

Schnelle quantitative Beurteilung der Interaktion von humanen Leukozyten mit
Aspergillus fumigatus mittels Durchflusszytometrie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Christopher Michael Rauh
geboren am 04.08.1993 in Friedrichroda

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Marie von Lilienfeld-Toal, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. James Beck, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. med. Dieter Buchheidt, Universitätsmedizin Mannheim

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.02.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	6
2. Zusammenfassung.....	9
3. Einleitung	10
3.1. Durch <i>Aspergillus fumigatus</i> hervorgerufene Krankheitsbilder	10
3.2. Die angeborene Immunantwort gegen <i>Aspergillus fumigatus</i>	11
3.2.1. Mechanische und chemische Barrieren	11
3.2.2. Phagozytose als essentieller Mechanismus der angeborenen Immunabwehr	12
3.2.3. Neutrophile Granulozyten	13
3.2.4. Monozyten	16
3.2.5. Mechanismen zur Abtötung der Konidien nach Phagozytose	17
3.3. Immunevasionsstrategien von <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
3.4. Gängige Methodik zur Messung der Phagozytose durch Leukozyten	18
4. Ziele der Arbeit.....	21
5. Methodik	22
5.1. Material.....	22
5.1.1. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	22
5.1.2. Kits.....	23
5.1.3. Chemikalien	23
5.1.4. Puffer und Lösungen.....	24
5.1.5. Antikörper.....	25
5.1.6. Geräte	25
5.1.7. Software.....	26
5.1.8. Humane Leukozyten	26
5.1.9. <i>Aspergillus fumigatus</i>	26
5.2. Methoden	26
5.2.1. Ernte von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien	26

5.2.2.	Präparation der Konidien für die Koinkubationsexperimente	27
5.2.3.	Präparation von humanen Leukozyten aus Buffy Coats	29
5.2.4.	Koinkubation von humanen Leukozyten und <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien	30
5.2.5.	Antikörperfärbung und durchflusszytometrische Analyse von koinkubierten Leukozyten	32
5.2.6.	Definition der Leukozytenpopulationen in der Durchflusszytometrie („Gating“).....	33
5.2.7.	Identifikation der Phagozytoseaktivität der Leukozytenpopulationen in der Durchflusszytometrie.....	34
5.2.8.	Koinkubationsexperimente mit fixierten <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien.....	38
5.2.9.	Bestimmung der Interleukin-1 β -Konzentration im Überstand der Koinkubation	38
5.2.10.	Statistische Auswertung.....	39
6.	Ergebnisse	40
6.1.	Schwellen von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien	40
6.2.	Koinkubation von Konidien und humanen Leukozyten.....	42
6.2.1.	Phagozytose von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien durch neutrophile Granulozyten.....	42
6.2.2.	Änderung der Antigenexpression der neutrophilen Granulozyten durch die Phagozytose von zuvor 5 h geschwollenen <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien nach einer Koinkubationszeit von 2 h (Zeitpunkt der maximalen Internalisierungsraterate)	44
6.2.3.	Phagozytose von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien durch Monozyten	49
6.2.4.	Änderung der Antigenexpression der Monozyten durch die Phagozytose von zuvor 2,5 h geschwollenen <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien nach einer Koinkubationszeit von 4 h (Zeitpunkt der maximalen Internalisierungsraterate)	53
6.3.	Einfluss einer Fixation der Konidien auf die Phagozytoserate	60
6.4.	Einfluss von Fluoreszeinisothiocyanat auf die Antigenexpression von Leukozyten.....	63

6.5. Interleukin-1 β -Ausschüttung durch Leukozyten bei Inkubation mit <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien	64
7. Diskussion.....	66
7.1. Phagozytose-Assay.....	66
7.2. Spektrale Überlappung von FITC und PE	72
7.3. Diskussion ausgewählter immunologischer Beobachtungen.....	73
7.3.1. Veränderung der Expression von CD11b und CD62L auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten.....	73
7.3.2. Bedeutung von Dectin-1 für die angeborene Immunantwort des Menschen auf <i>Aspergillus fumigatus</i>	74
7.3.3. Höhere CD15-Expression auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten in Interaktion mit <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien	76
7.3.4. Ausschüttung von Interleukin-1 β	76
8. Schlussfolgerungen.....	79
9. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	80
10. Anhang	90
10.1. Inhalt der Mastermixes zur Färbung für die durchflusszytometrische Vermessung	90
10.2. CD274 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt der max. Internalisierungsrate	91
10.3. Dectin-1 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt der max. Internalisierungsrate	92
10.4. HLA-DR auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt der max. Internalisierungsrate	93
10.5. Tabellenverzeichnis.....	94
10.6. Abbildungsverzeichnis.....	94
10.7. Danksagung	96
10.8. Ehrenwörtliche Erklärung	97

1. Abkürzungsverzeichnis

5(6)-FAM-SE	5(6)-Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester
A.	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK	Antikörper
AMCase	Acidic Mammalian Chitinase
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin mit Cyanin-7-Tandemkonjugat
ATCC	American Type Culture Collection
BUV395	Brilliant Ultraviolet 395 nm
BV421	Brilliant Violet 421 nm
BV605	Brilliant Violet 605 nm
BV711	Brilliant Violet 711 nm
C.	<i>Candida</i>
CCR2	C-C-Chemokin-Rezeptor 2
CD	Cluster of Differentiation
CFW	Calcofluor White
CH	Schweiz
Cr.	<i>Cryptococcus</i>
CXC	Untergruppe der Chemokine, bei welchen die beiden N-terminalen Cystein-Reste durch eine Aminosäure (X) getrennt sind
D	Deutschland
DC	Dendritische Zelle
DC-SIGN	Dendritic Cell-specific Intracellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-Integrin
dest.	destillata
DHN	Dihydroxynaphthalen
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	Early Endosome Antigen 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ESL-1	E-Selektin-Ligand 1
FCS	Fetales Kälberserum
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
hBD	humanes beta-Defensin
HLA-ABC	Human Leukocyte Antigen A, B und C
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – Antigen D-related
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
I	Italien
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
JMRC	Jena Microbial Resource Collection
<i>K.</i>	<i>Klebsiella</i>
k.	kein(e)
k. A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
LAMP-1	Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1
Mac-1	Macrophage antigen 1
max.	maximal
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
mo-DC	Monocyte-derived Dendritic Cell
MOI	Multiplicity of Infection
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NET	Neutrophil Extracellular Traps
p47phox	Bestandteil des zytosolischen Komplexes der phagozytischen NADPH-Oxidase
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-E	Phosphate Buffered Saline + Ethylendiamintetraessigsäure

PBS-T	Phosphate Buffered Saline + Tween-20
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin mit Cyanin-7-Tandemkonjugat
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex mit Cyanin 5.5-Konjugat
PI	Propidiumiodid
pksP	Polyketidsynthase-Gen P
PP	Polypropylen
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
PTX3	Pentraxin-3
Rab	Ras-related in Brain
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
ROK	Südkorea
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>Sacch.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Staph.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SSC	Side Scatter
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UK	United Kingdom
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V500	Violet 500 nm
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

2. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit dient der Etablierung und Validierung eines Phagozytoseassays zur Untersuchung der Interaktion humaner Leukozyten mit Konidien des ubiquitären Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*.

Das Spektrum der durch diesen opportunistischen Erreger ausgelösten Krankheitsbilder reicht von allergischen bis hin zu invasiven Aspergillosen. Für immunsupprimierte Patienten verläuft eine Infektion häufig letal. Ein wichtiger Abwehrmechanismus ist die Phagozytose und intrazelluläre Abtötung der Konidien. In früheren Arbeiten wurde die Phagozytose hauptsächlich durch zwei verschiedene Methoden untersucht: Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode bedient sich ebenfalls der Durchflusszytometrie. Konidien von *A. fumigatus* wurden mit FITC gefärbt und mit humanen Leukozyten inkubiert. Anschließend wurde mit Anti-FITC-APC gegengefärbt und weitere fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper eingesetzt, um die Antigenexpression der Phagozyten zu untersuchen. Auf diese Weise können internalisierte Konidien (FITC⁺APC⁻) leicht von an der Oberfläche haftenden Konidien (FITC⁺APC⁺) unterschieden werden. Bisherige Arbeiten trafen diese Unterscheidung durch Quenching oder Zugabe von Ethidiumbromid, wodurch es zu großen Überlagerungen mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen kommt. Die Gegenfärbung mit Anti-FITC-APC führt zu wesentlich geringeren Überlagerungen. Somit steht ein breites Spektrum für die Untersuchung der Expression phagozytärer Oberflächenantigene zur Verfügung. Die Methode stellt eine schnelle Möglichkeit dar, eine große Anzahl von Zellen hinsichtlich ihres Phagozytosestatus und ihrer Antigenpräsentation zu vermessen. Innerhalb eines Experiments können verschiedene Schwell- und Koinkubationszeiten analysiert werden.

Es wurde bestätigt, dass vor der Koinkubation zum Schwellen gebrachte Konidien leichter von neutrophilen Granulozyten und Monozyten phagozytiert werden. Es zeigten sich typische Muster der Aktivierung mit einer Steigerung der Expression von CD11b und einer Reduktion von CD62L auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten und einer vermehrten Expression von CD15 auf Monozyten. Nach langen Koinkubationszeiten mit geschwollenen Konidien konnte die Ausschüttung von IL-1 β mittels ELISA detektiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind Gegenstand zweier aktueller Publikationen.

3. Einleitung

3.1. Durch *Aspergillus fumigatus* hervorgerufene Krankheitsbilder

Der saprophytische Schimmelpilz *A. fumigatus* ist ubiquitär in der Luft vorkommender Krankheitserreger. Er ist sehr widerstandsfähig und toleriert Temperaturen von 12-65 °C sowie pH-Werte zwischen 2,2 und 8,8 (Kwon-Chung und Sugui 2013).

Das Spektrum an Krankheiten, welche durch *A. fumigatus* ausgelöst werden können, variiert von der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose über die Bildung von Aspergillomen bis zur häufig letalen invasiven Aspergillose bei immungeschwächten Patienten.

Die allergische bronchopulmonale Aspergillose kann als Komplikation von Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale oder Mukoviszidose beobachtet werden. Zugrundeliegend ist eine allergische Reaktion vom Typ I und III, welche bei Exposition von *Aspergillus*-Sporen, sogenannten Konidien, auftreten kann (Hahn 2009). Sie ist gekennzeichnet durch Fieber, Eosinophilie im Blutbild, röntgenologische Infiltrate und bräunlichen, *Aspergillus*-haltigen Auswurf. Die Therapie erfolgt mit Kortikosteroiden und ggf. Antimykotika (Greenberger 1984).

Bei Aspergillomen handelt es sich um Hyphengeflechte innerhalb präformierter Höhlen, beispielsweise den Nasennebenhöhlen, posttuberkulotischen Kavernen, Bullae oder bronchiektatischen Lungenabschnitten (Hahn 2009, Patterson und Streck 2010). Die Therapie eines einzelnen Aspergillomherdes besteht bestenfalls in der chirurgischen Exzision, alternativ kann eine antimykotische Therapie verabreicht werden (Denning et al. 2016).

Immunsupprimierte Patienten sind besonders gefährdet für eine invasive Aspergillose, die vermutlich gefährlichste Form der Aspergillose, welche häufig einen letalen Ausgang nimmt. Der wichtigste Risikofaktor hierbei ist die Neutropenie, wie sie beispielsweise nach Chemotherapie, im Zuge einer Blutstammzelltransplantation oder bei immunsupprimierenden Erkrankungen wie dem Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) vorkommen kann. Mögliche Symptome sind Husten, Dyspnoe, Hämoptoe und Schmerzen im Brustkorb (Denning et al. 1991, Post et al. 2007). Die Dissemination erfolgt per Angioinvasion von der Lunge in die Blutstrombahn, hierbei kommt es am häufigsten zu zentralnervösen Absiedlungen des Erregers (Dagenais und Keller 2009, Hahn 2009). Die Behandlung der Erkrankung erfolgt medikamentös

mit einem Azol-Antimykotikum oder Amphotericin B, in Einzelfällen kann Caspofungin zum Einsatz kommen. Bei Immunsupprimierten ist weiterhin eine ständige Prophylaxe vor Infektionen mit *A. fumigatus* zu erwägen. Diese kann beispielsweise mit Itraconazol oder Posaconazol erfolgen (Denning et al. 1991, Hahn 2009).

3.2. Die angeborene Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus*

3.2.1. Mechanische und chemische Barrieren

Die Infektion mit *A. fumigatus* erfolgt über die Inhalation von Konidien. Diese lösen sich aus den Konidiophoren des Pilzmyzels und erreichen ihr Ziel über die Luft. Auf Krankenhausstationen wurden durchschnittliche Konzentrationen von 1 – 5 Konidien/m³ Luft gemessen (Solomon et al. 1978). Im landwirtschaftlichen Bereich wurden sogar Spitzenkonzentrationen von bis zu 77 – 111 * 10³ Konidien/m³ Luft erreicht (Taha et al. 2005). Ein Mensch inhaliert folglich täglich mehrere hundert bis tausend Konidien dieses Schimmelpilzes. Diese gelangen bei einer Größe von 2,5 – 3 µm (Brakhage und Langfelder 2002) bis in die unteren Atemwege und lagern sich dort an die schleimbehafteten Wände an. Ohne eine effektive Abwehr würden die Konidien den Vorgang des Schwellens beginnen, d. h. sie nähmen an Größe und Antigenexpression zu, bevor sie auskeimten (Krappmann 2016).

Viele der Konidien werden über den Zilienschlag der Epithelzellen im Rahmen der mukoziliären Clearance der Atemwege wieder abtransportiert. Dieser Vorgang wird zusätzlich von Reflexen wie dem Husten und Niesen verstärkt (Krappmann 2016).

Neben dieser ersten mechanischen Barriere existiert auch eine chemische Abwehr gegen die Konidien. Die humanen beta-Defensine hBD2 und hBD9 werden von Zellen des respiratorischen Epithels produziert. Geschwollene Konidien verstärken die Expression der Defensine hierbei stärker als ungeschwollene (ruhende) Konidien (Alekseeva et al. 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der von den Epithelzellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sezernierte Proteaseinhibitor Trappin-2 eine konzentrationsabhängige fungizide Aktivität aufweist. Dieser Effekt zeigte sich nur gegenüber geschwollenen Konidien. Weiterhin wird vermutet, dass Trappin-2 auch Proteasen von *A. fumigatus* inhibiert (Baranger et al. 2008). Da angenommen wird, dass die proteolytische Aktivität des Pilzes zur Ausbildung einer invasiven Aspergillose führt (Latge 2001), könnte die proteaseinhibitorische Aktivität von Trappin-2 die Virulenz von *A. fumigatus*

reduzieren. Die Epithelzellen des Atmungstraktes und Makrophagen produzieren außerdem die Chitinase AMCase, welche über die Spaltung des in der Zellwand von *A. fumigatus* vorkommenden Chitins einen antifungalen Effekt zeigt (Chen et al. 2009). Die bisher durchgeführten Untersuchungen legen allerdings nur den Verdacht nahe, dass die Chitinase auch einen Effekt bei der Bekämpfung von *A. fumigatus* in den Atemwegen hat, da die meisten Experimente sich auf die Dermatopathogenität des Pilzes konzentrierten.

Gelangen die Konidien bis in die Alveolen, stellen die Pneumozyten und die lungenständigen Makrophagen (siehe Kap. 3.2.2.) eine Barriere zum Übertritt in die Gefäßbahn dar. Die Pneumozyten Typ II produzieren die Surfactantproteine A und D. Diese Proteine aus der Gruppe der Kollektine binden Konidien. Es zeigte sich, dass Konidien durch die Bindung an die Surfactantproteine *in vitro* verstärkt durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen mittels Phagozytose und Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) bekämpft werden (Madan et al. 1997). Dieser Effekt konnte *in vivo* bestätigt werden: Durch die intranasale Gabe von Surfactantprotein A und D konnte die Mortalität von *A. fumigatus*-Konidien ausgesetzten Mäusen stark reduziert werden (Madan et al. 2001).

3.2.2. Phagozytose als essentieller Mechanismus der angeborenen Immunabwehr

Im Zuge der angeborenen Immunantwort gegen Konidien des Schimmelpilzes *A. fumigatus* verwenden mehrere Zellen den Mechanismus der Phagozytose. Diesem kommt damit eine große Bedeutung in der Abwehr dieses Krankheitserregers zu.

Die in der Lunge befindlichen Makrophagen erkennen die in den Alveolen befindlichen Konidien u.a. über den β -Glucan-Rezeptor Dectin-1 (Brown et al. 2002) und phagozytieren innerhalb von 2 h bis zu 85 % der Konidien. Innerhalb der Makrophagen beginnen die Konidien zu schwellen, jedoch mit einer geringeren Größenzunahme gegenüber Konidien in Nährmedium. Es zeigte sich, dass geschwollene Konidien wesentlich besser durch Alveolarmakrophagen abgetötet werden können als ruhende Konidien (47 % vs. 22 %) (Philippe et al. 2003).

Zur Abtötung der phagozytierten Konidien produzieren Alveolarmakrophagen ROI. Dies konnte anhand von $p47phox^{-/-}$ Mäusen bewiesen werden, welche eine starke Reduktion der Abtötung von phagozytierten Konidien *in vitro* und *in vivo* zeigten (Philippe et al. 2003).

Das Hauptaugenmerk dieser Dissertation liegt auf der Phagozytose der Konidien durch neutrophile Granulozyten und Monozyten, weswegen die Abwehrvorgänge dieser Zellen in den nächsten drei Unterpunkten beschrieben werden.

3.2.3. Neutrophile Granulozyten

Wie bereits in Kap. 3.1. erwähnt, spielen neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen *A. fumigatus*.

Nach dem Kontakt des respiratorischen Epithels mit den Konidien von *A. fumigatus* schütten die Epithelzellen verschiedene Zytokine aus, darunter TNF α und Interleukin-1 β (IL-1 β) (Balloy und Chignard 2009). Die Chemokine aus der CXC-Subgruppe spielen bei der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle. Unter Stimulation mit IL-1 β zeigte sich eine verstärkte Expression und Freisetzung von Chemokinen, darunter auch der CXC-Subgruppe, durch das respiratorische Epithel (Brabcova et al. 2014). Unter dem Einfluss von Zytokinen bilden die Endothelzellen außerdem E- und P-Selektin und Integrine, welche sie auf ihrer Oberfläche exprimieren (Hamada et al. 2014).

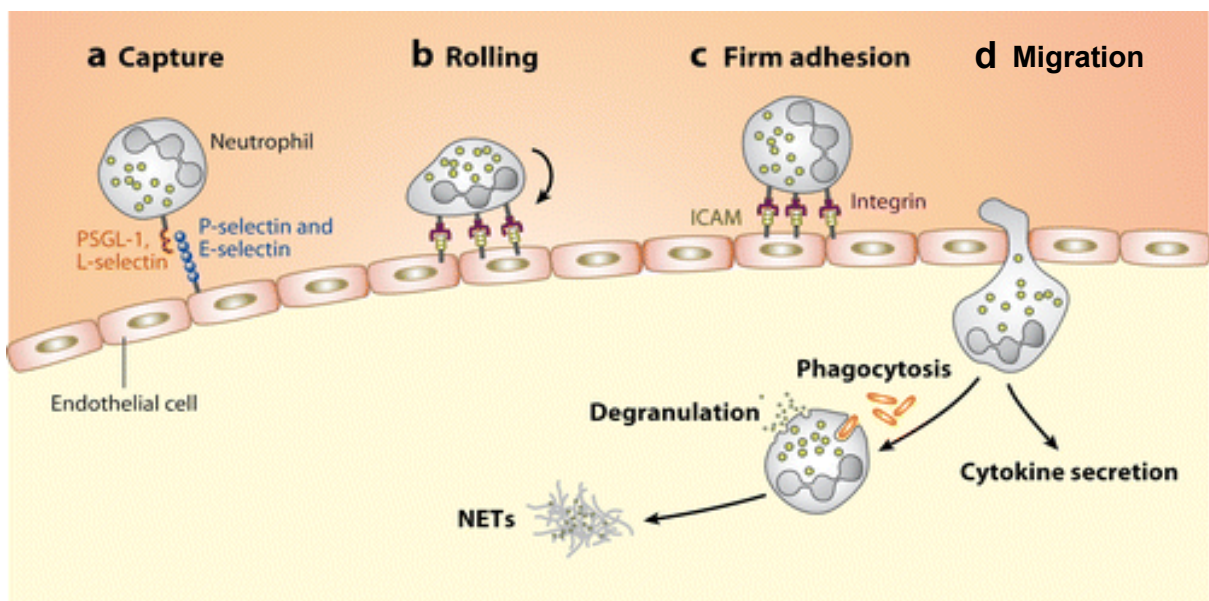
Dem Lockstoffgradienten folgend, läuft die Migration der neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäß zum Ort der Infektion in drei Schritten ab:

1. Selektine auf der Oberfläche der Endothelzellen binden Antigene auf der Granulozytenoberfläche. P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) bindet an P-Selektin, CD62L an Kohlenhydratliganden an der Endothelzelloberfläche (Bruehl et al. 1997). Es kommt zu einer Adhäsion der Granulozyten an die Gefäßwand (a auf Abb. 3.1.). Durch die Bindung von E-Selektin-Ligand 1 (ESL-1) an E-Selektin rollt der Granulozyt langsam an der Gefäßwand entlang (b auf Abb. 3.1.) (Hidalgo et al. 2007).
2. Über die Bindung von β_2 -Integrinen an interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) kommt es zur Festigung der Bindung an das Endothel mit einhergehender Formänderung (c auf Abb. 3.1.) (Bunting et al. 2002).
3. Zum letzten Schritt, der Migration durch das Endothel, stehen dem neutrophilen Granulozyten zwei mögliche Wege zur Verfügung – der transzelluläre und der parazelluläre Weg (d auf Abb. 3.1.). Ausschlaggebend sind auch in diesem Schritt die granulozytären β_2 -Integrine und die endothelialen ICAM (Borregaard 2010). An den Adhäsionsstellen bilden sich ICAM-1-reiche „cups“ (Carman und Springer 2004). Der adhärente Granulozyt beginnt, sich an der Endotheloberfläche entlang zu bewegen,

bis ein geeigneter Passageweg gefunden wird. Hierbei spielt das Antigen Macrophage antigen 1 (Mac-1), das zu den β_2 -Integrinen gehört und aus einem Komplex aus CD11b und CD18 besteht, die Schlüsselrolle. Neutrophile Granulozyten von Mac-1^{-/-} Mäusen bewegen sich wesentlich weniger und langsamer am Endothel entlang und passieren dieses dann an einer näher zur primären Adhärenz gelegenen Stelle (Phillipson et al. 2006).

Ein Antigengradient innerhalb der Zell-Zell-Verbindung sorgt dafür, dass die neutrophilen Granulozyten das Endothel parazellulär passieren (Woodfin et al. 2009). Zur transzellulären Migration bildet der neutrophile Granulozyt Podosomen aus, welche die Fusion von endothelialen Vesikeln mit der Zellmembran triggern. Unter Bildung einer Pore dringt das granulozytäre Podosom in die Endothelzelle ein und schafft eine Art Kanal für die transzelluläre Passage (Carman et al. 2007).

Der neutrophile Granulozyt erkennt spezifische Oberflächenstrukturen von Pathogenen, sogenannte Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMP) mit Hilfe




 Amulic B, et al. 2012.
Annu. Rev. Immunol. 30:459–89

Abb. 3.1.: Neutrophile Granulozyten – Migration und Pathogenbekämpfung.

Abb. modifiziert. (Amulic et al. 2012)

von ebenso spezifischen Pattern Recognition Receptors (PRR). Eine wichtige Rolle kommt hierbei bei Mäusen dem β -Glucanrezeptor Dectin-1 zu. Geschwollene und

auskeimende *A. fumigatus*-Konidien weisen einen hohen Anteil an β -1,3-Glucan an ihrer Oberfläche auf (Steele et al. 2005). Die neutrophilen Granulozyten von Dectin-1^{-/-} Mäusen nehmen wesentlich weniger Konidien auf (Jhingran et al. 2012).

Jedoch zeigten Ferwerda et al., dass Patienten mit Dectin-1-Mutationen keine veränderte Phagozytose und Abtötung von Pilzen durch neutrophile Granulozyten aufweisen. Patienten mit Dectin-1-Mutationen haben jedoch eine verringerte Cytokinproduktion durch Monozyten und Makrophagen, wodurch sie für mukokutane Pilzinfektionen anfälliger sind. Dies impliziert, dass die Bedeutung von Dectin-1 bei Mäusen und Menschen unterschiedlich groß ist (Ferwerda et al. 2009). Auch hier scheint das Integrin Mac-1 eine tragende Rolle zu spielen, da bei der Blockierung von Mac-1 (auch CR3 genannt) die Phagozytose des Hefepilzes *Sacch. cerevesiae* und von Zymosan, einer β -Glucan-Präparation, komplett inhibiert wird (van Bruggen et al. 2009). Der lösliche PRR Pentraxin-3 (PTX3) stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen der Opsonierung der Konidien und der Erkennung durch den Komplementrezeptor dar. PTX3 selbst opsoniert die Konidien, aktiviert das Komplementsystem über den alternativen Weg, wird über den Fc γ -Rezeptor erkannt und führt zur Aktivierung von CD11b, welches zur Phagozytose der Konidien führt (Moalli et al. 2010). Ebenso steigert die Opsonisierung durch L-Ficolin die Phagozytose von Konidien durch neutrophile Granulozyten und Monozyten (Bidula et al. 2015). Zuletzt besteht für den Granulozyten noch die Möglichkeit, die Konidien und das Myzel mit Hilfe verschiedener Toll-like Rezeptoren (hierbei v.a. TLR 2, 4 und 9) zu erkennen (Bellocchio et al. 2004). Ein weiterer Weg zur extrazellulären Bekämpfung der Konidien ist die Degranulation der Granulozyten. Hierbei wird u. a. Lactoferrin freigesetzt, welches Eisen bindet und dadurch das Aussprossen der Konidien verhindert (Zarembek et al. 2007).

Beim Respiratory Burst werden ROI aus den Granulozyten freigesetzt (Karlsson et al. 1995). Die Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) bildet H₂O₂, welches durch die per Degranulation freigesetzte Myeloperoxidase in toxische hypochlorige Säure (HOCl) umgesetzt wird. (Kettle et al. 1995)

Zuletzt ist noch die Bildung von Neutrophil extracellular traps (NET) als extrazellulärer Weg zur Bekämpfung von *A. fumigatus* zu nennen. Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führt hierbei zum programmierten Zelltod, bei welchem die Zellen zunächst abflachen, die Kernmembran anschließend ihre Fältelung verliert, der Kern sich unter Auflösung seiner Membran ausbreitet und schließlich über eine Ruptur der Plasmamembran Inhaltsstoffe der neutrophilen Granulozyten in den Extrazellulärraum

freigesetzt werden. Hierbei entsteht ein DNA-Geflecht (Fuchs et al. 2007). NET enthalten Histone und die Inhaltsstoffe der Granula der neutrophilen Granulozyten, welche an den in den NET gefangenen Pathogenen ihre Wirkung zeigen (Brinkmann et al. 2004). Mit Hilfe der Bildung von NET ist es den neutrophilen Granulozyten möglich Hyphen anzugreifen (Urban et al. 2006).

