kann Dexamethason über die verstärkte Expression des IL-7-Rezeptors die Viabilität von T-Zellen positiv beeinflussen (113). Pappas et al. verglichen die Lymphozytenzahlen von COVID-19-Patienten: Vor Beginn einer Dexamethasontherapie zeigten COVID-19-Patienten mit respiratorischer Insuffizienz eine deutliche Lymphopenie. Bei COVID-19-Patienten, die sich durch die Dexamethasontherapie klinisch besserten, zeigte sich ein Anstieg der $CD3^+$ T-Zellen. Patienten, die von der Dexamethasontherapie nicht profitierten, zeigten weiterhin eine Lymphopenie (114). Eine andere Studie ergab nach Behandlung mit Dexamethason verringerte SARS-CoV-2-spezifische $CD4^+$ T-Zellen in COVID-19-Patienten (111). Augenscheinlich können die $CD3^+$ T-Zellen unterschiedlich auf die Wirkung von Dexamethason ansprechen.

In dieser Arbeit konnte kein negativer Effekt von Dexamethason auf die Viabilität der T-Zellen von COVID-19-Patienten und gesunden Kontrollen beobachtet werden (Abbildung 23). In den hier durchgeführten Experimenten wurden die T-Zellen mit einem Antikörper gegen CD3/CD28 stimuliert. *Giles et al.* beschrieben, dass die direkte Ligation von CD28 eine durch Dexamethason verursachte Blockade des Zellzyklus verhindern konnte (112).

Es stellte sich die Frage, ob Dexamethason eine Auswirkung auf die Aktivierung der T-Zellen hat. Dexamethason führte in den hier durchgeführten Experimenten sowohl bei den gesunden Spendern als auch bei den COVID-19-Patienten zu keiner Veränderung der CD25 Expression (Abbildung 19). IL-2 und der IL-2-Rezeptor sind wichtig für die Proliferation von T-Zellen. Dexamethason inhibiert transkriptionell das IL-2-Gen und somit die IL-2-Produktion, hat aber keinen direkten Einfluss auf die IL-2-Rezeptor-Expression. Exogen hinzugefügtes IL-2 kann die Inhibition von Dexamethason auf den IL-2-Rezeptor aufheben (115). In der hier durchgeführten Kultivierung enthielt das T-Zellmedium IL-2, weshalb der inhibitorische Effekt von Dexamethason vielleicht aufgehoben wurde.

Hat Dexamethason eine Auswirkung auf den Metabolismus von T-Zellen? Es zeigte sich, dass eine steigende Konzentration von Dexamethason nur bei den T-Zellen der COVID-19-Patienten zu einer verminderten Glukoseaufnahme führte (Abbildung 21). Zuvor wurde gezeigt, dass T-Zellen von COVID-19-Patienten bei metabolischer Vorerkrankung vermindert Glukose aufnehmen konnten. Bei T-Zellen kann ebenfalls eine Insulinresistenz auftreten (92). Die Gabe von Dexamethason bei einer COVID-19-Infektion kann jedoch eine bestehende DM-Erkrankung verschlechtern oder zu einem steroidinduzierten Diabetes mellitus führen (116).

Ein steroidinduzierter DM ist eine bekannte Nebenwirkung. Therapeutische Dosierungen von Prednison induzieren eine Insulinresistenz, charakterisiert durch eine deutlich verminderte Glukoseaufnahme der Zellen (117). Weiterhin hat Dexamethason einen negativen Einfluss auf die insulinabhängige Glukoseaufnahme in Muskelzellen (118). Es besteht die Möglichkeit, dass synthetische Glukokortikoide auch einen Einfluss auf die insulinabhängige Glukoseaufnahme der T-Zellen nehmen.

In den CD4⁺ T-Zellen zeigte sich durch die Behandlung mit Dexamethason keine Veränderung der Fettsäureaufnahme bei gesunden Kontrollen und COVID-19 Patienten. In den CD8⁺ T-Zellen zeigte sich interessanterweise eine verringerte Fettsäureaufnahme durch eine steigende Konzentration von Dexamethason in den gesunden Kontrollen.

In COVID-19 wird insgesamt eine dysregulierte Immunantwort diskutiert. In 28 % der Todesfälle wurde eine Sepsis aufgrund eines Zytokinsturms beschrieben (5). Kommt es zu aufgrund einer überschießenden/dysregulierten Immunreaktion zu einer massiven Zytokinausschüttung, spricht man von einem cytokine release syndrom (CRS) oder auch von einem Zytokinsturm (119,120). Ein Zytokinsturm kann durch unterschiedlichste infektiöse und nicht infektiöse Erkrankungen ausgelöst werden. Es kommt zu einer Schädigung der Körpers bis zum Multiorganversagen (120). Deshalb wurde in diesem Zusammenhang die Auswirkung von Dexamethason auf die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IFN- γ untersucht.

IL-6 gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und ist ein zentrales Zytokin im CRS (41,45). Die Datenlage der Zytokinspiegel variiert in der Literatur. Einerseits beschrieben *Petrushevska et al.* erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 in schweren COVID-19-Verläufen. Durch d-ROM und PAT wurde ein deutlich erhöhter oxidativer Stress nachgewiesen, korrelierend mit den erhöhten IL-6-Spiegel (121). In einer Metaanalyse zeigte sich eine Assoziation zwischen erhöhtem IL-6 und der Mortalität und Morbidität einer COVID-19-Infektion (122). Der IL-6-Rezeptorantikörper Tocilizumab führte in einer Metaanalyse bei COVID-19-Patienten zu einer reduzierten Mortalität, zu einem reduzierten Progress zu einer künstlichen Beatmung und zu einer verkürzten Liegedauer (123).

