



Charakterisierung des Beitrags von *Pattern-Recognition-Receptors* bei der Einleitung einer proinflammatorischen Immunantwort gegen den Schimmelpilz *Rhizopus arrhizus*

Characterization of pattern recognition receptors involved in the proinflammatory immune response to the mold pathogen *Rhizopus arrhizus*

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von

Vanessa Elisabeth Thielen

aus Saarlouis

Würzburg 2021



Eingereicht am: 18. März 2021

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

1. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Löffler

2. Betreuer: Prof. Dr. Andrew J. Ullmann

3. Betreuer: Prof. Dr. Hermann Einsele

Tag des Promotionskolloquiums: 15. November 2021

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 20.02.2021

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Mucorales – eine Einführung	1
1.2. Systematik der Pilze, Gattung und Taxonomie	2
1.3. Eigenschaften von Mucorales	4
1.3.1. Morphologie	4
1.3.2. Virulenzfaktoren von Mucorales.....	5
1.4. Klinik - Mucormykosen	5
1.4.1. Epidemiologie von Mucormykosen	5
1.4.2. Mucormykosen - Ätiologie und prädisponierende Faktoren	6
1.4.3. Klinische Manifestation von Mucormykosen	9
1.4.4. Diagnostik von Mucormykosen	11
1.4.5. Therapie von Mucormykosen	13
1.4.6. Prognose und Letalität von Mucormykosen	14
1.5. Immunpathologie von Mucormykosen	15
1.5.1. Abwehrmechanismen des Immunsystems gegenüber Pilzpathogenen	15
1.5.2. Bedeutung von Zytokinen im Rahmen von Pilzinfektionen	23
1.5.3. Bedeutung von PRRs in natürlicher Immunzellen bei der Abwehr von Pilzen.....	24
1.5.4. Durch aktivierte PRRs eingeleitete Signalwege.....	28
1.6. Zielsetzung der Arbeit	31
2. MATERIAL UND GERÄTE	33
2.1. Material zur Blutentnahme	33
2.2. Reaktionsgefäße	33

2.3.	Biochemisches und molekularbiologisches Equipment	34
2.4.	Materialien zur Kultur und Inaktivierung von Pilzen	34
2.5.	Reagenzien und Materialien zur Isolation und Kultur von humanen Immunzellen	35
2.6.	Reagenzien zur Blockade oder Stimulation von PRR	36
2.7.	Reagenzien siRNA-Experimente	36
2.8.	Reagenzien zur Untersuchung der ROS-Freisetzung	36
2.9.	Reagenzien für die Durchflusszytometrie	36
2.10.	Reagenzien und Kits für Arbeiten mit Nukleinsäuren	37
2.11.	Oligonukleotide für die RT-qPCR	37
2.12.	Reagenzien für ELISA-Analysen	38
3.	METHODEN	39
3.1.	Mikrobiologische Methoden	39
3.1.1.	Kultur von Pilz-Isolaten	39
3.1.2.	Gewinnung von Konidien	39
3.1.3.	Gewinnung von Keimschläuchen	39
3.1.4.	Gewinnung von Hyphen	40
3.1.5.	Inaktivierung von Konidien, Keimschläuchen und Hyphen	40
3.2.	Blutentnahme und Spendereinschlusskriterien	41
3.3.	Isolation von Immunzellen	42
3.3.1.	Isolation von Granulozyten	42
3.3.2.	Isolation von PBMC	42
3.3.3.	Isolation von Monozyten	43
3.3.4.	Gewinnung von moDCs	43
3.3.5.	Zellzählung der isolierten Immunzellen	44

3.4. Koinkubationsexperimente von Pilz- und Immunzellen	45
3.4.1. Messung des oxidativen <i>Bursts</i> neutrophiler Granulozyten	45
3.4.2. Bestimmung der Phagozytoserate fluoreszenz-markierter Konidien durch neutrophile Granulozyten.....	49
3.4.3. Koinkubation mononukleärer Zellen mit Pilzzellen.....	50
3.4.4. Dectin-1 <i>Knockdown</i> in moDCs und Koinkubation mit Pilzzellen..	51
3.5. Molekularbiologische Methoden.....	53
3.5.1. RNA Isolation für RT-qPCR und ELISA	53
3.5.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	53
3.5.3. Herstellung der CDNA	54
3.5.4. RT-qPCR	54
3.5.5. IL-1 β und TNF- α ELISA	55
4. ERGEBNISSE	57
4.1. Teil I – Koinkubationsexperimente mit Neutrophilen.....	57
4.1.1. Stimulation des oxidativen Burst durch <i>Aspergillus</i> und <i>Rhizopus</i> Morphotypen.....	57
4.1.2. Optimierung der PRR-Agonisten- und -Antikörper-Konzentrationen.	59
4.1.3. Oxidativer Burst - Stimulation von Neutrophilen mittels Rezeptoragonisten und Blockade durch den jeweiligen Antikörper	62
4.1.4. Oxidativer Burst - Neutrophile nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i> und Blockade von TLR2 und TLR4	64
4.1.5. Oxidativer Burst - Neutrophile nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i> und Blockade des TLR2, TLR4 und Dectin-1-Rezeptors	65

4.1.6.	Phagozytose - Neutrophile nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i> und Blockade des TLR2, TLR4 und Dectin-1-Rezeptors	67
4.2.	Teil II – Koinkubationsexperimente mit mononukleären Zellen	70
4.2.1.	Stimulation der IL1- β und TNF- α mRNA-Expression mononukleärer Zellen durch Konidien und ausgekeimte Stadien von <i>R. arrhizus</i> .	70
4.2.2.	Dectin-1- <i>Knockdown</i> in moDCs	73
4.2.2.1.	Relative CLEC7A-Expression nach Dectin-1-<i>Knockdown</i>	73
4.2.2.2.	Relative IL-1β-mRNA- Expression und IL-1β-Sekretion nach Dectin-1-<i>Knockdown</i> in moDCs nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i>	74
5.	DISKUSSION	78
5.1.	Basale Stimulation der innate Immunzellen durch diverse Morphotypen von <i>R. arrhizus</i>.....	79
5.2.	Relevanz der verschiedenen PRRs bei der Erkennung von ruhenden und ausgekeimten Mucorales-Stadien.....	81
5.3.	Limitationen der Promotionsarbeit und Ausblick	86
5.4.	PRRs als diagnostischer oder therapeutischer Angriffspunkt bei Mucormykosen.....	87
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
6.1.	Deutsche Zusammenfassung	91
6.2.	Englische Zusammenfassung.....	92
7.	REFERENZEN	94

8. ANHANG	116
8.1. Abbildungsverzeichnis	116
8.2. Tabellenverzeichnis	118
8.3. Abkürzungsverzeichnis	119
8.4. Danksagung	121

1. EINLEITUNG

1.1. Mucorales – eine Einführung

Schimmelpilze sind ein natürlicher Teil unserer belebten Umwelt. Dazu gehört unter anderem die ubiquitär vorkommende Pilzordnung Mucorales, die der Klasse der Mucoromycotina angehört, und in der Raumluft, aber auch in Holzböden, Klimaanlage und vor allem in Nahrungsmitteln, wie zum Beispiel in Nüssen, faulenden Früchten und Gemüse nachweisbar ist. Ein gewisser Keimbesatz in Lebensmittel ist normal (Hollmann et al., 2008). Darüber hinaus werden Mucorales auf Grund des biotechnologischen Nutzens vermehrt in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, zum Beispiel zur Fermentation von Lebensmitteln oder zur Produktion von Enzymen. In der Europäischen Union werden verschiedene Lebensmittelenzyme von Mucorales wie die Glucoamylase, die Lipase und die Pectinesterase verwendet, die für die Herstellung von Käse, Bäckereiwaren, Milch, Bier und Wein unverzichtbar sind (Hollmann et al., 2008, Romani, 2011, Gryganskyi et al., 2018).

Neben dem wertvollen Nutzen und sinnvollen Einsatz in der Lebensmittelindustrie werden Mucorales als opportunistische Erreger gefürchtet, die in immunsupprimierten Patienten schwerste Infektionen auslösen können. Diese sogenannten Mucormykosen betreffen vor allem Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen wie beispielsweise akuten Leukämien, sowie Patienten nach allogener Stammzelltransplantation. Ebenso gefährdet sind Patienten, die eine hochdosierte Chemo- oder Steroidtherapie erfahren. Auch Diabetiker können vor allem in ketoazidotischen Zuständen vermehrt Mucormykosen entwickeln.

Aktuell überwiegen bei immunsupprimierten Patienten Infektionen mit *Aspergillus species* und *Candida species*. Nicht zuletzt auf Grund optimierter Therapieformen gegen diese beiden Erreger, ist aktuell eine steigende Inzidenz von Mucormykosen zu beobachten (Bitar et al., 2009). Dementsprechend ist das Verständnis der Pathogenese von Mucormykosen sowie den diversen Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems gegen Mucorales, auf

die in Kapitel 1.5 näher eingegangen werden soll, von absolut klinischer Bedeutung. Die Klassifikation der Mucorales sowie die vielgestaltige Klinik der Mucormykose, deren Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose und Immunpathologie sollen in den folgenden Abschnitten beschrieben werden. Da *Aspergillus species* zu den wichtigsten humanpathogenen Pilzen zählen, wurde *A. fumigatus*, der häufigste Erreger humaner invasiver Schimmelpilzinfektionen (Park and Mehrad, 2009), in der vorliegenden Arbeit vergleichend untersucht.

1.2. Systematik der Pilze, Gattung und Taxonomie

Pilze zählen zu den heterotrophen Eukaryonten und lassen sich wiederum in verschiedene Stämme und Substämme untergliedern. Die Taxonomie befindet sich in einem stetigen Wandel. Noch bis vor zehn Jahren basierte die Klassifikation auf morphologischen, fortpflanzungs- und stoffwechselbedingten Kriterien. Damals gehörte die Ordnung Mucorales neben der Ordnung der Entomophthorales der Klasse der Zygomycetes an, welche dem Stamm der Zygomycota zugeteilt wurden. So wurden Infektionen hervorgerufen durch Mucorales sowie durch die in den Subtropen und Tropen vorkommenden Entomophthorales als Zygomykosen bezeichnet (Kwon-Chung, 2012, Ribes et al., 2000). Seit einigen Jahren gewinnen jedoch phylogenetische Sequenzierungsstudien an Bedeutung, durch die neue Einteilungen im Reich der Pilze geschaffen werden (Gryganskyi et al., 2018). Hierbei stellte sich der bisher für monophyletisch gehaltene Stamm der Zygomycota als polyphyletisch dar, sodass Hibbett et al. 2007 vorschlugen den polyphyletischen Stamm der Zygomycota zwischen den Glomeromycota und vier Substämmen unklarer Zugehörigkeit (*Incertae cedis*) aufzuteilen. Zu diesen vier Substämmen gehören die Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina sowie Zoopagomycotina (Hibbett et al., 2007). Die Ordnung Mucorales lässt sich dem Substamm der Mucoromycotina zuordnen (Hoffmann et al., 2013). Diese neue Unterteilung hatte ebenso Auswirkungen auf die Nomenklatur der Infektionen. Seither wird der Begriff der Zygomykose, der fälschlicherweise oft als Synonym der Mucormykose benutzt wurde, zunehmend ersetzt. Eine Mucormykose

beschreibt eine durch die Ordnung Mucorales hervorgerufene Infektion, wohingegen eine Entomophthoromykosis durch Entomophthorales bedingt ist (Kwon-Chung, 2012). In Abbildung 1.1 wird die aktuelle Klassifizierung des Stammbaums der Pilze systematisch dargestellt (Ribes et al., 2000, Hibbett et al., 2007, Gryganskyi et al., 2018).

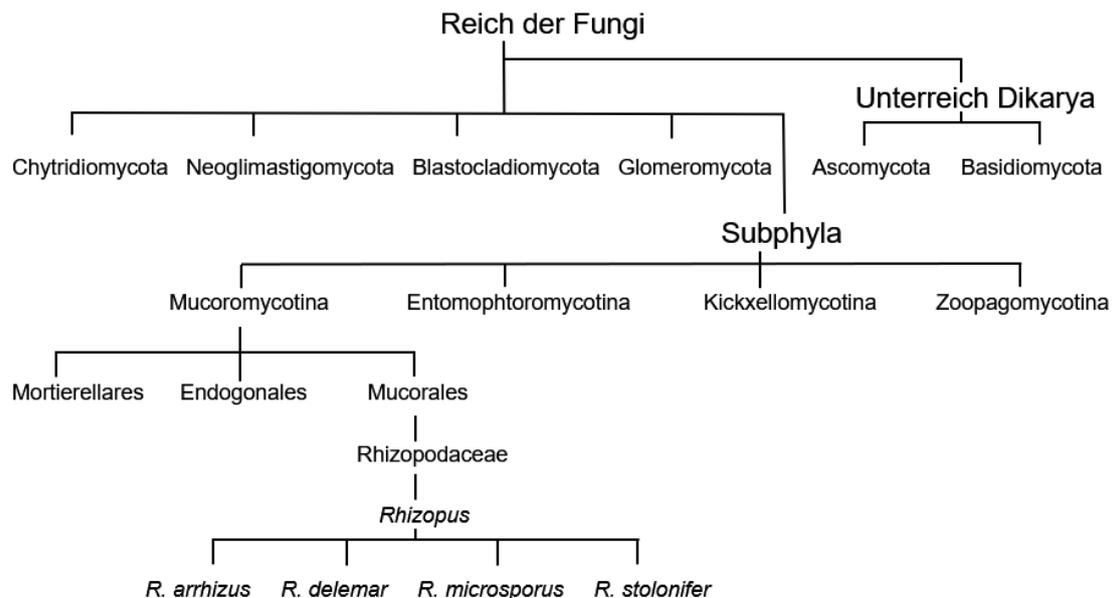


Abbildung 1.1: Aktueller Stammbaum der Pilze

Hier wird die aktuelle Einteilung der Pilze abgebildet. Die verschiedenen Ebenen repräsentieren die Rangfolge Reich bzw. Unterreich, Stamm bzw. Substamm, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung, Spezies.

Zum Substamm der Mucoromycotina zählen neben Endogonales und Mortierellares die Ordnung Mucorales. Hierzu lässt sich die Familie der Rhizopodaceae mit ihrer Gattung *Rhizopus* zuordnen. Nach aktuellen Gensequenzierungsstudien zählen zu *Rhizopus* vier große Spezieskomplexe: *Rhizopus microsporus* als Hauptspezies mit seiner Schwester-Spezies *Rhizopus stolonifer*, sowie die beiden nahe verwandten Arten *Rhizopus arrhizus* und *Rhizopus delemar*, denen sich weitere *Rhizopus spp.* zuordnen lassen (Gryganskyi et al., 2018). Die in der vorliegenden Arbeit vergleichend untersuchte Spezies *A. fumigatus* lässt sich dem Unterreich der Dikarya und dem Stamm der

Ascomycota zuordnen (siehe Abbildung 1.1) (Ribes et al., 2000, Hibbett et al., 2007).

1.3. Eigenschaften von Mucorales

1.3.1. Morphologie

Mucorales sind ubiquitär vorkommende, schnell wachsende Pilze, die auf vielen verschiedenen Pilznährmedien gedeihen können. Das Pilzgeflecht, das Myzel, der Mucorales besteht typischerweise aus unseptierten Hyphen, welche an den Enden kugelförmige Auftreibungen, die Sporangien entwickeln. Die Fortpflanzung der Mucorales kann sowohl geschlechtlich als auch ungeschlechtlich stattfinden. Zumeist erfolgt jedoch die ungeschlechtliche Fortpflanzung. Diese geschieht endogen durch Sporangiosporen oder exogen durch Konidien, welche bei Reife freigesetzt werden und sofort keimfähig sind. Diese Konidien keimen zu Keimschläuchen, welche sich durch Längenwachstum und Verzweigung erneut zu Hyphen entwickeln (Hollmann et al., 2008). In Abbildung 1.2 werden die verschiedenen Morphotypen von Mucorales dargestellt.

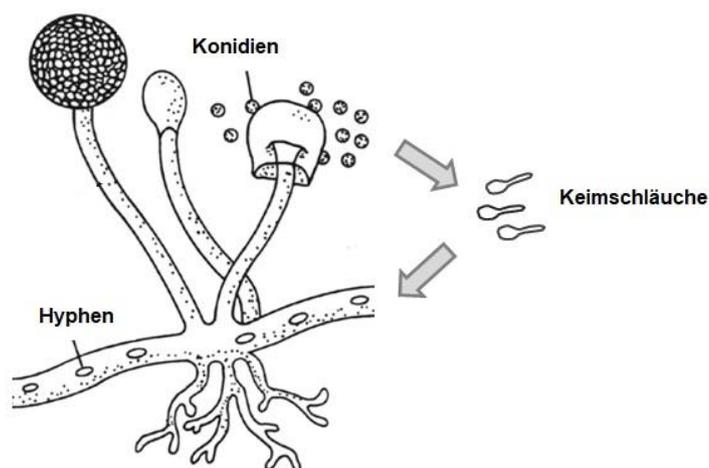


Abbildung 1.2: schematische Übersicht der drei Morphotypen von Mucorales

Dargestellt wird die Auskeimung von Konidien zu Keimschläuchen und deren weitere Entwicklung zu Hyphen.

1.3.2. Virulenzfaktoren von Mucorales

Mucorales' einzigartiger Virulenzcharakter und ihre unverwechselbare Wirt-Pathogen-Interaktion unterscheidet diese Pilzordnung von Anderen und ermöglicht ihr ein Voranschreiten der Infektion (Ibrahim et al., 2012). Einer der bedeutenden Virulenzfaktoren von Mucorales stellt die Angioinvasion dar, welche mit nachfolgenden Thrombosen und ausgedehnten Gewebnekrosen einhergehen kann. Innerhalb der Ordnung Mucorales repräsentiert die Spezies *R. arrhizus* einen der wichtigsten humanpathogenen Erreger. Ibrahim et al. konnten in einer Studie zeigen, dass sich sowohl Sporen als auch Keimschläuche von *R. arrhizus in vitro* an menschliche Endothelzellen anlagern und diese folglich beschädigen (Ibrahim et al., 2005). Die Thermotoleranz stellt einen weiteren Virulenzfaktor dar. Diese ermöglicht das Wachstum des Pilzes bei Körperwärme und sorgt dafür, dass Dauerformen von *R. arrhizus* extreme Temperaturen überstehen können (Domsch et al., 1980). Außerdem produziert *R. arrhizus* Hydroxamat-Siderophore, die dem Pilz eine ausreichende Eisenverfügbarkeit gewährleisten (Holzberg and Artis, 1983). Durch eine Keto-Reduktase ist *R. arrhizus* in der Lage saure sowie glukosereiche Bedingungen zu tolerieren, wie sie vor allem im Rahmen einer Ketoazidose bei diabetischen Patienten vorkommen können. Darüber hinaus produziert *R. arrhizus* das humantoxische Ergotalkaloid Agroclavin (Domsch et al., 1980).

1.4. Klinik - Mucormykosen

1.4.1. Epidemiologie von Mucormykosen

Neben den durch Ascomyzeten verursachten Aspergillosen und Candidosen stellen Mucormykosen die dritthäufigste invasive Mykose dar (Eucker et al., 2001). Mucormykosen sind seltene aber schwere Pilzinfektionen, die mit einer hohen Morbidität und Letalität assoziiert sind (Petrikos et al., 2014). Der erste Fall einer Mucormykose wurde 1885 von Paltauf beschrieben (Paltauf, 1885). Während der letzten Jahre gewannen Mucormykosen in Europa stark an Bedeutung, sodass 2004 eine Arbeitsgruppe für Mucormykosen von der

European Confederation of Medical Mycology (ECMM) ins Leben gerufen wurde. Mucormykosen repräsentieren unter allen Pilzinfektionen bei Hochrisiko-Patienten nur einen Anteil von 8,3 bis 13 % (Chamilos et al., 2006, Hotchi et al., 1980). 1992 berichtete eine Studie aus San Francisco eine jährliche Inzidenz von 1,7 Fällen pro 1 Mio. Einwohner, wohingegen in Spanien eine deutlich geringere Inzidenz von 0,43 Fällen pro 1 Mio. Einwohner festgestellt werden konnte (Rees et al., 1998, Torres-Narbona et al., 2007). Sowohl mehrere europäische Studien (Bitar et al., 2009, Saegeman et al., 2010) als auch eine US-amerikanische Studie (Kontoyiannis et al., 2000) konnten eine steigende Inzidenz von Mucormykosen beobachten. Einer aktuellen US-amerikanischen Studie zufolge, liegt die mittlere jährliche Inzidenz während eines Zeitraumes von 10 Jahren (2006 bis 2015) bei 3 Fällen pro 1 Mio. Einwohner (Webb et al., 2018). Im Rahmen einer multizentrischen Studie stieg der Anteil von Stammzellempfängern, die an einer Mucormykose litten von 4 % auf 25 % während eines Zeitraumes von 2 Jahren (2001-2003) (Park et al., 2004). In einer europäischen Fall-Sammlung von Skiada et al. wurden Mucormykosen zu 34 % durch human pathogene Erreger der Gattung *Rhizopus* verursacht, gefolgt von *Mucor* und *Lichtheimia* zu je 19 % (Skiada et al., 2011). Die Spezies *R. arrhizus* stellt hierbei den häufigsten Erreger dar (Roden et al., 2005, Chakrabarti et al., 2001).

1.4.2. Mucormykosen - Ätiologie und prädisponierende Faktoren

Durch die steigende Prävalenz an Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, häufig durchgeführten Chemotherapien und die Entwicklung der Transplantationsmedizin wächst die Anzahl immunsupprimierter Patienten und somit steigt auch die Inzidenz von opportunistischen Pilzkrankungen (Romani, 2011). Invasive Schimmelpilzinfektionen werden derzeit am häufigsten durch den humanpathogenen Erreger *A. fumigatus* hervorgerufen. Die Konidien des ubiquitär vorkommenden *A. fumigatus* sind aerogen und werden meist über die Lunge oder Sinus inhaliert. Auf diese Weise atmet der Mensch täglich unbemerkt hunderte von Konidien ein. In immunkompetenten Menschen führt eine

Besiedelung mit *Aspergillus* nicht zur Infektion. Dies legt nahe, dass bei gesunden Menschen das angeborene Immunsystem den Erreger sofort eliminiert, bevor das erworbene Immunsystem alarmiert wird (Park and Mehrad, 2009). Bei Atopikern kann der Pilz allerdings eine allergische Rhinitis oder Asthma bis hin zur allergischen bronchopulmonalen Aspergillose auslösen. Immuninkompetente Patienten, vor allem neutropenische Patienten, können schwere invasive Aspergillosen entwickeln (Neofytos et al., 2009).

In den letzten Jahren gewinnen jedoch Mucormykosen nicht zuletzt auf Grund der steigenden Anzahl prädisponierter Patienten, sowie der Steigerung der Virulenz der Erreger durch den Einsatz antimykotischer Prophylaxen stetig an Bedeutung. Die Pilzordnung Mucorales verursacht akute angioinvasive Infektionen in immunsupprimierten Patienten. Immunkompetente Menschen sind von der schwerwiegenden Infektion in der Regel nicht betroffen. Ausgenommen sind Polytraumapatienten oder Verbrennungsoffer, deren Haut die Funktion als Schutzbarriere nicht mehr erfüllen kann und somit zur Zutrittspforte für opportunistische Erreger wird. So kann sich in selteneren Fällen eine kutane Mucormykose entwickeln (Skiada and Petrikos, 2009). Zumeist jedoch werden die Sporen des ubiquitär vorkommenden Pilzes inhaliert oder ingestiert und können auf diese Weise in immunsupprimierten Patienten eine lebensbedrohliche Mucormykose auslösen. Maligne hämatologische Erkrankungen wie Lymphome, Leukämien und Multiple Myelome stellen die wichtigsten Risikofaktoren dar. Häufig betroffen sind Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT), Organtransplantation oder Graft-versus-Host-Disease. Zudem erhöhen eine Neutropenie sowie eine pharmakologische Immunsuppression durch hochdosierte Chemo- oder Steroidtherapien das Risiko eine Mucormykose zu entwickeln. Ebenso anfällig sind Patienten mit schwer kontrollierbarem Diabetes mellitus (Typ 1 als auch Typ 2) (Petrikos et al., 2014, Skiada et al., 2011, Roden et al., 2005, Chamilos et al., 2006). Eine Hyperglykämie schwächt die Abwehrfunktion innater Immunzellen und kann so die Entwicklung einer Mucormykose begünstigen (Chinn and Diamond, 1982). Trotz der vor allem in den Wohlstandsgesellschaften der Industriestaaten weiterhin ansteigenden Inzidenz von Diabetes mellitus,

konnte dennoch eine abnehmende Inzidenz der Mucormykosen bei Diabetikern festgestellt werden (Roden et al., 2005). Hierfür könnte der vermehrte Einsatz von Statinen bei metabolischem Syndrom eine mögliche Erklärung sein, da diese Medikamente gegen einige Erreger der Ordnung Mucorales wirksam zu sein scheinen (Bellanger et al., 2016). Darüber hinaus kann es im Rahmen eines Diabetes mellitus möglicherweise zu einer Ketoazidose kommen, welche Einfluss auf den Eisenstoffwechsel nimmt und somit ebenfalls die Entstehung einer Mucormykose fördert. Der während einer Ketoazidose bestehende niedrige pH-Wert des Serums hat zur Folge, dass weniger Eisen gebunden werden kann und so kann der humanpathogene Schimmelpilz *R. arrhizus* das vermehrt ungebundene Eisen zum Wachstum nutzen. Dementsprechend stellen eine hereditäre Hämochromatose oder eine Therapie mit dem Eisenchelator Deferoxamin, die häufig wegen Eisenüberladung bei Dialysepatienten Anwendung fand, Risikofaktoren für die Entwicklung einer Mucormykose dar (McNab and McKelvie, 1997, Boelaert et al., 1991). Heute werden neue Eisenchelatoren wie Deferasirox und Deferirone verwendet, die für Mucorales nicht als Siderophore dienen und deren Einsatz somit kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Mucormykose birgt. Des Weiteren wird in der Literatur diskutiert, ob eine antimykotische Prophylaxe mit Voriconazol, Isavuconazol oder Caspofungin in Hoch-Risikopatienten die Entstehung einer Mucormykose begünstigt (Marty et al., 2004, Pongas et al., 2009, Trifilio et al., 2007, Rausch et al., 2018). Erstaunlicherweise besteht bei HIV-Patienten keine erhöhte Gefahr eine lebensbedrohliche Mucormykose zu entwickeln, da vor allem neutrophile Granulozyten bei der Abwehr von invasiven Mykosen eine wichtige Rolle spielen. Lediglich in Assoziation mit intravenösem Drogenabusus, einer Neutropenie, Glukokortikoidtherapie oder Diabetes mellitus besteht ein erhöhtes Risiko (Petrikos et al., 2012, Antinori et al., 2009).

1.4.3. Klinische Manifestation von Mucormykosen

Invasive Mucormykosen können sich in unterschiedlichster Art und Weise präsentieren. Entsprechend der betroffenen Organsysteme werden rhinocerebrale, pulmonale, kutane, gastrointestinale und disseminierte Manifestationsformen unterschieden. Darüber hinaus gibt es noch sehr seltene Formen einer Mucormykose, die sich durch eine Endokarditis, Osteomyelitis oder Peritonitis äußern können. Am häufigsten präsentieren sich Mucormykosen in den Sinus (39 %), den Lungen (24 %) und der Haut (19 %). Disseminierte Formen treten in 23 % der Fälle auf (Roden et al., 2005). In einer Übersichtsarbeit von Roden et al. wurde auf den Zusammenhang zwischen Grunderkrankung und Lokalisation der Mucormykose hingewiesen. So manifestierten sich Mucormykosen in Patienten mit malignen Erkrankungen zu 60 % pulmonal, wohingegen bei Diabetikern eine Beteiligung der Sinus (66 %) in Form einer rhinocerebralen, sinu-orbitalen sowie Sinusinfektion festgestellt werden konnte (Roden et al., 2005) (siehe Abbildung 1.3).

Rhinocerebrale und sinu-orbitale Mucormykosen können zunächst mit unspezifischen Symptomen wie allgemeinem Krankheitsgefühl, Fieber und Kopfschmerzen einhergehen (Yohai et al., 1994). Vor allem bei bestehender Hyperglykämie oder Ketoazidose kann durch Involvierung der ethmoidalen Sinus zusätzlich eine Diplopie auftreten (Walsh et al., 2012). Findet keine rechtzeitige adäquate Therapie statt, so können sich die Erreger in der Schädelhöhle ausbreiten und unter anderem eine Enzephalitis verursachen (Hopkins et al., 1994).

Invasive pulmonale Mucormykosen können mit pleuritischen Schmerzen oder einer Bronchopneumonie, v.a. bei nicht-neutropenischen Patienten, einhergehen (Walsh et al., 2012). Das klinische Bild ähnelt einer pulmonalen invasiven Aspergillose und ist geprägt von Husten, Hämoptysen und fortschreitender Dyspnoe (Bigby et al., 1986, Hamilos et al., 2011). Neben der pulmonalen invasiven Mucormykose kann es auch im Rahmen einer exogen allergischen Alveolitis zu einer pulmonalen Beteiligung kommen. Hierbei handelt es sich um eine Hypersensitivitätsreaktion auf inhalierte Pilzsporen, die vor allem bei

Arbeitern in holzverarbeitenden Betrieben vorkommen (Müller-Wening et al., 1999).

Kutane Mucormykosen entstehen zumeist im Rahmen eines Traumas und können auch bei immunkompetenten Patienten auftreten (Skiada and Petrikos, 2009). Es können sich lokal-invasive Verläufe mit Pannikulitis, Myositis, Fasziiitis bis hin zur Osteitis präsentieren (Skiada and Petrikos, 2009, Prabhu and Patel, 2004).

Disseminierte Mucormykosen sind durch den Befall von mindestens zwei nicht-benachbarten Organen definiert. Typisch sind Angioinvasion und Thrombosierung von Gefäßen, die mit Organinfarkten einhergehen (Ribes et al., 2000).

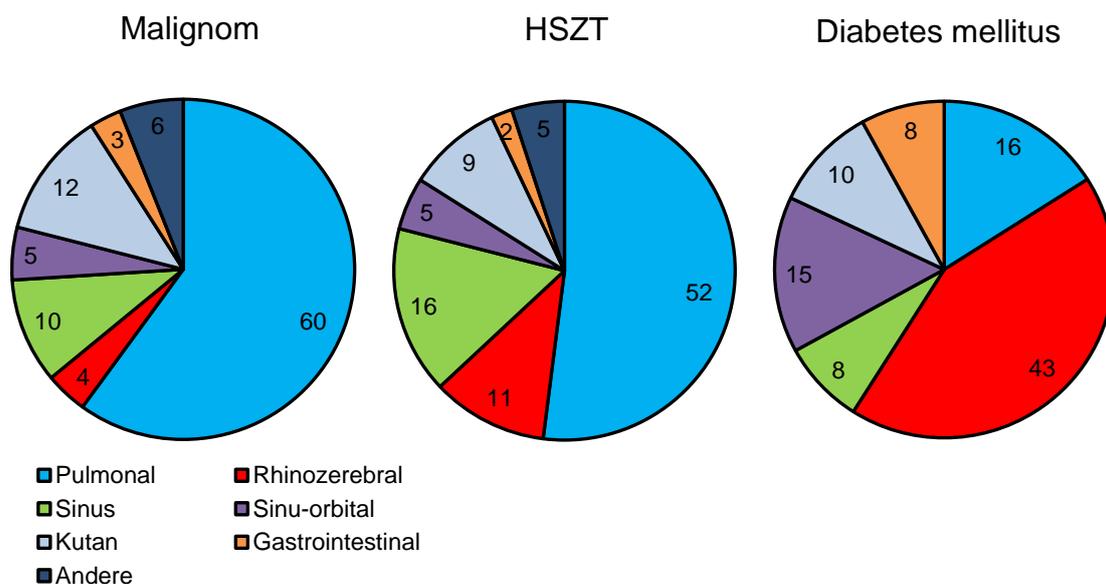


Abbildung 1.3: Lokalisation von Mucormykosen in Abhängigkeit von der jeweiligen Grunderkrankung.

Diese Abbildung wurde aus Roden et al. (2005) entnommen und modifiziert (Roden et al., 2005).

1.4.4. Diagnostik von Mucormykosen

Trotz moderner Technologien erweist sich die Diagnostik einer Mucormykose immer noch als schwierig. Dies liegt zum einen an den uncharakteristischen Symptomen einer Mucormykose und zum anderen an dem klinischen Erscheinungsbild, das sich mit der häufiger vorkommenden Aspergillose überschneidet. Eine frühe Diagnose ist jedoch von absolut klinischer Bedeutung, um schnellstmöglich eine aggressive Therapie einleiten zu können. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verzögerung des Therapiebeginns zu einer erhöhten Letalität führt (Chamilos et al., 2008c). So wurde in einigen Fällen die Diagnose einer Mucormykose erst bei einer Autopsie bestätigt. In einem *Case-Report* von Skiada et al., welcher 230 Fälle von Mucormykosen umfasste, wurde bei 4 % der Patienten eine Mucormykose erst *post mortem* diagnostiziert. In 6 % der Fälle wurde die Diagnose 24 Stunden vor Eintritt des Todes gestellt (Skiada et al., 2011). Laut Chakrabarti et al. konnte in einer retrospektiven Studie über ein Drittel der Mucormykosen erst durch eine Autopsie diagnostiziert werden. Zumeist wurde eine ante-mortem Diagnose bei rhinozerebralen, sowie kutanen Formen gestellt. Gastrointestinale und disseminierte Formen konnten ausnahmslos post-mortem bestätigt werden (Chakrabarti et al., 2001). Des Weiteren wiesen Lanternier et al. darauf hin, dass die Zeit zwischen Erstsymptomatik und Diagnosestellung sowohl abhängig von möglichen Risikofaktoren bzw. der Grunderkrankung des Patienten ist als auch von der Lokalisation der Mucormykose. So wurde bei Patienten nach Stammzelltransplantation die Diagnose einer Mucormykose eher gestellt, als bei Diabetikern oder Patienten nach Organtransplantation. Kutane Mucormykosen konnten frühzeitiger erkannt werden als pulmonale oder disseminierte Formen (Lanternier et al., 2012).

