

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Analyse der *in-vitro* Aktivität neutrophiler Granulozyten
gegenüber *Aspergillus fumigatus* unter dem Einfluss
von Antimykotika und Immunsuppressiva**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christina Decker

aus Lauf a. d. Pegnitz

Würzburg, August 2019

Referent:

Prof. Dr. Jürgen Löffler

Korreferent:

PD Dr. Johannes Wagener

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

16.07.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Invasive Aspergillose durch <i>Aspergillus fumigatus</i>.....	1
1.1.1	Der Erreger <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1.2	Pathophysiologie von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Infektionen	2
1.1.3	Ätiologie und Risikofaktoren der invasiven Aspergillose	4
1.1.4	Antimykotische Therapie der invasiven Aspergillose	6
1.1.4.1	Voriconazol	7
1.1.4.2	Amphotericin B – desoxychololat und liposomal	8
1.2	Neutrophile Granulozyten und deren Effektormechanismen als Teil der angeborenen Immunantwort gegen <i>Aspergillus fumigatus</i>	9
1.2.1	Eigenschaften neutrophiler Granulozyten	9
1.2.2	Bedeutung in der Immunabwehr gegenüber <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
1.2.3	Interleukin 8	12
1.2.4	Erkennung und Phagozytose	13
1.2.5	Oxidativer <i>Burst</i>	15
1.2.6	Bildung von <i>neutrophil extracellular traps</i>	17
1.3	Immunsuppression bei akuter <i>Graft-versus-Host</i>- Erkrankung	19
1.3.1	GvHD nach allogener Stammzelltransplantation	19
1.3.2	Klinik und Risikofaktoren der GvHD.....	20
1.3.3	Pathophysiologie der akuten GvHD.....	21
1.3.4	Immunsuppressive Prophylaxe.....	22
1.3.4.1	Ciclosporin A	22
1.3.4.2	Mycophenolat-Mofetil	23
1.3.5	Immunsuppressive Therapie mit Prednisolon	23
1.4	Zielsetzung der Arbeit	25

2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1	Material	26
2.1.1	Geräte.....	26
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.2.1	Labormaterialien.....	27
2.1.2.2	Kits	27
2.1.2.3	Reagenzien	28
2.1.2.4	Lösungen und Puffer	28
2.1.2.5	Medien	29
2.1.2.6	Antimykotika und Immunsuppressiva	29
2.1.3	Pilzstamm	29
2.1.4	Software.....	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Gewinnung humaner neutrophiler Granulozyten	30
2.2.1.1	Studienteilnehmer	30
2.2.1.2	Isolation und Aufreinigung von neutrophilen Granulozyten aus Vollblut	31
2.2.1.3	Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer.....	32
2.2.2	Arbeiten mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	33
2.2.2.1	Kultur von <i>Aspergillus fumigatus</i>	33
2.2.2.2	Gewinnung von Konidien	33
2.2.2.3	Anzucht von Keimschläuchen und Hyphen	33
2.2.2.4	Inaktivierung von Konidien, Keimschläuchen und Hyphen.....	33
2.2.3	Berechnung und Ansetzen der Pharmaka	34
2.2.4	Analyse der ROS-Freisetzung	36
2.2.4.1	Reaktive Sauerstoffspezies und DCF.....	36
2.2.4.2	Versuchsaufbau	36
2.2.5	Messung der IL-8-Freisetzung	38
2.2.5.1	ELISA	38
2.2.5.2	Generierung der Zytokin-Überstände	38
2.2.5.3	Durchführung des IL-8-ELISA	39

2.2.6 Bestimmung der neutrophilen Elastase-Aktivität.....	39
2.2.6.1 Bildung und Gewinnung der neutrophilen Elastase.....	39
2.2.6.2 Durchführung der neutrophilen Elastase-Messung	40
2.2.7 Beurteilung der Phagozytoserate.....	41
2.2.7.1 Durchflusszytometrie.....	41
2.2.7.2 FITC-Markierung der inaktivierten Keimschläuche.....	41
2.2.7.3 Ansetzen der Kokulturen	42
2.2.7.4 Gegenfärben der Granulozyten mit CD15-APC	43
2.2.7.5 Messung im Durchflusszytometer und Auswertung.....	43
2.2.8 Statistik	44
3 ERGEBNISSE.....	46
3.1 Einfluss von Antimykotika auf die Viabilität neutrophiler Granulozyten.....	46
3.2 Einfluss von Antimykotika und Immunsuppressiva auf den oxidativen <i>Burst</i> neutrophiler Granulozyten	47
3.2.1 Kinetik der ROS-Freisetzung und Abhängigkeit vom Morphotyp von <i>Aspergillus fumigatus</i>	48
3.2.2 Einfluss von Antimykotika auf die ROS-Sekretion bei Stimulation mit PMA.....	50
3.2.3 Einfluss von Antimykotika auf die ROS-Sekretion bei Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von <i>Aspergillus fumigatus</i>	52
3.2.4 Einfluss von Antimykotika auf die ROS-Sekretion bei Stimulation mit vitalen Keimschläuchen von <i>Aspergillus fumigatus</i>	53
3.2.5 Einfluss von Prednisolon auf die ROS-Freisetzung	54
3.2.6 Einfluss von CsA/MMF auf die ROS-Freisetzung	57
3.3 Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die IL-8-Sekretion neutrophiler Granulozyten	59
3.3.1 Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die IL-8-Sekretion bei Stimulation mit PMA	59

3.3.2	Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die IL-8-Sekretion bei Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von <i>Aspergillus fumigatus</i>	60
3.4	Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten bei Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von <i>Aspergillus fumigatus</i>	62
3.5	Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die Phagozytoserate von <i>Aspergillus fumigatus</i>-Keimschläuchen durch neutrophile Granulozyten	64
4	DISKUSSION	66
4.1	Morphotyp-abhängige Auslösung der Effektormechanismen von neutrophilen Granulozyten	67
4.2	Einfluss von Amphotericin B – liposomal und desoxycholat	68
4.3	Einfluss von Voriconazol	76
4.4	Einfluss von Prednisolon	79
4.5	Einfluss von CsA/MMF	82
4.6	Limitationen dieser Arbeit	83
4.7	Ausblick	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	87
6	LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	89
6.1	Literaturverzeichnis	89
6.2	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	108

ANHANG.....

Ergänzende Abbildung

Abkürzungen

Danksagung.....

Lebenslauf

1 EINLEITUNG

1.1 Invasive Aspergillose durch *Aspergillus fumigatus*

1.1.1 Der Erreger *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) gehört zu den filamentösen, saprophytischen Schimmelpilzen, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen und normalerweise beim Zerfallsprozess organischer Substanzen eine wichtige Rolle spielen. Häufig sind sie daher in Kompost, feuchtem Holz oder Vogelnestern zu finden, aber auch in Blumenerde oder Staub in Innenräumen (Gugnani, 2003). Durch asexuelle Vermehrung bildet *A. fumigatus* massenhaft Sporen, sogenannte Konidien, die über die Luft übertragen werden, wo sie metabolisch inaktiv mehrere Monate überleben können (Kwon-Chung & Sugui, 2013; van de Veerdonk et al., 2017). Unter unphysiologischen Bedingungen konnte mittlerweile auch ein sexueller Vermehrungszyklus beobachtet werden, aus dem sogenannte Ascosporen hervorgehen (O'Gorman et al., 2009). In warmer, feuchter und nährstoffreicher Umgebung, wie sie auch in den Alveolen der Lunge vorkommt, beginnen die Konidien zu schwellen und zu keimen (Ben-Ami et al., 2010). In Folge dessen verändert sich die Zusammensetzung ihrer Zellwand grundlegend: Die ruhenden Konidien verlieren ihre Melanin- sowie Hydrophobinschicht, schützende Hüllen, die sie immunologisch inert machen. Somit wird eine reorganisierte, hoch immunogene Zellwandschicht an die Oberfläche freigegeben, die v. a. aus β -1,3-Glucan, Chitin und Galactomannan besteht (Brakhage et al., 2010; Latge, 2010; Latge et al., 2005). Während der weiteren Auskeimung bilden sich zunächst kurze Keimschläuche und schließlich filamentös verzweigte Hyphen aus, die zusätzlich von einer Schicht aus dem Polysaccharid Galactosaminogalactan (GAG) umgeben sind und damit eine Art Biofilm bilden können (van de Veerdonk et al., 2017).

Von den über 300 bekannten *Aspergillus*-Arten werden etwa 40 als humanpathogen angesehen. Dazu zählen neben *A. fumigatus* beispielsweise

Aspergillus flavus, *Aspergillus terreus* und *Aspergillus niger*. Während viele dabei nur selten schwere Krankheiten verursachen, kann vor allem der Erreger *A. fumigatus* ein Auslöser schwerwiegender Infektionen des Menschen sein, der mit etwa 90 % die häufigste Ursache humaner Infektionen durch *Aspergillus*-Arten darstellt (Gugnani, 2003; Krappmann, 2016). Jährlich werden mehr als 200000 lebensbedrohliche Fälle dieser sogenannten Aspergillosen registriert (van de Veerdonk et al., 2017).

1.1.2 Pathophysiologie von *Aspergillus fumigatus*-Infektionen

Durch die hohe Konzentration der Konidien von *A. fumigatus* in der Luft (1 - 100 Konidien/m³) atmet der Mensch tagtäglich mehrere hundert dieser Sporen ein, welche auf Grund ihres geringen Durchmessers von 2,0 – 3,5 µm leicht in die Atemwege bis in die Alveolen der Lunge gelangen (Kwon-Chung & Sugui, 2013). Bei gesunden Menschen werden diese Sporen normalerweise erfolgreich durch Mechanismen der angeborenen Immunabwehr wie neutrophile Granulozyten und alveolare Makrophagen bekämpft. Als opportunistischer Erreger macht sich *A. fumigatus* jedoch verschiedene Umstände zu Nutze, die beim Erkrankten eine Immundefizienz verursachen. So können abhängig vom Immunstatus verschiedene Formen von Krankheitsbildern durch *Aspergillen* allgemein und im Besonderen durch *A. fumigatus* ausgelöst werden (Abb. 1.1):

An Asthma vorerkrankte Patienten können durch eine Hypersensitivitätsreaktion beispielsweise eine allergisch bronchopulmonale Aspergillose oder ein schweres Asthma mit Sensibilisierung gegenüber Pilzen entwickeln, während Personen mit chronischen Lungenerkrankungen gefährdet sind, an chronisch (nekrotisierender) pulmonaler Aspergillose zu erkranken. Außerdem sind die Konidien in der Lage, sich auf der Schleimhautoberfläche vorbestehender Lungenkavernen anzusiedeln und damit ein Aspergillom zu bilden (van de Veerdonk et al., 2017).

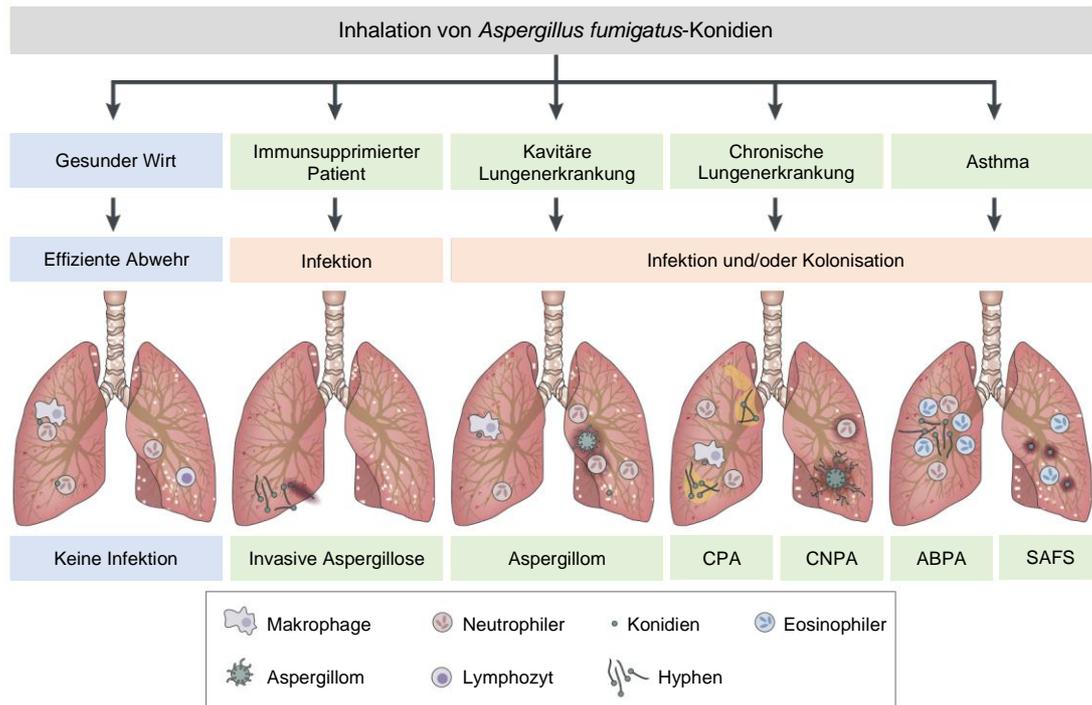


Abbildung 1.1: Klinisches Spektrum von *Aspergillus fumigatus*-assozierten Erkrankungen in Abhängigkeit vom Immunstatus des Patienten

Die Abbildung wurde aus van de Veerdonk et al. (2017) entnommen und modifiziert. C(N)PA = chronisch (nekrotisierende) pulmonare Aspergillose, ABPA = allergisch bronchopulmonale Aspergillose, SAFS = schweres Asthma mit Sensibilisierung gegenüber Pilzen.

Eine besonders fatale Erkrankung stellt die hauptsächlich durch *A. fumigatus* verursachte invasive Aspergillose (IA) dar, die meist ausgehend von der Lunge durch eine Invasion des Gewebes charakterisiert wird (Croft et al., 2016; Fang & Latge, 2018). Inhalierte Konidien reifen dabei nach 6 – 8 h im menschlichen Körper bei optimalen Temperaturbedingungen von 37 °C zu Hyphen heran und heften sich mit Hilfe ihrer zellwandassoziierten GAG-Schicht an Epithelzellen der Alveolen an (Croft et al., 2016; Kwon-Chung & Sugui, 2013). Anschließend sind sie in der Lage, diese Zellen zu infiltrieren und zu durchdringen, so in den Blutstrom zu gelangen und sich dadurch auch in anderen Organen wie beispielsweise im Gehirn auszubreiten (Sheppard & Filler, 2014). Die Verletzung der Endothelschicht und Freisetzung von Zytokinen führen schließlich u. a. zu

intravasalen Thrombosen, Hypoxie und Nekrotisierung des umliegenden Gewebes, sodass es auch Immunzellen und Medikamenten erschwert wird, in das betroffene Gewebe zu gelangen (Ben-Ami et al., 2010). Dabei ist nicht allein der Pilz für die Zerstörung des Gewebes verantwortlich, sondern auch überschießende, proinflammatorische Immunreaktionen. Beispielsweise unterscheidet sich das Bild in neutropenisch- und nicht-neutropenisch-bedingten Fällen (Kapitel 1.1.3) von IA grundlegend: Während ersteres durch eine Vielzahl von Hyphen mit Infiltration und Ausbreitung im Gewebe geprägt ist, dominieren in nicht-neutropenischen Fällen hauptsächlich neutrophile Granulozyten mit exzessiver Entzündungsaktivität (Al-Bader & Sheppard, 2016). Das Risiko für IA resultiert daher vorwiegend aus der Dysbalance von pro- und antiinflammatorischen Prozessen (Lass-Floerl et al., 2013).

1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren der invasiven Aspergillose

Fälle von IA beim Menschen weisen seit Jahren eine zunehmende Häufigkeit auf. Grund hierfür ist die steigende Anzahl an immunsupprimierten Patienten durch stetigen Fortschritt in der modernen Medizin (Latge, 1999). Heutzutage werden immer häufiger Organ- und Stammzelltransplantationen durchgeführt, Hochdosis-Chemotherapie-Protokolle angewandt sowie immunsuppressive Medikamente auch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt (Denning, 1998). Bezeichnenderweise datiert der erste veröffentlichte Fallbericht einer IA in einem immunkomprimierten Patienten aus dem Jahr 1953 – der Zeitraum, in dem Chemotherapie und Kortikosteroide Einzug in medizinische Behandlungsmethoden fanden (Rankin, 1953). Zu den Hochrisikogruppen für diese lebensbedrohliche Infektion gehören demnach Personen mit hämatologischen Neoplasien, Stammzell- und Organtransplantationen, ausgedehnter Kortikosteroid-Therapie sowie angeborenen Immundefekten (Lass-Floerl et al., 2013).

Persistierende Neutropenie, d. h. eine Verminderung von neutrophilen Granulozyten im Blut, gilt hierbei als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer IA und tritt z. B. häufig als Folge von zytotoxischer Chemotherapie bei

hämatologischen Erkrankungen auf (Dagenais & Keller, 2009). Zu den für eine IA relevanten, jedoch seltenen Immundefekten zählt die chronische Granulomatose (CGD), bei der die Anzahl der neutrophilen Granulozyten zwar normal, ihre Funktion jedoch stark eingeschränkt ist (Kapitel 1.2.5; Pollock et al., 1995). Beides verdeutlicht die essentielle Bedeutung der neutrophilen Granulozyten in der Abwehr von *A. fumigatus* (Kapitel 1.2.2).

Unter den nicht-neutropenischen Patienten sind vorwiegend jene mit beeinträchtigter T-Zell-Funktion betroffen, wie dies z. B. bei langandauernder Immunsuppressiva-Einnahme oder *Graft-versus-Host-Disease* infolge allogener Stammzelltransplantation der Fall ist (Kapitel 1.3; Dagenais & Keller, 2009). Neuerdings richtet sich der Fokus auch auf nicht-hämatologische Patienten, bei denen das Risiko als zu gering eingestuft und das Auftreten von IA so lange Zeit unterschätzt wurde. Zu dieser Gruppe gehören Patienten auf Intensivstation, postoperative Patienten sowie Personen mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung, AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) oder unter immunsuppressiver Therapie mit neueren Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Blockern (Baddley, 2011). Studien belegen, dass mittlerweile 30 – 50 % der Fälle von IA in nicht-neutropenischen Patienten diagnostiziert werden und ihre Letalitätsrate sich nicht wesentlich von derjenigen hämatologischer Patienten unterscheidet (Cornillet et al., 2006; Meersseman et al., 2004; Trof et al., 2007).

Insgesamt zeigen sich für Hochrisikopatienten trotz leicht verbesserter Tendenzen in den letzten Jahren immer noch inakzeptabel hohe Letalitätsraten zwischen 30 und 90 %, besonders für Patienten mit Stammzelltransplantation mit 86,7 % (Brakhage, 2005; Lin et al., 2001; Upton et al., 2007). Notwendige antimykotische Therapien werden oft erst verspätet eingeleitet, da im Moment spezifische und zuverlässige diagnostische Methoden fehlen. Dabei ist gerade eine frühzeitige Diagnose enorm wichtig, da ein verzögerter Therapiebeginn mit einer erhöhten Letalität behaftet ist. Limitierte therapeutische Möglichkeiten stellen darüber hinaus ein weiteres, massives Problem dar, weshalb die Entwicklung neuer Therapiestrategien in Zukunft unbedingt erforderlich ist (Brakhage, 2005; Denning, 2000).

1.1.4 Antimykotische Therapie der invasiven Aspergillose

Neben der operativen Sanierung des betroffenen Areals in seltenen Fällen steht vor allem die antimykotische Medikation im Mittelpunkt der Therapie einer IA. In den letzten Jahren gab es in der Entwicklung solcher Wirkstoffe einige Fortschritte zu verzeichnen. Mittlerweile werden mehrere Klassen systemisch eingesetzter Antimykotika verwendet, die verschiedene Angriffspunkte an der Pilzzelle nutzen (Ben-Ami et al., 2008). Für die Behandlung der IA stehen besonders Azole, das Polyen Amphotericin B und Echinocandine im Fokus. Azole sind die bevorzugten Medikamente in der Erstlinientherapie, während Amphotericin B die wichtigste Option für die Zweitlinientherapie darstellt (Ullmann et al., 2018). Die nachfolgend beschriebenen Wirkmechanismen beider Antimykotika sind in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

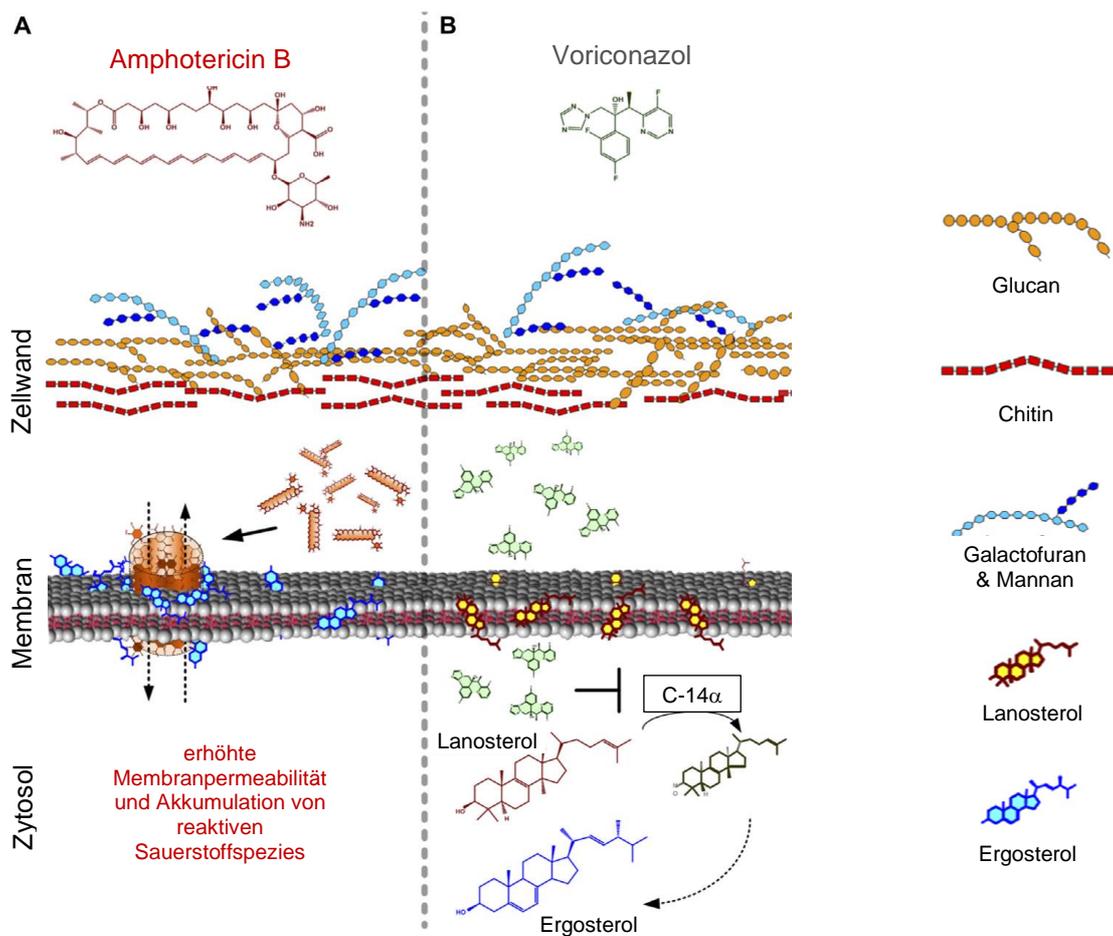


Abbildung 1.2: Wirkmechanismen von Amphotericin B (A) und Voriconazol (B)

(A) Amphotericin B bindet an Ergosterol in der Pilzmembran und führt so zu Porenbildung, erhöhter Membranpermeabilität und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies. (B) Voriconazol inhibiert die Ergosterol-Synthese durch Hemmung der Cytochrom-P450-abhängigen C-14 α -Demethylase, sodass weniger Ergosterol und mehr Lanosterol in die Plasmamembran eingebaut wird. C-14 α = C-14 α -Demethylase. Die Abbildung wurde aus Valiante et al. (2015) übernommen und modifiziert.

1.1.4.1 Voriconazol

Gemäß den aktuellen Leitlinien der ESCMID, der Europäischen Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten, wird empfohlen, für die Erstlinientherapie bei IA als Mittel der Wahl das Azol Voriconazol einzusetzen und dabei Plasmakonzentrationen zwischen 1 und 5,5 mg/l anzustreben (Ullmann et al., 2018). In verschiedenen Studien zeigten sich hierunter Ansprechraten von etwa 60 % (Denning et al., 2002; Jacobs et al., 2012). Voriconazol inhibiert die Cytochrom-P450-abhängige C-14 α -Demethylase und verhindert somit die Ergosterol-Synthese aus Lanosterol in der Pilzzelle. Ergosterol ist ein essentieller Bestandteil der inneren Plasmamembran von Pilzen, die nun nicht mehr adäquat aufgebaut werden kann (Ben-Ami et al., 2008). Stattdessen reichert sich Lanosterol in der Plasmamembran an, sodass Voriconazol gegenüber *A. fumigatus* insgesamt fungizid wirkt (Theuretzbacher et al., 2006; Valiante et al., 2015). Große Nachteile zeigen sich in der hohen interindividuellen Variabilität der Plasmakonzentrationen sowie in zahlreichen Wechselwirkungen von Voriconazol mit anderen Wirkstoffen, weshalb eine Überwachung bei Gabe des Medikaments unbedingt in Betracht gezogen werden sollte (Mousset et al., 2014). Zusätzlich kann der Einsatz von Voriconazol zu diversen Nebenwirkungen führen, darunter Hepatotoxizität, Neurotoxizität sowie Übelkeit und Erbrechen (Elewa et al., 2015).

Als gleichwertige Alternative zu Voriconazol für die Erstlinientherapie wird inzwischen auch der Einsatz von Isavuconazol angesehen (Ullmann et al., 2018). Andere Medikamente aus dieser Gruppe, wie Posaconazol oder Itraconazol, spielen v. a. für die antimykotische Primärprophylaxe bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien eine Rolle (Mellinghoff et al., 2018).

1.1.4.2 Amphotericin B – desoxycholat und liposomal

Der fungizide Wirkmechanismus des Polyens Amphotericin B (AmB) beruht auf einer Porenbildung in der inneren Plasmamembran durch Bindung an Ergosterol, sodass Kalium und andere intrazelluläre Moleküle austreten können (Ben-Ami et al., 2008). Außerdem führt es zu einer intrazellulären Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies in der Pilzzelle, die eine zusätzliche Toxizität vermitteln (Valiante et al., 2015). Daneben bindet AmB, wenn auch weniger stark, an humanes Cholesterol und wirkt somit auch toxisch auf menschliche Zellen (Holz, 1974; Odds et al., 2003). Bis 2002 war Amphotericin B - Desoxycholat (d-AmB) Goldstandard in der Therapie von IA, wobei mittlere Plasmaspiegel von 0,1 – 1 µg/ml erzielt wurden (Atkinson & Bennett, 1978; Fields et al., 1970; Mousset et al., 2014; Stahlmann et al., 2017). Auf Grund von Infusionsreaktionen, starker Nephrotoxizität und schlechterer Wirksamkeit gegenüber Voriconazol wird von der Verwendung dieses Medikaments abgeraten (Hamill, 2013; Herbrecht et al., 2002; Ullmann et al., 2018).

Mittlerweile wird für die Erstlinientherapie der IA nach Voriconazol und Isavuconazol der Einsatz von liposomalem Amphotericin B (LAmB) mit einer täglichen Dosis von 3 mg/kg empfohlen (Ullmann et al., 2018). In mehreren Studien konnten Ansprechraten zwischen 12 und 61 % erzielt werden (Cordonnier et al., 2007; Hachem et al., 2008; Ostrosky-Zeichner et al., 2003). Desweiteren ist es die wichtigste Alternative bei Versagen des ersten Therapieregimes oder bei bekannten Resistenzen gegenüber Azolen (Ullmann et al., 2018). Liposomal bedeutet in diesem Fall, dass der Wirkstoff in einer lipidlöslichen Hülle eingeschlossen ist und infolgedessen im Vergleich zu d-AmB weniger toxische Nebenwirkungen auftreten sowie ein höherer Plasmaspitzenwert bei mittleren Blutspiegeln von 10 – 80 µg/ml erreicht wird (Hamill, 2013; Sculier et al., 1989; Tiphine et al., 1999). Für weitere liposomale Formulierungen wie *Amphotericin B lipid complex* fehlen noch ausreichend Daten zur Verwendung als Erstlinientherapie, andere wie *Amphotericin B colloidal dispersion* sind wegen erhöhter Gefahr von Infusionsreaktionen aktuell nicht mehr kommerziell erhältlich (Hamill, 2013; Mousset et al., 2014).

1.2 Neutrophile Granulozyten und deren Effektormechanismen als Teil der angeborenen Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus*

1.2.1 Eigenschaften neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (Neutrophile oder PMN, *polymorph nuclear neutrophils*) spielen für das menschliche Immunsystem eine bedeutende Rolle. Als Teil der angeborenen Immunität sind sie eine der ersten Zellen, die an den Ort einer Infektion rekrutiert werden und bilden so eine wirkungsvolle Erstabwehr gegenüber pathogenen Mikroorganismen (Summers et al., 2010).

Generell werden drei Arten von polymorphkernigen Granulozyten, die den Hauptanteil aller Leukozyten in immunkompetenten Personen stellen, unterschieden: neutrophile, eosinophile und basophile. Dabei bilden neutrophile Granulozyten die größte Fraktion dieser drei Zellarten mit etwa 90 % (Kaufmann, 2014b). PMN enthalten zahlreiche biologisch aktive Moleküle wie Proteasen und antimikrobielle Enzyme in einer Vielzahl von Granula, die nacheinander während der Granulopoese gebildet werden. In ihren primären oder azurophilen Granula finden sich das Enzym Myeloperoxidase (MPO) sowie antimikrobielle Proteine wie Cathepsin G, Elastase oder Proteinase 3. Sekundäre oder spezifische Granula beinhalten v. a. Lysozym und Laktoferrin, während tertiäre oder Gelatinase-Granula die Metalloprotease 9 enthalten (Borregaard, 2010).

Jeden Tag werden etwa $5 - 10 \times 10^{10}$ neutrophile Granulozyten im Knochenmark produziert (Summers et al., 2010). Nach der Reifung zirkulieren diese normalerweise im Blut und werden durch verschiedene Botenstoffe, sogenannte Chemokine, an den Ort einer Infektion gelockt (Geering et al., 2013). Durch Diapedese mit Rollen, Adhäsion, Kriechen und transendothelialer Migration gelingt ihnen schließlich der Austritt aus dem Blut und der Übertritt in das entzündete Gewebe (Kolaczowska & Kubes, 2013). Während der Entzündungsphase kann sich ihre Lebensdauer durch aktivierende Substanzen wie Zytokine, aber auch durch mikrobielle Antigene verlängern (Colotta et al., 1992). Im Blutkreislauf besitzen neutrophile Granulozyten normalerweise eine

Überlebenszeit von lediglich 6 – 8 h, wobei einzelne Studien auch eine mehrtägige Zirkulationszeit beschreiben (Heinekamp et al., 2015; Pillay et al., 2010). Um die Gewebshomöostase sicherzustellen und Entzündungsvorgänge zu limitieren, ist die anschließende Elimination von zirkulierenden PMN unerlässlich. Die genauen Abläufe sind komplex und bedürfen weiterer Studien, sollen jedoch u. a. Apoptose und Beseitigung durch Makrophagen (Efferozytose) nach Extravasation ins Gewebe, reverse Migration aus peripheren Organen zurück in den Blutkreislauf und Rückkehr älterer PMN ins Knochenmark einschließen (Kruger et al., 2015).

1.2.2 Bedeutung in der Immunabwehr gegenüber *Aspergillus fumigatus*

Zur effizienten Abwehr von *A. fumigatus*, dem häufigsten Erreger von IA, sind neutrophile Granulozyten unerlässlich. Dies zeigt alleine die Tatsache, dass neutropenische Patienten das höchste Risiko besitzen, eine IA zu entwickeln (Balloy & Chignard, 2009). Auch in einem Mausmodell wurde ihr Stellenwert veranschaulicht: Mit Konidien von *A. fumigatus* infizierte Mäuse ohne neutrophile Granulozyten wiesen hohe Mortalitätsraten auf, wohingegen infizierte Mäuse ohne Makrophagen zu 100 % überlebten (Mircescu et al., 2009).

Nach Inhalation von *A. fumigatus*-Konidien kommt es zunächst zu einer unspezifischen Abwehr durch mukoziliäre Transportmechanismen der oberen Atemwege sowie durch alveolare Epithelzellen, die antimikrobielle Moleküle wie Defensine sezernieren und auch als nicht-professionelle Phagozyten agieren können (Dagenais & Keller, 2009; Krappmann, 2016). In den Alveolen der Lunge treffen die Konidien außerdem auf residente, professionelle Makrophagen, die in der Lage sind, das Pathogen zu erkennen und zu phagozytieren. So können innerhalb von 30 h etwa 90 % der Konidien abgetötet werden. Makrophagen und Epithelzellen rekrutieren darüber hinaus durch Ausschüttung von Chemokinen andere Zellen, darunter v. a. neutrophile Granulozyten, an den Ort der Infektion (Balloy & Chignard, 2009; Heinekamp et al., 2015). Konidien sowie kurze Keimschläuche, die der ersten Verteidigungslinie entkommen sind, können nun von neutrophilen Granulozyten registriert und nach dem Phagozytose-Vorgang

intrazellulär abgetötet werden (McCormick, Loeffler, et al., 2010). Im Gegensatz zu Alveolarmakrophagen läuft dieser Abtötungsvorgang durch PMN sofort und sehr schnell ab (Park & Mehrad, 2009).

Die weitaus bedeutsamere Aufgabe neutrophiler Granulozyten besteht aber darin, ausgekeimte Hyphen, die auf Grund ihrer Größe nicht phagozytiert werden konnten, extrazellulär zu eliminieren. Dafür lagern sich die Zellen dicht an die Oberfläche von Hyphen an, um durch einen möglichst engen Kontakt weitere antimikrobielle Mechanismen gezielt an den Pilzstrukturen entfalten zu können (Boyle et al., 2012; Latge, 1999; Park & Mehrad, 2009). Dabei spielen die extrazelluläre Freisetzung der granulären Komponenten (Degranulation), Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Ausbildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) eine wichtige Rolle (Heinekamp et al., 2015). Nach ihrer Aktivierung sind PMN außerdem in der Lage, eine Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen zu bilden (Scapini et al., 2000). Das Chemokin Interleukin-8 wird hierbei in größeren Mengen sezerniert und ist in diesem Kontext besonders hervorzuheben (Hellmann et al., 2017).