Andererseits wurde der IL-6-Spiegel in COVID-19-Patienten im Vergleich zu IL-6-Spiegeln in ARDS- und Sepsis-Patienten niedriger gemessen (120,124). In einer Metaanalyse zeigten sich die IL-6-Spiegel in COVID-19-Infektionen im Vergleich zu CAR-T-Zell-induzierten Zytokinfreisetzungssyndrom, ARDS anderer Genese und Sepsis deutlich niedriger (125).

In den hier durchgeführten Experimenten konnte interessanterweise eine Reduktion der IL-6-Spiegel durch eine Konzentration von 500 nM Dexamethason bei den COVID-19-Patienten an Tag 6 der Stimulation festgestellt werden (Abbildung 27). Einschränkend zu erwähnen ist die geringe Stichprobenzahl der gesunden Kontrollen.

TNF- α wurde als zentrales Zytokin im Zytokinsturm beschrieben (49). Einerseits zeigte sich TNF- α besonders bei COVID-19-Patienten mit schwerem Verlauf deutlich erhöht. Dies war mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (126). In unserer Publikation zeigte sich ebenfalls eine signifikante Anreicherung von Genen assoziiert mit der TNF-Signalübertragung in CD4⁺ T-Zellen von COVID-19-Patienten (77). Andererseits konnten deutlich niedrigere TNF- α -Spiegel bei COVID-19 im Vergleich zu Sepsis und CRS anderer Genese nachgewiesen werden (125). In mehreren Studien und Metaanalysen zeigten Patienten, die aufgrund einer Autoimmunerkrankung bereits einen TNF- α -Antikörper erhielten, eine deutlich verminderte Mortalität und Hospitalisierungsrate bei einer COVID-19-Infektion (49,127,128). In den hier durchgeführten *in-vitro*-Kultivierungen führte 500 nM Dexamethason zwar zu keinem signifikanten Effekt, aber tendenziell zu einer Verminderung des TNF- α -Spiegels an Tag 6 in gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten (Abbildung 26).

Bezüglich des Zytokins IFN- γ ergibt sich eine widersprüchliche Datenlage in der Literatur. In mehreren Studien konnte keine oder nur eine geringe Erhöhung des IFN- γ -Spiegels festgestellt werden (18,125,126). In der Studie von *Remy et al.* zeigte sich sogar eine deutlich verminderte IFN- γ -Produktion der T-Zellen bei COVID-19-Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollen oder Sepsis anderer Genese. Hier wird bei supprimierten T-Zellzahlen mit supprimierter IFN- γ -Produktion eher eine Immunsuppression als Pathogenese von COVID-19 diskutiert (129). Je niedriger der IFN- γ -Spiegel, desto wahrscheinlicher entstanden Komplikation im weiteren stationären Verlauf (130). *Cremoni et al.* diskutierten niedrige IFN- γ -Spiegel als prädiktiven Marker für eine mögliche Hospitalisierung bei einer COVID-19-Infektion (131). Es wird auch ein Fallbeispiel genannt, in dem bei Besserung der Symptome der IFN- γ -Spiegel wieder anstieg (130). Bemerkenswerterweise wird in COVID-19, wie oben beschrieben, erhöhtes lösliches CD25 festgestellt. Lösliches CD25 führt zur einer reduzierten IL-2-abhängigen T-Zell Proliferation und auch IFN- γ -Produktion (43,44).

In Patienten mit persistierenden Symptomen einer COVID-19 Infektion, auch als Long-COVID Post-COVID-Syndrom definiert, wird hingegen eine erhöhte IFN- γ -Sekretion der CD8⁺ T-Zellen beschrieben. Die Verbesserung der Symptome zeigte sich laborchemisch in einer Normalisierung der IFN- γ -Spiegel. Hier wurde der IFN- γ -Spiegel von COVID-19-Patienten 28 Tage nach Feststellung der Infektion bestimmt, es zeigten sich erhöhte IFN- γ -Spiegel, die sich jedoch nach 180 Tagen normalisierten (132). Man könnte allerdings argumentieren, dass die IFN- γ -Spiegel in früheren Stadien vermutlich eher die akute COVID-19-Erkrankung darstellen. Eine verzögerte IFN- γ -Produktion könnte nachfolgend an der Pathogenese von Long-COVID beteiligt sein. In den hier durchgeführten *in-vitro*-Kultivierungen führte 500 nM Dexamethason zwar zu keinem signifikanten Effekt, aber tendenziell zu einer Verminderung des IFN- γ -Spiegels an Tag 6 in gesunden Kontrollen und COVID-19-Patienten (Abbildung 25).

Zusammenfassend zeigte sich eine signifikante Senkung des IL-6-Spiegels und tendenzielle Senkungen der TNF- α - und IFN- γ -Spiegel unter 500 nM Dexamethason. Dies steht im Einklang mit der bestehenden Literatur. Glukokortikoide vermindern die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie auch IL-6, IFN- γ , TNF- α (39). Durch *in-vitro*-Gabe von Glukokortikoiden, insbesondere Dexamethason, konnte in Makrophagen eine verminderte IL-6-Sekretion festgestellt werden (133). Klinisch konnte bei 9 COVID-19-Patienten, die mit Methylprednisolon behandelt wurden, ein Anstieg der Lymphozytenzahl und eine Verminderung von CRP und IL-6-Spiegel festgestellt werden (133).

