

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Vergleichende Untersuchung der Interaktion humaner und  
muriner Immunzellen mit *Aspergillus fumigatus***

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Anna-Maria Hellmann  
aus Fulda  
Würzburg, Januar 2021





**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

**Koreferent:** Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 21.02.2022

**Die Promovendin ist Ärztin.**



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	1
1.2 Die invasive Aspergillose.....	4
1.3 Zelluläre Immunantwort gegen <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	10
1.3.1 Alveolarmakrophagen.....	11
1.3.2 Neutrophile Granulozyten .....	12
1.3.3 Dendritische Zellen .....	13
1.4 Mausmodell .....	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	15
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum .....	17
2.2 Material.....	17
2.2.1 Geräte.....	17
2.2.2 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.2.3 Medien, Reagenzien und Zytokine .....	19
2.2.4 Kits.....	20
2.2.5 Antikörper und Beads .....	20
2.2.6 Software.....	21
2.3 Methoden.....	22
2.3.1 Humane Primärzellen .....	22
2.3.1.1 Isolation von peripheren mononukleären Zellen.....	22
2.3.1.2 Isolation von Monozyten .....	22
2.3.1.3 <i>In vitro</i> Generieren von monozytären Makrophagen .....	23
2.3.1.4 <i>In vitro</i> Generieren von monozytären dendritischen Zellen .....	23
2.3.1.5 Isolation von humanen neutrophilen Granulozyten .....	24
2.3.2 Murine Primärzellen.....	24

---

2.3.2.1 Isolation von murinen Knochenmarkzellen und Generierung von murinen Makrophagen.....	24
2.3.2.2 Isolation von murinen Knochenmarkzellen und Generierung von murinen aus Knochenmarkzellen gereiften dendritischen Zellen .....	24
2.3.2.3 Isolation von murinen neutrophilen Granulozyten .....	25
2.3.3 <i>Aspergillus fumigatus</i> Pilzgenerierung und –kultivierung .....	25
2.3.4 Messung des oxidativen Bursts (ROS-Ausschüttung).....	26
2.3.4.1 Messung des oxidativen Bursts bei Makrophagen .....	26
2.3.4.2 Messung des oxidativen Bursts bei neutrophilen Granulozyten .....	26
2.3.5 Analyse der Zytokinsekretion mittels Multiplex-ELISA.....	27
2.3.6 <i>Live-cell Imaging</i> .....	27
2.3.7 Durchflusszytometrische Analysen.....	28
2.3.7.1 Durchflusszytometrische Analyse der Maturation von dendritischen Zellen .....	28
2.3.7.2 Dectin-1-Messungen mittels Durchflusszytometrie.....	32
2.3.8 Statistik .....	33
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1 Vergleichende Untersuchung der ROS-Ausschüttung zwischen humanen und murinen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten .....	34
3.1.1 ROS-Ausschüttung von Makrophagen .....	34
3.1.2 ROS-Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten .....	35
3.2 Analyse der Zytokinsekretion von humanen und murinen Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen .....	37
3.2.1 Zytokinsekretion von Makrophagen.....	37
3.2.2 Zytokinsekretion von neutrophilen Granulozyten.....	39
3.2.3 Zytokinsekretion von dendritischen Zellen.....	41
3.3 Analyse des Phagozytoseverhaltens von dendritischen Zellen mittels <i>Live-cell Imaging</i> .....	43

---

3.4 Untersuchung der Oberflächenexpression auf dendritischen Zellen nach Stimulation mit <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	45
3.4.1 Oberflächenexpression von Maturationsmarkern auf dendritischen Zellen .	45
3.4.2 Dectin-1-Oberflächenexpression auf dendritischen Zellen .....	48
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>50</b>
4.1 Vergleich von humanen und murinen Makrophagen .....	51
4.2 Vergleich von humanen und murinen neutrophilen Granulozyten.....	53
4.3 Vergleich von humanen und murinen dendritischen Zellen.....	54
4.4 Weitere Versuchsmodelle.....	57
4.5 Limitationen und Ausblick .....	62
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>64</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>



