Aus der Klinik für Anästhesiologie
Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

Kontextabhängige Funktionen von Monozyten bei Infektion und Inflammation: Modulation durch Pathogene, Glukokortikoide und Gravitation

Kumulative Habilitationsschrift

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Dominique Moser
(2025)

Inhaltsverzeichnis

1. Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet ... 2

2. Hintergrund ... 3

2.1 Der Monozyt – Effektorfunktionen und Subtypen ... 3

2.2 Dysregulation der Monozytenaktivität im Infektionsgeschehen ... 5

2.3 Einfluss einer schweren SARS-CoV-2 Infektion auf die Immunantwort ... 5

2.4 Regulation der Entzündung durch Hydrocortison ... 6

2.5 Immunpathologische Syndrome in Schwerelosigkeit ... 7

3. Fragestellung ... 8

3.1 Verändert eine schwere systemische Infektion die Monozytenreaktion auf eine Sekundärinfektion? ... 8

3.2 Wie infiziert SARS-CoV-2 den Monozyten und inwieweit verändert dies den Immunphänotypen und die Zytokinausschüttung? ... 8

3.3 Inwieweit können Immun(dys)funktionen durch unterschiedliche Behandlungsszenarien mit Hydrocortison oder durch ein Gravitationsprotokoll manipuliert werden? ... 8

4. Ergebnisse ... 9

4.1 Auswirkungen von schwerem COVID-19 auf antigeninduzierte Immunantworten ... 9

4.1.1 Immunantwort bei COVID-19 Patienten im Vergleich zu Patienten mit bakterieller Sepsis. 9

4.1.2 Die Immunantwort auf den Hefepilz *Candida albicans* bei schwerem COVID-19 ... 11

4.2 Die Modulation der Monozytenaktivität durch eine SARS-CoV-2 Infektion ... 15

4.2.1 GRP78 wird bei COVID-19 verstärkt auf der Zelloberfläche von Monozyten exprimiert .. 15

4.2.2 Nachweis einer direkten Interaktion zwischen dem SARS-CoV-2 Spike Protein und GRP78 ... 18

4.2.3 Pro-inflammatorische Zytokine induzieren eine csGRP78 Expression ... 18

4.2.4 csGRP78 ist eine alternativer SARS-CoV-2 Eintrittsrezeptor auf Monozyten ... 19

4.3 Die Manipulation von Immunzellfunktionen durch medikamentöse und physikalische Behandlungsstrategien ... 21

4.3.1 Modulation von Pyroptose durch akute oder chronische Exposition mit Hydrocortison ... 21

4.3.2 Modulation der Monozyten- und T-Zellaktivierung durch veränderte Gravitation ... 23

4.3.2.1 Der Einfluss von Mikro- und Hypergravitation ... 23

4.3.2.2 Präkonditionierung durch Hypergravitation ... 26

5. Zusammenfassung und Ausblick ... 28

6. Literaturverzeichnis ... 30

7. Themenrelevante Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift ... 35

8. Danksagung ... 36

1. Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet

Monozyten führen vielfältige entzündungsfördernde Effektorfunktionen bei der direkten Pathogenabwehr, aber auch bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems aus und tragen damit maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Gesundheit bei. Eine Hyperreaktivät von Monozyten und eine damit verbundene überschießende inflammatorische Reaktion kann mit immunpathologischen Erkrankungen einhergehen, was diese essentielle Komponente des Immunsystems zum Krankheitstreiber werden lässt. Dieser Übergang stellt einen wesentlichen Forschungsschwerpunkt auf dem Gebiet der experimentellen Anästhesiologie dar.

Die entzündungsfördernde Aktivität von Monozyten kann durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Einflüssen, die als Exposom zusammengefasst werden, dysreguliert werden. So gehen beispielsweise Infektionen mit viralen und bakteriellen Krankheitserregern mit einer erhöhten Produktion von Chaperonen [1, 2] und mit einer erhöhten Ausschüttung entzündungsfördernder Mediatoren als unmittelbare Reaktion auf freigesetzte Alarmine (sog. DAMPs von *damage-associated molecular patterns*) von umliegenden Zellen [3] einher. Auch ein erhöhter Spiegel des Stresshormons Cortisol kann, vor allem im Infektionsgeschehen, eine verstärkte Aktivität von Monozyten verursachen [4]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass das pro-inflammatorische Potenzial von Monozyten durch physikalische bzw. mechanische Faktoren wie durch Fluss oder Druck verursachte Deformation [5] oder Änderungen in der Gravitation [6] erhöht wird.

Ein verbessertes Verständnis darüber, wie das Exposom den Monozyten selbst, aber auch weiterführende Funktionen des Immunsystems beeinflusst kann dazu beitragen, personalisierte und innovative Behandlungsstrategien zu entwickeln, um Hyperreaktivitäten von Monozyten und anderen dysfunktionalen Immunantworten entgegenzuwirken. Untersuchungen im jeweiligen Kontext sind daher unerlässlich.

In der vorliegenden Arbeit werden Erkenntnisse aus Untersuchungen zum Einfluss des Exposoms auf spezifische Monozytenreaktionen und auf die multifunktionale Immunantwort in den drei verschiedenen Kontexten 1) der schweren systemischen Infektion, 2) einer SARS-CoV-2 Infektion im Speziellen und 3) unterschiedlicher Behandlungsstrategien mit Hydrocortison oder mit Gravitationsänderungen als Extrembeispiel für physikalisch verursachte Dysregulation zusammengefasst. Durch vergleichende Untersuchungen wurde die Rolle des Monozyten beim Krankheitsbild COVID-19 näher beleuchtet und es konnte gezeigt werden, dass die infektionsbedingte Hyperreaktivität dieser Zellen dem Patienten

bekannterweise Schaden zufügt, er aber weiterhin vor Sekundärinfektionen geschützt ist. Eine selektive Suppression gegenüber *Candida albicans* bildet dabei eine Ausnahme. Durch *ex vivo* Analysen mit Patientenblut und weiterführende *in vitro* Untersuchungen an Zellen mit Überexpression von Oberflächenrezeptoren durch Stimulation und lentiviraler Transduktion konnte ein alternativer Eintrittsrezeptor für SARS-CoV-2 auf Monozyten identifiziert und charakterisiert werden. Des Weiteren wurde im *in vitro* Modell am Beispiel der Pyroptose gezeigt, dass der endogene Cortisolspiegel für den Behandlungserfolg mit Hydrocortison bei Beginn einer bakteriellen Infektion entscheidend ist. Ergebnisse aus Untersuchungen zur Effizienz einer multifunktionalen Immunantwort in veränderter Gravitation zeigen das Potenzial dieser Maßnahme auf und bilden die Grundlage für die weitere Evaluation einer Gravitationstherapie bei Immundysfunktionen.

2. Hintergrund

2.1 Der Monozyt – Effektorfunktionen und Subtypen

Monozyten stellen Zellen des mononukleären-phagozytären Systems dar und sind wesentliche Bestandteile der innaten Immunantwort. Nach ihrer Entstehung im Knochenmark zirkulieren Monozyten im Gefäßsystem, transmigrieren in umliegende Gewebe [7] und schütten unter pathologischen Bedingungen verstärkt pro- und anti-inflammatorische Zytokine aus, die zur Regulation der Entzündungsreaktion beitragen. Zu den weiteren Effektorfunktionen dieser Zellen zählen Phagozytose, oxidativer Burst, Pyroptose, Antigenpräsentation an T-Helferzellen sowie deren Kostimulation und Geweberemodellierung [8-11]. Anhand der Expressionsprofile der Oberflächenproteine CD14 und CD16 werden Monozyten in die drei Subtypen „klassisch“, „intermediär“ und „nicht-klassisch“ unterschieden, welche eine starke Heterogenität bezüglich ihrer Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Homöostase und bei der Krankheitsbekämpfung aufweisen [12, 13]. Mit einem Anteil von 80-90 % bilden klassische Monozyten ($CD14^{++}CD16^{-}$) die größte Gruppe [9]. Diese Zellen migrieren konstitutiv von Blutgefäßen ins Gewebe, was jedoch unter inflammatorischen Konditionen deutlich häufiger erfolgt [8]. Dabei erlangen sie selbst pro-inflammatorische Eigenschaften und schütten entzündungsfördernde Zytokine aus. Nach der Migration ins betroffene Gewebe können Monozyten in unterschiedliche Richtungen ausdifferenzieren: entweder bleiben sie Monozyten mit der Fähigkeit zur Antigenpräsentation oder sie entwickeln sich zu Makrophagen oder dendritischen Zellen [8, 14]. In Abhängigkeit vom vorherrschenden Zytokinmilieu in der Mikroumgebung erfolgt dann eine Polarisierung der Makrophagen zum klassisch aktivierten inflammatorischen M1-Typ oder zum alternativ aktivierten regenerativen M2-Typ [15, 16] (Abb. 1).

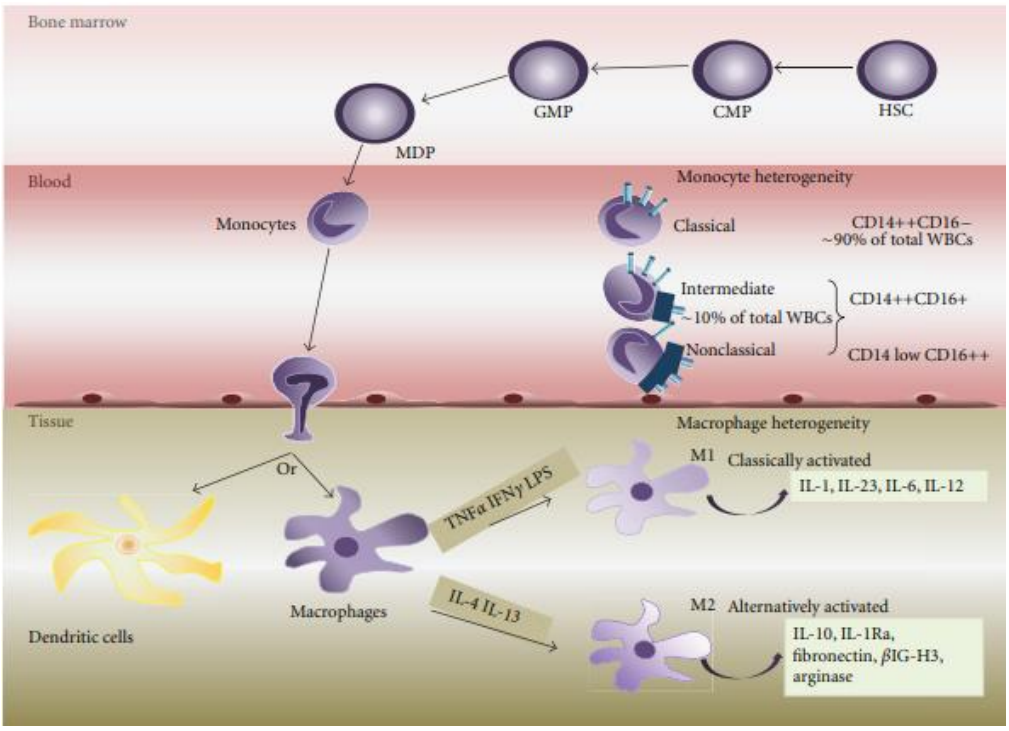

Abb. 1 Die Heterogenität von Monozyten und Makrophagen. Hämatopoetische Stammzellen entwickeln sich über diverse Differenzierungsschritte zu Monozyten, die in die Blutzirkulation entlassen werden. Monozyten werden in den klassischen ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediären ($CD14^{++}CD16^{+}$) und nicht-klassischen ($CD14^{low}CD16^{++}$) Subtypen unterschieden. Bei Inflammation migrieren Monozyten ins betroffene Gewebe und differenzieren dort entweder zu dendritischen Zellen oder zu Makrophagen aus, die wiederum in klassisch aktivierte inflammatorische M1- oder alternativ aktivierte regenerative M2-Makrophagen unterschieden werden können [17].

Die Fähigkeit zur Antigenpräsentation mittels MHC-Klasse-II Molekülen, sowie die Kostimulation von T-Helferzellen durch Moleküle wie CD80 oder CD86 lassen Monozyten und Makrophagen eine Bindegliedfunktion zwischen dem innaten und dem adaptiven Immunsystem einnehmen [13, 18].

Mit prozentualen Anteilen von jeweils 5-10 % bilden intermediäre ($CD14^{++}CD16^{+}$) und nicht-klassische ($CD14^{low}CD16^{++}$) Monozyten kleinere Gruppen der Monozytensubtypen. Intermediäre Monozyten sind besonders auf die Präsentation von Antigenen spezialisiert und ein vermehrtes Aufkommen dieser Zellen wird mit systemischen Infektionen in Verbindung gebracht. Dies impliziert eine wichtige Rolle von intermediären Monozyten bei der schnellen Bekämpfung von Pathogenen [13]. Nicht-klassische Monozyten patrouillieren in den Blutgefäßen, um dort Zelldebris zu beseitigen. Des Weiteren nehmen sie auch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung ein [13, 14].