Dexamethason kann *in-vitro* und *ex-vivo* bei COVID-19-Patienten oder Zellen, die mit SARS-CoV-2 stimuliert wurden, IFN- γ - und IL-6-Spiegel sowohl auf transkriptioneller- als auch Proteinebene senken (134). Eine *in-vitro*-Behandlung von T-Zellen der COVID-19-Patienten mit Dexamethason zeigte eine verminderte IFN- γ -Produktion. Diese wurde durch IL-7 wieder aufgehoben. Es zeigte sich vor allem bei T-Zellen von nicht intensivpflichtigen Patienten eine verminderte IFN- γ -Produktion durch Gabe von Dexamethason, vielleicht auch ursächlich für die erhöhte Mortalität bei Therapie mit Glukokortikoiden in nicht beatmungspflichtigen Patienten (135).

TNF- α - und IL-6-Spiegel sind bei COVID-19-Patienten zwar oft erhöht, jedoch nicht im Vergleich zu Sepsis/ARDS etc. anderer Genese. Die IFN- γ -Spiegel bei COVID-19-Patienten liegen eher im niedrigen bis normalen Bereich. *Diao et al.* argumentierten sogar, dass die Zytokine eher nicht von T-Zellen stammen (18).

Zusammenfassend beeinflusst eine Infektion mit SARS-COV-2 die Funktion und den Metabolismus der T-Zellen.

Es ergab sich in T-Zellen von COVID-19-Patienten das Bild einer vermehrten Aktivierung mit metabolischer Dysregulation, vermehrtem oxidativem Stress und eingeschränkter *in-vitro*-Wirkung von Dexamethason.

Da sich in vorläufigen Experimenten keine wegweisenden Befunde in den Färbungen von IgA, IgG, CD38, CD56, CD20, CD11b, CD98, CD56, CD66 ergab, wurde auf eine endgültige Auswertung verzichtet. Des Weiteren wurde der Datensatz zur Vitamin C-Gabe aufgrund von Unsicherheiten in Bezug auf die Konsistenz der Dosierung und einer niedrigen Fallzahl nicht berücksichtigt.

Die Erythrozytenlyse von frischen humanen Vollblutproben erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Kreutz. Die hier dargestellten Färbungen erfolgten durch den Autor der Arbeit. Die durchflusszytometrische Messung der Frischblutproben erfolgte freundlicherweise durch Frau Sonja-Maria Decking und Frau Nathalie Babl. Die Auswertung der Frischblutproben erfolgte durch den Autor der Arbeit. Die weitere Kultivierung der Zellen mit Stimulation, Behandlung, Ernte, Färbung, durchflusszytometrischer Messung, sowie die Auswertung erfolgten durch den Autor der Arbeit. Die ELISA-Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Monika Wehrstein, die Auswertung erfolgte durch den Autor der Arbeit.

6 Zusammenfassung

Die COVID-19 Pandemie, ausgelöst durch SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus), führt zu einer erhöhten Mortalität und Morbidität. Im Vordergrund der Pathogenese steht ein Ungleichgewicht der Immunzellen und eine Hypoxie, die die Schwere der Erkrankung bestimmen. Der Immunzellmetabolismus wurde in diesem Zusammenhang noch nicht ausführlich untersucht. Kortikosteroide, wie Dexamethason, werden zunehmend bei schweren Fällen als Therapieoption angewandt.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Hypothese, dass eine Infektion mit SARS-CoV-2 die Frequenz, die Funktion und den Metabolismus der T-Zellen beeinflusst. Um diese Fragestellung zu erörtern, wurden Vollblutproben von 47 SARS-CoV-2-positiv-getesteten-Patienten und 16 gesunden Spendern bearbeitet. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps (CD3, CD4, CD8), der Aktivierung (CD25, CD147), und des Stoffwechsels (Glukoseaufnahme, Fettsäureaufnahme), der ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme der T-Zellen. Außerdem wurden die Auswirkungen von Dexamethason auf eine mononukleäre Zellkultur untersucht.

Die T-Zellen von COVID-19-Patienten zeigten in schweren Verläufen der analysierten Frischblutproben eine vermehrte CD25- und CD147-Expression als Zeichen der verstärkten Aktivierung. Im Gegensatz dazu zeigte sich die dafür benötigte Aufnahme der Nährstoffe deutlich eingeschränkt. In COVID-19-Patienten mit metabolischer Vorerkrankung konnte eine deutlich erniedrigte Glukoseaufnahme festgestellt werden. In schweren Verläufen der COVID-19-Infektion zeigte sich im Vergleich zu milden Verläufen eine verminderte Aufnahme von Fettsäuren, möglicherweise bedingt durch eine mitochondriale Dysfunktion. Eine *in-vitro*-Stimulation von T-Zellen der COVID-19-Patienten erbrachte eine vermehrte ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme, hinweisgebend auf vermehrten oxidativen Stress. Eine *in-vitro*-Behandlung mit Dexamethason führte im Vergleich zu *in-vivo*-vorbehandelten T-Zellen (77) zu keiner Änderung der ROS-Produktion und Cystine-FITC-Aufnahme. Ebenfalls konnte keine Auswirkung von Dexamethason auf die Fettsäureaufnahme und die CD25- und CD147-Expression der T-Zellen von COVID-19-Patienten festgestellt werden. Die Glukoseaufnahme der T-Zellen wurde bei COVID-19-Patienten durch Dexamethason

sogar weiter verringert, hinweisgebend auf eine verstärkte Induktion der Insulinresistenz. Durch die Behandlung mit Dexamethason konnten *in-vitro* die Zytokin-Spiegel von IL-6 signifikant und von TNF- α und IFN- γ tendenziell gesenkt werden. Zusammenfassend ergab sich in T-Zellen von COVID-19-Patienten das Bild einer vermehrten Aktivierung mit metabolischer Dysregulation, vermehrtem oxidativem Stress und eingeschränkter *in-vitro*-Wirkung von Dexamethason.