Im Folgenden sollen einige der Effektormechanismen neutrophiler Granulozyten genauer erläutert werden (Abb. 1.3).

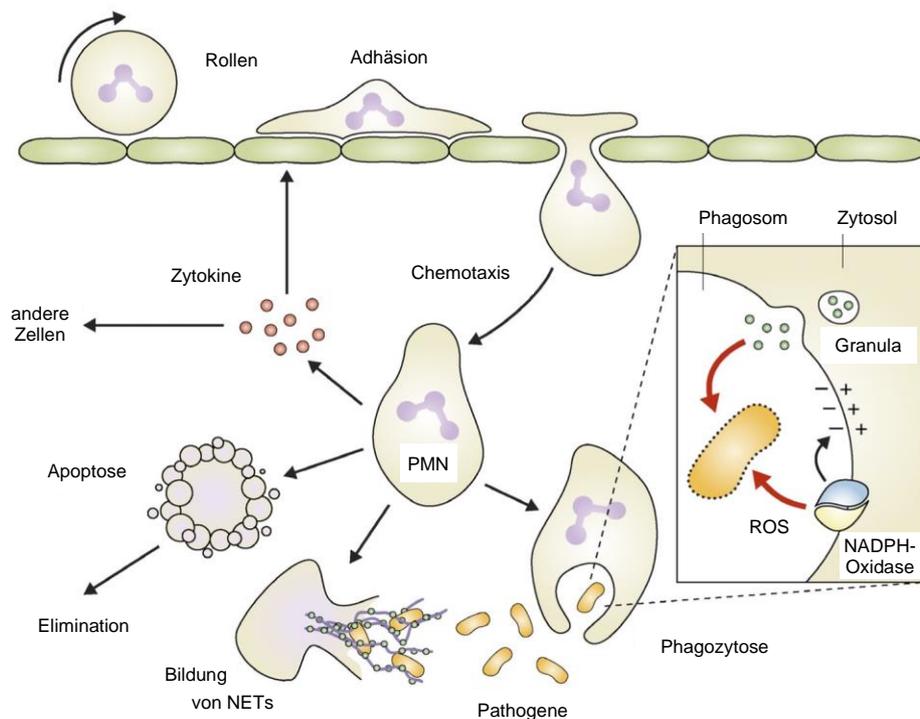


Abbildung 1.3: Überblick über verschiedene Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten

Nach Übertritt in das Gewebe und Migration an den Ort der Infektion sind neutrophile Granulozyten (PMN) in der Lage, eine Vielzahl an Effektormechanismen zu entfalten. Dazu gehören die Phagozytose von Pathogenen, Degranulation von Proteasen und antimikrobiellen Enzymen, Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase, Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) sowie die Sekretion von Zytokinen. Die Abbildung wurde aus Mocsai (2013) entnommen und modifiziert.

1.2.3 Interleukin 8

Zytokine dienen der Kommunikation auf zellulärer Ebene und regulieren so eine Vielzahl biologischer Aktivitäten. Zu ihnen gehören die Chemokine, deren Hauptfunktion darin besteht, gerichtete Migration auszulösen und damit Leukozyten zu rekrutieren. Sie können anhand ihrer Cysteinreste hauptsächlich in zwei große Klassen eingeteilt werden: die CC-Familie, bei der die ersten beiden Cysteine direkt aufeinander folgen, sowie die CXC-Familie, bei der diese durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind. Letztere können weiter unterteilt werden in Abhängigkeit davon, ob die aus drei Aminosäuren bestehende Sequenz Glu-Leu-Arg enthalten ist (ELR+) oder nicht (ELR-) (Commins et al., 2010). CXC/ELR+ Mitglieder zeichnen sich durch ihre chemotaktische Wirkung auf PMN aus, während dies bei CXC/ELR- nicht der Fall ist. Zu der CXC/ELR+ Gruppe zählt das Interleukin 8 (IL-8 oder CXCL-8).

Das hauptsächliche Ziel von IL-8 stellen neutrophile Granulozyten dar, welche für diesen Liganden zwei Rezeptoren, CXCR1 und CXCR2, exprimieren (Scapini et al., 2000). IL-8 gehört zu den entscheidendsten Chemokinen, die PMN an den Ort einer Infektion locken (Kobayashi, 2008). Es weist zwar auch einen chemotaktischen Effekt auf basophile Granulozyten und T-Lymphozyten auf, wirkt dabei aber bei weitem nicht so potent auf diese Zelltypen (Scapini et al., 2000). Die Bildung von IL-8 ist durch viele Zelltypen möglich, darunter Epi- und Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten (Baggiolini & Clark-Lewis, 1992).

Neben der Chemotaxis führt IL-8 noch zu einer Reihe weiterer Wirkungen in PMN, wie z. B. die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche, Anheftung an Endothelzellen, Degranulation der Lysosomen mit Freisetzung der Enzyme, Produktion von ROS sowie Bildung von NETs (Balloy & Chignard, 2009; Fuchs et al., 2007).

Neutrophile Granulozyten sind aber auch in der Lage, Chemokine selbst zu generieren und zu sezernieren. Vor mittlerweile fast 30 Jahren konnte dies für IL-8 als erstes Chemokin in PMN aufgezeigt werden (Bazzoni et al., 1991; Strieter et al., 1990). Dadurch können sie sich selbst autokrin am Ort des Geschehens zu ihren Effektorfunktionen anregen und eine größere Anzahl von PMN und andere Leukozyten an den Infektionsherd rekrutieren. Die Stimuli, die eine IL-8-Freisetzung auslösen können, sind vielzählig und beinhalten u. a. weitere Zytokine und Chemokine, proteolytische Enzyme oder Oberflächenmoleküle von Bakterien, Viren und Pilzen (Scapini et al., 2000). Auch durch Stimulation mit *A. fumigatus*-Antigenen konnte eine Hochregulierung von IL-8 in PMN gezeigt werden (Braedel et al., 2004; Hellmann et al., 2017).

IL-8 wird dabei in größeren Mengen von PMN produziert, wobei neu synthetisiertes IL-8 nicht sofort sezerniert werden muss, sondern zellgebunden gespeichert werden kann (Kuhns & Gallin, 1995). Die Freisetzung des Chemokins beginnt nach etwa 1 h, gefolgt von einer langsamen Zunahme über 5 – 6 h, um schließlich bis 18 – 24 h nach Stimulation anzusteigen (Kasama et al., 1994). All diese Beobachtungen resultieren in der Annahme, dass die Sekretion von IL-8 eine stereotype, sofortige Antwort der PMN auf jedwede Art von Pathogen darstellt, um somit bereits in der frühen Phase jederzeit auf eine Infektion mit einer vermehrten Rekrutierung von weiteren Immunzellen reagieren zu können (Scapini et al., 2000).

1.2.4 Erkennung und Phagozytose

Nach ihrer Rekrutierung an den Ort der Infektion sind neutrophile Granulozyten in der Lage, das Pathogen zu phagozytieren und intrazellulär abzutöten. Immunzellen können über verschiedene Rezeptoren, sogenannte PRRs

(*pathogen recognition receptors*), verschiedene immunogene Moleküle, sogenannte PAMPs (*pathogen-associated patterns*), auf der Oberfläche pathogener Mikroorganismen erkennen (Janeway & Medzhitov, 2002). Die Stimulation dieser Rezeptoren zieht über verschiedene intrazelluläre Signalwege wiederum eine Aktivierung spezifischer Effektormechanismen nach sich (Romani, 2011). In der Erkennung von *A. fumigatus* spielen nach heutiger Kenntnis v. a. die PRRs Dectin-1 und die *Toll-Like*-Rezeptoren (TLR) TLR-2 und TLR-4 eine Rolle, die auch von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden und dem Immunsystem erlauben, zwischen verschiedenen Morphologien und Zellwandkomponenten zu unterscheiden (McCormick, Loeffler, et al., 2010; Thywissen et al., 2011). Dectin-1 kann spezifisch an seinen in der Zellwand von *A. fumigatus* enthaltenen Liganden β -1,3-Glucan binden und ist damit ein wichtiger Rezeptor in der Erkennung dieses Pilzes. Die Anfälligkeit von Dectin-1-defizienten Mäusen gegenüber *Aspergillus*-Infektionen demonstriert die essentielle Bedeutung dieses Rezeptors (Werner et al., 2009). Die Aktivierung von Dectin-1 führt schließlich zu verstärkter Phagozytose, Zytokinproduktion und Sekretion von ROS (Levitz, 2010).

Durch ihre umgebende Schicht aus hydrophoben RodletA (RodA)-Proteinen entgehen ruhende Konidien weitgehend der Immunantwort, da PAMPs unter der schützenden Hülle kaum detektierbar sind, was zu einer sehr limitierten, proinflammatorischen Antwort führt (Aimanianda et al., 2009; Wurster et al., 2017). Auch der Pigmentfarbstoff 1,8-Dihydroxynaphthalen (DHN)-Melanin auf der Oberfläche der Konidien von *A. fumigatus* trägt dazu bei, eine PAMP-induzierte Immunantwort zu maskieren (Bayry et al., 2014). Trotz dieser Tatsache können sowohl schwellende als auch ruhende Konidien von neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden (Balloy & Chignard, 2009; Boyle et al., 2012). Dafür werden vorwiegend lösliche Faktoren wie Komplementfaktoren und Akute-Phase-Proteine verantwortlich gemacht, die auch an die geschützte Oberfläche ruhender Konidien binden und damit eine Immunreaktion vermitteln können (Wong & Aimanianda, 2017).

Nur wenige Sekunden nach Ingestion eines Pathogens kommt es zur Fusion mit primären und sekundären Granula der PMN zum sogenannten Phagosom und

zum Einbau der Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase in dessen Membran (Kapitel 1.2.5; Kruger et al., 2015; Segal et al., 1980). Dort können die enthaltenen antimikrobiellen Enzyme sowie die generierten ROS ihre schädigende Wirkung entfalten (Boyle et al., 2012). Nach weiteren wenigen Minuten fusionieren Lysosomen mit dem Phagosom und führen zu einer Ansäuerung des Inhalts, damit die enthaltenen sauren Hydrolasen wirken können (Hasenberg et al., 2011; Thywissen et al., 2011). Ruhende Konidien sind allerdings vorwiegend resistent gegen diese intrazellulären Abtötungsmechanismen (Levitz & Diamond, 1985). DHN-Melanin kann beispielsweise die Produktion von ROS und ebenso die Ansäuerung des Phagosoms in PMN verhindern (Jahn et al., 2000; Thywissen et al., 2011). Erst durch fortschreitende Keimung kommt es zu einer Degradation der RodA- und Melaninschicht sowie der Freilegung darunter liegender immunogener Moleküle der Zellwand, was eine effiziente Rezeptor-Pathogen-Interaktion möglich macht (Chai et al., 2010; Latge, 2010). Dies ist also Voraussetzung für eine effektive Abtötung und führt zu erhöhter Suszeptibilität der keimenden Konidien gegenüber neutrophilen Abtötungsmechanismen (Levitz & Diamond, 1985; Philippe et al., 2003).

1.2.5 Oxidativer *Burst*

Neutrophile Granulozyten besitzen die Fähigkeit zum respiratorischen oder oxidativen *Burst*. Diese Bezeichnung beruht auf Untersuchungen von 1933, bei denen während der Phagozytose von Pathogenen durch PMN der Sauerstoffverbrauch dramatisch anstieg (Baldrige & Gerard, 1933). PMN enthalten in ihrer Membran den Enzym-Komplex NADPH-Oxidase, der molekularen Sauerstoff in Hyperoxid-Anionen (O_2^-) umsetzt. Daraus wiederum katalysieren weitere Enzyme, darunter MPO aus den primären Granula der PMN, die Bildung von hochreaktiven Substanzen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), hypochlorige Säure (HClO) und Hydroxyl-Radikale ($HO\cdot$). Diese reaktiven Sauerstoffspezies reagieren mit mikrobiellen Komponenten wie Fett- und Nukleinsäuren und wirken dadurch toxisch. Die Freisetzung der ROS kann

hierbei sowohl intrazellulär in das Phagosom als auch extrazellulär erfolgen, was wichtig für die Bekämpfung verschiedener Morphologien von Pathogenen ist (Kapitel 1.2.2; Nguyen et al., 2017). Innerhalb von 2 h können so beispielsweise 50 % der Hyphen von *Aspergillus* zerstört werden (Roilides et al., 1993).

PMN sind auch in der Lage, reaktive Stickstoffmetaboliten zu bilden. Diese können mit ROS reagieren und so weitere toxische Produkte wie Peroxynitrit bilden (Bogdan et al., 2000). Inwieweit diese Metaboliten und das stickoxidgenerierende Enzym NO-Synthase allerdings eine Rolle in der Keimabtötung beim Menschen spielen, ist noch weitgehend unklar (Kaufmann, 2014a).

Patienten mit CGD weisen einen Defekt im Enzym NADPH-Oxidase bzw. u. a. in deren Untereinheit gp91^{phox} auf und erkranken besonders schwer an invasiven Pilzinfektionen (van den Berg et al., 2009). PMN dieser Patienten bzw. von gp91^{phox}-defizienten Mäusen zeigen stark beeinträchtigte antifungale Aktivität gegenüber *A. fumigatus* auf (Gazendam, van Hamme, et al., 2016; Pollock et al., 1995; Rex et al., 1990). Dies führte lange Zeit mit zu der Annahme, dass ROS entscheidend für die Abtötung von *Aspergillus*-Spezies seien.

Neben der direkten toxischen Wirkung soll die Aktivierung der NADPH-Oxidase auch als Stimulus für die Freisetzung der granulären Komponenten, Ausbildung von NETs und Sekretion proinflammatorischer Zytokine dienen (Nguyen et al., 2017). Miralda et al. (2017) stellten die These auf, dass diese nachgelagerten Effekte die eigentliche antimikrobielle Wirkweise der ROS darstellen und nicht der direkte Schaden durch die Substanzen selbst. Dies untermauern auch Studien, bei denen *Afyap1*- bzw. *sod1/sod2/sod3*-Deletionsmutanten von *A. fumigatus* die gleiche Virulenz besaßen wie ihre Wildtypen, obwohl sie durch die Ausschaltung dieser Gene eine drastisch erhöhte Anfälligkeit gegenüber ROS aufwiesen (Lambou et al., 2010; Lessing et al., 2007). Trotz der dominanten Rolle von *A. fumigatus*-Infektionen bei CGD-Patienten wird die Bedeutung der ROS für die direkte Abtötung dieses Pathogens also immer noch kontrovers diskutiert.

1.2.6 Bildung von *neutrophil extracellular traps*

Seit langem ist bekannt, dass Eiter aus Bakterien, toten Neutrophilen sowie DNA besteht. Hierbei wurde angenommen, dass die DNA unbeabsichtigt während des Sterbeprozesses auf Grund des Aufbruchs der Zellmembran passiv freigesetzt wird (Hasenberg et al., 2011). 2004 wurde von Brinkmann et al. jedoch ein neuartiger Mechanismus beschrieben, bei dem PMN nach Stimulation netzartige Strukturen aus DNA aktiv auswarfen, um damit extrazellulär Bakterien einzukapseln. Es wurde vermutet, dass diese *neutrophil extracellular traps*, kurz NETs, Mikroorganismen fixieren, diese an der Verbreitung hindern und antimikrobielle Moleküle konzentriert am Pathogen wirken lassen können. Dadurch sollen sie in der Lage sein, Virulenzfaktoren zu degradieren und den Mikroorganismus abzutöten.

Neben dekondensiertem Chromatin aus DNA bestehen NETs vorwiegend aus Histonen und granulären Proteinen, wie beispielsweise neutrophile Elastase, Cathepsin G, MPO und Lactoferrin. Auch der Chelator Calprotectin ist essentieller Bestandteil der NETs und bindet normalerweise freies Zink, das wichtig für das weitere Wachstum von Pathogenen ist (Urban et al., 2009). Wurde das Calprotectin in NETs spezifisch blockiert, konnte die Keimung von *Aspergillus nidulans* nicht effektiv verhindert werden (Bianchi et al., 2011). Durch Zugabe von Zink konnte die Wachstumsfähigkeit von *A. fumigatus*-Hyphen erneuert werden (McCormick, Heesemann, et al., 2010).

Die Bildung der NETs wurde als eine Form des Zelltods von PMN beschrieben, dessen ganzer Prozess *in-vitro* einige Stunden dauern kann (Fuchs et al., 2007). Dabei führt ein Zusammenspiel aus neutrophiler Elastase und MPO aus den Granula zu einer Spaltung der Histone im Nucleus und schließlich zur Dekondensation des Chromatins (Papayannopoulos et al., 2010). In eosinophilen Granulozyten konnte ein ähnlicher Vorgang beobachtet werden, bei dem die Masse jedoch innerhalb weniger Sekunden ausgeworfen wurde, aus mitochondrialer und nicht nukleärer DNA bestand und die Zellen dabei keinen Zelltod erlitten (Yousefi et al., 2008). Mittlerweile konnte auch für neutrophile Granulozyten *in-vivo* und *in-vitro* gezeigt werden, dass sie zu einer schnellen

Freisetzung der NETs aus mitochondrialer oder nukleärer DNA fähig sind und dabei nicht lysieren (Pilszczek et al., 2010; Yipp et al., 2012; Yousefi et al., 2009). Weshalb schlussendlich einige Zellen dabei zu Grunde gehen und manche den Vorgang überleben, ist noch ungeklärt.

Es wird angenommen, dass ROS eine wichtige Rolle in der Bildung von NETs spielen. Eine verminderte NET-Bildung wurde in Neutrophilen von CGD Patienten oder jenen mit einer gestörten ROS-Produktion beobachtet (Fuchs et al., 2007; Yousefi et al., 2009). Durch Zugabe eines alternativen ROS-produzierenden Enzyms *in-vitro* waren sie jedoch wieder zur Bildung von NETs in der Lage (Fuchs et al., 2007). In einem konkreten Fall konnte durch Gentherapie bei einem CGD-Patienten mit IA die Fähigkeit, NETs zu generieren, ebenfalls wiederhergestellt und eine Heilung erreicht werden (Bianchi et al., 2009; Bianchi et al., 2011). Andere Studien zeigen, dass die NADPH-Oxidase nicht unbedingt zur NET-Bildung erforderlich, sondern dies abhängig vom Stimulus ist (Parker et al., 2012). Möglicherweise gibt es sowohl NADPH-Oxidase-abhängige sowie -unabhängige Formen der NET-Bildung (Gazendam, van de Geer, et al., 2016).

Durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Lipopolysaccharide (LPS) und IL-8 kann die Generierung der NETs induziert werden (Fuchs et al., 2007), und sowohl Konidien als auch Hyphen von *A. fumigatus* stellen einen Stimulus für diesen Mechanismus dar (McCormick, Heesemann, et al., 2010). Bruns et al. (2010) beobachteten jedoch eine verminderte Bildung der NETs gegenüber Konidien und machten die umgebende RodA-Schicht dafür verantwortlich.

Auf Grund ihrer adhäsiven und elastischen Eigenschaften besteht die offensichtliche Funktion der NETs also darin, Pathogene einzufangen, zu fixieren und ihre Ausbreitung zu verhindern (Hasenberg et al., 2011). Inwieweit NETs jedoch tatsächlich die Fähigkeit zur direkten Abtötung besitzen, ist fraglich und Gegenstand reger Diskussionen. In NETs gefangene Pathogene überlebten und konnten weiter proliferieren, nachdem sie durch Zugabe von DNase aus den NETs befreit wurden (Menegazzi et al., 2012). Das Enzym DNase ermöglicht es Pathogenen, DNA zu spalten und damit NETs zu zerstören (Beiter et al., 2006). Auch die Zugabe von DNase zu PMN, die mit Hyphen von *A. fumigatus*

konfrontiert wurden, verminderte zwar die NET-Sekretion, dies hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Hyphen (Gazendam, van Hamme, et al., 2016). Auch in den Studien von Bruns et al. (2010) und McCormick, Heesemann, et al. (2010) konnten den NETs keine abtötenden Eigenschaften, sondern nur fungistatische Effekte durch eine Wachstumsinhibition der Keimschläuche von *A. fumigatus* nachgewiesen werden.

1.3 Immunsuppression bei akuter *Graft-versus-Host*-Erkrankung

1.3.1 GvHD nach allogener Stammzelltransplantation

Zur Behandlung von Leukämien sowie angeborenen und erworbenen Knochenmarkinsuffizienzen wird heutzutage v. a. das Verfahren der allogenen Blutstammzelltransplantation oder Knochenmarktransplantation angewandt (Gyurkocza et al., 2010). Allogen bedeutet, dass die Stammzellen von einem anderen, gesunden Menschen übertragen werden (Piper, 2013). Dadurch wird das körpereigene, hämatopoetische System nach vorbereitender Radio- oder Chemotherapie durch dasjenige des Spenders ersetzt, sodass durch die Aktivität des übertragenen Spender-Immunsystems die eigenen, übrig gebliebenen Tumorzellen angegriffen und vernichtet werden können (sogenannter *Graft-versus*-Leukämie-Effekt). Dabei gilt es, durch immunsuppressive Prophylaxe eine überschießende Immunantwort und somit eine Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion bzw. *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) zu verhindern (Negrin, 2015). Die immunsuppressive Behandlung sowie die GvHD selbst schwächen allerdings auch protektive Immunreaktionen ab, sodass es zu einer verminderten Infektabwehr mit vermehrtem Auftreten von opportunistischen Infektionen kommt (Kapitel 1.1.3; Graefe, 2016). Invasive Pilzinfektion stellen hierbei eine der häufigsten infektiösen Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation mit Letalitätsraten von bis zu 80 % dar (Sun et al., 2012). Die Wahrscheinlichkeit, nach allogener Stammzelltransplantation eine IA zu entwickeln, liegt bei 4 – 10 %

(Jantunen et al., 2002). Gemäß Morgan et al. (2005) beträgt die Letalitätsrate hierbei sogar über 80 %.

1.3.2 Klinik und Risikofaktoren der GvHD

Bei der akuten GvHD handelt es sich um eine systemische, entzündliche Erkrankung, die als Komplikation nach allogener Blutstammzelltransplantation oder Knochenmarktransplantation auftritt (Piper, 2013). Ihre Prävalenz hängt direkt vom Grad der Kompatibilität von Spender und Empfänger ab, die durch das humane Leukozyten-Antigen (HLA) bestimmt wird, und variiert deshalb zwischen 35 und 80 % (Ferrara et al., 2009). In den letzten Jahren wurden neben der mangelnden Übereinstimmung der HLA viele weitere Risikofaktoren identifiziert, die das Auftreten einer akuten GvHD wahrscheinlicher machen. Dazu gehören ein höheres Alter von Spender und Empfänger, ein weiblicher Spender mit vorangegangener Schwangerschaft für einen männlichen Empfänger, eine Stammzellquelle aus Blut im Gegensatz zu Knochenmark sowie eine Ganzkörperbestrahlung im Rahmen der vorbereitenden Radiotherapie.

Die akute GvHD tritt meist innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auf und betrifft hauptsächlich drei Organe: die Haut, den Darm und die Leber (Jacobsohn & Vogelsang, 2007). Ein Auftreten nach 100 Tagen wird als *late-onset*, persistierende und rekurrende akute GvHD definiert oder schließlich als chronische GvHD angesehen (Filipovich et al., 2005). Üblicherweise ist bei Ausbruch der akuten GvHD zuerst die Haut befallen, was sich häufig im klinischen Bild eines makulopapulösen Exanthems zeigt. Typisch für den Darm-Befall sind wässrige bis blutige Diarrhoen mit krampfartigen Abdominalschmerzen, während eine Beteiligung der Leber klinisch als Ikterus und Hepatitis in Erscheinung tritt (Jacobsohn & Vogelsang, 2007). Insgesamt ergibt sich v. a. für die schweren Verlaufsformen der akuten GvHD eine schlechte Prognose mit 5-Jahres-Überlebensraten von 5 – 25 % (Ferrara et al., 2009).

1.3.3 Pathophysiologie der akuten GvHD

Grundsätzlich wird eine akute GvHD durch eine Reaktion der Spenderzellen gegen das Empfängergewebe charakterisiert. T-Lymphozyten des Spenders übernehmen dabei die wesentliche Rolle in der Entstehung dieser Krankheit, deren Ausprägung direkt von der Anzahl übertragener T-Lymphozyten abhängt (Kernan et al., 1986). Ferrara et al. (2009) beschreiben drei Phasen der Entstehung: In der ersten Phase wird Empfängergewebe durch vorbereitende Radio- oder Chemotherapien geschädigt, sodass vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α freigesetzt werden. Durch die daraus resultierende Stimulierung von Antigen-präsentierenden-Zellen erfolgt in Phase zwei die Aktivierung von Spender-T-Zellen, die das Gewebe des Empfängers als fremd erkennen. In Phase drei vermittelt die Differenzierung der Spender-T-Zellen schließlich über Zytotoxische T-Zellen, Natürliche Killerzellen und Produktion weiterer schädigender Zytokine, v. a. TNF- α , die Zerstörung des Empfängergewebes. Eine neuere Studie konnte aufzeigen, dass neben T-Zellen auch neutrophile Granulozyten eine Rolle in der Pathogenese der GvHD spielen (Schwab et al., 2014).

Durch Depletion der T-Zellen aus dem Transplantat kann das Risiko einer GvHD gemindert werden. Dies führt jedoch zum Ausbleiben des *Graft-versus-Leukämie*-Effekts und damit zu erhöhten Rezidivraten (Apperley et al., 1988). Umgekehrt konnte aufgezeigt werden, dass das Auftreten einer GvHD wiederum die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs senkt (Weiden et al., 1979). Patienten können somit durchaus in einem gewissen Grad von einer GvHD profitieren (Piper, 2013). Entscheidend für den Heilerfolg ist also, eine ausgewogene Balance zwischen einer größtmöglichen Begrenzung des GvHD-Risikos und einer maximalen Wirkung des *Graft-versus-Leukämie*-Effekts herzustellen (Negrin, 2015). Diese Steuerung kann v. a. durch die adäquate Dosierung von Immunsuppressiva erzielt werden.

1.3.4 Immunsuppressive Prophylaxe

Nach erfolgter Transplantation muss der Patient über einen Zeitraum von 3 bis 6 Monaten immunsuppressive Medikamente einnehmen, um das Auftreten einer GvHD zu verhindern (Graefe, 2016). Durch vorhandene Risikofaktoren können hierbei die Intensität und Dauer der GvHD-Prophylaxe genauer abgeschätzt werden. Gemäß den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO) soll zur Standardprophylaxe eine Kombination eines Calcineurin-Inhibitors wie Ciclosporin A (CsA) oder Tacrolimus mit Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil (MMF) eingesetzt werden (Zeiser et al., 2019). In der Mehrzahl der Fälle wird der Wirkstoff CsA zusammen mit Methotrexat verabreicht (Zeiser & Blazar, 2017). Neuere Studien konnten jedoch aufzeigen, dass die Kombination aus CsA/MMF derjenigen aus CsA/Methotrexat nicht unterlegen und MMF im Vergleich zu Methotrexat weniger toxisch ist, sodass diese Kombination eine wirksame Alternative in der Prophylaxe der GvHD darstellt (Gupta et al., 2016; Hamad et al., 2015; Kharfan-Dabaja et al., 2014; Perkins et al., 2010).

1.3.4.1 Ciclosporin A

Die Wirkung von CsA beruht auf der Unterdrückung einer T-Zell-abhängigen Immunantwort. Es bindet an das zytosolische Rezeptorprotein Cyclophilin und hemmt damit die Phosphataseaktivität von Calcineurin. Auf Grund der fehlenden Dephosphorylierung bleibt die Translokation des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T-cells* (NF-AT) in den Zellkern und damit die NF-AT-vermittelte Produktion von IL-2 aus, das normalerweise ruhende T-Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten aktiviert. Der T-Zell-spezifische NF-AT dabei für die hohe Selektivität der Ciclosporinwirkung verantwortlich. CsA ist v. a. nephrotoxisch, kann zu arterieller Hypertonie sowie Gingivahyperplasie führen und besitzt ein hohes Interaktionspotential mit anderen Medikamenten. Auch auf Grund einer unsicheren Bioverfügbarkeit sollte deshalb eine regelmäßige Kontrolle der Blutspiegel erfolgen, wobei Werte zwischen 100 und 300 ng/ml angestrebt werden (Graefe, 2016). Nach allogener Stammzelltransplantation

werden von der DGHO in der ersten Spiegelbestimmung Werte über 250 ng/ml empfohlen, langfristig therapeutische Zielspiegel von 150 bis 300 ng/ml (Gupta et al., 2017; Zeighami et al., 2014; Zeiser et al., 2019).

1.3.4.2 Mycophenolat-Mofetil

MMF ist ein *Prodrug* und wird erst im Körper in den wirksamen Metaboliten Mycophenolsäure umgewandelt. Dort inhibiert es das Enzym Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), das zur *De-novo*-Synthese von Purinen, einem essentiellen Baustein der DNA, benötigt wird. Für Lymphozyten stellt diese Neusynthese einen überlebenswichtigen Mechanismus dar, da sie ihren Purinbedarf nicht wie viele andere Zellen durch die Wiederverwertung freier Purinbasen im sogenannten *salvage-pathway* decken können. Verstärkt wird dieses Enzym dabei in IL-2 aktivierten T-Zellen und proliferierenden B-Zellen exprimiert, sodass spezifisch diese Zellen in ihrer Proliferation gehemmt werden. Zu den beschriebenen Nebenwirkungen gehören unerwünschte Effekte auf den Gastrointestinaltrakt und das Nervensystem (Graefe, 2016). Nach Transplantationen im Allgemeinen sollen Blutspiegel von 1 – 3,5 µg/ml angestrebt werden. Höhere Werte sind mit vermehrtem Auftreten einer Leukopenie, niedrigere mit einem erhöhten Risiko von akuten Abstoßungsreaktionen assoziiert (Shaw et al., 2001). Für Patienten nach allogener Stammzelltransplantation wird eine Tagesdosis von 2 g i. v. bzw. 2 – 3 g p. o. empfohlen (Zeiser et al., 2016). Damit können im Blut dieser Patienten häufig nur Werte von etwa 0,5 µg/ml erreicht werden, sodass eine häufigere Gabe oder höhere Einzeldosen in Betracht gezogen werden müssen (Harnicar et al., 2015; Jacobson et al., 2005; Jenke et al., 2001; Kiehl et al., 2000; van Hest et al., 2007).

1.3.5 Immunsuppressive Therapie mit Prednisolon

Im Falle einer tatsächlich auftretenden GvHD soll die immunsuppressive Prophylaxe laut DGHO zunächst auf intravenöse Gabe umgestellt und supportive Maßnahmen ergriffen werden. Dazu gehören die Substitution von Flüssigkeit,

eine parenterale Ernährung, die adäquate Therapie von Schmerzen sowie eine antimykotische Prophylaxe (Kapitel 1.1.4.1). Ab einem Schweregrad II (moderat, Hautstadium 1-3, Leberstadium 1, Darmstadium 1, Karnofsky-Index ≥ 70 %) wird unbedingt empfohlen, als Erstlinientherapie eine systemische Medikation mit 2 mg/kg/Tag Prednisolon über 7 Tage mit anschließendem Ausschleichen zu verabreichen. Sprechen Patienten nicht darauf an, was in etwa der Hälfte der Fälle vorkommt, ist eine Zweitlinientherapie mit alternativen Immunsuppressiva erforderlich (Jacobsohn & Vogelsang, 2007; Zeiser et al., 2019).

Prednisolon ist ein Derivat des natürlich vorkommenden Glukokortikoids Kortisol. Durch Bindung an den zytosolischen Glukokortikoid-Rezeptor führt es über einen direkten Einfluss auf die Genexpression zu einer Hemmung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B). In Folge dessen wird die Transkription multipler Gene blockiert, sodass insgesamt eine Vielzahl an zellulären Immunfunktionen und -mediatoren gehemmt werden. Dabei werden nicht nur die Funktionen von T-Lymphozyten und Makrophagen beeinflusst (Graefe, 2016). Laut Hirsch et al. (2012) sollen PMN genauso wie andere Zellarten sensibel gegenüber den genomischen Effekten der Glukokortikoide sein, welche allerdings erst mit einer Latenz von Stunden bis Tage auftreten. Auch akute Effekte innerhalb von Minuten, die v. a. nach höherer Dosierung auftreten, wurden auf verschiedenste Zelltypen beschrieben. Vermutet werden hierbei eine Vermittlung der Glukokortikoid-Wirkung über spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche sowie nicht-rezeptorvermittelte, membranstabilisierende Eigenschaften des Pharmakons (Buttgereit et al., 1998). V. a. nach längerer Überdosierung muss mit unerwünschten Nebenwirkungen wie Hautatrophie, arterieller Hypertonie, Diabetes und Osteoporose gerechnet werden (Graefe, 2016). Eine Kontrolle der Blutspiegel ist hier nicht nötig, diese bewegen sich in Bereichen zwischen 50 und 600 ng/ml (Bergmann et al., 2012; Faure et al., 1998; Rose et al., 1981).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Neutrophile Granulozyten sind essentiell in der Abwehr invasiver Pilzinfektionen. Sie besitzen eine Vielzahl an antifungalen Abwehrmechanismen und tragen außerdem durch die Sekretion von Chemokinen zur Regulation des Immunsystems bei. Neutropenie ist demnach der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung einer IA. Darüber hinaus sind v. a. Patienten mit immunsuppressiver Langzeit-Therapie, z. B. zur Prophylaxe und Therapie der akuten GvHD nach allogener Stammzelltransplantation, besonders gefährdet. Dabei geht die Erkrankung in diesem Patientenkollektiv trotz des Einsatzes verschiedener Antimykotika-Klassen immer noch mit einer hohen Letalität einher (Hasenberg et al., 2011). Unerklärlich ist hierbei die relativ geringe Korrelation der *in-vitro*-Suszeptibilität der Pilze gegenüber Antimykotika und des therapeutischen Ansprechens (Latge, 1999). Eine wichtige, noch nicht umfänglich geklärte Frage ist die Interaktion von Antimykotika mit der Funktionalität von Immunzellen. Insbesondere das kombinierte Einwirken von Antimykotika und Immunsuppressiva ist bislang noch kaum untersucht. In dieser Arbeit wurde deshalb *in-vitro* der Einfluss klinisch eingesetzter Antimykotika zur Therapie der IA (L-AmB, Voriconazol) auf vier wichtige Effektorfunktionen (Oxidativer *Burst*, IL-8-Freisetzung, Bildung von NETs, Phagozytose) neutrophiler Granulozyten nach Exposition gegenüber *A. fumigatus*, dem häufigsten Erreger der IA, untersucht. Außerdem wurde der Effekt einer zusätzlichen Gabe von klinisch relevanten Immunsuppressiva (CsA, MMF, Prednisolon), die zur Prophylaxe und Therapie der akuten GvHD eingesetzt werden, auf diese vier Funktionen evaluiert.