2.2 Dysregulation der Monozytenaktivität im Infektionsgeschehen

Eine ausbleibende Regulation von Monozyten oder deren Hyperreaktivität kann zu immunpathologischen Antworten führen [19]. Bei bakteriellen Infektionen wie mit *Staphylococcus aureus* kann dies in einem toxischen Schocksyndrom resultieren [20]. Besonders häufig aber ist eine infektionsbedingte Hyperreaktivität bei Virusinfektionen zu beobachten. Bei Influenza-Infektionen kann eine dysregulierte Monozytenantwort die Entzündungsreaktion weiter verstärken, was zu Gewebeschäden und einer eingeschränkten Wundheilung führen kann [21]. Auch bei virusbedingter Neuroinflammation können dysregulierte Monozyten, die in das entzündete Gewebe einwandern um initial zu Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikroglia auszudifferenzieren, durch anti-virale Effektorfunktionen das umliegende Gewebe schädigen [19]. Aberrante Funktionen von Monozyten und Makrophagen wurden ebenfalls bei COVID-19 (*Coronavirus disease* 2019) beobachtet und sind maßgeblich an Gewebeschädigungen und einem schweren Krankheitsverlauf beteiligt [22]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die veränderte Monozytenaktivität bei COVID-19 gezielt untersucht.

2.3 Einfluss einer schweren SARS-CoV-2 Infektion auf die Immunantwort

Die Ausbreitung von SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) im Frühjahr 2020 führte zu einer weltweiten Pandemie, durch die bis heute über 774 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert gewesen sind. Mehr als sieben Millionen Menschen sind in unmittelbarem Zusammenhang mit der von SARS-CoV-2 ausgelösten Erkrankung COVID-19 verstorben [23]. COVID-19 geht mit respiratorischen Symptomen wie Husten und Atembeschwerden einher, jedoch können sich diese Beschwerden bei einem schweren Verlauf auch zu einem akuten Lungenversagen (ARDS von *acute respiratory distress syndrome*) ausweiten [24, 25]. Während einer COVID-19 Erkrankung erfolgt eine Vielzahl an immunologischen Reaktionen, die sowohl das innate als auch das adaptive Immunsystem betreffen. So ist bei den Patienten eine erhöhte Neutrophil/Lymphozyt Ratio zu verzeichnen, die auf eine Granulozytose [26] und eine gleichzeitige Lymphopenie [27], mit einer Depletion von überwiegend IFNγ produzierenden T-Zellen, zurückzuführen ist [28, 29]. Monozyten und Makrophagen wiederum setzen exzessiv pro-inflammatorische Zytokine frei, was in einem sog. Zytokinsturm resultieren kann [30] und allgemein als Monozyten/Makrophagen-aktivierungssyndrom (MAS) bezeichnet wird [31]. Das Ausmaß der Änderungen auf immunologischer Ebene ist bei COVID-19 mit der Schwere der Erkrankung assoziiert [27, 30, 32, 33].

Monozyten und Makrophagen können direkt mit SARS-CoV-2 infiziert werden [34, 35], allerdings wurde der Eintrittsweg bisher nicht vollständig aufgeklärt, da diese Zellen den klassischen SARS-CoV-2 Rezeptor ACE2 sowie die Spike-Protein aktivierende Protease TMPRSS2 [36, 37] nur sehr gering oder gar nicht exprimieren [38, 39]. Bislang wurden zahlreiche alternative Eintrittsrezeptoren für SARS-CoV-2 vorgeschlagen wie beispielsweise der Oberflächenrezeptor CD147 [40], die Rezeptor-Tyrosinkinase AXL [41] oder das Integrin LFA-1 [42]. Mittels *in silico* Proteindocking und *in situ* Proteinprofiling wurde das Chaperon GRP78 als ein weiterer potentieller Kandidat identifiziert [43, 44]. Dieses Protein ist im endoplasmatischen Retikulum vorzufinden und ist maßgeblich an der Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR, *unfolded protein response*) beteiligt [45, 46]. Bei zellulärem Stress wird GRP78 auch auf der Zelloberfläche exprimiert [47]. Im Gegensatz zu anderen Zelltypen wird GRP78 von Monozyten und Makrophagen bereits konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert, wenn auch nur in geringem Ausmaß [48].

2.4 Regulation der Entzündung durch Hydrocortison

Das Glukokortikoid Cortisol wird als Reaktion auf Stress durch die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse freigesetzt. Neben der Aktivierung kataboler Stoffwechselvorgänge zur Bewältigung der Stresssituation hat Cortisol auch eine dämpfende Wirkung auf das Immunsystem [49]. Hydrocortison findet als Synthetikum von Cortisol weitverbreitet klinischen Einsatz als Therapeutikum, beispielsweise zur Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen wie Asthma [50], rheumatoider Arthritis [51] und dem systemisch-inflammatorischen Antwortsyndrom (SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*) [52]. Dabei übt Hydrocortison genomische entzündungslindernde Eigenschaften durch die Bindung an Glukokortikoidrezeptoren im Zytosol von Immunzellen aus, was zur Inhibition pro-inflammatorischer Signalwege wie dem NF-κB- oder p38-Signalweg führt [53, 54]. Dies resultiert in einer verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1β, IL-6 oder TNF [55, 56], sowie in einer eingeschränkten Differenzierung, Aktivierung, Chemotaxis und Migration von Leukozyten [57, 58]. Entgegen dieser klassischen Sichtweise über die Wirkung von Glukokortikoiden wurden allerdings auch entzündungsfördernde Eigenschaften nachgewiesen, insbesondere bei geringen Konzentrationen. Dies betrifft vor allem die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine und die Expression von Mustererkennungsrezeptoren [56, 59, 60].

2.5 Immunpathologische Syndrome in Schwerelosigkeit

Die Auswirkungen von Weltraumbedingungen auf den Menschen zeigen eine bemerkenswerte Vergleichbarkeit zu den beschriebenen Modulationen bei Infektion und Inflammation auf der Erde (siehe Punkt 2.2 – 2.4). Menschen, die im Weltraum leben und arbeiten, sind einer Vielzahl von stressauslösenden Bedingungen ausgesetzt, welche mit einer erhöhten Cortisolausschüttung einhergehen [61]. Zudem werden bei Besatzungsmitgliedern von Weltraumstationen dysregulierte Immunfunktionen dokumentiert [62, 63]. Es wurde gezeigt, dass Monozyten ein erhöhtes pro-inflammatorisches Potenzial aufweisen, was anhand einer erhöhten Plasmakonzentration des Monozyten-spezifischen Zytokins IL-1β nachgewiesen werden konnte [6, 64]. Auch die Funktionen von T-Zellen werden durch Weltraumbedingungen stark beeinflusst, wobei die Ausprägungen zwischen unterschiedlichen Individuen deutlich variieren können. Bei manchen Individuen weisen sie eine verminderte Aktivierbarkeit durch antigene oder mitogene Stimulation auf [65] und bei anderen wiederum eine T-Helferzell-Polarisierung in Richtung TH2-Antwort [66], welche die Entwicklung autoimmunologischer Reaktionen begünstigt [67]. Dies resultiert in Abhängigkeit von der Ausprägung der Dysregulation entweder in einer Hypo- oder Hyperreaktivität. Eine Hyporeaktivität kann dabei zu einer Reaktivierung latenter Herpesviren führen [61], sowie zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen [68]. Im Fall von hyperreaktiven Immunantworten können autoimmunologische Reaktionen auftreten, die sich beispielsweise in allergischen Reaktionen oder Hautausschlägen manifestieren [69].

Für diese dysregulierten Immunfunktionen wird die Schwerelosigkeit, auch Mikrogravitation (μ*g*) genannt, als einer der Hauptauslöser angesehen [62, 63]. Auch in einem *ex vivo* Ansatz auf der Erde, bei dem das Zytokinmuster nach einer Inkubation von menschlichem Vollblut mit immunogenen Antigenen unter simulierter μ*g* vermessen wurde, konnte eine erhöhte Konzentration des Monozyten-assoziierten Zytokins TNF detektiert werden. Die Konzentrationen der T-Zell spezifischen Zytokine IL-2 und IFNγ waren hingegen reduziert [70]. Die in μ*g* auftretende verminderte Aktivierbarkeit von T-Zellen lässt den Beginn einer vorzeitigen Immunalterung vermuten. In Kombination mit einem erhöhten pro-inflammatorischen Potenzial von Monozyten könnte ein Zustand des *Inflammaging* eintreten [71, 72], welches durch eine permanente subklinische Inflammation geprägt ist, sowie in einer erhöhten Inzidenz viraler Reaktivierung aber auch autoimmunologischer Reaktionen, wie sie gehäuft bei älteren Menschen beobachtet werden [71, 73].

3. Fragestellung

Monozyten sind Zellen des mononukleären-phagozytären Systems und gehören zu den Kernelementen der innaten Immunantwort. Durch die direkte Interaktion mit T-Helferzellen stellen sie zudem ein Bindeglied zwischen dem innaten und adaptiven Immunsystem dar. Zahlreiche Untersuchungen verdeutlichten Veränderungen der pro-inflammatorischen Aktivität von Monozyten und Makrophagen in diversen Kontexten der Infektion und Inflammation. So wurde beispielsweise bei COVID-19 ein MAS beobachtet, was zu einem Zytokinsturm führen kann und mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert ist. Aber auch in nicht erdgebundenen Umgebungen, wie in Weltraumstationen wurde eine erhöhte Freisetzung Monozyten-spezifischer Zytokine gemessen. Selbst psychischer und physischer Stress, der mit einer erhöhten Freisetzung des Stresshormons Cortisol assoziiert ist, kann pro-inflammatorische Reaktionen von Monozyten/Makrophagen begünstigen. Aufgrund dieser hohen Suszeptibilität gegenüber dem Exposom ist ein besseres Verständnis darüber, wie die einzelnen Bedingungen die Reaktionen von Monozyten und auch anderen Zellen des Immunsystems modulieren von großer medizinischer Bedeutung, um zielgerichtete therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Es sollte mit den hier zusammengefassten Projekten im Detail untersucht werden, wie die im Vorfeld beschriebenen Bedingungen die Funktion von Monozyten beeinflussen und ob den veränderten nachteiligen Funktionen durch gezielte Gegenmaßnahmen entgegengewirkt werden kann.

Anhand der durchgeführten Studien wurden folgende Fragestellungen adressiert:

3.1 Verändert eine schwere systemische Infektion die Monozytenreaktion auf eine Sekundärinfektion?

3.2 Wie infiziert SARS-CoV-2 den Monozyten und inwieweit verändert dies den Immunphänotypen und die Zytokinausschüttung?

3.3 Inwieweit können Immun(dys)funktionen durch unterschiedliche Behandlungsszenarien mit Hydrocortison oder durch ein Gravitationsprotokoll manipuliert werden?

4. Ergebnisse

4.1 Auswirkungen von schwerem COVID-19 auf antigeninduzierte Immunantworten

Zur Untersuchung, ob die Immunantwort auf eine Sekundärinfektion während einer schweren systemischen Primärinfektion verändert ist, haben wir im Vollblut von Sepsispatienten und kritisch kranken COVID-19 Patienten den Aktivierungszustand von Leukozyten sowie deren Zytokinfreisetzung nach Antigenstimulation analysiert.

4.1.1 Immunantwort bei COVID-19 Patienten im Vergleich zu Patienten mit bakterieller Sepsis

Bei schwerem COVID-19 führt ein MAS zu einen Zytokinsturm, der in gravierenden Gewebeschädigungen resultieren kann. Eine exzessive Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen erfolgt auch bei Patienten zu Beginn einer schweren Sepsis, was als systemisch-inflammatorisches Antwortsyndrom (SIRS) bezeichnet wird [74, 75]. Im weiteren Verlauf aber setzt bei Sepsispatienten dann eine kompensatorische Immunparalyse ein [76], die eine adäquate Immunantwort gegen weitere eindringende Pathogene unterbindet und so die Anfälligkeit gegenüber Sekundärinfektionen erhöht [77]. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurde bestätigt, dass Patienten zu Beginn einer Sepsis trotz Leukozytose und pro-inflammatorischem Status im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine verminderte Immunantwort auf immunogene Antigene aufweisen [75]. Hierfür wurde durch einen Vollblutinkubationsassay mit anschließender Quantifizierung der Zytokinsekretion die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (DTH, *delayed type hypersensitivity)* auf *recall* Antigene überprüft. Dieses Verfahren ist eine Weiterentwicklung des Multitest Mérieux Hauttest zur *in vivo* Überprüfung der zellulären Immunantwort in einen *ex vivo* Vollblutansatz. Der Test ermöglicht eine wiederholte Anwendung beim selben Individuum, ohne eine Antigen-Sensitivierung hervorzurufen. Zudem erlaubt er neben dem Einsatz von bakteriellen und fungalen Antigenen auch den Einschluss von viralen Antigenen in die Untersuchungen [78].

Da sowohl bei schwerem COVID-19, als auch bei einsetzender schwerer Sepsis ein Zytokinsturm erfolgt, haben wir untersucht, ob auch bei COVID-19 die Immunantwort nach Antigenstimulation eingeschränkt ist. Dafür verglichen wir die *DTH*-Antwort von schwerkranken COVID-19 Patienten (SARS-P) und Patienten mit Sepsis aufgrund einer bakteriellen Pneumonie (BACT-P) (historischer Datensatz, publiziert in Feuerecker et al., 2018 [75]) zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation und im weiteren Verlauf von sieben

Tagen. Patienten mit Sepsis, die nicht auf eine Pneumonie zurückzuführen ist (BACT-S), und ein gesundes Probandenkollektiv dienten als Kontrollen (Daten aus [75]). Für den Vollblutinkubationsassay wurde lithium-heparinisiertes Vollblut in gleichem Volumenverhältnis mit PWM-haltigem Zellkulturmedium (PWM für *Pokeweed mitogen;* Lectin der Kermesbeere) für 48 Stunden inkubiert. Aus dem plasmatischen Überstand haben wir dann die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IFNγ und TNF, die eine multifunktionale Immunantwort widerspiegeln, gemessen und zwischen den Gruppen verglichen. Alle drei Patientengruppen wiesen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzierte Konzentrationen von IL-2 und IFNγ nach der Stimulation mit PWM auf. Diese Reduktion war bei der SARS-P Gruppe allerdings weniger stark ausgeprägt als bei BACT-P und BACT-S und sogar im Vergleich zu diesen beiden Gruppen signifikant erhöht. Die TNF-Konzentrationen waren bei den Gruppen BACT-P und BACT-S weiterhin im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden reduziert (Moser et al., 2022 [79]) (Abb. 2). Bei der SARS-P Gruppe hingegen war TNF im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant erhöht, was auf ein MAS schließen lässt [31]. Im weiteren zeitlichen Verlauf von sieben Tagen konnten wir bei den einzelnen Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zytokinkonzentrationen messen (Moser et al., 2022 [79]) (Abb.2).