Methoden zur Diagnostik einer Mucormykose sind rar. Die direkte Fluoreszenz-Mikroskopie mittels optischer Aufheller wie Calcofluor und Blankophor sowie die Kulturanzucht des Erregers, welcher durch eine vorangegangene bronchoalveoläre Lavage oder eine Biopsie gewonnen wurde, stellen aktuelle mikrobiologische Diagnostikverfahren dar (Cornely et al., 2014). Allerdings stellt hierbei die häufig vorkommende Thrombozytopenie der potenziellen Risikopatienten eine Kontraindikation für eine Biopsie dar. Mittels

histopathologischer Gewebsuntersuchungen kann zwischen Aspergillose und Mucormykose unterschieden werden, wodurch in 63 % bis 66 % der Fälle die Diagnose einer Mucormykose gestellt werden kann (Skiada et al., 2011, Ruping et al., 2010). Zudem sollte der behandelnde Arzt, sobald er bei einem für Mucormykosen prädisponierten Patienten den Verdacht einer invasiven Mykose hegt, eine Computertomografie (CT) des Gehirns, der Sinus und des Abdomens veranlassen, um die Schwere der Infektion und eine mögliche Dissemination zu erfassen. Läsionen wie Noduli, keilförmige Infiltrationen, Halo-Zeichen und umgekehrte Halo-Zeichen können in der CT sichtbar werden, sind aber ebenso wenig spezifisch für eine invasive Mucormykose wie die in Kapitel 1.4.3 beschriebenen Symptome (Walsh et al., 2012). Eine weitere hilfreiche Bildgebung stellt die Positronen-Emissions-Tomographie-CT (PET-CT) mit Fluor-18-Deoxyglucose (FDG) dar (Liu et al., 2013). Durch einen zusätzlichen negativen *Aspergillus*-Galaktomannantest im Patientenserum, sowie in der bronchoalveolären Lavage, kann die Verdachtsdiagnose einer Mucormykose unterstützt werden (Jha et al., 2013).

Auf Grund des geringen Anteils von 1,3- β -D-Glukanen in der Mucorales-Zellwand eignet sich der 1,3- β -D-Glukantest weniger zum Nachweis von Mucorales-Antigenen. Daher wird zur Diagnostik von invasiven Mucormykosen der 1,3- β -D-Glukantest aktuell nicht empfohlen, wohingegen die Durchführung des *Aspergillus*-Galaktomannantest bei der Abgrenzung zu einer Aspergillose absolut hilfreich sein kann (Cornely et al., 2014). Des Weiteren besteht die Möglichkeit zur Durchführung einer Mucorales Echt-Zeit- Polymerase-Kettenreaktion (*Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction*, RT-PCR), die auf die ribosomale 18s DNA von Mucorales abzielt. Hierzu eignet sich frisches Biopsiematerial am besten (Lass-Flörl et al., 2007, Rickerts et al., 2007). Durch Sequenzierung des ribosomalen *internal transcribed spacer* (ITS), einer Nukleotidsequenz, können Spezies und Gattungen von Mucorales nachgewiesen werden. Die alternative Technik *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF), kann durch Massenspektrometrie bereits viele Pilzspezies identifizieren. Diese Methode klingt

vielversprechend, muss allerdings noch weiter validiert werden (Cornely et al., 2014).

1.4.5. Therapie von Mucormykosen

Die Therapie von Mucormykosen wird auf Grund der häufig verkannten Diagnose oft zu spät eingeleitet. Zudem wird in einigen Fällen fälschlicherweise eine häufiger vorkommende invasive Aspergillose diagnostiziert und folglich eine Therapie mit Voriconazol eingeleitet, gegen die Mucorales resistent ist. Neben Voriconazol besitzt Mucorales natürliche Resistenzen gegen das Antimykotikum Caspofungin (Boucher et al., 2004). Seitdem Amphotericin B als erste Therapieform zur Verfügung steht, sank die Letalität von Mucormykosen erheblich (Rogers, 2008). Die *European Society for Clinical Microbiology* (ESCMID) und die ECMM haben für die Therapie von Mucormykosen Empfehlungen herausgegeben und Leitlinien erstellt. So wird Kindern und Erwachsenen ein chirurgisches Debridement in Kombination mit einer medikamentösen Therapie in Form von liposomalem Amphotericin B, welches weniger nephrotoxisch ist als das konventionelle AmphotericinB-Desoxycholat, in einer Dosis von 5 mg/kg/Tag empfohlen (Cornely et al., 2014). Nach einem umfangreichen *Review* von Roden et al. wurde ebenso die höchste Überlebensrate durch eine kombinierte Therapie aus chirurgischem Debridement und liposomalem Amphotericin B erzielt (Roden et al., 2005). Nach der SECURE und VITAL Studie von 2016 konnte bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und somit bestehender Kontraindikation für eine Amphotericin B Therapie eine ebenso erfolgreiche Behandlung mit Isavuconazol, einem Triazol der zweiten Generation, erreicht werden. Initial wird an den ersten beiden Therapietagen eine *Loading-dose* von 200 mg/8h empfohlen. Im Anschluss daran soll eine Erhaltungsdosis von 200 mg/Tag verabreicht werden (Marty et al., 2016, Maertens et al., 2016). Auch bei pädiatrischen Patienten konnte in einigen Fällen eine erfolgreiche Behandlung mit Isavuconazol nachgewiesen werden. Die Dosierung erfolgt allerdings gewichtsadaptiert (Barg et al., 2018). Als Zweitlinien-Therapie werden derzeit Empfehlungen für eine Behandlung mit

200 mg Posaconozol 4 Mal täglich ausgesprochen (Cornely et al., 2014). Prädisponierende Faktoren wie eine Neutropenie, eine Hyperglykämie oder Ketoazidose müssen selbstverständlich mitbehandelt werden. Bei neutropenischen Patienten empfiehlt sich eine Therapie mit *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF), um die Anzahl zirkulierender Granulozyten anzuheben (Kontoyiannis et al., 2000, Pagano et al., 2004, Roden et al., 2005). Bei Diabetikern kann eine adjuvante Therapie mit Deferasirox hilfreich sein (siehe Kapitel 1.4.2.) (Cornely et al., 2014).

Die Indikation für ein chirurgisches Debridement ergibt sich häufig bei sinu-orbitalen Manifestationsformen sowie bei kutanen Mucormykosen zur lokalen Sanierung und zur Biopsiegewinnung. Bei invasiven pulmonalen Mucormykosen ist ein chirurgisches Eingreifen häufig im Rahmen von Blutungen durch Gefäßeinbrüche indiziert (Skiada and Petrikkos, 2009, Cornely et al., 2014).

Neben den konventionellen Therapiemaßnahmen werden aktuell spezifische Immuntherapiemöglichkeiten erforscht, um invasive Pilzinfektionen einzudämmen. Hierzu zählt die *Chimeric Antigen Receptor* (CAR)-T-Zell-Therapie bei der gentechnisch veränderte T-Zellen einen antigenspezifischen Rezeptor, wie beispielweise Dectin-1, erhalten, welcher β -Glukane und somit Pilzinfektionen erkennt und abwehren kann (Kumaresan et al., 2014, Kumaresan et al., 2018).

1.4.6. Prognose und Letalität von Mucormykosen

Die Prognose bei bestehender Mucormykose richtet sich nach der Invasivität, der Lokalisation und der Vorerkrankungen. Kutane Mucormykosen haben bei Weitem eine bessere Prognose als andere Formen. Eine Studie von Lanternier, die 101 klinische Fälle einschloss, wies an Tag 90 eine Letalitätsrate von 44 % auf und konnte einen Zusammenhang zwischen der Lokalität der Infektion und der Sterberate feststellen. So betrug die Letalitätsrate bei kutanen Mucormykosen 22 %, bei rhinocerebralen 25 %, bei pulmonalen 48 % und bei disseminierten 79 % (Lanternier et al., 2012). Ebenso scheint die

Letalität abhängig von der Grunderkrankung zu sein, sodass die Gesamt-Letalitätsrate bei Diabetikern 32 - 44 %, bei Patienten mit Malignomen 60 - 66 %, bei Traumapatienten 11 % und bei Patienten ohne Grunderkrankung 35 % beträgt (Lanternier et al., 2012, Roden et al., 2005). Ebenso konnten Chamilos et al. zeigen, dass sich die Letalität durch eine verspätet eingeleitete Therapie fast verdoppelte (Chamilos et al., 2008c).

1.5. Immunpathologie von Mucormykosen

1.5.1. Abwehrmechanismen des Immunsystems gegenüber Pilzpathogenen

Der immunkompetente Mensch besitzt diverse Abwehrmechanismen gegenüber Pilzsporen, sodass die Entstehung bzw. das Voranschreiten zu einer invasiven Infektion vermieden wird. Durch die Zusammenarbeit zwischen innatem (angeborenem) und adaptivem (erworbenem) Immunsystem ist eine effektive Abwehr möglich. Erste Abwehrfunktion durch das angeborene Immunsystem stellen die mikrobielle Standortflora der intakten Haut und Schleimhaut, sowie die Oberflächenepithelien des respiratorischen und gastrointestinalen Traktes dar (McCormack et al., 2003, Murphy et al., 2018). Das angeborene Immunsystem besteht neben den humoralen Komponenten wie den Defensinen und dem Komplementsystem aus natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), gamma-delta-T-Zellen ($\gamma\delta$ T-Zellen), epithelialen und endothelialen Zellen sowie professionellen Phagozyten. Bei der direkten unspezifischen Immunabwehr spielen die Phagozyten eine wesentliche Rolle. Hierzu gehören mononukleäre Leukozyten (Makrophagen und Monozyten), neutrophile Granulozyten (*polymorphnuclear neutrophils*, PMN) und dendritische Zellen (DCs) (Calderone, 2001), welche in der Lage sind pathogene Erreger unmittelbar nach der Infektion durch antimykotische Effektormechanismen zu eliminieren. Demnach können Defizienzen im innaten Immunsystem durch fehlende sofortige Eliminierung von Mucorales-Konidien sowie durch fehlendes Aufhalten der Auskeimung der Konidien zu Keimschläuchen bereits eine Ausbreitung der Erkrankung

ermöglichen (Ibrahim et al., 2012). Abbildung 1.4 soll die inhalative Aufnahme der aerogenen Pilzkonidien sowie deren Adhärenzen an das Epithel veranschaulichen. Aufgenommene Konidien reifen zu Keimschläuchen heran, überwinden die Basalmembran und können so in die Wirtszelle eindringen. Die involvierten Zelltypen der innate Immunantwort und deren Verbindung zur adaptiven Immunantwort werden ebenso schematisch dargestellt.

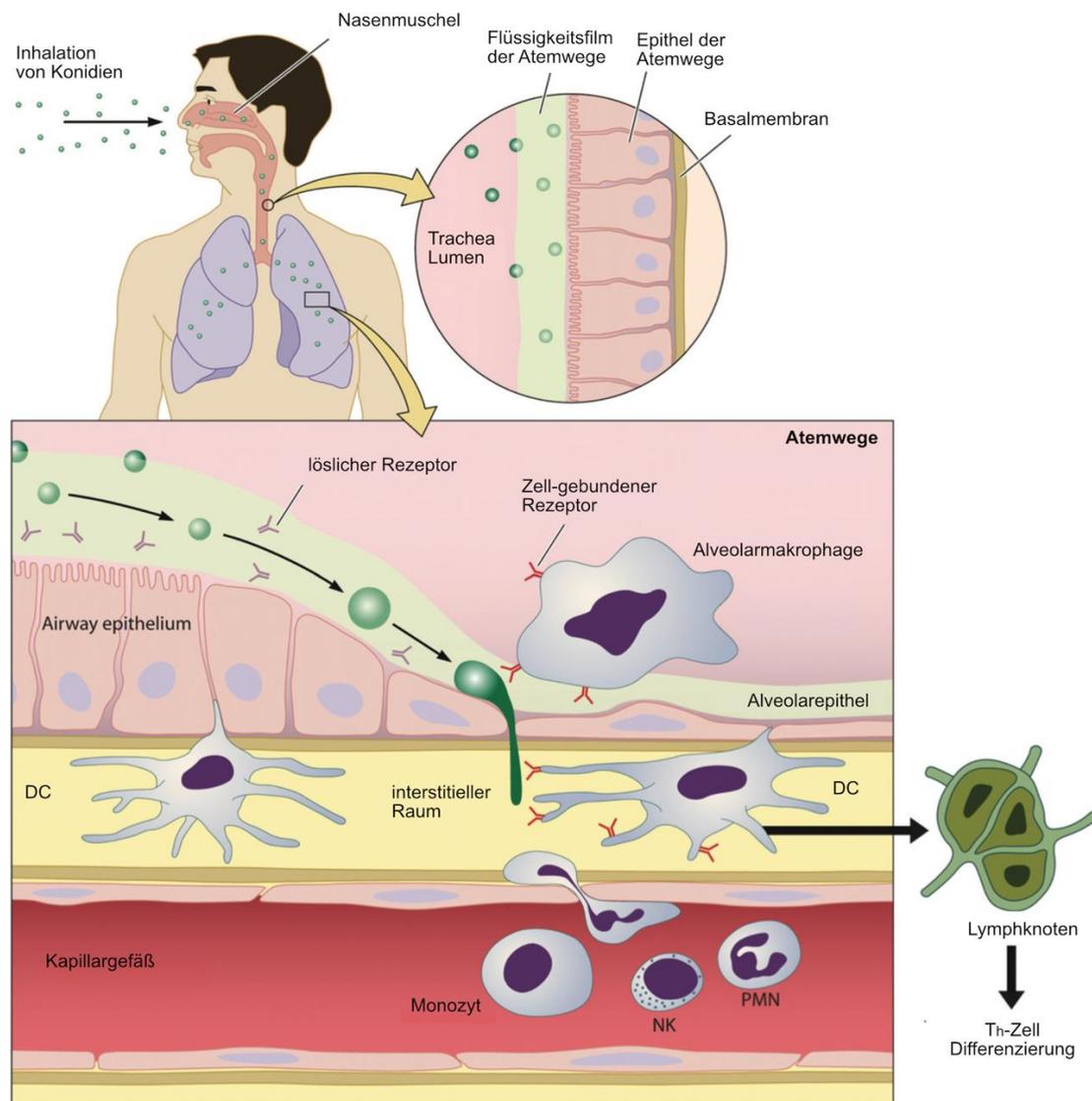


Abbildung 1.4: Alveoläre Abwehrreaktion durch das innate Immunsystem nach inhalativer Konidienaufnahme

Die Abbildung wurde aus Park et al. (2009) entnommen und modifiziert. Abkürzungen: DC: dendritische Zelle, NK: Natürliche Killerzelle; PMN: Polymorphkernige Leukozyten; T_H-Zelle: T-Helfer-Zelle (Park and Mehrad, 2009).

Damit allerdings eine direkte Immunantwort induziert werden kann, müssen die innatens Immunzellen eingedrungene Pathogene als fremd detektieren. Spezielle molekulare Muster ermöglichen dem innatens Immunsystem die Erkennung von vorhandenen Pathogenen. Viele Mikroorganismen besitzen sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), die von den innatens menschlichen Immunzellen über *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) erkannt werden (Akira et al., 2001, Anderson, 2000) (siehe Kapitel 1.5.3.). Die unterschiedlichen Zellwandbestandteile verschiedener Pilzspezies scheinen unterschiedliche PRRs zu aktivieren, die wiederum diverse Signalwege auslösen (Gil-Lamaignere et al., 2005) (siehe Kapitel 1.5.4.). Zudem existieren von den meisten Erregern verschiedene Morphotypen, die sich ebenso hinsichtlich der Immunogenität und Affinität zu den PRRs der innatens Immunzellen unterscheiden (Romani et al., 2002).

Nach Aktivierung der PRRs werden in den Phagozyten antimykotische Effektormechanismen induziert. Die Abwehr des Erregers erfolgt entweder durch Phagozytose oder durch die direkte Zerstörung des Pathogens. Hierbei wird zwischen dem oxidativen oder nicht-oxidativen Mechanismus unterschieden. Der oxidative Signalweg, auch als *Respiratory Burst* (oxidativer *Burst*) bekannt, nutzt beispielsweise die Nicotinamidadeninucleotid-phosphat-(NADPH-) Oxidase und die Stickstoffmonoxid-Synthase zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS schädigt die Zellwandstrukturen der Pilze über Proteinmodifikationen, Nukleinsäure-Abbrüche und Lipidperoxidationen (Mansour and Levitz, 2002). Demnach sind Menschen, die einen genetischen Mangel an NADPH-Oxidase aufweisen, empfänglicher für bakterielle oder mykotische Infektionen (Murphy et al., 2018). Der nicht-oxidative Signalweg besteht aus der Freisetzung von kationischen Peptiden wie den Defensinen und weiteren Effektormolekülen (Mansour and Levitz, 2002). Zeitgleich wird durch die Produktion von Chemokinen und Zytokinen (siehe Kapitel 1.5.2.) sowie durch professionelle antigenpräsentierende Zellen, die in Lymphknoten einwandern und infolgedessen die Proliferation von T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen) stimulieren, das adaptive Immunsystem aktiviert (Romani, 2004, Park and Mehrad, 2009) (siehe Abbildung 1.4).

Im Folgenden soll die spezifische Funktion der jeweiligen Immunzellen im Rahmen der innate Immunabwehr bei Pilzinfektionen näher beschrieben werden.

NK-Zellen stellen eine wichtige Zellpopulation bei der ersten Abwehr von Pilzinfektionen dar. Sie übernehmen eine regulatorische Rolle bei der direkten Immunantwort und induzieren eine Freisetzung von Zytotoxinen, welche für eine Eindämmung der Gewebsschädigung sorgen. Die Aktivität der NK-Zellen wird durch Makrophagen, DCs und T-Zellen sowie deren Zytokinfreisetzung gesteuert. Vor allem gelten die Zytokine Interleukin-12 (IL-12) und Interferon (INF) als Aktivatoren für NK-Zellen (Vivier et al., 2008). Die Rolle der NK-Zellen wurde auch im Rahmen von Mucormykosen näher untersucht. Hierbei konnten *R. arrhizus*-Hyphen eine Aktivierung der NK-Zellen auslösen und eine Schädigung durch Freisetzung von Perforinen induzieren. Im Gegensatz hierzu konnten Konidien keine NK-Zellen-Aktivierung hervorrufen (Schmidt et al., 2013).

Eine weitere unverzichtbare Zellpopulation der innate Immunabwehr stellen die neutrophilen Granulozyten dar, welche bei der Abwehr von Pilzen eine besonders wichtige Rolle spielen (siehe Kapitel 1.4.2.). Neutrophile reichern sich schnell in inflammatorischem Gewebe an und haben die stärkste phagozytotische Aktivität (Murphy et al., 2018). Neben der Fähigkeit zur Phagozytose und Freisetzung von ROS, setzen Neutrophile kationische Peptide frei. *Neutrophil cationic peptides* NP-1 und NP-2 sind dazu befähigt Keimschläuche von *R. arrhizus* effektiv abzutöten, nicht jedoch *R. arrhizus*-Konidien (Waldorf, 1989) (siehe Abbildung 1.5). Einen weiteren Abwehrmechanismus der neutrophilen Granulozyten stellt die Freisetzung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) dar. Dieser Mechanismus ermöglicht Neutrophilen das Festhalten von Mikroorganismen (Murphy et al., 2018) und inhibiert speziell bei Pilzinfektionen das Wachstum von Hyphen (McCormick et al., 2010). Die Relevanz Neutrophiler bei der Abwehr von invasiven Mykosen konnte durch mehrere Studien bestätigt werden. So wurde bei neutropenischen Patienten gegenüber nicht neutropenischen Patienten eine verstärkte Angioinvasion im Rahmen einer bestehenden Mucormykose festgestellt (Ben-

Ami et al., 2009). Durch weitere experimentelle Untersuchungen wurde gezeigt, dass Neutrophile in der Lage sind neben Konidien, auch Hyphen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* durch strukturelle Veränderungen der Hyphen-Formation zu zerstören (Diamond et al., 1978). Es wurde allerdings eine stärkere Resistenz von *Rhizopus spp.* gegenüber Phagozytose und Hyphenschädigung durch Neutrophile im Vergleich zu *A. fumigatus in vitro* nachgewiesen (Gil-Lamaignere et al., 2005, Chamilos et al., 2008a). Im *Drosophila melanogaster* Model, welches wichtige Aspekte einer Mucormykose im Menschen imitieren soll, wurden konforme Ergebnisse hinsichtlich erhöhter Resistenz von *R. arrhizus* im Vergleich zu *A. fumigatus* gegenüber Phagozytose und Hyphenschädigung beobachtet. Hierbei gelang es *R. arrhizus* im Gegensatz zu *A. fumigatus* innerhalb sehr kurzer Zeit immunkompetente *D. melanogaster* Fliegen zu infizieren und zu töten (Chamilos et al., 2008b). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Keimschläuche von *R. arrhizus* im Gegensatz zu Konidien eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten mit nachfolgender Inflammation induzieren (Pagano et al., 1997, Waldorf and Diamond, 1985).

Ein weiterer Zelltyp der innate Immunabwehr stellen Monozyten dar, welche während einer Infektion zur Differenzierung zu Makrophagen oder dendritischen Zellen im Stande sind. Bei einer Entzündung verlassen sie den Blutkreislauf und wandern in die Gewebe ein, sodass sie ab diesem Zeitpunkt die Funktion inflammatorischer Monozyten übernehmen und zur Produktion proinflammatorischer Zytokine dienen. 90 % der im Blut zirkulierenden Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche CD14-Antigene, welche wichtige Co-Rezeptoren für PRRs bei der Erkennung von Mucorales darstellen (siehe Kapitel 1.5.3.) (Murphy et al., 2018). Im Rahmen von Mucormykosen sind Makrophagen dazu befähigt Keimschläuche und Hyphen von *R. arrhizus* effektiv zu eliminieren. Im Gegensatz dazu wird bei *R. arrhizus*-Konidien lediglich die Entwicklung zu ausgekeimten Stadien unterbunden (Waldorf, 1989) (siehe Abbildung 1.5).

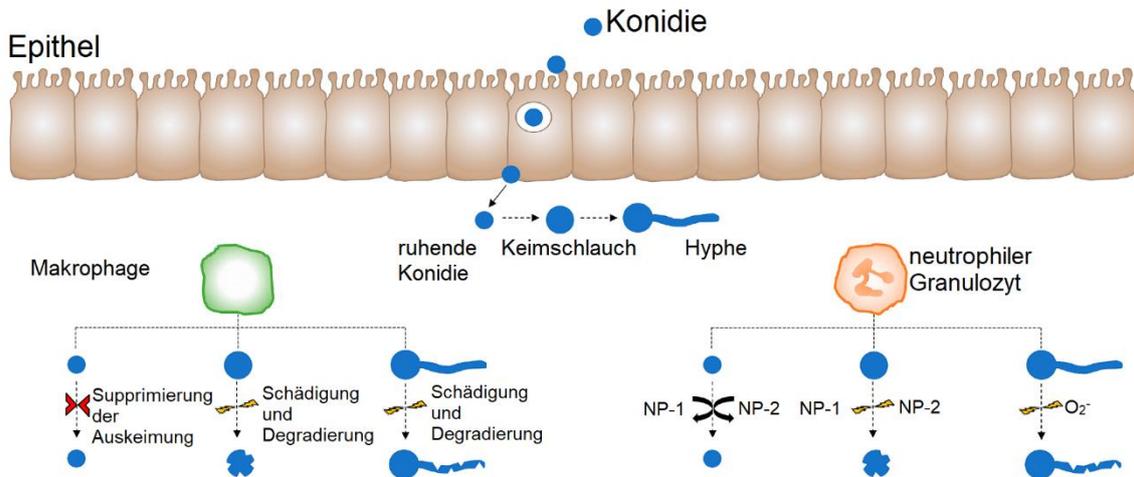


Abbildung 1.5: Morphotypabhängige Effektormechanismen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gegen Mucorales

Die Abbildung wurde aus Ghuman und Voelz (2017) entnommen und modifiziert (Ghuman and Voelz, 2017) und soll die Abwehrreaktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gegen verschiedene Morphotypen von Mucorales darstellen. Abkürzungen: NP: Neutrophil cationic peptide, O_2^- : reaktive Sauerstoffspezies

DCs stellen neben den Monozyten eine weitere Population mononukleärer Zellen dar, die an der direkten Immunabwehr von Pilzen beteiligt ist (Lothar et al., 2014). DCs sind sowohl für das innate als auch das adaptive Immunsystem von enormer Bedeutung (Leon et al., 2005). Durch Pathogenkontakt reifen DCs zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) heran und können naive T-Zellen aktivieren und zu deren Differenzierung zu verschiedenen T-Helferzellen (T_{h1} -, T_{h2} -, T_{h17} -, T_{reg} -Zellen) beitragen (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Diese maturierten T-Zellen sezernieren daraufhin eine Reihe an Zytokinen, welche die jeweilige Zytokinsekretion der innaten Immunzellen in einem weiteren positiven Feedbackmechanismus verstärken. Auf diese Weise stellen DCs die Schnittstelle zwischen innatem und adaptivem Immunsystem dar (Murphy et al., 2018). Innerhalb der Zellpopulation der DCs wird zwischen verschiedenen Subtypen differenziert, welche Unterschiede in der Phagozytoseaktivität sowie der Expression ihrer Oberflächenmoleküle, inklusive PRRs, aufweisen.

Die größten DC-Subgruppen repräsentieren die *myeloid dendritic cells* (mDCs), die *plasmacytoid dendritic cells* (pDCs) sowie die *monocyte-derived dendritic cells* (moDCs), welche sich aus Monozyten entwickeln. mDCs und pDCs sind nur in sehr geringen Mengen im Blut vorhanden, weshalb sich für experimentelle *in vitro*-Studien moDCs besonders gut eignen, da sie in großen Mengen aus Monozyten, welche aus humanem Vollblut gewonnen werden, durch standardisierte Protokolle hergestellt werden können. Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Arbeit die moDC-Mucorales-Interaktion experimentell untersucht.

Die Interaktion zwischen DCs und *Aspergillus* wurde bereits in mehreren Studien beschrieben. Hierbei wurde festgestellt, dass pulmonale DCs und moDCs durch Phagozytose von *Aspergillus*-Konidien und -Hyphen maturieren und folglich T_H-1-Zellen des adaptiven Immunsystems aktivieren (Bozza et al., 2002). Weitere Studien konnten eine Induktion proinflammatorischer Zytokine durch moDCs nach Kontakt mit *Aspergillus* beobachten (Mezger et al., 2008, Morton et al., 2011).

Gleichwohl die Interaktion zwischen Mucorales und DCs im Vergleich zu anderen innatens Immunzellen bislang wenig erforscht wurde, konnte in einer *in vitro* Studie gezeigt werden, dass durch *R. arrhizus*-Konidien keine DC-Aktivierung ausgelöst wurde. Im Gegensatz dazu bewirkten Hyphen von *R. arrhizus* eine starke proinflammatorische Freisetzung von Zytokinen (IL-23 und Tumornekrosefaktor- α , TNF- α) in DCs, was zur Einleitung der adaptiven Immunantwort führte. Ähnlich der Abwehrfunktion von Neutrophilen und Makrophagen gegenüber Mucorales ist auch die Immunantwort der DCs abhängig vom Mucorales-Morphotypen (Chamilos et al., 2010). Eine schematische Darstellung hierzu bietet die Abbildung 1.6.

Die beschriebenen Mechanismen der innatens Immunabwehr sorgen für eine direkte Elimination der eingedrungenen Pilzpathogene innerhalb kürzester Zeit, so dass keine wahrnehmbare Erkrankung des Wirtes zustande kommt. Im Falle, dass sich auf Grund der nicht ausreichend wirksamen Mechanismen der innatens Immunantwort eine manifeste Infektion entwickelt, werden spezifischere Mechanismen des adaptiven Immunsystems eingeleitet. Die durch DCs aktivierte

adaptive T-Zell-Immunantwort lässt sich in den protektiven T_h -1-Typ und den nicht protektiven T_h -2-Typ unterteilen. Die Typ-1-Antwort besteht aus der Induktion proinflammatorischer Zytokine wie $TNF-\alpha$ und $INF-\gamma$, die Makrophagen und zytotoxische T-Zellen aktivieren und somit die Erregerelimination begünstigen (Morton et al., 2012). Die Typ-2-Antwort hingegen sorgt durch Herabregulierung der Typ-1-spezifischen Zytokine für eine Eindämmung der proinflammatorischen Immunantwort. Auf diese Weise wird eine Balance geschaffen zwischen antimykotischen Abwehrmechanismen und den übermäßig-inflammatorischen Prozessen, die zu einer fortschreitenden Gewebedestruktion führen (Akira et al., 2001, Romani, 2004, Mencacci et al., 2000). T_h 17-Zellen sind durch die IL-17-Produktion charakterisiert und verstärken die Immunreaktion der Neutrophilen (Murphy et al., 2018). Die T_h -17-Antwort wird vor allem durch IL-23-Produktion induziert (Chamilos et al., 2010). T_{reg} -Zellen dämmen ebenso die exzessive inflammatorische Antwort ein und unterstützen die Entwicklung von T-Gedächtniszellen zum dauerhaften Schutz des Organismus gegenüber Pilzpathogenen (Murphy et al., 2018).

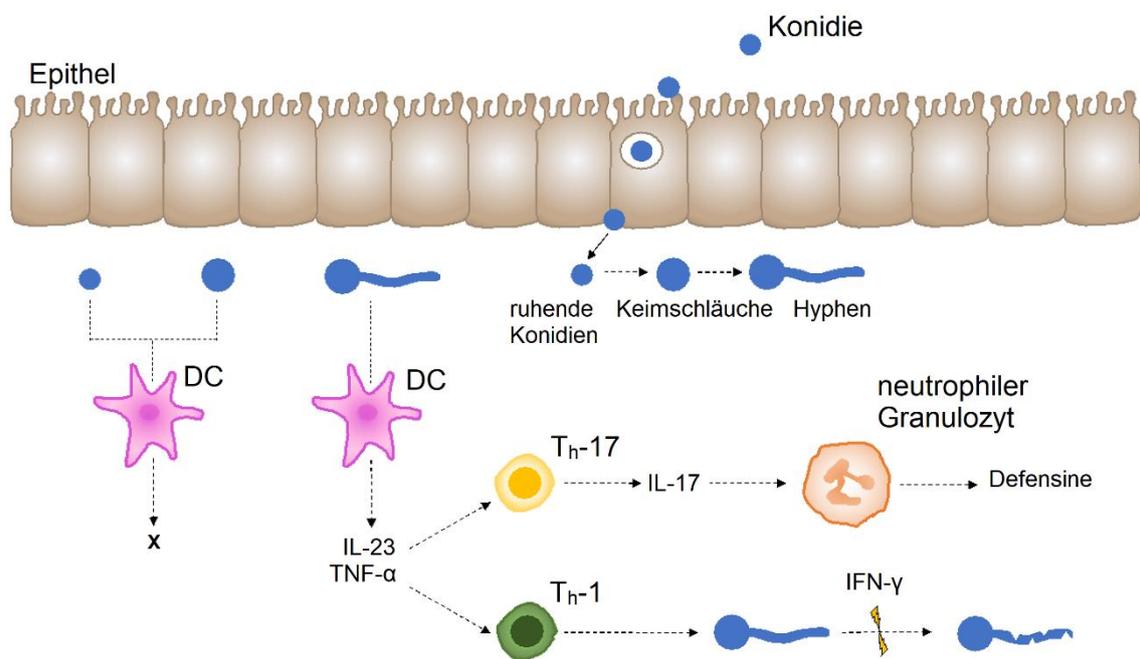


Abbildung 1.6: Morphotypabhängige Immunantwort dendritischer Zellen gegen Mucorales
 Die Abbildung wurde aus Ghuman und Voelz (2017) entnommen und modifiziert (Ghuman and Voelz, 2017) und soll die Immunantwort dendritischer Zellen auf verschieden Morphotypen von Mucorales schematisch darstellen.

1.5.2. Bedeutung von Zytokinen im Rahmen von Pilzinfektionen

Zytokine sind regulatorische Proteine, die von Leukozyten und teilweise auch von anderen Zellen des menschlichen Körpers ausgeschüttet werden und abhängig von ihrer Halbwertszeit und der Fähigkeit in den Blutkreislauf zu gelangen, autokrin, parakrin oder endokrin wirken können. Sie sind für die Signalübertragung zur Effektorzelle verantwortlich und regulieren auf diese Weise Wachstum, Differenzierung und Aktivität von Zielzellen. Es wird zwischen einer Vielzahl an Zytokinen unterschieden, die sich in folgende Familien untergliedern lassen: Chemokine, Interleukine (IL), Interferone (INF), Tumornekrosefaktoren (TNF) und Hämatoetine, denen die koloniestimulierenden Faktoren wie beispielsweise Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) aber auch IL-6 angehören.

Chemokine sind ebenso regulatorische Proteine, die Effektorzellen wie neutrophile Granulozyten oder Monozyten zu Infektionsherden attrahieren (Murphy et al., 2018).

Nachfolgend werden ausgewählte Vertreter der Zytokine, deren Expression und Freisetzung im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit analysiert wurden, näher beschrieben.