Folgenden Fragen wurde dabei explizit nachgegangen:

- Gibt es einen Einfluss der Antimykotika auf die Effektorfunktionen?
- Falls ja, ist dieser Einfluss dosisabhängig?
- Unterscheiden sich die beiden Formulierungen von Amphotericin B, L-AmB und d-AmB, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Effektorfunktionen?
- Inwieweit beeinflusst die Kombination aus Antimykotika und Immunsuppressiva die Effektorfunktionen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blutbildanalysegerät	KX-21N	Sysmex
Brutschränke	HERAtherm (35 °C) HERAcell 150i (37 °C, 5 % CO ₂)	Thermo Scientific
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson
Kühl- und Gefrierschränke	- 4 °C / - 20 °C	Liebherr
Mikroliterpipetten	Reference Research Research plus (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Mikroplatten- <i>Washer</i>	HydroFLex	Tecan
Mikrotiterplatten- <i>Reader</i>	GENios FL	Tecan
Mikroskop	Eclipse 50i	Nikon
Pipettierhilfe	accu-jet pro	Brand
Schüttler	Minitron	Infors HT
Sterilwerkbank	Herasafe HS 12	Thermo Electron Corporation
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 16 Heraeus Frescofuge 17 MC-6400-Centrifuge	Thermo Scientific Hartenstein

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

2.1.2.1 Labormaterialien

Labormaterial	Kennzeichen	Hersteller
<i>Cell Strainer</i>	40 µm	Falcon
<i>Cell Scraper</i>	16 cm	Sarstedt
Deckgläser	24 x 60 mm	Knittel
EDTA-Monovetten	2,7 ml, 9 ml	Sarstedt
Einmalspritzen	2 ml, 5 ml, 20 ml	Becton Dickinson
Rundboden- Polystyrolröhrchen	5 ml, 12 x 75 mm	Falcon
Kanülen	Venofix Safety, 19G	Braun
Mikrotiterplatten	24, 48, 96-Well Maxisorp 96-Well	Falcon Greiner Bio-One Nunc
Objektträger	26 x 76 mm	R. Langenbrinc
Pasteurpipetten	3 ml	Biosigma
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Wattestäbchen	steril verpackt	Applimed SA
Zählkammer	Neubauer improved, 0,100 mm x 0,0025 mm ²	Hecht Assistent
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One

2.1.2.2 Kits

Kit	Hersteller
<i>Human IL-8 ELISA MAX Deluxe</i>	Biolegend
<i>Neutrophil Extracellular Trap (NET) Assay Kit</i>	Cayman Chemical

2.1.2.3 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
CD15-Allophycocyanin (CD15-APC)	Miltenyi Biotec
2', 7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCF-Diacetat)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Erythrozyten-Lyse-Puffer (Puffer EL)	Qiagen
Ethanol 100 %	Fischar
FACS Flow/Rinse/Clean	Becton Dickinson
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
<i>Hanks' buffered salt solution</i> (HBSS)	Sigma-Aldrich
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	PAN Biotech
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Polymorphprep®	Fresenius
RPMI 1640 Medium (+ GlutaMAX)	Gibco
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.1.2.4 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Komponenten
HBSS-Lösung für Granulozytenaufreinigung	500 ml HBSS 2 ml EDTA 5 ml FCS
Waschpuffer für ELISA	500 ml PBS 250 µl Tween 20
Stopplösung für ELISA	0,5 M Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)
<i>NET Assay Buffer</i>	500 ml RPMI 1640 5 g Bovines Serumalbumin 500 µl 1 M Calciumchlorid

2.1.2.5 Medien

Medium	Einzelkomponenten
Bierwürz-Agar-Platten (Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg)	Bierwürze
RPMI-Medium für Granulozyten	500 ml RPMI 1640 (+ GlutaMAX) 5 bzw. 10 % FCS (je nach Versuch)

2.1.2.6 Antimykotika und Immunsuppressiva

Bezeichnung	Stocklösung	Hersteller
AmBisome (liposomales Amphotericin B)	4 mg/ml steriles H ₂ O	Gilead
Amphotericin B (Amphotericin B - Desoxycholat)	5 mg/ml steriles H ₂ O	Bristol-Myers Squibb
CellCept (Mycophenolat-Mofetil)	3 mg/ml 5 %ige Glucose	Roche
Prednisolut (Prednisolon)	50 mg/ml steriles H ₂ O	mibe
Sandimmun (Ciclosporin A)	2 mg/ml 0,9 %iges NaCl	Novartis
Vfend (Voriconazol)	10 mg/ml steriles H ₂ O	Pfizer

2.1.3 Pilzstamm

Taxon	Stamm
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	ATCC 46645

2.1.4 Software

Microsoft Office 2011
BD CellQuest Pro Version 0.3.9f7B
FlowJo Single Cell Analysis Software V10

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung humaner neutrophiler Granulozyten

2.2.1.1 Studienteilnehmer

Für alle Experimente dieser Arbeit wurden humane, neutrophile Granulozyten benötigt. Hierzu wurde venöses EDTA-Vollblut von gesunden, freiwilligen Spendern gewonnen. Die Probanden wurden nach folgenden Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt:

Einschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 40 Jahre
- Schriftliche Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien

- Schwangerschaft oder stillende Mütter
- Einnahme von Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren in den letzten 12 Wochen
- Einnahme von Antiinfektiva in den letzten 4 Wochen
- Akuter Infekt oder chronische Infektionserkrankung
- Raucher
- Insulinpflichtiger Diabetes mellitus
- Bereits an derselben Versuchsserie dieser Studie teilgenommen
- Abhängigkeitsverhältnis zum Investigatoren-Team

Zur Verschlüsselung der Daten wurde ein pseudonymisierter Spendererfassungsbogen ausgefüllt. Nach ausführlicher Aufklärung und Einwilligung der geeigneten Probanden erfolgte die Entnahme venösen Vollblutes durch Punktion einer oberflächlichen Armvene mit Hilfe einer 19G Kanüle. Dabei wurden jedem Spender zwei bis vier 9 ml EDTA-Monovetten entnommen, sowie bei Einverständnis eine 2,7 ml EDTA-Monovette zur Anfertigung eines Blutbildes mit 3-fach Differenzierung der Leukozyten. Dies

diente einerseits der Optimierung der Prozessparameter bei der Granulozyten-Isolation und andererseits als Basis für die weitere Qualitätskontrolle der gewonnenen Isolate.

2.2.1.2 Isolation und Aufreinigung von neutrophilen Granulozyten aus Vollblut

Je 5 ml einer speziellen Trennlösung (Polymorphprep®) wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen mit Hilfe einer serologischen Pipette vorgelegt und mit jeweils 7,5 ml des entnommenen EDTA-Blutes vorsichtig überschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 880 g. Hierdurch wurde das Blut in verschiedene Schichten aufgetrennt: ein Bodensatz aus Erythrozyten, darüber eine Zuckerphase mit neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils*, PMN) und vereinzelt Erythrozyten, darauf folgend eine vorwiegend aus Lymphozyten und Monozyten (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) bestehende Fraktion und abschließend Plasma (Abb. 2.1). Zur weiteren Aufreinigung wurde zunächst die obere Schicht aus Lymphozyten und Monozyten mittels steriler Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Danach wurde die Granulozytenfraktion mit einer neuen Pipette abgenommen, in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und dieses mit HBSS-Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation bei 590 g für 5 min und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml Puffer EL resuspendiert und für maximal 5 min inkubiert, um vereinzelt Erythrozyten zu entfernen. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 2 min bei 590 g sowie ein erneutes Dekantieren des Überstandes und schließlich eine Resuspension des Zellpellets in RPMI-Medium mit je nach Versuch 5 % bzw. 10 % FCS. Die benötigte Zellzahl konnte je nach Art des Versuches mittels Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.2.1.3) wie gewünscht eingestellt werden.

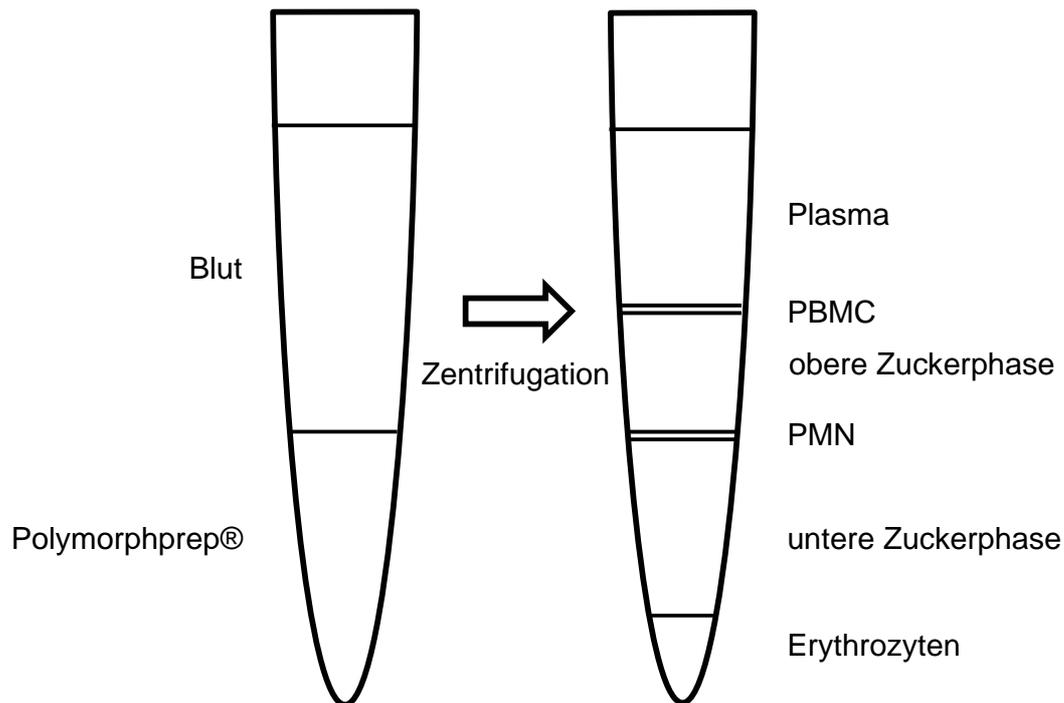


Abbildung 2.1: Schichttrennung des Blutes nach 30 min Zentrifugation

PMN = neutrophile Granulozyten, PBMC = Lymphozyten und Monozyten

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Anzahl neutrophiler Granulozyten in einer Suspension wurden 10 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau sowie 40 µl RPMI 1640 Medium 1:10 verdünnt. Davon wurden wiederum 10 µl mit dem gleichen Volumen RPMI 1640 Medium vermischt, sodass insgesamt eine 1:20-Verdünnung erzielt wurde. Je nach Menge des entnommenen Blutes und der damit enthaltenen Zellen wurde auch mit einer 1:10- bzw. 1:50-Verdünnung gearbeitet.

Die Zellzählung wurde anschließend mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt, wobei mittels Trypanblau-Exklusion der Anteil der vitalen Zellen bestimmt und nur diese quantifiziert wurden. Nach Auszählen von 4 Großquadraten und Bildung des Mittelwertes davon wurde die Konzentration der Zellsuspension für eine 1:20-Verdünnung folgendermaßen berechnet:

$$\text{Anzahl Zellen / ml} = \text{Mittelwert gezählter Zellen in 4 Großquadraten} \times 20 \\ (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 (\text{Volumen eines Großquadrats})$$

2.2.2 Arbeiten mit *Aspergillus fumigatus*

2.2.2.1 Kultur von *Aspergillus fumigatus*

Isolate von *A. fumigatus* (ATCC 46645) wurden auf Bierwürz-Agar-Platten aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg aufgetragen und mit einem sterilen Watteträger ausgestrichen. Anschließend erfolgte die Inkubation der verschlossenen Platten bei 35 °C für 2,5 - 4 Tage bis die Platte dicht bewachsen war.

2.2.2.2 Gewinnung von Konidien

Die hydrophoben Konidien von *A. fumigatus* wurden durch Zugabe von sterilem Wasser vorsichtig von der Platte abgelöst und durch einen 40 µm *Cell Strainer* passiert, um Myzelreste zu beseitigen. Anschließend wurde die Suspension mit sterilem Wasser verdünnt und die Anzahl der in der Lösung befindlichen Konidien mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.2.3 Anzucht von Keimschläuchen und Hyphen

Jeweils 1×10^8 Konidien wurden mit je 20 ml RPMI 1640 Medium in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit einer Schüttelfrequenz von 10 g über Nacht bei 25 °C inkubiert. Ab dem frühen Morgen erfolgte die Auskeimung dann bei 37 °C, bis die gewünschten Morphologien erreicht waren. Hierzu war insgesamt eine Inkubationsdauer von 13 – 17 h nötig. Die Keimschlauch- und Hyphenbildung wurde makro- sowie mikroskopisch überprüft. Falls keine anschließende Inaktivierung erfolgte (Kapitel 2.2.2.4), wurden die vitalen Zustandsformen nach Zentrifugation bei 5000 g und Aufnahme in RPMI 1640 Medium bis zur weiteren Verwendung in Aliquots mit einer Konzentration von je 2×10^7 / ml bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.2.4 Inaktivierung von Konidien, Keimschläuchen und Hyphen

Zum Erhalt inaktivierter Morphotypen von *A. fumigatus* wurden die Keimschlauch- und Hyphensuspension bei 5000 g für 7 min und die Konidien suspension bei 7000 g für 5 min zentrifugiert. Die entstandenen Pellets

wurden nach Dekantieren des Überstandes in 100 % Ethanol resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten fünf Waschschriffe, um die verbliebenen Ethanolreste vollständig zu entfernen: hierfür erfolgten jeweils zuerst eine Zentrifugation bei 7000 g für 7 min, danach die Abnahme des Ethanol- bzw. Wasserüberstandes, sowie zuletzt die erneute Zugabe von 1 ml sterilem Wasser. Im letzten Waschschriff wurde das Pellet jedoch nicht in sterilem Wasser, sondern in 1 ml RPMI 1640 Medium aufgenommen und resuspendiert. Die Anzahl der in der Suspension jeweils enthaltenen Konidien, Keimschläuche und Hyphen wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und daraufhin mit RPMI 1640 Medium auf eine Konzentration von je 2×10^7 / ml verdünnt. Die so entstandene Lösung wurde aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschriff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3 Berechnung und Ansetzen der Pharmaka

Damit die verwendeten Antimykotika und Immunsuppressiva in den jeweils therapeutisch sinnvollen Zielkonzentrationen vorlagen, mussten die Pharmaka für die unterschiedlichen Versuche entsprechend konzentriert hinzugefügt und vorher adäquat aus den Stocklösungen verdünnt werden. Die Zugabe der Antimykotika zum Versuchsansatz erfolgte dabei für die Messung des oxidativen *Burst* in 10-facher Konzentration (10 % im gesamten Ansatz), für die ELISA-, Phagozytose-, und NET-Analysen dagegen 20-fach konzentriert (5 % im gesamten Ansatz). Als Zielkonzentrationen für die Antimykotika wurden jeweils Werte im unteren und oberen Bereich therapeutisch angestrebter Plasmaspiegel ausgewählt (Kapitel 1.1.4.1 und 1.1.4.2). Die Immunsuppressiva wurden hingegen in entsprechender Konzentration direkt in die Suspension neutrophiler Granulozyten hinzugegeben, wobei allerdings die weitere Verdünnung (z. B. durch Hinzugabe von Antimykotika und Pilzstimuli) im Verlauf der jeweiligen Assays berücksichtigt wurde: Für die Messung des oxidativen *Burst* wurden die Zellen in einer 1,43-fach (70 % Granulozytensuspension im Gesamtansatz), für die ELISA- und Phagozytose-Analysen in einer 2-fach (50 %

Granulozytensuspension im Gesamtansatz), sowie für die NET-Messungen in einer 1,11-fach konzentrierten Lösung (90 % Granulozytensuspension im Gesamtansatz) dem Medium zugefügt.

Insgesamt ergaben sich folgende Zielkonzentrationen, tatsächlich zugegebene Konzentrationen je nach Versuchsansatz sowie Verdünnungen in RPMI 1640 Medium aus den nach Herstellerangaben generierten Stocklösungen (Tab. 2.1 und Tab. 2.2):

	Stocklösung (mg/ml)	Zielkonzentration (µg/ml)	10-fach-konzentriert (µg/ml) [→ V]	20-fach-konzentriert (µg/ml) [→ V]
LAmB	4	15	150 [→ 1:26,7]	300 [→ 1:13,3]
		50	500 [→ 1:8]	1000 [→ 1:4]
d-AmB	5	0,2	2 [→ 1:2500]	4 [→ 1:1250]
		0,5	5 [→ 1:1000]	10 [→ 1:500]
Vori	10	1	10 [→ 1:1000]	20 [→ 1:500]
		5	50 [→ 1:200]	100 [→ 1:100]

Tabelle 2.1: Zielkonzentrationen, zugegebene Konzentrationen je nach Versuchsansatz sowie Verdünnungen (V) aus den jeweiligen Stocklösungen der verschiedenen Antimykotika

LAmB = Liposomales Amphotericin B, d-AmB = Amphotericin B - Desoxychololat, Vori = Voriconazol

	Stocklösung (mg/ml)	Zielkonzentration (µg/ml)	1,43-fach-konzentriert (µg/ml) [→ V]	2-fach-konzentriert (µg/ml) [→ V]	1,11-fach-konzentriert (µg/ml) [→ V]
CsA	2	0,2	0,286 [→ 1:7000]	---	---
MMF	33	2	2,857 [→ 1:11500]	---	---
P	50	0,2	0,286 [→ 1:175000]	0,4 [→ 1:125000]	0,222 [→ 1:225000]

Tabelle 2.2: Zielkonzentrationen, zugegebene Konzentrationen je nach Versuchsansatz sowie Verdünnungen (V) aus den jeweiligen Stocklösungen der verschiedenen Immunsuppressiva

CsA = Ciclosporin A, MMF = Mycophenolat-Mofetil, P = Prednisolon, --- = nicht benötigt

2.2.4 Analyse der ROS-Freisetzung

2.2.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies und DCF

Während der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen wie beispielsweise *A. fumigatus* werden durch neutrophile Granulozyten vermehrt reaktive Sauerstoffradikale gebildet, was als oxidativer oder respiratorischer *Burst* bezeichnet wird. Diese reaktiven Sauerstoffspezies können mittels 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCF-DA) nachgewiesen werden. Diese zellpermeable, nicht-fluoreszierende Substanz wird intrazellulär deacetyliert und kann die Zelle in dieser Form nicht mehr verlassen. Durch gebildete ROS wie H_2O_2 , OH^- , $ONOO^-$ wird die Substanz zum grün fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert und kann im Fluorimeter gemessen werden.

2.2.4.2 Versuchsaufbau

Für diese Versuche wurde die Granulozytenzahl in RPMI-Medium (5 % FCS) auf $2,8 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt und nach folgendem Protokoll vorgegangen (Abb. 2.2): 70 µl der Neutrophilensuspension (2×10^5 Zellen) wurden pro *Well* in eine

96-Well-Platte vorgelegt. Wurde mit Immunsuppressiva gearbeitet, dann wurden die Zellen vorher direkt in eine Lösung mit 1,43-fach-konzentrierten Immunsuppressiva aufgenommen (Tab. 2.2). Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl der verschiedenen Antimykotika in 10-facher Konzentration (Tab. 2.1), sowie als Stimulus je 10 µl der Konidien-, Keimschlauch- oder Hyphensuspension (2×10^5 Pilzzellen) oder 10 µl PMA (Endkonzentration 10 µg/ml). Für Kontrollansätze ohne Antimykotika und Pilz bzw. PMA dienten jeweils 10 µl RPMI 1640 Medium als Volumenausgleich. Nach abschließender Zugabe von 10 µl DCF-DA (Endkonzentration: 165 µg/ml) zu jedem *Well* unter der abgedunkelten Sterilwerkbank erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensitäten im auf 37 °C vorgewärmten Mikrotiterplatten-Reader mit Wellenlängen von 485 nm (Exzitation) und 535 nm (Emission). Über einen Zeitraum von 2 h fand hierbei alle 5 min eine automatische Messung und Speicherung der Daten statt. Die Auswertung der Daten erfolgte in Microsoft Excel.

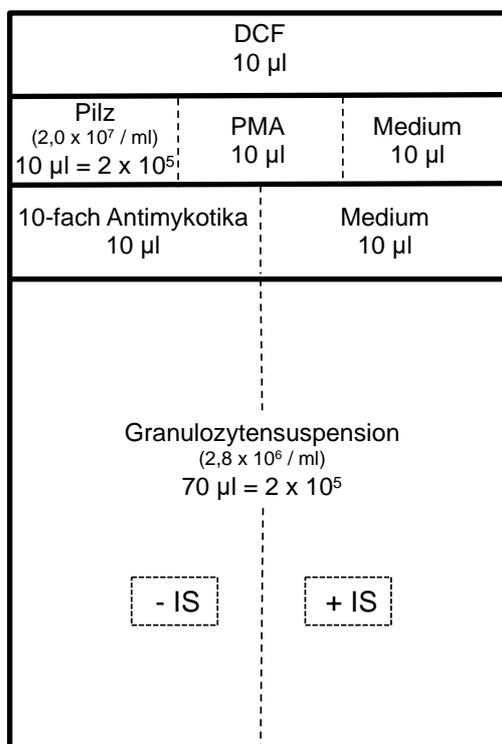


Abbildung 2.2: Protokoll für die Messung des oxidativen *Burst* der Granulozyten

IS = Immunsuppressiva, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, DCF = Dichlorfluorescein

2.2.5 Messung der IL-8-Freisetzung

2.2.5.1 ELISA

Neutrophile Granulozyten besitzen die Fähigkeit zur Zytokinausschüttung, u. a. um sich selbst und andere Zellen zu stimulieren und mit ihnen zu kommunizieren. Zum Nachweis dieser Botenstoffe kann ein *enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) genutzt werden. Hierfür kommen spezifische Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen zum Einsatz, die enzym-gekoppelt eine Farbreaktion auslösen. Durch die Intensität dieser Reaktion und mit Hilfe einer Verdünnungs- bzw. Standardreihe kann die Konzentration des zu bestimmenden Antigens ermittelt werden. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass IL-8 das am stärksten freigesetzte Zytokin durch humane PMN war, wenn diese mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* stimuliert wurden (Hellmann et al., 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das *Human IL-8 ELISA MAX Deluxe Kit* von Biolegend verwendet.

2.2.5.2 Generierung der Zytokin-Überstände

Als Stimulus für die Untersuchung der IL-8-Sekretion durch Granulozyten wurden PMA sowie inaktivierte Keimschläuche von *A. fumigatus* verwendet. Nach Aufreinigung der Granulozyten wurde die Neutrophilenanzahl in RPMI-Medium (10 % FCS) auf 2×10^6 / ml eingestellt. Ein Teil der PMN wurde direkt in eine 2-fach konzentrierte Prednisolon-Lösung aufgenommen (Tab. 2.2). Nun wurden in eine 48-Well-Platte je 100 μ l (2×10^5 Zellen) der Neutrophilensuspension ohne oder mit Prednisolon, 100 μ l Pilz (nach vorheriger 1:10-Verdünnung mit RPMI 1640 Medium 2×10^5 Pilzzellen) oder PMA (Endkonzentration 10 μ g/ml) sowie zum Schluss je 10 μ l der Antimykotika in 20-facher Konzentration (Tab. 2.1) gegeben. Für unstimulierte Kontrollansätze erfolgte die Zugabe von je 100 μ l RPMI 1640 Medium statt Pilz bzw. PMA zu 100 μ l der Neutrophilensuspension. Nach 24-stündiger Inkubation der Platte bei 37 °C wurden zu jedem *Well* 200 μ l RPMI 1640 Medium dazugegeben, die Überstände abgenommen und diese bei 6000 g für 6 min zentrifugiert. Die Überstände wurden erneut abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.5.3 Durchführung des IL-8-ELISA

Die Durchführung des ELISAs erfolgte anschließend nach Angaben des Herstellers (Biolegend): Mitgelieferte Nunc Maxisorp 96-Well-Platten wurden mit je 100 µl *Capture Antibody pro Well* über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen, mit 200 µl *Assay Diluent A pro Well* zur Minimierung unspezifischer Bindungen geblockt und die Platte versiegelt unter kontinuierlichem Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiter beschriebenen Inkubationsschritte fanden ebenfalls unter diesen Bedingungen statt. Währenddessen wurde mit *Human IL-8* eine Standardreihe vorbereitet. Hierzu wurden serielle 2-fach-Verdünnungen in *Assay Diluent A* in einem Konzentrationsbereich von 4 ng/ml bis 15,625 pg/ml angelegt. Nach dreimaligen Waschen der Platte mit Waschpuffer wurden in jedes *Well* 100 µl der Standards oder der generierten Probenüberstände pipettiert. Es folgten eine erneute Inkubation für 2 h, erneutes dreimaliges Waschen, sowie die Zugabe von 100 µl *Detection Antibody pro Well*, ehe sich ein weiterer einstündiger Inkubationsschritt und dreimaliges Waschen anschlossen. Anschließend wurden 100 µl *Avidin-HRP pro Well* zugegeben und die Platte für weitere 30 min inkubiert. Nach letztem dreimaligen Waschen wurden im Dunkeln je 100 µl *Substrate Solution C pro Well* zugegeben und der Farbumschlag nach maximal 15 min durch Zugabe von je 100 µl Stopplösung (0,5 M H₂SO₄) pro *Well* gestoppt. Im Anschluss erfolgte die Messung der Absorption im Mikrotiterplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Die Konzentrationen der Proben konnte mit Hilfe der Standardreihe in Microsoft Excel berechnet werden.

2.2.6 Bestimmung der neutrophilen Elastase-Aktivität

2.2.6.1 Bildung und Gewinnung der neutrophilen Elastase

Zur Beurteilung der Ausbildung von NETs wurde das *Neutrophil Extracellular Trap Assay Kit* von Cayman Chemical verwendet. Das Testsystem macht sich die Eigenschaft des in den sezernierten NETs enthaltenen Enzyms neutrophile Elastase zu Nutze: Die Aktivität dieses Enzyms kann durch Umsetzung eines

spezifischen Substrats und dessen Lichtabsorption gemessen werden und ist somit ein direkter Hinweis auf das Verhalten der NET-Formation. Die Analysen wurden gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Die Aufreinigung der PMN erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, allerdings wurde für den Waschschrift HBSS ohne FCS und EDTA verwendet. Für alle weiteren Verdünnungen wurde *NET Assay Buffer* anstelle von RPMI-Medium verwendet. Die Neutrophilenanzahl wurde nun in *NET Assay Buffer* auf 1×10^6 / ml eingestellt, wobei ein Teil der Zellen direkt in 1,11-fach konzentrierter Prednisolon-Lösung aufgenommen wurde (Tab. 2.2). In eine 24-Well-Platte wurden nun je 900 μ l (9×10^5 Zellen) der Neutrophilensuspension sowie 50 μ l der Antimykotika 20-fach konzentriert zugegeben (Tab. 2.1) und die Ansätze bei 37 °C für 30 min inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ausschließlich mit *NET Assay Buffer* mitgeführt. Für die Kokultur mit *A. fumigatus* wurden je 45 μ l (9×10^5 Pilzzellen) inaktivierter Keimschläuche pro *Well* eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C erfolgten zwei Waschschriffe mit je 1 ml *NET Assay Buffer* pro *Well*, in denen die Überstände abgenommen und somit gelöste, nicht NET-spezifische Elastase verworfen wurden. Zur Ablösung der gebundenen, NET-spezifischen Elastase wurden je 500 μ l *NET Assay S7 Nuclease* pro *Well* hinzugefügt, bevor nach 15 min je 10 μ l *NET Assay EDTA* pro *Well* pipettiert wurden, um diesen Prozess zu stoppen. Nach Abtrennung der Zellfragmente durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min wurden die Überstände mit der enthaltenen NET-spezifischen Elastase in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6.2 Durchführung der neutrophilen Elastase-Messung

Zur Durchführung der eigentlichen neutrophilen Elastase-Messung wurde zunächst eine Standardreihe vorbereitet. Dafür wurden mit *Human Neutrophil Elastase Assay Reagent* in *NET Assay Buffer* serielle 2-fach-Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 36 mU/ml bis 0,5625 mU/ml angelegt. Pro *Well* wurden 100 μ l der Standards bzw. der Proben in eine 96-Well-Platte gegeben. Nun folgte die Zugabe des *NET Assay Neutrophil Elastase Substrate* im Verhältnis 1:1. Nach einer Inkubationszeit von 1 sowie 2 h bei 37 °C wurden die

jeweiligen Fluoreszenzintensitäten im Mikrotiterplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Ermittlung der Konzentrationen der Proben erfolgte mit Hilfe der Standardreihe in Microsoft Excel. Hierfür wurden die Absorptionswerte für beide Untersuchungszeitpunkte mittels polynomischer Regression 4. Grades anhand der Standardreihe in Konzentrationen umgerechnet und aus diesen der Mittelwert gebildet.

2.2.7 Beurteilung der Phagozytoserate

2.2.7.1 Durchflusszytometrie

Die Fähigkeit der Granulozyten zur Phagozytose von *A. fumigatus*-Keimschläuchen wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse beurteilt. Das Grundprinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, dass Zellen aus einer Suspension einzeln in eine Kapillare gesaugt und durch einen fokussierten Laserstrahl angeregt werden. Dabei entsteht je nach Zelltyp eine bestimmte Lichtstreuung, das Streulicht, welches mit den optischen Eigenschaften der Zellen korreliert und von verschiedenen Detektoren aufgefangen und gemessen wird. So ist das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) ein Maß für das Volumen der Zellen, das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) dagegen ein Maß für ihre Granularität. Gleichzeitig zum Streulicht können auch Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden, was eine weitere Differenzierung hinsichtlich bestimmter Merkmale der Zellen erlaubt. Dafür müssen die Zellen vorher mit Fluoreszenzfarbstoff oder mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern, welche meist gegen bestimmte Oberflächenproteine der Zellen (z. B. CD-Moleküle, CD = *cluster of differentiation*) gerichtet sind, markiert werden. Die fluoreszierende Gruppe emittiert nun nach Exzitation durch einen Laserstrahl Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge, welches in verschiedenen Fluoreszenzkanälen gemessen werden kann.

2.2.7.2 FITC-Markierung der inaktivierten Keimschläuche

Als Stimulus zur Anregung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten dienten für diese Art von Experiment inaktivierte, FITC-markierte Keimschläuche von

A. fumigatus. Hierzu wurden wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben generierte Keimschläuche in einer Verdünnung von 1:100 mit FITC gefärbt und im Dunkeln bei 35 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die nun gefärbten Morphotypen gewaschen, bis keine gelbliche Verfärbung mehr zu erkennen war. Hierfür erfolgten je zwei Mal die Zentrifugation der Pilzzellen bei 10000 g für 7 min und nach vollständigem Dekantieren des Überstandes die Resuspension zunächst in sterilem Wasser, beim zweiten Mal in RPMI 1640 Medium, wobei eine Endkonzentration von 2×10^7 / ml eingestellt wurde.

2.2.7.3 Ansetzen der Kokulturen

Die Granulozyten wurden wie unter 2.2.1.3 beschrieben aufgereinigt und die Granulozytenzahl in RPMI-Medium (10 % FCS) auf 2×10^6 / ml eingestellt. Für die Ansätze mit Prednisolon wurde das Glucocorticoid in zweifacher Endkonzentration (Tab. 2.2) in einen Teil der Neutrophilensuspension gegeben. Das Ansetzen der Kokulturen erfolgte nun in 96-Well-Platten nach dem in Tabelle 2.3 aufgezeigtem Schema: Neutrophile Zellen ohne oder mit Prednisolon sowie Antimykotika in 20-facher Konzentration (Tab. 2.1) wurden sofort in ein *Well* pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei entsprechender Temperatur erfolgte die Zugabe der FITC-markierten, inaktivierten Keimschläuche bzw. RPMI 1640 Medium als Volumenausgleich. Eine Hintergrundkontrolle wurde bei 4 °C mitgeführt, da Zellen bei dieser Temperatur nicht phagozytieren. Aus den angesetzten Kokulturen ergaben sich abschließend 17 Kombinationen, die für 2 h erneut bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert wurden. Die optimale Inkubationszeit von 2 h wurde in einem Vorversuch bestimmt, um zu gewährleisten, dass die PMN zum Messzeitpunkt noch vital waren.