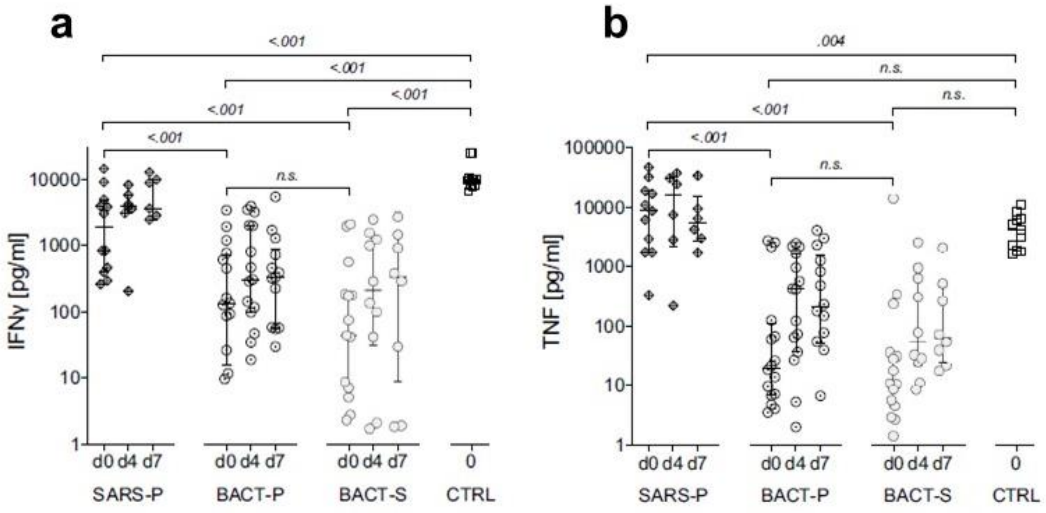

Abb. 2 Leukozyten von COVID-19 Patienten behalten im Vergleich zu Leukozyten von Patienten mit Sepsis Kapazitäten zur Aktivierung bei. Konzentrationen von freigesetztem (a) IFNγ und (b) TNF als Reaktion auf eine 48-stündige Inkubation mit PWM am Tag der Aufnahme auf die Intensivstation (d0), und an Tag 4 (d4) und Tag 7 (d7) des Aufenthaltes. SARS-P: Pneumonie durch SARS-CoV-2, BACT-P: Sepsis aufgrund Pneumonie durch bakterielle Infektion; BACT-S: Bakterielle Sepsis ohne Pneumonie; CTRL: gesunde Kontrollprobanden. Unterschiede zwischen den Gruppen mittels two-way ANOVA und Holm-Šidak test (Moser et al., 2022 [79]).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen demonstrieren, dass Leukozyten von schwer erkrankten COVID-19 Patienten im Vergleich zu Patienten mit Sepsis grundsätzlich die Fähigkeit beibehalten, auf eine Antigenstimulation mit einer adäquaten multifunktionalen Immunantwort zu reagieren. Eine kompensatorische Immunparalyse, wie sie bei Sepsispatienten auftritt, blieb bei diesen COVID-19 Patienten aus. Dennoch bestätigen die erniedrigten Konzentrationen von IL-2 und IFNγ eine eingeschränkte T-Zellantwort bei COVID-19 [29].

Ein hyperinflammatorisches Syndrom bei COVID-19 wird demnach größtenteils durch ein MAS der Monozyten verursacht.

4.1.2 Die Immunantwort auf den Hefepilz *Candida albicans* bei schwerem COVID-19

Die nachgewiesen erhaltene Fähigkeit zur Ausführung einer multifunktionalen Immunantwort bei schwer erkrankten COVID-19 Patienten stellt einen Erklärungsansatz für die im Vergleich zu Sepsispatienten allgemein geringere Inzidenz von Sekundärinfektionen dar [80-82]. Dennoch wurde bei COVID-19 Patienten mit ARDS ein erhöhtes Auftreten von fungalen Superinfektionen beobachtet [83, 84], was auf eine veränderte Reaktion von insbesondere Monozyten auf Pilzantigene schließen lässt. Zur Aufklärung dieses Zusammenhangs haben wir bei einem Patientenkollektiv mit COVID-19 und ARDS zunächst die T-Zell- und Monozyten-Phänotypen sowie deren Aktivierungszustände und das plasmatische Zytokinprofil charakterisiert. Sowohl bei $CD4^+$, als auch bei $CD8^+$ T-Zellen dieser Patienten haben wir mittels durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenexpressionen von CD69, HLA-DR und CD38 eine Hyperaktivierung im Vergleich zu T-Zellen von gesunden Kontrollprobanden festgestellt. Allerdings exprimierten die T-Zellen der Patienten auch verstärkt PD-1, was auf eine allmähliche Erschöpfung dieser Zellen durch den anhaltenden viralen Antigenkontakt schließen lässt [85-87]. Insbesondere der Phänotyp von $CD8^+$ T-Zellen wurde dahingehend weiter beeinflusst, dass der Anteil $CD8^+$ T-Gedächtniszellen bei COVID-19 Patienten reduziert gewesen ist und $CD244^+/CD226^+$ $CD8^+$ T-Zellen erhöht gewesen sind (Moser et al., 2021 [88]), was für eine hohe Virusspezifität mit verstärkten Effektorfunktionen spricht [89-91] (Abb. 3).

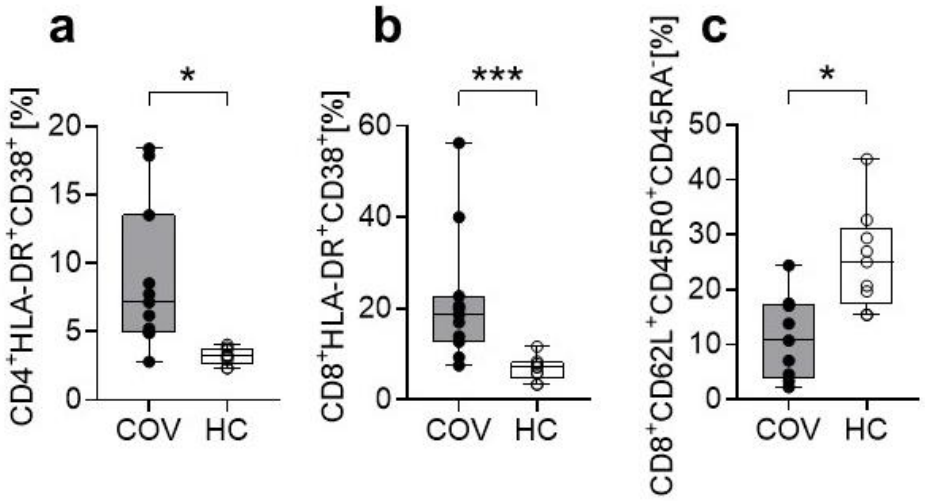

Abb. 3 Aktivierungszustand und Phänotyp von T-Zellen bei COVID-19 mit ARDS. Oberflächenexpression von HLA-DR und CD38 auf hyperaktivierten (a) $CD4^+$ und (b) $CD8^+$ T-Zellen. (c) Expressionsmuster $CD62L^+CD45RO^+CD45RA^-$ für $CD8^+$ T-Gedächtniszellen. Die Werte zeigen den prozentualen Anteil von Oberflächenmarker exprimierenden T-Zellen. COV: COVID-19 Patienten; HC (*healthy controls*): gesunde Kontrollprobanden. Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Zwei-Stichproben-t-Test oder Mann Whitney *U* Test *P < .05, ***P < .001 (Moser et al., 2021 [88]).

Im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen hat sich der Anteil an hyperaktiven T-Zellen weiter erhöht, was letztendlich zu einem AICD (*activation induced cell death*) führt [89] und dadurch die für COVID-19 charakteristische Lymphopenie hervorrufen kann (Moser et al., 2021 [88]). Unsere durchflusszytometrische Charakterisierung von Monozyten ergab eine signifikant höhere Expression der Moleküle CD86 und TLR2 auf der Zelloberfläche, was bei Studien anderer Arbeitsgruppen ebenfalls beobachtet wurde und zum pro-inflammatorischen Phänotyp dieser Zellen beiträgt [92, 93]. Des Weiteren erhöhte sich der Anteil intermediärer und nicht-klassischer Monozyten bei den COVID-19 Patienten. Dies änderte sich im zeitlichen Verlauf nicht, was für persistierende immunologische Änderungen bei diesem Krankheitsbild spricht. Erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-6, IL-8, TNF und sIL2Rα bestätigten ein MAS bei diesen Patienten (Moser et al., 2021 [88]).

Um die Immunantwort gegenüber unterschiedlichen Erregern einer potentiellen Superinfektion spezifisch zu untersuchen, haben wir einen Vollblutinkubationsassay mit den Antigenen LPS (Lipopolysaccharid; Komponente der Zellhülle Gram negativer Bakterien), HKLM (hitze-abgetötete *Listeria monocytogenes*; Gram positive Bakterien), *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans* durchgeführt und den Aktivierungszustand von T-Zellen und Monozyten sowie die Konzentrationen ausgeschütteter Zytokine gemessen. Die Inkubationsdauer wurde dabei auf sechs Stunden reduziert, da dies die Evaluierung einer frühen Aktivierung des

Immunsystems ermöglicht, insbesondere von Zellen der innaten Immunantwort. Die Oberflächenexpression der untersuchten Aktivierungsmarker wurde bei T-Zellen durch die Antigeninkubationen im Vergleich zur unbehandelten Basalkontrolle nicht verändert, was auf ein ausgeschöpftes Aktivierungspotential dieser Zellen hindeutet. Bei den Monozyten der COVID-19 Patienten haben wir hingegen im Vergleich zu den Kontrollprobanden nach Stimulation mit *C. albicans* eine signifikant verminderte Oberflächenexpression des ko-stimulatorischen Moleküls CD80 gemessen. Dies spricht für eine geringere Monozytenaktivierung durch dieses Pilzantigen und impliziert eingeschränkte ko-stimulatorische Effekte von CD80 auf die adaptive Immunantwort [94]. Die reduzierte Aktivierung von Monozyten bei diesen COVID-19 Patienten durch Stimulation mit dem *C. albicans* Antigen wurde durch die Konzentrationen der gemessenen Zytokine bestätigt. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen waren die Konzentrationen von IL-6, TNF, IL-10, IFNγ und den Monozyten-spezifischen Zytokinen IL-1α und IL-1β bei den COVID-19 Patienten nach einer Stimulation mit *C. albicans* nicht erhöht (Moser et al., 2021 [88]). Nach Stimulationen mit LPS, HKLM oder *Aspergillus fumigatus* waren die Konzentrationslevel dieser Zytokine bei den COVID-19 Patienten und den Kontrollen in einem vergleichbaren Bereich (Abb. 4).

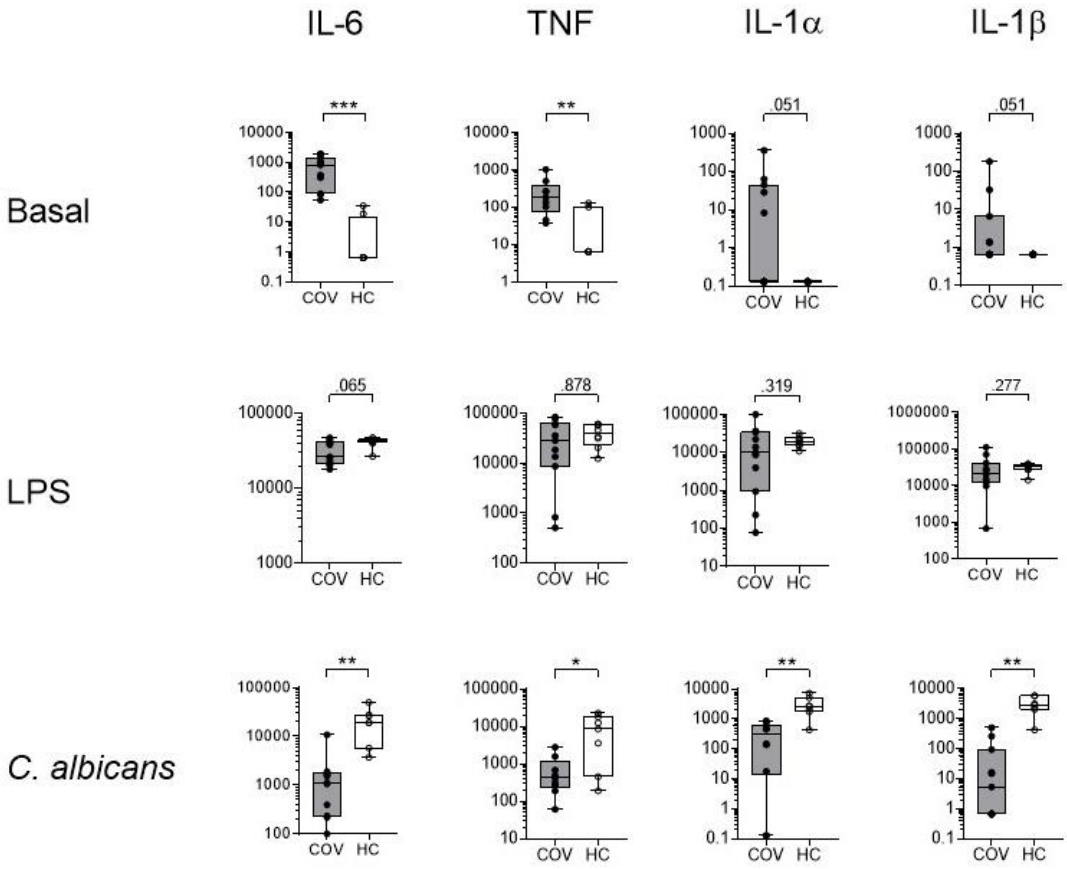

Abb. 4 Monozyten von COVID-19 Patienten weisen eine selektive Immunsuppression gegenüber *C. albicans* auf. Konzentrationen (pg/ml) von IL-6, TNF, IL-1α und IL-1β in plasmatischen Überständen nach einem sechsstündigen Vollblutinkubationsassay mit den Antigenen LPS und *C. albicans*. COV (graue Boxen): COVID-19 Patienten; HC (*healthy controls*, weiße Boxen): gesunde Kontrollprobanden. Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Zwei-Stichproben-t-Test oder Mann Whitney *U* Test *P < .05, **P < .01 (Moser et al., 2021 [88]).