IL-1 β ist ein klassisches proinflammatorisches Zytokin, welches auch bei der Abwehr von Pilzinfektion eine bedeutende Rolle einnimmt. IL-1 β wird von Makrophagen und Epithelzellen produziert. Es aktiviert das Endothel von Blutgefäßen und sorgt dafür, dass Effektorzellen verstärkt wirken können, indem sie den Blutkreislauf verlassen und in die Gewebe eindringen. Zusätzlich sorgt es für die Aktivierung von T₁₇-Zellen des adaptiven Immunsystems und induziert darüber hinaus Fieber (Rivest et al., 2000).

In einer vitro Studie konnte eine Induktion von IL-1 β in Alveolarmakrophagen und Monozyten nach Kontakt mit *Aspergillus*-Konidien und -Hyphen nachgewiesen werden (Warris et al., 2005).

TNF- α wird hauptsächlich von Zellen der myeloischen Reihe (Monozyten, Makrophagen, DCs und Neutrophile) sezerniert (Park and Mehrad, 2009) und

aktiviert ebenfalls das Gefäßendothel. Es steigert dessen Durchlässigkeit, was zu einem Zustrom von Immunglobulinen und Komplement und zugleich zu einem vermehrten Abstrom von Flüssigkeit zu den Lymphknoten führt. Systemisch werden durch TNF- α Fieber und Schock hervorgerufen (Murphy et al., 2018). Des Weiteren sorgt TNF- α für eine Induktion der T_h-1-Antwort (Xu et al., 2016).

Im Rahmen von Aspergillosen wurde sowohl in humanen Monozyten als auch in murinen Makrophagen nach Kontakt mit *Aspergillus*-Konidien eine vermehrte Produktion von TNF- α induziert (Netea et al., 2003, Wang et al., 2001). Durch Studien im Mausmodell wurde erkenntlich, dass die durch *A. fumigatus* ausgelöste Zytokinsekretion von TNF- α und IL-10 von der Art der in den Versuchsmäusen angewandten Immunsuppression abhängig zu sein scheint (Balloy et al., 2005). Darüber hinaus steigert TNF- α die Fähigkeit Neutrophiler zur *Aspergillus*-Hyphenschädigung (Roilides et al., 1998).

Im Zusammenhang mit Mucormykosen konnte den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β eine ebenso bedeutende Rolle bei der innate Immunantwort zugewiesen werden. In Neutrophilen wurde nach Kontakt mit *R. arrhizus*-Hyphen eine verstärkte relative Expression von TNF- α und IL-1 β beobachtet (Simitsopoulou et al., 2010, Gil-Lamaignere et al., 2005, Chamilos et al., 2008a). Es ist fraglich ob, die Freisetzung dieser proinflammatorischen Zytokine auch bei den Abwehrmechanismen mononukleärer Zellen des innate Immunsystems gegen Mucorales zum Tragen kommen.

1.5.3. Bedeutung von PRRs innater Immunzellen bei der Abwehr von Pilzen

Die Erkennung von Pathogenen geschieht über ein sehr komplexes System an Rezeptoren. Menschliche innate Immunzellen exprimieren PRRs, welche in der Lage sind PAMPs verschiedener Mikroorganismen zu erkennen und infolgedessen über Adaptermoleküle und Transkriptionsfaktoren eine Immunantwort einzuleiten (Murphy et al., 2018), deren Art und Ausprägung vom Zelltyp und den involvierten Signalwegen abhängen. Bei den PAMPs handelt es sich um spezifische Struktur motive. Dazu gehören Zuckerpolymer an der Oberfläche von Pilzen wie Chitine, Mannane oder β -D-Glukane,

Zellwandbestandteile von Bakterien wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptide oder Nucleinsäuren von Viren und Bakterien. Zu den PRRs zählen die Familie der *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), der C-Typ und der S-Typ Lektinrezeptoren. Diese Rezeptoren werden hauptsächlich auf Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert (Netea et al., 2008).

Die Entdeckung der Toll-Rezeptoren erfolgte am *Drosophila*-Fliegenmodell. Durch experimentelle Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Toll-Rezeptoren bei der Abwehr von Pilzpathogenen eine besondere Rolle einnehmen. Es stellte sich heraus, dass Toll-defiziente Fliegen empfänglicher für invasive Aspergillosen und Mucormykosen waren (Chamilos et al., 2008b). Später wurden auf menschlichen innatenn Immunzellen den Toll-Rezeptoren sehr ähnliche Rezeptoren, die Toll-Like-Rezeptoren, identifiziert (Murphy et al., 2018). *Toll-like-Rezeptoren* gehören der Klasse der Typ-I-Transmembranproteine an (Medzhitov et al., 1997). Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Pilze. Auf menschlichen Zellen wird zwischen zehn verschiedenen TLR-Arten differenziert, deren Expression sich abhängig vom Zelltyp unterschiedlich stark präsentiert (Murphy et al., 2018). Welcher TLR stimuliert wird und eine Immunantwort einleitet, hängt von der Pilzspezies, dem Morphotypen und dem Infektionsweg ab (Romani, 2004).

TLR2 konnte im humanen peripheren Blut auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, und DCs nachgewiesen werden, wobei in einer Studie eine stärkere Expression von sowohl TLR2 als auch TLR4 auf Monozyten im Vergleich zu Neutrophilen des gleichen Spenders festgestellt wurde (Kurt-Jones et al., 2002, Murphy et al., 2018). TLR2 stellt einen wichtigen Rezeptor für grampositive Bakterien, Peptidoglykane, Zymosane sowie für mykobakterielle Ara-lipoarabinomannane dar (Murphy et al., 2018). Es konnte eine Beteiligung von TLR2 an der Erkennung von Pilzpathogenen festgestellt werden. Jedoch scheint die proinflammatorische Immunantwort in Form einer TNF- α - und IL-1 β -Sekretion durch TLR2-Stimulation schwächer auszufallen als die durch TLR4-aktivierte eingeleitete Immunantwort. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die

Aktivierung von TLR2-Signalwegen eher zu einer T_h2- und T_{reg}-Immunantwort führt (Sutmoller et al., 2006, Netea et al., 2004).

TLR4 wird auf der Oberfläche von Neutrophilen, Makrophagen und DCs exprimiert und wird vor allem durch Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien aber auch durch Lipoteichonsäuren grampositiver Bakterien aktiviert (Murphy et al., 2018). Um LPS zu erkennen, benötigt TLR4 zusätzlich das akzessorische Protein MD-2. Im Rahmen einer Infektion kann sich LPS von der Oberfläche gramnegativer Bakterien ablösen und wird im Folgenden durch ein LPS-bindendes Protein auf das Oberflächen-Protein CD14 übertragen. CD14 befindet sich auf der Oberfläche von Neutrophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen und wird auf diese Weise ebenso zum akzessorischen Protein von TLR4 (Murphy et al., 2018). Darüber hinaus spielt TLR4 eine ebenso bedeutende Rolle bei der Immunabwehr von Pilzen, indem es Mannan-Strukturen der Pilzoberfläche erkennt und folglich eine Immunantwort einleitet. Durch eine TLR4 induzierte Immunantwort werden neben TNF- α und IL-1 β auch vermehrt Zytokine wie INF- γ und IL-12 produziert (Hirschfeld et al., 2001), welche den protektiven T_h-1-Schenkel des adaptiven Immunsystems aktivieren (Re and Strominger, 2001, O'Neill, 2002).

Neben den TLRs, stellt die Familie der Lektin-Rezeptoren eine wichtige Gruppe von PRRs zur Erkennung humanpathogener Erreger dar. Hierzu gehört unter anderem der C-Typ Lektin-Rezeptor (CLR) Dectin-1, auch bekannt als *C-type lectin domain family 7 member A* (CLEC7A), welcher als Hauptrezeptor für β -Glukane fungiert und ebenso die Produktion von Zytokinen und Chemokinen induziert. Dectin-1 wird auf Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und DCs exprimiert (Taylor et al., 2002). Im Vergleich zu Makrophagen wurde eine stärkere Expression der Dectin-1-Rezeptoren auf DCs nachgewiesen. Darüber hinaus unterstützen Dectin-1-Rezeptoren die Funktion von auf Makrophagen und dendritischen Zellen befindlichen TLR2, die mit β -Glukanen in Kontakt treten, und verstärken die ausgelöste Zytokinantwort (Gantner et al., 2003).

Die Expression von PRRs auf innate Immunzellen ist keinesfalls konstant. Interessanterweise können Zytokine Einfluss auf die Expression der PRRs

nehmen. In einer Studie konnte die Auswirkung von GM-CSF, einem Zytokin der Hämatopoetinfamilie, auf die Expression verschiedener TLRs gezeigt werden. Durch die Gabe von GM-CSF konnte ein deutlicher Anstieg der Expression von TLR2 auf Neutrophilen beobachtet werden, wohingegen die Expression von TLR4 konstant niedrig blieb. Bei Monozyten zeigte sich ein schwächerer Effekt; beide Rezeptoren konnten nur leicht vermehrt exprimiert werden (Kurt-Jones et al., 2002).

Im Rahmen invasiver Pilzmykosen, konnte bereits zum Teil die spezifische Rolle der an der Pilzerkennung beteiligten PRRs herausgestellt werden. Bislang wurden vor allem Erkenntnisse über die Rolle der PRRs bei der Erkennung von *A. fumigatus* gewonnen. Mehrere Studien berichteten über die Relevanz von TLR2 und TLR4 bei der Detektion und Abwehr von *Aspergillus* ssp. (Bellocchio et al., 2004, Wang et al., 2001, Mambula et al., 2002, Netea et al., 2003). In murinen Makrophagen zeigte sich nach *Aspergillus*-Kontakt eine morphotypabhängige Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Eine erhöhte Sekretion von TNF- α und IL-1 β erzielten *Aspergillus*-Konidien durch die Stimulation von TLR2 und TLR4, wohingegen *Aspergillus*-Hyphen im Rahmen ihrer Auskeimung die Fähigkeit zur TLR4-Stimulation verloren und lediglich TLR2 stimulierten (Netea et al., 2003). Ähnlich groß scheint die Relevanz von TLR2 bei der Erkennung von *A. fumigatus* durch humane *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs, mononukleäre Zellpopulation bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und DCs) zu sein. Hierbei zeigte sich nach Blockade des TLR4 von PBMCs keine verminderte Zytokinfreisetzung weder nach Stimulation mit Konidien noch mit Hyphen von *A. fumigatus*. Im Gegensatz hierzu konnte durch die Blockade von TLR2 auf humanen PBMC nach Stimulation mit *Aspergillus*-Konidien und -Hyphen eine stark reduzierte Zytokinfreisetzung festgestellt werden (Netea et al., 2003). Des Weiteren wurde in murinen moDCs durch Stimulation mit *A. fumigatus*-Hyphen ebenfalls eine TLR2-abhängige Zytokinfreisetzung beobachtet (Braedel et al., 2004). Durch experimentelle Untersuchung der moDCs-*Aspergillus*-Interaktion wurde eine Hochregulierung von TLR2, TLR4 und Dectin-1 in moDCs nach Kontakt mit *Aspergillus* festgestellt (Lothar et al., 2014). Darüber hinaus wurde bereits in moDCs durch Inhibition des

β -Glukan-Rezeptors, Dectin-1, eine Reduktion der proinflammatorischen Antwort nach *Aspergillus*-Kontakt beobachtet (Mezger et al., 2008).

Im Hinblick auf die zunehmende Relevanz von Mucormykosen, sollte die Interaktion zwischen Mucorales und innate Immunzellen ebenso gezielt untersucht werden. Bisher wurde in nur wenigen Studien über PRRs berichtet, die an der Erkennung von Mucorales beteiligt sind. Es konnte bereits demonstriert werden, dass Hyphen von *R. arrhizus* eine vermehrte Expression von TLR2 an der Oberfläche von Neutrophilen induzieren (Chamilos et al., 2008a). Für die DC-Aktivierung scheinen ebenso β -Glukane von Mucorales von enormer Bedeutung zu sein. Einer Studie zufolge konnte durch Blockade des Dectin-1-Rezeptors, eine komplette Inhibierung der IL-23-Sekretion durch DCs beobachtet werden, was auf eine Dectin-1-abhängige Immunantwort schließen lässt (Chamilos et al., 2010). Allerdings ist die Involvement verschiedener PRRs in die Detektion von Mucorales derzeit noch nicht vollkommen ersichtlich. Es ist unklar, ob TLR2 bzw. TLR4 auch auf anderen innate Immunzellen bei der Mucorales-Erkennung eine Rolle spielen und, ob deren Aktivierung morphotypabhängig geschieht. Ebenso ist fraglich, inwiefern Dectin-1 fernab der DC-Immunabwehr an der Erkennung von Mucorales beteiligt ist und, ob die Aktivierung des Rezeptors ebenfalls morphotypabhängig erfolgt.

1.5.4. Durch aktivierte PRRs eingeleitete Signalwege

Die durch PAMPs stimulierten PRRs lösen verschiedene Signalwege aus, die zur Aktivierung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren und letztendlich zu einer Immunantwort in Form einer Zytokinfreisetzung und hierdurch auch zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen. Stimulierte TLR2 und TLR4 treten mit *myeloid differentiation 88* (MyD88), einem Adaptermolekül, welches für die Signalübertragung zuständig ist, in Kontakt. Hierbei wird zwischen einem MyD88-abhängigen oder -unabhängigen Signalweg unterschieden. Zumeist wird über den MyD88-abhängigen Signalweg der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) aktiviert, der wiederum die Produktion proinflammatorischer Zytokine, insbesondere TNF- α stimuliert. Die Relevanz von TLR2, TLR4 und des

Adaptermoleküls MyD88 für die Abwehr von Pilzinfektionen, zeigte sich im Mausmodell durch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Aspergillosen bei TLR2-, TLR4- oder MyD88-defizienten Mäusen im Gegensatz zu *Wild-Type* Mäusen. Darüber hinaus wurde in MyD88-defizienten Mäusen eine stark verminderte TNF- α -Sekretion beobachtet, was auf eine MyD88-abhängige TNF- α -Produktion schließen lässt (Bellocchio et al., 2004).

Die durch Stimulation von Dectin-1 ausgelöste Signalkaskade erfolgt über den Src/Syk-Kinase/CARD9 (Src/Spleen tyrosine kinase/Caspaserekrutierungsdomäne9) Signalweg, der sowohl den kanonischen als auch den nicht-kanonischen NF- κ B Signaltransduktionsweg (Gringhuis et al., 2009) sowie den Transkriptionsfaktor nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) aktiviert. Durch den Syk-abhängigen Signalweg kann Dectin-1 die Proteinkinase Raf-1 aktivieren, die den kanonischen NF- κ B Signaltransduktionsweg induziert und den nicht-kanonischen hemmt. Der nicht-kanonische Signalweg würde andernfalls den NF- κ B Signaltransduktionsweg hemmen. Der kanonische NF- κ B Signaltransduktionsweg führt über eine Ausschüttung von TNF- α und IL-1 β zur Aktivierung von protektiven T_h1- und T_h17-Zellen des adaptiven Immunsystems. Zusätzlich konnte eine Interaktion zwischen der Familie der TLR und C-Typ Lektine festgestellt werden. Dectin-1 ist fähig über den Syk-Signalweg die MyD88-gekoppelten TLRs zu unterstützen und führt zu einer verstärkten Zytokininduktion (Ferwerda et al., 2008, Dennehy et al., 2008). In Studien konnte festgestellt werden, dass Gendefekte von Dectin-1 und CARD9 mit einer erhöhten klinischen Prädisposition für invasive Mykosen einhergehen (Ferwerda et al., 2009, Glocker et al., 2009). Abbildung 1.7 veranschaulicht die Signalwege, die nach Stimulation der PRRs durch Kontakt mit den PAMPs der Pilze eingeleitet werden (Bourgeois et al., 2010).

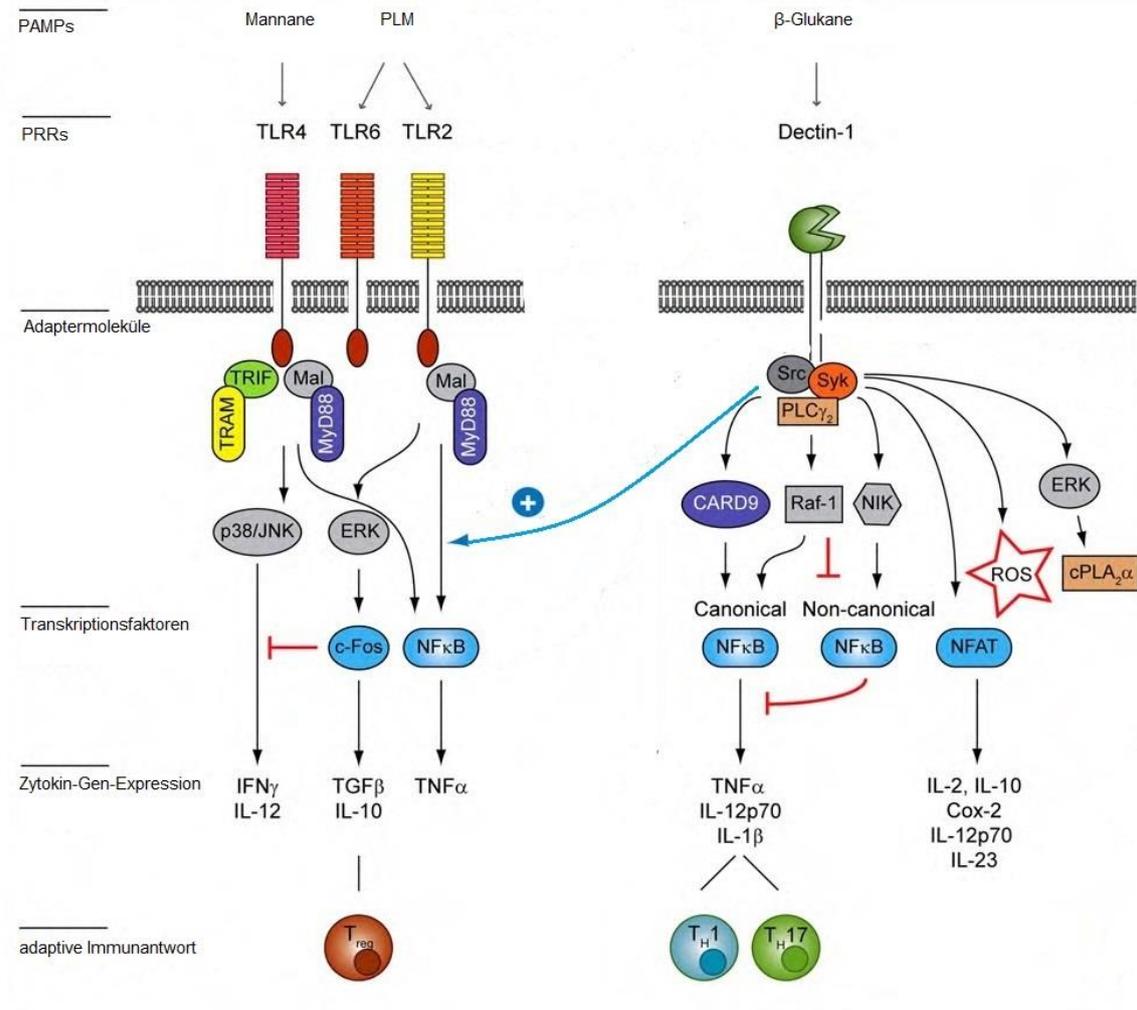


Abbildung 1.7: Signalkaskade der PRRs nach Aktivierung durch fungale Stimuli

Die Abbildung wurde modifiziert übernommen aus Bourgeois et al. (2010). Dargestellt sind die Signalwege zur Einleitung einer Immunantwort über Stimulation der verschiedenen PRRs durch PAMPs. Abkürzungen: PLM: Phospholipomannan, ROS: reaktive Sauerstoffspezies (Bourgeois et al., 2010, van de Veerdonk et al., 2008).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Durch die steigende Inzidenz der Mucormykosen während der letzten Jahre, gewinnt die schwerwiegende Erkrankung in der Klinik stetig an Bedeutung (Bitar et al., 2009, Rees et al., 1998, Torres-Narbona et al., 2007, Saegeman et al., 2010, Kontoyiannis et al., 2000). Derzeit wird eine durch Mucorales hervorgerufene lebensbedrohliche Infektion noch in vielen Fällen verkannt oder mit einer häufiger vorkommenden Aspergillose verwechselt, was die rasche Therapieeinleitung verhindert und zu einer erhöhten Letalität führt (Chamilos et al., 2008c).

Gemessen an der klinischen Bedeutung ist derzeit das Verständnis über die Immunpathologie von Mucormykosen wenig ausgeprägt. Um die Diagnostik einer Mucormykose zu erleichtern, therapeutische Fortschritte zu erzielen und relevante Mutationen in den Signalwegen herauszustellen, die als prädisponierende Risikofaktoren für Mucormykosen gelten, ist es unabdingbar zu verstehen, wie Mucorales vom menschlichen Immunsystem detektiert wird und welche Signalwege eingeleitet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die morphotypabhängige innate Immunreaktion gegen *R. arrhizus* genauer untersucht, mit der Zielsetzung folgenden Fragen auf den Grund zu gehen:

Sind die auf der Oberfläche innater Immunzellen befindlichen TLR2-, TLR4- und Dectin-1-Rezeptoren bei der Erkennung von *R. arrhizus* relevant?

Existieren Unterschiede zwischen der Relevanz der PRRs für einzelne Morphotypen von *R. arrhizus* im direkten Vergleich mit *A. fumigatus*?

Wie unterscheiden sich mononukleäre von polynukleären Zelltypen bei der Immunreaktion gegen *R. arrhizus*?

Um diese Fragestellungen experimentell zu untersuchen, wurden Versuche mit von gesunden Spendern gewonnenen neutrophilen Granulozyten, PBMCs, Monozyten und moDCs durchgeführt. Hierzu wurden die auf den Immunzellen befindlichen PRRs blockiert oder durch Gen-*Knockdown* ausgeschaltet. Nach

Kokultivierung der Immunzellen mit verschiedenen Morphotypen von *R. arrhizus* konnte die Immunantwort auf unterschiedliche Art und Weise gemessen werden.

2. MATERIAL UND GERÄTE

2.1. Material zur Blutentnahme

Cutasept F Haut-Desinfiziens	BODE Chemie
Gazin Mullkompressen	Lohmann und Rauscher
Leukomed Wundverband	BSN medical
Multi-Adapter	Sarstedt
Stauschlauch	Megro
S-Monovette 9 ml K3E t	Sarstedt
Venofix Safety 19G	B. Braun Melsungen AG

2.2. Reaktionsgefäße

Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 20 ml	Falcon
Reaktionsgefäß 50 ml	Falcon
Polystyrene Round-Bottom Tubes 5 ml	Falcon
6-Well-Plate	Greiner
12-Well-Plate	Greiner
24-Well-Plate	Greiner
96-Well-Plate	Greiner
96-Well-Plate PCR	Sarstedt

2.3. Biochemisches und molekularbiologisches Equipment

DNA / RNA UV-Cleaner UVC / T-AR	Biosan
FACS Calibur	Becton Dickinson
Heraeus Multifuge 3 S	Thermo Scientific
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr
QuadroMACS™	Miltenyi Biotec
Mikroliterpipetten Reference	Eppendorf
Mikroliterpipetten Research Plus	Eppendorf
Microplate TECAN ELISA Reader	Tecan
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies Inc.
Real Time-PCR-Cycler Step-One plus	Applied Biosciences
Sterilwerkbank Hera-safe KS18	Kendro
Sterilwerkbank MSC Advantage	Thermo Scientific
Tecan Plate Reader, XFluor Programm	Tecan
UV-Transilluminator Multi Image Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Vortex Gene 2	Scientific Industries

2.4. Materialien zur Kultur und Inaktivierung von Pilzen

Bierwürzplatten	Institut für Hygiene und Mikrobiologie
Cell Strainer 40 µm Nylon	Falcon
Ethanol	Sigma-Aldrich
Schüttler Certomat H	Braun
Wattestäbchen steril	Applimed SA

In den folgenden Experimenten wurde der *A. fumigatus*- Stamm #B015 sowie der *R. arrhizus*-Stamm #B149 verwendet. Beide Pilzspezies wurden von dem *Centraalbureau Voor Schimmelcultures* (CBS, Utrecht) durch das (IHM) der Universität Würzburg bezogen.

Spezies	CBS-Nummer	IMH-Nummer
<i>Aspergillus fumigatus</i>	192.65	B015
<i>Rhizopus arrhizus</i>	110.17	B149

2.5. Reagenzien und Materialien zur Isolation und Kultur von humanen Immunzellen

Biocoll Separating Solution, 1,077 g/ml	Biochrom
CD14 Microbeads, human (# 130-050-201)	Miltenyi Biotec
EDTA	Sigma-Aldrich
Erythrocyte lysis buffer (Erythrozyten- Lysepuffer)	Qiagen
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
GM-CSF	Sanofi Oncology
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
Interleukin-4	Miltenyi Biotec
LS-Säulen (# 130-042-401)	Miltenyi Biotec
Polymorph Prep	Axis Shield
Gentamicin (Refobacin®)	Merck Serono
RPMI-Medium 1640 + Glutamax	Gibco
Trypanblau	Fluka

2.6. Reagenzien zur Blockade oder Stimulation von PRR

LPS-EK Ultrapure (# LKP-36-01)	InvivoGen
Pam3CSK4 (# PMS-36-02)	InvivoGen
Zymosan <i>depleted</i> (# DZN-36-01)	InvivoGen
Anti-hTLR4-IgG (# T4G-36-01)	InvivoGen
Anti-hTLR2-IgA (# AA2-36-01)	InvivoGen
Anti-hDectin-1/CLEC7A-IgG (# VAP0213111)	R & D Systems

2.7. Reagenzien siRNA-Experimente

Hs_CLEC7A_1 siRNA	Qiagen
Negative-Control siRNA	Qiagen
HiPerFect® Transfection Reagent	Qiagen

2.8. Reagenzien zur Untersuchung der ROS-Freisetzung

Dichlorodihydrofluorescein (DCF)	Sigma Aldrich
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich
RPMI-Medium 1640 + Glutamax	Gibco

2.9. Reagenzien für die Durchflusszytometrie

anti-CD15-APC (# 130-091-371)	Miltenyi Biotec
FACS Clean	Becton Dickinson
FACS Flow	Becton Dickinson
FACS Rinse	Becton Dickinson
green fluorescent protein-(GFP)	ThermoFisher
Fluorescein isothiocyanat (FITC)	Sigma Aldrich

2.10. Reagenzien und Kits für Arbeiten mit Nukleinsäuren

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
iTaq™ Universal SYBR Green Supermix	Biorad
Nuklease-freies Wasser	Qiagen
RNA Protect Cell Reagent	Qiagen
RNeasy Mini Kit <ul style="list-style-type: none"> • RPE-Puffer • RLT-Puffer • RW1-Puffer 	Qiagen
SYBR Green Supermix	Biorad

2.11. Oligonukleotide für die RT-qPCR

Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
ALAS1	ALAS1fw1	GGC AGC ACA GAT GAA TCA GA
	ALAS1rv1	CCT CCA TCG GTT TTC ACA CT
IL-1 β	IL1Bfw1	GGA CAA GCT GAG GAA GAT GC
	IL1Brv1	TCG TTA TCC CAT GTG TCG AA
TNF- α	TNFfw1	TGC TTG TTC CTC AGC CTC TT
	TNFrv1	TGG GCT ACA GGC TTG TCA CT

2.12. Reagenzien für ELISA-Analysen

<p>Human TNFα ELISA Max Deluxe</p> <ul style="list-style-type: none"> • Assay Diluent A • Avidin Meerettich Peroxidase • Human TNF-α ELISA MAX Detection Antibody 200X • Substrat Solution A/B • TMB Substrat Solution • TNF-α Capture Antibody 	Biologend
<p>Human IL-1β ELISA Max Deluxe</p> <ul style="list-style-type: none"> • Assay Diluent A • Avidin Meerettich Peroxidase • IL-1β Capture Antibody • Mouse IL-1β ELISA MAXTM Detection Antibody 200X • Substrat Solution A/B • TMB Substrat Solution 	Biologend
PBS (Phosphat-Buffered Saline)	PAN Biotech
Tween-20	Sigma-Aldrich

3. METHODEN

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Kultur von Pilz-Isolaten

Isolate von *A. fumigatus* sowie *R. arrhizus* wurden mit sterilen Watteträgern auf Bierwürz-Agar-Platten ausgestrichen. Im Anschluss fand eine Inkubation bei 35 °C für circa 6 bis 8 Tage für *R. arrhizus* statt und 4 Tage für *A. fumigatus* statt, bis die Agarplatte dicht mit Myzel bewachsen war.

3.1.2. Gewinnung von Konidien

Mit einem angefeuchteten sterilen Watteträger wurde über die bewachsene Platte gestrichen, so dass im Anschluss die Konidien aus den *R. arrhizus*- und *A. fumigatus*-Kulturen in destilliertem Wasser suspendiert werden konnten. Die Konidienlösung wurde durch einen *Cell Strainer* mit einer Maschenweite von 40 µm passiert und im Anschluss konnte die Quantifizierung der in der Lösung befindlichen Konidien mittels Hämocytometer stattfinden.

3.1.3. Gewinnung von Keimschläuchen

0,5 – 1 x 10⁸ Konidien der Spezies *A. fumigatus* und *R. arrhizus* wurden in 20 ml RPMI-Medium 12 bis 14 h bei einer Schüttelfrequenz von 200 rpm in 50 ml Reaktionsgefäßen bei 22 °C inkubiert. Um im Anschluss vorhandene Myzelanteile zu eliminieren, wurde die Suspension durch einen 40 µl *Cell Strainer* passiert. Mittels Hämocytometer konnte der in der Lösung befindliche Konzentration an Keimschläuchen quantifiziert werden. Danach wurde mit der Inaktivierung der Keimschläuche mittels Ethanolbehandlung fortgefahren (siehe Kapitel 3.1.5.).

3.1.4. Gewinnung von Hyphen

Die Herstellung von Hyphen ist äquivalent zu der Herstellung der Keimschläuche. Es ist lediglich eine längere Inkubationszeit notwendig. $0,5 - 1 \times 10^8$ Konidien der Spezies *A. fumigatus* und *R. arrhizus* wurden in 20 ml RPMI-Medium 18 h bei einer Schüttelfrequenz von 200 rpm in 50 ml Reaktionsgefäßen bei 22 °C inkubiert. Mittels Hämocytometer konnte die in der Lösung befindliche Konzentration an Keimschläuchen quantifiziert werden. Danach wurde mit der Inaktivierung der Hyphen mittels Ethanolbehandlung fortgefahren.

3.1.5. Inaktivierung von Konidien, Keimschläuchen und Hyphen

Die Inaktivierung der Konidien, Keimschläuche und Hyphen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* erfolgte durch eine 30-minütige Behandlung mit 96 % Ethanol (EtOH). Hierzu wurde die Pilz-Suspension für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 96 % EtOH resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 5000 g. Die inaktivierten Zellen wurden anschließend mit 50 ml destilliertem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde zusammen mit 2 ml destilliertem Wasser in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Zellen erneut für 10 min bei 16000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen wiederum in 2 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Dieser Vorgang wurde mindestens fünf Mal wiederholt um das verbliebene Ethanol vollständig zu eliminieren. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Pilzzellen in RPMI Medium + 10 % FCS aufgenommen. Die in der Lösung enthaltenen Konidien, Keimschläuche und Hyphen wurden mit dem Hämocytometer mikroskopisch quantifiziert und die Lösung durch Zugabe von RPMI Medium + 100 µg/ml Gentamicin auf eine Konzentration von 1×10^8 Konidien, Keimschläuchen bzw. Hyphen pro ml eingestellt. Das Zellmaterial wurde bei -20 °C gelagert.

3.2. Blutentnahme und Spendereinschlusskriterien

Zur Isolation von PBMCs oder neutrophilen Granulozyten wurden 27 ml EDTA-Blut durch Punktion einer Antekubitalvene mittels Butterfly-Kanüle gewonnen. Der Hämoglobingehalt des Spenders wurde evaluiert und musste über 12,5 mg/dl liegen. Es galten die folgenden Ein- und Ausschlusskriterien:

Einschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 75
- Nichtraucher
- Schriftliche Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien

- akute Infektion oder Einnahme von Antiinfektiva innerhalb der letzten vier Wochen
- Einnahme von Immunsuppressiva innerhalb der letzten 12 Wochen
- Diabetes mellitus
- chronische Infektionskrankheiten
- Schwangerschaft
- Bereits an derselben Versuchsserie dieser Studie teilgenommen
- Abhängigkeitsverhältnis zum Investigatoren-Team

Es wurde ein Spendererfassungsbogen erstellt, der die oben genannten Kriterien abfragte.

3.3. Isolation von Immunzellen

3.3.1. Isolation von Granulozyten

Vier 15 ml Reaktionsgefäße wurden zu je 5 ml mit *Polymorph Prep* befüllt und im Anschluss mit je 7 ml EDTA-Blut überschichtet. Danach fand eine Zentrifugation bei 730 g für 30 min statt (Beschleunigung 3, Bremse 3). Nachfolgend wurde die obere Schicht bestehend aus PBMCs abpipettiert und verworfen. Die tieferliegende Schicht bestehend aus Granulozyten wurde ebenfalls abgenommen und mit HBSS + 0,4 % EDTA + 1 % FCS auf 50 ml aufgefüllt. Danach wurde die Zellsuspension bei 590 g 5 min (Beschleunigung 9, Bremse 9) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Granulozytenpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 3 min inkubiert. Nach der Einwirkzeit wurden die Zellen erneut bei 590 g 2 min zu zentrifugiert (Beschleunigung 9, Bremse 9). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in RPMI Medium + 5 % FCS aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben quantifiziert.