7 Literaturverzeichnis

1. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, u. a. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl.* 15 2020;395(10223):497–506.
2. COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard [Internet]. [zitiert 5. Juli 2025]. Verfügbar unter: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=o>
3. datadot [Internet]. [zitiert 5. Juli 2025]. COVID-19 deaths | WHO COVID-19 dashboard. Verfügbar unter: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
4. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, u. a. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270–3.
5. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363–74.
6. Docherty AB, Harrison EM, Green CA, Hardwick HE, Pius R, Norman L, u. a. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ.* 22. Mai 2020;369:m1985.
7. Thomas T, Stefanoni D, Reisz JA, Nemkov T, Bertolone L, Francis RO, u. a. COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. *JCI Insight.* 23. Juli 2020;5(14):e140327, 140327.
8. Ayres JS. A metabolic handbook for the COVID-19 pandemic. *Nat Metab.* 2020;2(7):572–85.
9. Reiterer M, Rajan M, Gómez-Banoy N, Lau JD, Gomez-Escobar LG, Ma L, u. a. Hyperglycemia in acute COVID-19 is characterized by insulin resistance and adipose tissue infectivity by SARS-CoV-2. *Cell Metab.* 2. November 2021;33(11):2174-2188.e5.

10. Wang Y, Yi B, Wang S, Chen X, Wen Z. Effect of hyperglycemia on the immune function of COVID-19 patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective study. *PeerJ*. 2022;10:e14570.
11. Lighter J, Phillips M, Hochman S, Sterling S, Johnson D, Francois F, u. a. Obesity in Patients Younger Than 60 Years Is a Risk Factor for COVID-19 Hospital Admission. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 28. Juli 2020;71(15):896–7.
12. Zhang XJ, Qin JJ, Cheng X, Shen L, Zhao YC, Yuan Y, u. a. In-Hospital Use of Statins Is Associated with a Reduced Risk of Mortality among Individuals with COVID-19. *Cell Metab*. 4. August 2020;32(2):176-187.e4.
13. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, u. a. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA*. 28. April 2020;323(16):1574–81.
14. Tian M, Liu W, Li X, Zhao P, Shereen MA, Zhu C, u. a. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal Transduct Target Ther*. 18. August 2021;6(1):308.
15. Dayaramani C, De Leon J, Reiss AB. Cardiovascular Disease Complicating COVID-19 in the Elderly. *Medicina (Mex)*. 17. August 2021;57(8):833.
16. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, u. a. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl*. 28 2020;395(10229):1054–62.
17. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, u. a. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. 01 2020;130(5):2620–9.
18. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, u. a. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020;11:827.

19. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, u. a. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 16 2020;181(2):271-280.e8.
20. Shen XR, Geng R, Li Q, Chen Y, Li SF, Wang Q, u. a. ACE2-independent infection of T lymphocytes by SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther*. 11. März 2022;7(1):83.
21. Kuklina EM. T Lymphocytes as Targets for SARS-CoV-2. *Biochem Biokhimiia*. Juni 2022;87(6):566–76.
22. Brunetti NS, Davanzo GG, de Moraes D, Ferrari AJR, Souza GF, Muraro SP, u. a. SARS-CoV-2 uses CD4 to infect T helper lymphocytes. *eLife*. 31. Juli 2023;12:e84790.
23. Shouman S, El-Kholy N, Hussien AE, El-Derby AM, Magdy S, Abou-Shanab AM, u. a. SARS-CoV-2-associated lymphopenia: possible mechanisms and the role of CD147. *Cell Commun Signal CCS*. 4. Juli 2024;22(1):349.
24. Wang K, Chen W, Zhang Z, Deng Y, Lian JQ, Du P, u. a. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct Target Ther*. 4. Dezember 2020;5(1):283.
25. Liu C, von Brunn A, Zhu D. Cyclophilin A and CD147: novel therapeutic targets for the treatment of COVID-19. *Med Drug Discov*. September 2020;7:100056.
26. Muramatsu T. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *J Biochem (Tokyo)*. Mai 2016;159(5):481–90.
27. Pushkarsky T, Zybarth G, Dubrovsky L, Yurchenko V, Tang H, Guo H, u. a. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22. Mai 2001;98(11):6360–5.
28. Vanarsdall AL, Pritchard SR, Wisner TW, Liu J, Jardetzky TS, Johnson DC. CD147 Promotes Entry of Pentamer-Expressing Human Cytomegalovirus into Epithelial and Endothelial Cells. *mBio*. 08 2018;9(3).