Die ausbleibende Immunantwort auf eine Stimulation mit dem *C. albicans* Antigen könnte den vermehrt beobachteten Candidosen bei COVID-19 Patienten mit ARDS zugrunde liegen [84, 95].

4.2 Die Modulation der Monozytenaktivität durch eine SARS-CoV-2 Infektion

Die Frage nach dem Eintrittsweg von SARS-CoV-2 in Monozyten und Makrophagen und auch die mit einer Infektion zusammenhängenden Veränderungen der Monozytenreaktion wurden durch translationale klinische und experimentelle Ansätze adressiert.

4.2.1 GRP78 wird bei COVID-19 verstärkt auf der Zelloberfläche von Monozyten exprimiert

Da Monozyten und Makrophagen über einen bisher nicht aufgeklärten Eintrittsweg direkt mit SARS-CoV-2 infiziert werden können, haben wir im Folgenden die Rolle von GRP78, welches über computerbasierte Modellierungen als potentieller Eintrittsrezeptor identifiziert wurde [43, 44], untersucht. Dafür haben wir zunächst die zellständige Expression von GRP78 (csGRP78, von *cell surface* GRP78) auf primären Zellen aus peripherem Blut quantifiziert. Der Schwerpunkt lag dabei auf COVID-19 Patienten, die einen hospitalisierungspflichtigen Verlauf hatten, jedoch keine intensivmedizinische Behandlung benötigten. Als Kontrollen wurden Blutproben von gesunden Blutspendern selben Alters und mit einer gleichen Geschlechterverteilung vermessen. Mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen GRP78 und durchflusszytometrische Messungen konnten wir nachweisen, dass die peripheren Monozyten dieser COVID-19 Patienten csGRP78 signifikant höher exprimierten als die Monozyten der Kontrollprobanden (Abb.5) (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]).

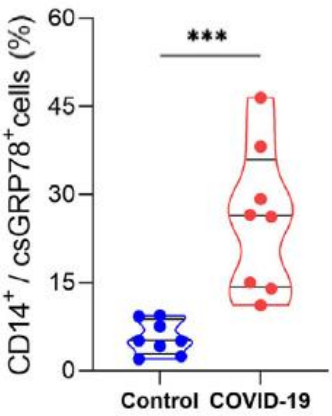

Abb. 5 Monozyten exprimieren bei COVID-19 verstärkt csGRP78. Oberflächenexpression von GRP78 bei primären Monozyten aus peripherem Blut von gesunden Kontrollprobanden (Control, n=8) und moderat erkrankten COVID-19 Patienten (COVID-19, n=8). Die Werte geben den prozentualen Anteil csGRP78-positiver $CD14^+$ Monozyten an. Die Violinplots zeigen die Medianwerte und den Interquartilbereich. Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Mann Whitney *U* Test ***P < .005 (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]).

Unter Verwendung weiterer Antikörper konnten wir auch eine erhöhte Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD86 und TLR2 zeigen. Bei den COVID-19 Patienten haben wir zudem erhöhte Plasmakonzentrationen von löslichem GRP78, sowie der pro-inflammatorischen Zytokine IFNγ, IL-6 und sIL-1Ra und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gemessen (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]), was auf ein bereits in vorangegangenen Untersuchungen von uns beschriebenes erhöhtes pro-inflammatorisches Potenzial von

Monozyten hindeutet (Moser et al., 2021 [88]). Zur näheren Untersuchung, welche Auswirkungen eine SARS-CoV-2 Infektion und hospitalisierungspflichtige COVID-19 Erkrankung auf die Monozyten dieser Patienten auf transkriptioneller Ebene hat, haben wir die Monozyten mittels magnetischer *beads* aus dem Vollblut separiert, deren RNA isoliert und mittels Hochdurchsatzsequenzierung vermessen lassen. Unsere bioinformatische Analyse ergab beim Vergleich von Monozyten der Patienten und der Kontrollprobanden eine Anzahl von 1048 differenziell exprimierten Genen. Eine anschließende Pathway-Enrichment-Analyse verdeutlichte, dass diese Gene vor allem bei Signalwegen zu zellulären Stressantworten, SARS-CoV-2 Infektionen, Virus- sowie Infektionserkrankungen im Allgemeinen und bei der UPR, bei der GRP78 maßgeblich involviert ist [46], angereichert gewesen sind (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]). Anhand immunhistozytochemischer Färbungen an histopathologischen Schnitten von Lungengeweben von COVID-19 Patienten *post-mortem* zeigten wir ebenfalls eine erhöhte Expression von GRP78 bei $CD14^+$ Monozyten (Abb. 6a, b) sowie bei $CD68^+$ Makrophagen. Der Vergleich erfolgte zu Kontrollpatienten, die an einem Herzinfarkt, also einer nicht-inflammatorischen Erkrankung, verstorben sind. Darüber hinaus wurde eine Kolokalisation von CD14- und SARS-CoV-2- Signalen detektiert, was auf eine direkte Infektion von Monozyten schließen lässt (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]) (Abb. 6c).

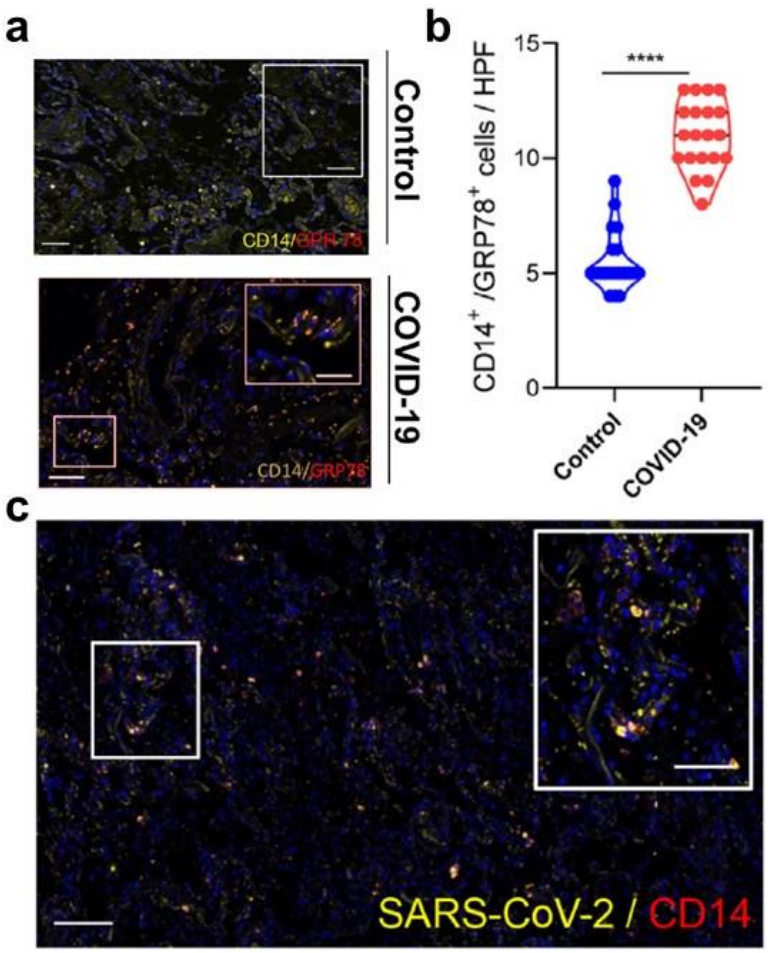

Abb. 6 GRP78 wird verstärkt auf Monozyten im Lungengewebe von COVID-19 Patienten exprimiert. (a) Repräsentative Färbungen von CD14 (gelb) und GRP78 (rot) und (b) Auswertung der $CD14^{+}/GRP78^{+}$ Zellen pro Hauptgesichtsfeld bei Kontrollpatienten (n=20) und COVID-19 Patienten (n=20). Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Mann Whitney *U* Test ***P < .001. (c) Repräsentative Färbungen von CD14 (rot) und SARS-CoV-2 (gelb) in Lungengewebe von COVID-19 Patienten. Bei (a) und (c) je 20-fache Vergrößerung (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]).

Durch diese Experimente konnten wir bestätigen, dass SARS-CoV-2 Monozyten direkt infiziert und dass dies mit einer erhöhten Expression von csGRP78 bei diesen Zellen einhergeht. Die erhöhte Expression von csGRP78 auf Monozyten bei moderater und schwerer/tödlich verlaufender COVID-19 Erkrankung werten wir dabei als Stressantwort dieser Zellen auf die SARS-CoV-2 Infektion (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]).

Unsere Ergebnisse konnten wir durch erneute bioinformatische Analysen von Datensets, die von Liao et al. [97] und Grant et al. [98] aus Zellen der Spülflüssigkeit nach bronchoalveolärer Lavage (BALF) bei schwer erkrankten COVID-19 Patienten mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNAseq) erhoben wurden, bekräftigen. Zum einen hat sich die Zusammensetzung der monozytären Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert. Während bei den Kontrollen überwiegend alveoläre Makrophagen im BALF vorzufinden waren (96,1 %), war dieser Anteil bei den COVID-19 Patienten drastisch reduziert (1,0 % bzw. 33,1 %) und von Monozyten abstammenden Makrophagen dominiert (58,9 % bzw. 47,0 %), sowie stark von klassischen (28,9 % bzw. 7,5 %) und nicht-klassischen Monozyten (11,2 % bzw. 12,4 %) unterwandert. Zum anderen zeigte sich, dass mit SARS-CoV-2 infizierte

Populationen besonders stark GRP78 exprimierten, was bei den von Monozyten abstammenden Makrophagen am stärksten ausgeprägt gewesen ist. Weitere bioinformatische Re-Analysen aus einem Datensatz von Stephenson et al. [99] zeigten interessanterweise zudem, dass Monozyten bei moderatem COVID-19 am stärksten GRP78 exprimieren (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]).

4.2.2 Nachweis einer direkten Interaktion zwischen dem SARS-CoV-2 Spike Protein und GRP78

Die Prüfung einer direkten Interaktion zwischen GRP78 und dem SARS-CoV-2 Spike Protein erfolgte durch einen Glutathion-S-Transferase(GST)-*Pulldown-Assay* und Ko-Immunpräzipitation. Dabei konnten wir sowohl mit dem vollständigen Spike Protein, als auch lediglich mit der S1 Untereinheit eine Interaktion nachweisen. Durch oberflächenresonanzspektroskopische Messungen ermittelten wir für das SARS-CoV-2 Wildtyp Spike Protein eine Bindungsaffinität mit einer Dissoziationskonstante von K_D = 55,2 nM und für die Omikron-Variante sogar von lediglich K_D = 27,2 nM (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]), was vergleichbar ist mit der Bindungsaffinität zwischen dem Spike Protein und ACE2 (K_D = 23,2) [100] und eine deutliche stärkere Bindung aufweist, als andere alternative SARS-CoV-2 Rezeptoren wie etwa CD147 (K_D = 185 nM) [40] oder AXL (K_D = 882 nM) [41].

4.2.3 Pro-inflammatorische Zytokine induzieren eine csGRP78 Expression

Da GRP78 eigentlich ein Chaperon ist, welches seine Hauptfunktionen bei der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase unter Situationen von zellulärem Stress einnimmt [45, 46], haben wir den Einfluss eines inflammatorischen Zytokinmilieus auf die Expression von csGRP78 und weiteren Aktivierungsmarkern bei primären humanen $CD14^+$ Monozyten und bei der humanen monozytenähnlichen Zelllinie THP-1 überprüft. Dafür verwendeten wir einen Cocktail aus den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1β, IL-6, IFNγ und TNF. Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen dabei Werten, wie wir sie auch im Plasma von COVID-19 Patienten während der hyperinflammatorischen Phase gemessen haben (Moser et al., 2021 [88]). Nach einer 48-stündigen Inkubation wurde mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper und Durchflusszytometrie eine verstärkte Expression von csGRP78 und CD40, CD69, CD80, CD86 und HLA-DR auf beiden untersuchten Zelltypen nachgewiesen, was auf eine direkte regulatorische Funktion von proinflammatorischen Zytokinen auf die Monozytenhyperaktivierung, aber vor allem auch auf die csGRP78 Expression schließen lässt (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]). Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie wurde bei THP-1 Zellen mit verstärkter csGRP78 Expression eine erhöhte Bindung des SARS-CoV-2 Spike Proteins detektiert. Die Spezifität der Bindung des

Spike Proteins an csGRP78 konnten wir durch den Einsatz der Inhibitoren Brefeldin A, welches die Translokation von GRP78 an die Zelloberfläche verhindert und AR-12, einen Inhibitor der GRP78 Transkription, bestätigen. Unter Einsatz dieser beiden Inhibitoren war das SARS-CoV-2 Signal an den Zellen signifikant reduziert (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]).