3.2.4. Monozyten

Auch Monozyten können u.a. durch Cytokine an den Ort der Infektion rekrutiert werden. Die Migration der Monozyten ist abhängig vom Chemokinrezeptor CCR2. CCR2^{-/-} Mäuse zeigten nach der pulmonalen Infektion mit *A. fumigatus* eine geringere pulmonale Dichte an Monozyten als Mäuse mit intaktem Rezeptor (Hohl et al. 2009). *A. fumigatus* wird über verschiedene Rezeptoren von Monozyten erkannt. Durch IL-1 β stimulierte Monozyten exprimieren PTX3, welches zur Erkennung des Pilzes beiträgt (s. Kap. 3.2.3.) (Alles et al. 1994). Durch Dectin-1 werden β -Glucane auf der Oberfläche geschwollener und auskeimender Konidien erkannt, was zur Phagozytose dieser Konidien durch von Monozyten abstammende Makrophagen beiträgt (Gersuk et al. 2006). Bei der Erkennung der Hyphen deuten Studien auf eine Kombination der Rezeptoren CD14 und TLR4 hin (Wang et al. 2001).

Der überwiegende Teil der CD14⁺ Monozyten ist CD16-negativ. Nur etwa 10 % exprimieren CD16. Beide Subgruppen sind in der Abwehr gegen *A. fumigatus* von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass die CD16⁻ Monozyten die Konidien phagozytieren und so deren Auskeimung verhindern können, während die CD16⁺ Monozyten große Mengen Tumornekrosefaktor α (TNF α) ausschütten (Serbina et al. 2009).

Hohl et al. zeigten im Mausmodell, dass viele der CD11b⁺ Monozyten, die Konidien in der Lunge phagozytiert haben, innerhalb kurzer Zeit stark CD11c und MHC Klasse II-Antigene exprimieren. Diese Zellen differenzieren vermutlich im Zuge der Phagozytose zu CD11b⁺ dendritischen Zellen (DC), welche die Konidien in die drainierenden mediastinalen Lymphknoten bringen. Dort kommt es zum Priming von CD4⁺ Lymphozyten, womit die Verbindung zum erworbenen Immunsystem hergestellt wird (Hohl et al. 2009).

Nach dem Kontakt zu Hyphen von *A. fumigatus* konnte eine Hochregulation der IL-1 β -mRNA und der TNF α -Expression in Monozyten nachgewiesen werden. Die

Ausschüttung von TNF α kann durch Antikörper (AK) gegen CD14 stark reduziert werden (Wang et al. 2001).

3.2.5. Mechanismen zur Abtötung der Konidien nach Phagozytose

Die Konidien befinden sich nach der Aufnahme in die Phagozyten im Phagosom. Dieses wird mikrotubulus- und aktinassoziiert von der Peripherie der Zelle zentripetal transportiert (Blocker et al. 1998, Jahraus et al. 2001).

Auf der phagozytären Oberfläche befinden sich die Proteine Ras-related in Brain 5 (Rab5) und Early Endosome Antigen 1 (EEA1). Diese sind assoziiert mit einem Sortiermechanismus, in welchem die phagozytierten Stoffe einem Recyclingschritt oder der Vernichtung zugänglich gemacht werden. Außerdem nimmt EEA1 eine Rolle beim Transport der Phagosomen ein (Mu et al. 1995). Phagosomen, die β -1,3-Glucane beinhalten (wie *A. fumigatus*-haltige Phagosomen), werden zudem durch eine Aktivierung der Spleen Tyrosine Kinase (Syk) durch Dectin-1 zur Reifung gebracht (Mansour et al. 2013). Durch Rab7 kommt es zur Fusion von Phagosom und hydrolasehaltigem Lysosom (Bucci et al. 2000, Segal et al. 1980). Dies geschieht vermutlich nach dem „Kiss and Run“-Prinzip: Es kommt zur kurzzeitigen Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom mit Übertragung von Teilchen und anschließender Trennung der Kompartimente (Storrie und Desjardins 1996). Untersuchungen durch Jahraus et al. legen die Beteiligung von Aktin und Myosin an diesem Prozess nahe (Jahraus et al. 2001).

Durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase werden ROI in das Phagosom gepumpt, welche der Abtötung der Konidien dienen (Segal 2005). Hierdurch sinkt schon innerhalb der ersten zwei Stunden der pH-Wert innerhalb des granulozytären Phagosoms auf bis zu 6,0 ab (Segal et al. 1981).

3.3. Immunevasionsstrategien von *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus verfügt über mehrere Möglichkeiten der Immunevasion.

Das auf der Oberfläche von *A. fumigatus*-Konidien befindliche Dihydroxynaphthalen-Melanin (DHN-Melanin) führt zu einer erhöhten Phagozytose von Konidien durch Epithelzellen des Atmungstraktes. Gleichzeitig jedoch inhibiert das DHN-Melanin die Ansäuerung im Phagosom und die Apoptose, sodass die Konidie intrazellulär

überleben kann. Die Apoptosehemmung wird selbst durch melanin ghosts, d. h. die extrahierte Melaninhülle ohne Konidie, verursacht, womit Melanin als Verursacher identifiziert werden konnte (Amin et al. 2014). Auch in aus Monozyten-abgeleiteten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten konnte gezeigt werden, dass die Ansäuerung in Phagolysosomen durch Melanin inhibiert wird. Eine Pilzmutante, welche ein defektes Polyketidsynthase-Gen P (pksP) aufweist (diese Synthase ist eines der Enzyme zur Bildung von DHN-Melanin), bildet unpigmentierte Konidien. Die unpigmentierten Konidien führen zu einer stärkeren Ansäuerung in den Phagolysosomen und einer verstärkten Abtötung des Keimes, verglichen mit Wildtyp-Konidien (WT-Konidien). Hierbei zeigte sich, dass ruhende Konidien die Ansäuerung stärker inhibieren (Jahn et al. 2002, Thywissen et al. 2011).

Ruhende Konidien verfügen über eine Hydrophobinhülle („rodlet-layer“), die die Antigene auf der Zelloberfläche maskiert. Dies stellt eine wichtige Immunevasionsstrategie des Pilzes dar, da hierdurch die Erkennung des Pathogens durch PRRs erheblich reduziert wird. Die Hülle beinhaltet das Protein RodA, welches immunologisch inert ist. Konidien ohne Hydrophobinhülle, beispielsweise Konidien von Δ RodA-Mutanten oder geschwollene, auskeimende Konidien, führen zu einer stärkeren Aktivierung der Immunabwehr (Aimanianda et al. 2009).

Des Weiteren produziert das Myzel von *A. fumigatus* Gliotoxin, das *in vitro* die Apoptose von Monozyten und DC über eine Aktivierung von Caspase-3 induziert und die Antigenpräsentation inhibiert. Dies führt zu einer reduzierten T-Zell-Aktivierung (Stanzani et al. 2005).

3.4. Gängige Methodik zur Messung der Phagozytose durch Leukozyten

Es gibt mehrere Herangehensweisen, die Phagozytose durch Leukozyten zu untersuchen. Häufig angewandt wird die Immunfluoreszenzmikroskopie. Hierzu werden Phagozyten mit einem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten AK gegen ein Oberflächenantigen markiert. Die zu phagozytierenden Pathogene, zum Beispiel Konidien, werden mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Häufig wird FITC verwendet. Nach der Koinkubation des Pathogens mit den Phagozyten können unter dem Mikroskop Zellen detektiert werden, welche Pathogene internalisiert haben. Eine Anregung der beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe führt zur Emission von zwei verschiedenen Fluoreszenzsignalen, die in der Mikroskopie betrachtet werden können.

Anhand einer Auszählung kann die Phagozytoserate bestimmt werden (da Silva Domingues et al. 2013, Ikeda-Dantsuji et al. 2015, Thywissen et al. 2011).

Als weiteres Verfahren steht die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Phagozytoserate zur Verfügung. Wieder wird das Pathogen durch einen Fluoreszenzfarbstoff, zum Beispiel FITC, markiert. Nach einer Koinkubation mit Phagozyten erfolgt die Markierung von phagozytären Antigenen mittels fluoreszenzfarbstoffgekoppelter AK. In der anschließenden durchflusszytometrischen Vermessung kann nun bestimmt werden, welcher Anteil der Phagozyten positiv für den, das Pathogen markierenden, Fluoreszenzfarbstoff ist, d. h. mindestens ein angefärbtes Pathogen phagozytiert oder an ihrer Oberfläche anhaften hat. Um unterscheiden zu können, ob das Pathogen phagozytiert wurde oder der Oberfläche der Zelle adhärent ist, kann mittels Quenching durch einen anderen Fluoreszenzfarbstoff das FITC-Signal an der Oberfläche anhaftender Pathogene ausgelöscht werden. Zum FITC-Quenching können unterschiedliche Substanzen verwendet werden. Häufig benutzt werden Trypanblau (Nuutila und Lilius 2005) und Gerbsäure (Giaimis et al. 1994). Voraussetzung ist, dass die Phagozyten vital sind (Giaimis et al. 1994). Durch die Inkubation mit Ethidiumbromid zeigt sich das sogenannte Resonanzenergietransferphänomen, durch welches die FITC-markierten Konidien, die nicht internalisiert wurden, rot fluoreszieren. Die internalisierten Konidien geben grünes Licht ab. Auch hierdurch ist eine Unterscheidung zwischen phagozytierten und adhärennten Konidien möglich (Fattorossi et al. 1989, Saresella et al. 1997). Andere Herangehensweisen zur Diskriminierung zwischen adhärennten und internalisierten Pathogenen finden sich nur bei Bakterien. Im Anschluss an die Koinkubation FITC-markierter *Escherichia coli* (*E. coli*) und Bacillus Calmette-Guérin mit Phagozyten konnten über die Markierung mit PE-gekoppelten AK die adhärennten Bakterien mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden, während die internalisierten Bakterien nicht vom zweiten AK erreicht wurden (de Boer et al. 1996). Über die Markierung von Bakterien mit Lucifer Yellow und das Markieren von adhärennten Bakterien über einen AK gegen Lucifer Yellow nach der Koinkubation mit Phagozyten konnte ebenfalls zwischen adhärennten und internalisierten Bakterien diskriminiert werden (Sveum et al. 1986).

Durchflusszytometrie-basierte Phagozytoseassays, welche über das Einbringen eines fluoreszenzfarbstoffgekoppelten AK gegen den konidienanfärbenden

Fluoreszenzfarbstoff (z. B. FITC) zwischen adhärennten und internalisierten Konidien nach Koinkubation mit Phagozyten unterscheiden können, existieren bisher nicht.

4. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit dient der Entwicklung und Etablierung eines Assays zur Untersuchung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien durch humane Leukozyten gesunder Spender und zur Analyse der konsekutiven Änderung der Oberflächenantigenexpression dieser Zellen. Als Quantifizierungsmethode soll die Durchflusszytometrie dienen. Hierbei sollen Vor- und Nachteile gegenüber der gängigen Methode der Immunfluoreszenzmikroskopie und anderen Phagozytoseassays herausgearbeitet werden.

Zur Etablierung des neuen Assays sind folgende Thesen zu erforschen:

1. Die Quantifizierung der Phagozytose ist durch Durchflusszytometrie schneller und in größerem Ausmaß durchführbar als durch andere Assays.
2. Die angewandte Färbemethode mit Anfärbung der Konidien mit FITC und Gegenfärbung mit anti-FITC-APC zur Diskriminierung des Phagozytosestatus einzelner Leukozyten birgt Vorteile gegenüber der Methode des Quenching des FITC-Signals, da ein größeres Frequenzspektrum zur Untersuchung der leukozytären Antigenexpression verfügbar ist.
3. Eventuelle beobachtete Änderungen in der Antigenpräsentation phagozytierender Leukozyten können verlässlich analysiert werden und sind nicht durch die angewendete Färbemethode hervorgerufen, sondern kongruent zu anderen Untersuchungen hinsichtlich leukozytärer Aktivierung und Initiierung der Immunantwort gegen ein Pathogen.

Die humanen Leukozyten sollen mit geschwollenen und unbehandelten (nativen) Konidien des Schimmelpilzes *A. fumigatus* über verschiedene Zeiten koinkubiert werden. Anschließend werden leukozytäre Antigene mittels fluoreszenzfarbstoffgekoppelten AK gefärbt. Durch die durchflusszytometrische Vermessung der Leukozyten wird der Status der Phagozytose der einzelnen Zelle bestimmt und ihre Antigenexpression quantifiziert.

Weiterhin sollen Experimente zur Auswirkung der Schwellzeit auf die Morphologie der Konidien mittels Mikroskopie, zur potentiellen Auswirkung des Farbstoffes FITC auf die Antigenexpression der Leukozyten mittels Durchflusszytometrie und zur Ausschüttung von Zytokinen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt werden.

5. Methodik

5.1. Material

5.1.1. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Abdeckfolie für Mikrovertiefungsplatte	Avery Dennison Materials GmbH, Gotha, D
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Auslaufpipette (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B. V. + Co. KG, Braunschweig, D
Etiketten für Reaktionsgefäße	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, D
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Filterspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biosigma S. r. l., Cona, I
Impföse (10 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Mikrotiterplatte, F-Form (12 Well)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Mikrotiterplatte, V-Form (96 Well)	Paul Böttger OHG, Bodenmais, D
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH + Co. KG, Lauda- Königshofen, D
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B. V. + Co. KG, Braunschweig, D
Pasteurpipetten (3 ml)	Ratiolab GmbH, Dreieich, D
Parafilm® „M“	Beemis® Flexible Packaging, Neenah, USA
Petrischale	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Petrischalenspatel Delta™	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Pipette (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipettenspitzen (20 µl)	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, D
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen (5 ml)	Ratiolab GmbH, Dreieich, D
Pipettierhilfe Pipetboy acu®	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, D
Polypropylen (PP)-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht, D
Skalpell	P. J. Dahlhausen + Co. GmbH, Köln, D

Thoma-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH + Co. KG, Lauda-Königshofen, D
Transferpette-8® (200 µl)	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, D
Vernichtungsbeutel (20 cm * 30 cm)	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Vernichtungsbeutel (70 cm * 112 cm)	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht, D
Zellschaber	SPL Life Sciences, Pocheon, ROK
Zellsieb (30 µm)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Zellsieb (40 µm)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

5.1.2. Kits

Human IL-1 beta ELISA	Affymetrix, Inc., San Diego, USA
Ready-SET-Go! (2 nd Generation)	

5.1.3. Chemikalien

BD Horizon Brilliant™ Stain Buffer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Dulbecco's	life technologies™, Paisley, UK
1x Phosphate buffered saline (PBS)	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ethanol, 96 %, vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
FACS-Clean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
FACS-Flow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
FACS-Rinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Fetales Kälberserum (FCS)	BioChrom AG, Berlin, D
Fluoreszein-5(6)-isothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
H ₃ PO ₄	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Histofix	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
KHCO ₃	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Malzextrakt-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Na ₂ CO ₃	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
NH ₄ CL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
RPMI1640	Thermo Scientific, Waltham, USA

Trypanblau	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

5.1.4. Puffer und Lösungen

ELISA-Stopplösung	1 M H ₃ PO ₄ Aqua dest.
ELISA-Waschpuffer	1x PBS 0,05 % Tween-20
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA Aqua dest.
Natriumkarbonat-Lösung	0,1 M Na ₂ CO ₃ Aqua dest.
NH ₄ Cl-Lösung	0,05 M NH ₄ Cl 1x PBS
PBS-E	2 mM EDTA 1x PBS
PBS-T	0,01 % Tween-20 1x PBS

5.1.5. Antikörper

Tab. 5.1.: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Label	Klon	Firma
anti-FITC	APC	NAWESLEE	eBioscience, Frankfurt/Main, D
anti-human CD11b	PE-Cy7	ICRF44	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
anti-human CD14	V500	M5E2	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
anti-human CD15	BV605	W6D3	BioLegend®, San Diego, USA
anti-human CD33	BV421	WM53	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
anti-human CD45	BUV395	HI30	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
anti-human CD45	BV711	HI30	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
anti-human CD62L	PE	DREG-56	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
anti-human CD66b	PerCP-Cy5.5	G10FS	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
anti-human CD274	PE-Cy7	MIH1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
anti-human HLA-DR	APC-Cy7	L243	BioLegend®, San Diego, USA
anti-human Dectin-1	PE	15E2	BioLegend®, San Diego, USA

5.1.6. Geräte

AxioCam	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Durchflusszytometer LSR Fortessa™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Eismaschine AF-10	Scotsman Ice Systems, Mailand, I
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Heraeus Megafuge 1.0R®	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, D
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, D
Lichtmikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	ibs tecnomara GmbH, Fernwald, D
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Waltham, USA
Photospektrometer Tecan safire 2	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Taschenrechner TI-30 ECO RS	Texas Instruments, Dallas, USA

5.1.7. Software

Adobe Reader 7.0 und XI	Adobe Systems, Inc., San José, USA
FACSDiva Software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
FlowJo™ vX 0.7	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad PRISM 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Magellan 5	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
AxioVision Rel. 4.6	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D

5.1.8. Humane Leukozyten

Buffy Coat	Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Jena, Jena, D
------------	---

5.1.9. *Aspergillus fumigatus*

<i>Aspergillus fumigatus</i> CEA10	Jena Microbial Resource Collection (JMRC), Jena, D
------------------------------------	---

5.2. Methoden

5.2.1. Ernte von *Aspergillus fumigatus*-Konidien

Für die Schwell- und Koinkubationsexperimente wurden Konidien des Schimmelpilzes *A. fumigatus* CEA10 (WT) verwendet. Alle Arbeiten mit dem Pilz oder seiner Konidien wurden unter einer sterilen mikrobiologischen Werkbank durchgeführt. Zur Gewinnung von Konidien wurden von der JMRC zur Verfügung gestellte Konidien auf Malzagarextrakt-Platten mit einer Impföse ausgestrichen und anschließend für

4 – 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Auf den nach dieser Zeit gewachsenen, sporenbildenden Pilz wurden mittels Pipettierhilfe 10 ml PBS-T aufgetragen. Die Konidien wurden durch einen Petrischalenspatel vom übrigen Pilzmyzel abgelöst. Die Konidien suspension wurde mit der Pipettierhilfe aufgenommen, durch ein 40 µm-Zellsieb gefiltert und anschließend mit 2600 x g über 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Konidienpellet in 10 ml PBS aufgenommen. Die entstandene Konidien suspension wurde 1 : 100 mit PBS verdünnt, je 10 µl der verdünnten Suspension in je eine Kammer der Thoma-Zählkammer (siehe Abb. 5.1.) pipettiert und die Konzentration an Konidien in der Suspension durch Auszählen in Doppelbestimmung errechnet.

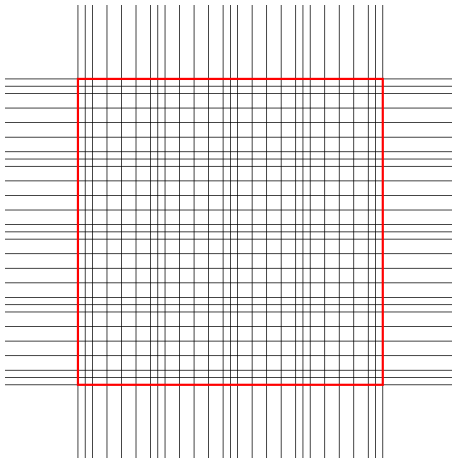


Abb. 5.1.: Schematische Darstellung einer Thoma-Zählkammer.

Darstellung der in der Thoma-Zählkammer eingravierten Linien. Konidien, die in den großen Quadraten innerhalb des rot markierten Bereiches liegen, werden gezählt. Aus dieser Zellzahl kann mit Hilfe einer Formel die Konzentration an Konidien in der Suspension errechnet werden.

Hierfür gilt folgende Formel: $\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{in Thoma-Kammer gezählte Zellzahl}}{16} * 2,5 * 10^5 * 100.$

5.2.2. Präparation der Konidien für die Koinkubationsexperimente

Für die unterschiedlichen Präparationen der Konidien wurde je eine bestimmte Menge an Konidien steril in Falcons abgefüllt. Da bei Färbung der Konidien wegen zusätzlicher Waschschriffe und bei längerem Schwellen der Konidien wegen der größeren Menge an im Zellsieb verbleibenden Konidien mit höheren Verlusten während der Präparation zu rechnen ist, wurden für diese Ansätze mehr Konidien behandelt als bei der Präparation von ungefärbten oder nur kurze Zeit geschwellenen

Konidien. Durch Zentrifugation bei 2600 x *g* über 5 min konnte das PBS aus der Suspension von den Konidien getrennt und verworfen werden. Das Konidienpellet wurde in 4 ml 0,1 M Na₂CO₃-Lösung resuspendiert. Zur Markierung der Konidien mit FITC wurde eine FITC-Lösung angesetzt: 1 mg FITC-Pulver wurde steril in 5 ml 0,1 M Na₂CO₃-Lösung gelöst. Zu den Konidien suspensionen, in welchen die Konidien FITC-markiert werden sollten, wurde 1 ml der FITC-Lösung gegeben. Zu den nicht zu markierenden Konidien wurde 1 ml 0,1 M Na₂CO₃-Lösung pipettiert.

Alle Konidien suspensionen wurden für 20 min bei 37 °C inkubiert und mit Hilfe des MACSmix™ Tube Rotators dabei ständig durchmischt. Anschließend wurden drei Waschschriffe durchgeführt: Es wurden je 10 ml PBS-T hinzugefügt und anschließend für 5 min bei 2600 x *g* zentrifugiert.

Die Konidien, welche nicht geschwollen werden sollten (ruhend), wurden anschließend in 500 µl PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C verwahrt.

Um die Konidien zu schwellen, wurde nach dem dritten Waschschriff das Konidienpellet in 5 ml RPMI1640 + 10 % FCS resuspendiert und anschließend für 2,5 h bzw. 4 h bei 37 °C unter Durchmischung durch den Tube Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen erneut für 5 min bei 2600 x *g* zentrifugiert und drei Waschschriffe mit je 10 ml PBS-T und 5-minütiger Zentrifugation bei 2600 x *g* durchgeführt.

Bei den Experimenten zur Untersuchung des Einflusses der Konidienfixation auf die Phagozytose durch Leukozyten wurden fixierte Konidien benötigt. Hierzu wurde nach dem dreimaligen Waschen das Konidienpellet mit FITC-markierten 2,5 h geschwollenen Konidien in 1 ml Histofix resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden 14 ml NH₄Cl-Lösung zugegeben und 5 min bei 2600 x *g* zentrifugiert. Dann wurden die Konidien in 5 ml NH₄Cl-Lösung resuspendiert und erneut eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden in drei Waschschriffen jeweils 10 ml PBS-T zugegeben und bei 2600 x *g* 5 min zentrifugiert. Bei den übrigen Koinkubationsexperimenten entfielen die Fixierung und die Durchführung dieses Absatzes.

Die entstandenen Pellets wurden in 10 ml PBS-T aufgenommen und durch ein 30 µm-Zellsieb gefiltert. Die gefilterten Konidien suspensionen wurden 5 min bei 2600 x *g* zentrifugiert und die entstandenen Pellets in 500 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden einige Mikroliter der entstandenen Suspensionen 1 : 100 in PBS verdünnt und je 10 µl davon in je eine Kammer der Thoma-Zählkammer gegeben. Analog zu

Kap. 5.2.1. wurde die Konzentration an Konidien in den Suspensionen in einer Doppelbestimmung ermittelt.

Die unverdünnten Konidiensuspensionen wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb von 7 Tagen verwendet oder später verworfen.

5.2.3. Präparation von humanen Leukozyten aus Buffy Coats

Bei der Aufbereitung von Vollblut zu medizinisch verwendbaren Blutprodukten mittels hochtouriger Zentrifugation entsteht neben Frischplasma und dem Erythrozytenkonzentrat der sogenannte Buffy Coat. Dieser enthält den Großteil der Leukozyten und der Thrombozyten des Vollblutes.

Zur Lyse der im Buffy Coat verbliebenen Erythrozyten wurden in einem Reaktionsgefäß 5 ml Buffy Coat mit 45 ml Erythrozyten-Lysepuffer (4 °C vorgekühlt) versetzt. Nach ca. 5 min war die Lyse der Erythrozyten durch die erhöhte Lichtdurchlässigkeit der Lösung bemerkbar. Im Folgenden wurde das Gemisch für 10 min bei 300 x g und 14 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es schloss sich ein Waschschrift an, bei welchem das Pellet mit 20 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und anschließend bei 300 x g und 14 °C für 5 min zentrifugiert wurde.

Das Leukozytenpellet wurde in 1 ml PBS-E resuspendiert.

Zur Bestimmung der Leukozytenkonzentration wurde zunächst 1 µl der Suspension in 250 µl PE verdünnt. Dazu wurden 250 µl 1 : 100 verdünntes Trypanblau gegeben.

Je 10 µl dieser Suspension wurden in eine Kammer der Neubauer-Zählkammer pipettiert. Nur tote Zellen und solche mit bereits perforierter Membran nehmen Trypanblau auf. Vitale Zellen färben sich dagegen nicht an (Strober 2015).

Um die Konzentration der vitalen Leukozyten zu ermitteln, wurden in einer Doppelbestimmung die ungefärbten Zellen in den auf Abb. 5.2. rot markierten Großquadranten ausgezählt.

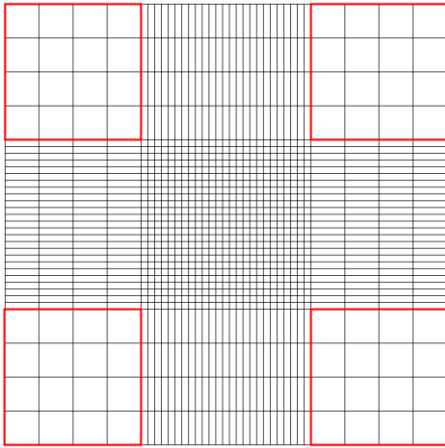


Abb. 5.2.: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer.

Darstellung der Neubauer-Zählkammer zur Zellzahlbestimmung. Ungefärbte Leukozyten, welche innerhalb der rot markierten Bereiche liegen, werden gezählt. Aus dieser Zellzahl kann mit Hilfe einer Formel die Konzentration an vitalen Leukozyten in der Suspension errechnet werden

Zur Berechnung der Leukozytenkonzentration in der unverdünnten Suspension gilt folgende Formel: $\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{4} * 10^4 * 500$. Hierbei ist 10^4 der Kammerfaktor. Da die Konzentration in einer Doppelbestimmung ermittelt wurde, wurde der Mittelwert der gezählten Zellen verwendet.

5.2.4. Koinkubation von humanen Leukozyten und *Aspergillus fumigatus*-Konidien

Für die Koinkubationen sollten pro Vertiefung einer 12-well-Platte $2 * 10^6$ Leukozyten mit $4 * 10^6$ *A. fumigatus*-Konidien vermischt werden. Dies entspricht einer Multiplicity of Infection (MOI) von 2.