3.3.2. Isolation von PBMC

Zur Gewinnung von PBMC zur Direktstimulation wurde EDTA-Blut, zur Gewinnung von PBMC zur Monozytenisolation wurde der Inhalt eines Leukozytenreduktionssystems in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit HBSS + 0,4 % EDTA + 1 % FCS auf 50 ml aufgefüllt. Danach wurden zwei Reaktionsgefäße mit je 20 ml Biocoll Separating Solution befüllt und anschließend mit 25 ml Blut-HBSS-Gemisch mittels einer serologischen Pipette überschichtet. Die Reaktionsgefäße wurden bei 730 g für 25 min zentrifugiert (Beschleunigung 5, Bremse 5). Danach wurde die PBMC-Schicht abpipettiert, in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und erneut auf 50 ml mit HBSS aufgefüllt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 300 g für 15 min (Beschleunigung 5, Bremse 5) blieben die Thrombozyten im Überstand und wurden dekantiert. Nach Wiederholung dieses Zentrifugationsschritts wurden die aufgereinigten PBMCs in 5 ml RPMI Medium aufgenommen oder zur weiteren

Monozytenisolation in 5 ml HBSS aufgenommen und wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben quantifiziert.

3.3.3. Isolation von Monozyten

Die 1×10^8 isolierten PBMCs wurden in 340 μ l HBSS und 60 μ l CD14 MicroBeads aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4 °C für 15 min inkubiert. Danach wurde das Gemisch mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 300 g (Beschleunigung 9, Bremse 9) zentrifugiert. Der verbliebene Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 2 ml HBSS resuspendiert. Im Anschluss fand eine magnetische Separation mittels einer QuadroMACS™ Magnetvorrichtung statt. Hierzu wurde die Zellsuspension auf zuvor mit 3 ml HBSS äquilibrierte LS-Säule pipettiert. Darauffolgend wurde die Säule drei Mal mit je 3 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurde die Säule aus der Magnetvorrichtung entnommen, auf ein 15 ml Zentrifugenröhrchen platziert und mit 5 ml HBSS befüllt. Mit einem der Säule beigefügten sterilen Stempel wurde die Elution der Zellen aus der Säule beschleunigt. Danach wurden die isolierten Monozyten wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, gezählt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut bei 300 g für 10 min zentrifugiert und darauffolgend durch Aufnahme in RPMI + 10 % FCS + 100 μ g/ml Gentamicin auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.3.4. Gewinnung von moDCs

Die isolierten Monozyten wurden in RPMI Medium + 10 % FCS + 100 μ g/ml Gentamicin aufgenommen. In jedes *Well* einer 6-*Well*-Platte wurden 1,2 μ l GM-CSF und 3 μ l IL-4 pipettiert. Danach wurden in jede Vertiefung $2,5 \times 10^6$ Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator gelagert. Der erforderliche Wechsel des Mediums fand im zweitägigen Intervall statt. Hierzu wurde je 1 ml Zellsuspension aus jedem *Well* abgenommen und in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die Zellsuspension für 10 min

bei 300 g (Beschleunigung 9, Bremse 9) zentrifugiert. Im Anschluss wurde der verbliebene Überstand dekantiert und das Zellpellet mit dem neu hergestellten Medium bestehend aus 1 ml RPMI Medium + 10 % FCS + 100 µg/ml Gentamicin, 1,2 µl GM-CSF und 3 µl IL-4 pro *Well* resuspendiert. Die Zellen wurden für weitere 48 Stunden im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gelagert.

Nach 6 Tagen konnten die generierten moDCs mittels Zellschaber vom Boden der *Wells* gelöst und die Zellsuspension in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die *Wells* wurden mit je 1 ml HBSS gespült und die Spüllösung zur gesammelten Zellsuspension hinzugefügt. Die geernteten moDCs wurden für 10 min bei 300 g zentrifugiert (Beschleunigung 9, Bremse 9). Der verbliebene Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in vorgewärmtem RPMI Medium + 10 % FCS + 100 µg/ml Gentamicin resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben quantifiziert.

3.3.5. Zellzählung der isolierten Immunzellen

Die isolierten und in RPMI Medium oder HBSS aufgenommenen Zellen wurden mittels RPMI Medium oder HBSS 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt. Zur mikroskopischen Zählung wurde ein Hämozytometer (modifizierte Neubauer-Zählkammer) verwendet. Hierzu wurde die auszuzählende Teilchensuspension bei aufgelegtem Deckglas seitlich auf eine Neubauer Zählkammer pipettiert und unter einem Lichtmikroskop die Zellanzahl festgestellt.

3.4. Koinkubationsexperimente von Pilz- und Immunzellen

3.4.1. Messung des oxidativen *Bursts* neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden nach der Aufreinigung in RPMI Medium + 5 % FCS in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Jedes *Well* wurde mit 50 μ l Zellsuspension befüllt (2×10^5 Zellen). Als Positivkontrolle wurde ein *Well* mit 48 μ l oben beschriebener Zellsuspension und 2 μ l PMA (Konzentration von 10ng/ μ l) befüllt. In den beiden folgenden Abschnitten werden die notwendigen Vorversuche beschrieben.

Neutrophile wurden in einem Vorversuch in einer 96-*Well*-Platte mit verschiedenen Morphotypen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* ohne Einsatz blockierender Antikörper kokultiviert. Hierbei wurden je 2×10^5 Neutrophile in sechs *Wells* pipettiert. Zu den Neutrophilen wurden 2×10^5 der inaktivierten Konidien, Keimschläuche bzw. Hyphen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* pipettiert. Somit entstanden sechs unterschiedlich befüllte *Wells* mit Pilzspezies. Ein *Well* ohne Pilzspezies diente als Kontrolle. Der Ansatz wurde doppelt angelegt. Zuletzt wurde Dichlorfluoresceindiacetat (DCF) 1:750 mit RPMI Medium + 5% FCS verdünnt und 10 μ l dieses Gemisches in jedes *Well* pipettiert. Im Anschluss konnte die Freisetzung von ROS in einem DCF basierten Assay am Tecan Plate Reader durch das XFluor Programm quantifiziert werden. Die Messung fand alle 5 min über einen Zeitraum von 120 min statt (Excitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 535 nm, Temperatur: 36 bis 38 ° C).

Die Menge an Antikörpern und Agonisten konnte durch Anlegen einer Verdünnungsreihe experimentell bestimmt werden. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe für die Rezeptor-Agonisten Pam3CSK (TLR2-Agonist) und Ultrapure-LPS (TLR4-Agonist) angelegt. Hierfür wurden 2×10^5 Neutrophile mit 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml des TLR2- und TLR4-Agonisten kokultiviert. Als Vergleichskontrolle wurde ein *Well* mit *A. fumigatus* Hyphen befüllt. Äquivalent zu diesem Versuch wurde die Titration des Dectin-1-Agonisten, Zymosan *depleted*, durchgeführt. Hierfür

wurden 2×10^5 Neutrophile mit 1 mg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62 µg/ml, 31 µg/ml, 16 µg/ml und 8 µg/ml Zymosan *depleted* kokultiviert. Als optimale TLR-Agonisten-Konzentration stellte sich eine Endkonzentration von 30 µg/ml heraus. Für Zymosan *depleted* etablierte sich eine Endkonzentration von 100 µg/ml, Es wurde von allen PRR-Agonisten jeweils eine Absolutmenge von 10 µl verwendet.

In einem weiteren Versuch fand die Titration der Rezeptor-Antikörper statt. Hierbei wurden wiederholt 2×10^5 Neutrophile mit 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml des TLR2- und TLR4-Antikörpers für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden die entsprechenden Agonisten hinzugegeben. Hierfür wurden sehr hohe Konzentrationen (800 µg/ml) von UltraPure-LPS-Lösung und Pam3CSK-Lösung in die jeweiligen mit ihren zugehörigen Antikörpern befüllten *Wells* pipettiert.

Die Titration des Dectin-1-Antikörpers wurde dem zuvor beschriebenen Versuch entsprechend durchgeführt. Hierzu wurden 2×10^5 Neutrophile in mehreren *Wells* mit 0,8 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,2 µg/ml und 0,1 µg/ml des Dectin-1-Antikörpers für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und im Anschluss in jedes *Well* 10 µl des Dectin-1-Agonisten, Zymosan *depleted* hinzugefügt. Nach Zugabe von DCF konnte wie oben bereits erwähnt die Messung am Tecan Plate Reader durchgeführt werden. Eine Konzentration von 10 µg/ml erschien bei allen PRR-Antikörpern sinnvoll.

Nach Optimierung der Konditionen in den zuvor beschriebenen Versuchen, wird im Folgenden das Hauptexperiment, in dem blockierende Antikörper Anwendung fanden, beschrieben. Hierzu wurden auf 2×10^5 Neutrophile je 10 µl (entsprechen 1 µg) der TLR- und Dectin-1-Antikörper (Endkonzentration 10 µg/ml) in die *Wells* hinzugefügt. In einigen *Wells* wurden die Antikörper kombiniert eingesetzt, sodass die Vertiefungen, die mit nur einem Antikörper befüllt wurden, zusätzlich 20 µl HBSS enthielten und die Vertiefungen, die mit zwei Antikörpern besetzt waren, nochmals mit 10 µl HBSS aufgefüllt wurden. Danach fand eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Anschließend wurden die TLR-Agonisten hinzugefügt. 10 µl UltraPure-LPS (Endkonzentration 30 µg/ml)

wurden ebenso wie 10 µl Pam3CSK (Endkonzentration 30 µg/ml) in die *Wells* pipettiert, die bereits mit den entsprechenden Antikörpern befüllt waren. Zymosan *depleted*, ein Dectin-1-Agonist, wurde zunächst 1:5 mit RPMI verdünnt (Endkonzentration 100 µg/ml) und in die entsprechend mit Dectin-1-Antikörper befüllten *Wells* pipettiert. Je 2×10^5 der inaktivierten Konidien, Keimschläuche bzw. Hyphen von *A. fumigatus* bzw. *R. arrhizus* wurden einzeln den *Wells* hinzugefügt. Zum einfachen Verständnis soll Tabelle 1 das Pipettierschema wiedergeben. Konidien beider Pilzspezies wurden in der tabellarischen Darstellung ausgespart, da diese wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, keine vermehrte ROS-Freisetzung in Neutrophilen induzierten und bei weiteren Versuchen nicht verwendet wurden.

Zugabe von PRR-Agonisten	Zugabe von Pilzzellen			
	<i>A. fumigatus</i>		<i>R. arrhizus</i>	
2 x 10 ⁵ PMN 30 µl HBSS				
2 x 10 ⁵ PMN 10 µl Pam3CSK 30 µl HBSS	2 x 10 ⁵ PMN 30 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 30 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu H</u>	2 x 10 ⁵ PMN 30 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 30 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar H</u>
2 x 10 ⁵ PMN 10 µl Pam3CSK 10 µl α-TLR2 20 µl HBSS	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 20 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 20 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu H</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 20 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 20 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar H</u>
2 x 10 ⁵ PMN 10 µl UP-LPS 30 µl HBSS	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR4 20 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR4 20 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu H</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR4 20 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR4 20 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar H</u>
2 x 10 ⁵ PMN 10 µl UP-LPS 10 µl α-TLR4 20 µl HBSS	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 10 µl α-TLR4 10 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 10 µl α-TLR4 10 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu H</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 10 µl α-TLR4 10 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 10 µl α-TLR4 10 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar H</u>
2 x 10 ⁵ PMN 10 µl Zym depl 30 µl HBSS	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-Dectin-1 10 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-Dectin-1 10 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Afu H</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-Dectin-1 10 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-Dectin-1 10 µl HBSS 2 x 10 ⁵ <u>Rar H</u>
2 x 10 ⁵ PMN 10 µl Zym depl 10 µl α-Dectin-1 20 µl HBSS	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 10 µl α-TLR4 10 µl α-Dectin-1 2 x 10 ⁵ <u>Afu GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 10 µl α-TLR4 10 µl α-Dectin-1 2 x 10 ⁵ <u>Afu H</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 10 µl α-TLR4 10 µl α-Dectin-1 2 x 10 ⁵ <u>Rar GT</u>	2 x 10 ⁵ PMN 10 µl α-TLR2 10 µl α-TLR4 10 µl α-Dectin-1 2 x 10 ⁵ <u>Rar H</u>

Tabelle 1: Belegung der 24-Well-Platte für Kokulturstudien von Neutrophilen mit *A. fumigatus* und *R. arrhizus* unter Einsatz von TLR2-, TLR4- und Dectin-1-Antikörper und den zugehörigen Agonisten

Die 24-Well-Platte wurde wie dargestellt befüllt und im Anschluss jedem 10 µl des DCF-Gemisches hinzugefügt, um gleich darauf die ROS-Freisetzung der Neutrophilen am Tecan Plate Reader zu messen. Abkürzungen: Afu: *A. fumigatus*, GT: Keimschläuche, HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*, H: Hyphen, PMN: Polymorphkernige Neutrophile, Rar: *R. arrhizus*, UP-LPS: UltraPure-LPS, Zym depl: Zymosan *depleted*

3.4.2. Bestimmung der Phagozytoserate fluoreszenz-markierter Konidien durch neutrophile Granulozyten

Die isolierten neutrophilen Granulozyten wurden in RPMI Medium + 10% FCS in einer Konzentration von 2×10^6 /ml aufgenommen. Im Anschluss wurden je 50 μ l der Zellsuspension in zwölf *Wells* einer 96-*Well*-Platte gegeben (1×10^5 Neutrophile). Zwei *Wells* wurden lediglich mit RPMI Medium befüllt und dienten später als Kontrolle. Zwei *Wells* einer zweiten Platte wurden ebenso mit der Granulozytensuspension befüllt, welche als Hintergrund-Kontrollen dienten und im weiteren Verlauf 3 Stunden bei 4 °C gelagert wurden. 10 μ l Antikörper-Suspension (Stock-Konzentration: 0,1 mg/ml, Endkonzentration 10 μ g/ml) wurden in die mit neutrophilen Granulozyten befüllten *Wells* der ersten Platte dazugegeben, ebenso wie Kombinationen aus TLR2- und TLR4-Antikörpern sowie eine Kombination aus TLR2-, TLR4- und Dectin-1- Antikörpern. Ein Volumenausgleich fand durch Zugabe von HBSS statt. Danach wurde die mit Antikörpern belegte Platte für 60 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden die *Rhizopus*-Konidien gefärbt. Hierzu wurden 1×10^7 Konidien mit 450 μ l RPMI Medium + 5 μ l FITC (Fluorescein-isothiocyanat) vermengt. Das Gemisch wurde bei 37 °C 30 min inkubiert und alle 10 min invertiert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 5000 g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml HBSS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt und das Pellet in 500 μ l RPMI Medium aufgenommen (Zielkonzentration: 2×10^7 /ml). Die Suspension wurde mit einer 5 ml Spritze fünfmal durch 23 G Kanüle passiert. 400 μ l des käuflich erworbenen GFP *Aspergillus* wurden mit 1,6 ml RPMI Medium auf eine Zielkonzentration von 2×10^7 /ml eingestellt. Im Anschluss wurden die in den *Wells* enthaltenen Neutrophilen und TLR-Antikörper mit den Konidien von *A. fumigatus* bzw. *R. arrhizus* kokultiviert. Pro Pilzspezies wurde eine Ko-Kultur nur mit neutrophilen Granulozyten ohne Antikörper angelegt. Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit fand die Neutrophilen-Färbung statt. Hierzu wurden die Zellsuspensionen in Reaktionsgefäße überführt, jedes *Well* mit 200 μ l HBSS gespült und die Zellsuspensionen bei für 10 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und alle Neutrophilen-Proben wurden mit 100 μ l HBSS und

5 µl CD15-APC-Antikörper resuspendiert und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde jede Probe mit 400 µl HBSS gewaschen und nochmals 10 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde nach Verwerfen des Überstandes das Pellet in 300 µl HBSS aufgenommen und die Proben in 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Am FACS Calibur Durchflusszytometer wurde die Phagozytoserate der mit anti-CD15-APC markierten neutrophilen Granulozyten ermittelt, indem der Anteil der FITC-positiven Zellen unter den CD15-positiven Zellen gemessen wurde.

3.4.3. Koinkubation mononukleärer Zellen mit Pilzzellen

Die isolierten PBMCs, Monozyten und dendritischen Zellen wurden in einzelnen Versuchen jeweils mit Konidien und Keimschläuchen von *A. fumigatus* bzw. *R. arrhizus* inkubiert.

Hierzu wurden 2×10^6 PBMC/1 ml RPMI Medium oder 2×10^6 Monozyten/ 1 ml HBSS in die einzelnen *Wells* einer 6-*Well*-Platte gegeben und danach 2×10^6 Zellen des jeweiligen Pilzmorphotypen hinzugefügt. Nach einer sechsstündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die Zellen geerntet werden. Das Kulturmedium wurde aus dem *Well* genommen, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 7 min bei 5000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen. Die *Wells* wurden mit je 700 µl *RNA-Protect* befüllt und nach wiederholtem Auf- und Abpipettieren wurde die Lösung zu dem in den Reaktionsgefäßen befindlichen Zellpellets hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden nochmals gevortext und bei - 20 °C eingefroren.

Die wie Kapitel 3.3.4 beschrieben generierten moDCs wurden in einer 24-*Well*-Platte ausplattiert. Jedes *Well* wurde mit 5×10^5 moDCs und 5×10^5 Konidien (jeweils aufgenommen in RPMI Medium + 10 % FCS + 100 µg/ml Gentamicin) und Keimschläuchen von *R. arrhizus* und *A. fumigatus* befüllt. Nach sechsstündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen geerntet. Die Durchführung Protokoll entspricht dem oben beschriebenen Ablauf, mit der Ausnahme, dass hier lediglich 500 µl *RNA-Protect* verwendet wurden.

3.4.4. Dectin-1 *Knockdown* in moDCs und Koinkubation mit Pilzzellen

Die gezählten moDCs wurden in RPMI Medium + 10% FCS + 100 µg/ml Gentamicin aufgenommen. Die Zielkonzentration betrug 2×10^6 /ml. Da sich die Inkubationszeiten für die RT-qPCR und den ELISA unterscheiden, musste je Assay eine 24-Well-Platte ausplattiert werden. Die Zellernte für die konsekutive RT-qPCR fand nach 6 Stunden statt, wohingegen die Überstände für die ELISA-Messungen nach 9 Stunden geerntet wurden.

Am ersten Tag wurden je 100 µl der Zellsuspension (2×10^5 moDCs) in ein *Well* gegeben. Die folgenden zwei Lösungen wurden hergestellt um die *Wells* mit Kontroll-siRNA und CLEC7A-siRNA zu befüllen:

1. Lösung mit Kontroll-siRNA:

- 100 µl RPMI Medium
- 6 µl HiPerFect®
- 3 µl der Kontroll-siRNA

2. Lösung mit CLEC7A-siRNA:

- 100 µl RPMI Medium
- 6 µl HiPerFect®
- 3 µl CLEC7A-siRNA

Die hergestellten Lösungen wurden zunächst bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert, bevor jede der beiden Lösungen nacheinander langsam in je acht der bereits mit moDC-Zellsuspension gefüllten *Wells* hinzuge tropft wurden. 6 Stunden später wurden nochmals 400 µl RPMI Medium in jedes *Well* hinzugegeben. Die moDCs wurden für 18 h bei 37 ° C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden je 2×10^5 Zellen der unterschiedlichen durch Ethanol inaktivierten Morphotypen (Konidien, Keimschläuche und Hyphen) von *A. fumigatus* bzw. *R. arrhizus* oder 1,2 µg *Zymosan depleted* (Endkonzentration 100 µg/ml) in die bereits befüllten *Wells* hinzugegeben. Nach sechs Stunden wurden RNA-Proben der moDCs der ersten *Well*-Platte wie oben beschrieben geerntet. Die Überstände für ELISA-Analysen wurden nach 9 Stunden von der

zweiten Wellplatte abgenommen und bei -20 °C kryopräserviert. Tabelle 2 gibt die Belegung der 24-Well-Platten schematisch wieder.

		Kontroll-siRNA		CLEC7A-siRNA	
2 x 10 ⁵ moDCs 100 µl Medium	2 x 10 ⁵ moDCs 100 µl Medium 12 µl Zym depl	2 x 10 ⁵ moDCs 100 µl Medium 3 µl siCtrl	2 x 10 ⁵ moDCs 100 µl Medium 12 µl Zym depl 3 µl siCtrl	2 x 10 ⁵ moDCs 100 µl Medium 3 µl siCLEC7A	2 x 10 ⁵ moDCs 100 µl Medium 12 µl Zym depl 3 µl siCLEC7A
2 x 10 ⁵ moDCs 100 µl Medium 6 µl HiPerFect	2 x 10 ⁵ moDCs 100 µl Medium 12 µl Zym depl 6 µl HiPerFect	2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCtrl 2 x 10 ⁵ Afu C	2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCtrl 2 x 10 ⁵ Rar C	2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCLEC7A 2 x 10 ⁵ Afu C	2x10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCLEC7A 2 x 10 ⁵ Rar C
		2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCtrl 2 x 10 ⁵ Afu GT	2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCtrl 2 x 10 ⁵ Rar GT	2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCLEC7A 2 x 10 ⁵ Afu GT	2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCLEC7A 2 x 10 ⁵ Rar GT
		2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCtrl 2 x 10 ⁵ Afu H	2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCtrl 2 x 10 ⁵ Rar H	2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCLEC7A 2 x 10 ⁵ Afu H	2 x 10 ⁵ moDCs 6 µl HiPerFect 3 µl siCLEC7A 2 x 10 ⁵ Rar H

Tabelle 2: Belegung der 24-Well-Platte für Kokulturstudien von moDCs mit *A. fumigatus* und *R. arrhizus* unter Dectin-1-Blockade mittels siRNA.

Abkürzungen: Afu: *A. fumigatus*, C: Konidien, GT: Keimschläuche, H: Hyphen, Rar: *R. arrhizus*, siCLEC7A: CLEC7A-siRNA, siCtrl: Kontroll-siRNA, Zym depl: Zymosan *depleted*

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. RNA Isolation für RT-qPCR und ELISA

Die in *RNA-Protect* gelösten Zellen wurden aufgetaut und für 5 min bei 7000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurden 350 µl Ethanol hinzugegeben, gevortext und auf eine Qiagen RNeasy Mini Elute-Säule aufgetragen. Es erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 8000 g. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation für 1 min bei 8000 g. Wieder wurde der Durchfluss verworfen und es wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Dieser Vorgang wiederholte sich zwei Mal, wobei der erste Zentrifugationsschritt bei 8000 g für 1 min und die zweite Zentrifugation bei 8000 g für 2 min durchgeführt wurde. Die Säule wurde nach dem Verwerfen des Durchflusses in ein neues *Collection-Tube* platziert und bei 17000 g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde im Anschluss auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, mit 30 µl RNase-freiem Wasser befüllt und für 1 min bei 8000 g zentrifugiert.

3.5.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Am *NanoDrop* Spectrophotometer wurde die RNA-Konzentration quantifiziert. Als Leerwert diente RNase freies Wasser. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der RNA wurden 2 µl der Probe eingesetzt. Bei direkter Messung liegt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Eine A260 Einheit entspricht 40 µg/ml RNA. Anhand der Ratio, dem Quotienten aus A260/A280, wurde der Reinheitsgrad der Nukleinsäure bestimmt, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2,1 angestrebt wurde.

3.5.3. Herstellung der cDNA

Die zuvor extrahierte RNA wurde durch reverse Transkription mittels *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit* (Applied Biosystems) zu *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurden 300 ng RNA eingesetzt und der Ansatz mit nukleasefreiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Im Anschluss daran wurde zu jeder Probe folgender Mix hinzugegeben:

- 2 µl 10 x RT- Puffer
- 0,8 µl 25 x dNTP Mix (100 nM)
- 2 µl 10 x RT Random Primer
- 1 µl MultiScribe RT
- 2,2 µl nukleasefreies Wasser

Folgendes Programm wurde zur cDNA-Synthese verwendet:

10 min bei 25 °C

120 min bei 37 °C

5 min bei 85 °C

Pause bei 4 °C

Die erhaltene cDNA wurde bei - 20 °C eingefroren.

3.5.4. RT-qPCR

Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression erfolgte mit Hilfe der RT-qPCR. Die cDNA wurde vor dem Einsatz für die RT-qPCR 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und im Anschluss gevortext. Für jede zu analysierende cDNA-Probe wurde der folgende Reaktionsansatz jeweils in Duplikaten angelegt:

- 1 µl Primer-Mix (beide Primer jeweils 10 µM)
- 5 µl nukleasefreies Wasser
- 10 µl SYBR Green Supermix (Biorad)
- 4,0 µl cDNA

Mittels des *Step-One plus PCR-Cyclers* (Applied Biosciences) wurde die Real-Time-qPCR durchgeführt. Hierzu wurde folgendes Programm verwendet:

<u>Initiale Denaturierung:</u>	95 °C für 30 sec
<u>Amplifikation (40 Zyklen):</u>	95 °C für 3 sec, 60 °C für 30 sec
<u>Schmelzkurve:</u>	95 °C für 15 sec, 60 °C für 60 sec, + 0,5 °C nach jeweils 15 sec, 95 °C für 15 sec

Zur Berechnung der relativen Expression eines zu analysierenden Gens im Verhältnis zu *Alas1*, dem Referenz-Gen (*Housekeeping-Gen*), diente die $\Delta\Delta Ct$ -Methode:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

mit $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Referenz}}$ und $\Delta Ct = Ct_{\text{zu analysierendes Gen}} - Ct_{\text{Standard-Gen}}$

Berechnung der Standardabweichung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte: $s = \sqrt{(s_1^2 + s_2^2)}$

s_1 steht für die Standardabweichung des zu analysierenden Gens

s_2 steht für die Standardabweichung für das Referenz-Gen (*Alas1*).

Für $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wurde der Fehlerbereich $2^{-\Delta\Delta Ct \pm s}$ berechnet, der durch Fehlerbalken angegeben und nach folgender Formel berechnet wurde:

$$\text{Fehler} = (2^{-\Delta\Delta Ct + s}) - (2^{-\Delta\Delta Ct})$$

3.5.5. IL-1 β und TNF- α ELISA

Die Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α in Kulturüberständen wurden mittels ELISA analysiert. Hierzu dienten BioLegend ELISA MAX Deluxe Sets. Die Durchführung beider ELISAs erfolgte gemäß den Angaben im Herstellerprotokoll und sollen nachfolgend kurz skizziert werden. 96 Well Platten wurde zunächst mit einem TNF- α - oder IL-1 β -spezifischen monoklonalen Antikörper (*Capture Antibody*) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten mit einem Waschpuffer bestehend aus PBS + 0,05% Tween-20 zweimal im ELISA Washer gewaschen und im Anschluss mit 200 μ l Assay Diluent A pro Well für eine weitere Stunde auf einem ELISA-Schüttler bei 200 rpm inkubiert.

Hieran schlossen sich drei weitere Waschschrirte an. 100 μ l der zuvor hergestellten Verdünnungen der TNF- α - und IL-1 β -Standardproben oder der Proben wurden nun zu den *Wells* zugefügt. Für jeden Standard und für jede Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Nullwert wurden zwei *Wells* zu je 100 μ l mit PBS und als Negativkontrolle 2 *Wells* zu je 100 μ l mit Medium (bestehend aus RPMI Medium + 10 % FCS + 100 μ g/ml Gentamicin) befüllt. Anschließend wurden die Proben für 2 h auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem die Platten drei weitere Waschschrirte erfuhren, wurden 100 μ l der jeweiligen Detektionsantikörper in die *Wells* gegeben und es eine erneute einstündige Inkubation auf dem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 μ l Avidin Meerettich Peroxidase in jedes *Well* pipetiert und die Platte für weitere 30 min inkubiert, bevor sie erneut einem dreimaligen Waschvorgang unterzogen wurde. Darauffolgend wurden 100 μ l der TMB Substrat-Lösung zu jedem *Well* hinzugefügt. Dieses sorgte für eine Blaufärbung der *Wells* proportional zu der in den Proben enthaltenen Menge an TNF- α bzw. IL-1 β . Nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln wurden in alle *Wells* 100 μ l 0.5 M Schwefelsäure hinzugegeben, welche die Reaktion abstoppte und einen Farbumschlag zu gelb bewirkte. Die Absorption jedes *Wells* wurde im Microplate TECAN ELISA *Reader* bei 450 und 570 nm gemessen. Die mit der Referenzwellenlänge festgestellten Optischen Dichte-Werte (OD-Werte) wurden von den OD-Werten, die durch die Messwellenlänge festgestellt wurden, abgezogen. Anschließend wurden die OD-Werte mittels einer 7-Punkt-Standardkurve in die entsprechenden Zytokinkonzentrationen umgerechnet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Teil I – Koinkubationsexperimente mit Neutrophilen

4.1.1. Stimulation des oxidativen Burst durch *Aspergillus* und *Rhizopus* Morphotypen

Zur Evaluation der basalen Pilz-induzierten ROS-Sekretion wurden Neutrophile mit verschiedenen Ethanol-inaktivierten Morphotypen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* inkubiert. Im Anschluss wurde die Freisetzung von ROS in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gemessen. Dieses Experiment wurde mehrfach mit Neutrophilen verschiedener Spender durchgeführt. Im Folgenden wird zunächst ein repräsentatives Beispiel dargestellt (siehe Abbildung 4.1). Die Positivkontrolle, PMA, sowie die Keimschläuche und Hyphen beider Pilzspezies lösten eine vermehrte Freisetzung von ROS aus, was sich in dem steilen Anstieg der Kurven und den hohen Absolutwerten widerspiegelt. Bei allen Spendern wurde der steilste Anstieg der Pilz-induzierten ROS-Freisetzung nach 40 bis 80 min beobachtet. Daher wurde für alle folgenden Experimente der 60 min-Wert verwendet. Konidien von *A. fumigatus* sowie *R. arrhizus* induzierten hingegen keine signifikant über die Medium-Kontrolle hinausgehende ROS-Freisetzung (siehe Abbildung 4.1).

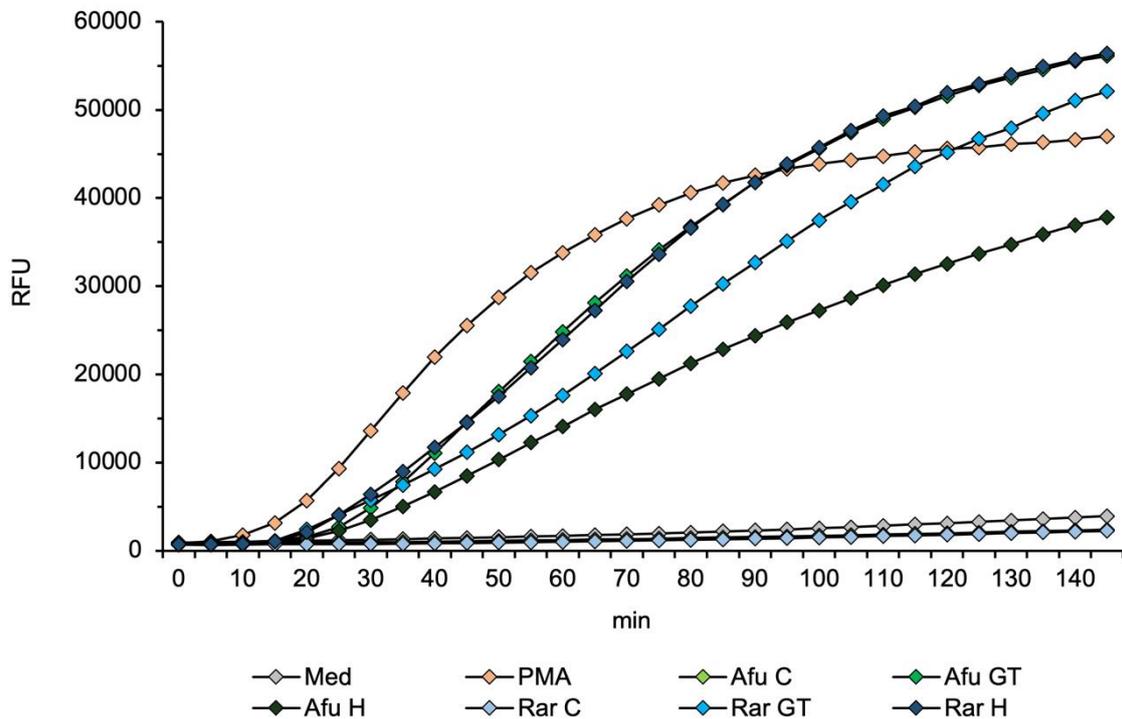


Abbildung 4.1: Zeitlicher Verlauf der ROS-Freisetzung neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit verschiedenen Morphotypen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus*

In einem DCF-basierten Assay wurde die Freisetzung von ROS in RFU gemessen, nachdem Neutrophile (2×10^5) eine Stunde mit der äquivalenten Menge an Konidien (C), Keimschläuchen (GT) und Hyphen (H) von *A. fumigatus* (Afu), *R. arrhizus* (Rar) und PMA ($10\text{ng}/\mu\text{l}$) als Positivkontrolle inkubiert wurden

Abbildung 4.2 zeigt eine Analyse auf Basis mehrerer unabhängiger Spender ($n = 5$), deren Neutrophile mit verschiedenen Ethanol-inaktivierten Morphotypen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* inkubiert wurden und im Anschluss die Freisetzung von ROS in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gemessen wurde. Im Vergleich zur Medium-Kontrollprobe zeigte sich eine deutliche Induktion der ROS-Freisetzung durch Keimschläuche und Hyphen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* (Faktor 3,8 bis 8,2). Die Positivkontrolle in Form von PMA steigerte die Freisetzung der Sauerstoffspezies durch Neutrophile durchschnittlich um ca. Faktor 10. Wie bereits im repräsentativen Beispiel gezeigt, konnten Konidien beider Pilzspezies nur eine geringe ROS-Antwort in Neutrophilen bewirken. Die

Absolutwerte der RFU lagen hier nur unwesentlich über dem Niveau der Medium-Kontrollprobe.