4.2.4 csGRP78 ist eine alternativer SARS-CoV-2 Eintrittsrezeptor auf Monozyten

Um weiter der Frage nachzugehen, ob csGRP78 als alternativer Eintrittsrezeptor für SARS-CoV-2 auf Monozyten in Frage kommt, konstruierten wir mittels lentiviraler Transduktion GRP78-überexprimierende THP-1 Zellen (hGRP78-THP-1). Diese Zellen wiesen wie auch Monozyten keine nennenswerte Expression von ACE2 auf. Die hGRP78-THP-1 Zellen wurden mit einem SARS-CoV-2 Spike Protein Pseudovirus inkubiert, der ein duales GFP- (*green fluorescent protein*)- und Luciferase- Reportergen beinhaltete. Die Virusaufnahme konnte daher mittels fluoreszenzmikroskopischer Detektion von GFP und der Enzymaktivität der Luciferase ermittelt werden. Durch beide Nachweismethoden konnten wir bestätigen, dass eine Überexpression von csGRP78 mit der Aufnahme des SARS-CoV-2 Pseudovirus einhergeht (Abb. 7a). Eine zusätzliche Inkubation mit den spezifischen Inhibitoren Brefeldin A und SubA (die A Untereinheit des AB5 Toxins, einer selektiven GRP78 Serinproteinase) führte auch bei hGRP78-THP-1 Zellen zu einer Reduktion von csGRP78 und einer deutlichen Verminderung des GFP-Signals, also einer reduzierten Aufnahme des Pseudovirus (Abb. 7b).

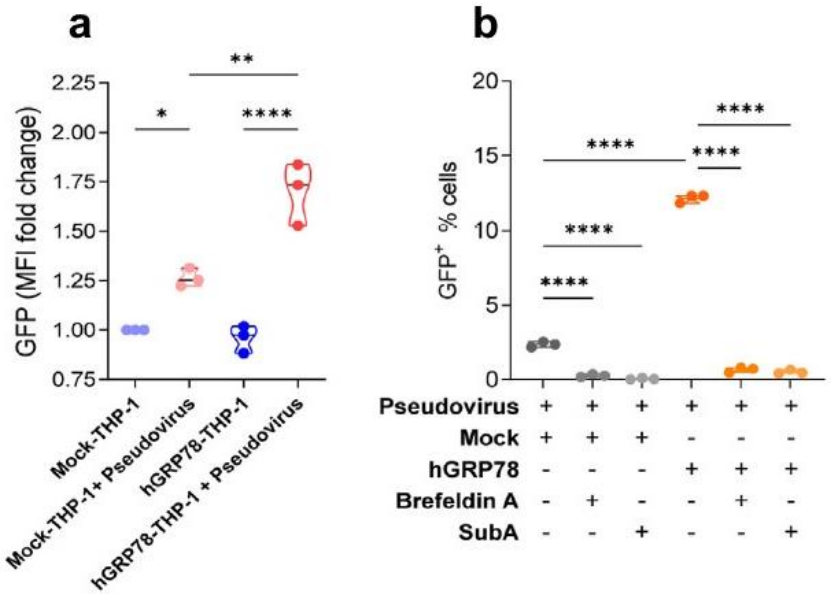

Abb. 7 Die Überexpression von GRP78 resultiert in einer erhöhten Virusaufnahme. (a) Nachweis der Aufnahme des SARS-CoV-2 Spike Protein Pseudovirus mittels Aktivität des GFP-Reportergens bei GRP78-überexprimierenden Zellen. (b) Verringerung des GFP-Signals nach Inkubation mit den GRP78 Inhibitoren Brefeldin A und SubA. Unterschiede zwischen den Gruppen mittels one-way ANOVA und Tukey post-hoc Test. *P < .05, **P < .01****P < .001 (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]).

Durch abschließende Analysen wurde eine unspezifische Aufnahme des Spike Proteins durch Phagozytose ausgeschlossen. Dafür induzierten wir in HEK293 T-Zellen, welche keine phagozytotischen Eigenschaften besitzen, mittels Transfektion mit einem pGRP78-pmCherry-N1 Plasmid eine Überexpression von GRP78 (hGRP78-HEK293T Zellen). Fluoreszenzmikroskopische Analysen bestätigten die Anlagerung des Spike Proteins an csGRP78, welches ausschließlich auf den GRP78 überexprimierenden hGRP78-HEK293T Zellen vorzufinden war (Han, Lv, Moser et al., 2023 [96]).

Diese Untersuchungen zeigen, dass Monozyten über csGRP78 und unabhängig von ACE2 mit SARS-CoV-2 infiziert werden können. Weiterhin legen die Ergebnisse der beschriebenen Experimente nahe, dass ein pro-inflammatorisches Zytokinmilieu zu den Schlüsselkonditionen zählt, welche eine erhöhte csGRP78 Expression induzieren.

4.3 Die Manipulation von Immunzellfunktionen durch medikamentöse und physikalische Behandlungsstrategien

In *in vitro* und *ex vivo* Untersuchungen sollte das Verständnis über die Auswirkungen von unterschiedlichen Behandlungsszenarien mit Hydrocortison und Gravitationsprotokollen auf die Immunantwort im Allgemeinen und die Monozytenreaktion im Speziellen verbessert werden. Dies ermöglicht es, Immun(dys)funktionen zielgerichtet, individualisiert und auch mit innovativen therapeutischen Ansätzen entgegenzutreten.

4.3.1 Modulation von Pyroptose durch akute oder chronische Exposition mit Hydrocortison

Bei der Verabreichung von Glukokortikoiden werden endogene Cortisol-Konzentrationen des Patienten, die vor allem bei medizinisch induzierter Immunsuppression oder bei einer hohen Stressbelastung erhöht sind [78], nicht berücksichtigt. Zur Untersuchung, ob akut oder chronisch erhöhte Glukokortikoid-Konzentrationen unterschiedliche Auswirkungen auf die Monozytenfunktion während einer bakteriellen Infektion haben, haben wir in einem *in vitro* Ansatz die Pyroptoseinduktion bei THP-1 Makrophagen unter verschiedenen Behandlungssequenzen mit Hydrocortison analysiert. Hierfür differenzierten wir THP-1 Monozyten durch Phorbol-12-myristat-13-acetat zu Makrophagen aus, die dann für 24 Stunden mit Hydrocortison entweder in physiologischen Konzentrationen von 0,1 µg/ml oder in moderat (0,2 µg/ml) oder stark erhöhten (0,4 µg/ml) Konzentrationen, wie sie bei immunsupprimierten oder gestressten Patienten gemessen werden, inkubiert wurden. Zellen ohne Hydrocortison dienten als Negativkontrolle. Pyroptose wurde in den THP-1 Makrophagen mittels Priming mit LPS und mit ATP als sekundären und auslösenden Stimulus induziert. Zum Zeitpunkt der Pyroptoseinduktion wurde die Hydrocortison-Konzentration von 0,1 µg/ml auf 0,2 bzw. 0,4 µg/ml erhöht, was einem akuten Anstieg durch Glukokortikoid-Therapie entspricht oder bei den Ursprungskonzentrationen belassen, um eine Situation chronisch erhöhter Konzentrationen zu simulieren. Die Auswirkungen von Hydrocortison auf die Pyroptoseinduktion haben wir mittels Western Blot Analyse der aktivierenden Phosphorylierungen der NF-κB-p65 Untereinheit und p38, sowie der Expression der Pyroptose-assoziierten Proteine NLRP3, Caspase-1 und Gasdermin D untersucht. Eine akute Exposition mit Hydrocortison bewirkte keine Änderung bezüglich der Produktion, Phosphorylierung oder Spaltung dieser Proteine, wohingegen eine chronische Hydrocortison-Exposition zu einer Reduktion führte. Durch Ko-Immunpräzipitation der Inflammasomkomponenten NLRP3 und ASC und mittels konfokaler fluoreszenzmikroskopischer Analysen der nukleären Translokation von p65, sowie der Ko-

Lokalisation von NLRP3 und ASC haben wir die Aktivierung des NF-κB Signalweges und die Assemblierung des Inflammasoms überprüft und den Sachverhalt aus den Western Blot Analysen bestätigt. Des Weiteren konnte hier durch Western Blot Analysen semiquantitativ gezeigt werden, dass die Aktivierung von intrazellulärem IL-1β bereits bei physiologischen Konzentrationen (0,1 µg/ml) im Vergleich zur Negativkontrolle reduziert gewesen ist, was für einen physiologischen Regulationsmechanismus der IL-1β Aktivität spricht. Sowohl bei akut, als auch bei chronisch erhöhten Hydrocortison-Konzentrationen war der Anteil an intrazellulärem aktivierten IL-1β reduziert, was bei der akuten Exposition stärker ausfiel als unter chronischen Bedingungen. Weiterführende Messungen der extrazellulären Konzentration von IL-1β und gespaltener Caspase-1 mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ergaben eine erhöhte Freisetzung beider Proteine beim akuten Ansatz und eine Reduktion bei einer chronischen Hydrocortison-Exposition (Abb. 8). Dies deutet darauf hin, dass chronisch verabreichtes Hydrocortison zu einer verminderten Produktion und Reifung von IL-1β und Caspase-1 führt, wohingegen eine akute Gabe die Freisetzung beider Proteine begünstigt und der regulatorische Effekt physiologischer Hydrocortison-Konzentrationen sogar ausgesetzt wird (Han, Choukér, Moser, 2024 [101]).

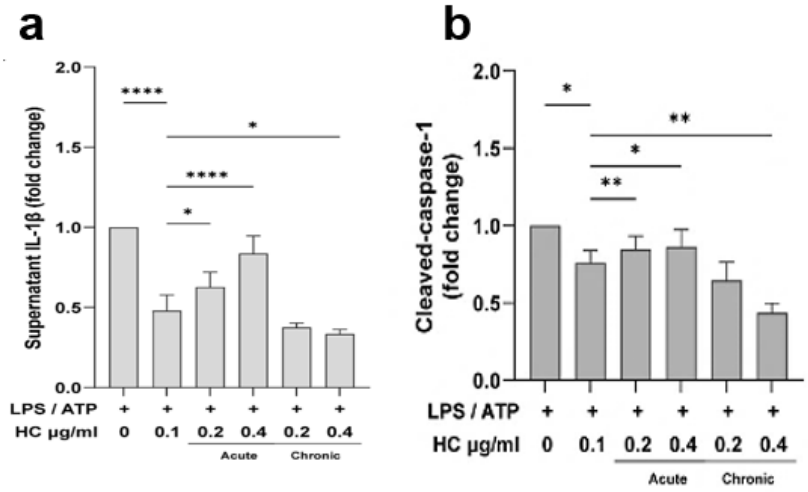

Abb. 8 Eine akute Erhöhung der Hydrocortison-Konzentration fördert die Freisetzung von IL-1β und gespaltener Caspase-1. THP-1 Makrophagen wurden mit 0.1 µg/ml Hydrocortison (HC) vorbehandelt. Ein akuter Anstieg umfasste die Erhöhung auf 0.2 oder 0.4 µg/ml bei Pyroptoseinduktion. Bei chronischer Exposition lagen die Hydrocortison-Konzentrationen konstant bei 0.2 oder 0.4 µg/ml. Zellen, die nicht mit Hydrocortison behandelt wurden dienten als Negativkontrolle. Werte zeigen n-fache Änderung der Konzentration im Zellüberstand von (a) IL-1β und (b) Caspase-1 zur Negativkontrolle (n=3). Unterschiede zwischen den Gruppen mittels one-way ANOVA., *P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.001 (Han, Choukér, Moser, 2024 [101]).

Dies spiegelte sich in Analysen zum Zellüberleben wider. Die durchflusszytometrische Quantifizierung pyroptotischer Zellen und Immunoassays zur Messung der Zelllyse anhand der Lactatdehydrogenase Konzentration ergaben Werte beim akuten Expositionsansatz, die vergleichbar zur Negativkontrolle gewesen sind. Bei chronisch mit Hydrocortison behandelten Zellen hingegen wurde eine Reduktion von Pyroptose und Zelltod festgestellt (Han, Choukér, Moser, 2024 [101]). Die Ergebnisse dieser *in vitro* Untersuchungen verdeutlichen drei bedeutende Zusammenhänge zwischen Hydrocortison und dessen Effekt auf Pyroptose bei THP-1 Makrophagen. Es wurde erstens festgestellt, dass unter Hydrocortison-defizienten Bedingungen eine physiologische Regulation der IL-1β Produktion ausbleibt. Patienten mit Nebenniereninsuffizienzen könnten daher ein erhöhtes Risiko für eine exzessive Zytokinausschüttung bei bakteriellen Infektionen haben. Zweitens könnte ein ähnliches Risiko bei einer akuten Verabreichung von hohen Hydrocortison-Konzentrationen auftreten. Denn beim akuten Ansatz beobachteten wir eine erhöhte Freisetzung von IL-1β, ohne dass vermehrt Zelltod aufgetreten ist, was auf eine Hyperaktivierung der THP-1 Makrophagen schließen lässt. Addiert sich die IL-1β Freisetzung, die aufgrund der Inflammasomaktivierung durch das Pathogen selbst und durch DAMPs von umliegenden sterbenden Zellen stattfindet mit der zusätzlichen Verabreichung von hochkonzentriertem Hydrocortison, kann auch dies zu übermäßig hohen IL-1β Werten führen. Drittens und abschließend wird die Pyroptoseaktivität von Makrophagen durch chronisch hohe Hydrocortison-Dosen deutlich reduziert, was zu einer potentiell reduzierten Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten führt, die das Abtöten und Beseitigen des Pathogens vermitteln würden. Eine zusätzliche medikamentöse Behandlung mit Hydrocortison oder anderen Glukokortikoiden könnte die Immunantwort weiter beeinträchtigen.