Nr.	Bezeichnung	sofortige Zugabe			Zugabe nach 30 min		Inkubation bei...
		PMN - P (1 x 10 ⁵ Zellen)	PMN + P (1 x 10 ⁵ Zellen)	AM (20-fach konzentriert)	Pilz (1 x 10 ⁶ Zellen)	RPMI 1640 Medium	
1	Hintergrund	50 µl	-	-	50 µl	-	4 °C
2	Pilz-Kontrolle	-	-	-	50 µl	50 µl	
3	PMN-Kontrolle	50 µl	-	-	-	50 µl	37 °C
4	ohne P	Medium	50 µl	-	-	50 µl	
5		LAmB 15 µg/ml	50 µl	-	5 µl	50 µl	
6		LAmB 50 µg/ml	50 µl	-	5 µl	50 µl	
7		d-AmB 0,2 µg/ml	50 µl	-	5 µl	50 µl	
8		d-AmB 0,5 µg/ml	50 µl	-	5 µl	50 µl	
9		Vori 1 µg/ml	50 µl	-	5 µl	50 µl	
10		Vori 5µg/ml	50 µl	-	5 µl	50 µl	
11		Medium	-	50 µl	-	50 µl	
12	mit P	LAmB 15 µg/ml	-	50 µl	5 µl	50 µl	
13		LAmB 50 µg/ml	-	50 µl	5 µl	50 µl	
14		d-AmB 0,2 µg/ml	-	50 µl	5 µl	50 µl	
15		d-AmB 0,5 µg/ml	-	50 µl	5 µl	50 µl	
16		Vori 1 µg/ml	-	50 µl	5 µl	50 µl	
17		Vori 5µg/ml	-	50 µl	5 µl	50 µl	

Tabelle 2.3: Schema zum Ansetzen der Kokulturen für den Phagozytose-Assay

PMN = neutrophile Granulozyten, AM = Antimykotika, LAmB = Liposomales Amphotericin B, d-AmB = Amphotericin B - Desoxycholat, Vori = Voriconazol, P = Prednisolon

2.2.7.4 Gegenfärben der Granulozyten mit CD15-APC

Nach Ablauf der erforderlichen 2 h erfolgte die Ernte der Proben und Gegenfärbung der Granulozyten mit CD15-APC. Die Zellsuspensionen wurden aus den 96-Well-Platten in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zentrifugation bei 400 g für 7 min, Dekantieren des Überstandes und vorsichtigem Abklopfen wurde das Zellpellet in 100 µl des mit HBSS 1:20 verdünnten CD15-APC resuspendiert und für 10 min inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend mit 900 µl HBSS aufgefüllt, erneut wie oben beschrieben zentrifugiert, sorgfältig abgeklopft und das Pellet schließlich mit 300 µl HBSS in 5 ml Polystyrolröhrchen überführt.

2.2.7.5 Messung im Durchflusszytometer und Auswertung

Sofort im Anschluss erfolgte die Messung der Proben im Durchflusszytometer. Zunächst wurden mittels einer manuell gesetzten Region im FSC / SSC in der

Cell Quest Pro Software alle vitalen Zellen grob eingegrenzt. Mit Hilfe der FlowJo-Analyse-Software wurde anschließend der Anteil FITC-positiver an den CD15-positiven Zellen (Phagozytoserate) quantifiziert (Abb. 2.3).

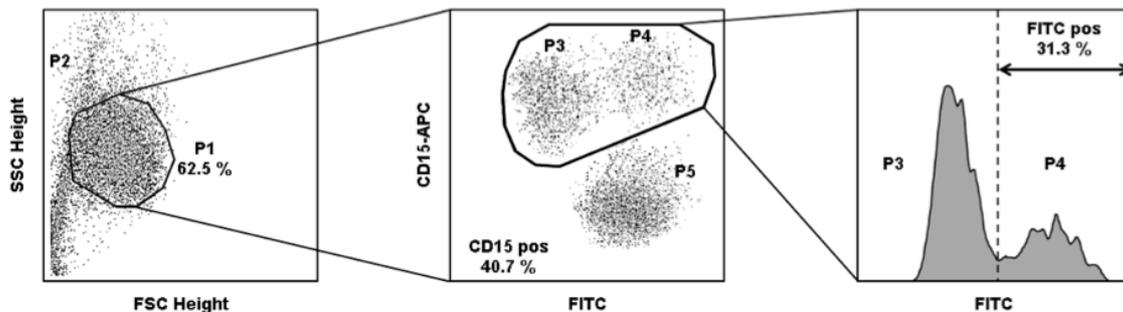


Abbildung 2.3: Auswertung der Daten des Phagozytose-Assays

1×10^5 neutrophile Granulozyten wurden für 2 h mit 1×10^6 FITC-markierten, inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen kokultiviert. Die Granulozyten wurden mit anti-CD15-APC gegengefärbt. Mit Hilfe der Cell Quest Pro Software wurden die Proben in einem FACS Calibur Durchflusszytometer gemessen. Da die PMN (P1) und die nicht-phagozytierten Keimschläuche (P2) durch die FSC/SSC Parameter nicht vollständig unterschieden werden konnten, wurde die Granulozytenfraktion bei der Messung zunächst grob markiert (P1) und 10000 Zellen im Gate P1 akquiriert. Durch Gating der CD15-positiven Zellen (P3+P4) konnten übrige, nicht-phagozytierte Keimschläuche (P5) mit Hilfe der FlowJo-Analyse-Software ausgeschlossen werden. Der Prozentsatz FITC-positiver Zellen (P4) innerhalb der CD15-positiven Population (P3+P4) wurde in einem Histogramm dargestellt.

2.2.8 Statistik

Alle Experimente wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Blutproben verschiedener Spender durchgeführt. Für die Analyse des oxidativen *Burst* sowie des ELISA wurden alle untersuchten Konditionen in dieser Arbeit in Duplikaten bestimmt und der Mittelwert aus diesen zwei Werten für jeden Spender berechnet. Die Darstellung aller in Kapitel 3 gezeigten Ergebnisse erfolgte, sofern nicht anders bezeichnet, als arithmetischer Mittelwert aller Spender \pm Standardabweichung oder Standardfehler (SEM). Die statistische

Signifikanz wurde unter Verwendung des gepaarten, zweiseitigen t-Tests überprüft. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,1$ als Trend in Richtung Signifikanz (■), ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant (*), ein p-Wert $< 0,01$ als hoch signifikant (**) und ein p-Wert $< 0,001$ als höchst signifikant (***) angesehen. Ein p-Wert von $> 0,1$ wurde als nicht signifikant (ns) beurteilt und aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht explizit in den Abbildungen dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von Antimykotika auf die Viabilität neutrophiler Granulozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, inwieweit die Viabilität der humanen neutrophilen Granulozyten durch die in diesem Projekt verwendeten Antimykotika beeinflusst wurde. Dafür wurden die wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben isolierten und gezählten PMN von 3 verschiedenen Spendern bei Raumtemperatur mit der jeweils höheren der untersuchten Antimykotika-Konzentrationen von LAmB (50 µg/ml), d-AmB (0,5 µg/ml) oder Voriconazol (5 µg/ml) versetzt. Anschließend wurden die Zellen nach einem Zeitraum von 1, 2 sowie 4 h im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gefärbt, der Prozentsatz vitaler PMN an der gesamten Zellpopulation in der Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt und mit einer unbehandelten Kontrolle (RPMI-Medium ohne Antimykotika) verglichen. Trypanblau-negative PMN wurden als vital gewertet (Kapitel 2.2.1.3).

Über 99 % der Neutrophilen waren in der Medium-Kontrolle ohne Zugabe von Antimykotika nach 4 h bei Raumtemperatur noch Trypanblau-negativ. Damit konnte im Hinblick auf weitere Analysen dieser Arbeit auch bestätigt werden, dass die Zellen über einen Zeitraum von 4 h vital blieben. Auch in Gegenwart der untersuchten Antimykotika konnte keine wesentlich verminderte Lebensfähigkeit der PMN beobachtet werden. Für die jeweils höchsten Konzentrationen aller untersuchten Antimykotika lag der Anteil Trypanblau-negativer Zellen und damit die Viabilität der PMN nach 1, 2 und 4 h ebenfalls jederzeit über 99 % (Abb. 3.1). Somit konnte in den nachfolgenden Experimenten ausgeschlossen werden, dass ein Antimykotika-vermittelter Effekt auf Funktionen von PMN nur über eine Beeinflussung der Vitalität der Zellen bedingt wird.

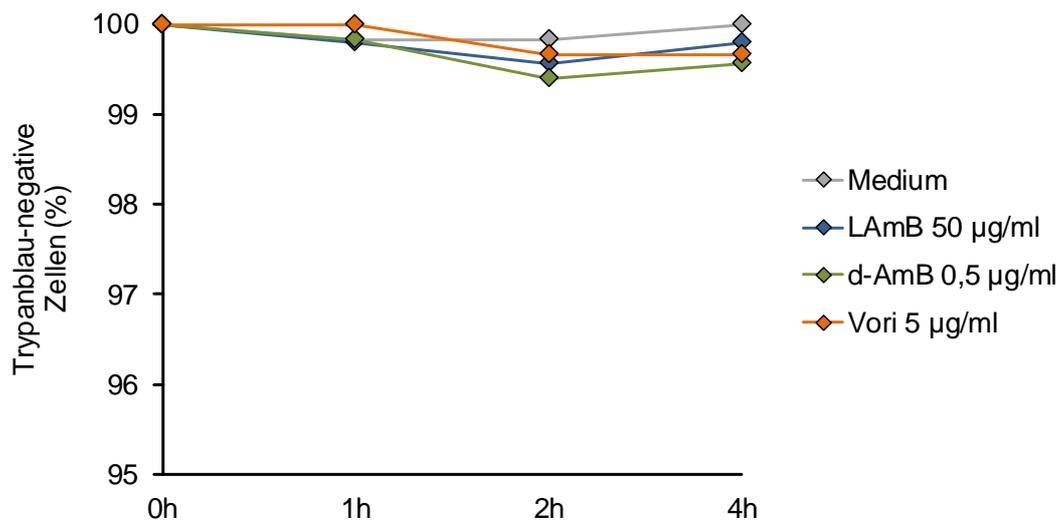


Abbildung 3.1: Analyse der Viabilität von PMN unter dem Einfluss verschiedener Antimykotika

Der Prozentsatz Trypanblau-negativer Zellen wurde nach 1, 2 und 4 h bei Raumtemperatur in RPMI-Medium sowie in Gegenwart verschiedener Antimykotika bestimmt. Die Mittelwerte von 3 verschiedenen Spendern sind in der Abbildung dargestellt.

Für alle folgenden Abbildungen gilt: LAmB = liposomales Amphotericin B, d-AmB = Amphotericin B - Desoxycholol, Vori = Voriconazol.

3.2 Einfluss von Antimykotika und Immunsuppressiva auf den oxidativen *Burst* neutrophiler Granulozyten

Nachdem der Einfluss der Antimykotika auf die Lebensfähigkeit der PMN im Allgemeinen evaluiert wurde, sollte nun untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß einzelne Effektorfunktionen dieser Zellen durch Antimykotika sowie unter gleichzeitiger Exposition gegenüber Immunsuppressiva beeinflusst werden. Zu Beginn stand hierbei die Analyse des oxidativen *Burst* neutrophiler Granulozyten im Fokus. Für alle in Kapitel 3.2 aufgeführten Ergebnisse wurden die Versuche wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben durchgeführt.

3.2.1 Kinetik der ROS-Freisetzung und Abhängigkeit vom Morphotyp von *Aspergillus fumigatus*

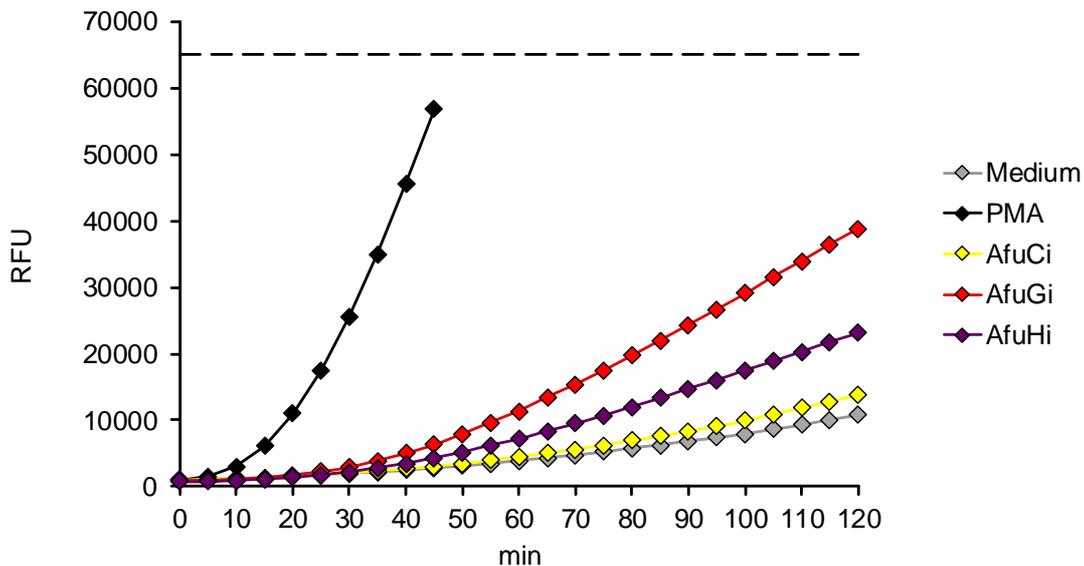
Zur Optimierung und Festlegung der experimentellen Bedingungen für die weiteren Versuche wurde die ROS-Freisetzung und deren Kinetik durch neutrophile Granulozyten gesunder Spender gegenüber dem unspezifischen Stimulus PMA und verschiedenen Morphotypen von *A. fumigatus* ohne Verwendung zusätzlicher Antimykotika oder Immunsuppressiva analysiert. Damit sollte zunächst ein Überblick über den zeitlichen Verlauf der Reaktion neutrophiler Granulozyten auf verschiedene Stimuli gewonnen werden.

Die Erfassung der ROS-Freisetzung erfolgte mittels DCF in einem Fluoreszenz-basierten Assay. In Abbildung 3.2 sind beispielhaft die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) zweier repräsentativer Spender nach Stimulation ihrer PMN mit Ethanol-inaktivierten oder vitalen Konidien, Keimschläuchen und Hyphen von *A. fumigatus* bzw. PMA im Zeitverlauf dargestellt. Daneben werden die RFU der unstimulierten Neutrophilen in RPMI-Medium ohne Zugabe von Pilzzellen oder PMA aufgezeigt. Die RFU wurden über 2 h alle 5 min bestimmt.

Nach ersten Auswertungen ließ sich deutlich erkennen, dass mit Ausnahme der Konidien alle untersuchten Morphotypen zu einer erhöhten ROS-Freisetzung durch PMN im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle führten, PMA sogar zu einer deutlich erhöhten und rasch ansteigenden Sekretion. Sowohl inaktivierte als auch vitale Konidien von *A. fumigatus* stellten in allen untersuchten Spendern keinen Stimulus für eine gesteigerte ROS-Sekretion dar, weshalb für die weiteren Versuchsreihen auf die Verwendung von Konidien verzichtet wurde. In unseren Experimenten verursachten inaktivierte wie auch vitale Keimschläuche im Gegensatz zu Hyphen über mehrere Spender hinweg eine ausgeprägte Stimulation und stellten somit den stärksten Auslöser unter den verschiedenen Morphotypen von *A. fumigatus* für den oxidativen *Burst* neutrophiler Granulozyten dar. Auch auf Grund der gegenüber Hyphen präziseren Quantifizierbarkeit und Dosierung von Keimschläuchen wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausschließlich mit diesem Morphotyp von *A. fumigatus* gearbeitet.

Eine Ablesedauer der RFU von über 120 min führte zu einer Plateaubildung mit fehlendem RFU-Anstieg und erschien daher nicht sinnvoll. Des Weiteren lagen die gemessenen RFU für den unspezifischen Stimulus PMA nach 40 bis 50 min meist deutlich über dem mit dem verwendeten Mikroplatten-Reader maximal erfassbaren Grenzwert der Fluoreszenzintensitäten. Auch bei 2-stündiger Stimulation mit Keimschläuchen von *A. fumigatus* konnte oftmals eine Überschreitung dieses Grenzwerts beobachtet werden. Die Zeitpunkte nach etwa 30-minütiger Stimulation mit PMA sowie nach 60-minütiger Stimulation mit Keimschläuchen hingegen entsprachen dem Bereich des jeweils stärksten RFU-Anstiegs und damit der höchsten Sensitivität gegenüber exogenen Einflüssen. Für alle weiteren Versuche wurden die RFU für PMA deshalb nach 30 min bestimmt, während sich die weitere Auswertung der RFU für Keimschläuche auf einen Zeitpunkt nach 1-stündiger Stimulation konzentrierte.

A



B

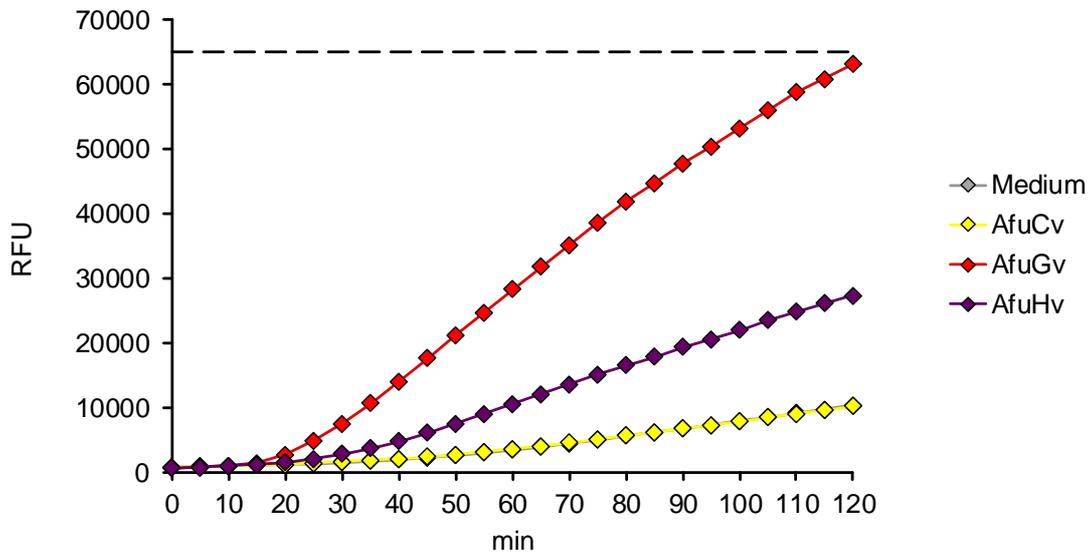


Abbildung 3.2: Stimulation der ROS-Freisetzung durch PMA und verschiedene Morphotypen von *A. fumigatus* in zwei repräsentativen Spendern

Analyse der ROS-Freisetzung humaner PMN nach Stimulation mit PMA (A) sowie Ethanol-inaktivierten (i, A) oder vitalen (v, B) Konidien (AfuC), Keimschläuchen (AfuG) oder Hyphen (AfuH) von *A. fumigatus*. Kontrollzellen in RPMI-Medium ohne Stimulanz wurden mitgeführt. Die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) wurden für jedes *Well* alle 5 min über einen Zeitraum von 120 min bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Duplikate für jeden Spender. Die gestrichelte Linie repräsentiert den mit dem Mikroplatten-Reader maximal erfassbaren Grenzwert der RFU.

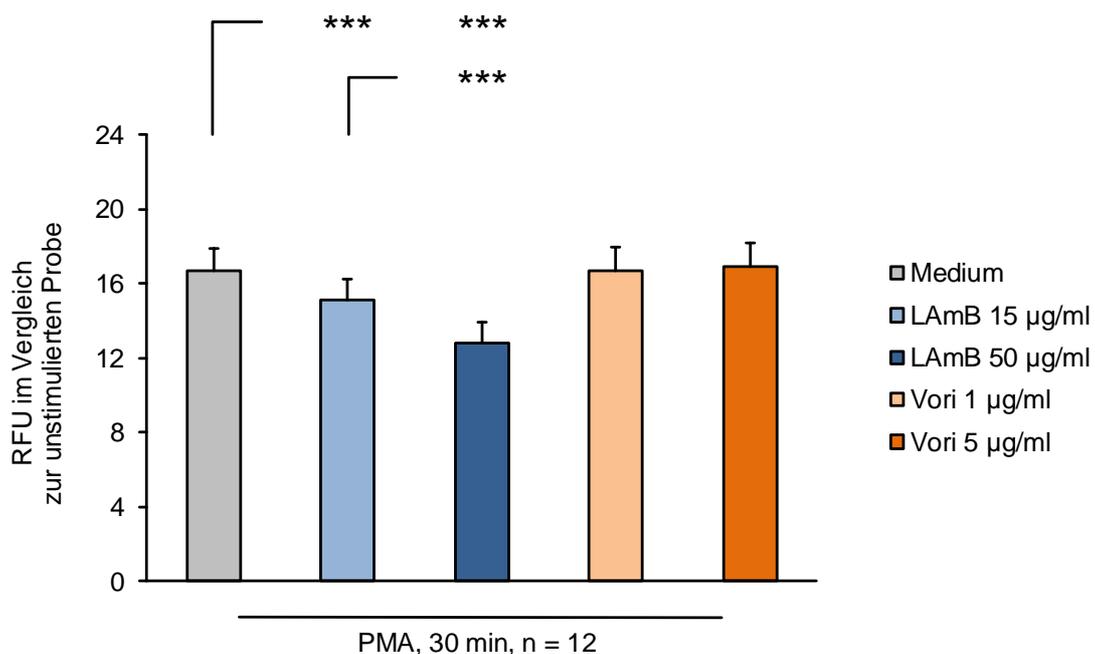
3.2.2 Einfluss von Antimykotika auf die ROS-Sekretion bei Stimulation mit PMA

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob Antimykotika die PMA-induzierte ROS-Freisetzung neutrophiler Granulozyten beeinflussen und ob dieser Effekt gegebenenfalls konzentrationsabhängig ist. Die Stimulation mit PMA führte zu einem mittleren Anstieg der RFU auf das 16,7-fache im Vergleich zur unstimulierten Probe (Abb. 3.3, A). In Gegenwart von LAmB konnte nach 30 min eine verminderte Freisetzung von ROS durch PMA-stimulierte PMNs beobachtet werden. Unter 15 µg/ml LAmB zeigte sich für 11 der 12 Spender eine 7 – 18-

prozentige RFU-Reduktion ($p < 0,001$), während unter $50 \mu\text{g/ml}$ LAmB eine Verminderung der RFU für alle Spender von $8 - 45 \%$ im Vergleich zur Medium-Probe ohne Antimykotika beobachtet wurde ($p < 0,001$, Ergänzende Abb. A), was auf eine dosisabhängige Reduktion der ROS-Sekretion neutrophiler Granulozyten durch LAmB schließen lässt ($p < 0,001$). Das Antimykotikum Voriconazol hingegen führte zu keiner signifikanten Veränderung des oxidativen *Burst*, weder in der hohen noch in der niedrigen Konzentration.

Um zu analysieren, ob die reduzierte ROS-Sekretion in Gegenwart von LAmB durch AmB selbst oder seine liposomale Formulierung bedingt war, wurde für 5 Spender außerdem der Einfluss von d-AmB auf den oxidativen *Burst* nach Stimulation mit PMA untersucht und mit Effekten durch LAmB verglichen. Wie LAmB führte auch d-AmB zu einer signifikanten Verringerung des PMA-induzierten oxidativen *Burst* in neutrophilen Granulozyten (Abb. 3.3, B). Die mittlere Reduktion der RFU im Vergleich zur Medium-Probe ohne Antimykotika betrug unter $0,2 \mu\text{g/ml}$ d-AmB 7% ($p = 0,002$), unter $0,5 \mu\text{g/ml}$ d-AmB 11% ($p = 0,052$). Für weitere Untersuchungen des oxidativen *Burst* wurde auf die Verwendung von d-AmB verzichtet, da es im klinischen Alltag in der Therapie der IA in westlichen Industriestaaten keine Verwendung mehr findet (Kapitel 1.1.4.2).

A



B

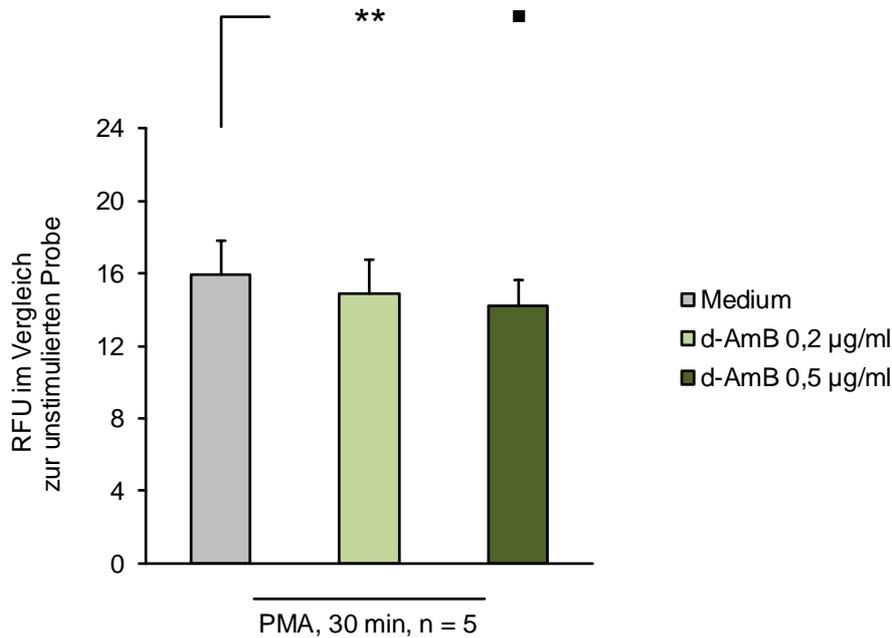


Abbildung 3.3: ROS-Sekretion nach PMA-Stimulation in Abhängigkeit von der Gegenwart verschiedener Antimykotika

Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten nach 30 min PMA-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen von insgesamt 12 (A) bzw. 5 (B) Spendern.

3.2.3 Einfluss von Antimykotika auf die ROS-Sekretion bei Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *Aspergillus fumigatus*

Zur genauen Analyse des Verhaltens der PMN gegenüber dem Pathogen *A. fumigatus* wurden die humanen neutrophilen Granulozyten nun mit inaktivierten Keimschläuchen des Pilzes konfrontiert und die ROS-Freisetzung unter Antimykotika-Einfluss bestimmt. Bei Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen zeigte sich ein mittlerer Anstieg der RFU auf das 4,7-fache im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen (Abb. 3.4). Unter Einfluss von LAmB konnte eine signifikante Steigerung der Sauerstoffradikal-Antwort gegenüber *A. fumigatus* Keimschläuchen beobachtet werden: Unter 15 µg/ml LAmB fand sich eine durchschnittliche Zunahme des oxidativen *Burst* um 24 % ($p = 0,002$),

unter 50 µg/ml LAmB um 43 % ($p = 0,008$) gegenüber der Medium-Probe ohne Antimykotika. Dieser durch LAmB bedingte Anstieg konnte bei 12 von insgesamt 13 Spendern beobachtet werden (Ergänzende Abb. B). In Gegenwart von Voriconazol zeigte sich die ROS-Freisetzung nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen unbeeinflusst.

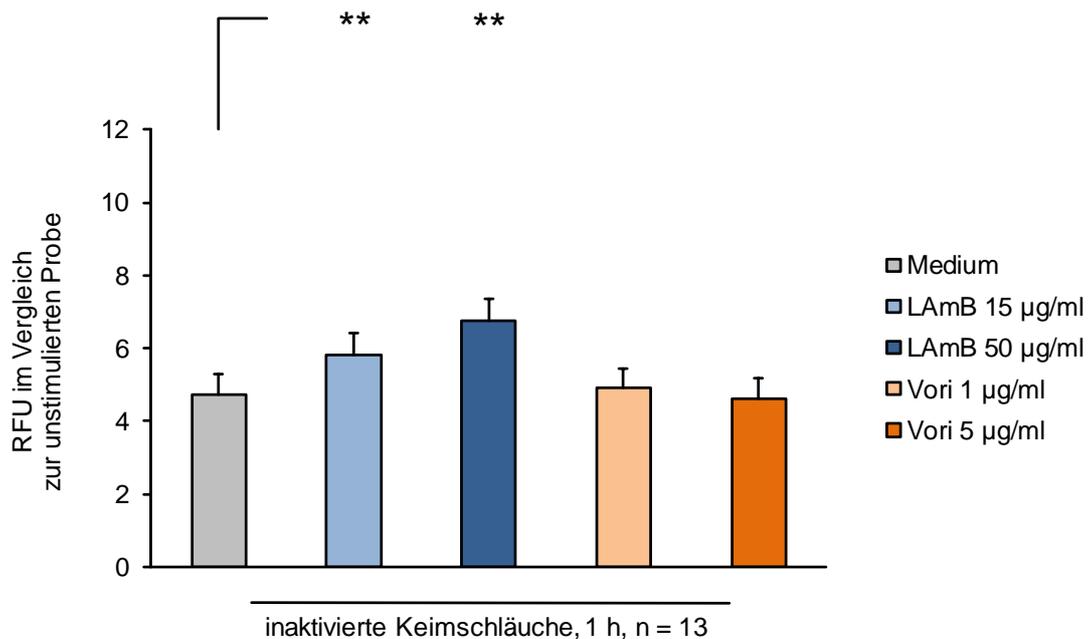


Abbildung 3.4: ROS-Sekretion nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* in Abhängigkeit von der Gegenwart verschiedener Antimykotika
 Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten nach 1-stündiger Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen von insgesamt 13 Spendern.

3.2.4 Einfluss von Antimykotika auf die ROS-Sekretion bei Stimulation mit vitalen Keimschläuchen von *Aspergillus fumigatus*

Nachdem ein Einfluss von LAmB auf die ROS-Freisetzung von mit inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen stimulierten PMN gezeigt wurde, sollte nun analysiert werden, welchen Einfluss Antimykotika auf die ROS-Sekretion von PMN nach Stimulation mit vitalen Keimschläuchen nehmen. Die Stimulation mit vitalen Keimschläuchen führte zu einer mittleren Zunahme der RFU auf das 5,6-

fache der unstimulierten Probe (Abb. 3.5, Ergänzende Abb. C). Die Zugabe aller untersuchten Antimykotika hatte in der Gesamtschau allerdings keine signifikante Veränderung der ROS-Freisetzung nach Stimulation mit vitalen Keimschläuchen zur Folge. Auch aufgrund logistischer Nachteile wurde in der gesamten Arbeit daher auf eine weitere Stimulation mit vitalen Morphotypen verzichtet.

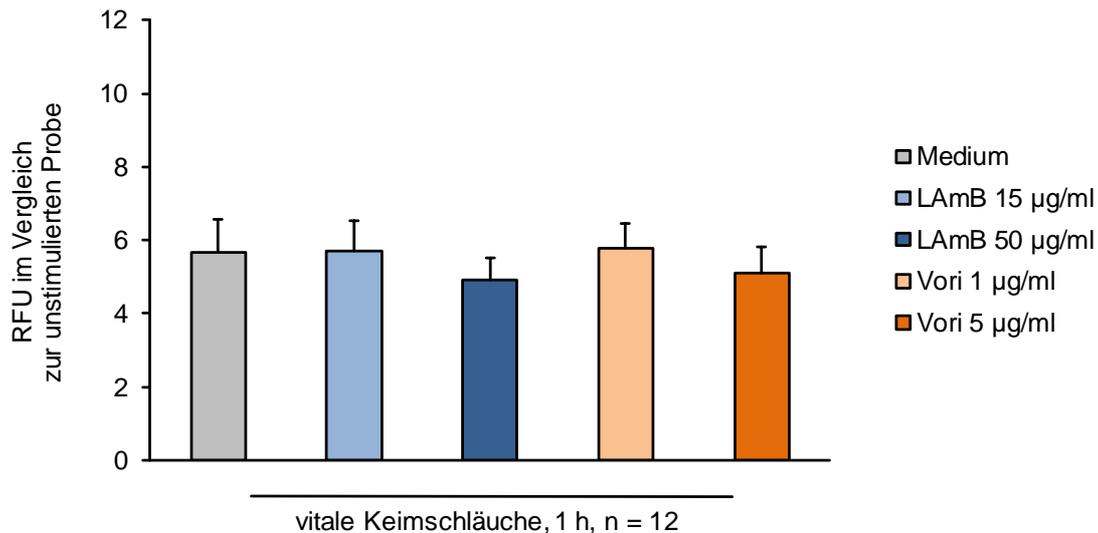


Abbildung 3.5: ROS-Sekretion nach Stimulation mit vitalen Keimschläuchen von *A. fumigatus* in Abhängigkeit von der Gegenwart verschiedener Antimykotika

Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten nach 1-stündiger Stimulation mit vitalen Keimschläuchen von *A. fumigatus* im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen von insgesamt 12 Spendern.

3.2.5 Einfluss von Prednisolon auf die ROS-Freisetzung

In den nächsten Experimenten sollte analysiert werden, inwieweit die ROS-Freisetzung neutrophiler Granulozyten durch das in der Therapie der akuten GvHD eingesetzte Immunsuppressivum Prednisolon sowie die gleichzeitige Exposition gegenüber verschiedenen Antimykotika beeinflusst wird. Hierzu wurde ein Teil der aufgereinigten Neutrophilensuspension eines jeden Spenders zu Beginn mit 200 ng/ml Prednisolon versetzt und die Proben ohne und mit Prednisolon anschließend verglichen. Da in den vorhergehenden Versuchen

allerdings wiederholt keine Beeinflussung des oxidativen *Burst* neutrophiler Granulozyten durch Voriconazol festgestellt werden konnte, wurden alle folgenden Analysen zur ROS-Freisetzung nur noch mit LAmB fortgeführt.

Durch LAmB konnte in PMA-stimulierten neutrophilen Granulozyten ohne Prednisolon-Exposition nach 30 min eine hoch signifikante, dosisabhängige Verminderung der ROS-Sekretion beobachtet werden (Kapitel 3.2.2). Prednisolon nahm keinen Einfluss auf die mittlere relative ROS-Freisetzung durch PMA-stimulierte Zellen ($19,20 \pm 2,82$ vs. $20,53 \pm 3,25$). Die konzentrationsabhängige Verminderung der durch LAmB induzierten ROS-Sekretion zeigte sich auch in Gegenwart von Prednisolon unverändert (Abb. 3.6).