Zunächst wurden die zuvor 4 h geschwollenen unmarkierten und FITC-markierten Konidien präpariert: Aus der mit Hilfe der Thoma-Zählkammer ermittelten Konzentration an Konidien in der Suspension wurde je das Volumen bestimmt, welches $4 * 10^6$ Konidien pro zu befüllende Mikrovertiefung enthält. Dieses wurde in je ein 15 ml-PP-Röhrchen pipettiert und bei $2600 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Konidienpellet in je $500 \mu\text{l}$ RPMI1640 + 10 % FCS pro Mikrovertiefung gelöst. Diese Lösung wurde in je eine Mikrovertiefung für unmarkierte und FITC-markierte Konidien pro geplante Koinkubationszeit pipettiert und für 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Inkubator inkubiert. Somit beträgt die Gesamtschwellzeit dieser Konidien 5 h.

Während des Konidienschwellens wurde die Leukozytensuspension vorbereitet. Durch die mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelte Konzentration an Leukozyten in der Präparationslösung wurde das Volumen, das die entsprechende Anzahl von Leukozyten enthält, in ein PP-Röhrchen pipettiert. Bei 300 x g wurde das Röhrchen für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Leukozytenpellet wurde in 1000 µl RPMI1640 + 10 % FCS pro zu befüllende Mikrovertiefung gelöst.

Die Konidien, die nicht oder für 2,5 h geschwollen worden waren, wurden analog zu den 4 h geschwollenen Konidien präpariert und in je eine Mikrovertiefung pro geplanter Koinkubationszeit pipettiert.

Anschließend wurde eine Mikrovertiefung mit 500 µl RPMI1640 + 10 % FCS pro geplanter Koinkubationszeit befüllt.

Nun wurden zu der Vergleichsprobe (RPMI1640 + 10 % FCS) und zu den Konidien je Mikrovertiefung 1000 µl der zuvor hergestellten Leukozytensuspension zugegeben und die Suspensionen mit der Pipette vermischt. Die Mikrovertiefungsplatten wurden für 0,5 h, 2 h und 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Somit wurden folgende Proben hergestellt:

- Leukozyten, welche in RPMI1640 über 0,5 h / 2 h / 4 h inkubiert wurden
- Leukozyten, welche mit nicht-geschwollenen FITC-markierten Konidien über 0,5 h / 2 h / 4 h koinkubiert wurden
- Leukozyten, welche mit 2,5 h geschwollenen FITC-markierten Konidien über 0,5 h / 2 h / 4 h koinkubiert wurden
- Leukozyten, welche mit 5 h geschwollenen FITC-markierten Konidien über 0,5 h / 2 h / 4 h koinkubiert wurden
- Leukozyten, welche mit 5 h geschwollenen unmarkierten Konidien über 4 h koinkubiert wurden

Nach der entsprechenden Koinkubationszeit wurden die Zellen im Inkubationsmedium mittels eines Zellschabers unter mikroskopischer Kontrolle gelöst und in PP-Röhrchen überführt. Die Lösung wurde für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bei 5 Experimenten zur späteren Bestimmung der IL-1β-Konzentration im Überstand bei -20 °C gelagert.

5.2.5. Antikörperfärbung und durchflusszytometrische Analyse von koinkubierten Leukozyten

Die Pellets wurden in 60 µl PBS-E pro Färbeansatz resuspendiert und in die Mikrovertiefungen einer 96-well-V-Mikrotiterplatte pipettiert. Die fluoreszenzmarkierten AK wurden als Mastermix vorbereitet und je 60 µl zu jeder Probe pipettiert.

Tab. 5.2.: Übersicht über die Zusammensetzung der Mastermixes.

BD Horizon Brilliant™ Stain Buffer	20 µl
Fluoreszenzmarkierte AK in unterschiedlicher Zusammensetzung (siehe Anhang Kap. 14.1.)	x µl
PBS-E	y µl
Summe	60 µl

Anschließend wurde die Platte abgeklebt, auf dem Vortexer geschüttelt und für 20 min bei RT dunkel inkubiert. Anschließend wurden je Mikrovertiefung 100 µl PBS-E zugegeben und 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach einem Waschschrift (Zugabe von 200 µl PBS-E mit darauffolgender Zentrifugation bei 200 x g für 5 min und Verwerfen des Überstandes), wurden die Pellets mit je 100 µl PBS-E gelöst und in ein FACS-Röhrchen überführt. Um für die Vermessung genug Probenvolumen bereitzustellen, wurden weitere 100 µl PBS-E zu jedem Röhrchen hinzupipettiert.

Je eine Probe der 4 h in RPMI1640 inkubierten Leukozyten, 4 h mit 5 h geschwollenen FITC-markierten Konidien koinkubierten Leukozyten und 4 h mit 5 h geschwollenen unmarkierten Konidien koinkubierten Leukozyten blieb ungefärbt und wurde direkt in das FACS-Röhrchen pipettiert. Weiterhin wurde je eine Probe der frisch präparierten Leukozyten, welche bis zur durchflusszytometrischen Vermessung bei 4 °C gelagert wurden, der Leukozyten, welche 4 h in RPMI1640 inkubiert wurden und der Leukozyten, welche mit 5 h geschwollenen Konidien über 4 h koinkubiert wurden, mit PI gefärbt. (Für eine Auflistung der Inhalte der Färbeansätze siehe Anhang Kap. 14.1.) Im Anschluss wurden mit dem LSR Fortessa 50 – 100 * 10³ Leukozyten je Probe durchflusszytometrisch vermessen.

5.2.6. Definition der Leukozytenpopulationen in der Durchflusszytometrie („Gating“)

Die in der Durchflusszytometrie vermessenen Zellen wurden zunächst in einem Dotplot-Diagramm dargestellt, in dem der auf allen Leukozyten vorhandene Oberflächenmarker CD45 (Fluoreszenz im BUV395-Kanal) gegen den Side Scatter (SSC) aufgetragen ist, um die Leukozyten von den nicht-phagozytierten Konidien und Zellfragmenten abzugrenzen.

Die so definierten Leukozyten wurden anschließend in die Subpopulationen neutrophile Granulozyten und Monozyten aufgetrennt. Dazu wurde in einem neuen Dotplot CD66b (Fluoreszenz im PerCP-Cy5.5-Kanal) gegen CD14 (Fluoreszenz im V500-Kanal) aufgetragen. CD66b wird ausschließlich auf Granulozyten exprimiert und ist daher zur immunologischen Identifizierung dieser Leukozytensubpopulation geeignet (Scapini et al. 2016). Das Glykoprotein CD14 ist ein auf Monozyten und Makrophagen exprimierter Rezeptor (Mandl et al. 2014). Daher wurde CD14 als immunologischer Marker für Monozyten verwendet. Die Strategie zur Definition der betrachteten Leukozytensubpopulationen ist in Abb. 5.3. exemplarisch dargestellt.

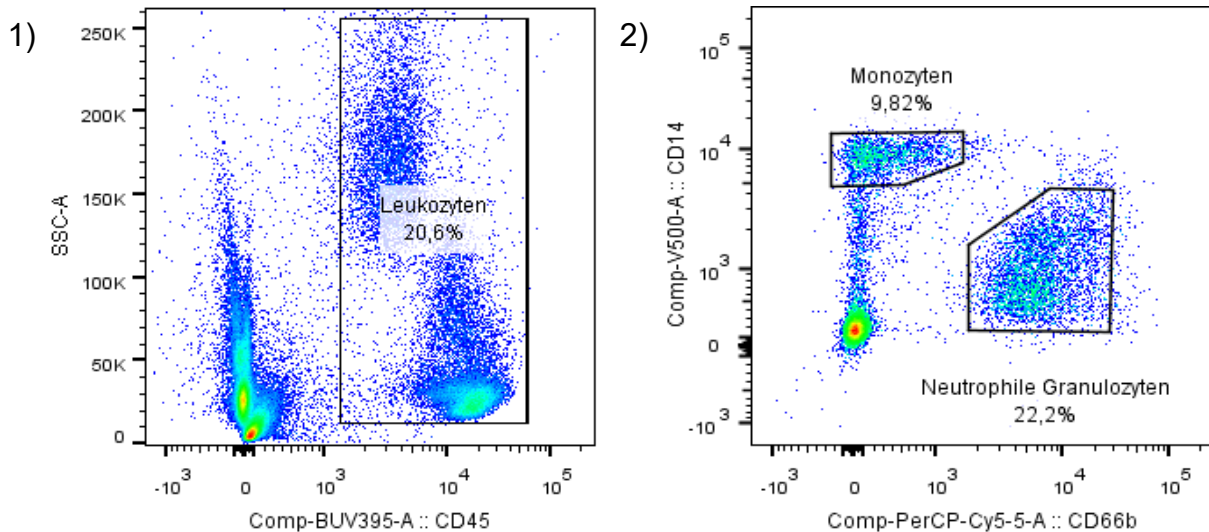


Abb. 5.3.: Repräsentative Darstellung der Definition von Leukozyten und Leukozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie.

1) Bei der vermessenen Probe wird der Oberflächenmarker CD45 gegen den SSC aufgetragen und die Leukozyten als CD45⁺ definiert. 2) Die Leukozyten werden nach den Oberflächenmarkern CD66b und CD14 getrennt dargestellt und die Subpopulationen neutrophile Granulozyten (CD66b⁺) und Monozyten (CD14⁺) definiert.

5.2.7. Identifikation der Phagozytoseaktivität der Leukozytenpopulationen in der Durchflusszytometrie

Vor der Koinkubation mit Leukozyten wurden die Konidien FITC-markiert und über unterschiedliche Zeiten geschwollen (siehe Kap. 5.2.2.). Bei der Koinkubation wurden Konidien von einigen Leukozyten internalisiert, einige blieben an der Oberfläche der Leukozyten haften. Andere Leukozyten phagozytierten keine Konidien. Wie in Abb. 5.4. dargestellt, lässt sich durch Zugabe eines APC-markierten Anti-FITC-AK nach der Koinkubation abgrenzen, ob die Konidien von den Leukozyten phagozytiert wurden (Leukozyten mit ausschließlich internalisierten Konidien erscheinen FITC⁺APC⁻, da Anti-FITC-APC nur an extrazellulär vorliegende FITC-gefärbte Konidien, nicht aber an internalisierte Konidien binden kann). Leukozyten mit an ihrer Zelloberfläche haftenden Konidien stellen sich FITC⁺APC⁺ dar, da das Anti-FITC-APC an das FITC der an der Oberfläche anhaftenden Konidien bindet. Leukozyten, welche sowohl Konidien internalisiert haben als auch an ihrer Oberfläche haftende Konidien besitzen, färben sich FITC⁺APC⁺. Dasselbe gilt für Leukozyten, welche ebenfalls Konidien an ihrer Oberfläche aufweisen ohne Konidien internalisiert zu haben. Zwischen diesen beiden Gruppen kann auf Grundlage der verwendeten Färbemethode nicht unterschieden werden. Als dritte Möglichkeit der Interaktion Leukozyt – Konidie besteht der Fall, dass der Leukozyt Konidien weder internalisiert hat noch an seiner Zelloberfläche anhaftende Konidien besitzt, also in keinem direkten zellulären Kontakt mit der Konidie steht. Diese Leukozyten sind dementsprechend FITC⁻APC⁻.

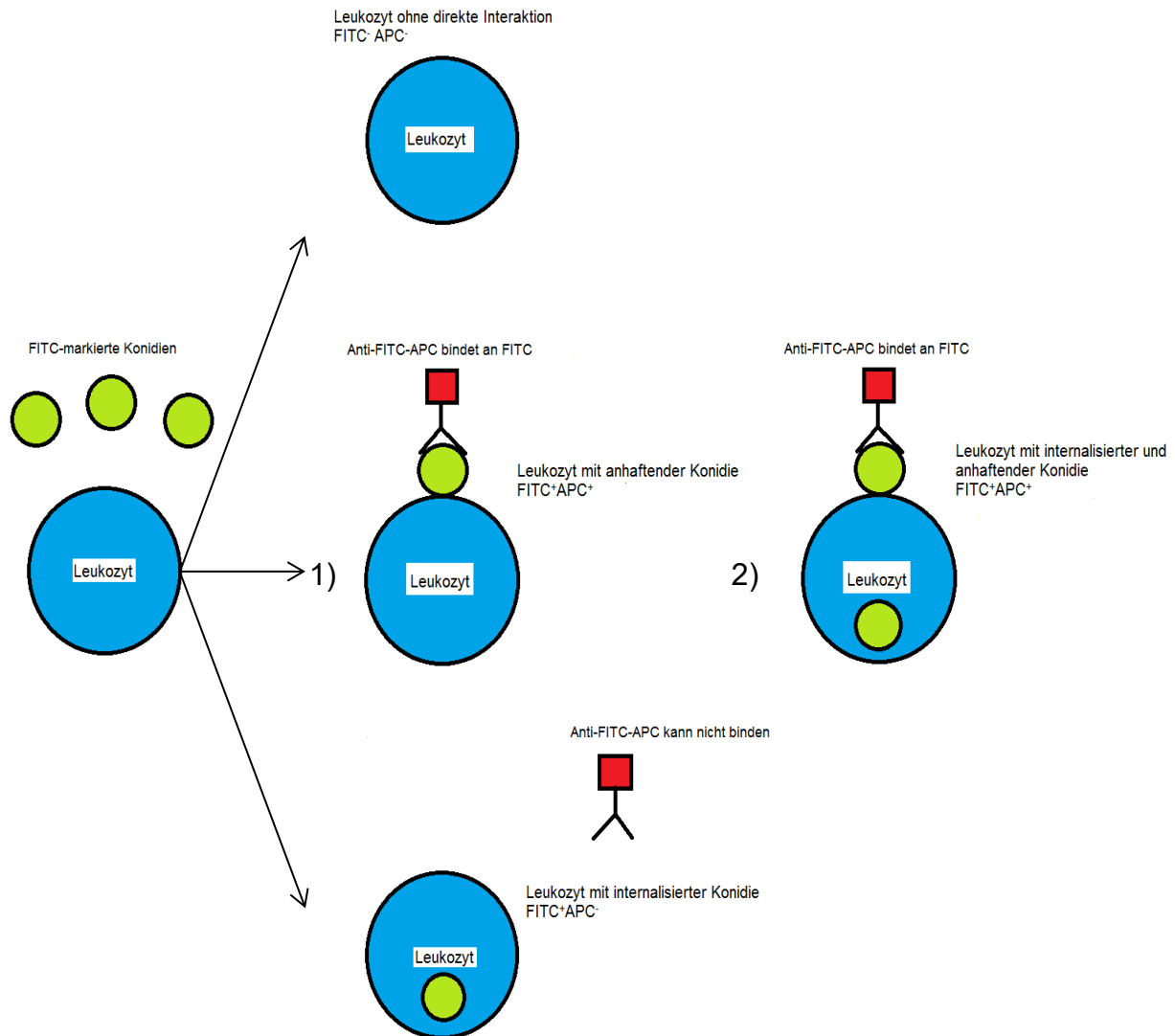


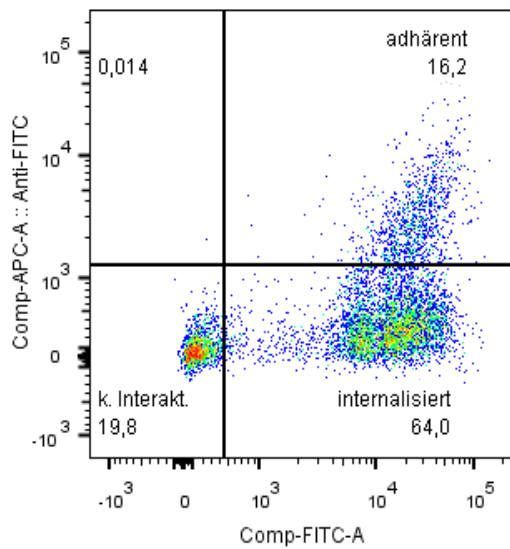
Abb. 5.4.: Schematische Darstellung der Phagozytoseaktivität und daraus folgender Fluoreszenzfärbung der Leukozyten.

Links: Ausgangssituation – Leukozyten und Konidien werden koinkubiert. Rechts oben: Der Leukozyt ist in keine direkte Interaktion mit Konidien getreten und ist dementsprechend FITC-APC-. Rechts Mitte: 1) Am Leukozyten haftet eine FITC-markierte Konidie. An das FITC bindet Anti-FITC-APC. Der Leukozyt ist somit FITC+APC+. 2) Der Leukozyt hat sowohl Konidien internalisiert als auch an seiner Oberfläche anhaften. Auch hier ist der Leukozyt FITC+APC+. Rechts unten: Der Leukozyt hat eine Konidie internalisiert. Anti-FITC-APC kann nicht binden, da sich die Konidie intrazellulär befindet. Der Leukozyt ist FITC+APC-.

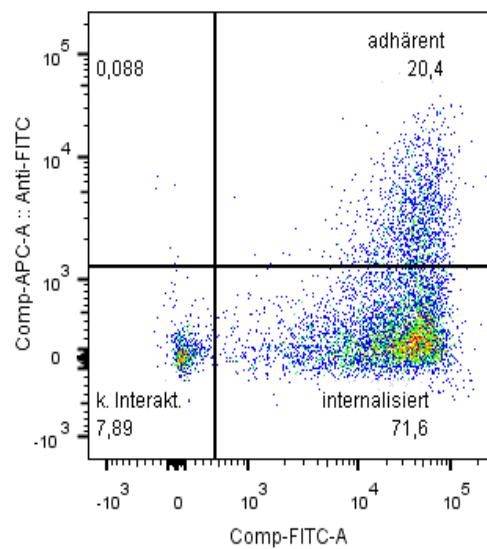
Phagozytose lag vor, wenn ein Leukozyt eine Konidie internalisierte und ggf. eine oder mehrere Konidien an seiner Oberfläche hafteten. Bei der Betrachtung der Änderung der Antigenexpression durch die Phagozytoseaktivität der Leukozytensubpopulationen wurde der Zeitpunkt der maximalen Internalisierungsrate der jeweiligen Subpopulation gewählt.

In Abb. 5.5. sind repräsentative Dotplots zu sehen, welche die Vorgehensweise bei der Unterteilung der Leukozyten in internalisierend ohne an der Oberfläche haftende Konidien (FITC⁺APC⁻), mit anhaftenden Konidien (FITC⁺APC⁺) und ohne direkten zellulären Kontakt zu Konidien (FITC⁻APC⁻) darstellen. Anhand der konidienfreien Kontrollproben wurden für neutrophile Granulozyten und Monozyten die Grenzen für die Positivität in den Fluoreszenzkanälen für FITC und APC festgelegt. Der prozentuale Anteil der FITC⁺APC⁻ Leukozyten stellt die Internalisierungsrate dar.

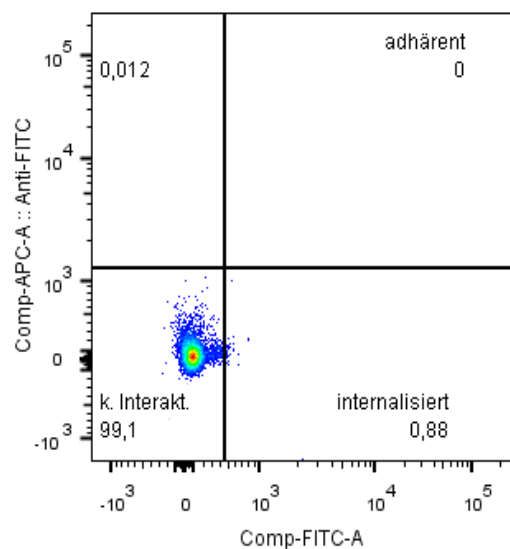
1)



2)



3)



4)

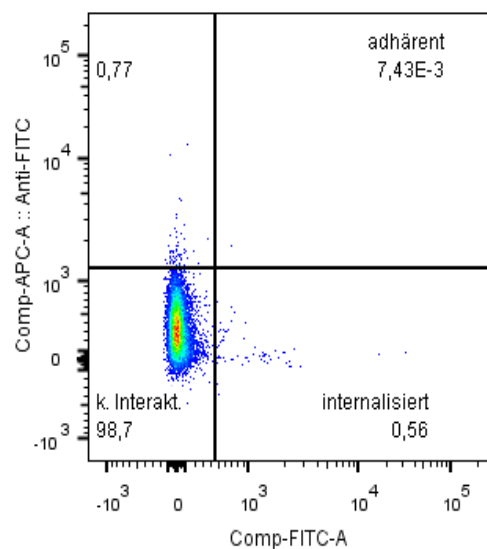


Abb. 5.5.: Repräsentative Dotplots zur Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien durch humane Leukozyten.

Dargestellt ist die Phagozytose durch 1) neutrophile Granulozyten und 2) Monozyten, jeweils zum Zeitpunkt der maximalen Internalisierungsrate dieser Subpopulationen. 3) zeigt neutrophile Granulozyten, 4) Monozyten, welche zur Kontrolle ohne Konidien inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen wurden. Zu unterscheiden sind drei Quadranten: FITC⁺APC⁺ – Leukozyten, welche Konidien an ihrer Oberfläche anhaften haben, FITC⁺APC⁻ – Leukozyten, welche Konidien internalisiert haben und keine Konidien an ihrer Oberfläche tragen und FITC⁻APC⁻ – Leukozyten ohne direkte Interaktion mit den Konidien. Der Quadrant FITC⁻APC⁺ wird nicht betrachtet, denn es kann kein APC-Signal ohne ein vorhandenes FITC-Signal geben. Bei den wenigen in diesem Quadranten vorhandenen Signalen handelt es sich wahrscheinlich um Färbeartefakte. n = 10

5.2.8. Koinkubationsexperimente mit fixierten *Aspergillus fumigatus*-Konidien

Wie in Kap. 5.2.2. beschrieben, wurde bei der Konidienpräparation eine Charge von 2,5 h geschwollenen FITC-markierten Konidien fixiert. Diese fixierten Konidien wurden analog zum Koinkubationsexperiment in Kap. 5.2.4. mit humanen Leukozyten über drei verschiedene Zeiten (hier: 30 min, 1 h, 2 h) inkubiert. Ebenso wurde eine unfixierte Konidiencharge mit Leukozyten über dieselben Zeiten inkubiert. Alle nachfolgenden experimentellen Schritte erfolgten analog zu den Kapiteln 5.2.4. –5.2.7.

5.2.9. Bestimmung der Interleukin-1 β -Konzentration im Überstand der Koinkubation

In Kap. 5.2.4. wurde bereits beschrieben, dass bei 5 der 10 Koinkubationsexperimente im Anschluss an die Koinkubation der nach Ernte und Zentrifugation entstandene Überstand bei -20 °C aufbewahrt wurde.

Die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt: Zunächst wurde die ELISA-Mikrovertiefungsplatte mit 100 μ l/Mikrovertiefung Fänger-AK in 1x Beschichtungspuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Mikrovertiefungen abgesaugt und dreimal mit 250 μ l Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 200 μ l 1x ELISA/ELISPOT-Verdünner in jede Mikrovertiefung pipettiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Es wurde ein Waschschrift mit Waschpuffer angeschlossen. In zwei Mikrovertiefungen wurden je 100 μ l der höchsten Standardkonzentration pipettiert.

Mit dem übrigen Standard wurde eine zweifache Verdünnungsreihe über acht Konzentrationen angefertigt und je Konzentration zwei Mikrovertiefungen mit 100 μ l beimpft. Zwei Mikrovertiefungen wurden mit 100 μ l 1x ELISA/ELISPOT-Verdünnung zur Feststellung des Nullwertes befüllt. Die Überstände der Koinkubationsversuche wurden auf Eis aufgetaut und mit Hilfe des Vortexers geschüttelt. Je Probe wurden zwei Mikrovertiefungen mit je 100 μ l befüllt. Anschließend wurden die Platten für 2 h bei RT inkubiert, danach wurden die Mikrovertiefungen abgesaugt und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Mikrovertiefungen wurden mit je 100 μ l verdünnter Detektions-AK befüllt und erneut für eine Stunde bei RT inkubiert. Es wurden drei Waschschriffe angeschlossen. Danach wurden in jede Vertiefung 100 μ l verdünnte Avidin-Meerrettichperoxidase (HRP) gegeben, die Platte versiegelt und für 30 min bei

RT inkubiert. Es wurde anschließend die Flüssigkeit aspiriert und sechsfach gewaschen.

Daraufhin wurden 100 µl 1x 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in jede Vertiefung pipettiert und die Platte für 15 min bei RT inkubiert. Es wurden anschließend 50 µl ELISA-Stopplösung in jede Mikrovertiefung gegeben und die Platte bei 450 nm im Photospektrometer Tecan safire 2 vermessen. Es wurde der Mittelwert der Doppelbestimmung errechnet und mit Hilfe der Verdünnungsreihe der Standards eine Konzentrationskurve erstellt und daran die Konzentration von IL-1β im Überstand der Koinkubationsversuche bestimmt.

5.2.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad PRISM 5. In den Graphiken ist der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Durch einen Mann-Whitney-Test wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede überprüft. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden in den Graphiken mit * gekennzeichnet.

6. Ergebnisse

6.1. Schwellen von *Aspergillus fumigatus*-Konidien

Werden Konidien durch den Menschen inhaliert, beginnen sie in der Lunge zu schwellen und auszukeimen. Hierbei erhöht sich die Antigenexpression der Konidien (Kyrmizi et al. 2013). Um dies *in vitro* nach zu vollziehen, ist es demnach sinnvoll, die eingesetzten Konidien vor der Koinkubation mit humanen Leukozyten zu schwellen.

In einer Nährlösung (in diesem Fall RPMI1640 + 10% FCS) bei 37 °C inkubiert, nehmen Konidien an Volumen zu und beginnen Keimschläuche zu bilden, die bei weiterem Wachstum das Hyphengeflecht des Pilzes ausbilden.

Da bei den nachfolgenden Experimenten Konidien mit unterschiedlichen Schwellzeiten mit humanen Leukozyten koinkubiert werden sollten, stellte sich die Frage nach der Größenzunahme der Konidien sowie dem Zeitpunkt, ab dem die geschwollenen Konidien zunehmend verklumpen und daher für weitere Experimente schwer zu präparieren sind. Der durchgeführte Versuch mit Konidien eines WT des Schimmelpilzes *A. fumigatus* diente daneben zur mikroskopischen Fotodokumentation der Konidien während des Prozesses des Schwellens.

In Abb. 6.1. sind Konidien nach drei verschiedenen Schwellzeiten und in ruhendem Zustand dargestellt: Während die Konidien nach einer Inkubation von bis zu 2,5 h weitestgehend einzeln, gelegentlich in kleinen Haufen von bis zu drei Konidien vorliegen, ist ab einer Schwellzeit von 4 h die Bildung größerer zusammenhängender Konidienhaufen zu bemerken. Weiterhin ist bei einer Schwellzeit von 5 h bei einigen Konidien die Bildung von Keimschläuchen sichtbar.