29. Watanabe A, Yoneda M, Ikeda F, Terao-Muto Y, Sato H, Kai C. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J Virol.* Mai 2010;84(9):4183–93.
30. Chen Z, Mi L, Xu J, Yu J, Wang X, Jiang J, u. a. Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Infect Dis.* 1. März 2005;191(5):755–60.
31. Damsker JM, Bukrinsky MI, Constant SL. Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by extracellular cyclophilin A. *J Leukoc Biol.* September 2007;82(3):613–8.
32. Bian H, Zheng ZH, Wei D, Zhang Z, Kang WZ, Hao CQ, u. a. Meplazumab treats COVID-19 pneumonia: an open-labelled, concurrent controlled add-on clinical trial [Internet]. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*; 2020 März [zitiert 13. Oktober 2020]. Verfügbar unter: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.03.21.20040691>
33. Bian H, Chen L, Zheng ZH, Sun XX, Geng JJ, Chen R, u. a. Meplazumab in hospitalized adults with severe COVID-19 (DEFLECT): a multicenter, seamless phase 2/3, randomized, third-party double-blind clinical trial. *Signal Transduct Target Ther.* 30. Januar 2023;8(1):46.
34. Bian H, Chen L, Zhang Z, Wen AD, Zheng ZH, Song LQ, u. a. Meplazumab, a CD147 antibody, for severe COVID-19: a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase 3 clinical trial. *Signal Transduct Target Ther.* 14. April 2025;10(1):119.
35. Radzikowska U, Ding M, Tan G, Zhakparov D, Peng Y, Wawrzyniak P, u. a. Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. *Allergy.* 4. Juni 2020;
36. Ali MM, Mirza I, Naquiallah D, Hassan C, Masrur M, Bianco FM, u. a. CD147 Levels in Blood and Adipose Tissues Correlate with Vascular Dysfunction in Obese Diabetic Adults. *J Cardiovasc Dev Dis.* 28. Dezember 2021;9(1):7.

37. Bao W, Min D, Twigg SM, Shackel NA, Warner FJ, Yue DK, u. a. Monocyte CD147 is induced by advanced glycation end products and high glucose concentration: possible role in diabetic complications. *Am J Physiol Cell Physiol*. November 2010;299(5):C1212-1219.
38. Li X, Zhang Y, Ma W, Fu Q, Liu J, Yin G, u. a. Enhanced glucose metabolism mediated by CD147 contributes to immunosuppression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother Cll*. April 2020;69(4):535–48.
39. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. April 2017;17(4):233–47.
40. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, u. a. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 25. Februar 2021;384(8):693–704.
41. Murphy KM, Weaver C, Janeway CA, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 9. Auflage. Berlin [Heidelberg]: Springer Spektrum; 2018. 1205 S. (Lehrbuch).
42. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 17. Februar 2012;12(3):180–90.
43. Schulz O, Sewell HF, Shakib F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J Exp Med*. 19. Januar 1998;187(2):271–5.
44. Lindqvist CA, Christiansson LH, Simonsson B, Enblad G, Olsson-Strömberg U, Loskog ASI. T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. *Immunology*. November 2010;131(3):371–6.
45. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4. September 2014;6(10):a016295.
46. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*.

Juli 2010;40(7):1830–5.

47. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 2(Suppl 2):S2.
48. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 1. August 2000;50(3):184–95.
49. Guo Y, Hu K, Li Y, Lu C, Ling K, Cai C, u. a. Targeting TNF- α for COVID-19: Recent Advanced and Controversies. *Front Public Health*. 2022;10:833967.
50. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*. April 2009;9(4):271–85.
51. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*. Januar 2018;101:14–8.
52. Chang CH, Pearce EL. Emerging concepts of T cell metabolism as a target of immunotherapy. *Nat Immunol*. April 2016;17(4):364–8.
53. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, u. a. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*. 23. Dezember 2011;35(6):871–82.
54. Almeida L, Lochner M, Berod L, Sparwasser T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin Immunol*. 2016;28(5):514–24.
55. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, u. a. The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity*. 1. Juni 2002;16(6):769–77.
56. Renner K, Geiselhöringer AL, Fante M, Bruss C, Färber S, Schönhammer G, u. a. Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions: Cellular immune response. *Eur J Immunol*. September 2015;45(9):2504–16.
57. Zhou X, Zhu X, Zeng H. Fatty acid metabolism in adaptive immunity. *FEBS J*.

Februar 2023;290(3):584–99.

58. Byersdorfer CA. The Role of Fatty Acid Oxidation in the Metabolic Reprograming of Activated T-Cells. *Front Immunol.* 18. Dezember 2014;5:641.

59. Byersdorfer CA, Tkachev V, Opipari AW, Goodell S, Swanson J, Sandquist S, u. a. Effector T cells require fatty acid metabolism during murine graft-versus-host disease. *Blood.* 31. Oktober 2013;122(18):3230–7.

60. Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, Harms GM, Shen H, Wang LS, u. a. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature.* 2. Juli 2009;460(7251):103–7.

61. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, u. a. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. März 2011;186(6):3299–303.

62. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol CB.* 19. Mai 2014;24(10):R453-462.

63. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 1. Februar 2000;49(2, Supplement 1):3–8.

64. von der Saal K. *Biochemie.* 1. Berlin: Springer; 2020. 274 S.

65. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 26. Oktober 2012;48(2):158–67.

66. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1–2):42–59.

67. Garg SK, Yan Z, Vitvitsky V, Banerjee R. Differential dependence on cysteine from transsulfuration versus transport during T cell activation. *Antioxid Redox Signal.* 1. Juli 2011;15(1):39–47.

68. Siska PJ, Kim B, Ji X, Hoeksema MD, Massion PP, Beckermann KE, u. a.

Fluorescence-based measurement of cystine uptake through xCT shows requirement for ROS detoxification in activated lymphocytes. *J Immunol Methods*. November 2016;438:51–8.

69. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, u. a. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*. 21. Februar 2013;38(2):225–36.

70. Desdín-Micó G, Soto-Heredero G, Mittelbrunn M. Mitochondrial activity in T cells. *Mitochondrion*. Juli 2018;41:51–7.