4.3.2 Modulation der Monozyten- und T-Zellaktivierung durch veränderte Gravitation

4.3.2.1 Der Einfluss von Mikro- und Hypergravitation

Es ist bekannt, dass Monozyten und auch andere Zellen des Immunsystems eine Empfindlichkeit gegenüber physikalischen Faktoren aufweisen [5]. Die Physiologie eines jeden Lebewesens auf der Erde ist an die Gravitation von 1*g* angepasst. Wird von dieser Norm abgewichen, stellt das eine einzigartige Extrembedingung dar, einzelne Zelltypen in ihrer Funktion und Dysfunktion besser zu verstehen und dadurch für den Fall von auftretenden Dysfunktionen innovative Gegenmaßnahmen entwickeln zu können.

Zur näheren Charakterisierung der Veränderungen von Immunfunktionen unter veränderter Gravitation untersuchten wir den Aktivitätsstatus von Monozyten und T-Zellen sowie das Zytokinprofil nach einem *ex vivo* Vollblutinkubationsassay im Parabelflug (Moser et al., 2019 [102]). Insgesamt wurden die Ansätze sechs Stunden mit LPS, HKLM oder PWM inkubiert, wobei zwei Stunden der Gesamtinkubationsdauer unter alternierender Mikro ($1x10^{-4}g$)- und Hypergravitation (1,8*g*) stattgefunden haben. Das durch Fluorochrom-konjugierte Antiköper und Durchflusszytometrie ermittelte Level der Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern ergab zwei unterschiedliche Aktivitätsmuster bei Monozyten: Zum einen haben wir eine erhöhte Aktivierung der Zellen durch eine Antigeninkubation unter alternierender Gravitation mittels Analyse der CD69 Expression quantifiziert. Andererseits führten diese Bedingungen im Vergleich zur Bodenkontrolle auch zu einer reduzierten Expression von TLR2 und HLA-DR auf der Zelloberfläche (Moser et al., 2019 [102]), was für eine Suppression von Monozyten spricht [103, 104] (Abb. 9).

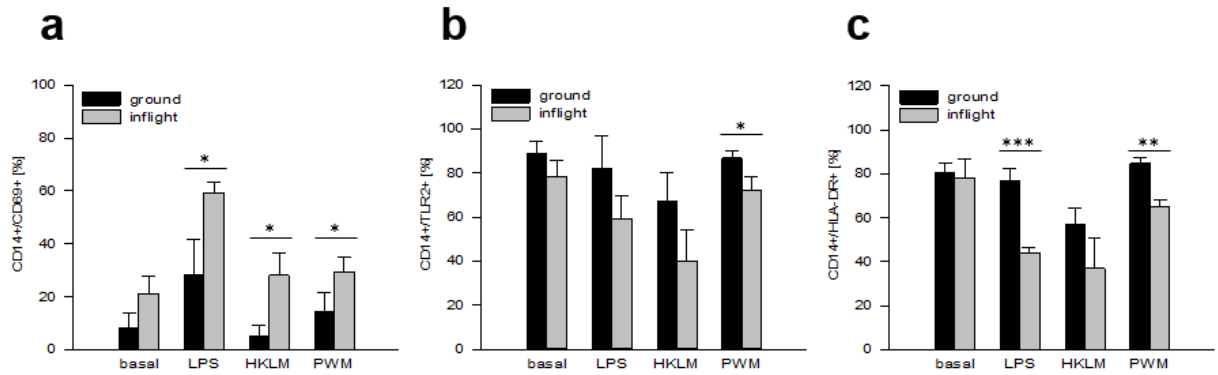

Abb. 9 Expression von Oberflächenmarkern auf Monozyten nach einem Vollblutinkubationsassay im Parabelflug. Expression der Aktivierungsmarker (a) CD69, (b) TLR2 und (c) HLA-DR auf $CD14^+$ Monozyten nach einer Inkubation mit LPS, HKLM und PWM. Balkendiagramme zeigen Mittelwerte von CD14/CD69, CD14/TLR2 oder CD14/HLA-DR doppelpositiven Monozyten (n=3). Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Zwei-Stichproben-t-Test, *P < .05, **P < .01, ***P < .001 (Moser et al., 2019 [102]).

Dieses Muster konnten wir durch Analysen zur Zytokinausschüttung bestätigen. Die Inkubation mit LPS, HKLM und PWM während dem Parabelflug resultierte in einer verstärkten Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IL-6 und TNF, aber auch des anti-inflammatorischen IL-10. Hingegen hatte alternierende Gravitation keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von CD69, CD28 und CD152 auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (Moser et al., 2019 [102]). Zur Klärung, welche der beiden Gravitationsbedingungen eine aktivierende und welche eine supprimierende Wirkung auf die untersuchten Leukozyten hat, folgten Stimulationsexperimente unter simulierter µ*g* (s-µ*g*) durch zweidimensionale Klinorotation

und unter milder Hypergravitation von 2,8*g*. Die Expressionen der Aktivierungsmarker auf der Oberfläche von Monozyten zeigten keine signifikanten Änderungen zwischen einer Antigeninkubation bei 1*g* oder s-µ*g* bzw. bei Hypergravitation. Allerdings wiesen die Medianwerte der CD80 Expression eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Erhöhung unter einer Antigeninkubation in s-µ*g* auf. Die gemessenen Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1α, IL-1β und TNF waren nach einer Antigeninkubation in s-µ*g* deutlich erhöht (Moser et al., 2023 [105]), was für IL-1β ebenfalls in echter µ*g* auf der ISS beobachtet wurde [64]. Erfolgte die Inkubation in Hypergravitation, waren die Zytokinkonzentrationen im Vergleich zur 1*g* Kontrolle deutlich reduziert (Abb. 10).

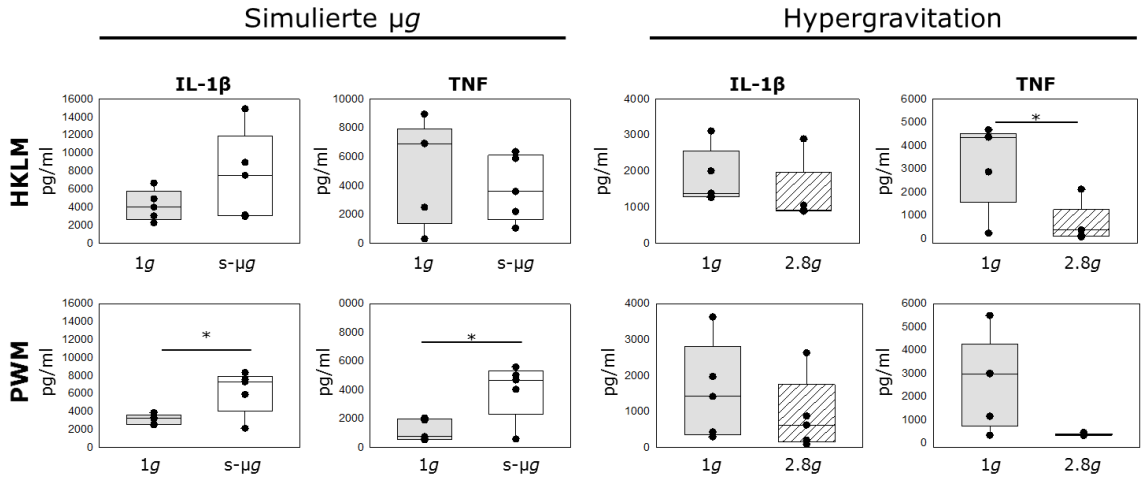

Abb. 10 Differenzielle Effekte von s-µ*g* und Hypergravitation (2,8*g*) auf die Ausschüttung von IL-1β und TNF im Vollblutinkubationsassay. Nach einer sechsstündigen Inkubation mit den Antigenen HKLM und PWM in s-µ*g* und Hypergravitation (2,8*g*) wurde die Konzentration von IL-1β und TNF quantifiziert und mit der 1*g* Kontrolle verglichen (n=5). Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Zwei-Stichproben-t-Test oder Mann Whitney U Test, *P < .05 (Moser et al., 2023 [105]).

Invers verhielt sich die Aktivierung von T-Zellen unter s-µ*g*. Nach Stimulationen mit HKLM und PWM in s-µ*g* wurde bei $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen eine signifikante Reduktion der CD69-Oberflächenexpression, also eine verminderte Aktivierung im Vergleich zur 1*g* Kontrolle gemessen (Abb. 11). Auch die Konzentrationen des T-Zell spezifischen Zytokins IFNγ waren nach den Antigeninkubationen in s-µ*g* tendenziell reduziert (Moser et al., 2023 [105]).

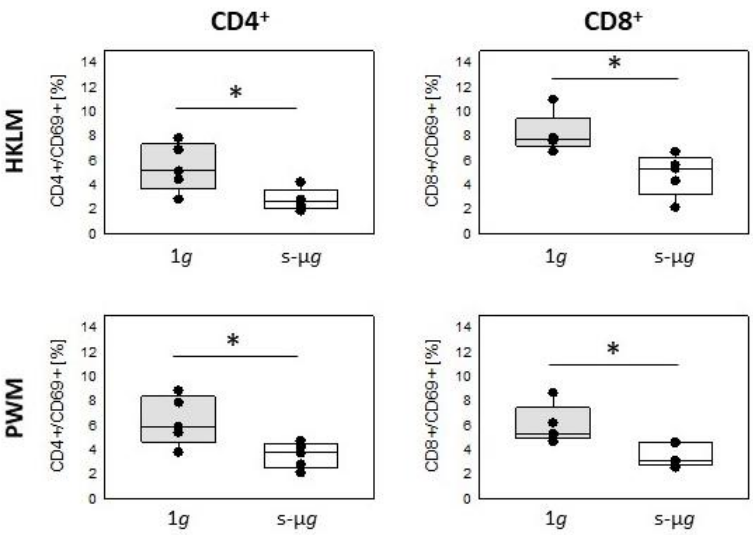

Abb. 11 Oberflächenexpression von CD69 auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Nach einer sechsstündigen Inkubation mit den Antigenen HKLM und PWM in s-µ*g* wurde der Anteil CD4/CD69 bzw. CD8/CD69 doppelpositiver Zellen durchflusszytometrisch vermessen (n=5). Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Zwei-Stichproben-t-Test, *P < .05 (Moser et al., 2023 [105]).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass s-µ*g* das pro-inflammatorische Potenzial von Monozyten verstärkt, wohingegen milde Hypergravitation von 2,8*g* zu einer reduzierten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine führt. T-Zellen hingegen sind durch s-µ*g* in ihrer Aktivierbarkeit gehemmt und von einer alleinigen Exposition mit milder Hypergravitation unbeeinflusst. Die gegenläufigen Beobachtungen der Monozytenaktivierung, die wir im Parabelflugexperimenten gemacht haben (Moser et al., 2019 [102]), können durch die persistierend alternierenden Gravitationsbedingungen erklärt werden, von denen bekannt ist, dass sie die CD69-Expression auf Leukozyten erhöhen können [106].

4.3.2.2 Präkonditionierung durch Hypergravitation

Zur Klärung unserer Frage, ob den inflammationsfördernden Effekten von s-µ*g* auf Monozyten und den inhibierenden Auswirkungen auf T-Zellen durch Hypergravitation (2,8*g*) entgegengewirkt werden kann, wurde der Vollblutinkubationsassay mit den Antigenen HKLM und PWM unter drei unterschiedlichen Sequenzen alternierender Gravitationslevel durchgeführt. Es wurde ein Präkonditionierungsansatz erprobt, bei dem die Inkubation zuerst für zwei Stunden in Hypergravitation absolviert und anschließend für vier Stunden in s-µ*g* fortgeführt wurde. Zudem wurden zwei Ansätze implementiert, bei dem die Hypergravitation entweder in der Mitte oder am Ende der Inkubation in s-µ*g* angesetzt wurde (Abb. 12).

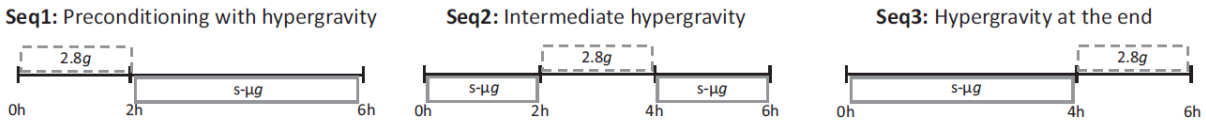

Abb. 12 Schemata zu den unterschiedlichen Behandlungsansätzen mit Hypergravitation. (Seq1) Präkonditionierung mit Hypergravitation; Therapeutische Ansätze mit Hypergravitation inmitten (Seq2) oder am Ende (Seq3) einer Antigeninkubation in s-µ*g* (Moser et al., 2023 [105]).