Für die weiteren Koinkubationsexperimente wurden daraufhin drei zu untersuchende Schwellzeiten für Konidien festgelegt: „ruhend“ (ungeschwollene Konidien), 2,5 h geschwollene Konidien und 5 h geschwollene Konidien. Bei Letzteren ist zu vermerken, dass die Klumpenbildung nach dieser Schwellzeit dazu führte, dass ein Großteil der Konidien im Filter hängen blieb. Daher wurden diese Konidien in der Präparation nur 4 h geschwollen und am Tag der Koinkubation zusätzlich für 1 h geschwollen, bevor die Leukozyten hinzugegeben wurden.

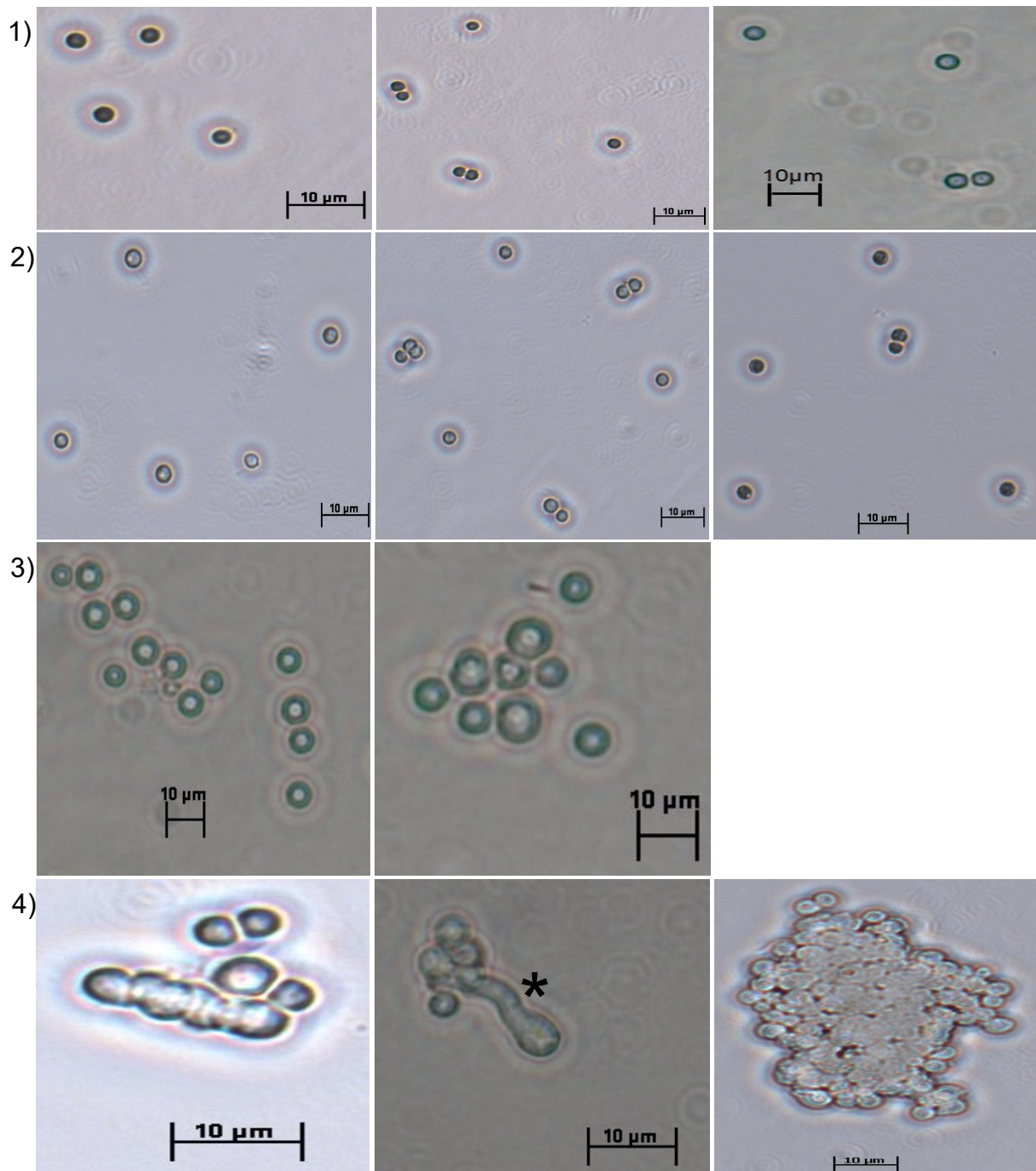


Abb. 6.1.: Lichtmikroskopische Aufnahmen von *A. fumigatus*-Konidien.

1) in ruhendem Zustand, 2) nach einer Inkubation in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C über 2,5 h, 3) nach einer Inkubation in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C über 4 h, 4) nach einer Inkubation in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C über 5 h. *: Keimschlauchbildung. Beispielhafte Abbildungen von n = 3 Experimenten.

6.2. Koinkubation von Konidien und humanen Leukozyten

6.2.1. Phagozytose von *Aspergillus fumigatus*-Konidien durch neutrophile Granulozyten

Betrachtet man die Phagozytose der Konidien durch die CD66b⁺ neutrophilen Granulozyten, ist zunächst festzustellen, dass die Internalisierungsrate (Anteil internalisierender Zellen an ihrer Gesamtheit) bei einer Koinkubation über 0,5 h bzw. 2 h mit der Schwellzeit der Konidien zunimmt. Weiterhin ist bei gleicher Schwellzeit die Internalisierungsrate der neutrophilen Granulozyten nach einer Inkubationszeit von 2 h höher als die Internalisierungsrate nach 0,5 h Koinkubation. Der Maximalwert der Internalisierungsrate der neutrophilen Granulozyten liegt bei einer Koinkubation über 2 h mit zuvor 5 h geschwollenen Konidien mit einem Wert von 60,8 % ± 6,5 % vor. Bei längerer Koinkubation konnte unabhängig von der Schwellzeit keine höhere Internalisierungsrate ermittelt werden. (s. Abb. 6.2. und Abb. 6.3.)

Für die nachfolgende Betrachtung der Veränderung der Antigenexpression der neutrophilen Granulozyten wurden daher die Proben einer zweistündigen Koinkubation mit 5 h geschwollenen Konidien ausgewertet.

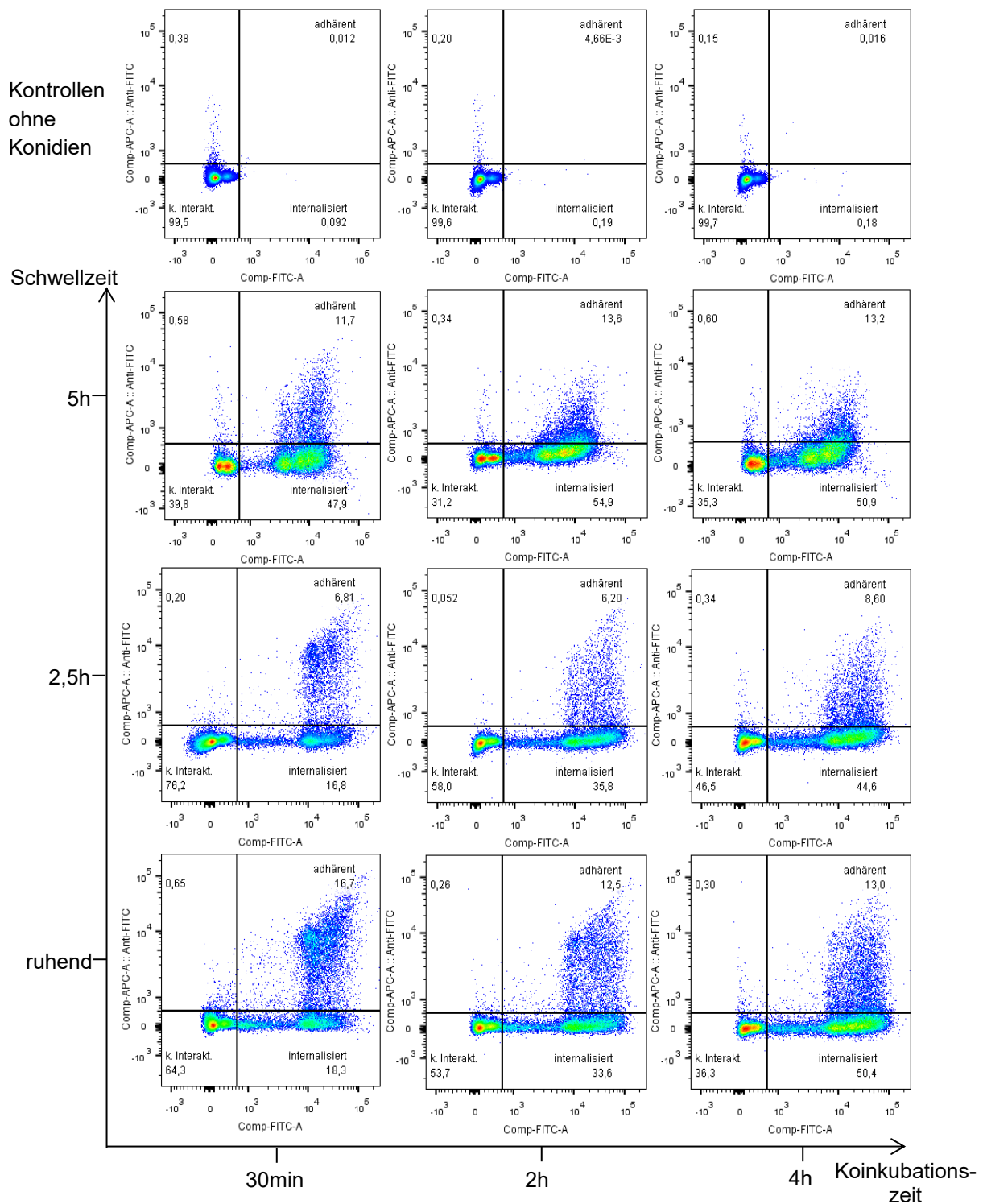


Abb. 6.2.: Repräsentative Dotplots zur Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien durch neutrophile Granulozyten.

Die Konidien wurden zuvor mit FITC markiert und über verschiedene Zeiten in Nährmedium (RPMI1640 + 10 % FCS) bei 37 °C geschwollen. Die Schwellzeiten sind hier an der y-Achse aufgetragen. An der x-Achse sind die verschiedenen Zeiten der Koinkubation von Konidien und Leukozyten aufgetragen. Durch Zugabe von Anti-FITC-APC kann abgegrenzt werden, ob Konidien internalisiert wurden (FITC⁺APC⁻) oder an der Oberfläche anhaften (FITC⁺APC⁺).

n = 10

Internalisierungsrate neutrophiler Granulozyten

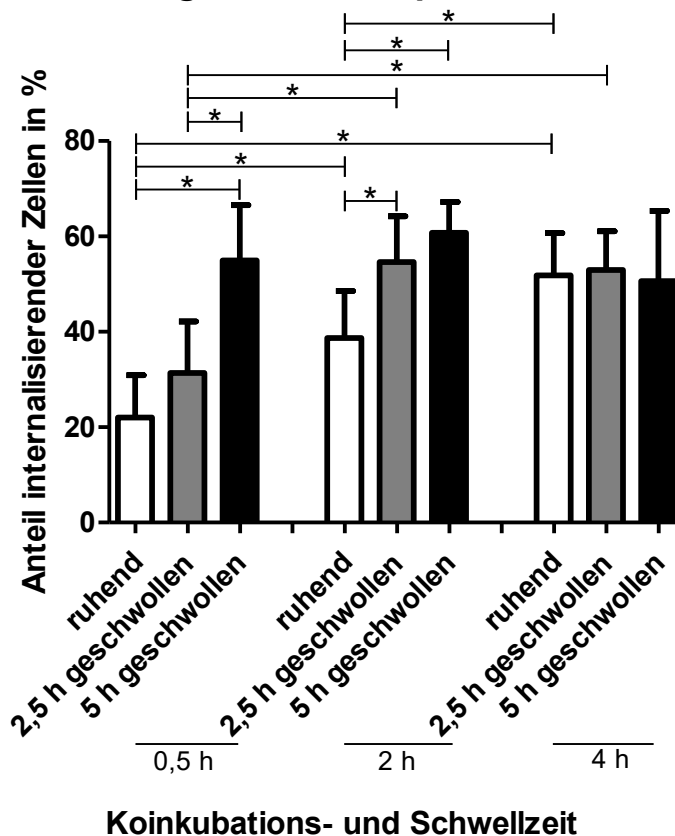


Abb. 6.3.: Internalisierungsrate neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von Schwell- und Koinkubationszeit.

Grafische Darstellung der Internalisierungsrate neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Schwellzeit der Konidien und der Koinkubationszeit von Konidien und Leukozyten in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung. n = 10.
*: p < 0,05 %

6.2.2. Änderung der Antigenexpression der neutrophilen Granulozyten durch die Phagozytose von zuvor 5 h geschwollenen *Aspergillus fumigatus*-Konidien nach einer Koinkubationszeit von 2 h (Zeitpunkt der maximalen Internalisierungsrate)

Wie bereits in Kap. 5.2.5. beschrieben, wurden diverse Antigene auf der Oberfläche der Leukozyten mittels fluoreszenzfarbstofftragender AK angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. Die mediane Fluoreszenzintensität (FI) wurde ausgewertet. Weiterhin wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Subpopulationen an ihrer Gesamtheit bestimmt. Verglichen wurden dabei die neutrophilen

Granulozyten, welche als Kontrolle über 2 h ohne Konidien in einem Nährmedium inkubiert wurden, Granulozyten, welche keine direkte Interaktion mit Konidien (weder internalisierte noch an der Oberfläche anhaftende Konidien) aufwiesen, Granulozyten, die an ihrer Oberfläche anhaftende Konidien aufwiesen (und von denen nicht gesagt werden kann, ob sie weitere Konidien internalisiert haben) und Granulozyten, welche Konidien internalisiert haben.

In Abb. 6.4. wurde 1) der prozentuale Anteil der CD11b⁺ Zellen an allen neutrophilen Granulozyten in den jeweils zugehörigen oben definierten Gruppen dargestellt, sowie 2) der Median der FI der oben beschriebenen Gruppen der neutrophilen Granulozyten dargestellt. Nahezu alle neutrophilen Granulozyten sind sowohl in der Kontrolle (Leukozyten ohne Konidien) als auch bei den Proben mit Konidien CD11b⁺ (ohne Konidien 90,9 % ± 25,4 %, keine direkte Interaktion 98,9 % ± 0,9 %, anhaftende Konidien 99,9 % ± 0,2 %, internalisierte Konidien 99,9 % ± 0,2 %). Bei der Betrachtung der medianen FI ist ein geringer Anstieg in den Granulozyten mit internalisierten Konidien (41796 ± 8006) gegenüber der Kontrollprobe ohne Konidien (34469 ± 6652) zu sehen. Die Granulozyten mit anhaftenden Konidien und Granulozyten ohne direkte Interaktion bei der Koinkubation mit Konidien zeigen keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Granulozyten, welche ohne Konidien inkubiert wurden.

1) Prozentualer Anteil CD11b⁺ neutrophiler Granulozyten 2) CD11b auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten

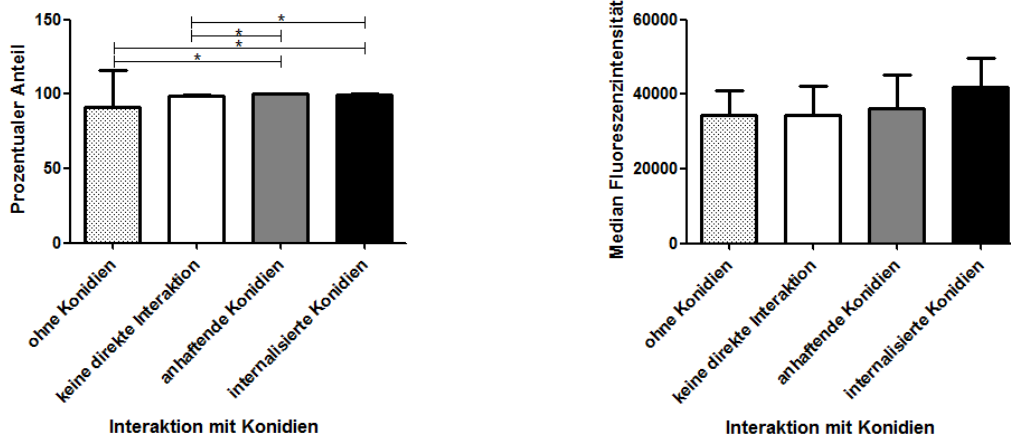


Abb. 6.4.: CD11b-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 2 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD11b⁺ neutrophilen Granulozyten an den gesamten neutrophilen Granulozyten. 2) Median der FI der an CD11b gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

Wie in Abb. 6.5. 1) zu sehen ist, sind sowohl bei den phagozytierenden neutrophilen Granulozyten als auch bei den neutrophilen Granulozyten der Kontrollproben fast alle Zellen CD15⁺. Einzig bei den neutrophilen Granulozyten, die zwar mit Konidien inkubiert wurden, jedoch keine Interaktion mit diesen zeigten, sind nur 81,8 % \pm 13,7 % CD15⁺ (vgl. ohne Konidien 92,0 % \pm 4,4 %, anhaftende Konidien 98,7 % \pm 1,1 %, internalisierte Konidien 98,9 % \pm 0,7 %). Allerdings zeigt sich bei der Betrachtung der Mediane der FI ein signifikanter höherer Wert bei den Granulozyten, die Konidien internalisiert (31246 \pm 5855) oder an ihrer Oberfläche anhaften haben (28136 \pm 3918), verglichen mit den Granulozyten der Kontrollprobe (23495 \pm 4744).

1) Prozentualer Anteil CD15⁺ neutrophiler Granulozyten 2) CD15 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten

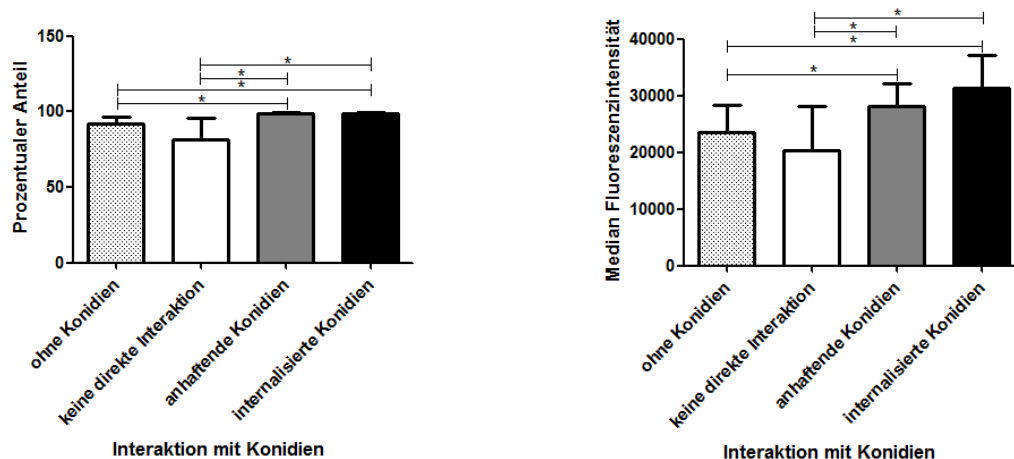


Abb. 6.5.: CD15-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 2 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD15⁺ neutrophilen Granulozyten an den gesamten neutrophilen Granulozyten. 2) Median der FI der an CD15 gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

Bei CD62L zeigt sich, wie in Abb. 6.6. dargestellt, dass zwar die direkt mit Konidien interagierenden neutrophilen Granulozyten einen ähnlichen prozentualen Anteil CD62L-Positiver besitzen (Granulozyten mit anhaftenden Konidien 66,5 % ± 25,9 %; Granulozyten mit internalisierten Konidien 61,9 % ± 30,2%) wie die Zellen aus der Kontrolle (61,1 % ± 22 %), allerdings besitzen die Granulozyten, welche zwar mit *A. fumigatus*-Konidien kokubiert wurden, jedoch nicht direkt mit ihnen interagierten, einen signifikant geringeren Anteil an CD62L⁺ Zellen (25,0 % ± 15,8 %). Die FI aller mit Konidien kokubierten neutrophilen Granulozyten ist im Median kleiner als die der neutrophilen Granulozyten in der Kontrollprobe (anhaftende Konidien: 966 ± 373; internalisierte Konidien: 832 ± 240; keine Interaktion: 325 ± 131; Inkubation ohne Konidien: 1750 ± 1719). Hierbei zeigt sich somit, dass die phagozytierenden neutrophilen Granulozyten zwar den gleichen Anteil an CD62L⁺ Zellen haben wie die neutrophilen Granulozyten der Kontrollproben, jedoch ist ihre FI geringer als bei den Granulozyten der Kontrollproben. Ergo sind diejenigen Zellen, die CD62L exprimieren, nach der Phagozytose von Konidien mit einer geringeren Dichte CD62L-exprimierend. Auffällig ist jedoch die große Streubreite zwischen den einzelnen Proben, die ohne

Konidien inkubiert wurden. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich auch im Vergleich der mit Konidien inkubierten neutrophilen Granulozyten untereinander: Die neutrophilen Granulozyten, die während der Inkubation eine phagozytotische Aktivität aufweisen oder Konidien an ihrer Oberfläche anhaften haben, sind stärker CD62L⁺ als Zellen ohne direkte Interaktion während der Koinkubation.

1) Prozentualer Anteil CD62L⁺ neutrophiler Granulozyten 2) CD62L auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten

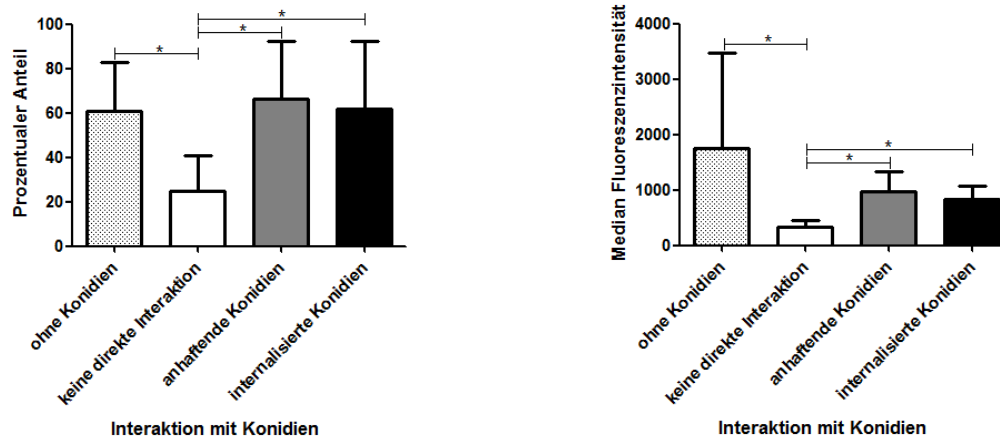


Abb. 6.6.: CD62L-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 2 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD62L⁺ neutrophilen Granulozyten an den gesamten neutrophilen Granulozyten. 2) Median der FI der an CD62L gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

Weiterhin wurde das Antigen CD33 betrachtet (s. Abb. 6.7.). Zunächst zeigt sich hier ein geringerer Anteil CD33⁺ neutrophiler Granulozyten in den Proben, die Konidien enthielten (30,9 % ± 20,2 % der neutrophilen Granulozyten ohne Interaktion; 27,1 % ± 20,8 % der neutrophilen Granulozyten mit anhaftenden Konidien und 16,5 % ± 12,5 % der neutrophilen Granulozyten mit internalisierten Konidien) gegenüber den neutrophilen Granulozyten in den konidienfreien Proben (52,6 % ± 25,4 %). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Betrachtung der FI. Auch hier ist der Unterschied zwischen den Granulozyten aus der konidienfreien Probe (773 ± 254) und den Granulozyten mit internalisierten Konidien (351 ± 126) am stärksten. Es zeigt sich also, dass die neutrophilen Granulozyten in Koinkubation mit

A. fumigatus-Konidien weniger CD33 exprimieren, vor allem die internalisierenden neutrophilen Granulozyten.

1) Prozentualer Anteil CD33⁺ neutrophiler Granulozyten 2) CD33 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten

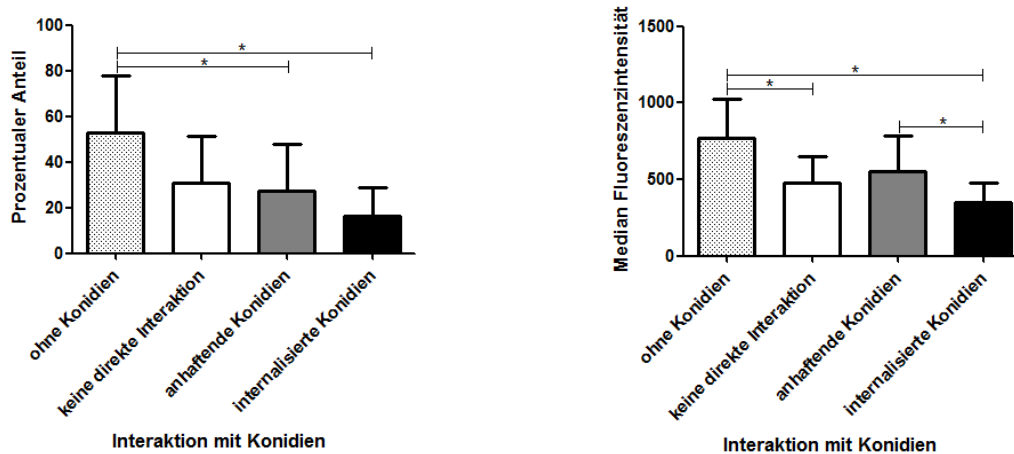


Abb. 6.7.: CD33-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 2 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD33⁺ neutrophilen Granulozyten an den gesamten neutrophilen Granulozyten. 2) Median der FI der an CD33 gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

Es wurden weiterhin die Antigene CD274, Dectin-1 und HLA-DR auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten vermessen. Für Dectin-1 zeigt sich eine große Schwankungsbreite. Die Ergebnisse der Vermessung von HLA-DR auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten sind statistisch nicht signifikant.

Die Resultate werden daher nicht im Ergebnisteil weiter beschrieben. Die grafischen Darstellungen befinden sich im Anhang in den Kapiteln 14.2 – 14.4.

6.2.3. Phagozytose von *Aspergillus fumigatus*-Konidien durch Monozyten

Das Vorgehen zur Definition der Monozyten anhand von Oberflächenmarkern in der Durchflusszytometrie ist in Kap. 5.2.6. beschrieben. Eine schematische Erklärung zum Vorgehen bezüglich der Bestimmung der Phagozytoseaktivität findet sich im Kap. 5.2.7.