71. Georgieva E, Ananiev J, Yovchev Y, Arabadzhiev G, Abrashev H, Abrasheva D, u. a. COVID-19 Complications: Oxidative Stress, Inflammation, and Mitochondrial and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 4. Oktober 2023;24(19):14876.

72. Shang C, Liu Z, Zhu Y, Lu J, Ge C, Zhang C, u. a. SARS-CoV-2 Causes Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy Impairment. *Front Microbiol*. 2021;12:780768.

73. Muhammad Y, Kani YA, Iliya S, Muhammad JB, Binji A, El-Fulaty Ahmad A, u. a. Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-sectional comparative study in Jigawa, Northwestern Nigeria. *SAGE Open Med*. 2021;9:2050312121991246.

74. Polonikov A. Endogenous Deficiency of Glutathione as the Most Likely Cause of Serious Manifestations and Death in COVID-19 Patients. *ACS Infect Dis*. 10. Juli 2020;6(7):1558–62.

75. Perła-Kaján J, Jakubowski H. COVID-19 and One-Carbon Metabolism. *Int J Mol Sci*. 10. April 2022;23(8):4181.

76. Song JW, Lam SM, Fan X, Cao WJ, Wang SY, Tian H, u. a. Omics-Driven Systems Interrogation of Metabolic Dysregulation in COVID-19 Pathogenesis. *Cell Metab*. 04 2020;32(2):188-202.e5.

77. Siska PJ, Decking SM, Babl N, Matos C, Bruss C, Singer K, u. a. Metabolic

imbalance of T cells in COVID-19 is hallmarked by basigin and mitigated by dexamethasone. *J Clin Invest.* 15. November 2021;131(22):e148225.

78. Xie M, Yunis J, Yao Y, Shi J, Yang Y, Zhou P, u. a. High levels of soluble CD25 in COVID-19 severity suggest a divergence between anti-viral and pro-inflammatory T-cell responses. *Clin Transl Immunol.* 2021;10(2):e1251.

79. Kalfaoglu B, Almeida-Santos J, Tye CA, Satou Y, Ono M. T-Cell Hyperactivation and Paralysis in Severe COVID-19 Infection Revealed by Single-Cell Analysis. *Front Immunol.* 2020;11:589380.

80. Zhang Y, Wang X, Li X, Xi D, Mao R, Wu X, u. a. Potential contribution of increased soluble IL-2R to lymphopenia in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* August 2020;17(8):878–80.

81. Gaber T, Tran CL, Schellmann S, Hahne M, Strehl C, Hoff P, u. a. Pathophysiological hypoxia affects the redox state and IL-2 signalling of human CD4+ T cells and concomitantly impairs survival and proliferation. *Eur J Immunol.* Juni 2013;43(6):1588–97.

82. Shilts J, Crozier TWM, Greenwood EJD, Lehner PJ, Wright GJ. No evidence for basigin/CD147 as a direct SARS-CoV-2 spike binding receptor. *Sci Rep.* 11. Januar 2021;11(1):413.

83. Zhou YQ, Wang K, Wang XY, Cui HY, Zhao Y, Zhu P, u. a. SARS-CoV-2 pseudovirus enters the host cells through spike protein-CD147 in an Arf6-dependent manner. *Emerg Microbes Infect.* Dezember 2022;11(1):1135–44.

84. Geng J, Yang X, Wang K, Wang K, Chen R, Chen ZN, u. a. Immunological and metabolic characteristics of the Omicron variants infection. *Signal Transduct Target Ther.* 21. Januar 2023;8(1):42.

85. Carpenè G, Onorato D, Nocini R, Fortunato G, Rizk JG, Henry BM, u. a. Blood lactate concentration in COVID-19: a systematic literature review. *Clin Chem Lab Med.* 23. Februar 2022;60(3):332–7.

86. Kanekura T. CD147/Basigin Is Involved in the Development of Malignant Tumors and T-Cell-Mediated Immunological Disorders via Regulation of Glycolysis. *Int J Mol Sci*. 11. Dezember 2023;24(24):17344.
87. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, Naiken T, Ilc K, Murray CM, u. a. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4. Oktober 2011;108(40):16663–8.
88. Merezhinskaya N, Ogunwuyi SA, Mullick FG, Fishbein WN. Presence and localization of three lactic acid transporters (MCT1, -2, and -4) in separated human granulocytes, lymphocytes, and monocytes. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. November 2004;52(11):1483–93.
89. Nedel WL, Strogulski NR, Kopczynski A, Rodolphi MS, Montes THM, Júnior JA, u. a. Association Between Hyperlactatemia, Perfusional Parameters, and Lymphocyte Mitochondrial Dysfunction in Septic Shock Patients. *Shock*. März 2022;57(3):378.
90. Gurshaney S, Morales-Alvarez A, Ezhakunnel K, Manalo A, Huynh TH, Abe JI, u. a. Metabolic dysregulation impairs lymphocyte function during severe SARS-CoV-2 infection. *Commun Biol*. 7. April 2023;6(1):374.
91. Liu X, Zhao J, Wang H, Wang W, Su X, Liao X, u. a. Metabolic Defects of Peripheral T Cells in COVID-19 Patients. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Juni 2021;206(12):2900–8.
92. Lau EYM, Carroll EC, Callender LA, Hood GA, Berryman V, Pattrick M, u. a. Type 2 diabetes is associated with the accumulation of senescent T cells. *Clin Exp Immunol*. August 2019;197(2):205–13.
93. Voraussetzungen zur Spende [Internet]. [zitiert 18. Mai 2025]. Verfügbar unter: <https://www.ukr.de/voraussetzungen-zur-spende>
94. Nian Y, Iske J, Maenosono R, Minami K, Heinbokel T, Quante M, u. a. Targeting age-specific changes in CD4⁺ T cell metabolism ameliorates alloimmune responses and prolongs graft survival. *Aging Cell*. Februar 2021;20(2):e13299.

95. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, u. a. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl*. 15 2020;395(10223):497–506.
96. Zhang Y, Kurupati R, Liu L, Zhou XY, Zhang G, Hudaihed A, u. a. Enhancing CD8⁺ T Cell Fatty Acid Catabolism within a Metabolically Challenging Tumor Microenvironment Increases the Efficacy of Melanoma Immunotherapy. *Cancer Cell*. 11. September 2017;32(3):377-391.e9.
97. Guntur VP, Nemkov T, de Boer E, Mohning MP, Baraghoshi D, Cendali FI, u. a. Signatures of Mitochondrial Dysfunction and Impaired Fatty Acid Metabolism in Plasma of Patients with Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC). *Metabolites*. 26. Oktober 2022;12(11):1026.
98. de Boer E, Petrache I, Goldstein NM, Olin JT, Keith RC, Modena B, u. a. Decreased Fatty Acid Oxidation and Altered Lactate Production during Exercise in Patients with Post-acute COVID-19 Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1. Januar 2022;205(1):126–9.
99. Li J, Huang Q, Long X, Zhang J, Huang X, Aa J, u. a. CD147 reprograms fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma cells through Akt/mTOR/SREBP1c and P38/PPAR α pathways. *J Hepatol*. Dezember 2015;63(6):1378–89.
100. Hildeman DA, Mitchell T, Kappler J, Marrack P. T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J Clin Invest*. März 2003;111(5):575–81.
101. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, u. a. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*. 21. Februar 2013;38(2):225–36.
102. Thompson EA, Cascino K, Ordonez AA, Zhou W, Vaghasia A, Hamacher-Brady A, u. a. Metabolic programs define dysfunctional immune responses in severe COVID-19 patients. *Cell Rep*. 16. März 2021;34(11):108863.
103. Huo Y, Rangarajan P, Ling EA, Dheen ST. Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in

activated microglia. BMC Neurosci. 26. Mai 2011;12(1):49.

104. Páez-Franco JC, Maravillas-Montero JL, Mejía-Domínguez NR, Torres-Ruiz J, Tamez-Torres KM, Pérez-Fragoso A, u. a. Metabolomics analysis identifies glutamic acid and cystine imbalances in COVID-19 patients without comorbid conditions. Implications on redox homeostasis and COVID-19 pathophysiology. PloS One. 2022;17(9):e0274910.

105. Kumar P, Osahon O, Vides DB, Hanania N, Minard CG, Sekhar RV. Severe Glutathione Deficiency, Oxidative Stress and Oxidant Damage in Adults Hospitalized with COVID-19: Implications for GlyNAC (Glycine and N-Acetylcysteine) Supplementation. Antioxid Basel Switz. 27. Dezember 2021;11(1):50.

106. Izquierdo JL, Soriano JB, González Y, Lumbreras S, Ancochea J, Echeverry C, u. a. Use of N-Acetylcysteine at high doses as an oral treatment for patients hospitalized with COVID-19. Sci Prog. 2022;105(1):368504221074574.

107. Couzin-Frankel J. The mystery of the pandemic's 'happy hypoxia'. Science. Mai 2020;368(6490):455–6.

108. Leonard MO, Godson C, Brady HR, Taylor CT. Potentiation of glucocorticoid activity in hypoxia through induction of the glucocorticoid receptor. J Immunol Baltim Md 1950. 15. Februar 2005;174(4):2250–7.

109. Crothers K, DeFaccio R, Tate J, Alba PR, Goetz MB, Jones B, u. a. Dexamethasone in hospitalised COVID-19 patients not on intensive respiratory support. Eur Respir J. Juli 2022;60(1):2102532.

110. Chen L, Jondal M, Yakimchuk K. Regulatory effects of dexamethasone on NK and T cell immunity. Inflammopharmacology. Oktober 2018;26(5):1331–8.

111. Thibeault C, Bardtke L, Vanshylla K, Di Cristanziano V, Eberhardt KA, Stubbemann P, u. a. Short- and long-term T cell and antibody responses following dexamethasone treatment in COVID-19. JCI Insight. 24. April 2023;8(8):e166711.

112. Giles AJ, Hutchinson MKND, Sonnemann HM, Jung J, Fecci PE, Ratnam NM,

u. a. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 11 2018;6(1):51.

113. Franchimont D, Galon J, Vacchio MS, Fan S, Visconti R, Frucht DM, u. a. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. März 2002;168(5):2212–8.

114. Pappas AG, Chaliasou AL, Panagopoulos A, Dede K, Daskalopoulou S, Moniem E, u. a. Kinetics of Immune Subsets in COVID-19 Patients Treated with Corticosteroids. *Viruses*. 24. Dezember 2022;15(1):51.

115. Boumpas DT, Anastassiou ED, Older SA, Tsokos GC, Nelson DL, Balow JE. Dexamethasone inhibits human interleukin 2 but not interleukin 2 receptor gene expression in vitro at the level of nuclear transcription. *J Clin Invest*. 1. Mai 1991;87(5):1739–47.

116. Rayman G, Lumb AN, Kennon B, Cottrell C, Nagi D, Page E, u. a. Dexamethasone therapy in COVID-19 patients: implications and guidance for the management of blood glucose in people with and without diabetes. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. Januar 2021;38(1):e14378.