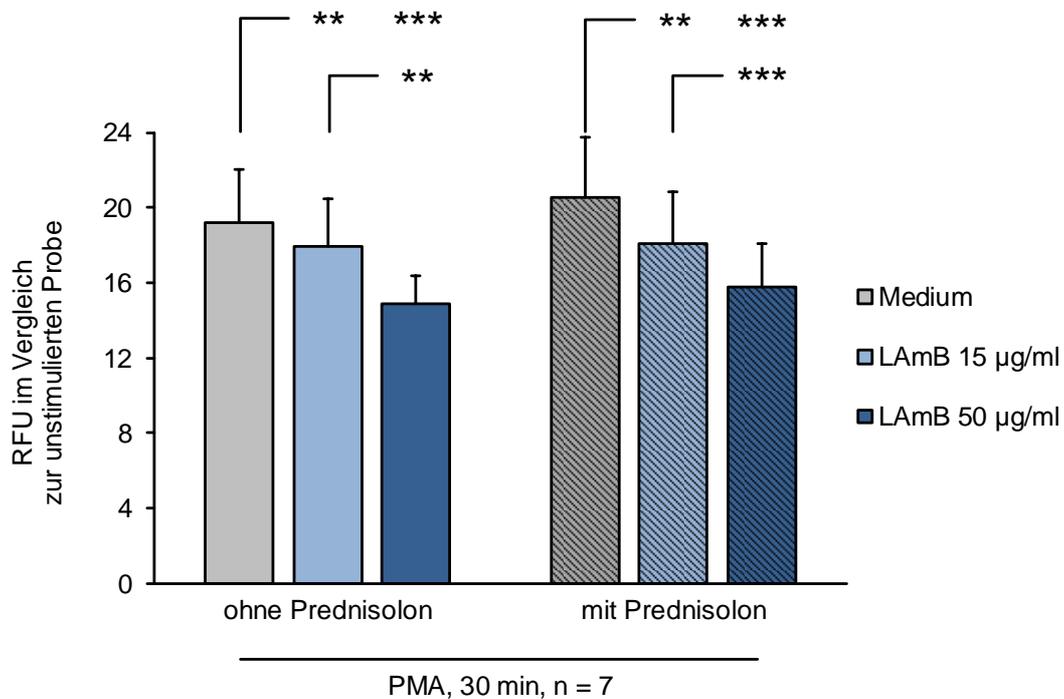


Abbildung 3.6: Vergleich der ROS-Sekretion nach PMA-Stimulation in Abhängigkeit von der Gegenwart von LAmB und Prednisolon

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten nach 30 min PMA-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen von 7 Spendern. Die einfarbigen Säulen dokumentieren die Mittelwerte der PMN ohne Prednisolon-Zugabe, die schraffierten Säulen repräsentieren die Mittelwerte der PMN, die mit Prednisolon versetzt wurden.

Bei Konfrontation der Granulozyten mit inaktivierten Keimschläuchen wurde durch LAmB eine signifikante Zunahme der ROS-Freisetzung nach 1 h aufgezeigt (Kapitel 3.2.3). Diese Auswirkung war bei Prednisolon-exponierten PMN nicht mehr zu beobachten (Abb. 3.7). Die durch LAmB bedingten, leichten Anstiege gegenüber der Medium-Probe ohne Antimykotika waren in Gegenwart von Prednisolon nicht signifikant. Im direkten Vergleich ohne und mit Prednisolon wurde zwischen den Medium-Proben keine signifikant differente ROS-Sekretion beobachtet ($3,17 \pm 0,82$ vs. $3,21 \pm 0,80$), unter gleichzeitiger Einwirkung von $15 \mu\text{g/ml}$ LAmB zeigte sich durch Prednisolon jedoch eine Abnahme der RFU von $4,84 \pm 1,28$ auf $3,55 \pm 0,43$ ($p = 0,038$). Noch ausgeprägter stellte sich dieser Unterschied unter $50 \mu\text{g/ml}$ LAmB mit einer Reduktion der RFU von $6,68 \pm 1,92$ auf $4,31 \pm 1,21$ dar ($p = 0,005$).

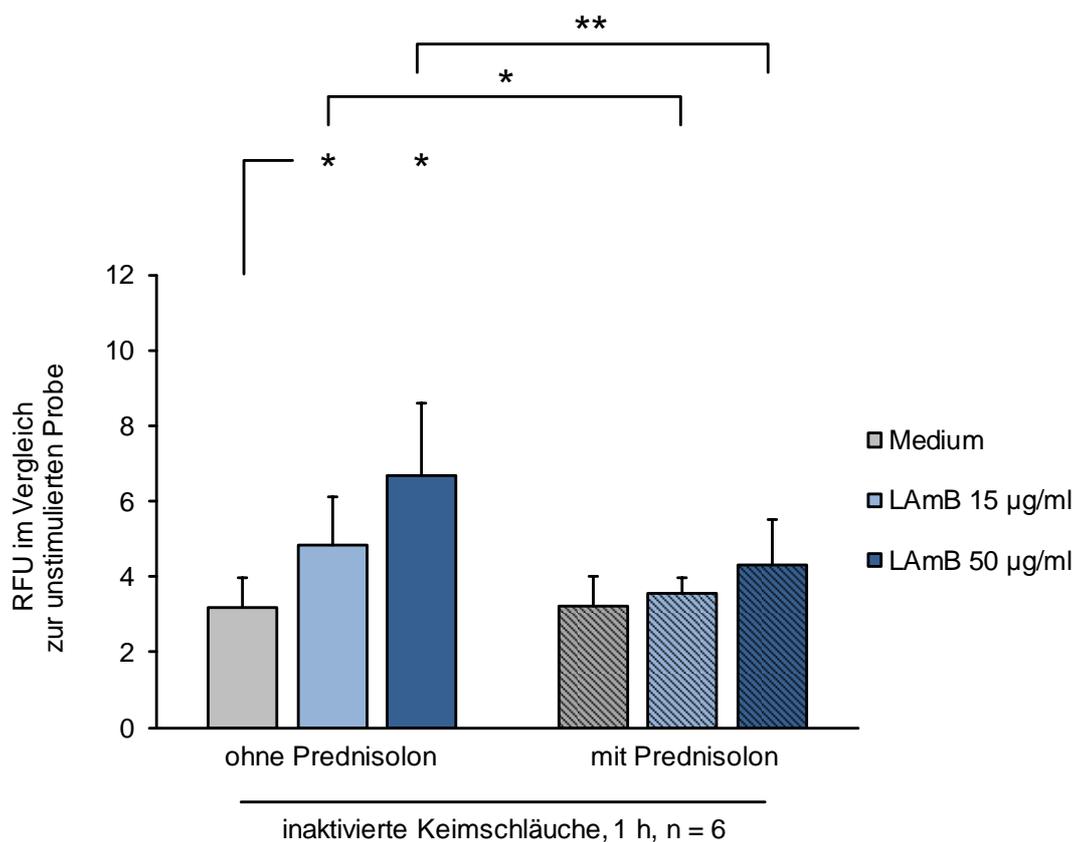


Abbildung 3.7: Vergleich der ROS-Sekretion nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* in Abhängigkeit von der Gegenwart von LAmB und Prednisolon

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten nach 1-stündiger Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen von 6 Spendern. Die einfarbigen Säulen dokumentieren die Mittelwerte der PMN ohne Prednisolon-Zugabe, die schraffierten Säulen repräsentieren die Mittelwerte der PMN, die mit Prednisolon versetzt wurden.

3.2.6 Einfluss von CsA/MMF auf die ROS-Freisetzung

Zu den Immunsuppressiva, die im klinischen Alltag zur Prophylaxe der akuten GvHD eingesetzt werden, zählen Ciclosporin A und Mycophenolat Mofetil. Im Folgenden wurde daher der Einfluss dieser Immunsuppressiva-Kombination auf die ROS-Freisetzung neutrophiler Granulozyten gegenüber inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* im Zusammenspiel mit Antimykotika untersucht. Analog zu den Versuchen mit Prednisolon wurden zu Beginn 200 ng/ml CsA sowie 2 µg/ml MMF zu einem Teil der aufgereinigten Neutrophilensuspension jedes Spenders gegeben und die Proben ohne und mit CsA/MMF verglichen.

Bei Stimulation der humanen Zellen mit inaktivierten Keimschläuchen konnte durch Zugabe von LAmB eine signifikante Steigerung der ROS-Freisetzung beschrieben werden (Kapitel 3.2.3). In Gegenwart der Immunsuppressiva CsA/MMF nahmen die RFU lediglich um 1,8 % gegenüber der entsprechenden Medium-Probe ohne CsA/MMF zu. Es zeigte sich hierunter weiterhin ein leichter Anstieg der ROS-Sekretion in Gegenwart von LAmB in beiden Konzentrationen um 12 % ($p = 0,03$) bzw. 20 % ($p = 0,07$) (Abb. 3.8). Grundsätzlich blieb die Sauerstoffradikalfreisetzung der PMN durch die Zugabe von CsA/MMF für alle untersuchten Konditionen unbeeinflusst.

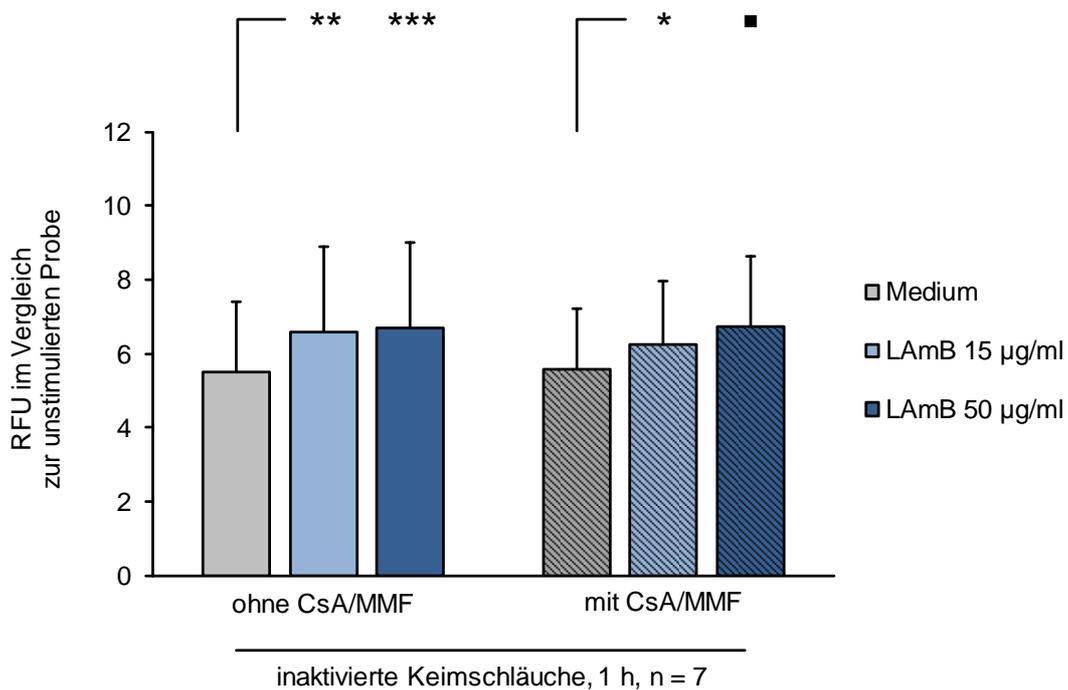


Abbildung 3.8: Vergleich der ROS-Sekretion nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* in Abhängigkeit von der Gegenwart von LAmB und CsA/MMF

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten nach 1-stündiger Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen von 7 Spendern. Die einfarbigen Säulen dokumentieren die Mittelwerte der PMN ohne CsA/MMF-Zugabe, die schraffierten Säulen repräsentieren die Mittelwerte der PMN, die mit CsA/MMF versetzt wurden.

3.3 Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die IL-8-Sekretion neutrophiler Granulozyten

Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit Antimykotika und Prednisolon bzw. das Zusammenspiel derer die IL-8-Freisetzung neutrophiler Granulozyten gegenüber inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* sowie PMA beeinflussen. PMN wurden hierfür mit beiden Stimuli konfrontiert und der Überstand mittels ELISA nach 24 h auf IL-8 getestet (Kapitel 2.2.5).

3.3.1 Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die IL-8-Sekretion bei Stimulation mit PMA

Die isolierten neutrophilen Granulozyten von 5 Spendern wurden durch PMA grundsätzlich zu einer deutlich erhöhten IL-8-Sekretion (102 ± 23 pg/ml) gegenüber der unstimulierten Neutrophilen-Kontrolle (36 ± 19 pg/ml, $p < 0,001$, Abb. 3.9) angeregt. Eine signifikant verminderte Ausschüttung des Zytokins im Vergleich zur Medium-Probe ohne Antimykotika wurde in Gegenwart von d-AmB ($0,5 \mu\text{g/ml}$: 78 ± 16 pg/ml, $p = 0,013$) und LAmB ($50 \mu\text{g/ml}$: 61 ± 18 pg/ml, $p = 0,007$) beobachtet. Unter Voriconazol fand sich ein leichter Rückgang der IL-8-Freisetzung ($5 \mu\text{g/ml}$: 83 ± 23 pg/ml, $p = 0,081$).

Durch Prednisolon kam es lediglich zu einer durchschnittlichen Abnahme der IL-8-Antwort gegenüber PMA in der Medium-Probe um 5 % auf 97 ± 20 pg/ml. Des Weiteren führte die Zugabe von Prednisolon zu keiner wesentlichen Veränderung des Einflusses der Antimykotika auf die IL-8-Sekretion. Insbesondere zeigte sich auch in Gegenwart von Prednisolon eine signifikante Verminderung der PMA-stimulierten IL-8-Freisetzung durch die meisten der untersuchten Antimykotika (Abb. 3.9). Dieser Effekt konnte vor allem unter LAmB beobachtet werden ($15 \mu\text{g/ml}$: 67 ± 11 pg/ml, $p = 0,035$; $50 \mu\text{g/ml}$: 61 ± 19 pg/ml, $p < 0,001$).

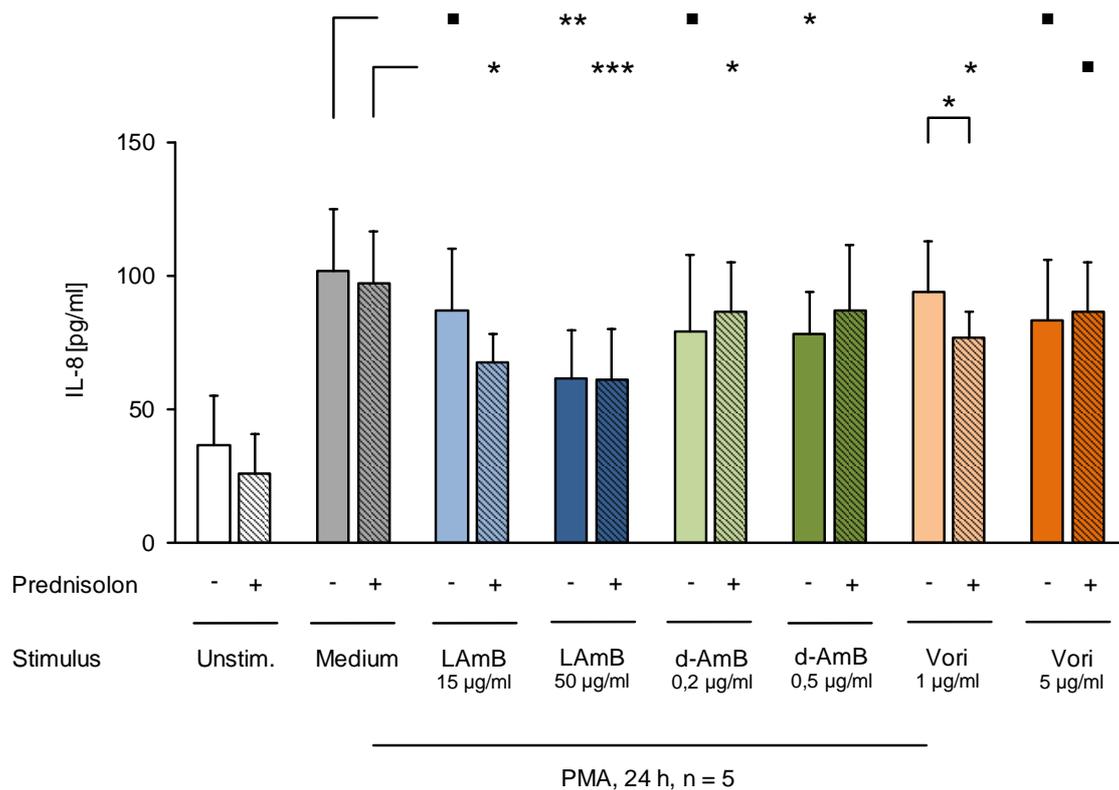


Abbildung 3.9: IL-8-Freisetzung gegenüber PMA in Gegenwart verschiedener Antimykotika und Prednisolon

Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der IL-8-Konzentration in den Überständen von PMN 5 verschiedener Spender nach 24-stündiger Stimulation mit PMA in Gegenwart verschiedener Antimykotika. Die einfarbigen Säulen dokumentieren die Mittelwerte der PMN ohne Prednisolon-Zugabe, die schraffierten Säulen repräsentieren die Mittelwerte der PMN, die mit Prednisolon versetzt wurden. Eine unstimulierte Neutrophilen-Kontrolle (Unstim., weiß) sowie eine PMA-stimulierte Probe ohne Antimykotika (Medium, grau) wurden mitgeführt.

3.3.2 Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die IL-8-Sekretion bei Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *Aspergillus fumigatus*

Ebenso wie PMA führten auch inaktivierte Keimschläuche von *A. fumigatus* zu einer deutlichen Anregung der IL-8-Sekretion in neutrophilen Granulozyten von insgesamt 4 Spendern (234 ± 119 pg/ml) gegenüber der unstimulierten Neutrophilen-Kontrolle (49 ± 53 pg/ml, $p = 0,054$, Abb. 3.10). Unter 15 µg/ml

LAmB und 0,2 µg/ml d-AmB war die Freisetzung von IL-8 durchschnittlich um lediglich 10 bzw. 19 % verringert, in Gegenwart der jeweils höheren Antimykotika-Konzentrationen zeigte sich eine Reduktion der Zytokinausschüttung von 23 – 28 %. Einzig unter 1 µg/ml Voriconazol fand sich eine um 18 % auf 274 ± 162 pg/ml gesteigerte Freisetzung von IL-8 im Vergleich zur Medium-Kontrolle ohne Antimykotika.

Die zusätzliche Exposition der PMN gegenüber Prednisolon führte zu einer durchweg verringerten IL-8-Antwort auf inaktivierte Keimschläuche im Vergleich zur Medium-Probe ohne Antimykotika. All diese Beobachtungen erreichten mit Ausnahme von 0,2 µg/ml d-AmB ohne Prednisolon ($p = 0,097$) aufgrund hoher interindividueller Variabilität der IL-8-Antwort allerdings keine statistische Signifikanz.

Deutlich ersichtlich wurde jedoch die Diskrepanz zwischen Proben mit und ohne Prednisolon: Ungeachtet der Zugabe von verschiedenen Antimykotika zeigte sich bei allen mit Keimschläuchen stimulierten Proben eine Reduktion der IL-8-Freisetzung um 46 – 73 % in Anwesenheit von Prednisolon ($p = 0,03 – 0,07$).

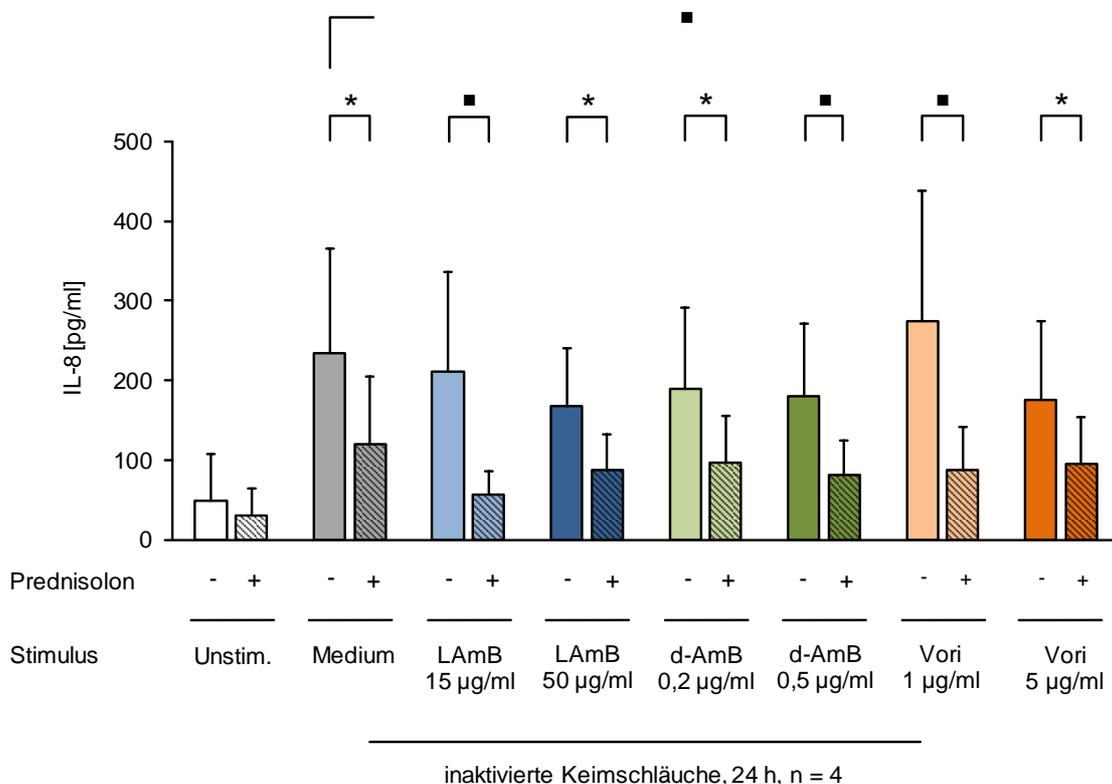


Abbildung 3.10: IL-8-Freisetzung gegenüber inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* in Gegenwart verschiedener Antimykotika und Prednisolon

Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der IL-8-Konzentration in den Überständen von PMN 4 verschiedener Spender nach 24-stündiger Kokultur mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* in Gegenwart verschiedener Antimykotika. Die einfarbigen Säulen dokumentieren die Mittelwerte der PMN ohne Prednisolon-Zugabe, die schraffierten Säulen repräsentieren die Mittelwerte der PMN, die mit Prednisolon versetzt wurden. Eine unstimulierte Neutrophilen-Kontrolle (Unstim., weiß) sowie eine Probe ohne Antimykotika (Medium, grau) wurden mitgeführt.

3.4 Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten bei Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *Aspergillus fumigatus*

Neutrophile Granulozyten besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung von NETs. Um zu untersuchen, ob dieser relativ neu beschriebene Abwehrmechanismus der Zellen gegenüber *A. fumigatus* durch Antimykotika oder Prednisolon bzw. das Zusammenspiel dieser Pharmaka beeinflusst wird, wurde die Bildung von NETs nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* durch Messung der Enzymaktivität der neutrophilen Elastase in Gegenwart der oben genannten Therapeutika analysiert. Das experimentelle Vorgehen erfolgte dabei wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben.

Inaktivierte Keimschläuche von *A. fumigatus* erwiesen sich grundsätzlich als starke Stimulanzen für die Ausbildung von NETs durch neutrophile Granulozyten ($5,8 \pm 2,7$ mU/ml gegenüber $1,6 \pm 1,3$ mU/ml der unstimulierten Neutrophilen-Kontrolle, $p = 0,004$, Abb. 3.11). In Gegenwart aller untersuchten Antimykotika in beiden Konzentrationen konnte eine signifikant verringerte Freisetzung von NETs nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen im Vergleich zur Medium-Probe ohne Antimykotika beobachtet werden. Besonders deutlich zeigte sich dies hierbei unter $15 \mu\text{g/ml}$ LAmB mit einer Reduktion um 33 % auf $3,9 \pm 2,4$ mU/ml ($p = 0,002$) sowie unter 1 und $5 \mu\text{g/ml}$ Voriconazol mit einer

Reduktion um 45 bzw. 48 % auf $3,2 \pm 2,0$ mU/ml ($p = 0,015$) bzw. $3,0 \pm 3,2$ mU/ml ($p = 0,011$).

Auch für neutrophile Granulozyten, die über 4 h zusätzlich gegenüber Prednisolon exponiert waren, stellten inaktivierte Keimschläuche von *A. fumigatus* einen starken Stimulus für die NET-Freisetzung dar ($4,8 \pm 1,9$ mU/ml gegenüber $1,1 \pm 1,0$ mU/ml der unstimulierten Neutrophilen-Kontrolle, $p = 0,005$). Die Anwesenheit von Prednisolon führte für stimulierte Zellen ohne Antimykotika lediglich zu einer Verminderung der NET-Elastase-Aktivität um 17 %. Analog zu den nicht Prednisolon-exponierten Proben zeigte sich eine 25 – 28- bzw. 13 – 36-prozentige Reduktion der NET-Formation in Gegenwart von LAmB und Voriconazol. Insgesamt erreichte allerdings bis auf 5 µg/ml Voriconazol ($p = 0,061$) kein Wert der analysierten Antimykotika unter Prednisolon-Einwirkung statistische Signifikanz. Zwischen den Proben ohne und mit Prednisolon fanden sich im direkten Vergleich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

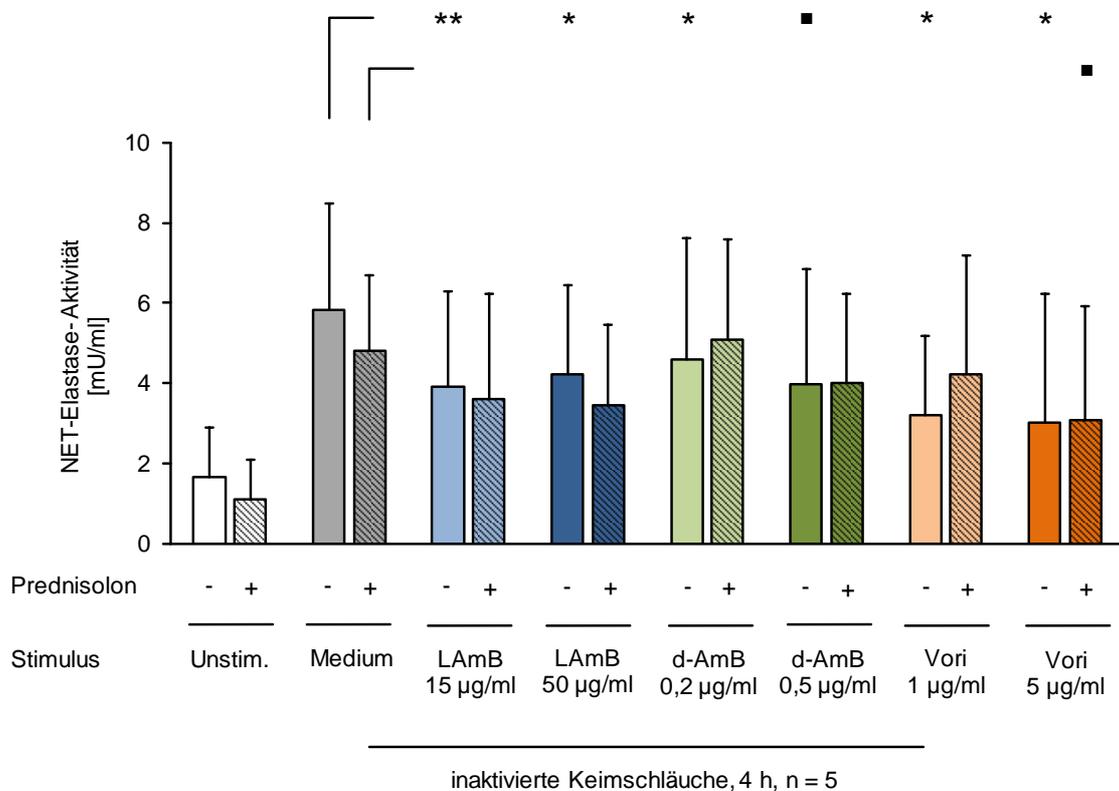


Abbildung 3.11: Ausbildung von NETs nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* in Gegenwart verschiedener Antimykotika und Prednisolon

Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der NET-Elastase-Aktivität der PMN von 5 Spendern nach 4-stündiger Exposition der Zellen gegenüber inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* in Gegenwart verschiedener Antimykotika. Die einfarbigen Säulen dokumentieren die Mittelwerte der PMN ohne Prednisolon-Zugabe, die schraffierten Säulen repräsentieren die Mittelwerte der PMN, die mit Prednisolon versetzt wurden. Eine unstimulierte Neutrophilen-Kontrolle (Unstim., weiß) sowie eine Probe ohne Antimykotika (Medium, grau) wurden mitgeführt.

3.5 Einfluss von Antimykotika und Prednisolon auf die Phagozytoserate von *Aspergillus fumigatus*-Keimschläuchen durch neutrophile Granulozyten

Als letzte hier in der Arbeit untersuchte Effektorfunktion neutrophiler Granulozyten wurde die Fähigkeit zur Phagozytose von *A. fumigatus* Keimschläuchen betrachtet und unter dem Einfluss von Antimykotika und Prednisolon analysiert. Inaktivierte, FITC-markierte Keimschläuche wurden mit neutrophilen Granulozyten in Gegenwart dieser Pharmaka inkubiert und der Prozentsatz phagozytischer Zellen davon bestimmt (Kapitel 2.2.7).

Humane PMN wiesen unter den beschriebenen Bedingungen ohne Antimykotika-Zugabe eine Phagozytoserate von $52,5 \pm 4,9$ % auf (Abb. 3.12). Auch unter dem Einfluss der untersuchten Antimykotika blieb diese Rate mit Werten von 51,2 – 53,1 % nahezu konstant. Einzig unter 50 µg/ml LAmB zeigte sich eine auf $48,7 \pm 6,6$ % verringerte Phagozytoserate im Vergleich zur Medium-Probe ohne Antimykotika ($p = 0,038$).

PMN unter Prednisolon-Einfluss ohne Antimykotika-Zugabe wiesen eine Phagozytoserate von $50,4 \pm 6,5$ % und damit eine nicht signifikant differente Rate im Vergleich zu derjenigen von Zellen ohne Prednisolon auf. Bei gleichzeitiger Exposition der PMN gegenüber Prednisolon und Antimykotika

konnten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Phagozytoserate festgestellt werden.

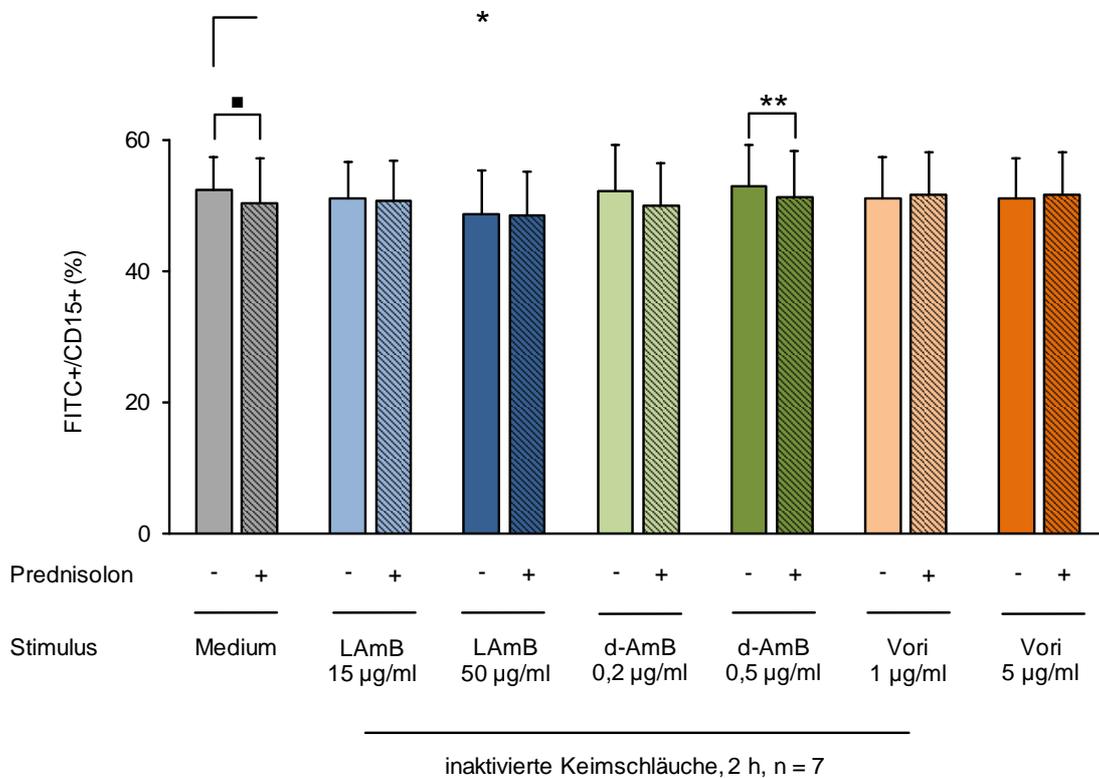


Abbildung 3.12: Phagozytose von *A. fumigatus*-Keimschläuchen in Gegenwart verschiedener Antimykotika und Prednisolon

Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytoserate von inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen durch PMN von 7 Spendern nach 2 h in Gegenwart verschiedener Antimykotika. Die einfarbigen Säulen dokumentieren die Mittelwerte der PMN ohne Prednisolon-Zugabe, die schraffierten Säulen repräsentieren die Mittelwerte der PMN, die mit Prednisolon versetzt wurden. Eine Medium-Probe ohne Antimykotika (grau) wurde mitgeführt. Für die Hintergrundkontrolle bei 4 °C konnte ein Prozentsatz von $1,5 \pm 0,7$ % durch unspezifische Adsorption von Keimschläuchen an die Zelloberfläche ermittelt werden (nicht dargestellt).

4 DISKUSSION

Da das Ausmaß von invasiven Pilzinfektionen im Wesentlichen vom Immunstatus des Patienten und seiner Immunantwort abhängt, kann die Modulation von Immunzellen zu einer klinisch relevanten Beeinflussung dieser Erkrankungen führen (Ben-Ami et al., 2008; Datta & Hamad, 2015). Neben ihren direkten fungiziden oder fungistatischen Mechanismen wurden durch Antimykotika derartige modulierende Effekte auf die angeborene Immunantwort beschrieben (Ben-Ami et al., 2008). Über diese indirekten Effekte der Antimykotika liegen bisher allerdings nur wenige Erkenntnisse vor und auch das kombinierte Einwirken von Antimykotika und Immunsuppressiva auf die Funktionalität von Immunzellen ist bislang kaum untersucht. Dabei ist dies von zusätzlicher Bedeutung, da die von Pilzinfektionen und speziell von IA durch *A. fumigatus* betroffenen Personen oftmals Patienten sind, die z. B. nach allogener Stammzelltransplantation zur Prophylaxe und Therapie der GvHD über längere Zeit Immunsuppressiva erhalten. So ist es wichtig zu berücksichtigen, dass Antimykotika eventuell differente Effekte auf Patienten mit unterschiedlichem Immunstatus bzw. zusätzlicher Komedikation mit Immunsuppressiva haben können (Mesa-Arango et al., 2012).