Wie in den Abb. 6.8. und 6.9. zu sehen, steigt die Internalisierungsrate der Monozyten mit Zunahme der Koinkubationszeit bei gleicher Schwellzeit der Konidien an. Betrachtet man bei gleicher Koinkubationszeit die Schwellzeit der Konidien, so ist festzustellen, dass die Internalisierungsrate nur bei einer Koinkubationszeit von 0,5 h mit zunehmender Schwellzeit stetig ansteigt. Bei einer längeren Koinkubation nimmt die Phagozytoserate der Monozyten bei einer Konidienschwellzeit von 5 h wieder ab. Bei der Mikroskopie von Proben dieser Koinkubationsexperimente zeigt sich, dass die Konidien nach fünfstündiger Schwellzeit und einer Koinkubation von 4 h stark an Größe zugenommen haben und das Auskeimen bereits begonnen hat. In Abb. 6.10. wurde zur Verdeutlichung exemplarisch eine auskeimende Konidie (→) im Größenvergleich mit einem Leukozyten (>) dargestellt.

Der Maximalwert der Internalisierungsrate der Monozyten liegt bei $55,4 \% \pm 17,0 \%$ bei einer Schwellzeit von 2,5 h und einer Koinkubationszeit von 4 h. Daher wurde bei der Betrachtung der Antigenexpression in Abhängigkeit von der Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien dieser Zeitpunkt gewählt.

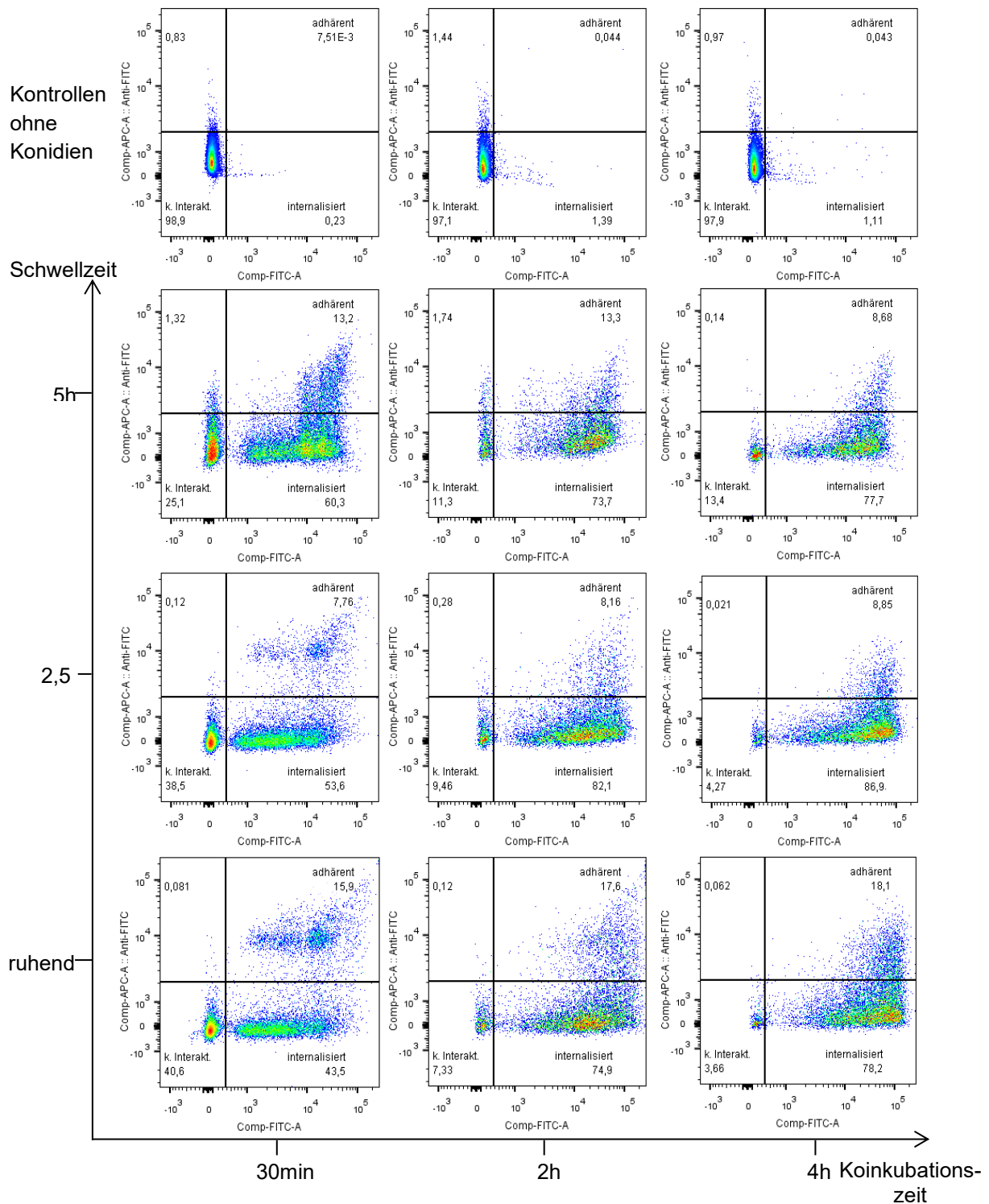


Abb. 6.8.: Repräsentative Dotplots der Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien durch Monozyten.

Die Konidien wurden zuvor mit FITC markiert und über verschiedene Zeiten in Nährmedium (RPMI1640 + 10 % FCS) bei 37 °C inkubiert und so zum Schwellen gebracht. Die Schwellzeiten sind hier an der y-Achse aufgetragen. An der x-Achse sind die verschiedenen Zeiten der Koinkubation von Konidien und Leukozyten aufgetragen. Durch Zugabe von Anti-FITC-APC kann abgegrenzt werden, ob Konidien internalisiert wurden oder an der Oberfläche anhaften. n = 10.

Internalisierungsrate von Monozyten

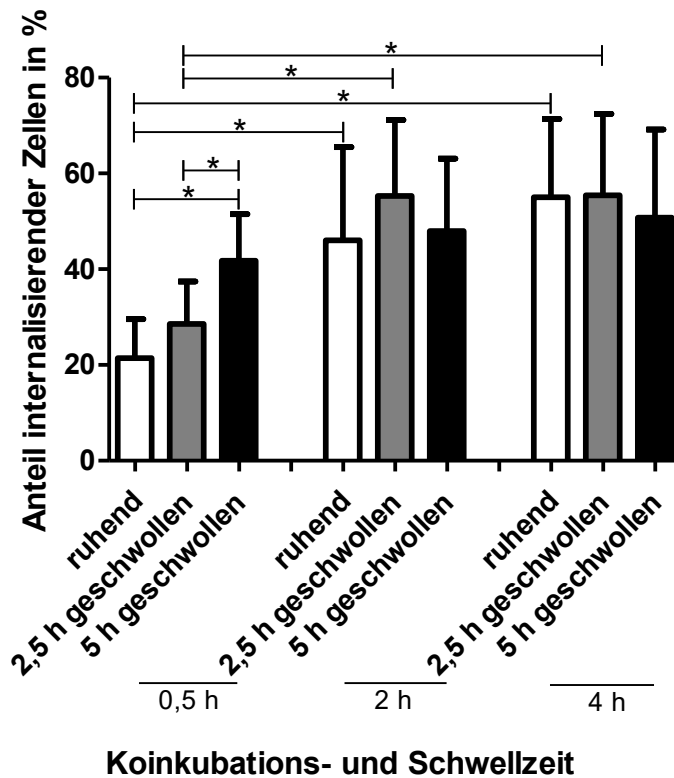


Abb. 6.9.: Internalisierungsrate von Monozyten in Abhängigkeit von Schwell- und Koinkubationszeit.

Grafische Darstellung der Internalisierungsrate von Monozyten in Abhängigkeit von der Schwellzeit der Konidien und der Koinkubationszeit von Konidien und Leukozyten in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung. n = 10.

*: $p < 0,05$ %



Abb. 6.10.: Repräsentatives lichtmikroskopisches Bild der Koinkubation von Leukozyten mit zuvor 5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien über 4 h.

Vergrößerung: 40x. >: Leukozyt ohne phagozytotische Aktivität; →: auskeimende Konidie; *: Leukozyt mit internalisierter Konidie. n = 10.

6.2.4. Änderung der Antigenexpression der Monozyten durch die Phagozytose von zuvor 2,5 h geschwollenen *Aspergillus fumigatus*-Konidien nach einer Koinkubationszeit von 4 h (Zeitpunkt der maximalen Internalisierungsrate)

Analog zu den neutrophilen Granulozyten wurden auch bei den Monozyten die Antigene CD11b, CD15, CD62L, CD33, CD274, Dectin-1 und HLA-DR mittels fluoreszenzfarbstoffgekoppelter AK angefärbt und durchflusszytometrisch vermessen. CD11b ist auf der Oberfläche nahezu aller vermessenen Monozyten zu detektieren, jedoch zeigt die mediane FI bei den Monozyten eine Abnahme durch die Koinkubation mit *A. fumigatus*-Konidien (s. Abb. 6.11.). Im Vergleich zu den Monozyten, die sich in den Proben ohne Konidien befanden (38461 ± 4871) zeigen besonders die Monozyten, welche mit Konidien koinkubiert wurden, aber nicht direkt mit diesen interagierten, eine starke Abnahme der medianen FI für CD11b (12152 ± 11456). Doch auch die Monozyten in Interaktion mit Konidien weisen eine signifikante Abnahme der medianen FI für CD11b gegenüber der Kontrolle auf (anhaftende Konidien: 21320 ± 7123 ; internalisierte Konidien: 23756 ± 7975). Das bedeutet, dass zwar weiterhin alle Monozyten nach der Koinkubation CD11b exprimieren, jedoch in geringerem Maße als Monozyten ohne Kontakt zu *A. fumigatus*-Konidien.

1) Prozentualer Anteil CD11b⁺ Monozyten 2) CD11b auf der Oberfläche von Monozyten

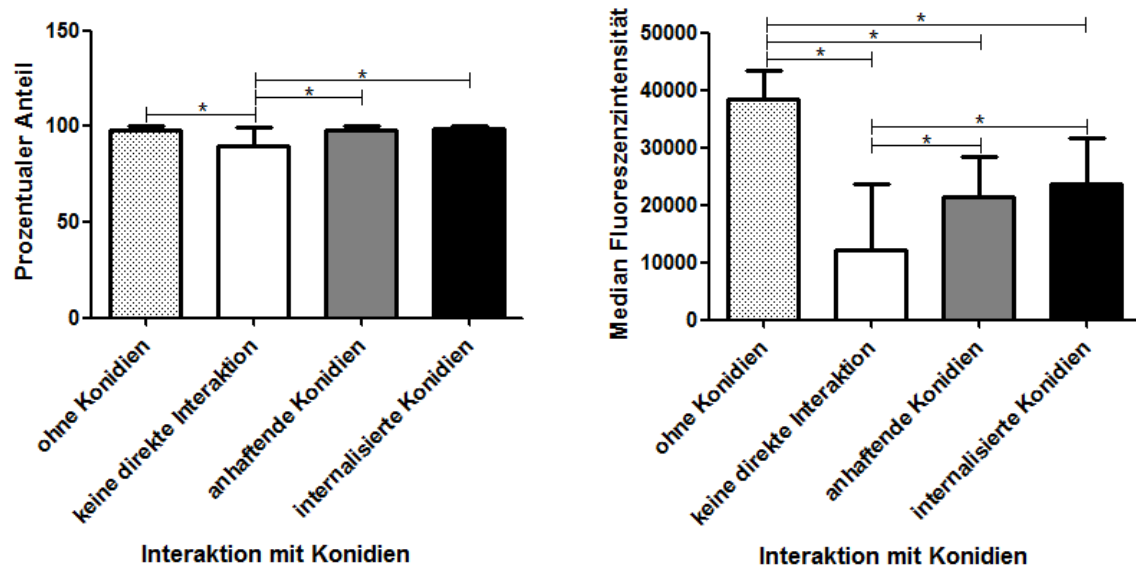


Abb. 6.11.: CD11b-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 2,5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 4 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD11b⁺ Monozyten an den gesamten Monozyten. 2) Median der FI der an CD11b gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

Wie in der Abb. 6.12. ersichtlich, weisen nur 18,2 % ± 14,0 % der Monozyten mit anhaftenden Konidien und 15,8 % ± 13,6 % der Monozyten mit internalisierten Konidien das Antigen CD15 auf ihrer Oberfläche auf. Verglichen mit den Monozyten der Kontrollproben (1,3 % ± 0,6 %) und den Monozyten aus der Koinkubation ohne direkte Interaktion mit Konidien (4,0 % ± 2,7 %) zeigt sich der Anteil CD15-positiver Monozyten unter den direkt mit Konidien interagierenden Monozyten jedoch signifikant erhöht. Selbiges Bild zeigt sich auch beim Vergleich der medianen FI (ohne Konidien: 924 ± 1170; ohne Interaktion: 439 ± 151; anhaftende Konidien: 1899 ± 354; internalisierte Konidien: 1940 ± 369).

1) Prozentualer Anteil CD15⁺ Monozyten 2) CD15 auf der Oberfläche von Monozyten

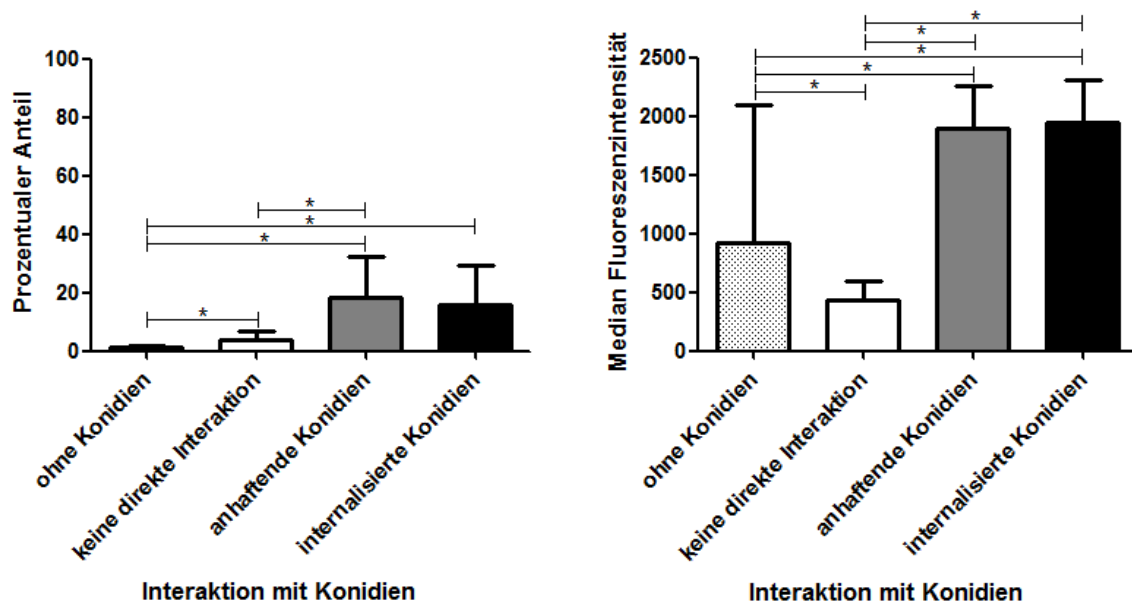


Abb. 6.12.: CD15-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 2,5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 4 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD15⁺ Monozyten an den gesamten Monozyten. 2) Median der FI der an CD15 gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

Wie Abb. 6.13. zu entnehmen ist, steigt bei den Monozyten mit Konidieninteraktion der Anteil der CD62L⁺ Zellen an (anhaftende Konidien: 80,2 % ± 30,7 %; internalisierte Konidien: 79,0 % ± 29,8 %), verglichen mit den Zellen aus den konidienfreien Proben (35,3 % ± 25,2 %) und den Zellen aus den Koinkubationsproben ohne Interaktion mit Konidien (24,0 % ± 21,1 %). Auch der Median der Fluoreszenzaktivität ist für dieses Antigen bei den Monozyten mit Phagozytoseaktivität (anhaftende Konidien: 1668 ± 408; internalisierte Konidien: 1542 ± 285) gegenüber den Monozyten der Kontrollproben (463 ± 359) und den mit Konidien koinkubierten Monozyten ohne Interaktion (215 ± 145) signifikant erhöht. Bei den Monozyten ist also bei der Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien eine Zunahme des Anteils der CD62L⁺ Zellen und insgesamt der CD62L-Antigenexpression zu beobachten.

1) Prozentualer Anteil CD62L⁺ Monozyten 2) CD62L auf der Oberfläche von Monozyten

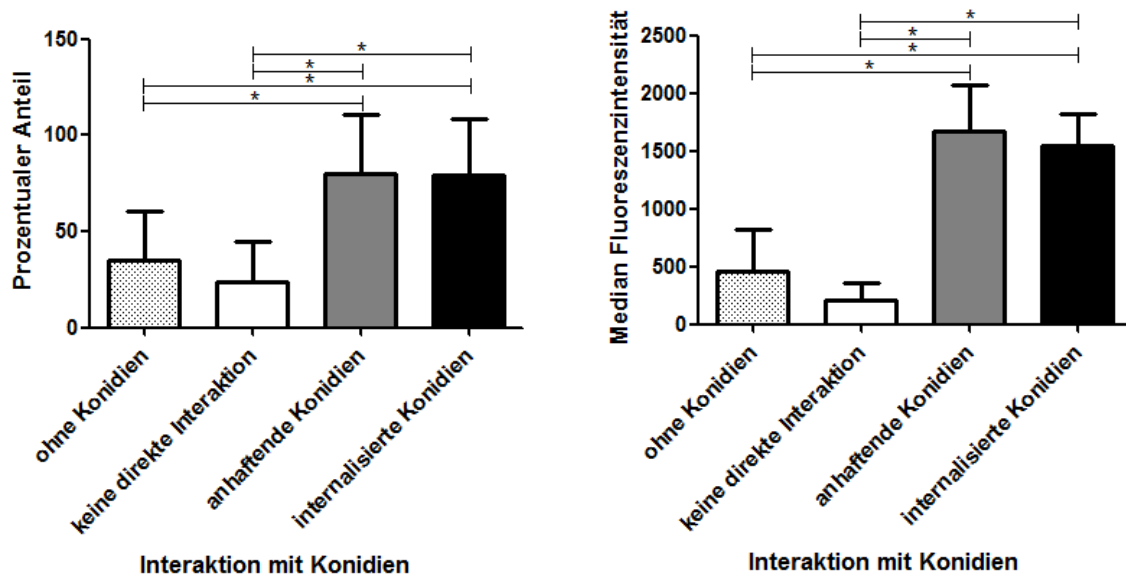


Abb. 6.13.: CD62L-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 2,5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 4 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD62L⁺ Monozyten an den gesamten Monozyten. 2) Median der FI der an CD62L gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

Zwar zeigen die Monozyten mit Phagozytoseaktivität aus den Proben mit Konidien zum Zeitpunkt der maximalen Phagozytoserate einen Anteil an CD33⁺ Zellen (anhaftende Konidien: 83,7 % ± 29,8 %; internalisierte Konidien: 82,7 % ± 30,4 %), der dem Anteil der Monozyten aus der konidienfreien Probe nahezu gleicht (91,0 % ± 22,8 %), jedoch liegt der Anteil der CD33-positiven Monozyten bei den Monozyten ohne direkte Interaktion mit Konidien bei der Koinkubation bei 60,0 % ± 25,2 % und damit deutlich unter den Werten der anderen betrachteten Subgruppen (s. Abb. 6.14.). In der medianen FI weisen die Monozyten mit direkter Zell-Konidien-Interaktion (anhaftende Konidien: 3506 ± 1917; internalisierte Konidien: 3561 ± 2217) einen ähnlichen Wert wie die Monozyten ohne Phagozytoseaktivität auf (3117 ± 3748). Diese Werte liegen signifikant unter der medianen FI für CD33 der Monozyten aus den Kontrollproben (11246 ± 3689).

1) **Prozentualer Anteil CD33⁺ Monozyten** 2) **CD33 auf der Oberfläche von Monozyten**

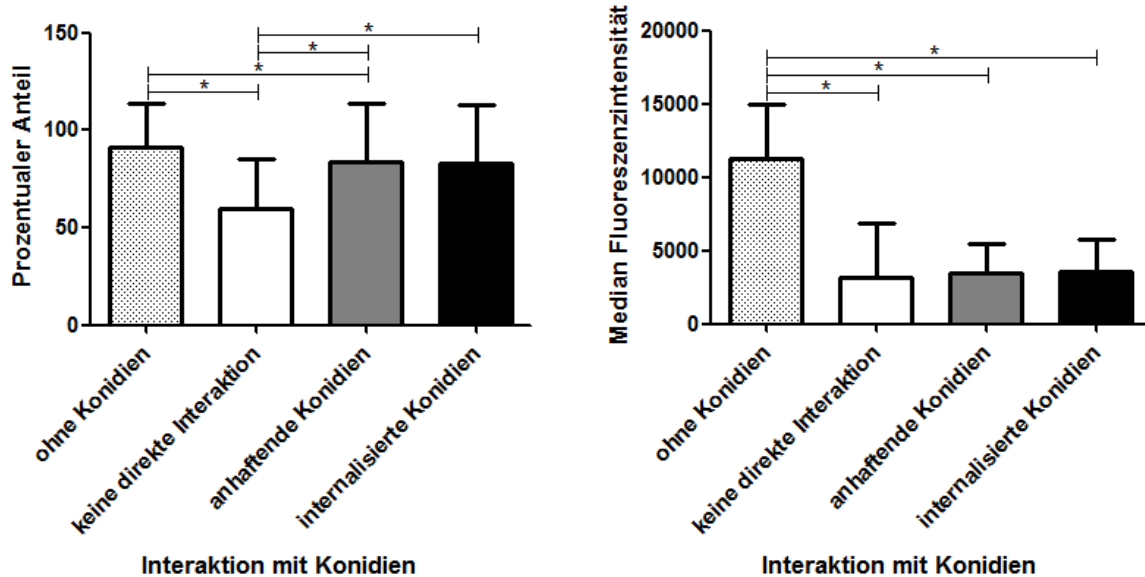


Abb. 6.14.: CD33-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 2,5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 4 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD33⁺ Monozyten an den gesamten Monozyten. 2) Median der FI der an CD33 gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

Auf Abb. 6.15. ist zu sehen, dass der Anteil CD274-tragender Monozyten bei der Koinkubation mit Konidien (keine direkte Interaktion: 49,4 % ± 17,9 %; anhaftende Konidien: 46,1 % ± 18,9 %; internalisierte Konidien: 32,9 % ± 20,1 %), besonders der der Monozyten, die Konidien internalisierten, im Vergleich zu den Monozyten aus den konidienfreien Proben (85,1 % ± 11,4 %) abnimmt. Dasselbe zeigt sich für die CD274-Antigenexpression dieser Monozytengruppen bei der Betrachtung der medianen FI: Bei der Koinkubation mit *A. fumigatus*-Konidien sinkt die mediane FI für CD274 (keine direkte Interaktion: 1191 ± 629; anhaftende Konidien: 939 ± 200; internalisierte Konidien: 730 ± 194) gegenüber der Kontrolle (3285 ± 1103), d. h. die Monozyten aus der Koinkubation mit Konidien tragen weniger CD274 auf ihrer Oberfläche.

1) Prozentualer Anteil CD274⁺ Monozyten 2) CD274 auf der Oberfläche von Monozyten

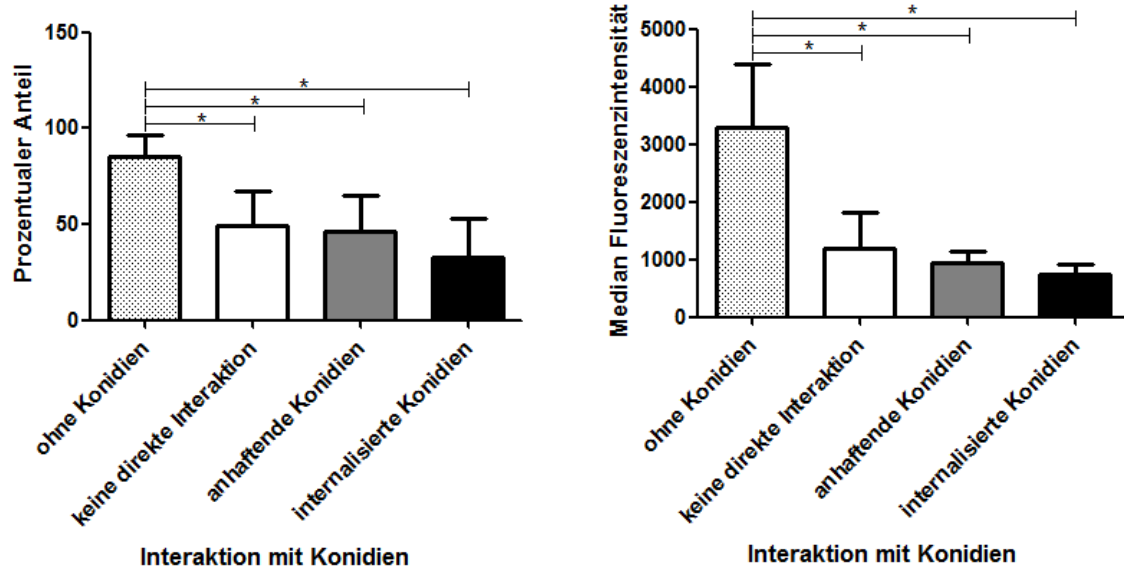


Abb. 6.15.: CD274-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 2,5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 4 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD274⁺ Monozyten an den gesamten Monozyten. 2) Median der FI der an CD274 gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

Abb. 6.16. zeigt die Expression von Dectin-1 auf der Oberfläche der Monozyten. Es ist eine Abnahme der für dieses Antigen positiven Monozyten bei den Monozyten aus der Koinkubation mit *A. fumigatus*-Konidien zu beobachten. Monozyten mit anhaftenden Konidien tragen zu 61,0 % ± 29,9 % Dectin-1 auf ihrer Oberfläche. Von den Monozyten, die Konidien internalisierten, sind 64,9 % ± 32,1 % Dectin-1⁺. Monozyten, die mit Konidien koinkubiert wurden, jedoch keine Interaktion mit diesen zeigten, sind nur zu 23,8 % ± 22,1 % Dectin-1⁺. Im Vergleich hierzu sind in den konidienfreien Kontrollproben mit 81,3 % ± 23,7 % deutlich mehr Dectin-1⁺ Monozyten vorhanden. Auch die mediane FI deutet auf eine starke Reduktion der Dectin-1-Expression der Monozyten bei Kontakt mit *A. fumigatus*-Konidien hin (ohne direkte Interaktion: 262 ± 271; Monozyten mit anhaftenden Konidien: 909 ± 319; Monozyten mit internalisierten Konidien: 972 ± 318). Im Vergleich dazu ist die mediane FI bei

Monozyten aus konidienfreien Proben nach 4 h Inkubation signifikant höher

1) Prozentualer Anteil Dectin-1⁺ Monozyten 2) Dectin-1 auf der Oberfläche von Monozyten

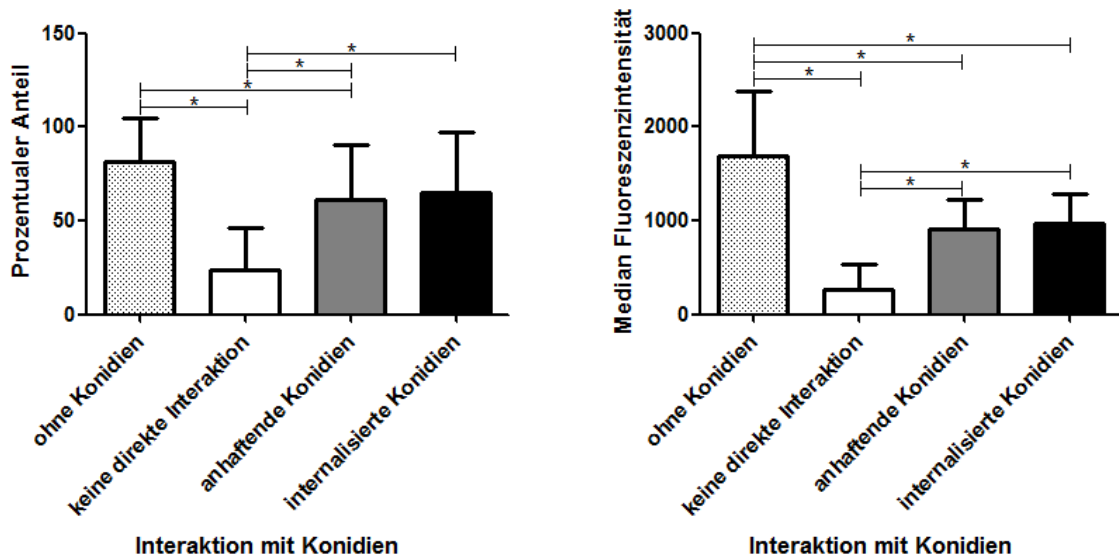


Abb. 6.16.: Dectin-1-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 2,5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 4 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der Dectin-1⁺ Monozyten an den gesamten Monozyten. 2) Median der FI der an Dectin-1 gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 % (1687 ± 700).