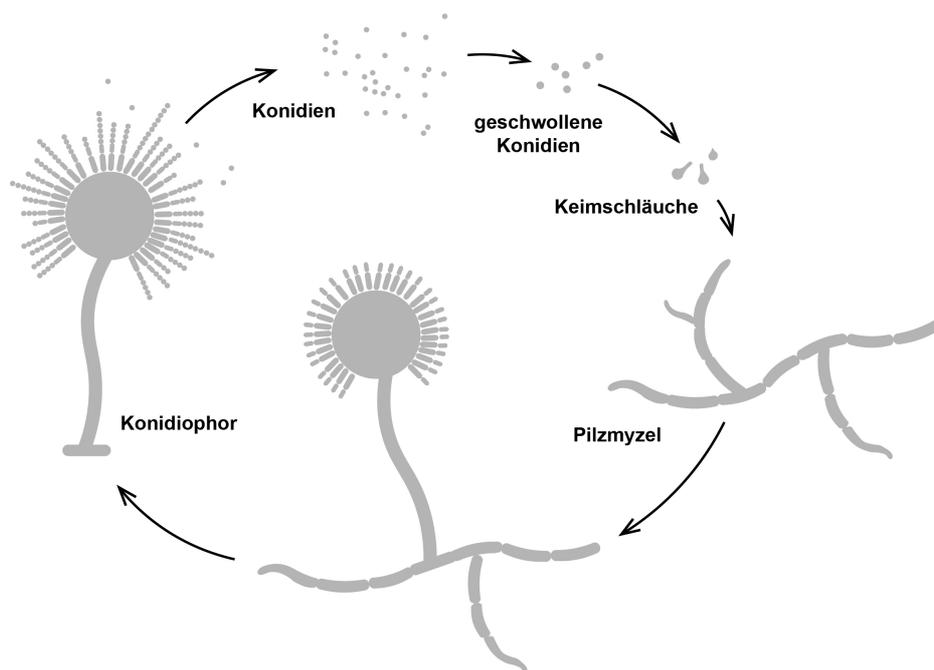
# 1 Einleitung

## 1.1 *Aspergillus fumigatus*

Der Schlauchpilz *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) wird taxonomisch zu der Gattung der Gießkannenschimmel (*Aspergillus*) gezählt, welche 350 Arten von Schimmelpilzen mit aspergillförmigen Sporenträgern umfasst. Die rauchgrüne Farbe seiner Sporen (lat. *fumus*: der Rauch) sowie die Form des Sporenträgers (Konidiophor), welche an ein Aspergill (liturgisches Gerät zum Besprengen mit Weihwasser von lat. *aspergere*: besprengen) erinnert, verleiht ihm dabei seinen Namen. Als saprophytisch wachsenden Pilz findet man *A. fumigatus* ubiquitär in der Umwelt, er wächst insbesondere auf Erdböden, Kompost, Pflanzenerde und verderbenden Lebensmitteln [Latgé (1999), Park and Mehrad (2009)]. Neben den überwiegend apathogenen Arten der Gattung *Aspergillus*, finden sich auch Arten mit humanpathogener Relevanz: Während bspw. *A. niger* als Erreger bei infektiösen Otitiden gefunden werden kann [Abdelazeem, Gamea et al. (2015)], spielt *A. flavus* eine nicht unerhebliche Rolle bei der Entwicklung des kleinzelligen Leberzellkarzinoms durch das Wachstum auf Getreide und die Bildung des Kanzerogens Aflatoxin, welches insbesondere in Afrika ein großes gesundheitliches Problem darstellt [McCullough and Lloyd (2019)]. In den Industrienationen ist insbesondere *A. fumigatus* als der häufigste Erreger bei invasiven Mykosen von medizinischer Relevanz [Latgé and Chamilos (2019)]. Dabei stellen die stetig steigenden Zahlen an Patientinnen und Patienten mit einer iatrogen verursachten Immunsuppression, die sehr hohe Letalität einer invasiven Aspergillose sowie die hohen Therapiekosten eine medizinische und gesundheitsökonomische Herausforderung dar [Latgé and Chamilos (2019), Herbrecht, Moghaddam et al. (2005), Chignard, Balloy et al. (2007)].

Ausgangspunkt der Interaktion von *A. fumigatus* mit dem menschlichen Organismus stellen die aerogenen Sporen, auch Konidien genannt, dar, welche im Rahmen des Entwicklungszyklus von *A. fumigatus* gebildet werden. Konidien sind dabei höchst widerstandsfähig und überleben selbst extreme Temperaturen und Trockenheit. Bei günstigen Umweltbedingungen schwellen die Konidien an, sprossen aus und bilden Keimschläuche. Die Keimschläuche wachsen anschließend als Hyphen zu einem Pilzgeflecht (Pilzmyzel), auf welchem sich die neuen Sporenträger ausbilden. Von diesen Konidiophoren werden Konidien in die Luft abgegeben und der Entwicklungszyklus beginnt von Neuem (Abb. 1) [Park and Mehrad (2009)]. Es ist

anzumerken, dass *A. fumigatus* lange zu den *Fungi imperfecti* gezählt wurde, welche sich ausschließlich wie beschrieben anamorph, sprich asexuell, fortpflanzen (asexueller Entwicklungszyklus). Durch die vollständige Gensequenzierung ergaben sich jedoch Hinweise auf einen sexuellen Vermehrungszyklus, welcher 2009 erstmals von O’Gorman et al. beschrieben wurde [O’Gorman, Fuller et al. (2009)]. Die sexuelle Vermehrung ermöglicht dem Pilz eine höhere genetische Variation und dadurch die Möglichkeit der evolutionären Anpassung.



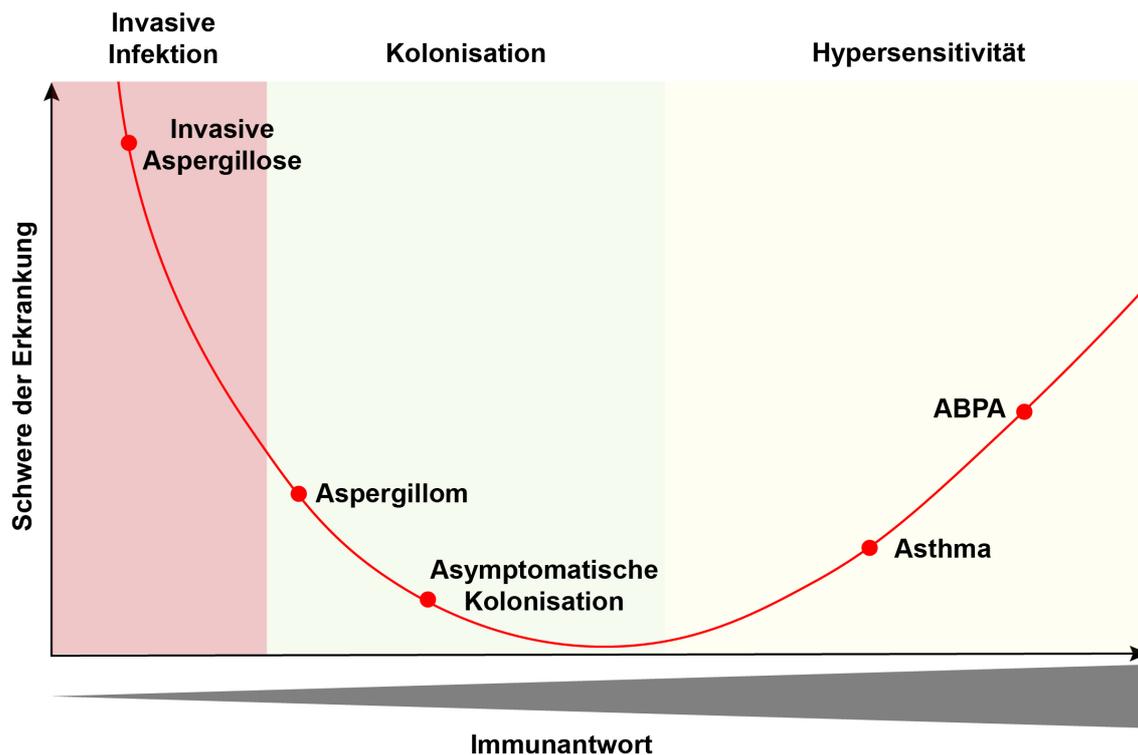
**Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *A. fumigatus***