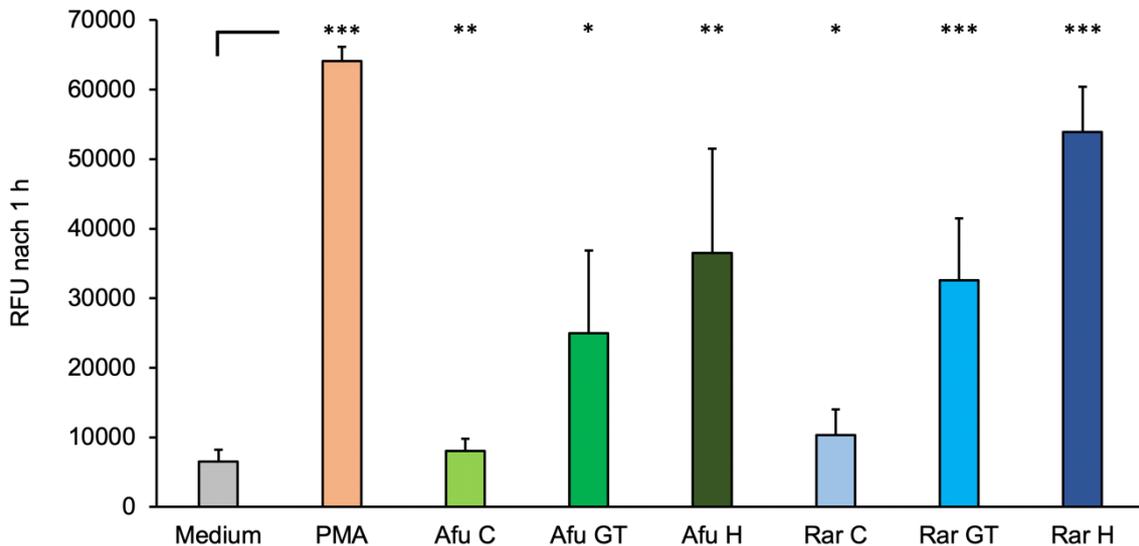


Abbildung 4.2: Stimulation der ROS-Antwort neutrophiler Granulozyten durch verschiedene Morphotypen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus*

In einem DCF-basierten Assay wurde die Freisetzung von ROS in RFU gemessen, nachdem Neutrophile (2×10^5) von 5 gesunden Spendern für 60 min mit der äquivalenten Menge an inaktivierten Konidien (C), Keimschläuchen (GT) und Hyphen (H) von *A. fumigatus* (Afu), *R. arrhizus* (Rar) und PMA als Positivkontrolle inkubiert wurden. Alle Signifikanzen wurden durch einen zweiseitigen gepaarten T-Test berechnet. *** $p < 0,001$; ** $0,001 < p < 0,01$; * $0,01 < p < 0,05$

4.1.2. Optimierung der PRR-Agonisten- und -Antikörper-Konzentrationen

Die optimale Menge an Agonisten zur Stimulation der neutrophilen PRRs wurde zunächst experimentell mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt. Ebenso wurde die Antikörper-Konzentration, die die Blockade der PRRs bewirkte, ausgetitriert. Hierzu wurden mehrere Vorversuche durchgeführt. Im Folgenden soll anhand des TLR4-Agonisten, UltraPure-LPS, sowie des TLR4-Antikörpers die Titration von Agonist und Antikörper exemplarisch dargestellt werden (siehe Abbildung 4.3). Hierzu wurde die ROS-Freisetzung nach Koinkubation von

2 x 10⁵ Neutrophilen mit unterschiedlichen Konzentrationen von UltraPure-LPS sowie mit 2 x 10⁵ *A. fumigatus*-Keimschläuchen (als Vergleichswert) gemessen. Die Stimulation der Neutrophilen und die konsekutive ROS-Freisetzung nach Kokultivierung mit *A. fumigatus* war erneut deutlich erkennbar (39688 RFU). Im Vergleich hierzu erreichte sogar die höchste getestete UltraPure-LPS-Konzentration (100 µg/ml) nur eine ROS-Freisetzung von 9110 RFU. Bei oder unterhalb einer UltraPure-LPS-Konzentration von 10 µg/ml wurden jeweils Werte auf dem Niveau der Mediumkontrolle beobachtet (2500 bis 2800 RFU). Eine Konzentration von UltraPure-LPS über 10 µg/ml erscheint demzufolge notwendig.

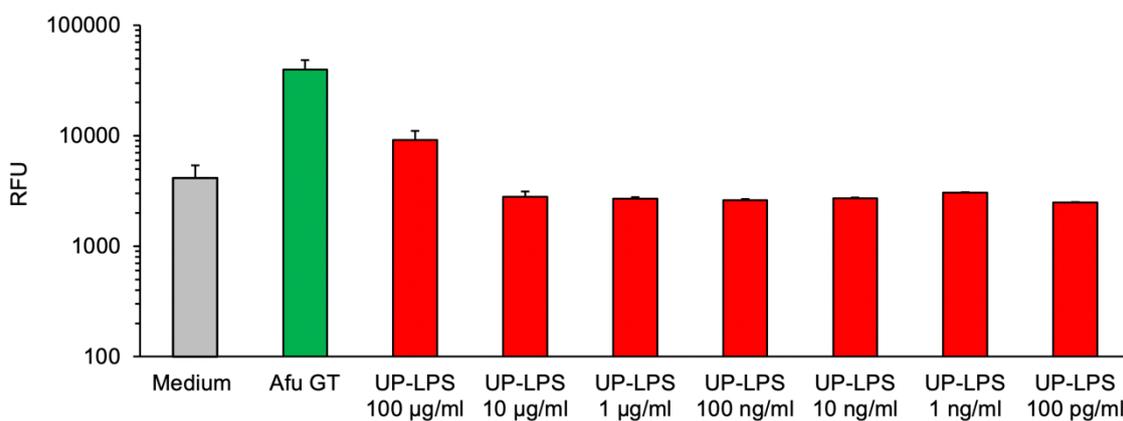


Abbildung 4.3: Titration des TLR4-Agonisten UltraPure-LPS

2 x 10⁵ Neutrophile wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von UltraPure-LPS (LPS) stimuliert und im Anschluss die ROS-Freisetzung in einem DCF-basierten Assay gemessen. Als Vergleich diente eine Kokultur von 2 x 10⁵ Neutrophilen mit 2 x 10⁵ Keimschläuchen (GT) von *A. fumigatus* (Afu). Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen auf Basis technischer Duplikate unter Verwendung von Neutrophilen eines repräsentativen Spenders.

Im weiteren Verlauf wurde die Konzentration des TLR4-Antikörpers experimentell bestimmt. Hierzu wurden 2×10^5 Neutrophile mit unterschiedlichen Konzentrationen des TLR4-Antikörpers behandelt und im Anschluss mit 800 µg/ml UltraPure-LPS kokultiviert, um danach die ROS-Freisetzung der Neutrophilen zu bestimmen. Diese unter Berücksichtigung der Vorgaben zur Verdünnung im Herstellerprotokoll höchste erzielbare Endkonzentration an UltraPure-LPS wurde gewählt, um den Antikörper in einem maximal stimulierten Setting auf seine Eignung zu prüfen (siehe Abbildung 4.4).

In der Tat war durch diese Konzentration an UltraPure-LPS eine deutliche Stimulation der Neutrophilen zu erkennen (ca. 22000 RFU). Durch den Einsatz von 0,5 µg/ml des TLR4-Antikörpers wurde die ROS-Freisetzung bereits um 44 % reduziert. Ab einer Konzentration von 10 µg/ml des TLR4-Antikörpers wurde die ROS-Freisetzung auf das Niveau der Medium-Kontrolle supprimiert.

Für die nachfolgenden Versuchen wurde auf Grund der ausreichenden Stimulation der PRRs unter Berücksichtigung ökonomischer Aspekte eine TLR-Agonisten-Konzentration von 30 µg/ml und eine Dectin-1-Agonisten-Konzentration von 100 µg/ml gewählt. Für die Antikörper-Konzentrationen erschien im Hinblick auf die adäquate PRR-Blockade und aus ökonomischer Sicht eine Endkonzentration von 10 µg/ml ausreichend.

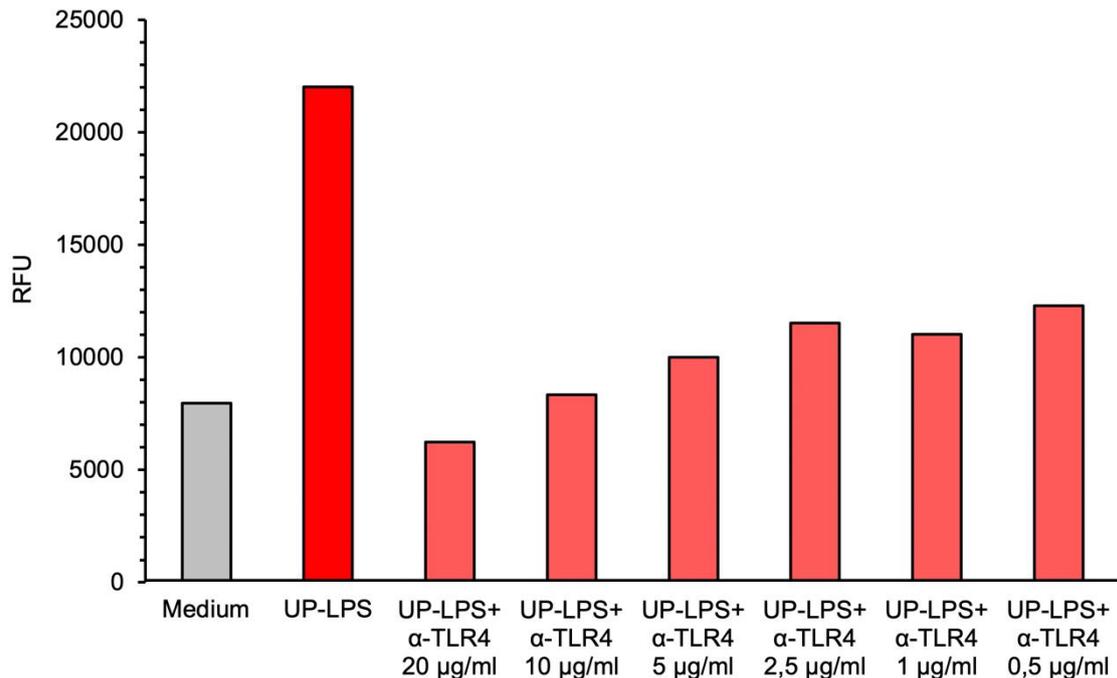


Abbildung 4.4: Titration der TLR4-Antikörper-Konzentration

2 x 10⁵ Neutrophile wurden mit je 800 µg/ml UltraPure-LPS unter Einsatz von unterschiedlichen Konzentrationen eines TLR4-blockierenden Antikörpers (α-TLR4) stimuliert. Im Anschluss wurde mittels DCF-basiertem Assay die neutrophile ROS-Freisetzung gemessen.

4.1.3. Oxidativer Burst - Stimulation von Neutrophilen mittels Rezeptoragonisten und Blockade durch den jeweiligen Antikörper

Nach der experimentellen Optimierung der Agonisten- und Antikörper-Konzentrationen wurde die stimulatorische Aktivität der PRR-Agonisten und die erfolgreiche Blockade durch die eingesetzten Antikörper validiert. Hierzu wurden neutrophile Granulozyten (2 x 10⁵) von 5 Spendern mit TLR2-, TLR4- und Dectin-1 Antikörpern (Konzentration je 10 µg/ml) behandelt und nachfolgend mit den jeweiligen Rezeptoragonisten inkubiert: 30 µg/ml Pam3CSK (TLR2-Agonist), 30 µg/ml UltraPure LPS (TLR4-Agonist) und 100 µg/ml Zymosan *depleted* (Dectin-1-Agonist).

Pam3CSK, UltraPure-LPS und Zymosan *depleted* stimulierten die ROS-Antwort im Vergleich zur Medium-Kontrollprobe durchschnittlich um das 2,5 bis 3,6-fache (siehe Abbildung 4.5). Für alle Agonisten konnte eine signifikante Reduktion der

stimulatorischen Kapazität nach Prä-Inkubation mit dem jeweiligen PRR-Antikörper beobachtet werden. Konkret wurde durch Einsatz des TLR2- bzw. TLR4-Antikörpers die ROS-Freisetzung der durch Pam3CSK bzw. UltraPure-LPS stimulierten Neutrophilen um 52 bis 53 % reduziert. Ebenso fand sich in Anwesenheit des Dectin-1-Antikörpers eine um 52 % verminderte ROS-Freisetzung der durch Zymosan *depleted* stimulierten Neutrophilen. Insbesondere bei Einsatz des TLR4- und Dectin-1-Antikörpers sank die ROS-Sekretion dabei fast auf das Niveau der Medium-Kontrollprobe.

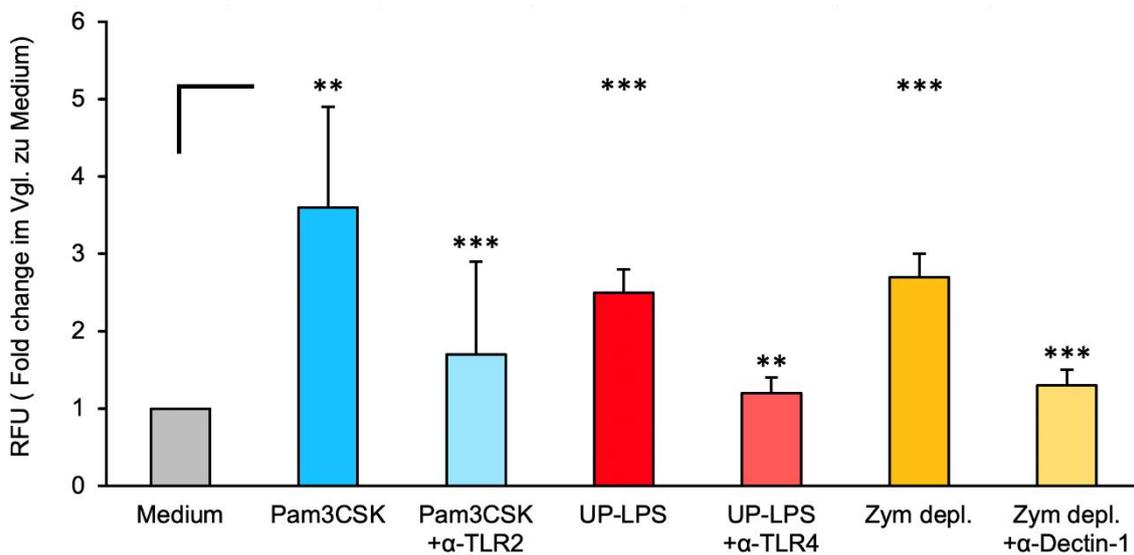


Abbildung 4.5: Freisetzung von ROS durch Neutrophile in Anwesenheit von PRR-Antigenen und -Antikörpern

Neutrophile von 5 gesunden Spendern (je 2×10^5 pro *Well*) wurden mit jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ TLR2-, TLR4- oder Dectin-1-Antikörper behandelt und im Anschluss mit den entsprechenden Rezeptor-Agonisten inkubiert. Hierzu wurden 30 $\mu\text{g/ml}$ Pam3CSK zur Stimulation von TLR2, 30 $\mu\text{g/ml}$ UltraPure-LPS (UP-LPS) zur Stimulation von TLR4 und 100 $\mu\text{g/ml}$ Zymosan *depleted* (Zym depl.) zur Stimulation von Dectin-1 verwendet. Die Signifikanzen wurden jeweils durch einen zweiseitigen gepaarten T-Test berechnet. *** $p < 0,001$; ** $0,001 < p < 0,01$

4.1.4. Oxidativer Burst - Neutrophile nach Stimulation mit *A. fumigatus* und *R. arrhizus* und Blockade von TLR2 und TLR4

Im Hauptexperiment wurden Neutrophile Granulozyten von fünf Spendern mit der äquivalenten Menge an Konidien, Keimschläuchen und Hyphen von *R. arrhizus* bzw. *A. fumigatus* unter Einsatz blockierender TLR2- und TLR4-Antikörper koinkubiert. In Abbildung 4.6 wird die Freisetzung der ROS dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Konidien beider Erreger lediglich eine schwache Immunantwort auf dem Niveau der Medium-Kontrollprobe auslösen. Die Keimschläuche sowie die Hyphen beider Pilzarten induzierten hingegen eine signifikante ROS-Antwort: Ohne gleichzeitige Antikörperblockade (graue Säulen) fand sich eine im Vergleich zur Mediumkontrolle 3,8 bis 8,5-fach erhöhte ROS-Freisetzung.

Bei Einsatz der blockierenden Antikörper zeigte sich sowohl bei Keimschläuchen von *A. fumigatus* als auch von *R. arrhizus* eine signifikante Verminderung der ROS-Antwort. Bei Einsatz des TLR2-Antikörpers sank die ROS-Freisetzung um 24 bis 34 %, in Anwesenheit des TLR4-Antikörpers um 31 bis 47 %. Bei Stimulation mit *A. fumigatus*-Hyphen konnte lediglich durch kombinierte Blockade von TLR2 und TLR4 eine signifikante Herabregulierung der Immunantwort detektiert werden, obwohl der biologische Effekt der kombinierten Blockade den der einzelnen TLR-Antikörper nur geringfügig überstieg.

Bei den *R. arrhizus*-Hyphen fand sich durch den Einsatz einzelner TLR-Antikörper eine um 17 bis 24 % reduzierte ROS-Freisetzung. Die Blockade beider Rezeptoren zugleich wirkte nochmals verstärkend und verminderte die Freisetzung von ROS um 30 %.

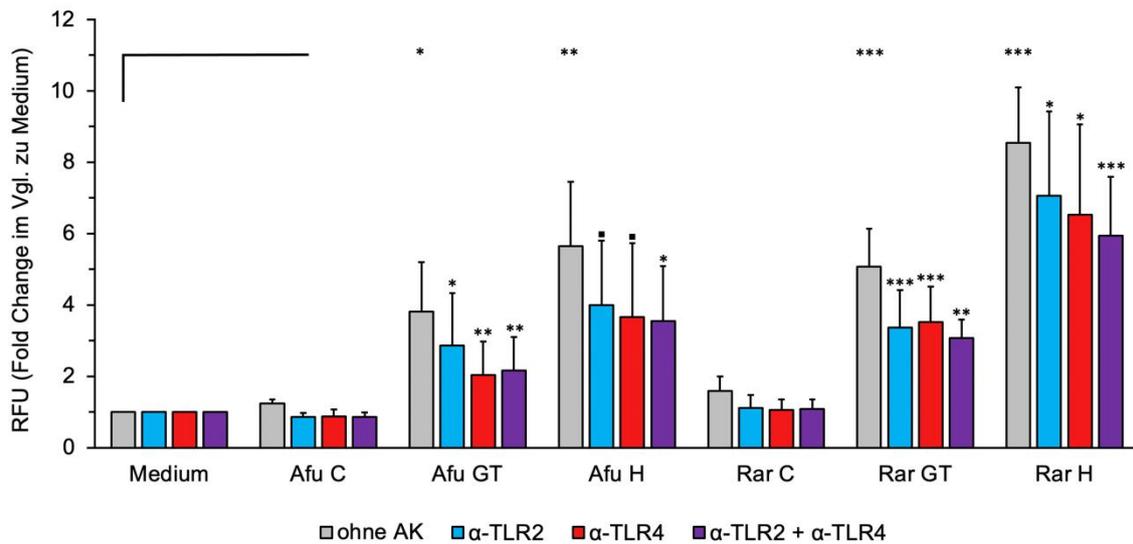


Abbildung 4.6: *Aspergillus*- und *Rhizopus*-induzierte ROS-Freisetzung durch Neutrophile nach TLR-Blockade

Gezeigt wird die ROS-Freisetzung, gemessen in RFU, nach Koinkubation von 2×10^5 Neutrophilen von 5 gesunden Spendern mit der äquivalenten Menge an Konidien (C), Keimschläuchen (GT) und Hyphen (H) von *A. fumigatus* (Afu) und *R. arrhizus* (Rar) unter Verwendung blockierender TLR- Antikörper (10 µg/ml) einzeln und in Kombination. Alle Signifikanzen wurden durch einen zweiseitigen gepaarten T-Test berechnet. *** $p < 0,001$; ** $0,001 < p < 0,01$; * $0,01 < p < 0,05$; ◻ $0,05 < p < 0,1$

4.1.5. Oxidativer Burst - Neutrophile nach Stimulation mit *A. fumigatus* und *R. arrhizus* und Blockade des TLR2, TLR4 und Dectin-1-Rezeptors

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Blockade von Dectin-1 einen relevanten Einfluss auf die ROS-Freisetzung von Neutrophilen nach Koinkubation mit *A. fumigatus* und *R. arrhizus* nimmt. Nachdem im vorangegangenen Versuch gezeigt werden konnte, dass Konidien beider Spezies keine verstärkte Freisetzung von ROS in Neutrophilen auslösen, wurde im folgenden Experiment auf den Einsatz von Konidien verzichtet. 2×10^5 neutrophile Granulozyten von fünf Spendern wurden mit der äquivalenten Menge an inaktivierten Keimschläuchen und Hyphen von *R. arrhizus* und *A. fumigatus* unter Einsatz blockierender TLR2-, TLR4- und/oder Dectin-1-Antikörper

koinkubiert und die ROS-Freisetzung analysiert (siehe Abbildung 4.7). Keimschläuche und Hyphen beider Erreger stimulierten im Vergleich zu Medium-Kontrollprobe um Faktor 4,4 bis 5,8. Bei der Kokultur von Neutrophilen mit beiden Pilzspezies verursachte bereits die alleinige Blockade des Dectin-1-Rezeptors eine 38 bis 43 %ige Reduktion der ROS-Antwort im Vergleich zur stimulierten Probe ohne Antikörper. Diese Reduktion erreichte nahezu das Ausmaß, das durch die kombinierte Blockade von TLR2 und TLR4 erzielt wurde (48 – 55 %). Die Kombination aller drei Antikörper verursachte bei beiden ausgekeimten Morphotypen von *Aspergillus* eine weitere geringfügige Reduktion der ROS-Antwort, wohingegen bei *Rhizopus*-Keimschläuchen und -Hyphen gegenüber der kombinierten TLR2/TLR4-Blockade kein additiver Effekt auf den oxidativen Burst beobachtet wurde.

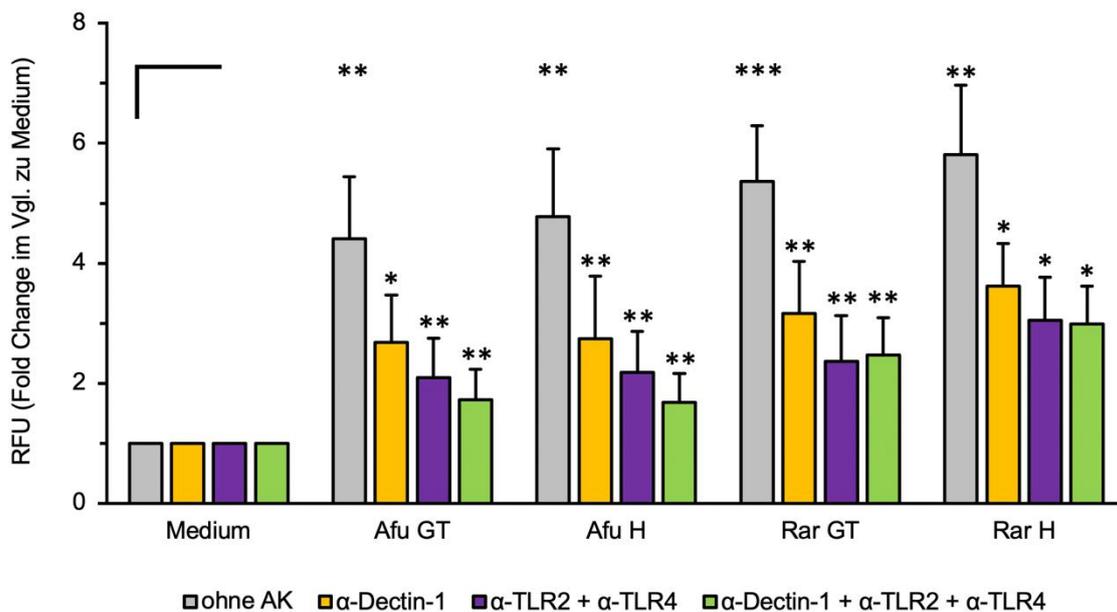


Abbildung 4.7: Freisetzung ROS durch Neutrophile nach TLR- und Dectin-1-Blockade

Gezeigt wird die ROS-Freisetzung gemessen in RFU nach Koinkubation von 2×10^5 Neutrophilen von 5 gesunden Spendern mit Keimschläuchen (GT) und Hyphen (H) von *A. fumigatus* (Afu) und *R. arrhizus* (Rar) unter Verwendung blockierender TLR- Antikörper (je 10 $\mu\text{g/ml}$ α -TLR2 und α -TLR4) und/oder eines Dectin-1-Antikörpers (10 $\mu\text{g/ml}$ α -Dectin-1). Der Dectin-1-Antikörper wurde sowohl einzeln als auch in Kombination mit den TLR-Antikörpern eingesetzt. Alle Signifikanzen wurden durch einen zweiseitigen gepaarten T-Test berechnet. *** $p < 0,001$; ** $0,001 < p < 0,01$; * $0,01 < p < 0,05$

4.1.6. Phagozytose - Neutrophile nach Stimulation mit *A. fumigatus* und *R. arrhizus* und Blockade des TLR2, TLR4 und Dectin-1-Rezeptors

Eine weitere wichtige Effektorfunktion von Neutrophilen ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose von Erregern. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Konidien von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* von Neutrophilen phagozytiert werden. Hierzu wurden Neutrophile von 5 Spendern (n = 5) mit inaktivierten FITC-markierten *R. arrhizus*-Konidien in Gegenwart von TLR2-, TLR4- und Dectin-1-Antikörpern über einen Zeitraum von 3 h bei 37 °C kokultiviert. Der Anteil der FITC-positiven Neutrophilen wurde anschließend wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben durchflusszytometrisch quantifiziert (siehe Abbildung 4.8). Die unspezifische Adsorption von Konidien an die Neutrophilen wurde anhand einer bei -4° C inkubierten Probe gemessen und von allen Phagozytoseraten subtrahiert. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 4.9 zusammengefasst.

Konidien von *A. fumigatus* wiesen eine sehr geringe Phagozytoserate auf (0,34 %), sodass keine zuverlässige Aussage über die Wirkung der PRR-Antikörper getroffen werden konnte. Die Phagozytoserate von *R. arrhizus*-Konidien hingegen lag bei über 36 %. Die Blockade von TLR2 löste im Vergleich zur Kontrollprobe ohne Antikörper keine signifikante Reduktion der Phagozytose von *R. arrhizus*-Konidien aus, wohingegen der alleinige Einsatz von TLR4- und Dectin-1-Antikörpern eine signifikante Verminderung der Phagozytoserate (relative Reduktion von 59% bzw. 38 %) bewirkte. Der kombinierte Einsatz sowohl beider TLR-Antikörper als auch aller drei Antikörper resultierte in einer weiteren Verminderung der Phagozytoseaktivität um insgesamt 66 bis 72 %.

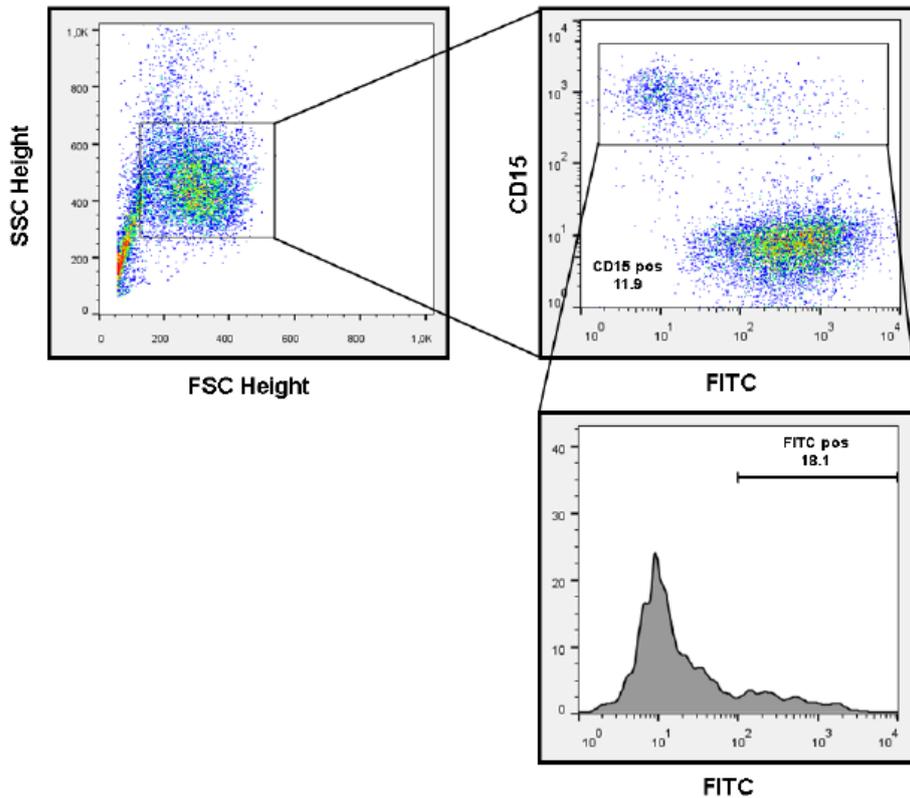


Abbildung 4.8: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Phagozytoserate

Jeweils 1×10^5 Neutrophile von 5 Spendern wurden mit der äquivalenten Menge inaktivierter FITC-markierten Konidien von *R. arrhizus* für 3 h unter der Anwendung von TLR2-, TLR4-, und Dectin-1-Antikörpern kokultiviert. Neutrophile wurden mit anti-CD15-APC gefärbt. Der Anteil der FITC-positiven Zellen an den CD15-positiven Neutrophilen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurde zunächst die Neutrophilen-Population anhand der FSC/SSC (Forward Scatter/Side Scatter) Messwerte orientierend eingegrenzt. Im Anschluss daran wurde aus dieser Population der Anteil der CD15-positiven Zellen ausgewählt. Danach konnte der Anteil der FITC-positiven Zellen aus der Population der CD15-positiven Zellen mittels eines Histogramm-Plots ermittelt werden.

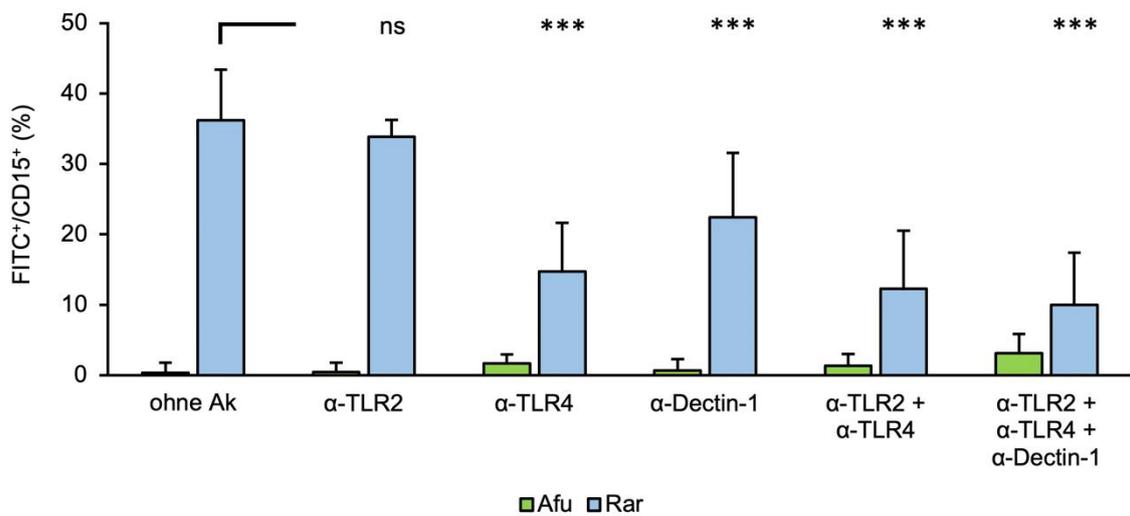


Abbildung 4.9: Phagozytoserate von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* Konidien durch neutrophile Granulozyten nach Blockade verschiedener PRRs

Dargestellt wird die neutrophile Phagozytoserate nach Koinkubation von 1×10^5 Neutrophilen mit der äquivalenten Menge an FITC-markierten Konidien von *A. fumigatus* (Afu) und *R. arrhizus* (Rar) unter Einsatz von TLR2, TLR4 (α -TLR2 und α -TLR4) und Dectin-1-Antikörpern (α -Dectin-1) in einer Konzentration von 10 μ g/ml. Die Hintergrund-Phagozytoserate bei -4 °C wurde von allen Werten subtrahiert. Durchflusszytometrisch wurde der Anteil FITC-positiven Zellen unter CD15-positiven Zellen bestimmt. Alle Signifikanzen wurden durch einen zweiseitig gepaarten T-Test berechnet. *** $p < 0,001$; ns (nicht signifikant) $p > 0,1$

4.2. Teil II – Koinkubationsexperimente mit mononukleären Zellen

4.2.1. Stimulation der IL-1 β und TNF- α mRNA-Expression mononukleärer Zellen durch Konidien und ausgekeimte Stadien von *R. arrhizus*

PBMCs, Monozyten und moDCs wurden mit verschiedenen Morphotypen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* koinkubiert und anschließend die Transkription von Zytokinen mittels RT-qPCR gemessen. Abbildung 4.10 stellt die relative Expression der mRNA von TNF- α und IL-1 β als Surrogat einer proinflammatorischen Immunantwort dar, nachdem PBMCs (2×10^6 Zellen), Monozyten (1×10^6 Zellen) und moDCs (5×10^5 Zellen) von fünf Spendern mit der jeweils äquivalenten Menge an Konidien und Keimschläuchen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* über einen Zeitraum von 6 Stunden koinkubiert wurden. Im Vergleich zur Medium-Kontrollprobe bewirkten die Konidien von *A. fumigatus* keine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β in PBMCs, Monozyten und moDCs. Konidien von *R. arrhizus* hingegen stimulierten die TNF- α - und IL-1 β -mRNA-Expression in PBMCs und Monozyten um Faktor 20,9 bis 23,2 ($p < 0.05$). Die Keimschläuche von *A. fumigatus* konnten in allen Zellreihen sowohl die TNF- α - also auch IL-1 β -mRNA Expression im Vergleich zur Medium-Kontrollprobe und zur *Aspergillus*-Konidien-Probe steigern. Das Signifikanzniveau wurde allerdings auf Grund inter-individueller Unterschiede nicht für alle Zelltypen erreicht. Die Keimschläuche von *R. arrhizus* lösten in allen drei Zellreihen eine Steigerung der TNF- α -mRNA-Expression (in PBMCs um Faktor 20,5, in Monozyten um Faktor 12,7 und in moDCs um Faktor 85,2) im Vergleich zu der Medium-Kontrollprobe aus. Ebenso wurde eine ähnlich hohe Steigerung der IL-1 β -mRNA-Expression beobachtet, wobei die Signifikanzniveaus wegen des bereits oben erwähnten Aspektes nicht in allen Fällen erreicht wurden. Bei PBMC und Monozyten zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen *Rhizopus*-Keimschlauch- und *Rhizopus*-Konidienprobe. In moDCs konnten durch Koinkubation mit *Rhizopus*-Keimschläuchen eine 5-fach verstärkte Expression der TNF- α -mRNA sowie eine 2-fach verstärkte Expression der IL-1 β -mRNA verglichen zur *Rhizopus*-Konidienprobe festgestellt werden.