Neutrophile Granulozyten spielen als Teil der angeborenen Immunität eine essentielle Rolle für die effiziente Abwehr von IA durch *A. fumigatus*. Bisher existiert keine Studie, die systematisch verschiedene Mechanismen dieser Immunzellen in Gegenwart verschiedener Antimykotika und Immunsuppressiva verglichen hat. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, vier Effektormechanismen humaner neutrophiler Granulozyten *in-vitro* unter dem Einfluss von LAmB, d-AmB und Voriconazol sowie zusätzlich von Prednisolon und CsA/MMF zu analysieren.

4.1 Morphotyp-abhängige Auslösung der Effektormechanismen von neutrophilen Granulozyten

Häufig beschrieben und untersucht ist bereits, welche fungalen Elemente von *A. fumigatus* als Stimulus für verschiedene Rezeptoren und damit Funktionen von Immunzellen dienen (Brakhage et al., 2010; Hohl et al., 2005; Lass-Floerl et al., 2013; Levitz, 2010). Grundsätzlich ließ sich in dieser Arbeit beobachten, dass sowohl inaktivierte als auch vitale Konidien des humanpathogenen Pilzes *A. fumigatus* zu keiner Stimulation des oxidativen *Burst* in humanen neutrophilen Granulozyten führten. Diese Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1 sind gut vereinbar mit den Erkenntnissen von Aïmanianda et al. (2009) sowie Wurster et al. (2017), die für die fehlende Auslösung der Immunantwort die Hydrophobin- und Rodletschicht der Konidien verantwortlich machen. Trotz dieser Schicht sollen ruhende *Aspergillus*-Konidien von PMN phagozytiert werden können (Balloy & Chignard, 2009; Boyle et al., 2012). In Vorversuchen dieser Arbeit wurde die Phagozytoserate von inaktivierten *A. fumigatus*-Konidien durch humane neutrophile Granulozyten analysiert. Dabei wurde analog zur ROS-Freisetzung beobachtet, dass die Konidien nicht zu einer Anregung dieser Effektorfunktion von PMN führten (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung hierfür liefert die Annahme von Wong and Aïmanianda (2017). Sie gehen davon aus, dass die Erkennung ruhender *A. fumigatus*-Konidien abhängig von löslichen Faktoren wie Komplementfaktoren oder Akute-Phase-Proteinen in humanem Serum ist. Vor diesem Hintergrund erscheint nachvollziehbar, warum die in unseren Versuchen in artifiziellem, tierischem Medium isolierten PMN nicht durch *A. fumigatus*-Konidien zu dieser Immunreaktion angeregt wurden.

Erst mit fortschreitender Keimung wird die Hydrophobin- und Rodletschicht der Konidien von *A. fumigatus* abgebaut bzw. geht verloren, sodass immunogene Moleküle an die Oberfläche treten und diese im Folgenden zu einer Stimulation von Immunzellen führen (Aïmanianda et al., 2009). Übereinstimmend mit dieser Theorie kam es durch Keimschläuche und Hyphen von *A. fumigatus* in unserer Arbeit zu einer starken Stimulation des oxidativen *Burst* von PMN (Kapitel 3.2.1). Auch die Phagozytose-Aktivität, Freisetzung von IL-8 und Bildung von NETs

wurden durch *A. fumigatus*-Keimschläuche signifikant induziert (Kapitel 3.3.2, 3.4, 3.5). Viele andere Studien verwendeten Hyphen von *A. fumigatus* als effizienten Stimulus für die Anregung von neutrophilen Effektorfunktionen (Chai et al., 2009; Chamilos et al., 2008; Dotis et al., 2008). In unseren Versuchen aus Kapitel 3.2.1 waren über mehrere Spender hinweg allerdings Keimschläuche im Gegensatz zu Hyphen die Ursache für eine weitaus hochgradigere Anregung der ROS-Freisetzung. Van de Veerdonk et al. (2017) berichteten von neuen Erkenntnissen, wonach Hyphen von einer Schicht aus dem Polysaccharid GAG umgeben sind und auch die schützende Hülle aus Hydrophobinen und DHN-Melanin nicht komplett verschwindet. Analog zu Konidien wäre es durchaus möglich, dass auch die einzigartige Zusammensetzung der Zellwand von Hyphen die Immunantwort von Immunzellen durch Maskierung der PAMPs zu einem gewissen Grad vermindert. Welchen Anteil die Polysaccharidschicht aus GAG im Einzelnen daran hat, ist fraglich. Vor kurzem konnte jedenfalls gezeigt werden, dass GAG antiinflammatorische Eigenschaften beispielsweise über eine verminderte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie über eine Induktion der Apoptose neutrophiler Granulozyten vermittelt (Gresnigt et al., 2014; Robinet et al., 2014). Für die weiteren Versuche der vorliegenden Arbeit wurden im Folgenden Keimschläuche als Stimulus für die neutrophilen Granulozyten verwendet.

4.2 Einfluss von Amphotericin B – liposomal und desoxycholat

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung des Einflusses des Antimykotikums Amphotericin B auf neutrophile Effektorfunktionen. Der fungizide Wirkmechanismus dieses Polyens beruht auf einer Porenbildung in der inneren Plasmamembran durch Bindung an Ergosterol, sodass Kalium und andere intrazelluläre Moleküle austreten können (Ben-Ami et al., 2008). Studien aus den 70er- und 80er-Jahren kamen bereits zu dem Schluss, dass eine erhöhte Plasmamembranpermeabilität nicht allein zu der abtötenden Wirkweise des Antimykotikums beiträgt (Chen et al., 1978; Sokol-Anderson et al., 1986). Die

Induktion von oxidativem Stress bzw. Produktion freier Sauerstoffradikale in der Pilzzelle durch AmB wurde durch mehrere, auch DCF-basierte Studien nachgewiesen (Mesa-Arango et al., 2014; Phillips et al., 2003; Sangalli-Leite et al., 2011). Die intrazelluläre Akkumulation dieser reaktiven Sauerstoffspezies führt zusätzlich zu einer schweren Schädigung des Pilzes (Valiante et al., 2015). Da konventionelles d-AmB eine hohe Toxizität aufweist, wurde in der Vergangenheit eine verträglichere Formulierung für dieses wirkungsvolle Antimykotikum gesucht und mit LAmB gefunden. Durch Integration des Wirkstoffs AmB in echte, unilamelläre Liposomen weist LAmB eine reduzierte Toxizität v. a. der Niere sowie eine höhere Effektivität als konventionelles d-AmB auf (Saliba & Dupont, 2008; Torrado et al., 2008). Obwohl d-AmB deshalb heutzutage in westlichen Industriestaaten keine große Rolle mehr für die Therapie der IA spielt, wurde auch der Effekt dieses Antimykotikums untersucht, um zu überprüfen, ob Unterschiede zu LAmB bestehen und ob ein möglicher Effekt durch AmB selbst oder seine liposomale Formulierung bedingt ist.

Neben der Wirkungsweise auf Pilze wurden durch den Wirkstoff AmB bereits einige immunmodulatorische Effekte auf eine Reihe von Immunzellen beschrieben (Mesa-Arango et al., 2012). Der Mechanismus der Immunmodulation ist dabei allerdings noch weitgehend unverstanden. Durch d-AmB wurden häufig eine erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-8, Prostaglandine und NO sowie die verstärkte Produktion von Sauerstoffradikalen beobachtet (Gigliotti et al., 1987; Mozaffarian et al., 1997; Sau et al., 2003; Simitsopoulou et al., 2005; Wilson et al., 1991). In anderen Studien führte die Exposition gegenüber d-AmB hingegen zu einer verminderten Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und ROS (Becker et al., 2003; Choi et al., 2010; Dotis et al., 2008). Durch LAmB überwogen in den bisher vorliegenden Arbeiten antiinflammatorische Prozesse wie die Herunterregulation und verringerte Freisetzung von IL-1 β und TNF- α (Simitsopoulou et al., 2005). In den Studien von Bellocchio et al. (2005) führte die Exposition von *A. fumigatus*-Konidien gegenüber LAmB zwar zu einer minimal erhöhten ROS-Freisetzung, eine erhöhte Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 trat allerdings wesentlich deutlicher in Erscheinung.

Um in diesem Zusammenhang weitere Erkenntnisse insbesondere zu neutrophilen Granulozyten zu gewinnen, wurde die ROS- und IL-8-Freisetzung dieser Zellen als Reaktion auf PMA unter Zugabe von LAmB und d-AmB analysiert. Durch Verwendung des unspezifischen Stimulus PMA, einem Proteinkinase-C-Aktivator, konnten unter Ausschluss der Effekte der Antimykotika auf die Pilzzellen auch dessen direkter Einfluss auf PMN betrachtet werden.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass LAmB die ROS-Sekretion PMA-stimulierter Neutrophilen nach 30 min dosisabhängig verminderte. Eine Verringerung der PMA-stimulierten ROS-Freisetzung ließ sich ebenfalls durch d-AmB beobachten (Kapitel 3.2.2). Zudem konnte eine verminderte IL-8-Freisetzung durch LAmB und d-AmB nach 24-stündiger Stimulation der Neutrophilen mit PMA festgestellt werden (Kapitel 3.3). Die erhobenen Daten stehen in Kontrast speziell zu Erkenntnissen von Wilson et al. (1991), die gleichfalls nach PMA-Stimulation eine erhöhte ROS-Freisetzung durch d-AmB beobachteten. Diese Experimente wurden allerdings mit Makrophagen durchgeführt. AmB bindet, wenn auch mit geringerer Affinität, neben Ergosterol ebenso an das strukturell ähnliche humane Cholesterol (Holz, 1974; Odds et al., 2003). Es wurde daher vermutet, dass AmB durch diese Bindung Konformationsänderungen hervorruft, die über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase eine erhöhte ROS-Freisetzung durch die Immunzellen bedingen (Chapman & Hibbs, 1978; Wilson et al., 1991).

Unsere Ergebnisse lassen eher vermuten, dass LAmB und d-AmB direkt inhibierend auf diese Immunzellen einwirken, was einen toxischen Effekt nahelegen könnte. Wie zuvor beschrieben sind auch humane Zellen durch ihren Cholesterolgehalt von dem porenbildenden Mechanismus durch AmB betroffen und können dadurch Schaden nehmen (Holz, 1974). Chunn et al. (1977) vermuteten ebenfalls eine direkte toxische Wirkung von AmB auf PMN. Sie konnten mittels Trypanblau-Exklusion eine Viabilität von humanen PMN unter 1 µg/ml d-AmB nach 2 h von etwa 75 % aufzeigen. Unsere Ergebnisse in Kapitel 3.1 mit einer über 99-prozentigen Viabilität der PMN auch noch nach 4 h sowohl unter 50 µg/ml LAmB als auch unter 0,5 µg/ml d-AmB stehen in Kontrast zu den Beobachtungen durch Chunn et al. (1977). Obwohl beide Analysen zur Viabilität

mittels Trypanblau-Exklusion und in Serum-freiem Medium durchgeführt wurden, sind sie auf Grund unterschiedlicher Zellisolationstechniken und Antimykotika-Konzentrationen kaum direkt vergleichbar. Anzumerken ist zudem, dass die Anfärbung durch Trypanblau zwar die günstigste und einfachste Methode zur Überprüfung der Viabilität darstellt, aber bei weitem nicht die sensitivste. Hierfür gibt es weitere Methoden wie z. B. das *Cytotox Staining* oder *Annexin/Propidium iodide Staining*, die im Rahmen einer tiefergehenden Analyse herangezogen werden sollten. Außerdem kann mittels Trypanblau-Methode nicht zwischen gesunden und denjenigen Zellen unterschieden werden, die zwar noch vital sind, aber bestimmte zelluläre Funktionen verloren haben. Für unsere nachfolgenden Experimente konnte durch die Ergebnisse in Kapitel 3.1 jedoch ausgeschlossen werden, dass für die in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen ein Antimykotika-vermittelter Effekt auf Funktionen von PMN nur über eine Beeinflussung der Viabilität der Zellen bedingt wird.

Möglich wäre daher ein inhibierender Effekt von LAmB und d-AmB auf die zellulären Funktionen der Neutrophilen und hierbei insbesondere auf die ROS- und IL-8-Freisetzung selbst, ohne wie von Chunn et al. (1977) angenommen frühzeitig zum Zelltod zu führen. Weiterhin muss in Erwägung gezogen werden, dass erst die Kombination aus LAmB bzw. d-AmB mit PMA zu einem frühzeitigen Zelltod führt und nicht LAmB bzw. d-AmB allein toxisch wirkt. PMA wurde in unseren Versuchen in Kapitel 3.1 nicht verwendet. Eine alleinige Toxizität von PMA bereits nach 30 min erscheint unwahrscheinlich, da sonst auch unter Einfluss von Voriconazol eine signifikante Verminderung des oxidativen *Burst* nach PMA-Stimulation zu erwarten wäre. Dies war allerdings nicht der Fall (Kapitel 3.2.2). In Kapitel 3.2.1 wurde zudem eine kontinuierlich ansteigende ROS-Freisetzung durch Neutrophile nach PMA-Stimulation über einen Zeitraum von mindestens 50 min beobachtet, was ebenfalls gegen eine frühzeitige, exklusive Toxizität von PMA spricht. Des Weiteren ist anzumerken, dass die Substanz PMA eine anerkannte und multipel in externen Studien verwendete Positivkontrolle darstellt. Nach 24-stündiger Einwirkzeit für die Analyse der IL-8-Sekretion erscheint eine Toxizität von PMA, die im Folgenden zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen kann, dagegen durchaus möglich und wird

bereits nach 3 – 5 h auch von anderen Autoren beschrieben (Suzuki & Namiki, 1998; Takei et al., 1996). Nach 24-stündiger PMA-Stimulation konnten zudem deutlich niedrigere Absolutwerte der Mittelwerte im Vergleich zur Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen beobachtet werden, was zusätzlich auf eine PMA-Toxizität bei prolongierter Exposition hinweist (Kapitel 3.3).

Nach Konfrontation der neutrophilen Granulozyten mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* ließ sich unter Einfluss von LAmB interessanterweise eine signifikant gesteigerte ROS-Sekretion beobachten (Kapitel 3.2.3). Auf eine zusätzliche Analyse von d-AmB wurde hier verzichtet, da die Untersuchungen mit PMA-Stimulation keinen Anhalt für einen Unterschied zu LAmB ergaben. Mutmaßliche Mechanismen einer durch AmB erhöhten ROS-Freisetzung sind transkriptionelle Veränderungen wie die Induktion proinflammatorischer Signalwege oder eine erhöhte Rezeptorexpression (Rogers et al., 1998; Sau et al., 2003). Obwohl der quantitative Anstieg der ROS-Produktion nur gering ausfiel, weist der Unterschied zur Stimulation mit PMA primär auf einen Effekt von LAmB mit bzw. auf den Pilz und nicht auf neutrophile Granulozyten hin. Vor dem Hintergrund des Wirkmechanismus von AmB, der Destabilisierung der Zellmembran und anschließender Porenbildung in Pilzzellen muss auch eine Freisetzung immunogener, zytosolischer Proteine bzw. Metaboliten des Pilzes durch LAmB berücksichtigt werden, was zu einer vermehrten Anregung des oxidativen *Burst* in PMN führen kann. Damit einhergehend konnten auch Bellocchio et al. (2005) zeigen, dass die Exposition mit LAmB zu einer leicht verstärkten Sauerstoffradikal-Freisetzung von PMN gegenüber *A. fumigatus*-Konidien führt. Obige Annahme erscheint umso wahrscheinlicher, da dieser Effekt durch Prednisolon abgeschwächt wurde, das für sein nicht-rezeptorvermitteltes Potential zur Stabilisation von Zellmembranen bekannt ist (Kapitel 4.4; Buttgerit et al., 1998). Eine mögliche Beeinflussung der Effekte durch unvermeidliche Wachstumsvorgänge von vitalen Pilzzellen konnte durch Verwendung inaktivierter Morphotypen ausgeschlossen werden.

Das Fehlen dieses Effekts in Experimenten mit vitalen Keimschläuchen könnte durch die Inhibition eben dieses Hyphen-Wachstums aus Keimschläuchen durch AmB erklärt werden (Kapitel 3.2.4). Eine Wachstumsinhibition von Pilzen durch

AmB ist bereits nach 1 – 2 h möglich (Teixeira et al., 2007). Die dadurch ausbleibenden Wachstumssignale und fehlenden Metaboliten des Pilzes könnten im Gegenzug zu einer verminderten Induktion der ROS-Sekretion führen. Somit würden sich dieser Effekt und die zuvor beschriebene Freisetzung zytosolischer Pilzproteine durch AmB-vermittelte Porenbildung weitgehend aufheben und das Bild einer unbeeinflussten ROS-Freisetzung ergeben.

Die Ergebnisse aus den ELISA-Analysen zur IL-8-Freisetzung sowie aus dem Phagozytose-Assay nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* ergaben keine Hinweise auf eine relevante Beeinflussung dieser Effektorfunktionen durch LAmB und d-AmB (Kapitel 3.3.2 und 3.5). Die beobachteten minimalen Verringerungen der IL-8-Konzentration und Phagozytoserate erreichten keine Signifikanz oder waren so marginal, dass ein klinisch relevanter Einfluss nicht anzunehmen ist. Insbesondere zeigte sich keine Tendenz in Richtung erhöhter IL-8-Sekretion durch LAmB gegenüber inaktivierten Keimschläuchen, wie dies bei den Analysen der ROS-Sekretion der Fall war.

Zur Ausbildung von NETs durch neutrophile Granulozyten gibt es noch wenige Erkenntnisse über mögliche Stimuli oder nachgeschaltete Signalwege und Mechanismen der NET-Induktion durch *A. fumigatus*. Kenny et al. (2017) konnten zeigen, dass verschiedenste Substanzen wie PMA, Pilze und Bakterien die NET-Bildung induzieren können und NETs je nach Stimulus auf unterschiedliche Art und Weise generiert und freigesetzt werden. Gemäß Bruns et al. (2010) trägt die RodA-Schicht auf *A. fumigatus*-Konidien analog zur ROS-Freisetzung effektiv zur Verhinderung der NET-Bildung bei, da vermutlich NET-induzierenden Oberflächenstrukturen der Pilzzelle abgeschirmt werden. Demonstriert wurde bereits, dass zur Ausbildung der NETs keine vitalen Pilzzellen als Stimulus nötig sind (McCormick, Heesemann, et al., 2010). Dies konnten unsere Daten mit einer deutlich erhöhten NET-Bildung nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* grundsätzlich bestätigen (Kapitel 3.4).

Insbesondere Literatur zu Einflussfaktoren auf diesen neuartigen Abwehrmechanismus von PMN ist limitiert. Für das Antibiotikum Gentamicin

beispielsweise konnte kürzlich ein inhibitorischer Effekt auf die NET-Freisetzung beobachtet werden (Manda-Handzlik et al., 2017). Interessanterweise zeigte sich in unserer Arbeit die Ausbildung von NETs nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* durch LAmB sowie d-AmB signifikant vermindert (Kapitel 3.4). Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Verhinderung des Pilzmetabolismus oder des Hyphenwachstums durch die Antimykotika konnte ausgeschlossen werden, da inaktivierte Keimschläuche verwendet wurden. Gehen wir davon aus, dass erneut der porenbildende Mechanismus von AmB mit nachfolgend austretenden Pilzmetaboliten greift, würden wir analog zur ROS-Sekretion eher eine leicht erhöhte NET-Bildung erwarten.

Dieser Umstand könnte darauf hindeuten, dass eine bestimmte Situation, z. B. die vermehrte Gegenwart von Pilzmetaboliten durch AmB, die Effektorfunktionen von PMN auf unterschiedliche Art und Weise beeinflusst. Es wäre andererseits denkbar, auch hier von einem leichtgradigen, toxischen Effekt von AmB auf diese Effektorfunktion auszugehen. Der Mechanismus der NETose könnte dabei in besonderem Maße suszeptibel gegenüber dem inhibierenden Einfluss von AmB sein. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass der verwendete NET-Elastase-Assay bovines Serumalbumin statt FCS als Proteinquelle vorsah, was ebenfalls einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte.

In der Gesamtschau konnte in dieser Arbeit kein wesentlich relevanter Einfluss durch LAmB sowie d-AmB insbesondere gegenüber *A. fumigatus* festgestellt werden. Bis auf einen konzentrationsabhängigen Effekt von LAmB auf die ROS-Freisetzung PMA-stimulierter PMN konnten unsere Daten zudem nicht unterstützen, dass eine höhere Konzentration der Antimykotika einen stärkeren immunmodulierenden Einfluss auf die untersuchten Effektorfunktionen von PMN hat. Des Weiteren lieferten die Analysen zur ROS- und IL-8-Freisetzung, Phagozytoseaktivität sowie zur NET-Bildung von neutrophilen Granulozyten keine Hinweise auf einen wesentlich differenten Einfluss von d-AmB und LAmB. Roilides et al. (2002) und Dotis et al. (2008) konnten in ihren XTT-Assay-basierten Untersuchungen zur PMN-vermittelten *A. fumigatus*-Hyphen-Schädigung ebenfalls keine bedeutenden Diskrepanzen zwischen der Wirkung von d-AmB und L-AmB erkennen. Dagegen gehen andere Studien von einem

relevanten Unterschied zwischen dem Effekt von d-AmB und LAmB auf die Funktionen von Immunzellen aus (Bellocchio et al., 2005; Simitsopoulou et al., 2005). Dieser Unterschied zwischen den Formulierungen von AmB wird durch die Bindung an verschiedene TLR-Rezeptoren erklärt. Es wird vermutet, dass d-AmB eher an TLR-2 bindet und damit eine proinflammatorische Immunantwort bewirkt, während durch bevorzugte Bindung von L-AmB an TLR-4 antiinflammatorische Effekte überwiegen (Bellocchio et al., 2005). Über eine gemeinsame Endstrecke über das Protein MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) führt die Aktivierung der Rezeptoren zu einer Translokation von NF- κ B in den Zellkern mit anschließender Expressionsinduktion verschiedener Gene u. a. für proinflammatorische Zytokine. Die proinflammatorischen Eigenschaften von d-AmB wären ein Erklärungsansatz für die Toxizität dieser Substanz im Gegensatz zu L-AmB (Mesa-Arango et al., 2012).

Es existieren sogar weitere Hinweise, wonach bereits Leerliposomen an sich eine immunmodulatorische Wirkung auf Immunzellen aufweisen. Bellocchio et al. (2005) dokumentierten durch Liposomen eine verminderte ROS-Freisetzung von mit *A. fumigatus*-Konidien stimulierten PMN, während gleichzeitig eine erhöhte Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 erfolgte. Insgesamt beobachteten sie allein durch Liposomen die Verschiebung einer pro- zu einer antiinflammatorischen Immunantwort. Weiterhin konnten Lewis et al. (2007) mittels XTT-Assay aufzeigen, dass Leerliposomen die Fähigkeit der PMN verbessern, Hyphen von *A. fumigatus* abzutöten. Beide Autoren vermuteten einen über TLR-4-vermittelten direkten Effekt der Liposomen auf PMN.

Obwohl einige Studien also einen differenten Einfluss von d-AmB und LAmB demonstrieren und sogar einen alleinigen Effekt der Leerliposomen postulieren, können unsere Ergebnisse diese Annahmen insgesamt nicht unterstützen. Zumindest für die in dieser Arbeit untersuchten Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten suggerieren unsere Daten, dass die beobachteten Effekte durch das Molekül Amphotericin B an sich vermittelt werden und die Wirkung auf die vier untersuchten Effektorfunktionen generell unabhängig von der liposomalen Formulierung bleibt. Auf Grund verschiedener Stimuli, untersuchter Zellen und

Messmethoden gestaltet sich ein Vergleich mit den Analysen anderer Studien allerdings schwierig. In unserer Arbeit wurde zudem nur der Effekt von d-AmB und L-AmB vergleichend, und nicht der Einfluss durch Leerliposomen im Speziellen analysiert. Es war hierbei nicht zwingend gegeben, dass in 15 bzw. 50 µg LAmB exakt 0,2 bzw. 0,5 µg AmB enthalten waren, sodass diese Konditionen direkt hätten verglichen werden können. In unserer Arbeit wurden dagegen Konzentrationen der therapeutisch relevanten Plasmaspiegel untersucht. Weitere Untersuchungen wären nötig, um die Effektorfunktionen der PMN explizit unter dem Einfluss von Leerliposomen zu evaluieren.

4.3 Einfluss von Voriconazol

Zahlreiche Studien belegen die antimykotische Wirksamkeit von Azolen und der Substanz Voriconazol (Denning et al., 2002; Espinel-Ingroff, 1998; Oakley et al., 1998; Vora, Chauhan, et al., 1998). Allgemein angenommener Wirkmechanismus ist dabei die Inhibierung des Enzyms C-14 α -Demethylase für die essentielle Ergosterol-Synthese aus Lanosterol in fungalen Zellen (Johnson & Kauffman, 2003). Studien zum Einfluss auf Immunzellen und im Besonderen auf PMN oder gegenüber *A. fumigatus* sind allerdings begrenzt und oft inkonsistent. Unter den gängigen Antimykotika zur Therapie der IA sind Azole soweit bekannt diejenigen mit dem geringsten Einfluss auf das menschliche Immunsystem und seine Zellen (Ben-Ami et al., 2008). Gegenüber Pilzen der Gattung *Candida* wurde von einer synergistischen antifungalen Aktivität von Azolen mit Phagozyten sowie PMN berichtet (Brummer & Stevens, 1996; Garcha et al., 1995; Vora, Purimetla, et al., 1998). Vora, Chauhan, et al. (1998) konnten ebenfalls eine durch Voriconazol additiv verstärkte Verhinderung des Wachstums von *A. fumigatus*-Hyphen durch neutrophile Granulozyten nachweisen. Als Erklärung für eine solche synergistische Aktivität wird angenommen, dass die Verminderung von Ergosterol sowie die gleichzeitige Akkumulation von nun anfallendem Lanosterol in der Zellmembran des Pilzes durch Azole diese vermehrt anfällig für oxidative und nicht-oxidative Schädigungsmechanismen

machen (Ben-Ami et al., 2008). Bis auf Simitsopoulou et al. (2007), die eine Hochregulation proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α durch Voriconazol in Monozyten beobachteten und eine Interaktion mit TLR annahmen, wird die These einer direkten Wirkung auf Immunzellen dabei nicht explizit unterstützt. Choi et al. (2010) fanden im Gegensatz dazu zwar eine verminderte TNF- α -Freisetzung durch Voriconazol in Monozyten, sie vermuteten jedoch einen indirekten Effekt über Wachstumsinhibition der vitalen *A. fumigatus*-Konidien.

Unsere Daten aus Kapitel 3.1 zeigten eine unbeeinträchtigte Lebensfähigkeit neutrophiler Granulozyten durch beide Voriconazol-Konzentrationen bis hin zu 4 h. Weiterhin blieb unter Einfluss des Azols die ROS- und IL-8-Sekretion durch PMA-stimulierte neutrophile Granulozyten weitgehend unverändert (Kapitel 3.2.2 und 3.3.1). Eine direkte Wirkung von Voriconazol auf neutrophile Granulozyten bzw. auf die ROS- und IL-8-Freisetzung dieser Zellen wird damit unwahrscheinlich. Eine Studie von Velert et al. (1998), die den Einfluss der Azole Fluconazol und Itraconazol auf die Sauerstoffradikalfreisetzung von PMA-stimulierten PMN untersuchte und dabei keinen Einfluss feststellen konnte, steht in Einklang mit dieser Vermutung.

Damit einhergehend fand sich nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen weder eine signifikant differente ROS-Freisetzung noch eine veränderte Phagozytoserate unter Voriconazol-Einfluss (Kapitel 3.2.3 und 3.5). Die IL-8-Sekretion in Kapitel 3.3.2 zeigte sich durch Voriconazol zwar leicht verändert, insgesamt zeigte sich jedoch für beide Konzentrationen kein einheitlicher Trend und auf Grund hoher interindividueller Unterschiede keine Signifikanz.

Vor dem Hintergrund des bekannten antifungalen Wirkmechanismus von Voriconazol wäre eher noch ein Einfluss auf Effektorfunktionen nach Interaktion mit vitalen Pilzzellen anzunehmen. Der dynamische Prozess der Enzym- und damit Synthesehemmung durch Voriconazol findet nur bei vitalen Morphotypen während des Wachstumsprozesses statt, wohingegen dieser bei inaktivierten Pilzzellen naturgemäß ausbleibt. Farowski et al. (2016) beobachteten für Posaconazol, ebenfalls ein Antimykotikum aus der Gruppe der Azole, eine verminderte ROS-Freisetzung von Neutrophilen gegenüber vitalen *A. fumigatus*-Konidien. Sie schrieben diesen Effekt analog zu Choi et al. (2010) der

verminderten metabolischen Aktivität bzw. der ausbleibenden Keimung des vitalen Pilzes durch Posaconazol zu. Ein immunmodulierender Effekt des Antimykotikums auf PMN erschien den Autoren unwahrscheinlich, da die Immunzellen gegenüber Azol-resistenten Konidien eine gleichbleibende ROS-Sekretion unter Posaconazol aufwiesen. Im Gegensatz dazu konnte in unserer Arbeit gegenüber vitalen Keimschläuchen, wie auch schon gegenüber inaktivierten Keimschläuchen und PMA, kein inhibierender oder verstärkender Effekt durch Voriconazol auf die Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale von PMN festgestellt werden (Kapitel 3.2.4).

Der relativ neu entdeckte Abwehrmechanismus der NET-Bildung durch neutrophile Granulozyten zeigte sich gegenüber inaktivierten *A. fumigatus*-Keimschläuchen unter beiden Konzentrationen von Voriconazol signifikant vermindert und steht damit in Kontrast zu den drei anderen untersuchten, unbeeinflussten Effektorfunktionen (Kapitel 3.4). Es erscheint möglich, dass Voriconazol direkt inhibierend explizit auf die NET-Bildung von PMN einwirkt. Ein Einfluss von Voriconazol auf die Viabilität von PMN konnte in unserem Vorversuch aus Kapitel 3.1 über die gesamte Versuchsdauer von 4 h ausgeschlossen werden, was eine leichtgradige Toxizität jedoch nicht notwendigerweise ausschließen muss. Wie bereits zuvor erwähnt könnte der Mechanismus der NETose besonders suszeptibel gegenüber marginalen Toxizitäten von Antimykotika sein. Denkbar wäre weiterhin, dass die durch Voriconazol veränderte Pilzstruktur wiederum nachfolgend verschiedene Funktionen von Immunzellen beeinflusst. Durch den verminderten Ergosterol-Gehalt der Pilzmembran könnten beispielsweise speziell Stimuli für die Bildung der NETs durch neutrophile Granulozyten verloren gehen. Zu betonen ist allerdings, dass für diesen Versuch ebenfalls inaktivierte Keimschläuche zur Verwendung kamen, sodass eine Synthesehemmung durch Voriconazol nicht zum Tragen kommen dürfte. Wie der inhibierende Effekt auf die NET-Bildung im Speziellen zustande kommt, kann daher in dieser Arbeit abschließend nicht geklärt werden.

Insgesamt deuten unsere Daten nicht darauf hin, dass neutrophile Granulozyten bzw. deren Effektorfunktionen durch die Exposition mit Voriconazol wesentlich

beeinflusst werden. Insbesondere zeigte sich kein konzentrationsabhängiger Effekt. Die verminderte NET-Bildung könnte hierbei eine Ausnahme darstellen und gibt daher Anlass zu weitergehenden Untersuchungen. Zukünftige Studien mit einem breiten Spektrum an Substanzen und möglichst auch unter Verwendung synthetischer Stimuli sollten insbesondere die Frage einer möglicherweise erhöhten Suszeptibilität dieses Effektormechanismus adressieren. Trotz dieser Ergebnisse sind eine Veränderung der Pilzstruktur durch Voriconazol und damit eine vermehrte Anfälligkeit des Pilzes wie zuvor von Ben-Ami et al. (2008) beschrieben aber durchaus möglich. In unseren Versuchen wurde lediglich der Effekt von Voriconazol explizit auf die einzelnen Effektorfunktionen der PMN überprüft und nicht die Anfälligkeit des Pilzes gegenüber diesen. Ein Ansatz für weiterführende Analysen wäre hier die Untersuchung der Schädigung von *A. fumigatus*-Keimschläuchen durch neutrophile Granulozyten unter Voriconazol-Einfluss, beispielsweise mittels XTT-Assay.

4.4 Einfluss von Prednisolon

Die Untersuchung des kombinierten Effekts der Antimykotika mit Prednisolon auf Effektorfunktionen der neutrophilen Granulozyten bildete einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit. Das in der Therapie der GvHD eingesetzte Prednisolon wirkt immunsuppressiv über einen direkten Einfluss auf die Genexpression mit Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, sodass insgesamt eine Vielzahl an zellulären Immunfunktionen und -mediatoren gehemmt werden, auch in neutrophilen Granulozyten (Hirsch et al., 2012; Stahn & Buttgereit, 2008). Außerdem ist es für sein nicht-rezeptorvermitteltes Potential zur Stabilisation von Membranen verschiedenster Zellen bekannt, das innerhalb von Sekunden bis Minuten auftreten kann (Buttgereit et al., 1998).

In unseren Experimenten nahm Prednisolon keinen Einfluss auf die mittlere relative ROS-Freisetzung durch PMA-stimulierte neutrophile Granulozyten nach 30 min (Kapitel 3.2.5). Ebenso zeigte sich die konzentrationsabhängige

Verminderung der durch LAmB induzierten ROS-Sekretion in Gegenwart von Prednisolon unverändert. Eine Wirkung von Prednisolon nach 30 min auf neutrophile Granulozyten ist daher unwahrscheinlich, unabhängig von der Gegenwart von LAmB. Die bisherigen Daten zum Wirkeintritt der transkriptionellen bzw. rezeptorvermittelten immunsuppressiven Wirkung von Prednisolon über NF- κ B sind widersprüchlich, normalerweise vergehen jedoch Stunden bis Tage, bis Effekte offensichtlich werden (Buttgereit et al., 1998; Orciuolo et al., 2007; Stahn & Buttgereit, 2008). Unsere Ergebnisse mit einer fehlenden rezeptorvermittelten Prednisolon-Wirkung auf PMN nach 30 min können diese Annahme unterstützen.