*A. fumigatus* Konidien schwellen an, knospen aus und wachsen als Keimschläuche zu einem Pilzmyzel. Auf diesem bilden sich schließlich Konidiophoren aus, welche erneut Konidien an die Umwelt abgeben [Park and Mehrad (2009)].

Der Mensch atmet täglich mehrere Hunderte *A. fumigatus* Konidien ein [Ben-Ami, Lewis et al. (2010)]. Sie befinden sich je nach Umgebung mit einer Konzentration von 1-100 Konidien/m<sup>3</sup> in der Luft und können aufgrund ihrer Partikelgröße von 2-3 µm die humanen Lungenalveolen erreichen [Latge (2001)]. Auch die Thermotoleranz von *A. fumigatus* macht den Menschen zu einem geeigneten Wirt für eine opportunistische Infektion. Die optimale Wachstumstemperatur liegt mit 37-42 °C im Bereich der menschlichen Körperkerntemperatur [McCormick, Loeffler et al. (2010)]. Zudem sind die Konidien von einer hydrophoben Rodlet-Schicht umgeben. Diese spezielle Proteinschicht aus immunologisch-inertem RodA schützt den Pilz vor Umwelteinflüssen

und nach der Inokulation durch die Maskierung von Zellwandbestandteile vor der Identifizierung durch das menschliche Immunsystem [Valsecchi, Dupres et al. (2017)].

Während bei immunkompetenten Individuen die Inhalation von Konidien in der Regel folgenlos bleibt, kann der fakultativ pathogene *A. fumigatus* in immunkomprimierten Patientinnen und Patienten oder bei einer gestörten Gewebestruktur der Lunge zu verschiedenen Erkrankungen führen. Ob und in welcher Form eine *Aspergillus*-assoziierte Erkrankung auftritt, ist dabei abhängig von dem Immunstatus des Patienten (Abb. 2). Bei hyperreagiblem Immunsystem kann die Konfrontation mit *A. fumigatus* zu allergischem Asthma sowie zur allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) führen. Bei einem leicht bzw. lokal geschwächten Immunsystem durch lokale Gewebsschädigung wie z.B. bei der Lungentuberkulose oder zystischen Fibrose kann es zu einer asymptomatischen Kolonisation mit dem Erreger oder zur Formation eines lokal begrenzten Pilzherdes, einem sogenannten Aspergillom, kommen. Bei einer starken Schwächung des Immunsystems, bspw. im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation, kann das Einatmen von Konidien zu einer invasiven Pilzinfektion mit *A. fumigatus* führen, der sogenannten invasiven Aspergillose (IA). Dieses Spektrum an *Aspergillus* assoziierten Erkrankungen unterstreicht eindrucksvoll die entscheidende Rolle der Balance der Immunantwort des Wirts bei der Infektion mit *A. fumigatus*. Hierbei besteht der Zwiespalt einerseits zwischen einer notwendigen Immunabwehr zur Verhinderung einer Infektion und andererseits einem Überschießen der Immunantwort mit der Gefahr einer Gewebeschädigung durch Hyperinflammation.



**Abbildung 2: *Aspergillus*-assoziierte Erkrankungen in Abhängigkeit der Immunantwort des Wirtsorganismus**

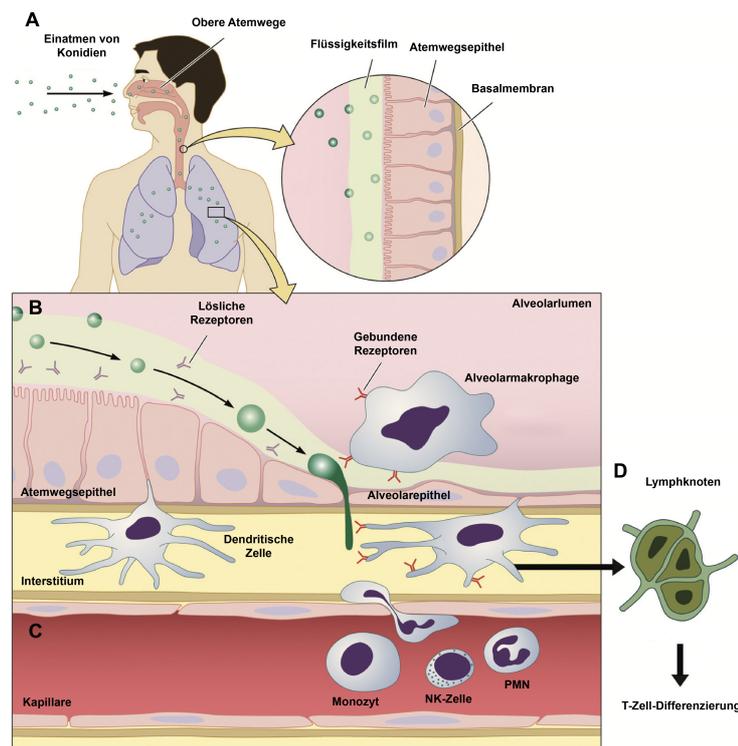
In Abhängigkeit des Immunstatus des Wirtes kann es bei Kontakt mit *A. fumigatus* zu einem weiten Spektrum an und zu verschiedenen Schweregraden der Erkrankung kommen. Je nach Immunstatus des Wirtes kann es hierbei von einer invasiven Aspergillose, über eine asymptomatische Kolonisation bis hin zu einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA), ausgelöst durch eine Hyperinflammation, kommen. Adaptiert von Park and Mehrad (2009), genehmigt durch den Herausgeber (*American Society for Microbiology*).