Im Rahmen dieser erprobten Behandlungssequenzen konnten wir ausschließlich durch den Präkonditionierungsansatz einen protektiven Effekt auf die T-Zellaktivierung bewirken. Die Oberflächenexpression von CD69 erreichte bei beiden T-Zell Subtypen wieder das Niveau der 1*g* Kontrolle (Abb. 13) und die Freisetzung von IFNγ war im Vergleich zu den anderen Ansätzen erhöht. Dem erhöhten pro-inflammatorischen Potenzial der Monozyten konnte nicht entgegengewirkt werden (Moser et al., 2023 [105]). Das Prinzip der Präkonditionierung beruht auf der Exposition von Zellen, Geweben oder einem Organismus mit einem initialen und in seiner Intensität nicht schädlichen Stimulus, der zu einer Toleranz gegenüber einem späteren und intensiveren Stimulus der gleichen Art führen soll. Die Wirksamkeit dieses Prinzips wurde auf medizinischer Ebene bereits anhand der hypoxischen, pharmakologischen und ischämischen Präkonditionierung belegt [107].

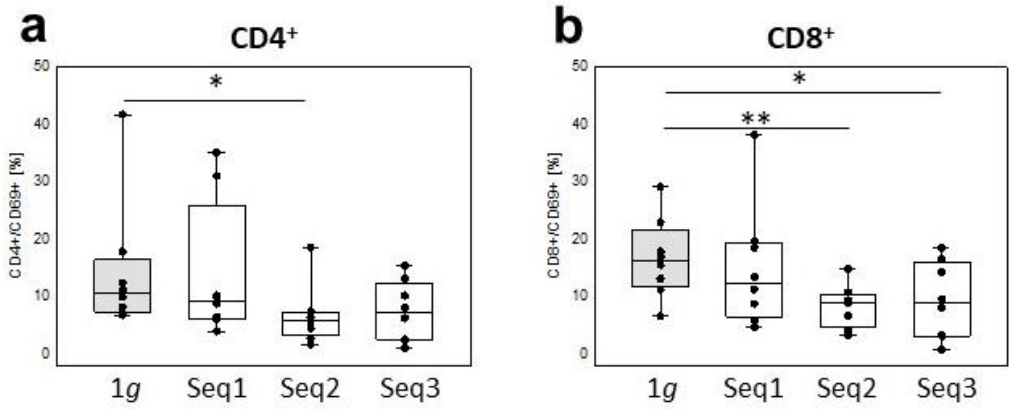

Abb. 13 Oberflächenexpression von CD69 auf CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen nach den Behandlungssequenzen Seq1-Seq3. Nach einer sechsstündigen Inkubation mit dem Antigen PWM in s-µ*g* unter dem Ansatz der Präkonditionierung mit Hypergravitation (2,8*g*) (Seq1), oder Hypergravitation inmitten (Seq2) oder am Ende (Seq3). Der Anteil CD4/CD69 bzw. CD8/CD69 doppelpositiver Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt (n=8). Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Zwei-Stichproben-t-Test oder Mann Whitney U Test , *P < .05, **P < .01 (Moser et al., 2023 [105]).

Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen stellen einen ersten Ansatzpunkt zur Entwicklung von Gegenmaßnahmen von raumfahrtbedingten Immundysfunktionen dar, die auf Präkonditionierung mit Hypergravitation beruhen. Allerdings implizieren diese Beobachtungen auch, dass durch milde Hypergravitation auch beeinträchtigten Immunfunktionen bei Patienten auf der Erde entgegengewirkt werden kann, was weiterer Untersuchungen in der Zukunft bedarf. Die Wirksamkeit von Hypergravitation auf andere physiologische Systeme und Krankheitsbilder wurde bereits erwiesen. So wurde im Nagetiermodell gezeigt, dass Hypergravitation das Muskelvolumen und die Knochendichte erhöht [108, 109], was in medizinischen Rehabilitationsprogrammen und bei Menschen mit altersbedingten Erkrankungen wie Osteoporose vorteilhafte therapeutische Effekte hervorrufen kann. Tatsächlich findet Hypergravitation bereits seit vierzig Jahren Einsatz in der Humanmedizin. In Uruguay werden Patienten mit Gefäßerkrankungen wie koronaren Herzerkrankungen, Lymphödemen und dem sekundären Raynaud Syndrom erfolgreich durch die Exposition mit milder Hypergravitation therapiert [110].

5. Zusammenfassung und Ausblick

Monozyten weisen in unterschiedlichen Kontexten der Infektion und Inflammation differenzielle Muster in ihrer Funktionalität auf. Die präsentierten Ergebnisse dieser Arbeit beantworten die eingangs formulierten Fragen. Wir konnten zeigen, inwieweit schwere systemische Infektionen unterschiedlichen Ursprungs die Immunantwort und insbesondere die Monozytenreaktion, auf eine Sekundärinfektion verändern. Bei schwer erkrankten COVID-19 Patienten mit ARDS tritt im Vergleich zu Sepsispatienten nach einem initialen Zytokinsturm keine Immunparalyse ein und eine überwiegend intakte multifunktionale Zytokinantwort auf Stimulation mit mitogenen, bakteriellen und fungalen Antigenen bleibt erhalten. Allerdings wurde eine selektive Immunsuppression gegenüber *Candida albicans* bei den COVID-19 Patienten identifiziert, was eine erhöhte Aufmerksamkeit behandelnder Ärzte auf Kandidosen bei diesem Patientenkollektiv lenken sollte. Zur Prüfung, ob diese selektive Immunsuppression spezifisch für *Candida albicans* auftritt oder auch für andere klinisch relevante *Candida*-Stämme, werden derzeit weiterführende Untersuchungen durchgeführt und zugrundeliegende Mechanismen auf molekularer Ebene untersucht. Durch die Behandlung der Fragestellung, wie Monozyten mit SARS-CoV-2 infiziert werden, haben wir gezeigt, dass die pro-inflammatorischen Konditionen während COVID-19 eine verstärkte Expression des Chaperons GRP78 auf der Zelloberfläche von Monozyten induzieren, welches in einen alternativen Eintrittsmechanismus von SARS-CoV-2 in diese Zellen involviert ist und deren pro-

inflammatorisches Potenzial weiter fördert. Eine pharmakologische Blockade von csGRP78 könnte daher dazu beitragen, das hyperinflammatorische Syndrom während COVID-19 zu reduzieren. Hier könnte der Einsatz des niedermolekularen Inhibitors BOLD-100 erwogen werden, welcher die verstärkte Expression von GRP78 inhibiert und bereits in klinischen Phase 1b/2 Studien bei der Therapie von gastrointestinalen Tumoren getestet wird.

Der dritten Frage dieser Arbeit, inwieweit Immun(dys)funktionen durch medikamentöse und physikalische bzw. mechanische Behandlungsstrategien manipuliert werden können, wurde durch *in vitro* Untersuchungen nachgegangen. Im Rahmen des medikamentösen Ansatzes haben wir die Effekte von akut oder chronisch verabreichtem Hydrocortison auf die Pyroptose bei bakterieller Infektion verglichen. Dabei konnten wir ausarbeiten, dass chronisch hohe Hydrocortison-Konzentrationen, wie sie auch bei gestressten oder immunsupprimierten Patienten vorzufinden sind, Pyroptose inhibieren. Akute Erhöhungen der Hydrocortison-Konzentration, wie sie bei medikamentöser Eindämmung der Inflammation auftreten, zeigen aber eine verstärkte Freisetzung von IL-1β. Diese Erkenntnisse könnten klinisch auf eine individuelle Bewertung der Dosierung und Dauer von Hydrocortison in Abhängigkeit des endogenen Cortisolspiegels verwendet werden. IL-1β könnte hierbei als Marker für den aktuellen Aktivitätszustand von Monozyten und Makrophagen herangezogen werden.

Als physikalische Behandlungsstrategie haben wir *ex vivo* Expositionsexperimente mit realen und simulierten Gravitationsänderungen durchgeführt. Monozyten wiesen hierbei ein durch alternierende Gravitation, aber auch in simulierter µ*g* ein erhöhtes pro-inflammatorisches Potenzial auf. T-Zellen hingegen weisen in simulierter µ*g* eine verminderte Aktivierbarkeit auf, der durch eine Präkonditionierung mit milder Hypergravitation entgegengewirkt werden kann. Da milde Hypergravitation nachgewiesenermaßen gut toleriert wird [110] könnte die Erprobung eines therapeutischen Ansatzes mit Hypergravitation zur Behandlung von T-Zell Defekten erwogen werden. Für eine erste Überprüfung dieses Konzeptes *in vivo* ist im Nagetiermodell ein autologer T-Zelltransfer nach einer Exposition der Zellen mit Hypergravitation bei immundefizienten Mäusen und eine anschließende Analyse der Immunkompetenz denkbar.

6. Literaturverzeichnis

1. Saibil, H., *Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(10): p. 630-42.
2. Wan, Q., et al., *Stress proteins: the biological functions in virus infection, present and challenges for target-based antiviral drug development.* Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 125.
3. Klimova, E.M., et al., *Low molecular weight cytotoxic components (DAMPs) form the post-COVID-19 syndrome.* Immunobiology, 2023. **228**(1): p. 152316.
4. Yeager, M.P., et al., *The Stress Hormone Cortisol Enhances Interferon-υ-Mediated Proinflammatory Responses of Human Immune Cells.* Anesth Analg, 2018. **127**(2): p. 556-563.
5. Yamamoto, K., U. Ikeda, and K. Shimada, *Role of mechanical stress in monocytes/macrophages: implications for atherosclerosis.* Curr Vasc Pharmacol, 2003. **1**(3): p. 315-9.
6. Crucian, B., et al., *Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight.* Aviat Space Environ Med, 2011. **82**(9): p. 857-62.
7. Quintar, A.A., C.C. Hedrick, and K. Ley, *Monocyte phenotypes: when local education counts.* J Exp Med, 2015. **212**(4): p. 432.
8. Jakubzick, C.V., G.J. Randolph, and P.M. Henson, *Monocyte differentiation and antigen-presenting functions.* Nat Rev Immunol, 2017. **17**(6): p. 349-362.
9. Guilliams, M., A. Mildner, and S. Yona, *Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes.* Immunity, 2018. **49**(4): p. 595-613.
10. Zhai, Z., et al., *Attenuation of Rheumatoid Arthritis Through the Inhibition of Tumor Necrosis Factor-Induced Caspase 3/Gasdermin E-Mediated Pyroptosis.* Arthritis Rheumatol, 2022. **74**(3): p. 427-440.
11. Sánchez-Pozo, C., et al., *Leptin stimulates the oxidative burst in control monocytes but attenuates the oxidative burst in monocytes from HIV-infected patients.* Clin Exp Immunol, 2003. **134**(3): p. 464-9.
12. Kratofil, R.M., P. Kubes, and J.F. Deniset, *Monocyte Conversion During Inflammation and Injury.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(1): p. 35-42.
13. Kapellos, T.S., et al., *Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 2035.
14. Bianchini, M., et al., *PD-L1 expression on nonclassical monocytes reveals their origin and immunoregulatory function.* Sci Immunol, 2019. **4**(36).
15. Zhou, D., et al., *Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways.* Cell Signal, 2014. **26**(2): p. 192-7.
16. Shapouri-Moghaddam, A., et al., *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease.* J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6425-6440.
17. Liaskou, E., D.V. Wilson, and Y.H. Oo, *Innate immune cells in liver inflammation.* Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 949157.
18. Watanabe, A., et al., *Increases of CD80 and CD86 Expression on Peripheral Blood Cells and their Gene Polymorphisms in Autoimmune Thyroid Disease.* Immunol Invest, 2020. **49**(1-2): p. 191-203.
19. Terry, R.L., et al., *Inflammatory monocytes and the pathogenesis of viral encephalitis.* J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 270.
20. Krakauer, T., *Staphylococcal Superantigens: Pyrogenic Toxins Induce Toxic Shock.* Toxins (Basel), 2019. **11**(3).
21. Xiong, H. and E.G. Pamer, *Monocytes and infection: modulator, messenger and effector.* Immunobiology, 2015. **220**(2): p. 210-4.