Nahezu alle Monozyten tragen HLA-DR auf ihrer Oberfläche. Jedoch zeigt sich bei den Monozyten, welche mit Konidien koinkubiert wurden, die jedoch keine direkte Interaktion mit diesen ausübten, ein signifikant geringerer Anteil an HLA-DR⁺ Zellen (75,7 % ± 20,3 %) verglichen mit den Monozyten aus den Proben, die 4 h konidienfrei inkubiert wurden (95,8 % ± 4,5 %).

Bei der medianen FI zeigen jedoch alle Monozyten aus der Koinkubation mit Konidien eine reduzierte HLA-DR-Expression (ohne Interaktion: 7483 ± 4232; mit anhaftenden Konidien: 11719 ± 7054; mit internalisierten Konidien: 7919 ± 3546) verglichen mit den Monozyten der Kontrollproben (20967 ± 8692). Eine Darstellung von prozentualem Anteil HLA-DR⁺ Monozyten und der medianen FI nach Koinkubation erfolgte in Abb. 6.17.

Bei einer Koinkubation mit *A. fumigatus*-Konidien kommt es also zu einer verminderten Expression von HLA-DR auf der Oberfläche von Monozyten.

1) Prozentualer Anteil HLA-DR⁺ Monozyten 2) HLA-DR auf der Oberfläche von Monozyten

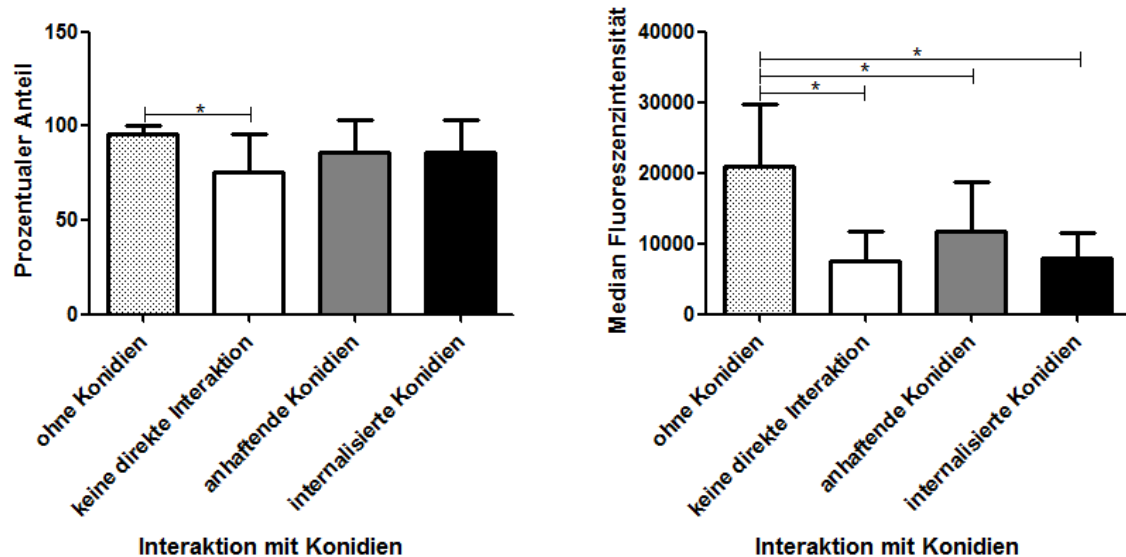


Abb. 6.17.: HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 2,5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 4 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der HLA-DR⁺ Monozyten an den gesamten Monozyten. 2) Median der FI der an HLA-DR gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

6.3. Einfluss einer Fixation der Konidien auf die Phagozytoserate

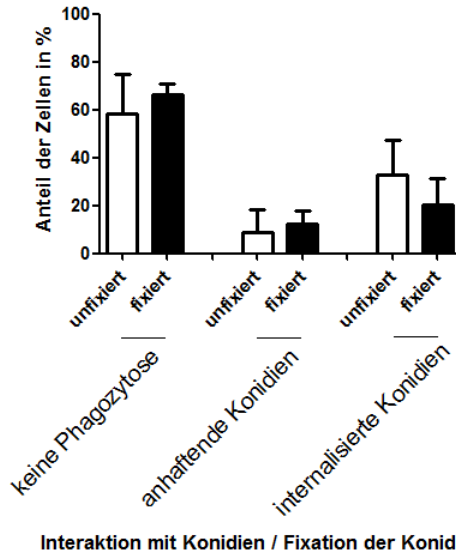
In der Literatur finden sich häufig Experimente mit *A. fumigatus*-Konidien, welche zuvor mittels verschiedener Lösungen fixiert worden sind (Hellmann, 2017). Es stellt sich dabei die Frage, inwieweit *in vitro*-Experimente mit fixierten Konidien die *in vivo*-Situation mit unfixierten Konidien nachstellen können. Im Vorfeld dieser Experimente wurden einige Versuche mit fixierten und unfixierten Konidien vorgenommen, um herauszufinden, ob die Fixation der Konidien einen Einfluss auf die Phagozytose selbiger durch Leukozyten ausübt. Beide Konidienchargen wurden zunächst 2,5 h geschwollen und eine anschließend fixiert (siehe Kap. 5.2.2.). Zur Auswertung der Phagozytoserate wurde analog zu den Ergebnissen von Kap. 6.2 vorgegangen.

Wie auf Abb. 6.18. zu sehen, sind nach einer Koinkubationszeit von 2 h Unterschiede in der Interaktion der Leukozyten mit den fixierten Konidien im Vergleich zu unfixierten Konidien zu bemerken: Betrachtet man die Gesamtheit der Leukozyten (1) ist zu sehen, dass die direkte Interaktion mit Konidien eher ausbleibt, sind Letztere vorher fixiert worden ($58,1 \% \pm 16,9 \%$ bei Leukozyten ohne direkte Interaktion mit unfixierten Konidien vs. $66,3 \% \pm 4,3 \%$ bei Leukozyten ohne direkte Interaktion mit zuvor fixierten Konidien). Weiterhin ist vor allem der Anteil der Leukozyten, welche Konidien nach 2 h internalisiert haben, vermindert, wenn die Konidien fixiert worden sind (unfixierte Konidien: $32,8 \% \pm 14,5 \%$; fixierte Konidien: $20,5 \% \pm 10,6 \%$). Betrachtet man die einzelnen Leukozytensubpopulationen hinsichtlich ihrer Phagozytoseaktivität, zeigt sich weitestgehend das gleiche Bild. Die neutrophilen Granulozyten interagieren seltener mit fixierten Konidien (ohne direkte Interaktion $63,4\% \pm 23,3\%$) als unfixierten Konidien (ohne direkte Interaktion $44,9 \% \pm 26,2 \%$). Wie bei den Leukozyten im Allgemeinen kommt es auch bei den neutrophilen Granulozyten bei der Koinkubation mit fixierten Konidien bei einem niedrigeren Anteil zur Internalisierung ($27,8 \% \pm 21,9 \%$), verglichen mit den neutrophilen Granulozyten mit unfixierten Konidien ($47,1 \% \pm 25,1 \%$).

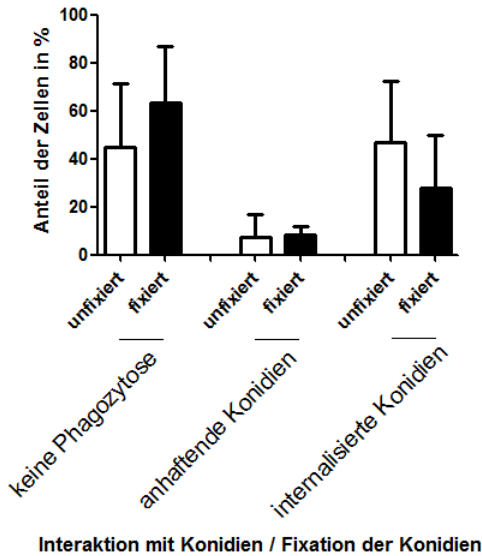
Bei den Monozyten zeigt sich, dass sie geringfügig weniger Zellen ohne direkte Interaktion nach der Koinkubation mit fixierten Konidien ($18,2 \% \pm 29,0 \%$) als Monozyten mit unfixierten Konidien ($25,2 \% \pm 27,1 \%$) aufweisen. Jedoch haben Monozyten, welche mit zuvor fixierten Konidien koinkubiert wurden, einen höheren Anteil an an ihrer Oberfläche haftenden Konidien ($43,6 \% \pm 31,6 \%$) als die Monozyten mit unfixierten Konidien ($23,5 \% \pm 21,3 \%$). Dementsprechend ist der Anteil internalisierender Zellen bei den Monozyten in Koinkubation mit fixierten Konidien wie auch bei den Leukozyten und den neutrophilen Granulozyten gegenüber der Koinkubation mit unfixierten Konidien erniedrigt (fixierte Konidien: $36,1 \% \pm 28,5 \%$; unfixierte Konidien: $50,7 \% \pm 24,5 \%$).

Somit wird gerechtfertigt, die *A. fumigatus*-Konidien vor der Koinkubation mit humanen Leukozyten in den Experimenten zur Phagozytose und Antigenexpression nicht zu fixieren, um bei der Betrachtung Phagozytoseaktivität der Leukozyten einer *in vivo*-Situation möglichst nahe zu kommen.

1) **Phagozytose fixierter und unfixierter Konidien durch Leukozyten nach 2 h Koinkubation**



2) **Phagozytose fixierter und unfixierter Konidien durch neutrophile Granulozyten nach 2 h Koinkubation**



3) **Phagozytose fixierter und unfixierter Konidien durch Monozyten nach 2 h Koinkubation**

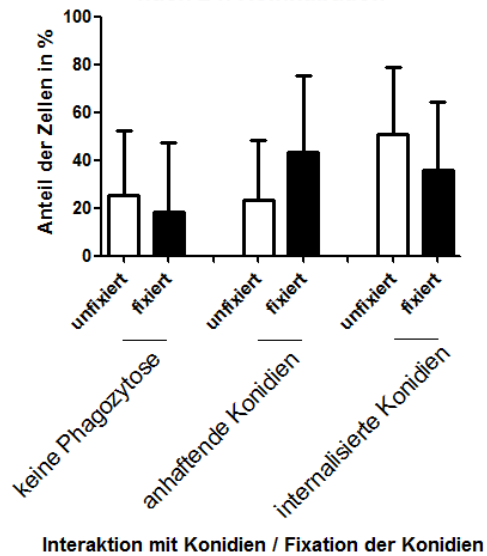


Abb. 6.18.: Einfluss der Fixation der *A. fumigatus*-Konidien auf die Interaktion Leukozyt – Konidie.

Darstellung der Interaktion nach einer Koinkubation über 2 h mit 2,5 h geschwollenen Konidien bei 1) Leukozyten, 2) neutrophilen Granulozyten und 3) Monozyten. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung. n = 4.

6.4. Einfluss von Fluoreszeinisothiocyanat auf die Antigenexpression von Leukozyten

Um zu überprüfen, ob der Fluoreszenzfarbstoff FITC einen Einfluss auf die Expression der in der Hauptversuchsreihe beobachteten leukozytären Antigene ausübt, wurden in drei Experimenten Leukozyten mit FITC-markierten und unmarkierten *A. fumigatus*-Konidien koinkubiert. Anschließend wurde die mediane FI der angefärbten Oberflächenmarker CD11b, CD15, CD33, CD62L, CD274, Dectin-1 und HLA-DR auf der Oberfläche der in den Proben enthaltenen neutrophilen Granulozyten und Monozyten – je zum Zeitpunkt der max. Internalisierungsrate – bestimmt.

Wie auf den Graphiken in Abb. 6.19. zu sehen, ist einzig bei Monozyten hinsichtlich CD62L und Dectin-1 eine starke Erhöhung der medianen FI bei der Markierung der Konidien mit FITC zu verzeichnen (CD62L mit FITC-Konidien: $1651,5 \pm 606,0$ vs. CD62L mit unmarkierten Konidien: $449,0 \pm 122,3$; Dectin-1 mit FITC-Konidien: $764,0 \pm 188,9$ vs. Dectin-1 mit unmarkierten Konidien: $154,6 \pm 116,0$). Beide Antigene wurden mit Hilfe eines PE-gekoppelten AK markiert.

1) Einfluss von FITC auf die Antigenexpression neutrophiler Granulozyten 2) Einfluss von FITC auf die Antigenexpression von Monozyten

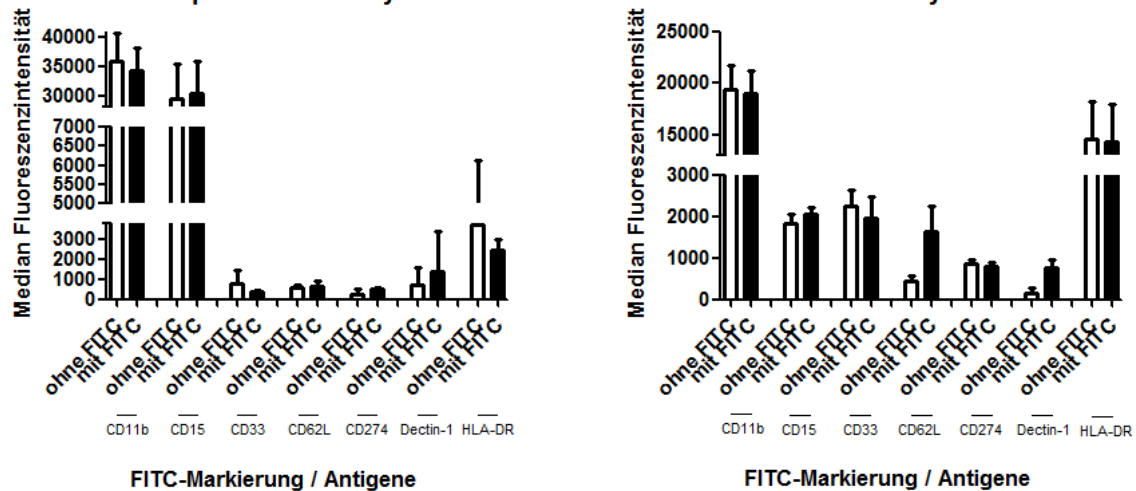


Abb. 6.19.: Einfluss von FITC als Markierung der Konidien auf die Antigenexpression der koinkubierten Leukozyten.

Einfluss der FITC-Färbung auf die vermessene Antigenexpression von 1) neutrophilen Granulozyten und 2) Monozyten. Es wurden separat Leukozyten mit unmarkierten oder FITC-markierten *A. fumigatus*-Konidien koinkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. Der Median der FI zu einzelnen Antigenen zum Zeitpunkt der maximalen Internalisierungsrate (bei 1) nach 2 h Koinkubation mit 5 h geschwollenen Konidien; bei 2) nach 4 h Koinkubation mit 2,5 h geschwollenen Konidien) wurde ermittelt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung. n = 3.

6.5. Interleukin-1 β -Ausschüttung durch Leukozyten bei Inkubation mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien

In den bei fünf Experimenten aufbewahrten Überständen nach der Koinkubation von Leukozyten und *A. fumigatus*-Konidien wurde mit Hilfe eines ELISA die IL-1 β -Konzentration bestimmt. Die Leukozyten wurden über drei verschiedene Zeiten (30 min; 2 h und 4 h) mit unterschiedlich lang geschwollenen (ruhend; 2,5 h; 5 h) *A. fumigatus*-Konidien koinkubiert.

Wie in Abb. 6.20. dargestellt, zeigt sich ein Anstieg der IL-1 β -Konzentration nur nach einer Koinkubation mit Konidien, die zuvor 5 h in Nährmedium geschwollen wurden. Dieser Anstieg ist erst nach einer Koinkubationszeit von 2 h zu verzeichnen (2,3 pg/ml \pm 1,6 pg/ml). Nach 4 h Koinkubation mit 5 h geschwollenen Konidien ist dieser Anstieg deutlich (19,8 pg/ml \pm 12,3 pg/ml). Die Konzentrationen in den

Überständen der Koinkubation über einen kürzeren Zeitraum und/oder mit über kürzerer Zeit geschwollenen Konidien liegt mit < 2 pg/ml unter der Sensitivitätsgrenze des verwendeten ELISA. Daher sind diese Zeitpunkte trotz kleinerer detektierter Konzentrationen an IL-1 β als solche ohne IL-1 β -Ausschüttung anzusehen.

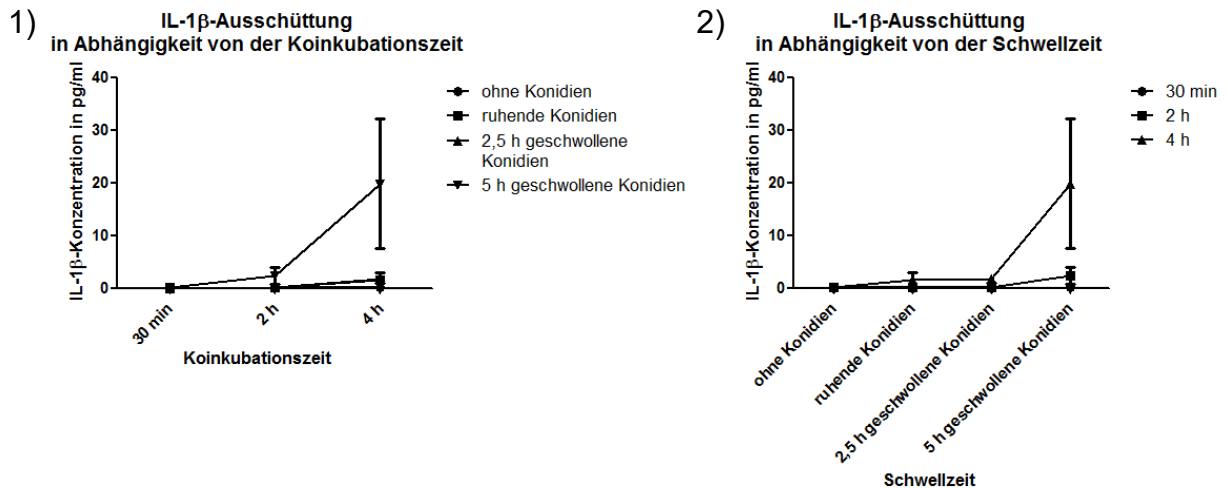


Abb. 6.20.: Abhängigkeit der IL-1 β -Ausschüttung von Koinkubations- und Schwellzeit.

Darstellung der IL-1 β -Konzentration in Abhängigkeit von 1) Koinkubations- und 2) Schwellzeit. Es wurden Leukozyten über drei Zeiten (30 min; 2 h; 4 h) mit Konidien inkubiert, welche ungeschwollen (ruhend) bzw. über verschiedene Zeiten (2,5 h; 5 h) geschwollen worden waren. Im Überstand der Koinkubation wurde die Konzentration von IL-1 β mittels ELISA in Doppelbestimmung detektiert. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung. $n = 5$.

7. Diskussion

7.1. Phagozytose-Assay

Die vorliegende Arbeit dient der Etablierung einer Methode zur schnellen Quantifizierung der Phagozytose von Konidien durch Leukozyten. Nach der Koinkubation von teilweise vorgeschwollenen FITC-markierten *A. fumigatus*-Konidien mit humanen Leukozyten und anschließender Antikörperfärbung wurden je Probe $50 - 100 \cdot 10^3$ Zellen durchflusszytometrisch vermessen. Hierbei zeigt sich ein Vorteil gegenüber der häufig angewandten Methode der Immunfluoreszenzmikroskopie, bei der für gewöhnlich nur einige hundert Zellen zur statistischen Auswertung ausgezählt werden (Ikeda-Dantsuji et al. 2015, Volling et al. 2011): Durch die Auswertung einer wesentlich größeren Anzahl an Zellen lassen sich statistisch genauere, verlässlichere Aussagen treffen. Des Weiteren stellt die durchflusszytometrische Vermessung gegenüber der mikroskopischen Auswertung einer Probe eine große Zeitersparnis dar. Einzig die Färbung schließt sich noch an die Koinkubation an, bevor die Probe vermessen werden kann. Die Probe muss nicht zusätzlich fixiert werden, wenn sie sofort analysiert wird, und die eigentliche Vermessung erfolgt maschinell, was eine unvoreingenommene Analyse ermöglicht. Außerdem können verschiedene Zellen (hier sowohl neutrophile Granulozyten als auch Monozyten) in der gleichen Probe analysiert werden, ohne dass eine Isolation einzelner Populationen vor der Inkubation nötig wäre. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können zusätzlich Antigene auf der Zelloberfläche der Phagozyten vermessen werden und so Aussagen über ein verändertes Expressionsverhalten der Zelle im Zuge der Koinkubation mit dem Pathogen und dessen Phagozytose getroffen werden. Durch die angewandte Technik der Färbung mit FITC und Gegenfärbung mit anti-FITC-APC kann ebenso wie beim Quenching mit z. B. Trypanblau die Phagozytose untersucht werden. Eine Gegenfärbung von FITC-gefärbten Konidien mit Calcofluor White (CFW) ist in der mikroskopischen Analyse der Phagozytose verbreitet, jedoch auf Organismen mit einer chitinhaltigen Zellwand begrenzt. Hierin ist ein weiterer Vorteil der Gegenfärbung mit Anti-FITC-APC zu sehen. Es bleibt ein weites Farbspektrum zur durchflusszytometrischen Untersuchung weiterer Antigene verfügbar, welches, wie im Falle der CFW-Gegenfärbung zwischen 300 nm und 440 nm eingeschränkt werden würde.

In den bisher publizierten durchflusszytometriebasierten Phagozytoseassays, die sich FITC-gefärbter Konidien bedienen, wurde das FITC-Signal nicht-internalisierter Konidien auch durch das Resonanzenergietransferphänomen mit Hilfe von Farbstoffen wie Ethidiumbromid unterdrückt (Fattorossi et al. 1989). Durch Methode der Gegenfärbung FITC-markierter adhärenter Konidien mittels eines APC-gekoppelten AK (Anti-FITC-APC) kann durch Auftragung der FI von FITC gegen die von APC leicht zwischen Leukozyten mit internalisierten, Leukozyten mit adhären Konidien und Leukozyten ohne direkte Interaktion mit Konidien unterschieden werden (s. Kap. 5.2.7.). Zusätzlich können im gleichen Färbeschritt mit Anti-FITC-APC weitere fluoreszenzfarbstoffgekoppelte AK eingesetzt werden, um die in der Durchflusszytometrie identifizierten phagozytierenden Leukozyten weiter anhand ihrer Oberflächenantigenexpression charakterisieren zu können.

Ein Nachteil gegenüber der Mikroskopie besteht darin, dass durch die in dieser Arbeit angewandte Methode keine Unterscheidung zwischen Leukozyten mit internalisierten und adhären Konidien und Leukozyten ohne internalisierte, aber mit adhären Konidien getroffen werden kann (siehe Kap. 5.2.7. und Abb. 5.4.). Durch die mikroskopische Betrachtung der Zellen hätte hier unterschieden werden können (Ikeda-Dantsuji et al. 2015). Eine 2017 erschienene Publikation von Fei et al. bedient sich einer Kombination der Methoden der Durchflusszytometrie und der Konfokalmikroskopie – der Imaging Flow Cytometry. Hierbei wurden Leukozyten mit gefärbten Beads inkubiert, die oberflächengebundenen Beads anschließend nach demselben Prinzip wie in der vorliegenden Arbeit gegengefärbt und die Leukozyten anschließend durchflusszytometrisch vermessen. Anschließend wurden die Zellen noch der Konfokalmikroskopie zugeführt. Durch eine 3D-Rekonstruktion der Zellen konnte genau bestimmt werden, welche Zellen 1) Beads ausschließlich internalisiert haben, 2) nur oberflächenanhaftende Beads aufweisen oder 3) sowohl Beads internalisiert als auch Beads an ihrer Oberfläche anhaftend haben (Fei et al. 2017). Diese Methode könnte auch zur weiterführenden Untersuchung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien durch humane neutrophile Granulozyten und Monozyten angewendet werden.

In Tab. 7.1. sind diverse Publikationen zur Untersuchung und Quantifizierung der Phagozytose dargestellt, um die Vorgehensweisen mit der vorliegenden Arbeit unter mehreren Gesichtspunkten in einer Übersicht vergleichen zu können. Am Ende der Tabelle ist die Publikation mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aufgeführt.

Tab. 7.1.: Übersicht über Publikationen zu Phagozytoseassays.

Quelle	Methode	Ausgewertete Events	Phagozyten	Pathogene	Färbung
(Busetto et al. 2004)	Durchflusszytometrie	k. A.	Granulozyten	<i>C. albicans</i>	5(6)-Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester (5(6)-FAM-SE), Quenching durch Trypanblau
(Cinco et al. 1994)	Durchflusszytometrie	10 ⁴	Granulozyten, Monozyten	<i>Borrelia burgdorferi</i>	FITC, Quenching durch Crystal Violet
(Fattorossi et al. 1989)	Durchflusszytometrie	2 * 10 ³	Granulozyten	<i>C. albicans</i>	FITC, Quenching durch Ethidiumbromid
(Giaimis et al. 1994)	Durchflusszytometrie	k. A.	Makrophagen	<i>Sacch. cerevesiae</i>	FITC, teilweise Quenching mit Gerbsäure
(Madan et al. 1997)	Durchflusszytometrie	k. A.	Humane neutrophile Granulozyten, Alveolar-makrophagen	<i>A. fumigatus</i>	FITC, Quenching durch Ethidiumbromid
(Nuutila und Lilius 2005)	Durchflusszytometrie	5 * 10 ³	Granulozyten	Zymosan	FITC, Quenching durch Trypanblau
(Perticarari et al. 1991)	Durchflusszytometrie	10 ⁴	Granulozyten	Staph. aureus	FITC, Quenching mit Crystal Violet, Granulozyten mit Hydroethidin

Fortsetzung Tab. 7.1.: Übersicht über Publikationen zu Phagozytoseassays.