## 1.2 Die invasive Aspergillose

Die IA unterscheidet sich von der Kolonisation durch das Eindringen des Pathogens in das Gewebe und konsekutiv in die Blutstrombahn des Wirtes. Der häufigste Erreger der IA ist dabei *A. fumigatus* [Moura, Cerqueira et al. (2018)]. Da die Pilzsporen ubiquitär in der Luft vorkommen und eingeatmet werden, ist die primäre Eintrittspforte die Lunge. Eine weitere Eintrittspforte stellen die Nasennebenhöhlen dar.

Der menschliche Organismus verfügt über eine Reihe von Abwehrmechanismen, um eine Kolonisation bzw. ein Eindringen des Pathogens in den Organismus zu verhindern. Dabei spielen sowohl mechanische Barrieren als auch zelluläre und humorale Bestandteile des Immunsystems eine wichtige Rolle: Inhalierte Konidien können primär

mit Hilfe der mukoziliären Clearance des respiratorischen Epithels aus den Atemwegen entfernt werden (Abb. 3 A). Dabei werden die Konidien durch den Mukus gebunden und anschließend aktiv durch die Zilienbewegung der Epithelzellen in die extrathorakalen Atemwege befördert, wo sie abgehustet oder verschluckt werden [Balloy and Chignard (2009)]. Gelangen Konidien in tiefere Bereiche der Atemwege (Abb. 3 B) können diese durch Alveolarmakrophagen phagozytiert und damit inaktiviert werden [Philippe, Ibrahim-Granet et al. (2003)]. Verstärkt wird dieser Effekt durch Surfactant A und D, welche von den Pneumozyten Typ II produziert werden und als Opsonine die Aktivität der phagozytierenden Zellen steigern können [Madan, Kishore et al. (2001)]. Nicht eliminierte Konidien sprossen bei Körpertemperatur aus und können als Hyphen in das Lungengewebe und die Blutstrombahn eindringen (Abb. 3 C). Gelangen *A. fumigatus* Hyphen bis in das Gewebe und die Blutstrombahn, so kann eine Elimination dieser durch neutrophile Granulozyten durch Ausschüttung radikaler Sauerstoffspezies, Bilden von extrazellulären Netzen sowie Phagozytose erfolgen [Feldmesser (2006), Margalit and Kavanagh (2015), Alflen, Aranda Lopez et al. (2020)]. Als weiterer Abwehrmechanismus können dendritische Zellen im Gewebe *A. fumigatus* phagozytieren und durch eine nachfolgende Antigenpräsentation eine Immunantwort durch die Aktivierung von T-Lymphozyten induzieren (Abb. 3 D) [Bozza, Gaziano et al. (2002)]. Sie stellen somit ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar. Auch spielt die Zytokinausschüttung der verschiedenen Immunzellen, welche eine Koordination der Immunantwort gegen *A. fumigatus* ermöglicht, eine entscheidende Rolle [Feldman, Vyas et al. (2019)]. Eine detaillierte Darstellung der Funktion der einzelnen Abwehrzellen in der Immunantwort gegen *A. fumigatus* erfolgt in Abschnitt 1.3.



### Abbildung 3: Pathogenese der invasiven Aspergillose

Schematische Darstellung der an der Immunantwort gegen in den Organismus per Inhalation aufgenommenen *Aspergillus* Konidien. Nach Eintreten der Konidien über die oberen Atemwege (A) können diese bei fehlender oder nicht funktioneller mukoziliärer Clearance in die tieferen Atemwege fortschreiten (B). Bei insuffizienter Immunantwort ist ein Eindringen des Pilzes in das Lungeninterstitium sowie die Blutbahn möglich (PMN, polymorphonukleäre Zelle, NK, Natural-Killer-Zelle) (C). Nach Kontakt mit dem Pilz wandern dendritische Zellen in die regionalen Lymphknoten und können hier T-Zellen aktivieren (D). Adaptiert von Park and Mehrad (2009), genehmigt durch den Herausgeber (*American Society for Microbiology*).

Bei Versagen dieser Abwehrmechanismen, wie es bspw. bei Immunsupprimierten der Fall sein kann, kann es zu einer Ausbreitung des Pilzes in der Lunge und zu einer pulmonalen invasiven Aspergillose kommen. Über die Blutstrombahn ist eine Dissemination möglich, welche meist den kontralateralen Lungenflügeln und das Gehirn betrifft [Park and Mehrad (2009)]. Aggravierend kann es durch Erosion von Blutgefäßen zu starken Blutungen sowie zu thromboembolischen Komplikationen wie ischämischen Nekrosen in peripheren Geweben kommen.