Obwohl die Inkubation über Nacht demnach für eine immunsuppressive Wirkung ausreichen müsste, zeigte sich in unserer Arbeit für alle untersuchten Antimykotika kein relevanter Einfluss auf die IL-8-Freisetzung PMA-stimulierter neutrophiler Granulozyten durch Prednisolon-Exposition (Kapitel 3.3.1). Unwahrscheinlich ist, dass der Inkubationszeitraum von 24 h immer noch zu kurz für die rezeptorvermittelte, immunsuppressive Wirkung des Prednisolons ist. Hirsch et al. (2012) beobachteten, dass Prednisolon die IL-8-Sekretion von LPS-simulierten PMN von Pferden bereits nach einer Inkubationszeit von 5 h signifikant vermindert. In menschlichen Zellen konnten Hirsch et al. (2012) dies für Dexamethason nachweisen, das ebenfalls wie Prednisolon zu den Glucocorticoiden gehört, nur eine höhere Potenz aufweist. Denkbar wäre, dass es durch den starken Stimulus PMA bereits nach kurzer Zeit zu einer kompletten Freisetzung von zellgebunden gespeichertem IL-8 kommt (Kuhns & Gallin, 1995). Außerdem muss nach 24 h erneut die Toxizität von PMA auf PMN berücksichtigt werden (Suzuki & Namiki, 1998; Takei et al., 1996). Beide Annahmen könnten dazu führen, dass Prednisolon anschließend seine supprimierende Wirkung auf Zellen nicht mehr entfalten kann.

Eine Zunahme der ROS-Sekretion nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* war bei Prednisolon-exponierten PMN durch LAmB nach 1 h nicht mehr zu beobachten (Kapitel 3.2.5). Deutlich ersichtlich wurde die Diskrepanz zwischen den Proben mit und ohne Prednisolon. Während zwischen den Medium-Proben ohne Antimykotika kein Unterschied zu erkennen

war, zeigte sich die ROS-Sekretion unter LAmB-Einfluss signifikant gegenüber den Proben ohne Prednisolon vermindert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Prednisolon nach 1 h nicht durch Beeinflussung der PMN selbst wirkt, sondern mit dem Antimykotikum LAmB und bzw. oder dem Pilz wechselwirkt. Eine mögliche Erklärung wäre der schnell eintretende, membranstabilisierende Effekt des Prednisolons, der der Porenbildung durch LAmB und damit einem Austritt ROS-stimulierender Metaboliten von *A. fumigatus* entgegenwirken könnte (Buttgereit et al., 1998).

Die immunsuppressiven Effekte scheinen dagegen in unseren ELISA-Analysen nach 24-stündiger Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* zum Tragen zu kommen. Zwischen den Proben ohne und mit Prednisolon ließ sich analog zur ROS-Freisetzung ein starker Unterschied erkennen. Durch Prednisolon war hierbei allerdings nicht nur die IL-8-Konzentration in den Antimykotika-Proben durchweg vermindert, sondern auch die IL-8-Konzentration in den Medium-Proben ohne Antimykotika (Kapitel 3.3.2). Daher lässt sich vermuten, dass Prednisolon in diesem Fall auch unabhängig von den jeweiligen Antimykotika direkt auf die PMN einwirkt. Häufig beschrieben ist bereits die verminderte Synthese einer Vielzahl an Zytokinen wie TNF- α , IL-4 oder IL-6 durch rezeptorvermittelte Effekte (Buttgereit et al., 1995; Wu et al., 1991). Dass die verminderte IL-8-Freisetzung nach 24-stündiger Prednisolon-Exposition durch eine direkt immunsuppressive Wirkung auf PMN bedingt ist, erscheint daher durchaus plausibel.

Zur Untersuchung des zusätzlichen Effekts von Prednisolon auf die NET-Bildung sowie auf die Phagozytoserate durch PMN waren die humanen Zellen jeweils für 4 bzw. 2 h Prednisolon exponiert. Für beide Effektorfunktionen zeigten sich nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen unabhängig von den untersuchten Antimykotika keine relevanten Differenzen durch die Gegenwart von Prednisolon (Kapitel 3.4 und 3.5). Einige Studien konnten einen verminderten Phagozytose-Index von neutrophilen Granulozyten nach 3,5- bzw. 4-stündiger Prednisolon-Exposition aufzeigen (Jones et al., 1983; Simitsopoulou et al., 2015). Jones et al. (1983) wiesen allerdings explizit darauf hin, dass für ihre Versuche mindestens eine Inkubationszeit von 3 h mit Prednisolon erforderlich war, um eine suffiziente

Suppression der Phagozytoseaktivität zu erhalten. Es wäre demnach möglich, dass in unseren Versuchen auch Inkubationszeiten von 2 und 4 h nicht ausreichen, um eine suffiziente, immunsuppressive Wirkung von Prednisolon auf humane Zellen zu ermöglichen.

Insgesamt bestätigten die Analysen dieser Arbeit zum Einfluss von Prednisolon auf Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten die bekannte Wirkweise dieses Immunsuppressivums. Hinweise auf ein additives Einwirken von Prednisolon mit einem spezifischen Antimykotikum ergaben sich zwar nicht, allerdings wurde durch das Zusammenspiel von LAmB mit Prednisolon ersichtlich, dass Immunsuppressiva durchaus Antimykotika-assoziierte Effekte auf die Immunantwort modulieren bzw. abschwächen können. Hier wären weitere Untersuchungen zur genaueren Abklärung dieses Effekts angebracht.

4.5 Einfluss von CsA/MMF

Die kurze Exposition der PMN über einen Zeitraum von 1 h gegenüber CsA/MMF ergab keine signifikanten Veränderungen der ROS-Sekretion gegenüber inaktivierten Keimschläuchen von *A. fumigatus* (Kapitel 3.2.6). Dieses Ergebnis ist gut vereinbar mit der allgemein beschriebenen Wirkweise dieser Immunsuppressiva spezifisch auf Lymphozyten (Graefe, 2016). Dies ist auch der Grund, weshalb diese Substanzen für die Prophylaxe der GvHD eingesetzt werden, in deren Pathogenese T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle einnehmen. Die immunsuppressive Wirkung von MMF beruht auf einer reversiblen Hemmung des Enzyms IMPDH, das Schlüsselenzym der Purin-Synthese in B- und T-Lymphozyten (Ritter & Pirofski, 2009). CsA, ein Calcineurininhibitor, wirkt über eine Inhibition von IL-2, sodass spezifisch T-Zellen nicht aktiviert werden (Schreiber, 1991; Wurster et al., 2016).

Zum kombinierten Einwirken von CsA/MMF mit Antimykotika finden sich nur wenige aussagekräftige Daten. Vorwiegend wurde eine synergistische Aktivität von CsA mit Antimykotika wie AmB und Fluconazol gegenüber Pilzen

beobachtet, hierbei wurde allerdings kein Effekt auf Immunzellen bzw. auf deren Effektorfunktionen untersucht (Kontoyiannis et al., 2008; Marchetti et al., 2000). Ungeachtet der Spezifität ihrer Wirkungsweise finden sich verschiedene, zum Teil widersprüchliche Studien zum Einfluss von CsA/MMF auf andere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten. Krotz et al. (2007) dokumentierten eine signifikante Verminderung des oxidativen *Burst* in PMN durch MMF nach 6 h. Sie spekulierten, dass es durch Hemmung des Enzyms IMPDH zu einer intrazellulären Guanosintriphosphat-Depletion kommt und dies über eine Inhibition der NADPH-Oxidase zu einer verminderten Bildung von ROS führt. Weiterhin konnten sie zumindest für Endothelzellen eine verstärkte Sekretion von Sauerstoffradikalen durch CsA sowohl nach 6 als auch nach 24 h beobachten. Im Gegensatz dazu deutete eine andere Studie einen inhibitorischen Effekt von hochdosiertem CsA auf die ROS-Sekretion neutrophiler Granulozyten an (Spisani et al., 2001). Roilides et al. (1994) wiederum konnten unseren Ergebnissen entsprechend aufzeigen, dass therapeutisch relevante Konzentrationen unter 250 ng/ml CsA nach einer Inkubationszeit von ebenfalls 1 h nicht zu einer Suppression des oxidativen *Burst* von PMN gegenüber *A. fumigatus* führen. Es wird ersichtlich, dass die Inkubationszeit für eine mögliche Wirkung von CsA/MMF durchaus eine Rolle spielt und diese womöglich erst nach längerer Zeit zum Tragen kommt. Generell konnten unsere Daten einen Einfluss von CsA/MMF auch im Zusammenspiel mit LAmB zumindest auf die ROS-Freisetzung von PMN allerdings nicht unterstützen.

4.6 Limitationen dieser Arbeit

Grundsätzlich sind Analysen zu neutrophilen Granulozyten problematisch, da eine Vielzahl an Einflussfaktoren wie z. B. die kurze Lebensdauer der PMN berücksichtigt werden müssen. Quantitative Tests zu neutrophilen Funktionen wie in unseren Analysen werfen zudem das Problem auf, dass die Isolation der Zellen aus peripherem Blut ohne Störung ihrer normalen Physiologie erfolgen muss (Haynes & Fletcher, 1990). Unterschiedliche Assays und PMN-Isolations-

Protokolle mit verschiedenen Zellkulturmedien oder Antikoagulantien kommen beispielsweise zur Anwendung und sind bisher noch zu wenig standardisiert (Brinkmann et al., 2010; Kenny et al., 2017; Oh et al., 2008). Erst kürzlich wurde wieder eine Studie veröffentlicht, die eine klare Überlegenheit der Antikoagulation mit EDTA, wie auch in dieser Arbeit verwendet, sowohl für die Effizienz der Zellisolation als auch für die Funktionalität der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Antikoagulation mit Heparin aufzeigt (Baïen et al., 2018). Zu erwähnen ist, dass das in dieser Arbeit angewandte Polymorphprep®-Protokoll zur Dichtegradienten-Zentrifugation explizit den Einsatz von EDTA-Blut erforderte.

Insgesamt lassen sich nur wenige Studien zu dem konkret in dieser Arbeit untersuchten Thema finden. Erschwerend kommt hinzu, dass häufig Unterschiede in den Konzentrationen oder Hersteller der Pharmaka, Stimuli, Morphotypen sowie Inkubationszeiten bestehen (Bellocchio et al., 2005; Choi et al., 2010; Hirsch et al., 2012; Simitsopoulou et al., 2015). Diese Differenzen erschweren eine Vergleichbarkeit dieser Studien mit unseren Ergebnissen. Außerdem wurden viele der zitierten Studien in Mäusen durchgeführt, was die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen schwierig macht (Hellmann et al., 2017; Mestas & Hughes, 2004).

Limitationen sehen wir außerdem in der Verwendung eines einzelnen *A. fumigatus*-Isolates. Für umfangreichere Analysen sollten zukünftig mehrere Pilz-Stränge zur Anwendung kommen. Die Komplexität der verschiedenen Assays und die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten forderten jedoch Einschränkungen sowie eine Auswahl der vielversprechendsten Inkubationszeiten, Dosierungen der Pharmaka und Zustandsformen der Morphotypen. So wurde zudem für weitere Effektorfunktionen beispielsweise auf eine Untersuchung von CsA/MMF verzichtet, da die Gegenwart von CsA/MMF zu keiner relevanten Beeinflussung des oxidativen *Burst* neutrophiler Granulozyten führte.

Für die Analyse der Effektorfunktionen wurden Ethanol-inaktivierte und für die Quantifizierung der ROS-Freisetzung einmalig auch vitale Keimschläuche von *A. fumigatus* verwendet. Einerseits konnte durch die Ethanol-Inaktivierung der

Keimschläuche die kontinuierliche Veränderung der Zusammensetzung des vitalen Erregers durch Hyphen-Wachstum aus Keimschläuchen verhindert werden und somit über die gesamte Dauer der Analysen das Vorliegen des gewünschten Morphotyps sichergestellt werden. Zudem ließen sich die inaktivierten Keimschläuche länger lagern, sodass auch Analysen zu verschiedenen Effektorfunktionen aus dem gleichen *Batch* durchgeführt werden konnten. Andererseits entspricht die Untersuchung von inaktivierten Morphotypen unweigerlich weniger realen Bedingungen als die Verwendung vitaler Pilze. Dies war auf Grund logistischer Nachteile jedoch limitiert. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass auch unter Verwendung vitaler Morphotypen Ergebnisse aus *in-vitro*-Analysen häufig nicht den Resultaten aus *in-vivo*-Studien entsprechen, da auch zusätzliche Faktoren wie z. B. pharmakokinetische Eigenschaften eine Rolle spielen (Torrado et al., 2008).

4.7 Ausblick

Insgesamt ergaben unsere Analysen keinen Anhalt für eine relevante Beeinflussung des oxidativen *Burst*, der IL-8-Freisetzung und der Phagozytose-Aktivität neutrophiler Granulozyten durch die untersuchten Antimykotika, insbesondere gegenüber *A. fumigatus*. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant verminderte Bildung von NETs durch LAmB, d-AmB und auch Voriconazol beobachtet werden. Damit unterstützen unsere Daten Hinweise auf differente Aktivierungsmechanismen von verschiedenen Effektorfunktionen der PMN. Zukünftig wären daher tiefergehende Analysen des Zusammenspiels von Antimykotika mit diesem noch immer wenig verstandenen Mechanismus der Auslösung und Bildung von NETs angebracht. Insbesondere sind vergleichende Studien mit vitalen Morphotypen, weiteren Gattungen wie *Candida* oder *Rhizopus* sowie andere Antimykotika wie Echinocandinen wünschenswert, um einen umfassenderen Überblick auch hinsichtlich anderer invasiver Pilzinfektionen zu gewinnen.

Neutrophile Granulozyten tragen nicht nur durch die in unserer Arbeit untersuchten Funktionen, sondern auch durch eine Vielzahl weiterer Mechanismen zu einer effektiven Bekämpfung von *A. fumigatus* bei. Deshalb wäre es von zusätzlicher Bedeutung, in Zukunft auch den Einfluss von Antimykotika auf die Sekretion weiterer pro- sowie antiinflammatorischer Zytokine oder auf die Freisetzung der granulären Komponenten wie Cathepsin G, Elastase und Lactoferrin zu untersuchen. Aufschlussreich wäre hierbei, ob die verschiedenen Mechanismen durch das identische Antimykotikum ebenfalls different beeinflusst werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der ubiquitär vorkommende Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) ist Haupterreger der invasiven Aspergillose (IA). Diese invasive Pilzinfektion tritt gehäuft bei Patienten mit immunsuppressiver Langzeit-Therapie z. B. nach allogener Stammzelltransplantation zur Prophylaxe und Therapie der *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) auf. Trotz der *in-vitro*-Suszeptibilität der Pilze gegenüber verschiedenen Antimykotika ist die Erkrankung in diesem Patientenkollektiv weiterhin mit einer hohen Letalität assoziiert. Neben ihren direkten, antifungalen Eigenschaften wurden durch Antimykotika auch indirekte, modulierende Wirkungen auf die Funktionalität von Immunzellen beschrieben, die damit möglicherweise das therapeutische Ansprechen dieser Erkrankung beeinflussen. Insbesondere neutrophile Granulozyten (PMN) spielen als Teil der angeborenen Immunität durch ihre Vielzahl an Abwehrmechanismen eine essentielle Rolle für die Bekämpfung von invasiven Pilzinfektionen und damit der IA. Von zusätzlicher Bedeutung und bislang kaum untersucht ist das kombinierte Einwirken von Antimykotika und Immunsuppressiva auf die Funktionalität dieser Zellen.

In dieser Arbeit wurde daher *in-vitro* der Einfluss klinisch eingesetzter Antimykotika zur Therapie der IA (liposomales Amphotericin B bzw. Amphotericin B – Desoxycholat, Voriconazol) auf wichtige Effektorfunktionen humaner neutrophiler Granulozyten nach Exposition gegenüber *A. fumigatus* untersucht. Im Fokus stand hierbei die Analyse des oxidativen *Burst*, der Interleukin (IL)-8-Freisetzung, der Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) sowie der Phagozytose-Aktivität dieser Immunzellen. Außerdem wurde der Effekt einer zusätzlichen Gabe klinisch relevanter Immunsuppressiva (Ciclosporin A / Mycophenolat-Mofetil, Prednisolon), die zur Prophylaxe und Therapie der akuten GvHD eingesetzt werden, auf diese vier Funktionen evaluiert.

Zusammenfassend ergaben unsere Analysen keinen Anhalt für eine relevante Beeinflussung des oxidativen *Burst*, der IL-8-Freisetzung und der Phagozytose-Aktivität neutrophiler Granulozyten durch die untersuchten Antimykotika,

insbesondere gegenüber *A. fumigatus*. Weiterhin wurden in dieser Arbeit keine signifikanten Differenzen zwischen dem Einfluss von liposomalem Amphotericin B und Amphotericin B - Desoxycholat beobachtet. Durch Prednisolon konnten überwiegend bereits bekannte, immunsuppressive Wirkungen auf PMN bestätigt sowie zusätzlich Hinweise auf eine Modulation Antimykotika-vermittelter Immuneffekte durch Immunsuppressiva gewonnen werden. Die kurze Exposition der PMN gegenüber Ciclosporin A / Mycophenolat-Mofetil ergab keine signifikanten Veränderungen der Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies.

Des Weiteren unterstützen unsere Daten Hinweise auf differente Aktivierungsmechanismen von verschiedenen Effektorfunktionen der PMN. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Funktionen konnte in dieser Arbeit eine signifikant verminderte Bildung von NETs durch liposomales Amphotericin B, Amphotericin B - Desoxycholat und auch Voriconazol beobachtet werden.

Damit geben unsere Ergebnisse Anlass zu tiefergehenden Analysen des Zusammenspiels von Antimykotika insbesondere mit dem noch immer wenig verstandenen Mechanismus der Auslösung und Bildung von NETs. Zudem wären weitere Studien wünschenswert, um einen umfassenderen Überblick und ein besseres Verständnis auch hinsichtlich anderer invasiver Pilzinfektionen sowie weiterer Abwehrmechanismen zu erhalten.

6 LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

6.1 Literaturverzeichnis

- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Kniemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S. R., . . . Latge, J. P. (2009). Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, *460*(7259), 1117-1121.
- Al-Bader, N., & Sheppard, D. C. (2016). Aspergillosis and stem cell transplantation: An overview of experimental pathogenesis studies. *Virulence*, *7*(8), 950-966.
- Apperley, J. F., Mauro, F. R., Goldman, J. M., Gregory, W., Arthur, C. K., Hows, J., . . . et al. (1988). Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: importance of a graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol*, *69*(2), 239-245.
- Atkinson, A. J., Jr., & Bennett, J. E. (1978). Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, *13*(2), 271-276.
- Baddley, J. W. (2011). Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Med Mycol*, *49 Suppl 1*, S7-S12.
- Baggiolini, M., & Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*, *307*(1), 97-101.
- Baien, S. H., Langer, M. N., Heppelmann, M., von Kockritz-Blickwede, M., & de Buhr, N. (2018). Comparison Between K3EDTA and Lithium Heparin as Anticoagulant to Isolate Bovine Granulocytes From Blood. *Front Immunol*, *9*, 1570.
- Baldridge, C. W., & Gerard, R. W. (1933). The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol*, *103*, 235–236.
- Balloy, V., & Chignard, M. (2009). The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*, *11*(12), 919-927.
- Bayry, J., Beaussart, A., Dufrene, Y. F., Sharma, M., Bansal, K., Kniemeyer, O., . . . Beauvais, A. (2014). Surface structure characterization of *Aspergillus fumigatus* conidia mutated in the melanin synthesis pathway and their human cellular immune response. *Infect Immun*, *82*(8), 3141-3153.
- Bazzoni, F., Cassatella, M. A., Rossi, F., Ceska, M., Dewald, B., & Baggiolini, M. (1991). Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med*, *173*(3), 771-774.

- Becker, M. J., de Marie, S., Fens, M. H., Verbrugh, H. A., & Bakker-Woudenberg, I. A. (2003). Effect of amphotericin B treatment on kinetics of cytokines and parameters of fungal load in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*, *52*(3), 428-434.
- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., & Henriques-Normark, B. (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*, *16*(4), 401-407.
- Bellocchio, S., Gaziano, R., Bozza, S., Rossi, G., Montagnoli, C., Perruccio, K., . . . Romani, L. (2005). Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. *J Antimicrob Chemother*, *55*(2), 214-222.
- Ben-Ami, R., Lewis, R. E., & Kontoyiannis, D. P. (2008). Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. *Clin Infect Dis*, *47*(2), 226-235.
- Ben-Ami, R., Lewis, R. E., & Kontoyiannis, D. P. (2010). Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *Br J Haematol*, *150*(4), 406-417.
- Bergmann, T. K., Barraclough, K. A., Lee, K. J., & Staatz, C. E. (2012). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Prednisolone and Prednisone in Solid Organ Transplantation. *Clinical Pharmacokinetics*, *51*(11), 711-741.
- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., & Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, *114*(13), 2619-2622.
- Bianchi, M., Niemiec, M. J., Siler, U., Urban, C. F., & Reichenbach, J. (2011). Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol*, *127*(5), 1243-1252 e1247.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., & Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*, *12*(1), 64-76.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, *33*(5), 657-670.
- Boyle, K. B., Stephens, L. R., & Hawkins, P. T. (2012). Activation of the neutrophil NADPH oxidase by *Aspergillus fumigatus*. *Ann N Y Acad Sci*, *1273*, 68-73.
- Braedel, S., Radsak, M., Einsele, H., Latgé, J.-P., Michan, A., Loeffler, J., . . . Hebart, H. (2004). *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune

- cells via toll-like receptors 2 and 4. *British Journal of Haematology*, 125, 392-399.
- Brakhage, A. A. (2005). Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Curr Drug Targets*, 6(8), 875-886.
- Brakhage, A. A., Bruns, S., Thywissen, A., Zipfel, P. F., & Behnsen, J. (2010). Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol*, 13(4), 409-415.
- Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp*(36).
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., . . . Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535.
- Brummer, E., & Stevens, D. A. (1996). Synergy of human neutrophils with fluconazole in killing *Candida* species. *Mycopathologia*, 134(3), 115-120.
- Bruns, S., Kniemeyer, O., Hasenberg, M., Amanianda, V., Nietzsche, S., Thywissen, A., . . . Gunzer, M. (2010). Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog*, 6(4), e1000873.
- Buttgereit, F., Brink, I., Thiele, B., Burmester, G. R., Hiepe, F., & Hall, E. D. (1995). Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen-induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 275(2), 850-853.
- Buttgereit, F., Wehling, M., & Burmester, G.-R. (1998). A new Hypothesis of modular glucocorticoid actions. *Arthritis & Rheumatism*, 41(5), 761-767.
- Chai, L. Y., Kullberg, B. J., Vonk, A. G., Warris, A., Cambi, A., Latge, J. P., . . . Netea, M. G. (2009). Modulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 77(5), 2184-2192.
- Chai, L. Y., Netea, M. G., Sugui, J., Vonk, A. G., van de Sande, W. W., Warris, A., . . . Kullberg, B. J. (2010). *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology*, 215(11), 915-920.
- Chamilos, G., Lewis, R. E., Lamaris, G., Walsh, T. J., & Kontoyiannis, D. P. (2008). Zygomycetes hyphae trigger an early, robust proinflammatory response in human polymorphonuclear neutrophils through toll-like receptor 2 induction but display relative resistance to oxidative damage. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(2), 722-724.

- Chapman, H. A., Jr., & Hibbs, J. B., Jr. (1978). Modulation of macrophage tumoricidal capability by polyene antibiotics: support for membrane lipid as a regulatory determinant of macrophage function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(9), 4349-4353.
- Chen, W. C., Chou, D. L., & Feingold, D. S. (1978). Dissociation between ion permeability and the lethal action of polyene antibiotics on *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 13(6), 914-917.
- Choi, J. H., Kwon, E. Y., Park, C. M., Choi, S. M., Lee, D. G., Yoo, J. H., . . . Stevens, D. A. (2010). Immunomodulatory effects of antifungal agents on the response of human monocytic cells to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Med Mycol*, 48(5), 704-709.
- Chunn, C. J., Starr, P. R., & Gilbert, D. N. (1977). Neutrophil Toxicity of Amphotericin B. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 12(2), 226-230.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., & Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, 80(8), 2012-2020.
- Commins, S. P., Borish, L., & Steinke, J. W. (2010). Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S53-72.
- Cordonnier, C., Bresnik, M., & Ebrahimi, R. (2007). Liposomal amphotericin B (AmBisome) efficacy in confirmed invasive aspergillosis and other filamentous fungal infections in immunocompromised hosts: a pooled analysis. *Mycoses*, 50(3), 205-209.
- Cornillet, A., Camus, C., Nimubona, S., Gandemer, V., Tattevin, P., Belleguic, C., . . . Gangneux, J. P. (2006). Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis*, 43(5), 577-584.
- Croft, C. A., Culibrk, L., Moore, M. M., & Tebbutt, S. J. (2016). Interactions of *Aspergillus fumigatus* Conidia with Airway Epithelial Cells: A Critical Review. *Front Microbiol*, 7, 472.
- Dagenais, T. R., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 22(3), 447-465.
- Datta, K., & Hamad, M. (2015). Immunotherapy of Fungal Infections. *Immunol Invest*, 44(8), 738-776.
- Denning, D. W. (1998). Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, 26(4), 781-803; quiz 804-785.
- Denning, D. W. (2000). Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet*, 355(9202), 423-424.

- Denning, D. W., Ribaud, P., Milpied, N., Caillot, D., Herbrecht, R., Thiel, E., . . . Lode, H. (2002). Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, *34*(5), 563-571.
- Dotis, J., Simitopoulou, M., Dalakiouridou, M., Konstantinou, T., Panteliadis, C., Walsh, T. J., & Roilides, E. (2008). Amphotericin B formulations variably enhance antifungal activity of human neutrophils and monocytes against *Fusarium solani*: comparison with *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*, *61*(4), 810-817.
- Elewa, H., El-Mekaty, E., El-Bardissy, A., Ensom, M. H., & Wilby, K. J. (2015). Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole in the Management of Invasive Fungal Infections: A Critical Review. *Clin Pharmacokinet*, *54*(12), 1223-1235.
- Espinel-Ingroff, A. (1998). In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol*, *36*(1), 198-202.
- Fang, W., & Latge, J. P. (2018). Microbe Profile: *Aspergillus fumigatus*: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *Microbiology*, *164*(8), 1009-1011.
- Farowski, F., Cornely, O. A., & Hartmann, P. (2016). High Intracellular Concentrations of Posaconazole Do Not Impact on Functional Capacities of Human Polymorphonuclear Neutrophils and Monocyte-Derived Macrophages In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, *60*(6), 3533-3539.
- Faure, C., Andre, J., Pelatan, C., Munck, A., Giraud, M., Cezard, J. P., & Jacqz-Aigrain, E. (1998). Pharmacokinetics of intravenous methylprednisolone and oral prednisone in paediatric patients with inflammatory bowel disease during the acute phase and in remission. *Eur J Clin Pharmacol*, *54*(7), 555-560.
- Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., & Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet*, *373*(9674), 1550-1561.
- Fields, B. T., Jr., Bates, J. H., & Abernathy, R. S. (1970). Amphotericin B serum concentrations during therapy. *Appl Microbiol*, *19*(6), 955-959.
- Filipovich, A. H., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J. R., Lee, S. J., . . . Flowers, M. E. (2005). National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*, *11*(12), 945-956.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., . . . Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, *176*(2), 231-241.

- Garcha, U. K., Brummer, E., & Stevens, D. A. (1995). Synergy of fluconazole with human monocytes or monocyte-derived macrophages for killing of *Candida* species. *J Infect Dis*, *172*(6), 1620-1623.
- Gazendam, R. P., van de Geer, A., Roos, D., van den Berg, T. K., & Kuijpers, T. W. (2016). How neutrophils kill fungi. *Immunol Rev*, *273*(1), 299-311.
- Gazendam, R. P., van Hamme, J. L., Tool, A. T., Hoogenboezem, M., van den Berg, J. M., Prins, J. M., . . . Kuijpers, T. W. (2016). Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *J Immunol*, *196*(3), 1272-1283.
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., & Simon, H. U. (2013). Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol*, *34*(8), 398-409.
- Gigliotti, F., Shenep, J. L., Lott, L., & Thornton, D. (1987). Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. *J Infect Dis*, *156*(5), 784-789.
- Graefe, K. H. (2016). Immunsuppressiva. In K. H. Graefe, W. K. Lutz, & H. Bönisch (Eds.), *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie* (2., vollständig überarbeitete Auflage ed.): Georg Thieme Verlag.
- Gresnigt, M. S., Bozza, S., Becker, K. L., Joosten, L. A., Abdollahi-Roodsaz, S., van der Berg, W. B., . . . van de Veerdonk, F. L. (2014). A polysaccharide virulence factor from *Aspergillus fumigatus* elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist. *PLoS Pathog*, *10*(3), e1003936.
- Gugnani, H. C. (2003). Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front Biosci*, *8*, s346-357.
- Gupta, A., Punatar, S., Gawande, J., Mathew, L., Kannan, S., & Khattry, N. (2017). Analysis of factors affecting initial cyclosporine level and its impact on post transplant outcomes in acute leukemia. *J Cancer Res Ther*, *13*(6), 981-988.
- Gupta, A., Punatar, S., Mathew, L., Kannan, S., & Khattry, N. (2016). Cyclosporine Plus Methotrexate or Cyclosporine Plus Mycophenolate Mofetil as Graft Versus Host Disease Prophylaxis in Acute Leukemia Transplant: Comparison of Toxicity, Engraftment Kinetics and Transplant Outcome. *Indian J Hematol Blood Transfus*, *32*(3), 248-256.
- Gyurkocza, B., Rezvani, A., & Storb, R. F. (2010). Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Rev Hematol*, *3*(3), 285-299.
- Hachem, R. Y., Boktour, M. R., Hanna, H. A., Husni, R. N., Torres, H. A., Afif, C., . . . Raad, II. (2008). Amphotericin B lipid complex versus liposomal

- amphotericin B monotherapy for invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy. *Cancer*, 112(6), 1282-1287.
- Hamad, N., Shanavas, M., Michelis, F. V., Uhm, J., Gupta, V., Seftel, M., . . . Kim, D. D. (2015). Mycophenolate-based graft versus host disease prophylaxis is not inferior to methotrexate in myeloablative-related donor stem cell transplantation. *Am J Hematol*, 90(5), 392-399.
- Hamill, R. J. (2013). Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, 73(9), 919-934.
- Harnicar, S., Ponce, D. M., Hilden, P., Zheng, J., Devlin, S. M., Lubin, M., . . . Barker, J. N. (2015). Intensified Mycophenolate Mofetil Dosing and Higher Mycophenolic Acid Trough Levels Reduce Severe Acute Graft-versus-Host Disease after Double-Unit Cord Blood Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21(5), 920-925.
- Hasenberg, M., Behnsen, J., Krappmann, S., Brakhage, A., & Gunzer, M. (2011). Phagocyte responses towards *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*, 301(5), 436-444.
- Haynes, A. P., & Fletcher, J. (1990). Neutrophil function tests. *Baillieres Clin Haematol*, 3(4), 871-887.
- Heinekamp, T., Schmidt, H., Lapp, K., Pahtz, V., Shopova, I., Koster-Eiserfunke, N., . . . Brakhage, A. A. (2015). Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. *Semin Immunopathol*, 37(2), 141-152.
- Hellmann, A. M., Lothar, J., Wurster, S., Lutz, M. B., Schmitt, A. L., Morton, C. O., . . . 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.
- Herbrecht, R., Denning, D. W., Patterson, T. F., Bennett, J. E., Greene, R. E., Oestmann, J. W., . . . the Global *Aspergillus* Study, G. (2002). Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*, 347(6), 408-415.
- Hirsch, G., Lavoie-Lamoureux, A., Beauchamp, G., & Lavoie, J. P. (2012). Neutrophils are not less sensitive than other blood leukocytes to the genomic effects of glucocorticoids. *PLoS One*, 7(9), e44606.
- Hohl, T. M., Van Epps, H. L., Rivera, A., Morgan, L. A., Chen, P. L., Feldmesser, M., & Pamer, E. G. (2005). *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog*, 1(3), e30.
- Holz, R. W. (1974). The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 469-479.

- Jacobs, F., Selleslag, D., Aoun, M., Sonet, A., & Gadisseur, A. (2012). An observational efficacy and safety analysis of the treatment of acute invasive aspergillosis using voriconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(6), 1173-1179.
- Jacobsohn, D. A., & Vogelsang, G. B. (2007). Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis*, 2, 35.
- Jacobson, P., Rogosheske, J., Barker, J. N., Green, K., Ng, J., Weisdorf, D., . . . McGlave, P. (2005). Relationship of mycophenolic acid exposure to clinical outcome after hematopoietic cell transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, 78(5), 486-500.
- Jahn, B., Boukhallouk, F., Lotz, J., Langfelder, K., Wanner, G., & Brakhage, A. A. (2000). Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus conidia*. *Infect Immun*, 68(6), 3736-3739.
- Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- Jantunen, E., Anttila, V. J., & Ruutu, T. (2002). *Aspergillus* infections in allogeneic stem cell transplant recipients: have we made any progress? *Bone Marrow Transplant*, 30(12), 925-929.
- Jenke, A., Renner, U., Richte, M., Freiberg-Richter, J., Platzbecker, U., Helwig, A., . . . Bornhauser, M. (2001). Pharmacokinetics of intravenous mycophenolate mofetil after allogeneic blood stem cell transplantation. *Clin Transplant*, 15(3), 176-184.
- Johnson, L. B., & Kauffman, C. A. (2003). Voriconazole: A New Triazole Antifungal Agent. *Clin Infect Dis.*, 36, 630-637.
- Jones, C. J. P., Morris, K. J., & Jayson, M. I. V. (1983). Prednisolone inhibits phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes via steroid receptor mediated events. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 42, 56-62.
- Kasama, T., Strieter, R. M., Lukacs, N. W., Burdick, M. D., & Kunkel, S. L. (1994). Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol*, 152(7), 3559-3569.
- Kaufmann, S. H. E. (2014a). Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen. In *Basiswissen Immunologie* (pp. 85-96). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kaufmann, S. H. E. (2014b). Zellen des Immunsystems. In *Basiswissen Immunologie* (pp. 7-12). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kenny, E. F., Herzig, A., Kruger, R., Muth, A., Mondal, S., Thompson, P. R., . . . Zychlinsky, A. (2017). Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*, 6.