Quelle	Methode	Ausgewertete Events	Phagozyten	Pathogene	Färbung
(Prodan et al. 1995)	Durchflusszytometrie	10 ⁴	Granulozyten, Monozyten	<i>Staph. aureus</i>	FITC
(Saresella et al. 1997)	Durchflusszytometrie	10 ⁴	Granulozyten	<i>C. albicans</i>	FITC, Quenching durch Ethidiumbromid
(Ibrahim-Granet et al. 2003)	Immunfluoreszenz-mikroskopie	100	humane Alveolar-makrophagen, murine Alveolar-makrophagen	<i>A. fumigatus</i>	FITC, sekundärer AK mit Texas Red
(Ikeda-Dantsuji et al. 2015)	Immunfluoreszenz-mikroskopie	600	murine Makrophagen	<i>Cr. neoformans</i> , <i>Cr. gattii</i>	CFW
(Luther et al. 2007)	Immunfluoreszenz-mikroskopie	k. A.	murine Alveolar-, Peritoneal-makrophagen, humane embryonische Nierenzellen	<i>A. fumigatus</i> <i>WT, pksP-Mutante</i>	CFW, nicht-internalisierte Konidien mit Cy3-gekoppeltem Streptavidin

Fortsetzung Tab. 7.1.: Übersicht über Publikationen zu Phagozytoseassays.

Quelle	Methode	Ausgewertete Events	Phagozyten	Pathogene	Färbung
(Philippe et al. 2003)	Immunfluoreszenz-mikroskopie	k. A.	murine Alveolar-makrophagen	<i>A. fumigatus</i>	FITC, nicht-internalisierte Konidien mit Texas Red
(Slesiona et al. 2012)	Immunfluoreszenz-mikroskopie	10 ³	murine Alveolar-makrophagen, Peritoneal-makrophagen, aus Knochenmarks-zellen differenzierte Makrophagen, humane Monozyten	<i>A. terreus</i> , <i>A. fumigatus</i>	FITC, nicht internalisierte Konidien mit Texas Red
(Volling et al. 2011)	Immunfluoreszenz-mikroskopie	800	Markophagen	<i>A. fumigatus</i> <i>WT, pksP-</i> <i>Mutante</i>	FITC, nicht internalisierte Konidien mit CFW

Fortsetzung Tab. 7.1.: Übersicht über Publikationen zu Phagozytoseassays.

Quelle	Methode	Ausgewertete Events	Phagozyten	Pathogene	Färbung
(Wasylnka und Moore 2003)	Immunfluoreszenz-mikroskopie	200	humane Pneumozyten Typ II, murine Makrophagen	<i>A. fumigatus</i>	Autofluoreszenz mit GFP durch Transfektion, extrazelluläre Konidien mit <i>A. fumigatus</i> -spezifischem AK und sekundärem Alexa 647-markierten AK, Zellen mit AK gegen Cathepsin D, CD71, Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1 (LAMP-1), CD63
(da Silva Domingues et al. 2013)	Phasenkontrast-mikroskopie und Konfokallaser-mikroskopie	k. A.	murine Makrophagen, humane Monozyten, Promyelozyten	<i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. aureus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC12600 Autofluoreszenz mit GFP durch Transfektion, phagozytäres Aktin mit Tetramethylrhodamin-isothiocyanatphalloidin
(Hartung et al. 2019)	Durchflusszytometrie	50 - 100 * 10 ³	humane neutrophile Granulozyten und Monozyten	<i>A. fumigatus</i> CEA10 (WT)	FITC, Anti-FITC-APC, AK gegen CD11b, CD14, CD15, CD33, CD45, CD66b, CD274, Dectin-1, HLA-DR

7.2. Spektrale Überlappung von FITC und PE

Wie unter Kap. 6.4. beschrieben, zeigt sich bei der Färbung der Konidien mit FITC ein größerer medianer FI der PE-gekoppelten AK gegen CD62L und Dectin-1 verglichen mit ungefärbten Konidien. Dadurch stellt sich die Frage, ob die Färbung mit FITC selbst zu einer höheren Antigenpräsentation von CD62L und Dectin-1 auf den koinkubierten Zellen führt, oder ob durch die Fluoreszenz von FITC emittiertes Licht im Kanal für PE mit vermessen und maschinell als PE-Signal missverstanden wird (spill-over Effekt). FITC emittiert am stärksten Licht der Wellenlänge 515 nm –530 nm, während PE am stärksten bei 575 nm Licht emittiert. Jedoch sendet auch FITC im Frequenzspektrum um 575 nm Licht aus, welches dann im PE-Kanal registriert und als PE-Signal fehlgedeutet wird (siehe Abb. 7.1.) (Roederer 2002). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die FITC⁺ Phagozyten (mit internalisierten und/oder adhärennten Konidien) auch ein leichtes Signal im PE-Kanal erzeugen, ohne selbst ein Antigen zu präsentieren, das mit einem PE-gekoppelten AK markiert wurde.

Folglich verwendet man bei der durchflusszytometrischen Vermessung mehrerer fluoreszenzfarbstoffmarkierter AK innerhalb derselben Probe sogenannte Kompensationen. Hierbei wird das „falsche“, durch die Fluoreszenz von FITC erzeugte Signal aus dem PE-Signal herausgerechnet. Jedoch sind einer solchen Kompensation Grenzen gesetzt: Dectin-1 ist auf der Oberfläche von humanen Leukozyten nur schwach exprimiert. Mit steigender Inkubationszeit nimmt die Expression weiter ab. Außerdem phagozytieren die Leukozyten nach einer langen Koinkubationszeit eine bis mehrere FITC-markierte Konidien. Folglich wird ein sehr schwaches anti-Dectin-1-PE-Signal von einem sehr starken FITC-Signal überlagert, welches nicht mehr kompensiert werden kann. CD62L ist ein wesentlich stärker exprimiertes leukozytäres Antigen, weshalb der Einfluss von FITC-Fluoreszenzlicht geringer auf die Detektion der PE-Fluoreszenz ist als bei Dectin-1.

Ein Lösungsansatz ist die Umstellung des Färbepanels unter Verwendung anderer heller Fluoreszenzfarbstoffe zur Färbung von Dectin-1 und CD62L, die nicht durch FITC überlagert werden.

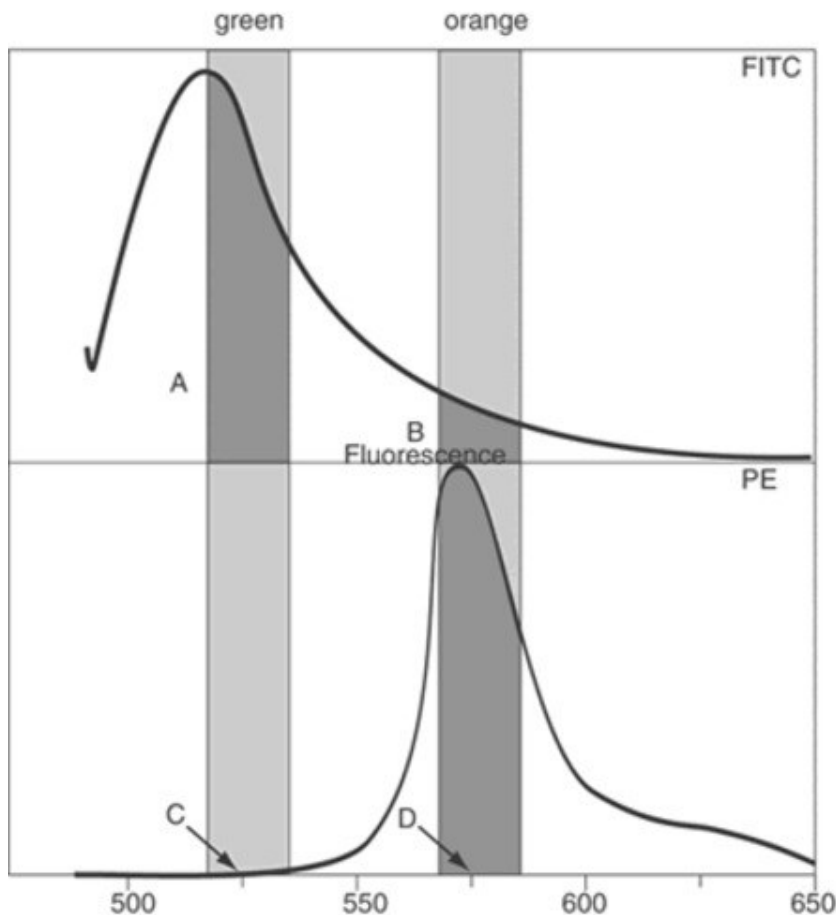


Abb. 7.1.: Grafische Darstellung der Frequenzspektren der Fluoreszenzfarbstoffe FITC und PE. (Roederer 2002)

Deutlich sichtbar ist, dass FITC auch im Kanal von PE Licht emittiert.

7.3. Diskussion ausgewählter immunologischer Beobachtungen

7.3.1. Veränderung der Expression von CD11b und CD62L auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten

Wie im Ergebnisteil (Kap. 6.2.2. und Kap. 6.2.4.) beschrieben, sind nahezu alle untersuchten Leukozyten CD11b⁺. Jedoch exprimieren Leukozyten in Interaktion mit Konidien mehr CD11b (höhere mediane FI) als Leukozyten, die mit Konidien koinkubiert wurden, aber nicht in direkte Interaktion mit diesen getreten sind. Allerdings ist die CD11b-Expression gegenüber der konidienlosen Kontrollprobe in jeder der betrachteten Leukozytenpopulationen mit Konidien vermindert.

Das Oberflächenmolekül CD11b, welches mit CD18 einen Komplex bildet, ist für die Adhäsion und Migration von Immunzellen verantwortlich (Zen et al. 2011).

Auch das Antigen CD62L aus der Gruppe der Selektine ist für die granulozytäre Migration ein entscheidendes Antigen (Bruehl et al. 1997). Bei der Aktivierung des neutrophilen Granulozyten wird die oberflächliche CD62L-Dichte durch Spaltung des Antigens unter Abspaltung von löslichem CD62L reduziert (Hafezi-Moghadam und Ley 1999). Mastej und Adamiec beschreiben dieselbe Veränderung der Antigenexpression bei Patienten mit diabetischer Mikroangiopathie. Dies wird als Aktivierung des neutrophilen Granulozyten gedeutet. Eine Erhöhung von CD11b fördert die Adhäsion des neutrophilen Granulozyten an die Endotheloberfläche und damit die Migration zum Ort der Infektion (Mastej und Adamiec 2008). CD11b befindet sich in sekundären und tertiären Granula. Eine Erhöhung der CD11b-Expression auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten ist dementsprechend ein Zeichen von Degranulation (Imbert et al. 2016). Ein weiterer Effekt von CD11b (im Komplex mit CD18) ist die Interaktion mit dem Dendritic Cell-specific Intracellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-Integrin (DC-SIGN) auf der Oberfläche der DC, wodurch es zur Ausreifung der DC kommt und das adaptive Immunsystem zur Infektionsbekämpfung hinzugezogen wird (van Gisbergen et al. 2005).

Die Änderung der CD11b- und CD62L-Antigenexpression in der beobachteten Weise ist folglich Ausdruck der Aktivierung des neutrophilen Granulozyten durch die Interaktion mit *A. fumigatus*-Konidien. Die gleiche Veränderung der Antigenexpression auf neutrophilen Granulozyten wurde auch bei Patienten mit schwerem Asthma bronchiale beobachtet und als Aktivierung der Granulozyten gewertet (Mann und Chung 2006).

7.3.2. Bedeutung von Dectin-1 für die angeborene Immunantwort des Menschen auf *Aspergillus fumigatus*

Wie in den Kap. 3.2.2 – 3.2.4. bereits beschrieben, kommt Dectin-1 als PRR auf der Oberfläche vieler Leukozyten vor. Obwohl Dectin-1 in seiner Bedeutung als β -Glucan-Rezeptor in der Immunabwehr der Maus bereits tiefgehend erforscht und charakterisiert werden konnte, ist weiterhin unklar, wie groß die Rolle dieses Antigens für die menschliche Abwehr gegen pathogene Pilze ist. Für humane Makrophagen konnte er als wichtigster Rezeptor in der Erkennung von β -Glucanen identifiziert werden (Brown et al. 2002, Willment et al. 2005). Hingegen konnte bei humanen neutrophilen Granulozyten beobachtet werden, dass Dectin-1 nicht an der

Phagozytose von *Sacch. cerevesiae* bzw. von β -glucanhaltigem Zymosan beteiligt ist, sondern CR3, welcher sich aus CD11b und CD18 zusammensetzt, die tragende Rolle spielt (van Bruggen et al. 2009).

Die in dieser Arbeit erfolgte Vermessung der Dectin-1-Expression auf neutrophilen Granulozyten zeigte nur geringe Unterschiede der Expression der mit Konidien inkubierten neutrophilen Granulozyten gegenüber der Kontrollprobe. Insgesamt weisen die Proben eine große interindividuelle Schwankungsbreite auf, was sich in großen Standardabweichungen widerspiegelt. Der prozentuale Anteil Dectin-1⁺ neutrophiler Granulozyten liegt sowohl bei den Kontrollen als auch bei neutrophilen Granulozyten in Interaktion mit Konidien unter 40 %. Des Weiteren stellte sich die Vermessung von Dectin-1 in dieser Arbeit auf Grund der Färbung mit PE und der Überlagerung mit dem FITC-Signal der Konidien schwierig dar. Daher findet sich die Analyse der Dectin-1-Expression der neutrophilen Granulozyten im Anhang und nicht im Hauptteil der Arbeit.

In Anbetracht der schwachen Expression von Dectin-1 stellt sich dadurch die Frage nach der Bedeutung dieses Antigens für die Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien durch neutrophile Granulozyten und deren Aktivierung. Hingegen kann auf den neutrophilen Granulozyten in dieser Arbeit ein Anstieg des durch van Bruggen für die Phagozytose β -glucanhaltiger verantwortlich gemachten Antigens CD11b beobachtet werden. Dies führt zu der Annahme, dass CD11b auch in der Immunantwort gegen *A. fumigatus* eine tragende Rolle spielen könnte.

Bei den Monozyten und Makrophagen ist der Kenntnisstand bezüglich der Rolle von Dectin-1 klarer: Willment et al. zeigten, dass nicht nur auf murinen, sondern auch auf humanen Makrophagen Dectin-1 der wichtigste Rezeptor zur Erkennung von β -Glucanen ist (Willment et al. 2005). Weiterhin beobachteten sie, dass anders als bei Mausmakrophagen keine Hochregulation der Dectin-1-Expression auf der Oberfläche rekrutierter humaner Makrophagen stattfindet. Es wurde beschrieben, dass die Dectin-1-Expression annähernd gleich bleibt. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch auf der Oberfläche humaner Monozyten in Interaktion mit *A. fumigatus*-Konidien eine verminderte Expression von Dectin-1 festgestellt, wenngleich diese höher ist als auf der Oberfläche von koinkubierten Monozyten, welche nicht in direkte Interaktion mit den Konidien traten. Wie bereits in Kap. 7.2. erwähnt, sollte eine erneute Vermessung der Dectin-1-Expression mit einem an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten AK durchgeführt werden, um die hier beschriebenen Messungen zu

verifizieren. Weiterhin könnte untersucht werden, ob die Dectin-1-Expression dieser Monozyten von ihrem Phänotyp (CD14⁺⁺CD16⁻ als „klassischer“ Phänotyp vs. CD14⁺CD16⁺⁺ als „nicht-klassischer“ monozytärer Phänotyp) abhängig ist.

7.3.3. Höhere CD15-Expression auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten in Interaktion mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien

Das Oberflächenantigen CD15 ist beteiligt an der Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an die Gefäßinnenwand (Forsyth et al. 1989). Damit vermittelt auch dieses Antigen die Migration dieser Zellen zum Ort der Infektion.

Gegenüber den neutrophilen Granulozyten aus der Vergleichsprobe ist die CD15-Expression auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten, welche *A. fumigatus*-Konidien phagozytiert oder an ihrer Oberfläche anhaften haben, erhöht. Es ist somit möglich, dass neutrophile Granulozyten nach dem Kontakt zu pathogenen Konidien CD15 verstärkt exprimieren, um effektiver an den Ort der Infektion migrieren zu können.

Appelmek et al. zeigten, dass auch CD15 (ähnlich CD11b) durch seine Interaktion mit DC-SIGN zu einer Verknüpfung des angeborenen mit dem erworbenen Immunsystem führt. Die Bindung von CD15 an die Lectin-Domäne von DC-SIGN führt zu einer Zelladhäsion der DC an den neutrophilen Granulozyten und zu einer Veränderung der Th1/Th2-Balance und der Zytokinausschüttung (Appelmek et al. 2003).

7.3.4. Ausschüttung von Interleukin-1 β

In der vorliegenden Arbeit ist beobachtet worden, dass die Koinkubation von Leukozyten mit lang (5 h) geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien über 4 h zu einer Ausschüttung von IL-1 β führt.

Abb. 7.2. (entnommen aus: Dinarello, 2005) zeigt die Wirkung von IL-1 β auf den menschlichen Körper: Es führt einerseits zu einer Thrombo- und Granulozytose, zu Fieber und zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-6 durch die Endothelzellen. Letzteres führt wiederum zu einer Expression von Akut-Phase-Proteinen (Dinarello 2005).

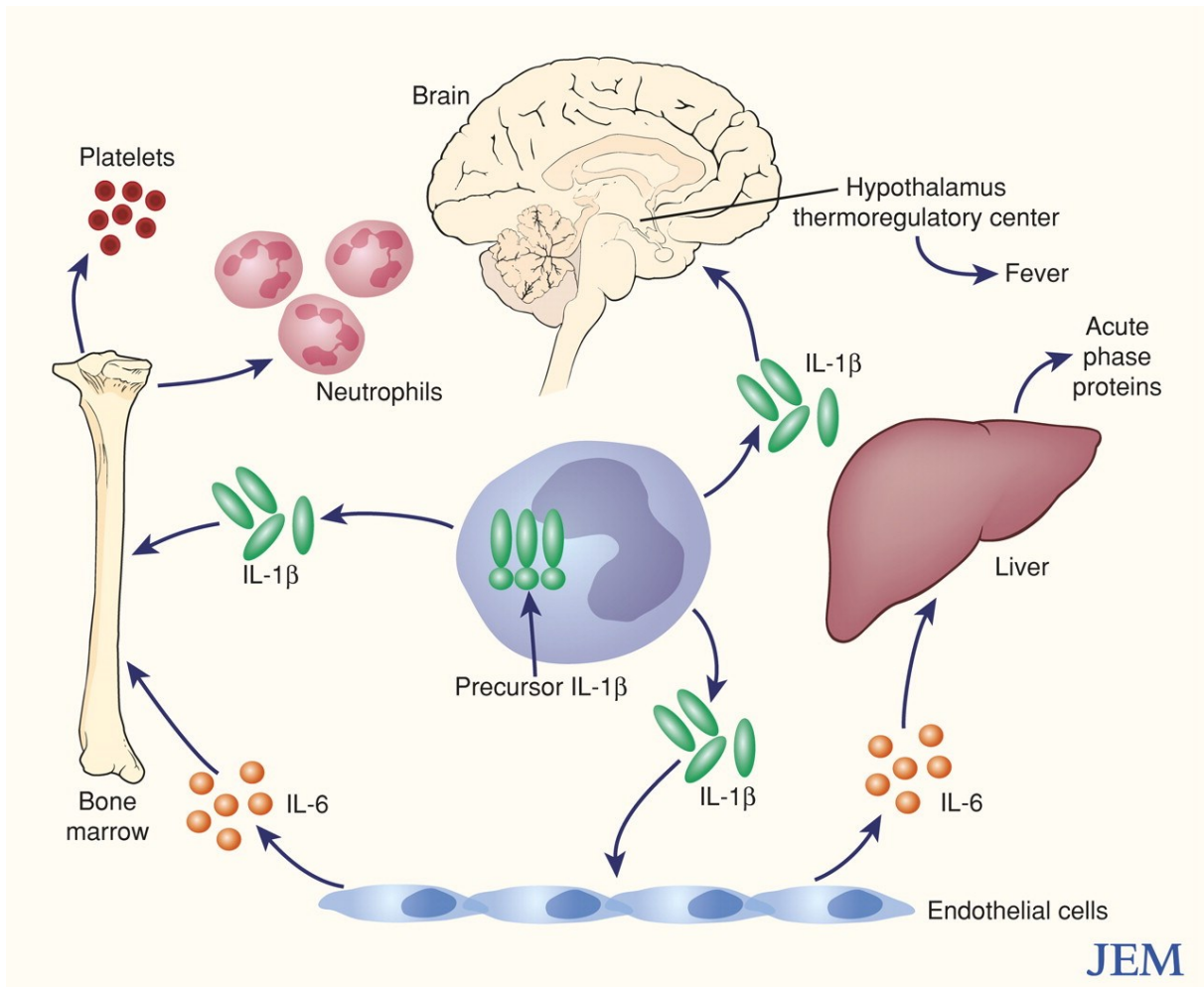


Abb. 7.2.: Übersichtsdarstellung zur Wirkung von IL-1 β auf den menschlichen Körper. (Dinarello 2005)

Pascual et al. zeigten, dass Monozyten gesunder Spender, die mit Serum von Patienten mit systemischer juveniler idiopathischer Arthritis inkubiert wurden, IL-1 β ausschütten. In Inkubation mit dem spendereigenen Serum zeigte sich keine Steigerung der IL-Konzentration. Daraus kann geschlossen werden, dass die Ausschüttung von IL-1 β auf Botenstoffen im Serum beruht (Pascual et al. 2005).

Der Kontakt zu geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien führt zur Ausschüttung von Zytokinen, die auch bei anderen, systemischen Entzündungsreaktionen exprimiert werden.

Wie bereits in Kap. 3.2.4. erwähnt, wiesen Wang et al. eine verstärkte Bildung von IL-1 β -mRNA durch sechstündige Koinkubation von Monozyten mit Hyphenfragmenten von *A. fumigatus* nach (Wang et al. 2001). Da in dieser Arbeit erst nach 4 h Schwellzeit die Bildung von Keimschläuchen nachgewiesen werden konnte, erscheint es in Anbetracht der Ergebnisse von Wang et al. wahrscheinlich, dass IL-1 β erst durch

Kontakt der Monozyten zum Hyphengeflecht und nicht bereits durch den Kontakt zu ruhenden Konidien ausgeschüttet wird. Dies würde erklären, warum sich erst nach einer langen Inkubationszeit (4 h) mit zuvor lang geschwollenen, teils auskeimenden Konidien (5 h Schwellzeit) eine IL-1 β -Konzentrationserhöhung im Überstand der Koinkubationsversuche nachweisen lässt. Hellmann et al. zeigten ein ähnliches Ergebnis: Durch Kontakt zu auskeimenden *A. fumigatus*-Konidien wird in humanen Monozyten die Ausschüttung von IL-1 β stimuliert (Hellmann et al. 2017).

Durch das Auskeimen der Konidien genügt die primäre Immunantwort zur Bekämpfung des Pathogens potentiell nicht mehr, weshalb Botenstoffe ausgeschüttet werden, um weitere Immunzellen einzubeziehen.

8. Schlussfolgerungen

Der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Assay zur Untersuchung der Phagozytose von *A. fumigatus*-Konidien durch humane neutrophile Granulozyten und Monozyten erlaubt eine schnelle Quantifizierung dieser durch Anwendung der Durchflusszytometrie. Hierdurch kann eine erheblich größere Anzahl Zellen schneller vermessen werden als mit Hilfe der Mikroskopie. Einzelne Subpopulationen müssen nicht vor Inkubation aufwendig isoliert werden, sondern können zusammen mit anderen Leukozytensubpopulationen inkubiert und anschließend auf Grund von Oberflächenmarkern in der Durchflusszytometrie unterschieden werden.

Durch die Färbung der Konidien mit FITC und die Gegenfärbung mit anti-FITC-APC lassen sich die Zellen einteilen: internalisierende Zellen, Zellen mit anhaftenden Konidien und Zellen ohne direkte Interaktion mit Konidien. Nicht bestimmt werden kann, ob eine Zelle mit an der Oberfläche anhaftenden Konidien auch Konidien internalisiert hat.

In derselben Probe können neben der Bestimmung der Phagozytose, durch fluoreszenzfarbstoffgekoppelte AK weitere Oberflächenantigene der Phagozyten angefärbt und quantifiziert werden. Dabei zeigte sich eine allgemeine Aktivierung phagozytischer Zellen. Nach längerer Koinkubation mit vorgeschwollenen Konidien konnte zudem IL-1 β detektiert werden, was zur Ausweitung der Immunantwort führen würde.

Folgend kann untersucht werden, inwiefern sich die Oberflächenmarker der Phagozyten bei immunsupprimierten Patienten, für die *A. fumigatus*-Konidien zu tödlichen Infektionen führen kann, von gesunden Menschen unterscheidet. Außerdem kann die Interaktion von Leukozyten mit *A. fumigatus*-Mutanten untersucht werden und damit Unterschiede zwischen den Mutanten hinsichtlich ihrer Phagozytierung durch neutrophile Granulozyten und Monozyten festgestellt werden.

Nach abgeschlossener Etablierung und Validierung wurde die hier vorgestellte Methode zur quantitativen Beurteilung der Interaktion zwischen humanen Leukozyten und *A. fumigatus*-Konidien 2019 in Cytometry Part A und im Journal of Visualized Experiments publiziert, um sie auch anderen Wissenschaftlern zugänglich zu machen.

9. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latge JP. 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 460 (7259):1117-1121.
- Alekseeva L, Huet D, Femenia F, Mouyna I, Abdelouahab M, Cagna A, Guerrier D, Tichanne-Seltzer V, Baeza-Squiban A, Chermette R, Latge JP, Berkova N. 2009. Inducible expression of beta defensins by human respiratory epithelial cells exposed to *Aspergillus fumigatus* organisms. *BMC Microbiol*, 9:33.
- Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. 1994. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood*, 84 (10):3483-3493.
- Amin S, Thywissen A, Heinekamp T, Saluz HP, Brakhage AA. 2014. Melanin dependent survival of *Aspergillus fumigatus* conidia in lung epithelial cells. *Int J Med Microbiol*, 304 (5-6):626-636.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*, 30:459-489.
- Appelmelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. 2003. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol*, 170 (4):1635-1639.
- Balloy V, Chignard M. 2009. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*, 11 (12):919-927.
- Baranger K, Zani ML, Chandenier J, Dallet-Choisy S, Moreau T. 2008. The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS J*, 275 (9):2008-2020.
- Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, Lipford GB, Pitzurra L, Romani L. 2004. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol*, 173 (12):7406-7415.
- Bidula S, Sexton DW, Abdolrasouli A, Shah A, Reed A, Armstrong-James D, Schelenz S. 2015. The serum opsonin L-ficolin is detected in lungs of human transplant recipients following fungal infections and modulates inflammation and killing of *Aspergillus fumigatus*. *J Infect Dis*, 212 (2):234-246.