Die IA zeigt als opportunistischen Infektion bei immunsupprimierten Patientinnen und Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen eine hohe Prävalenz [Busca and Pagano

(2018), Latgé and Chamilos (2019)]. Risikofaktoren stellen dabei insbesondere eine prolongierte Neutropenie dar, welche sowohl iatrogen als auch krankheitsbedingt auftreten kann, sowie eine längerfristige Therapie mit hochdosierten Corticosteroiden. Während bei der Neutropenie die erforderlichen neutrophilen Granulozyten zur Inhibition des Wachstums und der Ausbreitung der invasiven Hyphen quantitativ fehlen, führt eine Corticosteroidtherapie zu einer qualitativen Beeinträchtigung der Funktion von Immunzellen. Dabei kommt es zu einer Hemmung der Bildung von reaktiven Oxygenspezies (ROS) durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten und somit zu einer verminderten Elimination des Pilzes in verschiedenen Stadien der Infektion [Philippe, Ibrahim-Granet et al. (2003), Ronchetti, Ricci et al. (2018)]. Aktivierte neutrophile Granulozyten werden jedoch trotzdem zum Ort der Infektion geleitet und können dort eine Entzündungsreaktion mit lokaler Gewebeschädigung verursachen [Ronchetti, Ricci et al. (2018)].

Patientinnen und Patienten, bei denen die zuvor genannten Risikofaktoren vorliegen und die somit ein hohes Risiko zur Entwicklung einer IA haben, sind u.a. Patientinnen und Patienten mit akuten Leukämien, auch aufgrund von aggressiven Chemotherapie-Regimen, nach allogener Stammzelltransplantation, nach solider Organtransplantation mit anschließender längerfristiger Immunsuppression, mit AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), angeborenen Immundefekten oder Patientinnen und Patienten unter immunsuppressiver Therapie bspw. bei Autoimmunerkrankungen.

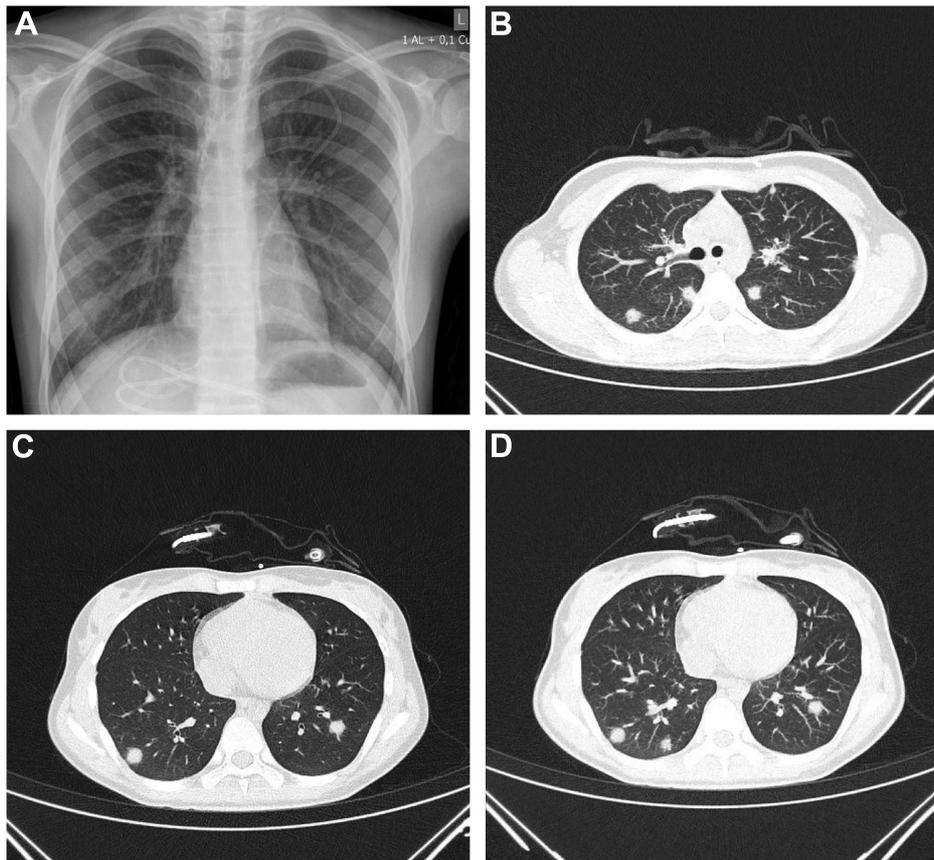
Durch Aufkommen neuer Therapieregime in den vergangenen Jahren ergaben sich zudem neue Risikogruppen für die IA. Hierzu zählen Patientinnen und Patienten, welche *small-molecule* Kinase-Inhibitoren erhalten [Bazaz and Denning (2018), Ghez, Calleja et al. (2018)], Intensiv-Patientinnen und -Patienten nach durchgemachter bakterieller Sepsis [Taccone, Van den Abeele et al. (2015)] sowie Patientinnen und Patienten nach CAR-T Zell-Therapie und Corticosteroid-Therapie [Hill, Li et al. (2018)]. Die eben genannten Risikofaktoren gehen zwar in der Regel nicht mit einer Neutropenie, jedoch mit einer Immunmodulation einher, welche das Auftreten einer IA ermöglicht.