117. Pagano G, Cavallo-Perin P, Cassader M, Bruno A, Ozzello A, Masciola P, u. a. An in vivo and in vitro study of the mechanism of prednisone-induced insulin resistance in healthy subjects. *J Clin Invest*. November 1983;72(5):1814–20.

118. Ruzzin J, Wagman AS, Jensen J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetologia*. Oktober 2005;48(10):2119–30.

119. Montazersaheb S, Hosseiniyan Khatibi SM, Hejazi MS, Tarhriz V, Farjami A, Ghasemian Sorbeni F, u. a. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virol J*. 26. Mai 2022;19(1):92.

120. Jarczак D, Nierhaus A. Cytokine Storm-Definition, Causes, and Implications. *Int J Mol Sci*. 3. Oktober 2022;23(19):11740.

121. Petrushevska M, Zendelovska D, Atanasovska E, Eftimov A, Spasovska K. Presentation of cytokine profile in relation to oxidative stress parameters in patients with severe COVID-19: a case-control pilot study. *F1000Research*. 2021;10:719.
122. Aziz M, Fatima R, Assaly R. Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: A meta-analysis. *J Med Virol*. November 2020;92(11):2283–5.
123. Selvaraj V, Khan MS, Bavishi C, Dapaah-Afriyie K, Finn A, Lal A, u. a. Tocilizumab in Hospitalized Patients with COVID-19: A Meta Analysis of Randomized Controlled Trials. *Lung*. 1. Juni 2021;199(3):239–48.
124. Sinha P, Matthay MA, Calfee CS. Is a „Cytokine Storm“ Relevant to COVID-19? *JAMA Intern Med*. 1. September 2020;180(9):1152–4.
125. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, u. a. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med*. 1. Dezember 2020;8(12):1233–44.
126. Smail SW, Babaei E, Amin K, Abdulahad WH. Serum IL-23, IL-10, and TNF- α predict in-hospital mortality in COVID-19 patients. *Front Immunol*. 2023;14:1145840.
127. Kokkotis G, Kitsou K, Xynogalas I, Spoulou V, Magiorkinis G, Trontzas I, u. a. Systematic review with meta-analysis: COVID-19 outcomes in patients receiving anti-TNF treatments. *Aliment Pharmacol Ther*. Januar 2022;55(2):154–67.
128. Gianfrancesco M, Hyrich KL, Al-Adely S, Carmona L, Danila MI, Gossec L, u. a. Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. *Ann Rheum Dis*. 1. Juli 2020;79(7):859–66.
129. Remy KE, Mazer M, Striker DA, Ellebedy AH, Walton AH, Unsinger J, u. a. Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections. *JCI Insight*. 3. September 2020;5(17):e140329, 140329.
130. Ruetsch C, Brglez V, Crémoni M, Zorzi K, Fernandez C, Boyer-Suavet S, u. a.

Functional Exhaustion of Type I and II Interferons Production in Severe COVID-19 Patients. *Front Med.* 2020;7:603961.

131. Cremoni M, Allouche J, Graça D, Zorzi K, Fernandez C, Teisseyre M, u. a. Low baseline IFN- γ response could predict hospitalization in COVID-19 patients. *Front Immunol.* 2022;13:953502.

132. Krishna BA, Lim EY, Metaxaki M, Jackson S, Mactavous L, NIHR BioResource, u. a. Spontaneous, persistent, T cell-dependent IFN- γ release in patients who progress to Long Covid. *Sci Adv.* 23. Februar 2024;10(8):eadi9379.

133. Xiang Z, Liu J, Shi D, Chen W, Li J, Yan R, u. a. Glucocorticoids improve severe or critical COVID-19 by activating ACE2 and reducing IL-6 levels. *Int J Biol Sci.* 2020;16(13):2382–91.

134. Engel JJ, van der Made CI, Keur N, Setiabudiawan T, Röring RJ, Damoraki G, u. a. Dexamethasone attenuates interferon-related cytokine hyperresponsiveness in COVID-19 patients. *Front Immunol.* 2023;14:1233318.

135. Mazer MB, Davitt E, Turnbull IR, Caldwell CC, Brakenridge SC, Remy KE, u. a. In Vitro-Administered Dexamethasone Suppresses T Cell Function With Reversal by Interleukin-7 in Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Explor.* April 2021;3(4):e0378.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen danken, die mich während meiner Promotion sowohl im Labor als auch später bei der Verfassung unterstützt haben.

Zuerst möchte ich PD Dr. Peter Siska nennen, der mich bei meiner Doktorarbeit hervorragend betreut hat. Besonders hervorzuheben ist die hilfreiche Kritik, Geduld und die Bereitschaft auch nach seinen klinischen Diensten stets für seine Doktoranden erreichbar zu sein.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Katrin Singer und Prof. Marina Kreutz für die initiale Betreuung der Doktorarbeit bedanken.

Weiterer Dank gebührt Monika Wehrstein und Marcus Kielmanowicz für die Einarbeitung in die laborchemischen Untersuchungen, die fachkundige Hilfe und kontinuierliche Unterstützung. Vielen Dank auch an alle weiteren Mitglieder der Arbeitsgruppe Kreutz, insbesondere Sonja-Maria Decking und Nathalie Babl. Ich konnte mich mit jeglichen fachlichen Fragen immer an sie wenden. Ich habe mich in der Arbeitsgruppe sehr wohlfühlt und habe die kollegiale Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsumfeld sehr geschätzt.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Die Arbeit ist meiner Mutter gewidmet, ohne ihre kontinuierliche Unterstützung wäre dies nicht möglich gewesen.