- Kernan, N. A., Collins, N. H., Juliano, L., Cartagena, T., Dupont, B., & O'Reilly, R. J. (1986). Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood*, *68*(3), 770-773.
- Kharfan-Dabaja, M., Mhaskar, R., Reljic, T., Pidala, J., Perkins, J. B., Djulbegovic, B., & Kumar, A. (2014). Mycophenolate mofetil versus methotrexate for prevention of graft-versus-host disease in people receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(7).
- Kiehl, M. G., Shipkova, M., Basara, N., Blau, I. W., Schutz, E., Armstrong, V. W., . . . Fauser, A. A. (2000). Mycophenolate mofetil in stem cell transplant patients in relation to plasma level of active metabolite. *Clin Biochem*, *33*(3), 203-208.
- Kobayashi, Y. (2008). The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*, *13*, 2400-2407.
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, *13*(3), 159-175.
- Kontoyiannis, D. P., Lewis, R. E., Alexander, B. D., Lortholary, O., Dromer, F., Gupta, K. L., . . . Singh, N. (2008). Calcineurin inhibitor agents interact synergistically with antifungal agents in vitro against *Cryptococcus neoformans* isolates: correlation with outcome in solid organ transplant recipients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*, *52*(2), 735-738.
- Krappmann, S. (2016). How to invade a susceptible host: cellular aspects of aspergillosis. *Curr Opin Microbiol*, *34*, 136-146.
- Krotz, F., Keller, M., Derflinger, S., Schmid, H., Gloe, T., Bassermann, F., . . . Sohn, H. Y. (2007). Mycophenolate acid inhibits endothelial NAD(P)H oxidase activity and superoxide formation by a Rac1-dependent mechanism. *Hypertension*, *49*(1), 201-208.
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., . . . Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*, *11*(3), e1004651.
- Kuhns, D. B., & Gallin, J. I. (1995). Increased cell-associated IL-8 in human exudative and A23187-treated peripheral blood neutrophils. *J Immunol*, *154*(12), 6556-6562.
- Kwon-Chung, K. J., & Sugui, J. A. (2013). *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog*, *9*(12), e1003743.

- Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N., & Latge, J. P. (2010). Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*, *75*(4), 910-923.
- Lass-Floerl, C., Roilides, E., Loeffler, J., Wilflingseder, D., & Romani, L. (2013). Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses*, *56*(4), 403-413.
- Latge, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, *12*(2), 310-350.
- Latge, J. P. (2010). Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol*, *12*(7), 863-872.
- Latge, J. P., Mouyna, I., Tekaia, F., Beauvais, A., Debeaupuis, J. P., & Nierman, W. (2005). Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, *43 Suppl 1*, S15-22.
- Lessing, F., Kniemeyer, O., Wozniok, I., Loeffler, J., Kurzai, O., Haertl, A., & Brakhage, A. A. (2007). The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell*, *6*(12), 2290-2302.
- Levitz, S. M. (2010). Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathog*, *6*(4), e1000758.
- Levitz, S. M., & Diamond, R. D. (1985). Mechanisms of Resistance of *Aspergillus fumigatus* Conidia to Killing by Neutrophils in Vitro. *J Infect Dis.*, *152*(1), 33-42.
- Lewis, R. E., Chamilos, G., Prince, R. A., & Kontoyiannis, D. P. (2007). Pretreatment with empty liposomes attenuates the immunopathology of invasive pulmonary aspergillosis in corticosteroid-immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemother*, *51*(3), 1078-1081.
- Lin, S.-J., Schranz, J., & Teutsch, S. M. (2001). Aspergillosis Case-Fatality Rate: Systematic Review of the Literature. *Clin Infect Dis*, *32*, 358-366.
- Manda-Handzlik, A., Bystrzycka, W., Siczekowska, S., Demkow, U., & Ciepiela, O. (2017). Antibiotics Modulate the Ability of Neutrophils to Release Neutrophil Extracellular Traps. *Adv Exp Med Biol*, *944*, 47-52.
- Marchetti, O., Moreillon, P., Glauser, M. P., Bille, J., & Sanglard, D. (2000). Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, *44*(9), 2373-2381.
- McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D., Loeffler, J., . . . Ebel, F. (2010). NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the

- pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*, 12(12-13), 928-936.
- McCormick, A., Loeffler, J., & Ebel, F. (2010). *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol*, 12(11), 1535-1543.
- Meersseman, W., Vandecasteele, S. J., Wilmer, A., Verbeken, E., Peetermans, W. E., & Van Wijngaerden, E. (2004). Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med*, 170(6), 621-625.
- Mellinghoff, S. C., Panse, J., Alakel, N., Behre, G., Buchheidt, D., Christopheit, M., . . . Cornely, O. A. (2018). Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: 2017 update of the recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Haematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann Hematol*, 97(2), 197-207.
- Menegazzi, R., Decleva, E., & Dri, P. (2012). Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood*, 119(5), 1214-1216.
- Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L., & Zaragoza, O. (2012). It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol*, 3, 286.
- Mesa-Arango, A. C., Trevijano-Contador, N., Roman, E., Sanchez-Fresneda, R., Casas, C., Herrero, E., . . . Zaragoza, O. (2014). The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(11), 6627-6638.
- Mestas, J., & Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172(5), 2731-2738.
- Miralda, I., Uriarte, S. M., & McLeish, K. R. (2017). Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 217.
- Mircescu, M. M., Lipuma, L., van Rooijen, N., Pamer, E. G., & Hohl, T. M. (2009). Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *J Infect Dis*, 200(4), 647-656.
- Mocsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*, 210(7), 1283-1299.
- Morgan, J., Wannemuehler, K. A., Marr, K. A., Hadley, S., Kontoyiannis, D. P., Walsh, T. J., . . . Warnock, D. W. (2005). Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol*, 43 Suppl 1, S49-58.

- Mousset, S., Buchheidt, D., Heinz, W., Ruhnke, M., Cornely, O. A., Egerer, G., . . . Bohme, A. (2014). Treatment of invasive fungal infections in cancer patients—updated recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol*, 93(1), 13-32.
- Mozaffarian, N., Berman, J. W., & Casadevall, A. (1997). Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages represents an additional mechanism of action for amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(8), 1825-1829.
- Negrin, R. S. (2015). Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2015, 225-230.
- Nguyen, G. T., Green, E. R., & Meccas, J. (2017). Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 373.
- O'Gorman, C. M., Fuller, H., & Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228), 471-474.
- Oakley, K. L., Moore, C. B., & Dennig, D. W. (1998). In-vitro activity of voriconazole against *Aspergillus* spp. and comparison with itraconazole and amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother*, 91–94.
- Odds, F. C., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 11(6), 272-279.
- Oh, H., Siano, B., & Diamond, S. (2008). Neutrophil isolation protocol. *J Vis Exp*(17).
- Orciuolo, E., Stanzani, M., Canestraro, M., Galimberti, S., Carulli, G., Lewis, R., . . . Komanduri, K. V. (2007). Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implications for the pathogenesis of invasive aspergillosis. *J Leukoc Biol*, 82(4), 839-848.
- Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K. A., Rex, J. H., & Cohen, S. H. (2003). Amphotericin B: time for a new "gold standard". *Clin Infect Dis*, 37(3), 415-425.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 191(3), 677-691.
- Park, S. J., & Mehrad, B. (2009). Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev*, 22(4), 535-551.

- Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (2012). Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol*, *92*(4), 841-849.
- Perkins, J., Field, T., Kim, J., Kharfan-Dabaja, M. A., Fernandez, H., Ayala, E., . . . Anasetti, C. (2010). A randomized phase II trial comparing tacrolimus and mycophenolate mofetil to tacrolimus and methotrexate for acute graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant*, *16*(7), 937-947.
- Philippe, B., Ibrahim-Granet, O., Prevost, M. C., Gougerot-Pocidallo, M. A., Sanchez Perez, M., Van der Meeren, A., & Latge, J. P. (2003). Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun*, *71*(6), 3034-3042.
- Phillips, A. J., Sudbery, I., & Ramsdale, M. (2003). Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(24), 14327-14332.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A., . . . Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, *116*(4), 625-627.
- Pilsczek, F. H., Salina, D., Poon, K. K., Fahey, C., Yipp, B. G., Sibley, C. D., . . . Kubes, P. (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, *185*(12), 7413-7425.
- Piper, W. (2013). Krankheiten des Immunsystems. In *Innere Medizin* (pp. 721-777). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Pollock, J. D., Williams, D. A., Gifford, M. A., Li, L. L., Du, X., Fisherman, J., . . . Dinauer, M. C. (1995). Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet*, *9*(2), 202-209.
- Rankin, N. E. (1953). Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with agranulocytosis and antibiotic therapy. *Br Med J*, *1*(4816), 918-919.
- Rex, J. H., Bennett, J. E., Gallin, J. I., Malech, H. L., & Melnick, D. A. (1990). Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Infect Dis*, *162*(2), 523-528.
- Ritter, M. L., & Pirofski, L. (2009). Mycophenolate mofetil: effects on cellular immune subsets, infectious complications, and antimicrobial activity. *Transpl Infect Dis*, *11*(4), 290-297.
- Robinet, P., Baychelier, F., Fontaine, T., Picard, C., Debre, P., Vieillard, V., . . . Elbim, C. (2014). A polysaccharide virulence factor of a human fungal

- pathogen induces neutrophil apoptosis via NK cells. *J Immunol*, 192(11), 5332-5342.
- Rogers, P. D., Jenkins, J. K., Chapman, S. W., Ndebele, K., Chapman, B. A., & Cleary, J. D. (1998). Amphotericin B activation of human genes encoding for cytokines. *J Infect Dis*, 178(6), 1726-1733.
- Roilides, E., Lyman, C. A., Filoti, J., Akpogheneta, O., Sein, T., Lampaignere, C. G., . . . Walsh, T. J. (2002). Amphotericin B Formulations Exert Additive Antifungal Activity in Combination with Pulmonary Alveolar Macrophages and Polymorphonuclear Leukocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(6), 1974-1976.
- Roilides, E., Robinson, T., Sein, T., Pizzo, P. A., & Walsh, T. J. (1994). In vitro and ex vivo effects of cyclosporin A on phagocytic host defenses against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(12), 2883-2888.
- Roilides, E., Uhlig, K., Venzon, D., Pizzo, P. A., & Walsh, T. J. (1993). Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect Immun*, 61(4), 1185-1193.
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 11(4), 275-288.
- Rose, J. Q., Yurchak, A. M., & Jusko, W. J. (1981). Dose dependent pharmacokinetics of prednisone and prednisolone in man. *J Pharmacokinet Biopharm*, 9(4), 389-417.
- Saliba, F., & Dupont, B. (2008). Renal impairment and amphotericin B formulations in patients with invasive fungal infections. *Med Mycol*, 46(2), 97-112.
- Sangalli-Leite, F., Scorzoni, L., Mesa-Arango, A. C., Casas, C., Herrero, E., Gianinni, M. J., . . . Zaragoza, O. (2011). Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes Infect*, 13(5), 457-467.
- Sau, K., Mambula, S. S., Latz, E., Henneke, P., Golenbock, D. T., & Levitz, S. M. (2003). The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 278(39), 37561-37568.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., & Cassatella, M. A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*, 177, 195-203.
- Schreiber, S. L. (1991). Chemistry and Biology of the Immophilins and Their Immunosuppressive Ligands. *Science*, 251, 283-287.

- Schwab, L., Goroncy, L., Palaniyandi, S., Gautam, S., Triantafyllopoulou, A., Mocsai, A., . . . Zeiser, R. (2014). Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med*, *20*(6), 648-654.
- Sculier, J. P., Delcroix, C., Brassinne, C., Laduron, C., Hollaert, C., & Coune, A. (1989). Pharmacokinetics of Amphotericin B in Patients Receiving Repeated Intravenous High Doses of Amphotericin B Entrapped into Sonicated Liposomes. *Journal of Liposome Research*, *1*(2), 151-166.
- Segal, A. W., 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.
- Shaw, L. M., Holt, D. W., Oellerich, M., Meiser, B., & van Gelder, T. (2001). Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion. *Ther Drug Monit*, *23*(4), 305-315.
- Sheppard, D. C., & Filler, S. G. (2014). Host cell invasion by medically important fungi. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *5*(1), a019687.
- Simitsopoulou, M., Roilides, E., Dotis, J., Dalakiouridou, M., Dudkova, F., Andreadou, E., & Walsh, T. J. (2005). Differential expression of cytokines and chemokines in human monocytes induced by lipid formulations of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*, *49*(4), 1397-1403.
- Simitsopoulou, M., Roilides, E., Likartsis, C., Ioannidis, J., Orfanou, A., Paliogianni, F., & Walsh, T. J. (2007). Expression of immunomodulatory genes in human monocytes induced by voriconazole in the presence of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, *51*(3), 1048-1054.
- Simitsopoulou, M., Walsh, T. J., Kyrpitzis, D., Petraitis, V., Kontoyiannis, D. P., Perlin, D. S., & Roilides, E. (2015). Methylprednisolone impairs conidial phagocytosis but does not attenuate hyphal damage by neutrophils against *Exserohilum rostratum*. *Med Mycol*, *53*(2), 189-193.
- Sokol-Anderson, M. L., Brajtburg, J., & Medoff, G. (1986). Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis*, *154*(1), 76-83.
- Spisani, S., Fabbri, E., Muccinelli, M., Cariani, A., Barbin, L., Trotta, F., & Dovigo, L. (2001). Inhibition of neutrophil responses by cyclosporin A. An insight into molecular mechanisms. *Rheumatology (Oxford)*, *40*(7), 794-800.
- Stahlmann, R., Lode, H., Barth, H., & Sonntag, H.-G. (2017). Antibiotika und andere Therapeutika zur antiinfektiven Therapie. In K. Aktories, U. Förstermann, F. B. Hofmann, & K. Starke (Eds.), *Allgemeine und spezielle*

Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel (Vol. 12., pp. 701-824). Amsterdam: Urban & Fischer/Elsevier.

- Stahn, C., & Buttgereit, F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4(10), 525-533.
- Strieter, R. M., Kasahara, K., Allen, R., Showell, H. J., Standiford, T. J., & Kunkel, S. L. (1990). Human neutrophils exhibit disparate chemotactic factor gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 173(2), 725-730.
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*, 31(8), 318-324.
- Sun, Y. Q., Xu, L. P., Liu, D. H., Zhang, X. H., Chen, Y. H., Chen, H., . . . Huang, X. J. (2012). The incidence and risk factors of invasive fungal infection after haploidentical haematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion. *Clin Microbiol Infect*, 18(10), 997-1003.
- Suzuki, K., & Namiki, H. (1998). Phorbol 12-myristate 13-acetate induced cell death of porcine peripheral blood polymorphonuclear leucocytes. *Cell Struct Funct*, 23(6), 367-372.
- Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., & Sendo, F. (1996). Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol*, 59(2), 229-240.
- Teixeira, A. B., Moretti, M. L., Machado, H. C., Nishimura, K., Taguchi, H., & Schreiber, A. Z. (2007). Evaluation of the inhibitory effect of amphotericin B on the apical growth of *F. solani* using the BioCell-Tracer system. *Mycoses*, 50(3), 183-188.
- Theuretzbacher, U., Ihle, F., & Derendorf, H. (2006). Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Profile of Voriconazole. *Clin Pharmacokinet*, 45(7), 649-663.
- Thywissen, A., Heinekamp, T., Dahse, H. M., Schmalzer-Ripcke, J., Nietzsche, S., Zipfel, P. F., & Brakhage, A. A. (2011). Conidial Dihydroxynaphthalene Melanin of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus* Interferes with the Host Endocytosis Pathway. *Front Microbiol*, 2, 96.
- Tiphine, M., Letscher-Bru, V., & Herbrecht, R. (1999). Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl Infect Dis*, 1(4), 273-283.
- Torrado, J. J., Espada, R., Ballesteros, M. P., & Torrado-Santiago, S. (2008). Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci*, 97(7), 2405-2425.

- Trof, R. J., Beishuizen, A., Debets-Ossenkopp, Y. J., Girbes, A. R., & Groeneveld, A. B. (2007). Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic critically ill patients. *Intensive Care Med*, 33(10), 1694-1703.
- Ullmann, A. J., Aguado, J. M., Arikan-Akdagli, S., Denning, D. W., Groll, A. H., Lagrou, K., . . . Cornely, O. A. (2018). Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clinical Microbiology and Infection*, 24, e1-e38.
- Upton, A., Kirby, K. A., Carpenter, P., Boeckh, M., & Marr, K. A. (2007). Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis*, 44(4), 531-540.
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., . . . Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5(10), e1000639.
- Valiante, V., Macheleidt, J., Föge, M., & Brakhage, A. A. (2015). The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol*, 6(325).
- van de Veerdonk, F. L., Gresnigt, M. S., Romani, L., Netea, M. G., & Latge, J. P. (2017). *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol*, 15(11), 661-674.
- van den Berg, J. M., van Koppen, E., Ahlin, A., Belohradsky, B. H., Bernatowska, E., Corbeel, L., . . . Kuijpers, T. W. (2009). Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One*, 4(4), e5234.
- van Hest, R. M., Doorduijn, J. K., de Winter, B. C., Cornelissen, J. J., Vulto, A. G., Oellerich, M., . . . van Gelder, T. (2007). Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Ther Drug Monit*, 29(3), 353-360.
- Velert, M. M., Cabrera, E., Orero, A., Peman, J., & Canton, E. (1998). Effect of fluconazole and itraconazole on human polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism and phagocytosis. *Rev Esp Quimioter*, 11(1), 70-74.
- Vora, S., Chauhan, S., Brummer, E., & Stevens, D. A. (1998). Activity of voriconazole combined with neutrophils or monocytes against *Aspergillus fumigatus*: effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(9), 2299-2303.
- Vora, S., Purimetla, N., Brummer, E., & Stevens, D. A. (1998). Activity of voriconazole, a new triazole, combined with neutrophils or monocytes against *Candida albicans*: effect of granulocyte colony-stimulating factor

- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(4), 907-910.
- Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D., & Storb, R. (1979). Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*, 300(19), 1068-1073.
- Werner, J. L., Metz, A. E., Horn, D., Schoeb, T. R., Hewitt, M. M., Schwiebert, L. M., . . . Steele, C. (2009). Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol*, 182(8), 4938-4946.
- Wilson, E., Thorson, L., & Speert, D. P. (1991). Enhancement of Macrophage Superoxide Anion Production by Amphotericin B. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 35(5), 796-800.
- Wong, S. S. W., & Aimanianda, V. (2017). Host Soluble Mediators: Defying the Immunological Inertness of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *J Fungi (Basel)*, 4(1).
- Wu, C. Y., Fargeas, C., Nakajima, T., & Delespesse, G. (1991). Glucocorticoids suppress the production of interleukin 4 by human lymphocytes. *Eur J Immunol*, 21(10), 2645-2647.
- Wurster, S., Helm, J., Weis, P., Lazariotou, M., Page, L., Einsele, H., & Ullmann, A. J. (2016). *Cyclosporin A, MMF, and prednisolone lead to reduced sensitivity of the quantification of Aspergillus-specific T-cells*. Paper presented at the ECCMID, Abstract #6024, Amsterdam, Netherlands.
- Wurster, S., Thielen, V., Weis, P., Walther, P., Elias, J., Waaga-Gasser, A. M., . . . Ullmann, A. J. (2017). Mucorales spores induce a proinflammatory cytokine response in human mononuclear phagocytes and harbor no rodlet hydrophobins. *Virulence*, 8(8), 1708-1718.
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytnuik, L. D., . . . Kubes, P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*, 18(9), 1386-1393.
- Yousefi, S., Gold, J. A., Andina, N., Lee, J. J., Kelly, A. M., Kozlowski, E., . . . Simon, H. U. (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*, 14(9), 949-953.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., & Simon, H. U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*, 16(11), 1438-1444.
- Zeighami, S., Hadjibabaie, M., Ashouri, A., Sarayani, A., Khoee, S. H., Mousavi, S., . . . Ghavamzadeh, A. (2014). Assessment of cyclosporine serum

concentrations on the incidence of acute graft versus host disease post hematopoietic stem cell transplantation. *Iran J Pharm Res*, 13(1), 305-312.

Zeiser, R., & Blazar, B. R. (2017). Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*, 377(22), 2167-2179.

Zeiser, R., Dreger, P., Finke, J., Greinix, H., Holler, E., Luft, T., . . . Wolff, D. (2016). GvHD-Prophylaxe und Therapie. Verfügbar unter https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien_Kap-09_GvHD-Prophylaxe%20und%20Therapie.pdf. Abgerufen am 7. Juli 2019.

Zeiser, R., Wolff, D., Scheid, C., Luft, T., Greinix, H., Dreger, P., . . . Holler, E. (2019). Graft-versus-Host Erkrankung, akut. Verfügbar unter <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/graft-versus-host-erkrankung-akut/@@guideline/html/index.html>. Abgerufen am 7. Juli 2019.

6.2 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle	Beschreibung	Seite
Tab. 2.1	Zielkonzentrationen, zugegebene Konzentrationen je nach Versuchsansatz sowie Verdünnungen aus den jeweiligen Stocklösungen der verschiedenen Antimykotika	35
Tab. 2.2	Zielkonzentrationen, zugegebene Konzentrationen je nach Versuchsansatz sowie Verdünnungen aus den jeweiligen Stocklösungen der verschiedenen Immunsuppressiva	36
Tab. 2.3	Schema zum Ansetzen der Kokulturen für den Phagozytose-Assay	43

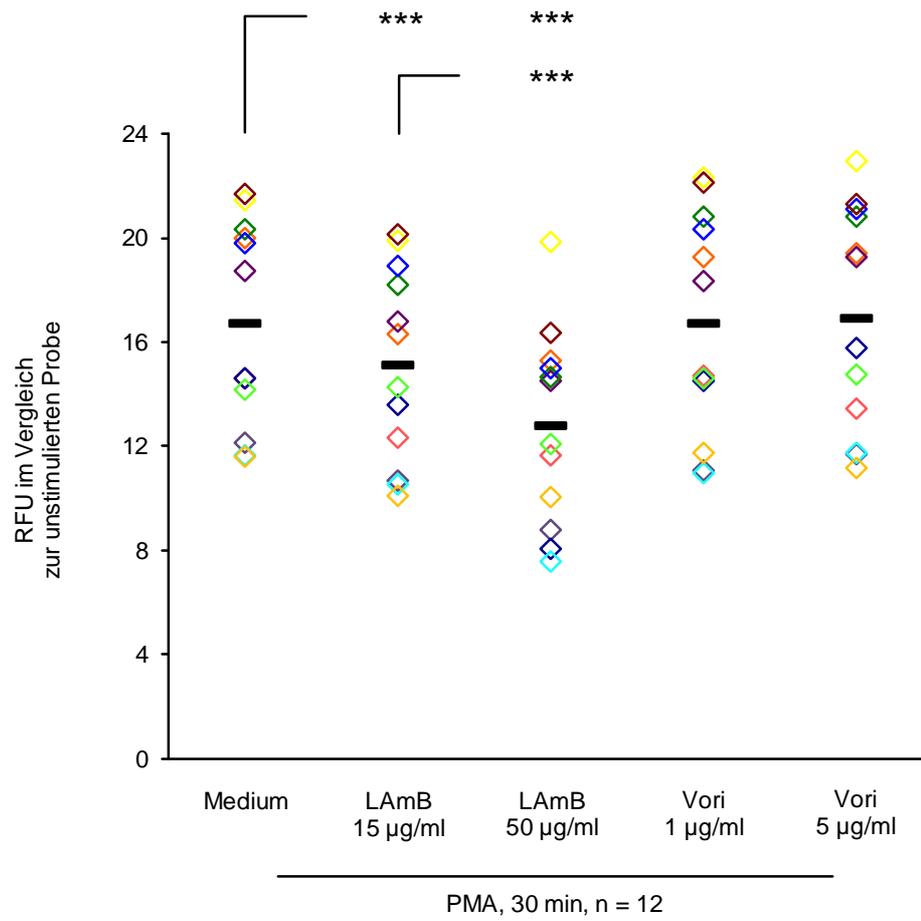
Abbildung	Beschreibung	Seite
Abb. 1.1	Klinisches Spektrum von <i>Aspergillus fumigatus</i> -assoziierten Erkrankungen in Abhängigkeit vom Immunstatus des Patienten	3
Abb. 1.2	Wirkmechanismen von Amphotericin B und Voriconazol	6
Abb. 1.3	Überblick über verschiedene Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten	11
Abb. 2.1	Schichttrennung des Blutes nach 30 min Zentrifugation	32
Abb. 2.2	Protokoll für die Messung des oxidativen <i>Burst</i> der Granulozyten	37
Abb. 2.3	Auswertung der Daten des Phagozytose-Assays	44
Abb. 3.1	Analyse der Viabilität von PMN unter dem Einfluss verschiedener Antimykotika	47
Abb. 3.2	Stimulation der ROS-Freisetzung durch PMA und verschiedene Morphotypen von <i>A. fumigatus</i> in zwei repräsentativen Spendern	49/50
Abb. 3.3	ROS-Sekretion nach PMA-Stimulation in Abhängigkeit von der Gegenwart verschiedener Antimykotika	51/52
Abb. 3.4	ROS-Sekretion nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von <i>A. fumigatus</i> in Abhängigkeit von der Gegenwart verschiedener Antimykotika	53
Abb. 3.5	ROS-Sekretion nach Stimulation mit vitalen Keimschläuchen von <i>A. fumigatus</i> in Abhängigkeit von der Gegenwart verschiedener Antimykotika	54
Abb. 3.6	Vergleich der ROS-Sekretion nach PMA-Stimulation in Abhängigkeit von der Gegenwart von LAmB und Prednisolon	55

Abb. 3.7	Vergleich der ROS-Sekretion nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von <i>A. fumigatus</i> in Abhängigkeit von der Gegenwart von LAmB und Prednisolon	56
Abb. 3.8	Vergleich der ROS-Sekretion nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von <i>A. fumigatus</i> in Abhängigkeit von der Gegenwart von LAmB und CsA/MMF	58
Abb. 3.9	IL-8-Freisetzung gegenüber PMA in Gegenwart verschiedener Antimykotika und Prednisolon	60
Abb. 3.10	IL-8-Freisetzung gegenüber inaktivierten Keimschläuchen von <i>A. fumigatus</i> in Gegenwart verschiedener Antimykotika und Prednisolon	61
Abb. 3.11	Ausbildung von NETs nach Stimulation mit inaktivierten Keimschläuchen von <i>A. fumigatus</i> in Gegenwart verschiedener Antimykotika und Prednisolon	63
Abb. 3.12	Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> -Keimschläuchen in Gegenwart verschiedener Antimykotika und Prednisolon	65

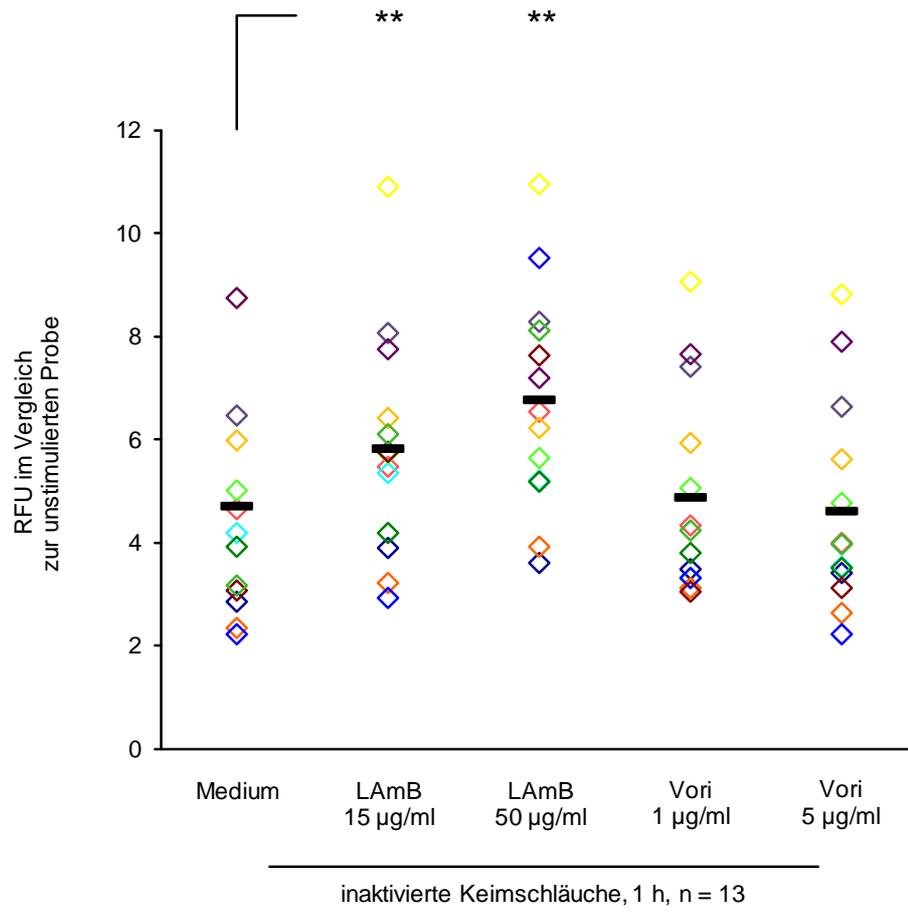
ANHANG

Ergänzende Abbildung

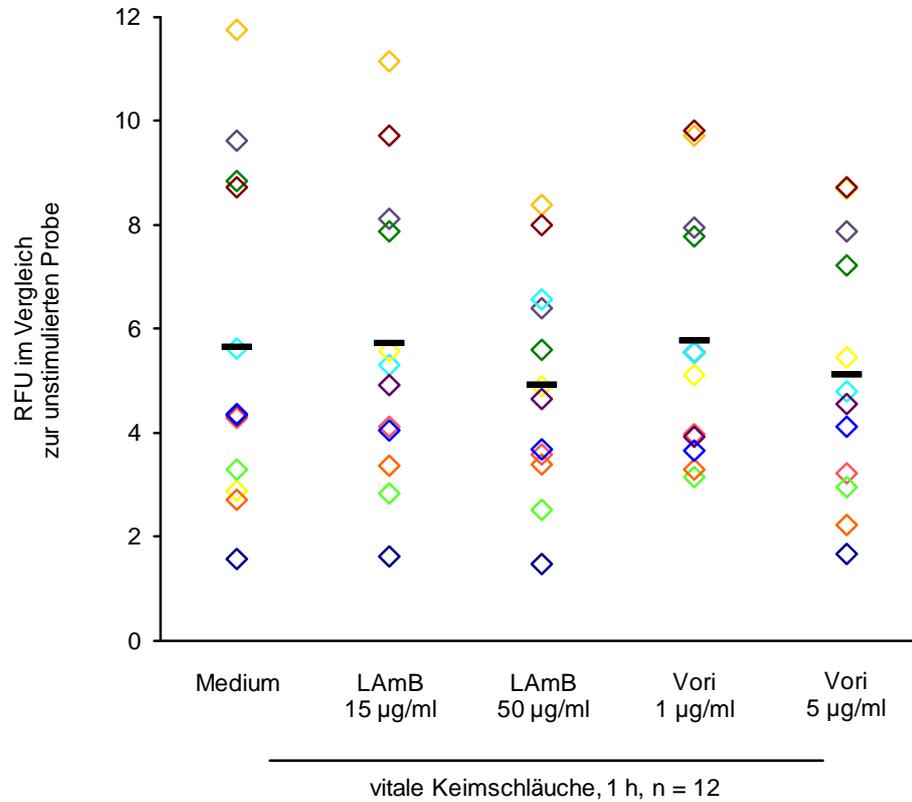
A



B



C



Ergänzende Abbildung: ROS-Sekretion nach Stimulation mit PMA (A), inaktivierten (B) und vitalen (C) Keimschläuchen von *A. fumigatus* in Abhängigkeit von der Gegenwart verschiedener Antimykotika

Dargestellt sind die relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten von 12 (A, C) bzw. 13 (B) Spendern nach 30-minütiger Stimulation mit PMA (A) bzw. 1-stündiger Stimulation mit inaktivierten (B) oder vitalen (C) Keimschläuchen von *A. fumigatus* im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen. Die horizontalen Balken zeigen den Mittelwert.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AmB	Amphotericin B
APC	Allophycocyanin
CC	CC-Motiv
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CGD	Chronische Granulomatose
CsA	Ciclosporin A
CXC	CXC-Motiv
CXCL	CXC-Motiv-Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Rezeptor
d-AmB	Amphotericin B - Desoxycholat
DCF(-DA)	2', 7'-Dichlorfluorescein(-Diacetat)
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
DHN-Melanin	1,8-Dihydroxynaphthalen-Melanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Erythrozyten-Lyse
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELR+/-	ELR-Motiv positiv/negativ
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gravitationskraft
GAG	Galactosaminogalactan
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
h	Stunde(n)

HBSS	<i>HANKS´ buffered salt solution</i>
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IA	Invasive Aspergillose
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
LAmB	Liposomales Amphotericin B
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute(n)
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MPO	Myeloperoxidase
NADPH-Oxidase	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	<i>polymorph nuclear neutrophils,</i> neutrophile Granulozyten
PRRs	<i>pathogen recognition receptors</i>
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
RodA	RodletA
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SSC	<i>side scatter</i>
Tab.	Tabelle
TLR	<i>Toll-Like-Rezeptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)- 2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Löffler sowie Prof. Dr. Andrew Ullmann für die Möglichkeit bedanken, dass ich diese Arbeit unter ihrer wissenschaftlichen Leitung durchführen durfte und mir dafür die Laborräume und Materialien zur Verfügung gestellt wurden. Prof. Dr. Jürgen Löffler möchte ich insbesondere für die Überlassung des Themas, seine konstruktive Kritik bei den zahlreichen Treffen und die jederzeit freundliche Zusammenarbeit danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Sebastian Wurster, M.Sc., für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit. Seine umfassende und geduldige Unterstützung bei der Klärung jeglicher Fragen sowie die stets unverzüglichen Hilfestellungen und Korrekturen trugen entscheidend zur Fertigstellung dieser Dissertation bei.

Ein besonderer Dank geht auch an alle freiwilligen Spender, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Von Herzen danke ich meinem Freund und meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, die mich in allen Lebenslagen unterstützen, mich stets motivieren und immer ein offenes Ohr für mich haben. Ohne eure Unterstützung wäre mein Studium und diese Dissertation nicht möglich gewesen.