Die IA ist mit einer hohen Letalität behaftet, welche durch die oft schwere Grunderkrankung der Patientinnen und Patienten sowie die späte Diagnosestellung der IA und die nebenwirkungsreiche Therapie bedingt ist [Latgé and Chamilos (2019)]. Begünstigt wird dieser Umstand durch einen anfänglich oft symptomarmen bzw. unspezifischen Verlauf mit Husten, einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes und antibiotikaresistenten Fieber. Seltener kommt es weiterhin zu Dyspnoe, pleuralen Schmerzen, vermehrtem Sputum und Hämoptysen [Denning (1998)]. Aufgrund der

Tatsache, dass das Fieber durch verschiedene Medikamente sowohl unterdrückt als auch durch die Grunderkrankung bzw. durch andere Infektionen ausgelöst werden kann, ist eine frühe Diagnose bzw. die Eingrenzung der Differentialdiagnosen oft schwierig.

Zur Diagnosestellung der IA stehen mehrere Optionen zur Verfügung, welche meist nur in Kombination und unter Beachtung der Symptome wegweisend sind:

- . Serologische Marker: Üblich ist hierbei der Galactomannan-Nachweis (spezifisch für *Aspergillus*) oder  $\beta$ -D-Glucan-Nachweis (auch bei anderen invasiven Mykosen positiv) im Blut.
- . Bildgebende Verfahren: Mittel der Wahl ist eine Schnittbildgebung wie bspw. eine *low-dose* Computertomographie (CT) (Abb. 4) oder Magnetresonanztomographie. Bei pulmonalem Befall sind hierbei oft Rundherde mit einem sogenannten Halo-Sign im CT wegweisend.
- . Mikroskopie: Es erfolgt der Nachweis von Hyphen aus einem Biopsat oder aus Flüssigkeit, welche bei einer bronchoalveolären Lavage (BAL) gewonnen wird.
- . Kultur: Es erfolgt ein kultureller Nachweis aus sonst sterilem Material wie Blut oder Pleuraerguss. Auch der kulturelle Nachweis aus BAL-Flüssigkeit ist anzustreben.
- . Molekulargenetische Verfahren: Bei der *Aspergillus*-PCR handelt es sich um den Nachweis von *A. fumigatus*-DNA aus Blut, BAL-Flüssigkeit oder einem Biopsat.



**Abbildung 4: Vergleichende Röntgen-Thorax- und CT-Thorax-Aufnahmen einer Patientin mit invasiver Pilzinfektion**

Bildgebung einer 14-jährigen AML-Patientin mit invasiver Pilzinfektion bei Aplasie unter Therapie. Die Patientin präsentierte sich mit Fieber und rasselnden Atemgeräuschen, gezeigt werden eine weitestgehend unauffällige Röntgen-Thorax a.p.-Aufnahme (a.p., anterior posterior, Strahlengang der Röntgenaufnahme) **(A)** sowie multiple Rundherde im CT-Thorax nativ **(B-D)** mit freundlicher Genehmigung der Kinderonkologie Universitätskinderklinik Köln.

Bei Verdacht auf eine IA sollte schnellstmöglich mit einer Therapie begonnen werden. Erste Wahl hierbei ist die intravenöse Therapie mit Voriconazol [von Lilienfeld-Toal, Wagener et al. (2019)]. Dieses gehört zu der Gruppe der Azole und hemmt die Ergosterolsynthese der Pilzmembran. Bei zunehmenden Azolresistenzen [Perlin, Rautemaa-Richardson et al. (2017)] spielen Polyene, wie das liposomale Amphotericin B, welche eine Porenbildung in der Pilzmembran durch Bindung an Ergosterol induzieren, eine zunehmende Rolle in der Therapie der IA [Jenks and Hoenigl (2018)]. Bei Hochrisikopatienten sollte je nach Erkrankung zudem eine prophylaktische Therapie bspw. mit Posaconazol erwogen werden [Mellinghoff, Panse et al. (2018)].

### 1.3 Zelluläre Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus*

Die Erkennung von *A. fumigatus* durch das menschliche Immunsystem erfolgt über Pathogen-Erkennungsrezeptoren (PRR, *pattern-recognition receptors*), welche von verschiedenen Abwehrzellen exprimiert werden. Diese binden an spezifische extrazelluläre Strukturen des Pilzes wie bspw.  $\beta(1,3)$ -D-Glucan und Mannan sowie auch an intrazellulären Pilzbestandteile, welche nach Abtötung des Pilzes freigesetzt werden. Diese vom Immunsystem erkannten Antigene werden auch als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet [Chai, Vonk et al. (2011)]. Die Aktivierung der PRRs durch Binden an PAMPs führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) und zur konsekutiven Hochregulation der Produktion verschiedener Zytokine bzw. zur Maturation von dendritischen Zellen [Rescigno, Martino et al. (1998), Lawrence (2009)]. Die wichtigsten PRRs in der Erkennung von *A. fumigatus* sind dabei Dectin-1, ein C-Typ Lectin Rezeptor, sowie die Toll-like Rezeptoren -2 und -4 [Ferwerda, Meyer-Wentrup et al. (2008)].

Dectin-1 (CLEC7A, *C-type lectin domain family 7 member A*) ist ein Transmembran-Rezeptor, welcher von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird und  $\beta(1,3)$ -D-Glucan bindet, einen Hauptbestandteil der Pilzzellwand [Taylor, Brown et al. (2002), Taylor, Tsoni et al. (2007)]. Aufgrund der nach extrazellulär gerichteten hydrophoben Rodlet-Schicht von ruhenden Konidien wird  $\beta(1,3)$ -D-Glucan maskiert, sodass Dectin-1 nur an geschwollene Konidien, Keimschläuche und Pilzhyphen binden kann. Dectin-1 dient hierbei als Phagozytose-Rezeptor sowie zur Initiierung einer proinflammatorischen Immunantwort [Mezger, Kneitz et al. (2008)].