Zusammengenommen dokumentieren diese Ergebnisse, dass im Gegensatz zu *A. fumigatus* sowohl ruhende als auch ausgekeimte Stadien von *R. arrhizus* eine proinflammatorische Zytokinantwort in diversen mononukleären Zellpopulationen induzieren.

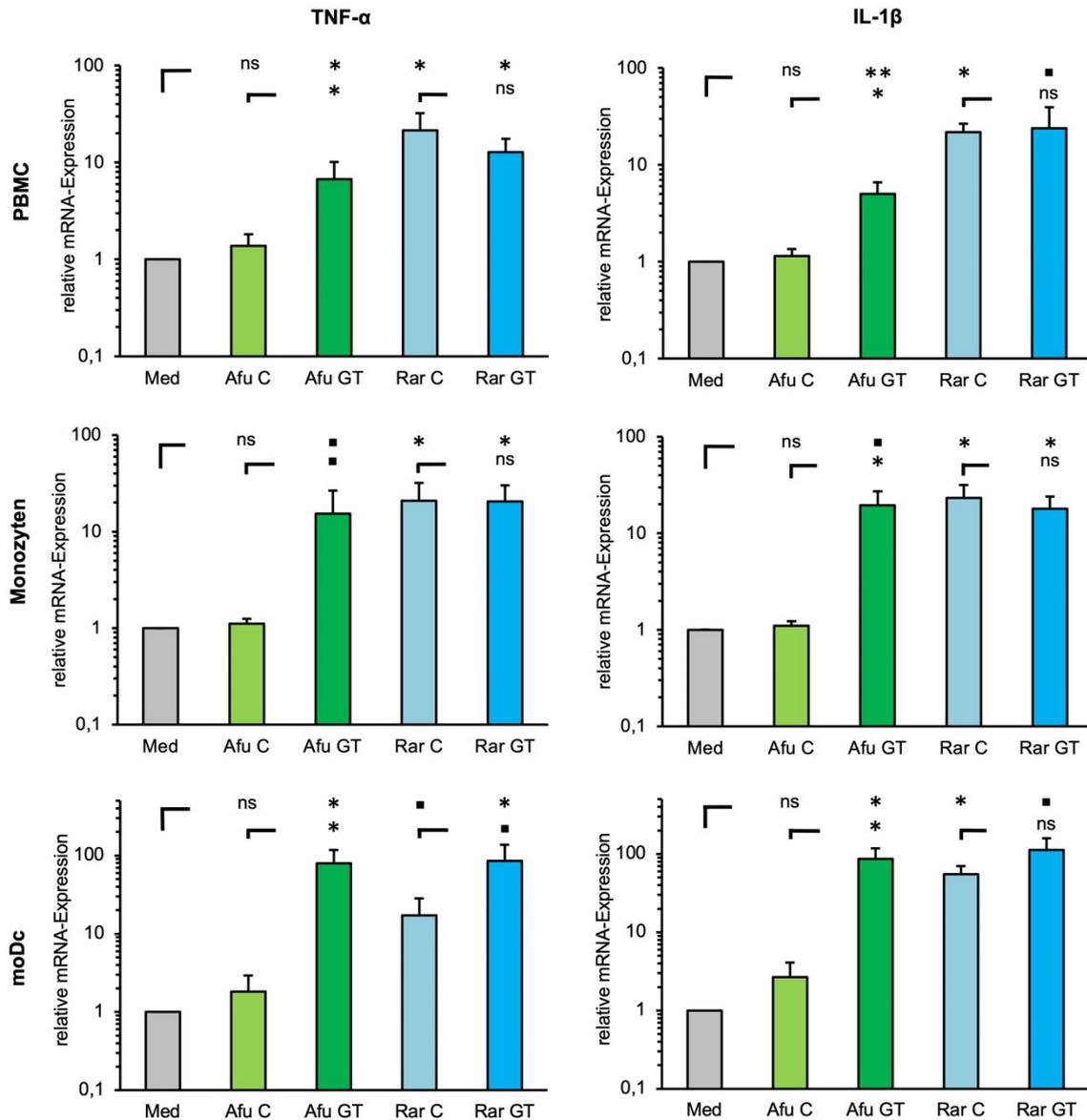


Abbildung 4.10: Stimulation der Zytokin-Genexpression mononukleärer Zellen durch ruhende und ausgekeimte Stadien von *A. fumigatus* und *R. arrhizus*

Nach 6-stündiger Koinkubation von PBMC (2×10^6), Monozyten (1×10^6), moDCs (5×10^5) von je fünf Spendern mit der äquivalenten Menge an Konidien (C) und Keimschläuchen (GT) von *A. fumigatus* (Afu) und *R. arrhizus* (Rar) wurde die relative Expression von TNF- α und IL-1 β -mRNA mittels RT-qPCR bestimmt. Die Signifikanzen wurden im zweiseitigen gepaarten T-Test zum einen zur Medium-Kontrollprobe und zum anderen zwischen Kokulturen mit C und GT der jeweiligen Spezies berechnet. ** $0,001 < p < 0,01$; * $0,01 < p < 0,05$; ■ $0,05 < p < 0,1$

4.2.2. Dectin-1-Knockdown in moDCs

4.2.2.1. Relative CLEC7A-Expression nach Dectin-1-Knockdown

Dectin-1 stellt einen wichtigen Rezeptor für fungale β -Glukane dar (Taylor et al., 2002). Nachdem in Vorexperimenten vergeblich versucht wurde Dectin-1 (CLEC7A) auf moDCs durch den Einsatz von sehr hohen Konzentrationen an Dectin-1-Antikörpern (33 μ l bei einer Konzentration von 10 μ g/ml) zu blockieren, wurde der Ansatz verfolgt, das Dectin-1-Gen (CLEC7A) durch Transfektion mittels RNA-Interferenz (siRNA) auszuschalten. Hierzu wurden moDCs mit einer CLEC7A-siRNA (siCLEC7A) sowie mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA (siCtrl) kokubiert. Im Anschluss wurde mittels RT-qPCR die relative mRNA-Expression von CLEC7A gemessen. In Abbildung 4.11 wird die Herabregulation durch Einsatz der siCLEC7A im Vergleich zur Mediumprobe deutlich. Es konnte eine um 93 % verminderte Expression von CLEC7A-mRNA verzeichnet werden. Im Gegensatz hierzu blieb die CLEC7A-Transkription durch die verwendete Kontroll-siRNA oder alleinige Exposition gegenüber dem Transfektionsreagenz HiPerFect® (Quiagen) unbeeinflusst.

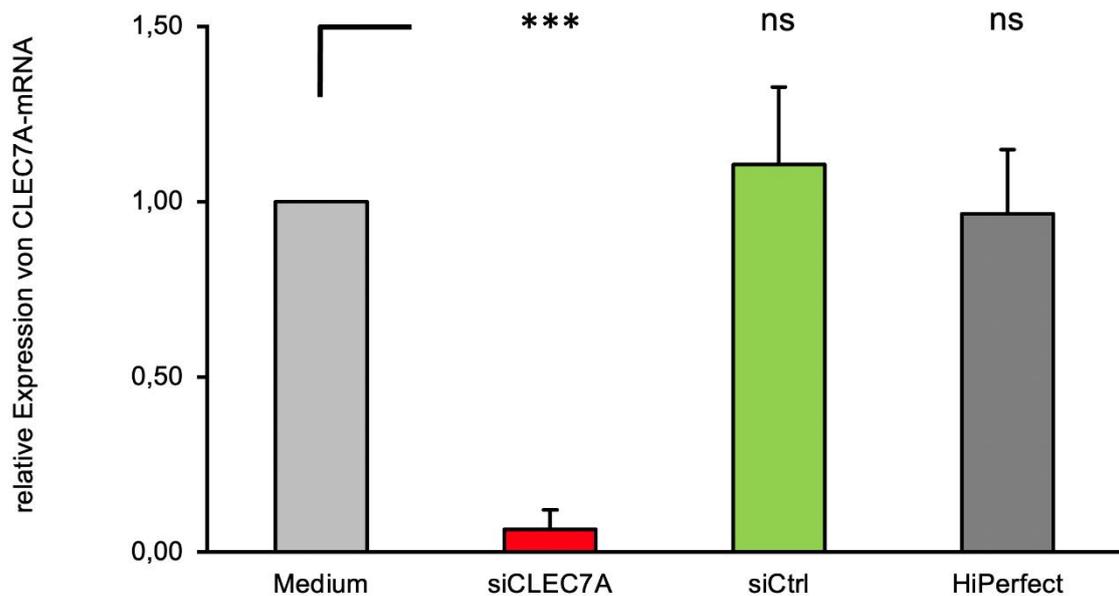


Abbildung 4.11: Validierung der Suppression der CLEC7A-mRNA Expression nach RNA-Interferenz in moDCs

Dargestellt wird die relative Expression von CLEC7A-mRNA in moDCs (2×10^5) von 5 verschiedenen Spendern ($n=5$), die zuvor mit einer CLEC7A-siRNA (siCLEC7A) oder einer Kontroll-siRNA (siCtrl) transfiziert wurden. Als Transfektionsreagenz wurde HiPerFect® verwendet. Die Signifikanzen wurden durch einen zweiseitigen gepaarten T-Test zur Medium-Kontrollprobe berechnet. *** $p < 0,001$; ns (nicht signifikant) $p > 0,1$

4.2.2.2. Relative IL-1 β -mRNA- Expression und IL-1 β -Sekretion nach Dectin-1-Knockdown in moDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* und *R. arrhizus*

Zur Isolation von Monozyten und anschließender Generierung von moDCs wurden PBMC von fünf Spendern gewonnen. Ein Teil der moDCs wurde mit einer CLEC7A-siRNA zur Ausschaltung der Genexpression von CLEC7A transfiziert. Zugleich wurde ein zweiter Teil der moDCs mit einer Kontroll-siRNA (siCtrl) behandelt. Zymosan *depleted*, ein Dectin-1-Agonist, wurde ebenso wie Konidien, Keimschläuche und Hyphen von *A. fumigatus* bzw. *R. arrhizus* mit den transfizierten moDCs koinkubiert. Im Anschluss wurde die relative Expression

von IL-1 β -mRNA durch eine RT-qPCR (siehe Abbildung 4.12) und die Freisetzung von IL-1 β mittels ELISA (siehe Abbildung 4.13) gemessen.

Der Dectin-1-Stimulus Zymosan *depleted* bewirkte in siCtrl-transfizierten moDCs eine 30,6-fache Hochregulation der IL-1 β -mRNA-Expression ($p = 0,005$) gegenüber der Medium-Kontrollprobe. Die Transfektion mit CLEC7A-siRNA reduzierte die Zymosan *depleted*-induzierte IL-1 β -Transkription um 80 % ($p = 0,007$). Wie bereits beim vorherigen Experiment bewirkten Konidien von *A. fumigatus* lediglich eine 1,9-fache Steigerung der IL-1 β -mRNA-Expression. Im Gegensatz dazu ließen Konidien von *R. arrhizus* die IL-1 β -mRNA-Expression um das 15,6-fache ansteigen. Die Keimschläuche beider Pilzspezies bewirkten eine 17 bis 22-fache Hochregulation der IL-1 β -mRNA-Expression. Die Transfektion mit CLEC7A-siRNA reduzierte die IL-1 β -Transkription um 30 % bei *A. fumigatus*-Konidien, um 65 % bei *A. fumigatus*-Keimschläuchen, um 46 % bei *R. arrhizus* Konidien und um 50 % bei *R. arrhizus* Keimschläuchen. Hyphen von *A. fumigatus* lösten eine 16-fache Steigerung und *R. arrhizus*-Hyphen eine 12-fache Steigerung der IL-1 β -mRNA-Expression aus. Durch die Ausschaltung von CLEC7A wurde die IL-1 β -mRNA-Expression sowohl bei *A. fumigatus*-Hyphen als auch *R. arrhizus*-Hyphen um 68 % reduziert.

Auch auf der Ebene der mittels ELISA quantifizierten Sekretion von IL-1 β bewirkte Zymosan *depleted* in siCtrl-transfizierten moDCs eine 56-fache Steigerung der IL-1 β -Sekretion (siehe Abbildung 4.13). Die Transfektion mit CLEC7A-siRNA reduzierte die Zymosan *depleted*-induzierte IL-1 β -Ausschüttung um 81,7 %. Konidien von *A. fumigatus* bewirkten in siCtrl-transfizierten moDCs nur eine 1,7-fache Steigerung der IL-1 β -Sekretion, während Konidien von *R. arrhizus* die IL-1 β -Sekretion um mehr als das 8-fache ansteigen ließen. Die Keimschläuche beider Pilzspezies bewirkten eine 17- bis 28-fache Steigerung der IL-1 β -Sekretion. Die Transfektion mit CLEC7A-siRNA reduzierte die Ausschüttung von IL-1 β um 5 % bei Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien, um 75 % bei *A. fumigatus*-Keimschläuchen, um 78 % bei *R. arrhizus* Konidien und um 71 % bei *R. arrhizus* Keimschläuchen. Hyphen beider Pilzspezies ließen die IL-1 β -Sekretion um das 17 bis 28-fache ansteigen. Durch die Ausschaltung von

CLEC7A wurde die Sekretion von IL-1 β durch *A. fumigatus*-Hyphen um 83 % und durch *R. arrhizus*-Hyphen um 79 % reduziert. Zusammengenommen weisen diese Daten auf eine Beteiligung von Dectin-1 an der Erkennung von ruhenden und ausgekeimten Stadien von Mucorales und an der Induktion einer proinflammatorischen Zytokinantwort hin.

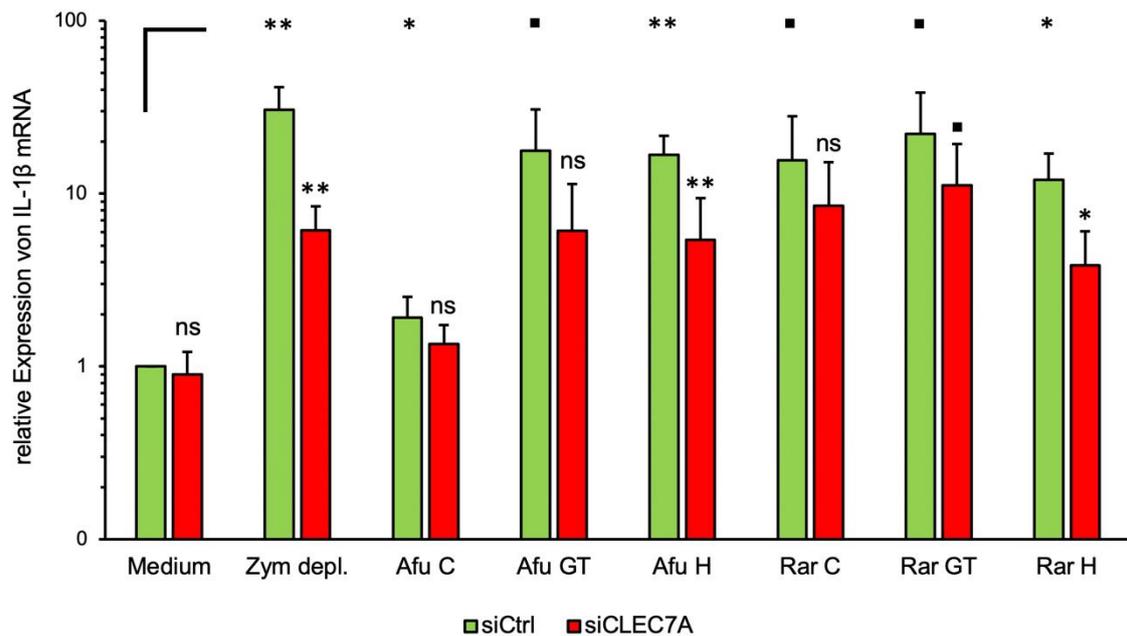


Abbildung 4.12: Relative Expression von IL-1 β -mRNA in transfizierten moDCs nach Stimulation mit ruhenden und ausgekeimten Morphotypen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus*

moDCs (2×10^5) von 5 Spendern wurden mit der äquivalenten Menge an Konidien (C), Keimschläuche (GT) und Hyphen (H) von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* stimuliert. Die moDCs wurden mit einer CLEC7A-siRNA (siCLEC7A) sowie einer Kontroll-siRNA (siCtrl) transfiziert. Die relative Expression von IL-1 β -mRNA wurde mittels RT-qPCR gemessen. Die Signifikanzen wurden im zweiseitigen gepaarten T-Test zum einen zur Medium-Kontrollprobe und andererseits zwischen den mit siCtrl und siCLEC7A transfizierten moDCs berechnet. ** $0,001 < p < 0,01$; * $0,01 < p < 0,05$; ■ $0,05 < p < 0,1$

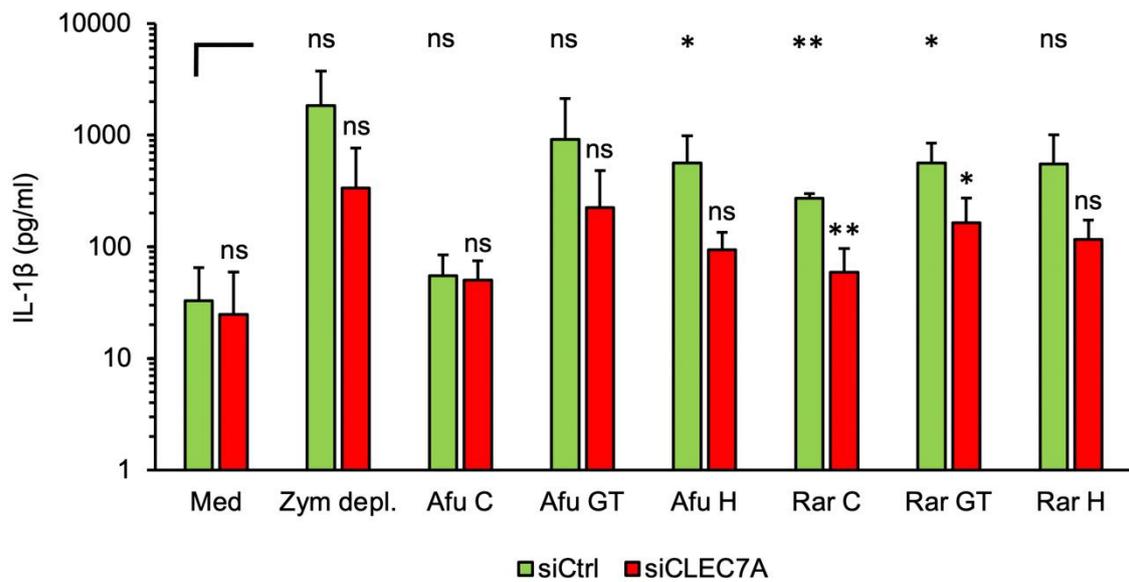


Abbildung 4.13: Freisetzung von IL-1 β durch transfizierte moDCs nach Stimulation mit ruhenden und ausgekeimten Morphotypen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus*

moDCs (2×10^5) von 5 Spendern wurden mit einer CLEC7A-siRNA (siCLEC7A) oder einer Kontroll-siRNA (siCtrl) transfiziert und anschließend mit der äquivalenten Menge an Konidien (C), Keimschläuche (GT) und Hyphen (H) von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* stimuliert. Die IL-1 β -Sekretion wurde sodann mittels ELISA in den Kulturüberständen gemessen. Die Signifikanzen wurden im zweiseitigen gepaarten T-Test zur jeweiligen Kontroll-siRNA-Probe berechnet.

** $0,001 < p < 0,01$; * $0,01 < p < 0,05$; \square $0,05 < p < 0,1$

5. DISKUSSION

Die diagnostischen und therapeutischen Optionen bei Mucormykosen sind weiterhin limitiert, was eine vergleichsweise hohe Letalitätsrate zur Folge hat. Abhängig von der Lokalisation variiert diese zwischen 50 und 100 % (Ribes et al., 2000, Roden et al., 2005). Die Letalitätsraten von Candidosen und Aspergillosen liegen zwischen 20 bis 50 % und 35 bis 45 % (Horn et al., 2009, Burgos et al., 2008, Steinbach et al., 2012). Diese Zahlen machen deutlich, dass neben der aktuellen Diagnostik und Therapieform unbedingt Verbesserungen erforderlich sind, die darauf abzielen Mucormykosen frühzeitig zu erkennen und adäquat zu behandeln. Ebenso drängt die stetig zunehmende Inzidenz dieser verheerenden Infektion, die zum Teil aus der immer häufigeren Anwendung immunsuppressiver Therapien resultiert, nach weiteren Entwicklungen im Management von Mucormykosen. Ein besseres Verständnis der Immunpathologie wäre sowohl für die Entwicklung immunologischer Biomarker als auch für immuntherapeutische Optionen wie die CAR-T-Zell-Therapie (siehe Kapitel 1.4.5.) von Bedeutung. Von ebenso enormer Wichtigkeit ist die Erforschung der prädisponierenden Risikofaktoren für Mucormykosen, wie z. B. Mutationen in Genen für immunologische Signalkaskaden.

Gegenstand dieser Arbeit sind daher die an der Erkennung von *R. arrhizus* beteiligten PRRs verschiedener Immunzellen des innate Immunsystems und deren Einleitung einer Immunantwort. Darüber hinaus wurde die morphotypabhängige Relevanz der PRRs bei verschiedenen Immunzellen bei Kontakt mit *R. arrhizus* genauer untersucht. Die an der Erkennung von *Aspergillus spp.* morphotypabhängig beteiligten PRRs und konsekutiv aktivierten Signalkaskaden wurden bereits vielfach untersucht (siehe Kapitel 1.5.3. und 1.5.4.). Aus diesem Grund wurden alle Experimente vergleichend mit der Spezies *A. fumigatus* durchgeführt, welche derzeit den häufigsten Erreger von invasiven Schimmelpilz-Infektionen repräsentiert (Eucker et al., 2001).

Die involvierten PRRs innater Immunzellen bei Kontakt mit Mucorales waren hingegen bislang selten Gegenstand experimenteller Untersuchungen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten eine TLR2-, TLR4-

und Dectin-1-abhängige Stimulation humaner innater Immunzellpopulationen sowohl durch Konidien als auch ausgekeimte Stadien von *R. arrhizus* nachweisen.

5.1. Basale Stimulation der innaten Immunzellen durch diverse Morphotypen von *R. arrhizus*

Um die morphotypabhängige Immunantwort gegenüber Mucorales zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Koinkubationsexperimente von verschiedenen innaten Immunzellen mit ruhenden und ausgekeimten Morphotypen von *R. arrhizus* durchgeführt. Wie bei *A. fumigatus* lösten Keimschläuche und Hyphen von *R. arrhizus* in humanen PBMCs, Monozyten und moDCs erwartungsgemäß eine vermehrte relative Expression von TNF- α und IL-1 β als Surrogat einer proinflammatorischen Immunantwort aus. Anders als bei *A. fumigatus* induzierten allerdings auch die ruhenden Konidien von *R. arrhizus*, die sogenannten Sporangiosporen, eine frühe und starke proinflammatorische Zytokinantwort in verschiedenen mononukleären Zellpopulationen (siehe Abbildung 4.10).

Im Einklang mit diesen transkriptionellen Ergebnissen wurde durch unsere Arbeitsgruppe eine vermehrte Sekretion von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF und MCP (*monocyte chemotactic protein*) nach Koinkubation von PBMCs mit Konidien und Keimschläuchen von *R. arrhizus* nachgewiesen (Wurster et al., 2017b). Des Weiteren wurde die proinflammatorische Zytokinantwort von PBMCs bei Kokulturrexperimenten mit Konidien diverser humanpathogener Mucorales Spezies (*Cunninghamella bertholletiae*, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiernalis*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus* und *Rhizopus microsporus*) bestätigt. Dies lässt darauf schließen, dass verschiedene Mucorales-Spezies ähnliche strukturelle oder metabolische Eigenschaften in Bezug auf die Stimulation mononukleärer Zellen und deren konsekutive Zytokinsekretion besitzen (Wurster et al., 2017b).

Mehrere Studien einschließlich einer Arbeit unserer Gruppe konnten wesentliche Unterschiede im Zellwandaufbau zwischen *A. fumigatus* und *R. arrhizus*

herausarbeiten, die für die unterschiedliche Wirkung ruhender Konidien verantwortlich sein können. Zum einen besitzen *R. arrhizus* und andere Mucorales im Vergleich zu *Aspergillus spp.* einen wesentlich höheren Anteil an Chitin und Chitosan (Lewis et al., 2012). Dies lässt sich durch die höhere Anzahl an Chitinsynthasen und Chitindeacetylasen im Genom von *R. arrhizus* im Vergleich zu *A. fumigatus* erklären, wodurch diese Zellwandbestandteile vermehrt synthetisiert werden können (Davis and Bartnicki-Garcia, 1984). *A. fumigatus* hingegen besitzt im Vergleich zu *R. arrhizus* vermehrt Gene, die für die $\beta(1,3)$ -D-Glucan-Synthase codieren (Ma et al., 2009). Zum anderen sind Konidien von *A. fumigatus* von einem protektiven hydrophoben *Rodlet-Layer* umgeben. Neben dessen Relevanz bei der aerogenen Dissemination der Konidien werden durch diesen auch die immunogenen Oberflächenstrukturen der Konidien maskiert. Während der Maturierung verliert *A. fumigatus* diesen *Rodlet-Layer* und ist somit über die freigelegten Oberflächenstrukturen für innate Immunzellen erkenntlich, was beispielsweise bei Neutrophilen in einer stärkeren Freisetzung von ROS resultiert (Aimanianda et al., 2009). Bei *R. arrhizus* konnte jedoch im Gegensatz zu Ascomyzeten elektronenmikroskopisch und mittels bioinformatischer Analysen kein Äquivalent zu diesen *Rodlet*-Hydrophobinen nachgewiesen werden (Wurster et al., 2017b). Auch die Behandlung von *R. arrhizus* mit Flusssäure, die Phosphordiesterbindungen spaltet und damit bei *A. fumigatus* die *Rodlet*-Hydrophobine von den tieferen Zellwandstrukturen abspaltet, führte bei *R. arrhizus* weder in Bezug auf die Immunogenität noch die elektronenmikroskopisch sichtbare Oberflächenstruktur zu signifikanten Veränderungen (Wurster et al., 2017b). Daher ist davon auszugehen, dass die proinflammatorische Immunogenität von Mucorales-Konidien zumindest teilweise auf eine fehlende *Rodlet*-Hydrophobin-Schicht zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zur Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort mononukleärer Zellen wurde in den Koinkubationsexperimenten mit Neutrophilen aber interessanterweise keine vermehrte ROS-Freisetzung durch *R. arrhizus*-Konidien induziert (siehe Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Ausgekeimte Stadien von *R. arrhizus* induzierten allerdings in neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu *A. fumigatus* eine wesentlich stärkere ROS-Freisetzung (siehe Abbildung 4.2).

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit einer Studie von Chamilos et al., die ebenfalls eine deutlich erhöhte Stimulation der ROS-Freisetzung von Neutrophilen durch *R. arrhizus*-Hyphen gegenüber *A. fumigatus*-Hyphen fand (Chamilos et al., 2008a). Obwohl in beiden Studien Hyphen von *Rhizopus* im Vergleich zu *Aspergillus* eine deutlich höhere ROS-Freisetzung induzierten, stellten Chamilos et al. fest, dass die Hyphenschädigung durch Neutrophile bei *R. arrhizus*-Hyphen signifikant vermindert ausfällt im Vergleich zu *A. fumigatus*-Hyphen (Chamilos et al., 2008a). Dies könnte möglicherweise auf eine höhere Resistenz von *R. arrhizus* gegenüber Sauerstoffradikalen und anderen von Neutrophilen sezernierten zytotoxischen Metaboliten hinweisen.

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben konnten *R. arrhizus*-Konidien zwar keine vermehrte ROS-Freisetzung in Neutrophilen bewirken, jedoch provozierte die Stimulation mit *R. arrhizus*-Konidien die Phagozytose durch Neutrophile (siehe Abbildung 4.9). Zudem besitzen Neutrophile neben der Phagozytose einen weiteren effektiven Abwehrmechanismus gegen *Rhizopus*-Konidien in Form der NP-1- und NP-2-Sekretion (siehe Kapitel 1.5.1.). Zusammengenommen legen diese Beobachtungen den Schluss nahe, dass die verschiedenen Effektorfunktionen von Neutrophilen durch unterschiedliche Zellwandbestandteile oder Oberflächenmoleküle induziert werden, die in Mucorales-Konidien unterschiedlich stark exprimiert werden. Ebenso könnte auch das Inaktivierungsverfahren der Pilzkonidien mittels Ethanol unterschiedlich stark mit den neutrophilen Effektorfunktionen interferieren.

5.2. Relevanz der verschiedenen PRRs bei der Erkennung von ruhenden und ausgekeimten Mucorales-Stadien

Die morphotypabhängige Interaktion zwischen Mucorales und menschlichen innatem Immunzellen wurde bislang auch hinsichtlich der involvierten PRRs kaum untersucht. Aus vorangegangenen Studien war bereits bekannt, dass *A. fumigatus*-Antigene neutrophile Granulozyten über TLR2 und TLR4 stimulieren (Braedel et al., 2004), was in der vorliegenden Arbeit reproduziert

werden konnte. Die Blockade von TLR2, TLR4 und Dectin-1 durch rezeptorspezifische Antikörper führte folglich bei ausgekeimten Stadien von *A. fumigatus* wie zu erwarten zu einer reduzierten Immunantwort in Form einer verminderten ROS-Freisetzung.

In einer früheren Studie wurde nach Exposition gegenüber *R. arrhizus*-Hyphen eine Hochregulierung der TLR2-mRNA in Neutrophilen beobachtet, was eine Beteiligung von TLR2 bei der Erkennung dieses Erregers suggeriert (Chamilos et al., 2008a). Des Weiteren wurde durch *R. arrhizus* die Expression von weiteren 25 Genen, die in den TLR-Signalweg involviert sind, stimuliert. Unter anderem wurde eine starke Hochregulierung der CD14-, MYD88- sowie der TNF- α - und IL-1 β -mRNA in *Rhizopus*-exponierten Neutrophilen gezeigt (Chamilos et al., 2008a). Darüber hinaus konnte eine weitere Studie zeigen, dass vor allem Hyphen von *R. arrhizus* über TLR2 proinflammatorische Gene wie IL-1 β und TNF- α in Neutrophilen aktivieren (Gil-Lamaignere et al., 2005). Allerdings stellen transkriptionelle Studien keinen Beweis für eine funktionelle Beteiligung der jeweiligen Rezeptoren dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher durch Einsatz spezifischer blockierender Rezeptorantikörper die funktionelle Relevanz von TLR2, TLR4 und Dectin-1 bei der Erkennung von *R. arrhizus* durch neutrophile Granulozyten beurteilt. Hierbei wurde gezeigt, dass Keimschläuche und Hyphen von *R. arrhizus* nach Blockade von TLR2, TLR4 und Dectin-1 auf Neutrophilen eine deutlich reduzierte ROS-Freisetzung auslösen (siehe Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7). Diese Daten legen nahe, dass alle drei Rezeptoren bei der ROS-Antwort gegenüber ausgekeimten Stadien von *R. arrhizus* beteiligt sind. Allerdings besteht die Notwendigkeit, die Relevanz dieser Rezeptoren in zukünftigen Studien anhand weiterer Mucorales-Isolate zu bestätigen. Bei der Stimulation Neutrophiler und der damit induzierten ROS-Freisetzung durch ausgekeimte Stadien beider Pilzspezies zeigte sich ein Trend, dass die alleinige Blockade von Dectin-1 fast genauso stark die ROS-Freisetzung minderte wie die kombinierte Blockade von TLR2 und TLR4. Interessanterweise scheint auch die Blockade der Rezeptoren nur bedingt additiv zu wirken, was weitere unergründete Signalwege selbst bei Ausfall aller drei Rezeptoren nahelegt.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit die Relevanz der einzelnen PRRs bei der neutrophilen Phagozytoseaktivität untersucht. Konidien von *R. arrhizus* spielten in den oben diskutierten ROS-Freisetzung durch Neutrophile eine untergeordnete Rolle. Dahingegen phagozytierten Neutrophile die Konidien von *R. arrhizus* relativ effizient innerhalb weniger Stunden (durchschnittlich 36,2 % in 3 h). Konidien von *A. fumigatus* wurden im Gegensatz zu *R. arrhizus* in diesem Zeitraum unter den gewählten experimentellen *in vitro* Bedingungen nur gering phagozytiert (siehe Abbildung 4.9). Die Blockade von TLR2 verminderte die Phagozytoseaktivität von *R. arrhizus*-Konidien nur unwesentlich und scheint demzufolge keine wichtige Rolle für die Induktion der Phagozytose zu spielen. Die Anwendung von TLR4- und Dectin-1-Antikörpern hingegen supprimierte die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen signifikant, sodass rückschließend die beiden Rezeptoren einen wichtigen Aktivator für die neutrophile Phagozytose darzustellen scheinen (siehe Abbildung 4.9).