- Blocker A, Griffiths G, Olivo JC, Hyman AA, Severin FF. 1998. A role for microtubule dynamics in phagosome movement. *J Cell Sci*, 111 (Pt 3):303-312.
- Borregaard N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33 (5):657-670.
- Brabcova E, Kolesar L, Thorburn E, Striz I. 2014. Chemokines induced in human respiratory epithelial cells by IL-1 family of cytokines. *Folia Biol (Praha)*, 60 (4):180-186.
- Brakhage AA, Langfelder K. 2002. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annu Rev Microbiol*, 56:433-455.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303 (5663):1532-1535.
- Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Wong SY, Gordon S. 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med*, 196 (3):407-412.
- Bruehl RE, Moore KL, Lorant DE, Borregaard N, Zimmerman GA, McEver RP, Bainton DF. 1997. Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Leukoc Biol*, 61 (4):489-499.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. 2000. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*, 11 (2):467-480.
- Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. 2002. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol*, 9 (1):30-35.
- Busetto S, Trevisan E, Patriarca P, Menegazzi R. 2004. A single-step, sensitive flow cytometric assay for the simultaneous assessment of membrane-bound and ingested *Candida albicans* in phagocytosing neutrophils. *Cytometry A*, 58 (2):201-206.
- Carman CV, Springer TA. 2004. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*, 167 (2):377-388.
- Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, Dvorak HF, Dvorak AM, Springer TA. 2007. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*, 26 (6):784-797.

- Chen L, Shen Z, Wu J. 2009. Expression, purification and in vitro antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clin Exp Dermatol*, 34 (1):55-60.
- Cinco M, Murgia R, Perticarari S, Presani G. 1994. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and metabolic burst induced in phagocytic cells in whole blood by *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol Lett*, 122 (1-2):187-193.
- da Silva Domingues JF, van der Mei HC, Busscher HJ, van Kooten TG. 2013. Phagocytosis of bacteria adhering to a biomaterial surface in a surface thermodynamic perspective. *PLoS One*, 8 (7):e70046.
- Dagenais TR, Keller NP. 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 22 (3):447-465.
- Dagenais TR, Giles SS, Aimanianda V, Latge JP, Hull CM, Keller NP. 2010. *Aspergillus fumigatus* LaeA-mediated phagocytosis is associated with a decreased hydrophobin layer. *Infect Immun*, 78 (2):823-829.
- de Boer EC, Bevers RF, Kurth KH, Schamhart DH. 1996. Double fluorescent flow cytometric assessment of bacterial internalization and binding by epithelial cells. *Cytometry*, 25 (4):381-387.
- Denning DW, Follansbee SE, Scolaro M, Norris S, Edelstein H, Stevens DA. 1991. Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, 324 (10):654-662.
- Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, Ullmann AJ, Dimopoulos G, Lange C, European Society for Clinical M, Infectious D, European Respiratory S. 2016. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*, 47 (1):45-68.
- Dinarello CA. 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*, 201 (9):1355-1359.
- Fattorossi A, Nisini R, Pizzolo JG, D'Amelio R. 1989. New, simple flow cytometry technique to discriminate between internalized and membrane-bound particles in phagocytosis. *Cytometry*, 10 (3):320-325.
- Fei C, Lillico DME, Hall B, Rieger AM, Stafford JL. 2017. Connected component masking accurately identifies the ratio of phagocytosed and cell-bound particles in individual cells by imaging flow cytometry. *Cytometry A*, 91 (4):372-381.
- Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Sriel AB, Venselaar H, Elbers CC, Johnson MD, Cambi A, Huysamen C, Jacobs L, Jansen T, Verheijen

- K, Masthoff L, Morre SA, Vriend G, Williams DL, Perfect JR, Joosten LA, Wijmenga C, van der Meer JW, Adema GJ, Kullberg BJ, Brown GD, Netea MG. 2009. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med*, 361 (18):1760-1767.
- Forsyth KD, Simpson AC, Levinsky RJ. 1989. CD15 antibodies increase neutrophil adhesion to endothelium by an LFA-1-dependent mechanism. *Eur J Immunol*, 19 (7):1331-1334.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176 (2):231-241.
- Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. 2006. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol*, 176 (6):3717-3724.
- Giaimis J, Lombard Y, Poindron P, Muller CD. 1994. Flow cytometry distinction between adherent and phagocytized yeast particles. *Cytometry*, 17 (2):173-178.
- Greenberger PA. 1984. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol*, 74 (5):645-653.
- Hafezi-Moghadam A, Ley K. 1999. Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med*, 189 (6):939-948.
- Hahn K, Schulz, Suerbaum. 2009. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Hamada K, Osaka M, Yoshida M. 2014. Cell density impacts epigenetic regulation of cytokine-induced E-selectin gene expression in vascular endothelium. *PLoS One*, 9 (4):e90502.
- Hartung S, Rauh C, Hoang TNM, Jahreis S, Wagner K, Macheleidt J, Brakhage AA, Rummler S, Hochhaus A, von Lilienfeld-Toal M. 2019. Fast and Quantitative Evaluation of Human Leukocyte Interaction with *Aspergillus fumigatus* Conidia by Flow Cytometry. *Cytometry A*, 95 (3):332-338.
- Heinzelmann M, Gardner SA, Mercer-Jones M, Roll AJ, Polk HC, Jr. 1999. Quantification of phagocytosis in human neutrophils by flow cytometry. *Microbiol Immunol*, 43 (6):505-512.
- Hellmann AM, Lother J, Wurster S, Lutz MB, Schmitt AL, Morton CO, Eyrich M, Czakai K, Einsele H, Loeffler J. 2017. Human and Murine Innate Immune Cell Populations Display Common and Distinct Response Patterns during Their In

- Vitro Interaction with the Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *Front Immunol*, 8:1716.
- Hidalgo A, Peired AJ, Wild M, Vestweber D, Frenette PS. 2007. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 26 (4):477-489.
- Hohl TM, Rivera A, Lipuma L, Gallegos A, Shi C, Mack M, Pamer EG. 2009. Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe*, 6 (5):470-481.
- Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, Latge JP. 2003. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun*, 71 (2):891-903.
- Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y. 2015. Interferon-gamma promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *J Infect Chemother*, 21 (12):831-836.
- Imbert S, Bresler P, Boissonnas A, Gauthier L, Souchet L, Uzunov M, Leblond V, Mazier D, Nguyen S, Fekkar A. 2016. Calcineurin inhibitors impair neutrophil activity against *Aspergillus fumigatus* in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Allergy Clin Immunol*, 138 (3):860-868.
- Jahn B, Langfelder K, Schneider U, Schindel C, Brakhage AA. 2002. PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol*, 4 (12):793-803.
- Jahraus A, Egeberg M, Hinner B, Habermann A, Sackman E, Pralle A, Faulstich H, Rybin V, Defacque H, Griffiths G. 2001. ATP-dependent membrane assembly of F-actin facilitates membrane fusion. *Mol Biol Cell*, 12 (1):155-170.
- Jhingran A, Mar KB, Kumasaka DK, Knoblaugh SE, Ngo LY, Segal BH, Iwakura Y, Lowell CA, Hamerman JA, Lin X, Hohl TM. 2012. Tracing conidial fate and measuring host cell antifungal activity using a reporter of microbial viability in the lung. *Cell Rep*, 2 (6):1762-1773.
- Karlsson A, Markfjall M, Stromberg N, Dahlgren C. 1995. *Escherichia coli*-induced activation of neutrophil NADPH-oxidase: lipopolysaccharide and formylated peptides act synergistically to induce release of reactive oxygen metabolites. *Infect Immun*, 63 (12):4606-4612.

- Kettle AJ, Gedye CA, Hampton MB, Winterbourn CC. 1995. Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides. *Biochem J*, 308 (Pt 2):559-563.
- Krappmann S. 2016. How to invade a susceptible host: cellular aspects of aspergillosis. *Curr Opin Microbiol*, 34:136-146.
- Kwon-Chung KJ, Sugui JA. 2013. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog*, 9 (12):e1003743.
- Kyrmizi I, Gresnigt MS, Akoumianaki T, Samonis G, Sidiropoulos P, Boumpas D, Netea MG, van de Veerdonk FL, Kontoyiannis DP, Chamilos G. 2013. Corticosteroids block autophagy protein recruitment in *Aspergillus fumigatus* phagosomes via targeting dectin-1/Syk kinase signaling. *J Immunol*, 191 (3):1287-1299.
- Latge JP. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*, 9 (8):382-389.
- Luther K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F. 2007. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol*, 9 (2):368-381.
- Madan T, Eggleton P, Kishore U, Strong P, Aggrawal SS, Sarma PU, Reid KB. 1997. Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun*, 65 (8):3171-3179.
- Madan T, Kishore U, Singh M, Strong P, Hussain EM, Reid KB, Sarma PU. 2001. Protective role of lung surfactant protein D in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*, 69 (4):2728-2731.
- Mandl M, Schmitz S, Weber C, Hristov M. 2014. Characterization of the CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte population in human bone marrow. *PLoS One*, 9 (11):e112140.
- Mann BS, Chung KF. 2006. Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respir Res*, 7:59.
- Mansour MK, Tam JM, Khan NS, Seward M, Davids PJ, Puranam S, Sokolovska A, Sykes DB, Dagher Z, Becker C, Tanne A, Reedy JL, Stuart LM, Vyas JM. 2013. Dectin-1 activation controls maturation of beta-1,3-glucan-containing phagosomes. *J Biol Chem*, 288 (22):16043-16054.
- Mastej K, Adamiec R. 2008. Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol*, 45 (3):183-190.

- Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, Romani L, Mantovani A, Garlanda C. 2010. Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. *Blood*, 116 (24):5170-5180.
- Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, Toh BH. 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem*, 270 (22):13503-13511.
- Nuutila J, Lilius EM. 2005. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A*, 65 (2):93-102.
- Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J. 2005. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med*, 201 (9):1479-1486.
- Patterson K, Streck ME. 2010. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Proc Am Thorac Soc*, 7 (3):237-244.
- Perticarari S, Presani G, Mangiarotti MA, Banfi E. 1991. Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative products by neutrophils. *Cytometry*, 12 (7):687-693.
- Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, Gougerot-Pocidalo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, Latge JP. 2003. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun*, 71 (6):3034-3042.
- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, 203 (12):2569-2575.
- Post MJ, Lass-Floerl C, Gastl G, Nachbaur D. 2007. Invasive fungal infections in allogeneic and autologous stem cell transplant recipients: a single-center study of 166 transplanted patients. *Transpl Infect Dis*, 9 (3):189-195.
- Prodan M, Tulissi P, Perticarari S, Presani G, Franzin F, Pussini E, Pozzato G. 1995. Flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and oxidative burst of polymorphonuclear leukocytes and monocytes in myelodysplastic disorders. *Haematologica*, 80 (3):212-218.

- Roederer M. 2002. Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 1:Unit 1 14.
- Saresella M, Roda K, Speciale L, Taramelli D, Mendozzi E, Guerini F, Ferrante P. 1997. A flow cytometric method for the analysis of phagocytosis and killing by polymorphonuclear leukocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 832:53-61.
- Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. 2016. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev*, 273 (1):48-60.
- Segal AW. 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, 23:197-223.
- Segal AW, Dorling J, Coade S. 1980. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and morphological studies. J Cell Biol*, 85 (1):42-59.
- Segal AW, Geisow M, Garcia R, Harper A, Miller R. 1981. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature*, 290 (5805):406-409.
- Serbina NV, Cherny M, Shi C, Bleau SA, Collins NH, Young JW, Pamer EG. 2009. Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia. *J Immunol*, 183 (4):2678-2687.
- Slesiona S, Ibrahim-Granet O, Olias P, Brock M, Jacobsen ID. 2012. Murine infection models for *Aspergillus terreus* pulmonary aspergillosis reveal long-term persistence of conidia and liver degeneration. *J Infect Dis*, 205 (8):1268-1277.
- Solomon WR, Burge HP, Boise JR. 1978. Airborne *Aspergillus fumigatus* levels outside and within a large clinical center. *J Allergy Clin Immunol*, 62 (1):56-60.
- Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SL, St John LS, Komanduri KV. 2005. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood*, 105 (6):2258-2265.
- Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, Kolls JK, Brown GD. 2005. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*, 1 (4):e42.
- Storrie B, Desjardins M. 1996. The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays*, 18 (11):895-903.
- Strober W. 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 111:A3 B 1-3.

- Sveum RJ, Chused TM, Frank MM, Brown EJ. 1986. A quantitative fluorescent method for measurement of bacterial adherence and phagocytosis. *J Immunol Methods*, 90 (2):257-264.
- Taha MP, Pollard SJ, Sarkar U, Longhurst P. 2005. Estimating fugitive bioaerosol releases from static compost windrows: feasibility of a portable wind tunnel approach. *Waste Manag*, 25 (4):445-450.
- Thywissen A, Heinekamp T, Dahse HM, Schmalzer-Ripcke J, Nietzsche S, Zipfel PF, Brakhage AA. 2011. Conidial Dihydroxynaphthalene Melanin of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus* Interferes with the Host Endocytosis Pathway. *Front Microbiol*, 2:96.
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*, 8 (4):668-676.
- van Bruggen R, Drewniak A, Jansen M, van Houdt M, Roos D, Chapel H, Verhoeven AJ, Kuijpers TW. 2009. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. *Mol Immunol*, 47 (2-3):575-581.
- van Gisbergen KP, Ludwig IS, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. 2005. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett*, 579 (27):6159-6168.
- Volling K, Thywissen A, Brakhage AA, Saluz HP. 2011. Phagocytosis of melanized *Aspergillus* conidia by macrophages exerts cytoprotective effects by sustained PI3K/Akt signalling. *Cell Microbiol*, 13 (8):1130-1148.
- Wang JE, Warris A, Ellingsen EA, Jorgensen PF, Flo TH, Espevik T, Solberg R, Verweij PE, Aasen AO. 2001. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun*, 69 (4):2402-2406.
- Wasylnka JA, Moore MM. 2002. Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun*, 70 (6):3156-3163.
- Wasylnka JA, Moore MM. 2003. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *J Cell Sci*, 116 (Pt 8):1579-1587.
- Willment JA, Marshall AS, Reid DM, Williams DL, Wong SY, Gordon S, Brown GD. 2005. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally

equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol*, 35 (5):1539-1547.

Woodfin A, Voisin MB, Imhof BA, Dejana E, Engelhardt B, Nourshargh S. 2009.

Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*, 113 (24):6246-6257.

Zarembek KA, Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Gallin JI. 2007. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *J Immunol*, 178 (10):6367-6373.

Zen K, Guo YL, Li LM, Bian Z, Zhang CY, Liu Y. 2011. Cleavage of the CD11b extracellular domain by the leukocyte serproteases is critical for neutrophil detachment during chemotaxis. *Blood*, 117 (18):4885-4894.

10. Anhang

10.1. Inhalt der Mastermixes zur Färbung für die durchflusszytometrische Vermessung

Tab. 10.1.: Inhalte der Mastermixes zur Färbung für die durchflusszytometrische Vermessung.

Ansatz	Antikörper	Volumen/Probe	
1	Anti-FITC – APC	0,5 µl	
	CD11b – PE-Cy7	1,5 µl	
	CD14 – V500	0,5 µl	
	CD15 – BV605	0,2 µl	
	CD33 – BV421	1,5 µl	
	CD45 – BUV395	1 µl	
	CD66b – PerCP-Cy5.5	1,5 µl	
	Dectin-1 – PE	1,5 µl	
	HLA-DR – APC-Cy7	1 µl	
	PBS-E	11 µl	
	BD Horizon Brilliant™ Stain Buffer	20 µl	
	2	Anti-FITC – APC	0,5 µl
		CD14 – V500	0,5 µl
CD15 – BV605		0,2 µl	
CD45 – BUV395		1 µl	
CD62L – PE		1 µl	
CD66b – PerCP-Cy5.5		1,5 µl	
CD274 – PE-Cy7		1 µl	
HLA-DR – V450		1,5 µl	
PBS-E		13 µl	
BD Horizon Brilliant™ Stain Buffer		20 µl	
3	CD14 – V500	0,5 µl	
	CD45 – BUV395	1 µl	
	CD66b – PerCP-Cy5.5	1,5 µl	
	PBS-E	37 µl	
4	Anti-FITC – APC	0,5 µl	
	CD14 – V500	0,5 µl	
	CD45 – BUV395	1 µl	
	CD66b – PerCP-Cy5.5	1,5 µl	
	PBS-E	37 µl	
5	Ungefärbt		
6	PI 1 : 10 000 verdünnt		

10.2. CD274 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt der max. Internalisierungsrate

1) Prozentualer Anteil CD274⁺ neutrophiler Granulozyten 2) CD274 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten

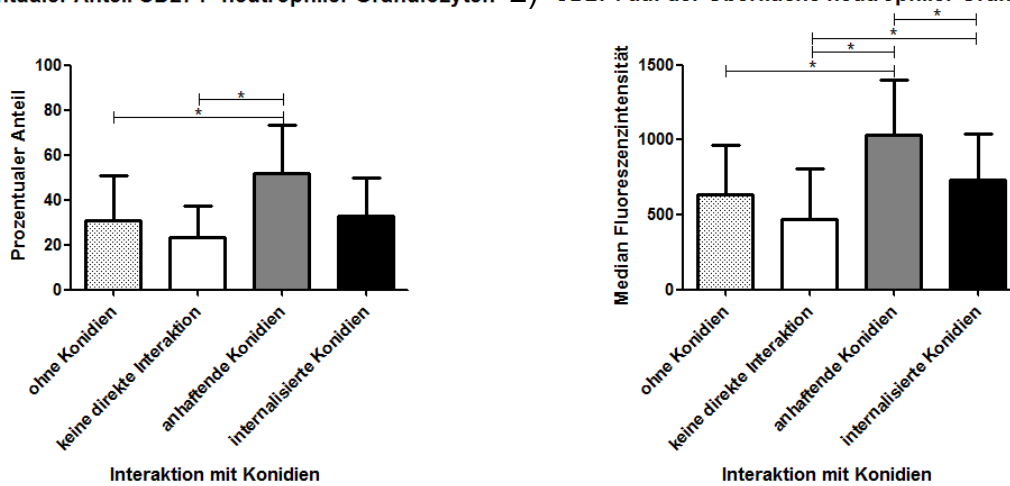


Abb. 10.1.: CD274-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 2 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der CD274⁺ neutrophilen Granulozyten an den gesamten neutrophilen Granulozyten. 2) Median der FI der an CD274 gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

10.3. Dectin-1 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt der max. Internalisierungsrate

1) Prozentualer Anteil Dectin-1⁺ neutrophiler Granulozyten 2) Dectin-1 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten

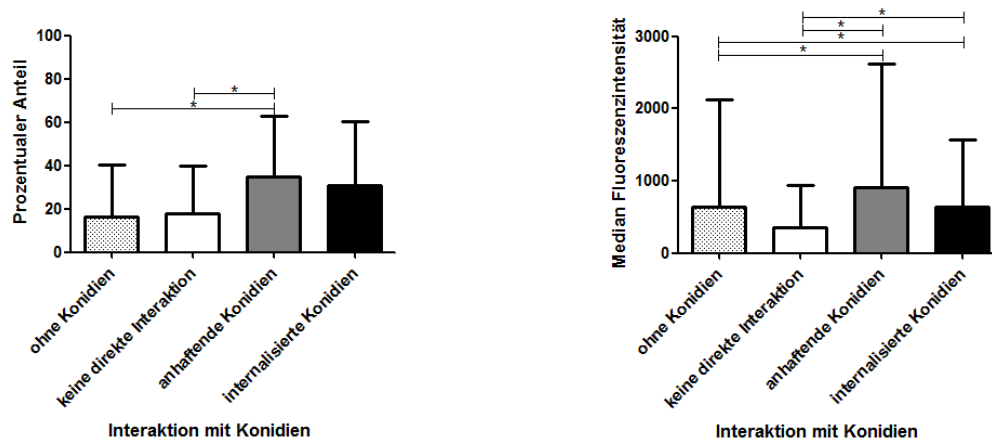


Abb. 10.2.: Dectin-1-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 2 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der Dectin-1⁺ neutrophilen Granulozyten an den gesamten neutrophilen Granulozyten. 2) Median der FI der an Dectin-1 gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

10.4. HLA-DR auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt der max. Internalisierungsrate

1) Prozentualer Anteil HLA-DR⁺ neutrophiler Granulozyten 2) HLA-DR auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten

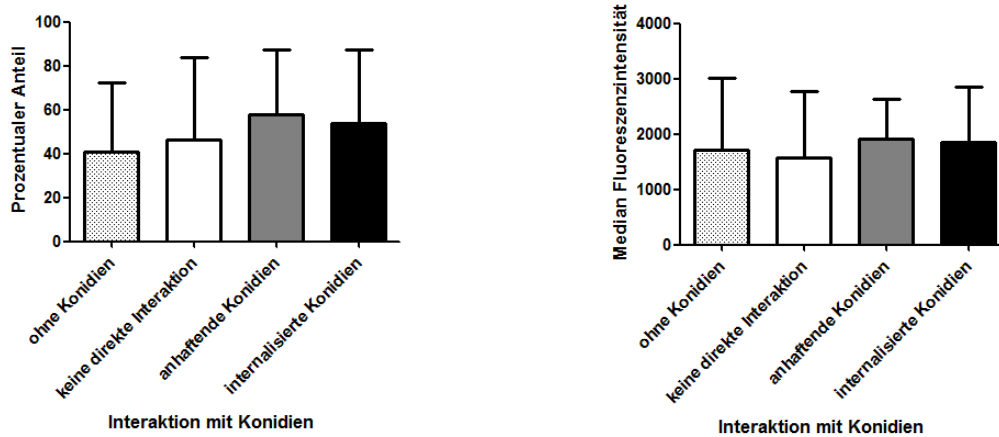


Abb. 10.3.: HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.

Es wurden Leukozyten mit 5 h geschwollenen *A. fumigatus*-Konidien bzw. die Kontrollprobe ohne Konidien für 2 h in RPMI1640 + 10 % FCS bei 37 °C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. 1) Prozentualer Anteil der HLA-DR⁺ neutrophilen Granulozyten an den gesamten neutrophilen Granulozyten. 2) Median der FI der an HLA-DR gebundenen farbstoffgekoppelten AK als Ausdruck der Expressionsstärke des Antigens. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n = 10. *: p < 0,05 %

10.5. Tabellenverzeichnis

Tab. 5.1.: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	25
Tab. 5.2.: Übersicht über die Zusammensetzung der Mastermixes.....	32
Tab. 7.1.: Übersicht über Publikationen zu Phagozytoseassays.....	68-70
Tab. 10.1.: Inhalte der Mastermixes zur Färbung für die durchflusszytometrische Vermessung.....	89

10.6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1.: Neutrophile Granulozyten – Migration und Pathogenbekämpfung.....	14
Abb. 5.1.: Schematische Darstellung einer Thoma-Zählkammer.....	27
Abb. 5.2.: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer.....	30
Abb. 5.3.: Repräsentative Darstellung der Definition von Leukozyten und Leukozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie.....	33
Abb. 5.4.: Schematische Darstellung der Phagozytoseaktivität und daraus folgender Fluoreszenzfärbung der Leukozyten.....	35
Abb. 5.5.: Repräsentative Dotplots zur Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Konidien durch humane Leukozyten.....	37
Abb. 6.1.: Lichtmikroskopische Aufnahmen von <i>A. fumigatus</i> -Konidien.....	41
Abb. 6.2.: Repräsentative Dotplots zur Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Konidien durch neutrophile Granulozyten.....	43
Abb. 6.3.: Internalisierungsrate neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von Schwell- und Koinkubationszeit.....	44
Abb. 6.4.: CD11b-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.....	46
Abb. 6.5.: CD15-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.....	47
Abb. 6.6.: CD62L-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.....	48
Abb. 6.7.: CD33-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.....	49
Abb. 6.8.: Repräsentative Dotplots der Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Konidien durch Monozyten.....	51

Abb. 6.9.: Internalisierungsrate von Monozyten in Abhängigkeit von Schwell- und Koinkubationszeit.	52
Abb. 6.10.: Repräsentatives lichtmikroskopisches Bild der Koinkubation von Leukozyten mit zuvor 5 h geschwollenen <i>A. fumigatus</i> -Konidien über 4 h.	53
Abb. 6.11.: CD11b-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.	54
Abb. 6.12.: CD15-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.	55
Abb. 6.13.: CD62L-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.	56
Abb. 6.14.: CD33-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.	57
Abb. 6.15.: CD274-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.	58
Abb. 6.16.: Dectin-1-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.	59
Abb. 6.17.: HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.	60
Abb. 6.18.: Einfluss der Fixation der <i>A. fumigatus</i> -Konidien auf die Interaktion Leukozyt – Konidie.....	62
Abb. 6.19.: Einfluss von FITC als Markierung der Konidien auf die Antigenexpression der koinkubierten Leukozyten.....	64
Abb. 6.20.: Abhängigkeit der IL-1 β -Ausschüttung von Koinkubations- und Schwellzeit.	65
Abb. 7.1.: Grafische Darstellung der Frequenzspektren der Fluoreszenzfarbstoffe FITC und PE. (Roederer 2002).....	73
Abb. 7.2.: Übersichtsdarstellung zur Wirkung von IL-1 β auf den menschlichen Körper. (Dinarello 2005)	77
Abb. 10.1.: CD274-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.....	91
Abb. 10.2.: Dectin-1-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.....	92
Abb. 10.3.: HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Interaktion mit Konidien.....	93

10.7. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Marie von Lilienfeld-Toal für die Möglichkeit in der Arbeitsgruppe für Infektionen in der Hämatologie und Onkologie arbeiten und promovieren zu dürfen, für die gute Betreuung und fachliche Beratung sowie für die Erstellung des Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Susann Hartung und Dr. Kathleen Wagner für die Einarbeitung in die experimentelle Forschung, die Betreuung der Dissertation und die fachlichen Ratschläge.

Bei Dr. Susanne Jahreis möchte ich mich für die fachlichen Gespräche und die Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe für Infektionen in der Hämatologie und Onkologie für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Gerrit Kimpel für die fachliche und persönliche Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern Annett und Heiko Rauh für ihr fortwährendes Vertrauen und ihre Unterstützung.

10.8. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Marie von Lilienfeld-Toal, Dr. Susann Hartung, Dr. Kathleen Wagner und Dr. Susanne Jahreis,
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Berlin, den 14.02.2021

(Christopher Michael Rauh)