Eine weitere Rezeptorfamilie, welche bei der Erkennung von *A. fumigatus* eine wichtige Rolle spielt, sind die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs). Hierbei handelt es sich um eine große Gruppe an PRRs, welche in der Lage sind, verschiedene PAMPs zu erkennen. Bei der Erkennung von *A. fumigatus* sind insbesondere TLR-2 und -4 von Bedeutung, welche auf Monozyten, dendritischen Zellen sowie Makrophagen exprimiert werden [Braedel, Radsak et al. (2004), Mambula, Sau et al. (2002)]. Oberflächenmoleküle von Konidien binden dabei sowohl an TLR-2 und -4, Hyphen ausschließlich an den TLR-4-Rezeptor [Netea, Warris et al. (2003)]. Zymosan, ein Homoglykan und Bestandteil der fungalen Zellwand, ist hierbei ein Ligand für den Dectin-1- sowie TLR-2-Rezeptor [Sato, Sano et al. (2003), Brown (2006)].

Im Folgenden wird vor allem detailliert auf die unterschiedlichen Zelltypen des angeborenen Immunsystems und ihrer Rolle in der Abwehr von *A. fumigatus* eingegangen, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Darüber hinaus stellen diese z.T. ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar. Auch *Natural-Killer-Zellen* (NK-Zellen) sind an der Immunabwehr gegen *A. fumigatus* durch Freisetzung von Perforin, Granzym und Interferon  $\gamma$  (IF $\gamma$ ) beteiligt [Schmidt, Tramsen et al. (2011), Bouzani, Ok et al. (2011)]. Auf die Rolle von NK-Zellen in der Immunantwort gegen *A. fumigatus* sowie auf die Rolle der adaptiven Immunantwort wird in dieser Arbeit nicht detailliert eingegangen.

### 1.3.1 Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen sind ortsansässige Makrophagen im respiratorischen Gewebe, welche als erste Verteidigungslinie gegen Erreger dienen, die in den unteren Respirationstrakt eingedrungen sind [Brakhage, Bruns et al. (2010)]. Sie zählen zu der Gruppe des mononukleären Phagozytensystems. Sie gehen als ortsansässige, spezialisierte Makrophagen in der Embryogenese aus den fetal blutbildenden Organen ( Dottersack, Leber) hervor. Hierbei bilden sich aus hämatopoetischen Stammzellen embryonale Gewebsmakrophagen-Vorläuferzellen, welche in das periphere Gewebe (Hirn, Leber, Lunge, Milz) wandern und sich dort zu spezialisierten Makrophagen entwickeln [Tan and Krasnow (2016)].

Nach der Embryonalzeit können Monozyten (CD14<sup>+</sup>, Ly6<sup>high</sup>), welche im Knochenmark unter Einfluss von M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*) aus der myeloischen Reihe gebildet werden, in das Gewebe einwandern und dort zu Makrophagen ausdifferenzieren. Sie haben einen Zelldurchmesser von 10-15  $\mu\text{m}$  [Abbas (2015)].

Die Hauptaufgabe der Alveolarmakrophagen in der Abwehr von *A. fumigatus* ist die Phagozytose und intrazelluläre Abtötung von Konidien. Hierbei werden die aufgenommenen Konidien im Phagolysosom zersetzt. Auch die Ausschüttung von ROS zur extrazellulären Abtötung von Konidien ist beschrieben [Grimm, D'Auria et al. (2014)]. Makrophagen können zudem durch die Ausschüttung von Zytokinen mit anderen Immunzellen interagieren und somit die Immunantwort verstärken aber auch regulieren. Durch Th1-Zellen (T-Helfer-Zellen Typ 1) via IF $\gamma$  aktivierte Makrophagen schütten proinflammatorische Zytokine wie Interleukin1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), IL6, IL12, IL23 und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) aus. IL1 $\beta$  ist hierbei die hauptsächlich sekretierte, biologisch aktive Isoform von IL1. Als Hauptvertreter der proinflammatorischen Zytokinantwort gelten TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IL6; sie wirken unter anderem parakrin und führen

zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Endothelzellaktivierung, aber auch pyrogen, fördern die Bildung von akute Phase Proteinen in der Leber, aktivieren Th17-Zellen, welche zur Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten beitragen, sowie verstärken die Th1-Antwort. Auf der anderen Seite können Makrophagen jedoch auch anti-inflammatorische und immunoregulatorische Zytokine wie IL10 sekretieren. IL10 hemmt die IL12-Ausüttung und führt zur vermehrten Expression von MHC (*major histocompatibility complex*, deut. Haupthistokompatibilitätskomplex)-II-Molekülen. Es fördert somit den Übergang der akuten, angeborenen zu der adaptiven Immunantwort [Madan, Abbas et al. (2001), Shapouri-Moghaddam, Mohammadian et al. (2018)]. Durch Phagozytose von abgetöteten Wirtszellen tragen Makrophagen zudem zur Gewebereparatur bei. Als antigenpräsentierende Zellen können Makrophagen spezifische T-Zellen aktivieren und die adaptive Immunantwort regulieren [Abbas (2015)]. Unter Corticosteroid-Therapie kommt es zu einer verminderten Bildung von ROS verbunden mit einer verminderten intrazellulären Elimination des Pilzes [Philippe, Ibrahim-Granet et al. (2003)].