Während diese Ergebnisse grundlegende Rückschlüsse über eine funktionelle Beteiligung der untersuchten Rezeptoren erlauben, muss erwähnt werden, dass isolierte *in vitro* Experimente, die *in vivo* Situation zu einzelnen Effektorfunktionen nur unzureichend abbilden können. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten durch Zytokine und Hämatopoetine modulierbar ist. Die *ex-vivo* G-CSF-Behandlung von Vollblut von Empfängern allogener hämatopoetischer Stammzellen und solider Organe führte beispielsweise zu einem vermehrten respiratorischen Burst gegenüber *Aspergillus*- und *Rhizopus*-Konidien (Pursell et al., 2003). Um diese komplexen Interdependenzen abbilden zu können, sind weiterführende Experimente, beispielsweise in Form eines Mausmodells mit PRR-mutierten Mäusen oder mit Blutproben bzw. Immunzell-Kulturen von Patienten mit einer entsprechenden bekannten PRR-Mutation nötig.

Da, wie oben bereits aufgeführt, Dectin-1 eine große Rolle bei der Induktion einer Immunantwort durch Neutrophile nach Stimulation mit *R. arrhizus* spielt und dieser Rezeptor bislang zugleich am wenigsten im Rahmen von Mucormykosen charakterisiert ist, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Relevanz des Dectin-1-Rezeptors von moDCs bei der Erkennung unterschiedlicher

Morphotypen von *R. arrhizus* untersucht. Dectin-1 stellt einen wichtigen Rezeptor für fungale β -Glukane dar. Allerdings sind bislang nicht in allen humanpathogenen Pilzspezies β -Glukane nachgewiesen worden. Bei Mucormykosen fällt der klinische 1,3- β -D-Glukantest in der Regel negativ aus (Cornely et al., 2014). Immunfluoreszenzstudien konnten zwar die Expression von β -Glukanen auf der Oberfläche von ausgekeimten Stadien von *A. fumigatus*- und *R. arrhizus* nachweisen, nicht jedoch auf Konidien beider Pilzspezies (Chamilos et al., 2010). Des Weiteren wurde bereits demonstriert, dass die Erkennung von ausgekeimten Stadien von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* durch moDCs Dectin-1-abhängig erfolgt (Chamilos et al., 2010). Die auf DCs exprimierten Dectin-1-Rezeptoren erkennen die auf der Pilzoberfläche befindlichen β -Glukane und induzieren über den Syk-CARD-9-Signalweg eine IL-23-Produktion, die zu einer T_H17 -Immunantwort beiträgt (LeibundGut-Landmann et al., 2007).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Koinkubationsexperimenten war das Antikörperblockadeverfahren trotz intensiver Optimierung nicht erfolgreich, was vermutlich auf die intensive Expression von Dectin-1 auf moDCs zurückzuführen war (Lothar et al., 2014). Um die Relevanz von Dectin-1 mittels eines Verfahrens nachzuweisen, welches unabhängig vom Antikörper-Blockadeverfahren ist, wurde die Genexpression von Dectin-1 in moDCs mittels CLEC7A-siRNA ausgeschaltet. Zur Kontrolle wurde ein zweiter Teil der moDCs mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach Stimulation der transfizierten moDCs mit verschiedenen Morphotypen von *A. fumigatus* und *R. arrhizus* wurde die proinflammatorische Zytokinantwort gemessen. Im Einklang mit den vorherigen Experimenten in mononukleären Zellen blieb die Transkription von IL-1 β nach Stimulation der moDCs mit Konidien von *A. fumigatus* unabhängig von der eingesetzten siRNA fast unbeeinflusst. Während eine starke basale Induktion der IL-1 β -Transkription und Sekretion durch die Konidien von *R. arrhizus* beobachtet wurde, bewirkte die Ausschaltung von Dectin-1 eine deutliche Reduktion der relativen IL-1 β -mRNA-Expression (um 46 %, siehe Abbildung 4.12) und IL-1 β -Sekretion (um 78 %, siehe Abbildung 4.13). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch die Erkennung von *R. arrhizus*-Konidien durch moDCs zumindest

teilweise Dectin-1-abhängig ist. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zur oben genannten Studie von Chamilos und Kollegen, welche lediglich eine Dectin-1-abhängige Erkennung durch moDCs bei ausgekeimten Stadien beider Pilzspezies beschreibt (Chamilos et al., 2010). Möglicherweise lässt sich dieser Unterschied durch verschiedenartige Kulturbedingungen des Pilzes, Inaktivierungsverfahren, Kokulturbedingungen oder durch das Verfahren zur Ausschaltung von Dectin-1 erklären. Ob β -Glukane als Dectin-1-Ligand auch auf ruhenden Konidien von Mucorales exprimiert werden, bleibt zudem weiterhin klärungsbedürftig. Möglicherweise sind β -Glukane zwar vorhanden, aber maskiert, sodass sie zwar für das natürliche Dectin-1 nicht jedoch für den β -Glukan-Antikörper zugänglich sind (Cornely et al., 2014). Zur eingehenden Klärung dieser Fragen wären weitergehende Studien zum morphotyp-abhängigen Aufbau der Mucorales-Zellwand nötig.

In der Gesamtschau legen die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Effekte nahe, dass Dectin-1 sowohl für die Erkennung von Konidien als auch von ausgekeimten Stadien von *R. arrhizus* relevant ist und insbesondere bei den ausgekeimten Stadien eine prominente Rolle für die Einleitung der proinflammatorischen Antwort spielt. Eine Erklärung für diese prominente Rolle könnte sein, dass durch die Ausschaltung von Dectin-1 die Funktion und Signalweiterleitung weiterer Rezeptoren moduliert wurde. Es wurde in diesem Zusammenhang beispielsweise gezeigt, dass Dectin-1 über den Syk-Signalweg die TLR-induzierte Zytokinproduktion verstärken kann (Gantner et al., 2003, Ferwerda et al., 2008, Dennehy et al., 2008). Allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit auch, dass offensichtlich weitere Rezeptoren involviert sind, die bei Ausfall von Dectin-1 eine partielle Stimulation innater Immunzellen bewirken können. Während Experimente mit kombinierter Rezeptorausschaltung in moDCs durch die Notwendigkeit des siRNA-Verfahrens kompliziert wären, zeigten unsere Ergebnisse, dass Neutrophile auch bei kombinierter Ausschaltung von TLR2, TLR4 und Dectin-1 noch eine partielle ROS-Antwort und Phagozytose von *R. arrhizus* aufrechterhalten können. Ein weiterer interessanter Rezeptor, den es auch im Hinblick auf Mucorymosen zu untersuchen gilt, ist der von Swidergall et al. beschriebene *Ephrin type-A receptor 2* (EphA2), der auf oralen Epithelzellen

nachgewiesen wurde und ähnlich wie ein PRR an β -Glukane von *Candida albicans* bindet und daraufhin eine proinflammatorische Immunantwort einleitet (Swidergall et al., 2018, Swidergall et al., 2019). Gleichermäßen spannend wäre es die Relevanz des Oberflächenproteins CD14 bei der Erkennung von *Rhizopus* zukünftig näher zu untersuchen. Wang et al. konnten bereits experimentell nachweisen, dass die proinflammatorische Immunantwort CD14-blockierter Monozyten, nach Kontakt mit *Aspergillus* vermindert ausfiel (Wang et al., 2001). Des Weiteren existieren Hinweise auf die Beteiligung eines weiteren C-Typ Lectin-Rezeptors, Dectin-2, bei der Erkennung von *A. fumigatus* durch Neutrophile (de Jesus Carrion et al., 2013). Eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte eine späte Herabregulation der Transkription von TLR4, Dectin-1 und Dectin-2 in moDCs nach Stimulation mit Mucorales in einem *in vitro* Alveolarmodell beobachten (Wurster et al., 2017a). Unveröffentlichte Daten unserer Gruppe zeigten des Weiteren eine frühe Induktion der Expression von Dectin-2 auf moDCs nach Mucorales-Exposition, gefolgt von einer späteren Repression auf transkriptioneller Ebene und Proteinebene. Während ein funktioneller Beweis aussteht, deuten diese Daten auf eine mögliche Rolle von Dectin-2 bei der Erkennung von Mucorales hin.

5.3. Limitationen der Promotionsarbeit und Ausblick

In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits auf einige Limitationen dieser Arbeit hingewiesen, auf die hier nochmals näher eingegangen werden soll. Zum einen wurden die beschriebenen Experimente mit isolierten Immunzellpopulationen durchgeführt, die natürlich nur unzureichend die komplexe *in-vivo*-Situation und somit auch nicht die Interaktion unter den Zelltypen abbilden können. Hierfür würden sich Experimente unter Verwendung von Vollblut-Systemen besser eignen. Auch der Einsatz von multizellulären Alveolarmodellen zur besseren Abbildung der Immunpathologie respiratorischer Epithelien, wo zumeist der Erstkontakt mit Mucorales erfolgt, könnte hilfreich sein. Belic et al. zeigten bereits mittels zweischichtigem Alveolarmodell, dass *R. arrhizus* in Anwesenheit von moDCs die Alveolärmembran weniger gut

durchdringen konnte, was in einer reduzierten Pilzinvasion resultierte und zeitgleich die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch moDCs ansteigen ließ (Belic et al., 2019). Ebenso könnten auch murine Modelle nützlich sein, die *in-vivo*-Situation aufzuzeigen. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit nur wenige Effektorfunktionen betrachtet. Hier wäre es daher nötig, breit angelegte Studien mit Multiplex-Zytokin-Assays, eingehender Analyse der Regulation von Aktivierungsmarkern und der Expression weiterer transkriptioneller Marker zu tätigen. Zudem wäre die Relevanz der untersuchten Rezeptoren für die fungizidale Aktivität mononukleärer Zellen und neutrophiler Granulozyten zu zeigen, z. B. mittels Tetrazolium-basierten metabolischen Assays (Meshulam et al., 1995), Biolumineszenz-Verfahren (Ibrahim-Granet et al., 2010) oder mikroskopischer Algorithmen (Wurster et al., 2019). Des Weiteren wurden alle Experimente dieser Arbeit ausschließlich mit einer Mucorales-Spezies (*R. arrhizus*) und einem einzelnen Isolat durchgeführt. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob andere Mucorales eine ähnliche Stimulation der einzelnen Rezeptoren der untersuchten Immunzellen bewirken oder ob wiederum andere Rezeptoren hierbei eine wichtige Rolle spielen, die es weiter zu erforschen gilt.

5.4. PRRs als diagnostischer oder therapeutischer Angriffspunkt bei Mucormykosen

Bisweilen ist bekannt, dass bestimmte genetische Mutationen das Risiko erhöhen an einer Mucormykose zu erkranken. Eine Mutation im Stop-Codon Tyr238X des Dectin-1-Rezeptors ist mit einem erhöhten Risiko für Pilzinfektionen assoziiert (Plantinga et al., 2009). Camargo und Kollegen konnten bei hämatoonkologischen Patienten, welche eine invasive Aspergillose oder Mucormykose entwickelten im Vergleich zu hämatoonkologischen Patienten, die keine invasive Mykose erlitten, einen Defekt in der Expression des Dectin-1-Rezeptors feststellen (Camargo et al., 2015). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Stammzellen von Patienten, die eine verringerte Dectin-1 Expression aufwiesen, deutlich weniger proinflammatorische Zytokine nach

Stimulation mit *C. albicans* produzierten (Ferwerda et al., 2009). Analoge Experimente zur Untersuchung der Zytokinsekretion nach *R. arrhizus*-Stimulation könnten interessant sein.

Weitere Studien zeigten, dass antimykotische Therapien Einfluss auf die Immunpathologie von Pilzinfektionen nehmen. Es wurde festgestellt, dass β -Glukane von *Rhizopus*-Hyphen nach Caspofungin Behandlung vermehrt demaskiert werden und deren Schädigung durch Neutrophile zunimmt. Darüber hinaus wurde ein Anstieg der Dectin-1-Rezeptoren auf Neutrophilen beobachtet (Lamaris et al., 2008). Eine Studie zeigte, dass eine Behandlung mit Kortikosteroiden die Expression von Dectin-1 auf der Oberfläche von Granulozyten verringert (Willment et al., 2003), was neben weiteren immunsuppressiven Effekten zur erhöhten Suszeptibilität von Patienten mit Kortikosteroidtherapie für invasive Mykosen beitragen kann (Lionakis and Kontoyiannis, 2003).

Eine frühzeitige Diagnose von Mucormykosen könnte in vielen Fällen lebensrettend sein (Chamilos et al., 2008c). Da sich jedoch bei einer beginnenden Mucormykose die klinische Konstellation oft unspezifisch präsentiert und es bei Voranschreiten der Erkrankung oft keine effektive Therapie mehr gibt (Chamilos et al., 2008c), sind neue Biomarker für Mucormykosen ein intensiv untersuchtes Feld. Diverse Immunbiomarker wurden bereits untersucht, welche zukünftig als diagnostisches Mittel für invasive Pilzinfektionen dienen könnten. Bacher und Kollegen konnten pilzspezifische T-Zellen im Blut gesunder Spender nachweisen. Im Falle einer invasiven Pilzinfektion ließ sich eine erhöhte Anzahl CD154+ T-Zellen im Blut betroffener Patienten feststellen (Bacher et al., 2015). Ferner konnten Potenza et al. Mucorales-spezifische T-Zellen im Blut hämatoonkologischer Patienten, die eine invasive Mucormykose erlitten, nachweisen (Potenza et al., 2016). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte in einem optimierten Vollblut-Assay *R. arrhizus*- und *Rhizomucor pusillus*-reaktive T-Zellen mit hoher Sensitivität nachweisen (Weis et al., 2020).

Im Vergleich zur invasiven Aspergillose sind Immunassays zur Diagnostik von Mucormykosen allerdings noch relativ unspezifisch und häufig wenig

standardisiert, da relevante Antigene und PAMPs schlecht charakterisiert sind. Daher wäre es von großer Bedeutung, die relevanten Antigene und PAMPs von Mucorales sowie die durch diese aktivierten Signalwege und die konsekutive Immunantwort besser zu verstehen, um noch effektivere und spezifischere T-Zell-Assays oder mononukleäre Stimulationsassays für invasive Mucormykosen entwickeln zu können.

Bei erhöhter Anfälligkeit für opportunistische Pilzkrankungen, die mittels nebenwirkungsreicher Antimykotika nur unzureichend behandelbar sind und meist auf eine zusätzliche radikale chirurgische Therapie nicht verzichtet werden kann, könnten neue Therapieformen in Form von Immuntherapeutika relevant werden (Lauruschkat et al., 2018). Als eine von wenigen zellulären Immuntherapieformen konnte die Wirksamkeit von Dectin-1-CAR-T-Zellen (siehe Kapitel 1.4.5.) *in vivo*, zumindest für invasive Aspergillosen, gezeigt werden. Dectin-1-CAR-T-Zellen sind in der Lage *Aspergillus*-Hyphen aufzuspüren und eine Infektion einzudämmen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Dectin-1-CAR-T-Zellen auch nach Behandlung mit Kortikosteroiden immer noch ausreichend dazu in der Lage sind *Aspergillus*-Hyphen zu schädigen. Dementsprechend könnte sich der Transfer von modifizierten T-Zellen in immunsupprimierte Patienten als neue Therapieform erweisen (Kumaresan et al., 2014). Es wäre wünschenswert die Wirksamkeit der beschriebenen Dectin-1-CAR T-Zell-Therapie gegenüber Mucormykosen zu untersuchen. Die gezeigte Relevanz von Dectin-1 bei der Erkennung von Mucorales ist in dieser Hinsicht allerdings vielversprechend.

In Bezug auf die Entwicklung einer potenziellen Immuntherapie gegen Mucormykosen konnten Castillo et al. allerdings bereits erste Fortschritte mit einem anderen Ansatz erzielen. *R. arrhizus*-spezifische T-Zellen konnten von gesunden Spendern gewonnen werden und deren Ausbeute durch eine *ex vivo* Zytokinbehandlung mit IL-2 und IL-7 enorm gesteigert werden. Die *R. arrhizus*-spezifischen T-Zellen konnten im Gegensatz zu nicht spezifischen T-Zellen fungale Antigene deutlich besser erkennen und induzierten eine proinflammatorische Zytokinantwort. Somit ließen sich T-Zellen von gesunden Spendern als potenzielle Immuntherapie nutzen (Castillo et al., 2018).

Vergleichende Untersuchungen von *ex vivo* selektierten Mucorales-spezifischen T-Zellen und CAR-T-Zell-Therapeutika wären wünschenswert um die Wirksamkeit, Sicherheit und logistische Umsetzung der beiden Therapieansätze direkt zu vergleichen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Deutsche Zusammenfassung

Während der letzten Jahrzehnte ist eine steigende Inzidenz von Infektionen durch Pilze der Ordnung Mucorales zu beobachten. *Rhizopus arrhizus* ist der häufigste Erreger dieser lebensbedrohlichen Infektionen, die vor allem immunsupprimierte Patienten betreffen. Aufgrund der oft schwierigen Diagnosestellung und limitierter therapeutischer Optionen liegt derzeit die Letalität von Mucormykosen zwischen 50 bis 100 %. Eine Voraussetzung für die Etablierung neuer Biomarker oder immuntherapeutischer Strategien ist ein verbessertes Verständnis der immunpathologischen Prozesse bei der Abwehr von Mucorales.

In dieser Arbeit wurden daher verschiedene Immunzellpopulationen durch ruhende und ausgekeimte Stadien von *R. arrhizus* stimuliert und anschließend deren proinflammatorische Immunantwort gemessen. Als Vergleich diente die proinflammatorische Immunantwort der untersuchten Immunzellen nach Stimulation mit *Aspergillus fumigatus*. Darüber hinaus war es Gegenstand dieser Arbeit, zu charakterisieren welche *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) an der Erkennung von Mucorales durch verschiedene innate Immunzellen beteiligt sind. Zugleich wurde untersucht, ob unterschiedliche Morphotypen der Pilzspezies Auswirkungen auf die Stimulation der jeweiligen PRRs haben. Hierfür wurden Koinkubations-Experimente mit neutrophilen Granulozyten sowie *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs), Monozyten und *monocyte derived dendritic cells* (moDCs) mit verschiedenen Morphotypen von *R. arrhizus* durchgeführt. Die Rezeptoren TLR2, TLR4 und/oder Dectin-1 wurden dabei durch neutralisierende Antikörper oder RNA-Interferenz blockiert.

Ausgekeimte Stadien von *A. fumigatus* sowie *R. arrhizus* induzierten eine erhöhte ROS-Freisetzung in Neutrophilen, die durch isolierte oder kombinierte Blockade von TLR2, TLR4 und Dectin-1 abgeschwächt wurde. Ebenso wurde die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten gegenüber *R. arrhizus*-Konidien durch Blockade von TLR4 und Dectin-1 deutlich reduziert.

Im Gegensatz zu *A. fumigatus* induzierten sowohl ruhende Konidien als auch ausgekeimte Stadien (Keimschläuche und Hyphen) von *R. arrhizus* eine robuste pro-inflammatorische Zytokinantwort durch moDCs. Nach Inhibition der Dectin-1 Expression durch RNA-Interferenz zeigte sich die Transkription und Sekretion von Interleukin-1 β in Gegenwart aller drei untersuchten Morphotypen von *R. arrhizus* deutlich vermindert (Transkription um 46 bis 68 % und Sekretion um 75 bis 79 % vermindert). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Dectin-1 ein wichtiger Mediator bei der Einleitung der innate Immunantwort verschiedener Zelltypen gegen *R. arrhizus* ist. Diese Beobachtung sollte in weiteren Studien eingehender untersucht werden, z. B. um die Eignung von Dectin-1 als Rezeptor für zelltherapeutische Ansätze wie T-Zell-Konstrukte mit chimären Antigen-Rezeptoren zu evaluieren.

6.2. Englische Zusammenfassung

While *Aspergillus* species remain the most common cause of opportunistic mold infections, emerging pathogens such as Mucorales account for an increasing share of invasive mycoses in immunocompromised patients. Unspecific clinical presentation, lack of reliable biomarkers, and limited therapeutic options contribute to poor outcomes of this devastating infection. Depending on the site of infection, mortality rates of mucormycoses reach up to 100%, highlighting an unmet need for advances in diagnostic and therapeutic strategies.

To facilitate improvements in immune biomarker development and immunotherapy, better understanding of host defense and host-pathogen interplay is warranted. Therefore, this project sought to assess the activation of proinflammatory immune responses by resting and germinated stages of *Rhizopus arrhizus*, the most common pathogenic Mucorales species. Furthermore, we aimed to characterize the pattern recognition receptors (PRRs) which are involved in the detection of *R. arrhizus*. To that end, we co-incubated polymorphonuclear neutrophils (PMNs), peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), monocytes, and monocyte derived dendritic cells (moDCs) from

healthy donors with different morphotypes of *R. arrhizus* and compared immune responses to *A. fumigatus* stimulation.

Oxidative burst of PMNs was only stimulated by germinated morphotypes of both fungi but not by resting conidia. Inhibition of TLR2, TLR4 and Dectin-1 by specific blocking antibodies significantly reduced the secretion of reactive oxygen species in response to *R. arrhizus* germlings and hyphae. Similarly, phagocytosis of *R. arrhizus* spores by PMNs was significantly reduced by blockade of TLR4 and Dectin-1, further corroborating a functional role of these receptors in the recognition of Mucorales.

Co-culture studies with PBMCs, monocytes, and moDCs revealed that both resting and germinated stages of *R. arrhizus* induce a proinflammatory cytokine response of mononuclear phagocytes, whereas conidia of *A. fumigatus* were largely inert. To determine a functional role of Dectin-1 in the recognition of *R. arrhizus* morphotypes by mononuclear cells, moDCs were transfected with CLEC7A-siRNA, resulting in a knockdown of the Dectin-1 gene. The transfected moDCs were stimulated with different *A. fumigatus* and *R. arrhizus* morphotypes and mRNA expression and secretion of IL-1 β were determined by qPCR and ELISA. Significantly weaker induction of IL-1 β by germinated stages of both fungi and *R. arrhizus* spores was seen in siCLEC7A-transfected moDCs. Collectively, these results indicate that major pattern recognition pathways with known roles in the detection of *A. fumigatus* are also pivotal to mount a proinflammatory immune response to *R. arrhizus*.

7. REFERENZEN

- AIMANIANDA, V., BAYRY, J., BOZZA, S., KNIEMEYER, O., PERRUCCIO, K., ELLURU, S. R., CLAVAUD, C., PARIS, S., BRAKHAGE, A. A. & KAVERI, S. V. 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 460, 1117.
- AKIRA, S., TAKEDA, K. & KAISHO, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2, 675-80.
- ANDERSON, K. V. 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current opinion in immunology*, 12, 13-19.
- ANTINORI, S., NEBULONI, M., MAGNI, C., FASAN, M., ADORNI, F., VIOLA, A., CORBELLINO, M., GALLI, M., VAGO, G., PARRAVICINI, C. & RIDOLFO, A. L. 2009. Trends in the postmortem diagnosis of opportunistic invasive fungal infections in patients with AIDS: a retrospective study of 1,630 autopsies performed between 1984 and 2002. *Am J Clin Pathol*, 132, 221-7.
- BACHER, P., STEINBACH, A., KNIEMEYER, O., HAMPRECHT, A., ASSENMACHER, M., VEHRESCHILD, M. J., VEHRESCHILD, J. J., BRAKHAGE, A. A., CORNELLY, O. A. & SCHEFFOLD, A. 2015. Fungus-specific CD4+ T cells for rapid identification of invasive pulmonary mold infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191, 348-352.
- BALLOY, V., HUERRE, M., LATGÉ, J.-P. & CHIGNARD, M. 2005. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infection and immunity*, 73, 494-503.
- BARG, A. A., MALKIEL, S., BARTUV, M., GREENBERG, G., TOREN, A. & KELLER, N. 2018. Successful treatment of invasive mucormycosis with isavuconazole in pediatric patients. *Pediatr Blood Cancer*, 65, e27281.

- BELIC, S., PAGE, L., LAZARIOTOU, M., WAAGA-GASSER, A. M., DRAGAN, M., SPRINGER, J., LOEFFLER, J., MORTON, C. O., EINSELE, H. & ULLMANN, A. J. 2019. Comparative analysis of inflammatory cytokine release and alveolar epithelial barrier invasion in a Transwell® bilayer model of mucormycosis. *Frontiers in microbiology*, 9, 3204.
- BELLANGER, A. P., TATARA, A. M., SHIRAZI, F., GEBREMARIAM, T., ALBERT, N. D., LEWIS, R. E., IBRAHIM, A. S. & KONTOYIANNIS, D. P. 2016. Statin Concentrations Below the Minimum Inhibitory Concentration Attenuate the Virulence of *Rhizopus oryzae*. *J Infect Dis*, 214, 114-21.
- BELLOCCHIO, S., MONTAGNOLI, C., BOZZA, S., GAZIANO, R., ROSSI, G., MAMBULA, S. S., VECCHI, A., MANTOVANI, A., LEVITZ, S. M. & ROMANI, L. 2004. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *The Journal of Immunology*, 172, 3059-3069.
- BEN-AMI, R., LUNA, M., LEWIS, R. E., WALSH, T. J. & KONTOYIANNIS, D. P. 2009. A clinicopathological study of pulmonary mucormycosis in cancer patients: extensive angioinvasion but limited inflammatory response. *J Infect*, 59, 134-8.
- BIGBY, T. D., SEROTA, M. L., TIERNEY JR, L. M. & MATTHAY, M. A. 1986. Clinical spectrum of pulmonary mucormycosis. *Chest*, 89, 435-439.
- BITAR, D., VAN CAUTEREN, D., LANTERNIER, F., DANNAOUI, E., CHE, D., DROMER, F., DESENCLOS, J.-C. & LORTHOLARY, O. 2009. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997–2006. *Emerging infectious diseases*, 15, 1395.
- BOELAERT, J. R., FENVES, A. Z. & COBURN, J. W. 1991. Deferoxamine therapy and mucormycosis in dialysis patients: report of an international registry. *Am J Kidney Dis*, 18, 660-7.

- BOUCHER, H. W., GROLL, A. H., CHIOU, C. C. & WALSH, T. J. 2004. Newer systemic antifungal agents. *Drugs*, 64, 1997-2020.
- BOURGEOIS, C., MAJER, O., FROHNER, I. E., TIERNEY, L. & KUCHLER, K. 2010. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. *Curr Opin Microbiol*, 13, 401-8.
- BOZZA, S., GAZIANO, R., SPRECA, A., BACCI, A., MONTAGNOLI, C., DI FRANCESCO, P. & ROMANI, L. 2002. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *The Journal of Immunology*, 168, 1362-1371.
- BRAEDEL, S., RADSAK, M., EINSELE, H., LATGE, J. P., MICHAN, A., LOEFFLER, J., HADDAD, Z., GRIGOLEIT, U., SCHILD, H. & HEBART, H. 2004. *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol*, 125, 392-9.
- BURGOS, A., ZAOUTIS, T. E., DVORAK, C. C., HOFFMAN, J. A., KNAPP, K. M., NANIA, J. J., PRASAD, P. & STEINBACH, W. J. 2008. Pediatric invasive aspergillosis: a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. *Pediatrics*, 121, e1286-e1294.
- CALDERONE, R. 2001. *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*, CRC Press.
- CAMARGO, J. F., BHIMJI, A., KUMAR, D., KAUL, R., PAVAN, R., SCHUH, A., SEFTEL, M., LIPTON, J. H., GUPTA, V. & HUMAR, A. 2015. Impaired T cell responsiveness to interleukin-6 in hematological patients with invasive aspergillosis. *PloS one*, 10, e0123171.
- CASTILLO, P., WRIGHT, K. E., KONTOYIANNIS, D. P., WALSH, T., PATEL, S., CHORVINSKY, E., BOSE, S., HAZRAT, Y., OMER, B. & ALBERT, N. 2018. A new method for reactivating and expanding T cells specific for

Rhizopus oryzae. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 9, 305-312.

CHAKRABARTI, A., DAS, A., SHARMA, A., PANDA, N., DAS, S., GUPTA, K. L. & SAKHUJA, V. 2001. Ten years' experience in zygomycosis at a tertiary care centre in India. *J Infect*, 42, 261-6.

CHAMILOS, G., GANGULY, D., LANDE, R., GREGORIO, J., MELLER, S., GOLDMAN, W. E., GILLIET, M. & KONTOYIANNIS, D. P. 2010. Generation of IL-23 producing Dendritic Cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of TH-17 responses. *PLoS one*, 5, e12955.

CHAMILOS, G., LEWIS, R., LAMARIS, G., WALSH, T. & KONTOYIANNIS, D. 2008a. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52, 722-724.

CHAMILOS, G., LEWIS, R. E., HU, J., XIAO, L., ZAL, T., GILLIET, M., HALDER, G. & KONTOYIANNIS, D. P. 2008b. Drosophila melanogaster as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 9367-9372.

CHAMILOS, G., LEWIS, R. E. & KONTOYIANNIS, D. P. 2008c. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 503-509.

CHAMILOS, G., LUNA, M., LEWIS, R. E., BODEY, G. P., CHEMALY, R., TARRAND, J. J., SAFDAR, A., RAAD, II & KONTOYIANNIS, D. P. 2006. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica*, 91, 986-9.

- CHINN, R. & DIAMOND, R. D. 1982. Generation of chemotactic factors by *Rhizopus oryzae* in the presence and absence of serum: relationship to hyphal damage mediated by human neutrophils and effects of hyperglycemia and ketoacidosis. *Infection and immunity*, 38, 1123-1129.
- CORNELY, O. A., ARIKAN-AKDAGLI, S., DANNAOUI, E., GROLL, A. H., LAGROU, K., CHAKRABARTI, A., LANTERNIER, F., PAGANO, L., SKIADA, A., AKOVA, M., ARENDRUP, M. C., BOEKHOUT, T., CHOWDHARY, A., CUENCA-ESTRELLA, M., FREIBERGER, T., GUINEA, J., GUARRO, J., DE HOOG, S., HOPE, W., JOHNSON, E., KATHURIA, S., LACKNER, M., LASS-FLORL, C., LORTHOLARY, O., MEIS, J. F., MELETIADIS, J., MUNOZ, P., RICHARDSON, M., ROILIDES, E., TORTORANO, A. M., ULLMANN, A. J., VAN DIEPENINGEN, A., VERWEIJ, P., PETRIKKOS, G., EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL, M., INFECTIOUS DISEASES FUNGAL INFECTION STUDY, G. & EUROPEAN CONFEDERATION OF MEDICAL, M. 2014. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. *Clin Microbiol Infect*, 20 Suppl 3, 5-26.
- DAVIS, L. & BARTNICKI-GARCIA, S. 1984. The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*. *Microbiology*, 130, 2095-2102.
- DE JESUS CARRION, S., LEAL, S. M., GHANNOUM, M. A., AIMANIANDA, V., LATGÉ, J.-P. & PEARLMAN, E. 2013. The rodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1–and dectin-2–dependent responses and enhances fungal survival in vivo. *The Journal of Immunology*, 191, 2581-2588.
- DENNEHY, K. M., FERWERDA, G., FARO-TRINDADE, I., PYŹ, E., WILLMENT, J. A., TAYLOR, P. R., KERRIGAN, A., TSONI, S. V., GORDON, S. & MEYER-WENTRUP, F. 2008. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *European journal of immunology*, 38, 500-506.

- DIAMOND, R. D., KRZESICKI, R., EPSTEIN, B. & JAO, W. 1978. Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes in vitro. A possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. *The American journal of pathology*, 91, 313.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W. & ANDERSON, T.-H. 1980. *Compendium of soil fungi. Volume 1*, Academic Press (London) Ltd.
- EUCKER, J., SEZER, O., GRAF, B. & POSSINGER, K. 2001. Mucormycoses. *Mycoses*, 44, 253-60.
- FERWERDA, B., FERWERDA, G., PLANTINGA, T. S., WILLMENT, J. A., VAN SPRIEL, A. B., VENSELAAR, H., ELBERS, C. C., JOHNSON, M. D., CAMBI, A. & HUYSAMEN, C. 2009. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *New England Journal of Medicine*, 361, 1760-1767.
- FERWERDA, G., MEYER-WENTRUP, F., KULLBERG, B. J., NETEA, M. G. & ADEMA, G. J. 2008. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cellular microbiology*, 10, 2058-2066.
- GANTNER, B. N., SIMMONS, R. M., CANAVERA, S. J., AKIRA, S. & UNDERHILL, D. M. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *Journal of Experimental medicine*, 197, 1107-1117.
- GHUMAN, H. & VOELZ, K. 2017. Innate and adaptive immunity to Mucorales. *Journal of Fungi*, 3, 48.
- GIL-LAMAIGNERE, C., SIMITSOPOULOU, M., ROILIDES, E., MALOUKOU, A., WINN, R. M. & WALSH, T. J. 2005. Interferon- γ and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important zygomycetes. *The Journal of infectious diseases*, 191, 1180-1187.