22. Knoll, R., J.L. Schultze, and J. Schulte-Schrepping, *Monocytes and Macrophages in COVID-19.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 720109.
23. Organization, W.H. *WHO COVID-19 dashboard*. 2024 12.02.2024]; Available from: https://covid19.who.int/.
24. Huang, C., et al., *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.* Lancet, 2020. **395**(10223): p. 497-506.
25. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.* Nature, 2020. **579**(7798): p. 270-273.
26. Buonacera, A., et al., *Neutrophil to Lymphocyte Ratio: An Emerging Marker of the Relationships between the Immune System and Diseases.* Int J Mol Sci, 2022. **23**(7).
27. Huang, I. and R. Pranata, *Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis.* J Intensive Care, 2020. **8**: p. 36.
28. Trouillet-Assant, S., et al., *Type I IFN immunoprofiling in COVID-19 patients.* J Allergy Clin Immunol, 2020. **146**(1): p. 206-208.e2.
29. Remy, K.E., et al., *Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections.* JCI Insight, 2020. **5**(17).
30. Ragab, D., et al., *The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 1446.
31. Otsuka, R. and K.I. Seino, *Macrophage activation syndrome and COVID-19.* Inflamm Regen, 2020. **40**: p. 19.
32. Yang, A.P., et al., *The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients.* Int Immunopharmacol, 2020. **84**: p. 106504.
33. Chen, G., et al., *Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019.* J Clin Invest, 2020. **130**(5): p. 2620-2629.
34. Delorey, T.M., et al., *COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets.* Nature, 2021. **595**(7865): p. 107-113.
35. Junqueira, C., et al., *FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation.* Nature, 2022. **606**(7914): p. 576-584.
36. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor.* Cell, 2020. **181**(2): p. 271-280.e8.
37. Wang, Q., et al., *Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2.* Cell, 2020. **181**(4): p. 894-904.e9.
38. Ren, X., et al., *COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas.* Cell, 2021. **184**(7): p. 1895-1913.e19.
39. Radzikowska, U., et al., *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, 2020. **75**(11): p. 2829-2845.
40. Wang, K., et al., *CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells.* Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 283.
41. Wang, S., et al., *AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells.* Cell Res, 2021. **31**(2): p. 126-140.
42. Shen, X.R., et al., *ACE2-independent infection of T lymphocytes by SARS-CoV-2.* Signal Transduct Target Ther, 2022. **7**(1): p. 83.
43. Ibrahim, I.M., et al., *COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction.* J Infect, 2020. **80**(5): p. 554-562.
44. Elfiky, A.A. and I.M. Ibrahim, *Host-cell recognition through Cs-GRP78 is enhanced in the new Omicron variant of SARS-CoV-2, in silico structural point of view.* J Infect, 2022. **84**(5): p. 722-746.
45. Pfaffenbach, K.T. and A.S. Lee, *The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress.* Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(2): p. 150-6.

46. Bertolotti, A., et al., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 326-32.
47. Vig, S., et al., *Cytokine-induced translocation of GRP78 to the plasma membrane triggers a pro-apoptotic feedback loop in pancreatic beta cells.* Cell Death Dis, 2019. **10**(4): p. 309.
48. Misra, U.K. and S.V. Pizzo, *Heterotrimeric Galphaq11 co-immunoprecipitates with surface-anchored GRP78 from plasma membranes of alpha2M*-stimulated macrophages.* J Cell Biochem, 2008. **104**(1): p. 96-104.
49. Zefferino, R., S. Di Gioia, and M. Conese, *Molecular links between endocrine, nervous and immune system during chronic stress.* Brain Behav, 2021. **11**(2): p. e01960.
50. Derendorf, H., et al., *Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma.* Eur Respir J, 2006. **28**(5): p. 1042-50.
51. Fisher, M., *Hydrocortisone versus prednisolone in rheumatoid arthritis.* Lancet, 1956. **271**(6932): p. 18-9.
52. Ying, P., et al., *Effect of hydrocortisone on the 28-day mortality of patients with septic acute kidney injury.* Ren Fail, 2019. **41**(1): p. 794-799.
53. De Bosscher, K., et al., *Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 3919-24.
54. Ayroldi, E., et al., *Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways.* Faseb j, 2012. **26**(12): p. 4805-20.
55. Cronstein, B.N., et al., *A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 9991-5.
56. Cruz-Topete, D. and J.A. Cidlowski, *One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids.* Neuroimmunomodulation, 2015. **22**(1-2): p. 20-32.
57. Piemonti, L., et al., *Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation.* J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6473-81.
58. Franchimont, D., et al., *Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes.* J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1768-74.
59. Lim, H.Y., et al., *Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration.* Immunology, 2007. **122**(1): p. 47-53.
60. Hermoso, M.A., et al., *Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(11): p. 4743-56.
61. Rooney, B.V., et al., *Herpes Virus Reactivation in Astronauts During Spaceflight and Its Application on Earth.* Front Microbiol, 2019. **10**: p. 16.
62. Sonnenfeld, G., *Editorial: Space flight modifies T cellactivation—role of microgravity.* J Leukoc Biol, 2012. **92**(6): p. 1125-6.
63. Luo, H., et al., *Microgravity inhibits resting T cell immunity in an exposure time-dependent manner.* Int J Med Sci, 2014. **11**(1): p. 87-96.
64. Buchheim, J.I., et al., *Stress Related Shift Toward Inflammaging in Cosmonauts After Long-Duration Space Flight.* Front Physiol, 2019. **10**: p. 85.
65. Chang, T.T., et al., *The Rel/NF-κB pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity.* J Leukoc Biol, 2012. **92**(6): p. 1133-45.
66. Crucian, B., et al., *A case of persistent skin rash and rhinitis with immune system dysregulation onboard the International Space Station.* J Allergy Clin Immunol Pract, 2016. **4**(4): p. 759-762.e8.
67. Elenkov, I.J., *Systemic stress-induced Th2 shift and its clinical implications.* Int Rev Neurobiol, 2002. **52**: p. 163-86.

68. Mermel, L.A., *Infection prevention and control during prolonged human space travel.* Clin Infect Dis, 2013. **56**(1): p. 123-30.
69. Crucian, B., et al., *Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight.* Int J Gen Med, 2016. **9**: p. 383-391.
70. Van Walleghem, M., et al., *Gravity-Related Immunological Changes in Human Whole Blood Cultured Under Simulated Microgravity Using an In Vitro Cytokine Release Assay.* J Interferon Cytokine Res, 2017. **37**(12): p. 531-540.
71. Franceschi, C., et al., *Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **908**: p. 244-54.
72. Minciullo, P.L., et al., *Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2016. **64**(2): p. 111-26.
73. Sanada, F., et al., *Source of Chronic Inflammation in Aging.* Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 12.
74. Delano, M.J. and P.A. Ward, *The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome.* Immunol Rev, 2016. **274**(1): p. 330-353.
75. Feuerecker, M., et al., *Early immune anergy towards recall antigens and mitogens in patients at onset of septic shock.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 1754.
76. Assinger, A., et al., *Platelets in Sepsis: An Update on Experimental Models and Clinical Data.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 1687.
77. Hamers, L., M. Kox, and P. Pickkers, *Sepsis-induced immunoparalysis: mechanisms, markers, and treatment options.* Minerva Anestesiol, 2015. **81**(4): p. 426-39.
78. Feuerecker, M., et al., *A corticoid-sensitive cytokine release assay for monitoring stress-mediated immune modulation.* Clin Exp Immunol, 2013. **172**(2): p. 290-9.
79. Moser, D., et al., *SARS-CoV-2 pneumonia and bacterial pneumonia patients differ in a second hit immune response model.* Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 15485.
80. Langford, B.J., et al., *Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis.* Clin Microbiol Infect, 2020. **26**(12): p. 1622-1629.
81. Garcia-Vidal, C., et al., *Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study.* Clin Microbiol Infect, 2021. **27**(1): p. 83-88.
82. van Vught, L.A., et al., *Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis.* Jama, 2016. **315**(14): p. 1469-79.
83. Arastehfar, A., et al., *COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA)-From Immunology to Treatment.* J Fungi (Basel), 2020. **6**(2).
84. Mastrangelo, A., et al., *Candidemia in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients: Incidence and Characteristics in a Prospective Cohort Compared With Historical Non-COVID-19 Controls.* Clin Infect Dis, 2021. **73**(9): p. e2838-e2839.
85. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.* Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
86. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression.* Nature, 2006. **443**(7109): p. 350-4.
87. Diao, B., et al., *Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).* Front Immunol, 2020. **11**: p. 827.
88. Moser, D., et al., *COVID-19 Impairs Immune Response to Candida albicans.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 640644.
89. Gonzalez, S.M., N.A. Taborda, and M.T. Rugeles, *Role of Different Subpopulations of CD8(+) T Cells during HIV Exposure and Infection.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 936.
90. Huang, Z., et al., *CD226: An Emerging Role in Immunologic Diseases.* Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 564.
91. Schlaphoff, V., et al., *Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8+ T cells.* PLoS Pathog, 2011. **7**(5): p. e1002045.

92. Zheng, M., et al., *TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines.* Nat Immunol, 2021. **22**(7): p. 829-838.
93. Haschka, D., et al., *Alterations of blood monocyte subset distribution and surface phenotype are linked to infection severity in COVID-19 inpatients.* Eur J Immunol, 2022. **52**(8): p. 1285-1296.
94. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227-42.
95. Arastehfar, A., et al., *COVID-19-Associated Candidiasis (CAC): An Underestimated Complication in the Absence of Immunological Predispositions?* J Fungi (Basel), 2020. **6**(4).
96. Han, B., et al., *ACE2-independent SARS-CoV-2 virus entry through cell surface GRP78 on monocytes - evidence from a translational clinical and experimental approach.* EBioMedicine, 2023. **98**: p. 104869.
97. Liao, M., et al., *Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19.* Nat Med, 2020. **26**(6): p. 842-844.
98. Grant, R.A., et al., *Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia.* Nature, 2021. **590**(7847): p. 635-641.
99. Stephenson, E., et al., *Single-cell multi-omics analysis of the immune response in COVID-19.* Nat Med, 2021. **27**(5): p. 904-916.
100. Shang, J., et al., *Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2.* Nature, 2020. **581**(7807): p. 221-224.
101. Han, B., A. Choukér, and D. Moser, *Differential effects of acute and chronic hydrocortisone treatment on pyroptosis* Heliyon, 2024, **10** (10):e31156. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e31156.
102. Moser, D., et al., *Cells´ Flow and Immune Cell Priming under alternating g-forces in Parabolic Flight.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 11276.
103. Winkler, M.S., et al., *Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNFα response: A diagnostic tool for immunosuppression?* PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0182427.
104. Schimunek, L., et al., *Early decreased TLR2 expression on monocytes is associated with their reduced phagocytic activity and impaired maturation in a porcine polytrauma model.* PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0187404.
105. Moser, D., et al., *Differential effects of hypergravity on immune dysfunctions induced by simulated microgravity.* Faseb j, 2023. **37**(5): p. e22910.
106. Nomura, J., et al., *Increased and decreased expression of CD69 and CD23, respectively, in gravity-stressed lymphocytes.* Aviat Space Environ Med, 2001. **72**(8): p. 727-32.
107. Choukèr, A., et al., *In vivo hypoxic preconditioning protects from warm liver ischemia-reperfusion injury through the adenosine A2B receptor.* Transplantation, 2012. **94**(9): p. 894-902.
108. Ikawa, T., et al., *Hypergravity suppresses bone resorption in ovariectomized rats.* Advances in Space Research, 2011. **47**: p. 1214-1224.
109. Tominari, T., et al., *Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 6614.
110. Isasi, E., M.E. Isasi, and J. van Loon, *The application of artificial gravity in medicine and space.* Front Physiol, 2022. **13**: p. 952723.

7. Themenrelevante Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift

Moser D, Feuerecker M, Biere K, Han B, Hoerl M, Schelling G, Kaufmann I, Choukér A, Woehrle T.
SARS-CoV-2 pneumonia and bacterial pneumonia patients differ in a second hit immune response model.
Sci Rep. 2022 Sep 15;12(1):15485.

Moser D, Biere K, Han B, Hoerl M, Schelling G, Choukér A, Woehrle T.
COVID-19 impairs immune response to Candida albicans.
Front Immunol. 2021 Feb 26:12:640644.

Han B*, Lü Y*, **Moser D***, Zhou X, Woehrle T, Han L, Osterman A, Rudelius M, Choukér A, Lei P.
ACE2-independent SARS-CoV-2 virus entry through cell surface GRP78 on monocytes - evidence from a translational clinical and experimental approach.
EBioMedicine. 2023 Dec:98:104869.
(*geteilte Autorenschaft)

Han B, Choukér A, **Moser D**.
Differential effects of acute and chronic hydrocortisone treatment on pyroptosis.
Heliyon. 2024 May 11;10(10):e31156.

Moser D*, Sun SJ*, Li N, Biere K, Hoerl M, Matzel S, Feuerecker M, Buchheim J-I, Strewe C, Thiel CS, Gao YX, Wang CZ, Ullrich O, Long M, Choukér A.
Cells´ Flow and Immune Cell Priming under alternating g-forces in Parabolic Flight.
Sci Rep. 2019 Aug 2;9(1):11276.
(*geteilte Autorenschaft)

Moser D, Biere K, Liemersdorf C, Tuschen M, Hemmersbach R, Choukér A.
Differential effects of hypergravity on immune dysfunctions induced by simulated microgravity.
FASEB J. 2023 May;37(5):e22910.

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler, Direktor der Klinik für Anästhesiologie, für die Unterstützung meines wissenschaftlichen Werdegangs.

Ein ganz besonders großer Dank gilt meinem Mentor Prof. Dr. med. Alexander Choukér, Leiter des Labors für Translationale Forschung „Stress & Immunität“. Seine Expertise sowie seine außerordentliche Förderung und Unterstützung hat mich nicht nur wissenschaftlich und beruflich, sondern auch menschlich stark geprägt und vorangebracht.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern des Labors für Translationale Forschung „Stress & Immunität“, aber besonders bei Frau Katharina Biere und Frau Marion Hörl bedanken. Ohne ihre Unterstützung und unermüdlichen Einsatz hätten unsere Studien, die uns vieles abverlangt haben, nicht so erfolgreich umgesetzt werden können. Auch ihren Ideenreichtum, ihre Flexibilität und Zuverlässigkeit schätze ich sehr.

Privat möchte ich mich von ganzem Herzen bei den für mich wichtigsten Menschen bedanken: meiner Familie.

Vor allem danke ich meinem Ehemann Manuel Moser, dass er mich immer motiviert und dabei unterstützt hat mich zu verwirklichen und weiterzuentwickeln. Auch meinen Kindern Melina, Amelie und Manuel danke ich für Ihre Geduld und ihre Unterstützung.