- GLOCKER, E.-O., HENNIGS, A., NABAVI, M., SCHÄFFER, A. A., WOELLNER, C., SALZER, U., PFEIFER, D., VEELKEN, H., WARNATZ, K. & TAHAMI, F. 2009. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *New England Journal of Medicine*, 361, 1727-1735.
- GRINGHUIS, S. I., DEN DUNNEN, J., LITJENS, M., VAN DER VLIST, M., WEVERS, B., BRUIJNS, S. C. & GEIJTENBEEK, T. B. 2009. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol*, 10, 203-13.
- GRYGANSKYI, A. P., GOLAN, J., DOLATABADI, S., MONDO, S., ROBB, S., IDNURM, A., MUSZEWSKA, A., STECZKIEWICZ, K., MASONJONES, S., LIAO, H. L., GAJDECZKA, M. T., ANIKE, F., VUEK, A., ANISHCHENKO, I. M., VOIGT, K., DE HOOG, G. S., SMITH, M. E., HEITMAN, J., VILGALYS, R. & STAJICH, J. E. 2018. Phylogenetic and Phylogenomic Definition of *Rhizopus* Species. *G3 (Bethesda)*, 8, 2007-2018.
- HAMILOS, G., SAMONIS, G. & KONTOYIANNIS, D. P. 2011. Pulmonary Mucormycosis. *Semin Respir Crit Care Med*, 32, 693-702.
- HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LUCKING, R., THORSTEN LUMBSCH, H., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., MCLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J., REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A., VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DAI, Y. C., GAMS, W., GEISER, D. M., GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R. A., HYDE, K. D., IRONSIDE, J. E., KOLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LARSSON, K. H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J. M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASTO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHUSSLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L.,

- UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEISS, M., WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y. J. & ZHANG, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, 111, 509-47.
- HIRSCHFELD, M., WEIS, J. J., TOSHCHAKOV, V., SALKOWSKI, C. A., CODY, M. J., WARD, D. C., QURESHI, N., MICHALEK, S. M. & VOGEL, S. N. 2001. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and immunity*, 69, 1477-1482.
- HOFFMANN, K., PAWLOWSKA, J., WALTHER, G., WRZOSEK, M., DE HOOG, G. S., BENNY, G. L., KIRK, P. M. & VOIGT, K. 2013. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*, 30, 57-76.
- HOLLMANN, M., RAZZAZI-FAZELI, E. & BÖHM, J. 2008. Mucorales un deren toxikologische Bedeutung: eine Übersicht. *SCIENCE AND PRACTICE WISSENSCHAFT UND PRAXIS*, 32, 414-420.
- HOLZBERG, M. & ARTIS, W. M. 1983. Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. *Infection and immunity*, 40, 1134-1139.
- HOPKINS, R. J., ROTHMAN, M., FIORE, A. & GOLDBLUM, S. E. 1994. Cerebral mucormycosis associated with intravenous drug use: three case reports and review. *Clinical infectious diseases*, 19, 1133-1137.
- HORN, D. L., NEOFYTOS, D., ANAISSIE, E. J., FISHMAN, J. A., STEINBACH, W. J., OLYAEI, A. J., MARR, K. A., PFALLER, M. A., CHANG, C.-H. & WEBSTER, K. M. 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clinical infectious diseases*, 48, 1695-1703.
- HOTCHI, M., OKADA, M. & NASU, T. 1980. Present state of fungal infections in autopsy cases in Japan. A statistical survey of all autopsy cases during

the ten-year period from 1966 to 1975. *American Journal of Clinical Pathology*, 74, 410-416.

IBRAHIM-GRANET, O., JOUVION, G., HOHL, T. M., DROIN-BERGÈRE, S., PHILIPPART, F., KIM, O. Y., ADIB-CONQUY, M., SCHWENDENER, R., CAVAILLON, J.-M. & BROCK, M. 2010. In vivo bioluminescence imaging and histopathologic analysis reveal distinct roles for resident and recruited immune effector cells in defense against invasive aspergillosis. *BMC microbiology*, 10, 105.

IBRAHIM, A. S., SPELLBERG, B., AVANESSIAN, V., FU, Y. & EDWARDS, J. E. 2005. *Rhizopus oryzae* adheres to, is phagocytosed by, and damages endothelial cells in vitro. *Infection and immunity*, 73, 778-783.

IBRAHIM, A. S., SPELLBERG, B., WALSH, T. J. & KONTOYIANNIS, D. P. 2012. Pathogenesis of mucormycosis. *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 1, S16-22.

IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327, 291-5.

JHA, A. K., BANSAL, D., CHAKRABARTI, A., SHIVAPRAKASH, M. R., TREHAN, A. & MARWAHA, R. K. 2013. Serum galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis in children with haematological malignancies. *Mycoses*, 56, 442-8.

KONTOYIANNIS, D. P., WESSEL, V. C., BODEY, G. P. & ROLSTON, K. V. 2000. Zygomycosis in the 1990s in a tertiary-care cancer center. *Clin Infect Dis*, 30, 851-6.

KUMARESAN, P. R., DA SILVA, T. A. & KONTOYIANNIS, D. P. 2018. Methods of controlling invasive fungal infections using CD8+ T cells. *Frontiers in immunology*, 8, 1939.

KUMARESAN, P. R., MANURI, P. R., ALBERT, N. D., MAITI, S., SINGH, H., MI, T., ROSZIK, J., RABINOVICH, B., OLIVARES, S. & KRISHNAMURTHY, J. 2014. Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic

fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 10660-10665.

KURT-JONES, E. A., MANDELL, L., WHITNEY, C., PADGETT, A., GOSSELIN, K., NEWBURGER, P. E. & FINBERG, R. W. 2002. Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood*, 100, 1860-1868.

KWON-CHUNG, K. J. 2012. Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives. *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 1, S8-S15.

LAMARIS, G. A., LEWIS, R. E., CHAMILOS, G., MAY, G. S., SAFDAR, A., WALSH, T. J., RAAD, I. I. & KONTOYIANNIS, D. P. 2008. Caspofungin-mediated β -glucan unmasking and enhancement of human polymorphonuclear neutrophil activity against *Aspergillus* and non-*Aspergillus* hyphae. *The Journal of infectious diseases*, 198, 186-192.

LANTERNIER, F., DANNAOUI, E., MORIZOT, G., ELIE, C., GARCIA-HERMOSO, D., HUERRE, M., BITAR, D., DROMER, F., LORTHOLARY, O. & FRENCH MYCOSIS STUDY, G. 2012. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 1, S35-43.

LASS-FLÖRL, C., RESCH, G., NACHBAUR, D., MAYR, A., GASTL, G., AUBERGER, J., BIALEK, R. & FREUND, M. C. 2007. The Value of Computed Tomography-Guided Percutaneous Lung Biopsy for Diagnosis of Invasive Fungal Infection in Immunocompromised Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 45, e101-e104.

LAURUSCHKAT, C. D., EINSELE, H. & LOEFFLER, J. 2018. Immunomodulation as a therapy for *Aspergillus* infection: current status and future perspectives. *Journal of Fungi*, 4, 137.

- LEIBUNDGUT-LANDMANN, S., GROß, O., ROBINSON, M. J., OSORIO, F., SLACK, E. C., TSONI, S. V., SCHWEIGHOFFER, E., TYBULEWICZ, V., BROWN, G. D. & RULAND, J. 2007. Syk-and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature immunology*, 8, 630.
- LEON, B., LOPEZ-BRAVO, M. & ARDAVIN, C. 2005. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol*, 17, 313-8.
- LEWIS, R. E., LORTHOLARY, O., SPELLBERG, B., ROILIDES, E., KONTOYIANNIS, D. P. & WALSH, T. J. 2012. How does antifungal pharmacology differ for mucormycosis versus aspergillosis? *Clinical infectious diseases*, 54, S67-S72.
- LIONAKIS, M. S. & KONTOYIANNIS, D. P. 2003. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *The Lancet*, 362, 1828-1838.
- LIU, Y., WU, H., HUANG, F., FAN, Z. & XU, B. 2013. Utility of 18F-FDG PET/CT in diagnosis and management of mucormycosis. *Clinical nuclear medicine*, 38, e370-1.
- LOTHER, J., BREITSCHOPF, T., KRAPPMANN, S., MORTON, C. O., BOUZANI, M., KURZAI, O., GUNZER, M., HASENBERG, M., EINSELE, H. & LOEFFLER, J. 2014. Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 1160-1168.
- MA, L.-J., IBRAHIM, A. S., SKORY, C., GRABHERR, M. G., BURGER, G., BUTLER, M., ELIAS, M., IDNURM, A., LANG, B. F. & SONE, T. 2009. Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS genetics*, 5, e1000549.
- MAERTENS, J. A., RAAD, II, MARR, K. A., PATTERSON, T. F., KONTOYIANNIS, D. P., CORNELLY, O. A., BOW, E. J., RAHAV, G., NEOFYTOS, D., AOUN, M., BADDLEY, J. W., GILADI, M., HEINZ, W. J.,

- HERBRECHT, R., HOPE, W., KARTHAUS, M., LEE, D. G., LORTHOLARY, O., MORRISON, V. A., OREN, I., SELLESLAG, D., SHOHAM, S., THOMPSON, G. R., 3RD, LEE, M., MAHER, R. M., SCHMITT-HOFFMANN, A. H., ZEIHNER, B. & ULLMANN, A. J. 2016. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet*, 387, 760-9.
- MAMBULA, S. S., SAU, K., HENNEKE, P., GOLENBOCK, D. T. & LEVITZ, S. M. 2002. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 39320-39326.
- MANSOUR, M. K. & LEVITZ, S. M. 2002. Interactions of fungi with phagocytes. *Current opinion in microbiology*, 5, 359-365.
- MARTY, F. M., COSIMI, L. A. & BADEN, L. R. 2004. Breakthrough zygomycosis after voriconazole treatment in recipients of hematopoietic stem-cell transplants. *N Engl J Med*, 350, 950-2.
- MARTY, F. M., OSTROSKY-ZEICHNER, L., CORNELLY, O. A., MULLANE, K. M., PERFECT, J. R., THOMPSON, G. R., 3RD, ALANGADEN, G. J., BROWN, J. M., FREDRICKS, D. N., HEINZ, W. J., HERBRECHT, R., KLIMKO, N., KLYASOVA, G., MAERTENS, J. A., MELINKERI, S. R., OREN, I., PAPPAS, P. G., RACIL, Z., RAHAV, G., SANTOS, R., SCHWARTZ, S., VEHRESCHILD, J. J., YOUNG, J. H., CHETCHOTISAKD, P., JARURATANASIRIKUL, S., KANJ, S. S., ENGELHARDT, M., KAUFHOLD, A., ITO, M., LEE, M., SASSE, C., MAHER, R. M., ZEIHNER, B., VEHRESCHILD, M., VITAL & FUNGISCOPE MUCORMYCOSIS, I. 2016. Isavuconazole treatment for mucormycosis: a single-arm open-label trial and case-control analysis. *Lancet Infect Dis*, 16, 828-837.

- MCCORMACK, F. X., GIBBONS, R., WARD, S. R., KUZMENKO, A., WU, H. & DEEPE, G. S., JR. 2003. Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary collectins. *J Biol Chem*, 278, 36250-6.
- MCCORMICK, A., HEESEMANN, L., WAGENER, J., MARCOS, V., HARTL, D., LOEFFLER, J., HEESEMANN, J. & EBEL, F. 2010. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and infection*, 12, 928-936.
- MCNAB, A. A. & MCKELVIE, P. 1997. Iron overload is a risk factor for zygomyces. *Arch Ophthalmol*, 115, 919-21.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY JR, C. A. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394.
- MENCACCI, A., CENCI, E., BACCI, A., MONTAGNOLI, C., BISTONI, F. & ROMANI, L. 2000. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. *Current pharmaceutical biotechnology*, 1, 235-251.
- MESHULAM, T., LEVITZ, S. M., CHRISTIN, L. & DIAMOND, R. D. 1995. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2, 3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *Journal of Infectious Diseases*, 172, 1153-1156.
- MEZGER, M., KNEITZ, S., WOZNIOK, I., KURZAI, O., EINSELE, H. & LOEFFLER, J. 2008. Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *The Journal of infectious diseases*, 197, 924-931.
- MORTON, C. O., BOUZANI, M., LOEFFLER, J. & ROGERS, T. R. 2012. Direct interaction studies between *Aspergillus fumigatus* and human immune cells; what have we learned about pathogenicity and host immunity? *Frontiers in microbiology*, 3, 413.

- MORTON, C. O., VARGA, J. J., HORNBAACH, A., MEZGER, M., SENNEFELDER, H., KNEITZ, S., KURZAI, O., KRAPPMANN, S., EINSELE, H. & NIERMAN, W. C. 2011. The temporal dynamics of differential gene expression in *Aspergillus fumigatus* interacting with human immature dendritic cells in vitro. *PloS one*, 6, e16016.
- MÜLLER-WENING, D., RENCK, T. & NEUHAUSS, M. 1999. Wood chip alveolitis. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*, 53, 364-368.
- MURPHY, K., WEAVER, C. & SEIDLER, L. 2018. *Janeway Immunologie*, Springer Berlin Heidelberg.
- NEOFYTOS, D., HORN, D., ANAISSIE, E., STEINBACH, W., OLYAEI, A., FISHMAN, J., PFALLER, M., CHANG, C., WEBSTER, K. & MARR, K. 2009. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clinical Infectious Diseases*, 48, 265-273.
- NETEA, M. G., BROWN, G. D., KULLBERG, B. J. & GOW, N. A. 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 67.
- NETEA, M. G., SUTMULLER, R., HERMANN, C., VAN DER GRAAF, C. A., VAN DER MEER, J. W., VAN KRIEKEN, J. H., HARTUNG, T., ADEMA, G. & KULLBERG, B. J. 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 172, 3712-3718.
- NETEA, M. G., WARRIS, A., VAN DER MEER, J. W., FENTON, M. J., VERVERJANSSEN, T. J., JACOBS, L. E., ANDRESEN, T., VERWEIJ, P. E. & KULLBERG, B. J. 2003. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *The Journal of infectious diseases*, 188, 320-326.

- O'NEILL, L. A. 2002. Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal? *Trends in immunology*, 23, 296-300.
- PAGANO, L., OFFIDANI, M., FIANCHI, L., NOSARI, A., CANDONI, A., PICARDI, M., CORVATTA, L., D'ANTONIO, D., GIRMENIA, C. & MARTINO, P. 2004. Mucormycosis in hematologic patients. *haematologica*, 89, 207-214.
- PAGANO, L., RICCI, P., TONSO, A., NOSARI, A., CUDILLO, L., MONTILLO, M., CENACCHI, A., PACILLI, L., FABBIANO, F. & DEL FAVERO, A. 1997. Mucormycosis in patients with haematological malignancies: a retrospective clinical study of 37 cases. *British journal of haematology*, 99, 331-336.
- PALTAUF, A. 1885. Mycosis mucorina. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*, 102, 543-564.
- PARK, B., KONTOYIANNIS, D., PAPPAS, P., WANNEMUEHLER, K., ANAISSIE, E., FRIDKIN, S. & WALSH, T. Comparison of zygomycosis and fusariosis to invasive aspergillosis (IA) among transplant recipients reporting to TRANSNET. Program and Proceedings of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004.
- PARK, S. J. & MEHRAD, B. 2009. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev*, 22, 535-51.
- PETRIKKOS, G., SKIADA, A. & DROGARI-APIRANTHITOU, M. 2014. Epidemiology of mucormycosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 20 Suppl 6, 67-73.
- PETRIKKOS, G., SKIADA, A., LORTHOLARY, O., ROILIDES, E., WALSH, T. J. & KONTOYIANNIS, D. P. 2012. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 1, S23-34.
- PLANTINGA, T. S., VAN DER VELDEN, W. J., FERWERDA, B., VAN SPRIEL, A. B., ADEMA, G., FEUTH, T., DONNELLY, J. P., BROWN, G. D.,

- KULLBERG, B.-J. & BLIJLEVENS, N. M. 2009. Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 724-732.
- PONGAS, G. N., LEWIS, R. E., SAMONIS, G. & KONTOYIANNIS, D. P. 2009. Voriconazole-associated zygomycosis: a significant consequence of evolving antifungal prophylaxis and immunosuppression practices? *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 5, 93-7.
- POTENZA, L., VALLERINI, D., BAROZZI, P., RIVA, G., GILIOLI, A., FORGHIERI, F., CANDONI, A., CESARO, S., QUADRELLI, C. & MAERTENS, J. 2016. Mucorales-specific T cells in patients with hematologic malignancies. *PloS one*, 11, e0149108.
- PRABHU, R. & PATEL, R. 2004. Mucormycosis and entomophthoromycosis: a review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 31-47.
- PURSELL, K., VERRAL, S., DARAIESH, F., SHRESTHA, N., SKARIAH, A., HASAN, E. & PITRAK, D. 2003. Impaired phagocyte respiratory burst responses to opportunistic fungal pathogens in transplant recipients: in vitro effect of r-metHuG-CSF (Filgrastim). *Transplant infectious disease*, 5, 29-37.
- RAUSCH, C. R., DIPIPO, A. J., BOSE, P. & KONTOYIANNIS, D. P. 2018. Breakthrough Fungal Infections in Patients With Leukemia Receiving Isavuconazole. *Clinical Infectious Diseases*, ciy406.
- RE, F. & STROMINGER, J. L. 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 37692-37699.
- REES, J. R., PINNER, R. W., HAJJEH, R. A., BRANDT, M. E. & REINGOLD, A. L. 1998. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the

- San Francisco Bay area, 1992-1993: results of population-based laboratory active surveillance. *Clin Infect Dis*, 27, 1138-47.
- RIBES, J. A., VANOVER-SAMS, C. L. & BAKER, D. J. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev*, 13, 236-301.
- RICKERTS, V., MOUSSET, S., LAMBRECHT, E., TINTELNOT, K., SCHWERDTFEGER, R., PRESTERL, E., JACOBI, V., JUST-NUBLING, G. & BIALEK, R. 2007. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin Infect Dis*, 44, 1078-83.
- RIVEST, S., LACROIX, S., VALLIÈRES, L., NADEAU, S., ZHANG, J. & LAFLAMME, N. 2000. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223, 22-38.
- RODEN, M. M., ZAOUTIS, T. E., BUCHANAN, W. L., KNUDSEN, T. A., SARKISOVA, T. A., SCHAUFELE, R. L., SEIN, M., SEIN, T., CHIOU, C. C., CHU, J. H., KONTOYIANNIS, D. P. & WALSH, T. J. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis*, 41, 634-53.
- ROGERS, T. R. 2008. Treatment of zygomycosis: current and new options. *J Antimicrob Chemother*, 61 Suppl 1, i35-40.
- ROILIDES, E., DIMITRIADOU-GEORGIADOU, A., SEIN, T., KADILTSOGLOU, I. & WALSH, T. J. 1998. Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*, 66, 5999-6003.
- ROMANI, L. 2004. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 4, 1-23.
- ROMANI, L. 2011. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 11, 275-88.

- ROMANI, L., BISTONI, F. & PUC CETTI, P. 2002. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends in microbiology*, 10, 508-514.
- RUPING, M. J., HEINZ, W. J., KINDO, A. J., RICKERTS, V., LASS-FLORL, C., BEISEL, C., HERBRECHT, R., ROTH, Y., SILLING, G., ULLMANN, A. J., BORCHERT, K., EGERER, G., MAERTENS, J., MASCHMEYER, G., SIMON, A., WATTAD, M., FISCHER, G., VEHRESCHILD, J. J. & CORNELLY, O. A. 2010. Forty-one recent cases of invasive zygomycosis from a global clinical registry. *J Antimicrob Chemother*, 65, 296-302.
- SAEGEMAN, V., MAERTENS, J., MEERSSEMAN, W., SPRIET, I., VERBEKEN, E. & LAGROU, K. 2010. Increasing incidence of mucormycosis in University Hospital, Belgium. *Emerg Infect Dis*, 16, 1456-8.
- SCHMIDT, S., TRAMSEN, L., PERKHOFER, S., LASS-FLÖRL, C., HANISCH, M., RÖGER, F., KLINGEBIEL, T., KOEHL, U. & LEHRNBECHER, T. 2013. *Rhizopus oryzae* hyphae are damaged by human natural killer (NK) cells, but suppress NK cell mediated immunity. *Immunobiology*, 218, 939-944.
- SIMITSOPOULOU, M., GEORGIADOU, E., WALSH, T. J. & ROILIDES, E. 2010. *Cunninghamella bertholletiae* exhibits increased resistance to human neutrophils with or without antifungal agents as compared to *Rhizopus* spp. *Medical mycology*, 48, 720-724.
- SKIADA, A., PAGANO, L., GROLL, A., ZIMMERLI, S., DUPONT, B., LAGROU, K., LASS-FLORL, C., BOUZA, E., KLIMKO, N., GAUSTAD, P., RICHARDSON, M., HAMAL, P., AKOVA, M., MEIS, J. F., RODRIGUEZ-TUDELA, J. L., ROILIDES, E., MITROUSIA-ZIOUVA, A., PETRIKKOS, G. & EUROPEAN CONFEDERATION OF MEDICAL MYCOLOGY WORKING GROUP ON, Z. 2011. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin Microbiol Infect*, 17, 1859-67.

- SKIADA, A. & PETRIKKOS, G. 2009. Cutaneous zygomycosis. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 5, 41-5.
- STEINBACH, W. J., MARR, K. A., ANAISSIE, E. J., AZIE, N., QUAN, S.-P., MEIER-KRIESCHE, H.-U., APEWOKIN, S. & HORN, D. L. 2012. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *Journal of Infection*, 65, 453-464.
- SUTMULLER, R. P., DEN BROK, M. H., KRAMER, M., BENNINK, E. J., TOONEN, L. W., KULLBERG, B.-J., JOOSTEN, L. A., AKIRA, S., NETEA, M. G. & ADEMA, G. J. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation*, 116, 485-494.
- SWIDERGALL, M., SOLIS, N. V., LIONAKIS, M. S. & FILLER, S. G. 2018. EphA2 is an epithelial cell pattern recognition receptor for fungal β -glucans. *Nature microbiology*, 3, 53-61.
- SWIDERGALL, M., SOLIS, N. V., WANG, Z., PHAN, Q. T., MARSHALL, M. E., LIONAKIS, M. S., PEARLMAN, E. & FILLER, S. G. 2019. EphA2 is a neutrophil receptor for *Candida albicans* that stimulates antifungal activity during oropharyngeal infection. *Cell reports*, 28, 423-433. e5.
- TAYLOR, P. R., BROWN, G. D., REID, D. M., WILLMENT, J. A., MARTINEZ-POMARES, L., GORDON, S. & WONG, S. Y. 2002. The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *The Journal of immunology*, 169, 3876-3882.
- TORRES-NARBONA, M., GUINEA, J., MARTINEZ-ALARCON, J., MUNOZ, P., GADEA, I., BOUZA, E. & GROUP, M. Z. S. 2007. Impact of zygomycosis on microbiology workload: a survey study in Spain. *J Clin Microbiol*, 45, 2051-3.

- TRIFILIO, S., SINGHAL, S., WILLIAMS, S., FRANKFURT, O., GORDON, L., EVENS, A., WINTER, J., TALLMAN, M., PI, J. & MEHTA, J. 2007. Breakthrough fungal infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients on prophylactic voriconazole. *Bone Marrow Transplant*, 40, 451-6.
- VAN DE VEERDONK, F. L., KULLBERG, B. J., VAN DER MEER, J. W., GOW, N. A. & NETEA, M. G. 2008. Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Current opinion in microbiology*, 11, 305-312.
- VIVIER, E., TOMASELLO, E., BARATIN, M., WALZER, T. & UGOLINI, S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nature immunology*, 9, 503.
- WALDORF, A. R. 1989. Pulmonary defense mechanisms against opportunistic fungal pathogens. *Immunology series*, 47, 243-271.
- WALDORF, A. R. & DIAMOND, R. D. 1985. Neutrophil chemotactic responses induced by fresh and swollen *Rhizopus oryzae* spores and *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infection and immunity*, 48, 458-463.
- WALSH, T. J., GAMALETSSOU, M. N., MCGINNIS, M. R., HAYDEN, R. T. & KONTOYIANNIS, D. P. 2012. Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis). *Clinical Infectious Diseases*, 54, S55-S60.
- WANG, J., WARRIS, A., ELLINGSEN, E., JØRGENSEN, P., FLO, T., ESPEVIK, T., SOLBERG, R., VERWEIJ, P. & AASEN, A. 2001. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infection and immunity*, 69, 2402-2406.
- WARRIS, A., NETEA, M. G., VERWEIJ, P. E., GAUSTAD, P., KULLBERG, B.-J., WEEMAES, C. M. & ABRAHAMSEN, T. G. 2005. Cytokine responses and regulation of interferon-gamma release by human mononuclear cells to

- Aspergillus fumigatus* and other filamentous fungi. *Sabouraudia*, 43, 613-621.
- WEBB, B. J., FERRARO, J. P., REA, S., KAUFUSI, S., GOODMAN, B. E. & SPALDING, J. Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network. *Open forum infectious diseases*, 2018. Oxford University Press US, ofy187.
- WEIS, P., HELM, J., PAGE, L., LAURUSCHKAT, C. D., LAZARIOTOU, M., EINSELE, H., LOEFFLER, J., ULLMANN, A. J. & WURSTER, S. 2020. Development and evaluation of a whole blood-based approach for flow cytometric quantification of CD154+ mould-reactive T cells. *Medical mycology*, 58, 187-196.
- WILLMENT, J. A., LIN, H.-H., REID, D. M., TAYLOR, P. R., WILLIAMS, D. L., WONG, S. Y., GORDON, S. & BROWN, G. D. 2003. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 171, 4569-4573.
- WURSTER, S., BELIC, S., LAZARIOTOU, M., WAAGA-GASSER, A. M., DRAGAN, M., SPRINGER, J., MICHEL, D., LÖFFLER, J., EINSELE, H. & ULLMANN, A. J. 2017a. *Receptor expression and epithelial damage response to pathogenic Mucorales species characterized in an alveolar bilayer model* [Online]. Vienna, Austria: 27th ECCMID. [Accessed 25.04.2017 2017].
- WURSTER, S., KUMARESAN, P. R., ALBERT, N. D., HAUSER, P. J., LEWIS, R. E. & KONTOYIANNIS, D. P. 2019. Live Monitoring and Analysis of Fungal Growth, Viability, and Mycelial Morphology Using the IncuCyte NeuroTrack Processing Module. *Mbio*, 10.
- WURSTER, S., THIELEN, V., WEIS, P., WALTHER, P., ELIAS, J., WAAGA-GASSER, A. M., DRAGAN, M., DANDEKAR, T., EINSELE, H. & LOEFFLER, J. 2017b. Mucorales spores induce a proinflammatory

cytokine response in human mononuclear phagocytes and harbor no rodlet hydrophobins. *Virulence*, 8, 1708-1718.

XU, J., EASTMAN, A. J., FLACZYK, A., NEAL, L. M., ZHAO, G., CAROLAN, J., MALACHOWSKI, A. N., STOLBERG, V. R., YOSRI, M. & CHENSUE, S. W. 2016. Disruption of early tumor necrosis factor alpha signaling prevents classical activation of dendritic cells in lung-associated lymph nodes and development of protective immunity against cryptococcal infection. *MBio*, 7, e00510-16.

YOHAI, R. A., BULLOCK, J. D., AZIZ, A. A. & MARKERT, R. J. 1994. Survival factors in rhino-orbital-cerebral mucormycosis. *Survey of ophthalmology*, 39, 3-22.

8. ANHANG

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aktueller Stammbaum der Pilze.....	3
Abbildung 1.2: schematische Übersicht der drei Morphotypen von Mucorales	4
Abbildung 1.3: Lokalisation von Mucormykosen in Abhängigkeit von der jeweiligen Grunderkrankung	10
Abbildung 1.4: Alveoläre Abwehrreaktion durch das innate Immunsystem nach inhalativer Konidienaufnahme.....	16
Abbildung 1.5: Morphotypabhängige Effektormechanismen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gegen Mucorales.....	20
Abbildung 1.6: Morphotypabhängige Immunantwort dendritischer Zellen gegen Mucorales	22
Abbildung 1.7: Signalkaskade der PRRs nach Aktivierung durch fungale Stimuli	30
Abbildung 4.1: Zeitlicher Verlauf der ROS-Freisetzung neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit verschiedenen Morphotypen von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i>	58
Abbildung 4.2: Stimulation der ROS-Antwort neutrophiler Granulozyten durch verschiedene Morphotypen von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i>	59
Abbildung 4.3: Titration des TLR4-Agonisten UltraPure-LPS	60
Abbildung 4.4: Titration der TLR4-Antikörper-Konzentration	62
Abbildung 4.5: Freisetzung von ROS durch Neutrophile in Anwesenheit von PRR-Antigenen und -Antikörpern.....	63

Abbildung 4.6: <i>Aspergillus</i> - und <i>Rhizopus</i> -induzierte ROS-Freisetzung durch Neutrophile nach TLR-Blockade	65
Abbildung 4.7: Freisetzung ROS durch Neutrophile nach TLR- und Dectin-1-Blockade	66
Abbildung 4.8: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Phagozytoserate.....	68
Abbildung 4.9: Phagozytoserate von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i> Konidien durch neutrophile Granulozyten nach Blockade verschiedener PRRs.....	69
Abbildung 4.10: Stimulation der Zytokin-Genexpression mononukleärer Zellen durch ruhende und ausgekeimte Stadien von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i>	72
Abbildung 4.11: Validierung der Suppression der CLEC7A-mRNA Expression nach RNA-Interferenz in moDCs.....	74
Abbildung 4.12: Relative Expression von IL-1 β -mRNA in transfizierten moDCs nach Stimulation mit ruhenden und ausgekeimten Morphotypen von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i>	76
Abbildung 4.13: Freisetzung von IL-1 β durch transfizierte moDCs nach Stimulation mit ruhenden und ausgekeimten Morphotypen von <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i>	77

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Belegung der 24-Well-Platte für Kokulturstudien von Neutrophilen mit <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i> unter Einsatz von TLR2-, TLR4- und Dectin-1-Antikörper und den zugehörigen Agonisten... ..	48
Tabelle 2:	Belegung der 24-Well-Platte für Kokulturstudien von moDCs mit <i>A. fumigatus</i> und <i>R. arrhizus</i> unter Dectin-1-Blockade mittels siRNA.....	52

8.3. Abkürzungsverzeichnis

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Afu	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ALAS	δ -Aminolävulinatsynthase
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
C	<i>conidia</i> , Konidie
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CARD9	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 9</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLEC7A	<i>C-type lectin domain family 7 member A</i>
DC	dendritische Zelle
DCF	<i>Dichlorfluoresceindiacetat</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EphA2	<i>Ephrin type-A receptor 2</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gravitationskraft
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GT	<i>germtube</i> , Keimschlauch
HBSS	Hanks' Buffered Salt Solution
H	Hyphe
IFN	Interferon
IL	Interleukin
<i>MCP</i>	<i>monocyte chemotactic protein</i>
Med	Mediumkontrolle

moDC	<i>monocyte derived Dendritic Cells</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NP	<i>Neutrophil cationic peptides</i>
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	<i>Phosphat-Buffered Saline</i>
PMA	<i>Phorbol-12-Myristat-13-Acetat</i>
PMN	polymorphkernige Leukozyten
PRR	Pattern recognition receptor
<i>R. arrhizus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Rar	<i>Rhizopus arrhizus</i>
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RT-qPCR	quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
siCtrl	Kontroll-siRNA
siRNA	<i>small interfering Ribonukleinsäure</i>
spp.	Spezies
SSC	<i>Side Scatter</i>
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UP-LPS	UltraPure-LPS
Zym depl	<i>Zymosan depleted</i>

8.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen herzlich danken, die mich bei meinem Studium und der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein großer Dank gebührt zunächst meinem Betreuungskomitee Prof. Dr. Jürgen Löffler, Prof. Dr. Andrew J. Ullmann und Prof. Dr. Hermann Einsele für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit unter ihrer wissenschaftlichen Leitung anfertigen zu dürfen sowie für die Bereitstellung des Labors und der benötigten Mittel.

Außerdem möchte ich der *Graduate School of Life Sciences* danken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit sowohl finanziell als auch durch das zahlreiche Angebot hilfreicher Kurse unterstützt hat.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Sebastian Wurster, M.Sc., der mich während der experimentellen Phase im Labor sowie darüber hinaus stets mit seinem unerschöpflichen Wissen begleitet hat. Danke für diese ausgezeichnete Betreuung und kontinuierliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich allen Spendern danken, ohne die die Durchführung der Experimente gar nicht erst möglich gewesen wäre.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine damaligen WG-Mitbewohnerinnen Anni, Lini, Nessi und Tabea die mir sowohl während des Studiums als auch während der Anfertigung dieser Arbeit immer emotionalen Rückhalt gaben und mir hilfreich zur Seite standen.

Von Herzen möchte ich meiner Mama und meiner Schwester danken, die mir immer wieder Zuversicht gaben und mich motivierten auch in schwierigen Phasen nicht aufzugeben und mein Ziel konsequent weiterzuverfolgen. Danke für euren großartigen Rückhalt und eure kontinuierliche Motivation. Zuletzt möchte ich meinem Freund Rodolfo für seine alltägliche Unterstützung, seine grenzenlose Geduld und seine Liebe danken.