### 1.3.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils*, PMNs) sind Teil des angeborenen Immunsystems. Ihr Name geht aus der lobulierten Morphologie ihres Zellkernes sowie des Färbeverhaltens ihrer im Zytoplasma befindlichen Granula hervor. Der Durchmesser eines PMN beträgt 12-15 µm. Nach ihrer Bildung im Knochenmark aus myeloischen Vorläuferzellen unter dem Einfluss von G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) gelangen die neutrophilen Granulozyten in die Blutstrombahn und zirkulieren dort Stunden bis wenige Tage [Abbas (2015)]. Bei einer Infektion können diese durch die lokale Freisetzung von Botenstoffen in das Zielgewebe migrieren und somit zum Ort der Infektion gelangen [Shevchenko, Bogorodskiy et al. (2018)].

In der Immunantwort gegen *A. fumigatus* sind neutrophile Granulozyten verantwortlich, das Auskeimen des Pilzes zu verhindern, sowie bereits gebildete Hyphen abzutöten [Feldmesser (2006)]. Sind die neutrophilen Granulozyten über die Blutbahn durch Chemotaxis am Ort der Infektion angekommen, verlassen sie diese und migrieren in das infizierte Gewebe. Dort setzen die PMNs reaktive Sauerstoffspezies frei, welche zur Abtötung des Pilzes beitragen. Es wird auch eine regulatorische Rolle der ROS als Signalmoleküle diskutiert [Brakhage, Bruns et al. (2010)]. Zudem können PMNs Konidien phagozytieren sowie NETs (*neutrophil extracellular traps*, deut. extrazelluläre Netze) bilden, welche aus Chromatin und antimikrobiellen Proteinen bestehen und den

Pilz binden und unschädlich machen können [Ravindran, Khan et al. (2019)]. Durch die Ausschüttung von Zytokinen findet eine Regulation der Immunantwort statt: So wirken IL8, Gro $\alpha$  (*growth-related gene product  $\alpha$* ) und Gro $\beta$  erneut chemotaktisch auf weitere PMNs und führen zur vermehrten Migration von PMNs zum Ort der Infektion. Andere Zellpopulationen wie Monozyten, Makrophagen, unreife dendritische Zellen, Lymphozyten, NK-Zellen, eosinophile und basophile Granulozyten werden unter anderem durch die von PMNs produzierten Zytokine MCP1 (*monocyte chemotactic protein 1*), MIP1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* ) und MIP1 $\beta$  angezogen. IL8 sowie das auch ausgeschüttete, chemotaktisch auf T-Lymphozyten wirkende IP10 (*interferon- $\gamma$ -inducible protein 10*) haben zudem eine angiogenetische Wirkung [Scapini, Lapinet-Vera et al. (2000), Abbas (2015)].

### 1.3.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) sind antigen-präsentierende Zellen und fungieren somit als wichtigstes Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem [Janeway (2008)]. Sie haben ihren Namen von den baumartigen Zellfortsätzen (griech. *dendron*: der Baum), welche sie zur Antigenaufnahme nutzen. Sie gehen aus der myeloischen Reihe im Knochenmark aus einer monozytären Vorläuferzelle hervor und wandern dann in das periphere Gewebe aus [Banchereau and Steinman (1998)]. Man unterscheidet verschiedene Subtypen von dendritischen Zellen. Die Hauptaufgabe der klassischen dendritischen Zelle ist es, mikrobielle bzw. im Fall der IA Pilzbestandteile zu phagozytieren, in das lymphatische Gewebe zu migrieren, das Antigen zu präsentieren und somit naive T-Zellen hierdurch zu aktivieren. Sie tragen auch durch Ausschüttung von Zytokinen zur Regulation des Immunsystems bei. Des Weiteren gibt es plasmazytoide DCs, welche vor allem in der Abwehr gegen virale Erreger eine Rolle spielen [Geissmann, Manz et al. (2010)]. Da dendritische Zellen nur eine sehr kleine Zellfraktion im peripheren Blut darstellen, werden für *in vitro* Versuche in der Regel dendritische Zellen aus den häufiger vertretenen Monozyten unter dem Einfluss von IL4 und GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) generiert; diese werden als moDCs (*monocyte-derived dendritic cells*) bezeichnet [Bender, Sapp et al. (1996)].

Nach Antigenaufnahme im Lungeninterstitium reifen die DCs durch Hochregulation von MHC-I, MHC-II, CD80 (*cluster of differentiation 80*), CD86 sowie CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*) aus [Zhou and Tedder (1996), Cella, Engering et al. (1997), Yanagihara, Komura et al. (1998), Lutz and Schuler (2002)]. CCR7 fungiert hierbei als *homing-*

Rezeptor und dient zur Migration der DCs in die T-Zell-Zone der Lymphknoten [Humrich, Humrich et al. (2006), Forster, Davalos-Misslitz et al. (2008)]. Auch für murine DCs wurde dieser Vorgang beschrieben [Bozza, Gaziano et al. (2002)]. Im lymphatischen Gewebe angelangt, werden nun die vorher prozessierten Pilzfragmente an der Zelloberfläche als Antigen über MHC-I und -II Komplexe präsentiert. Hierbei dienen über MHC-I Moleküle präsentierte Antigene der Erkennung durch  $CD8^+$  T-Zellen sowie über MHC-II Moleküle präsentierte Antigene der Erkennung durch  $CD4^+$  T-Zellen. Durch die spezifische Bindung des T-Zell-Rezeptors sowie CD4 bzw. CD8 an das präsentierte Antigen findet eine Selektion von spezifischen T-Zellen statt. Als Ko-Stimulation dienen weiterhin die Bindung von CD80 und CD86 der antigenpräsentierenden Zelle an CD28 der T-Zelle, sowie die Ausschüttung von Zytokinen durch die DCs [Abbas (2015)]. Die von den DCs ausgeschütteten Zytokine spielen hierbei insbesondere eine Rolle für die T-Zell-Differenzierung. Hierbei differenzieren sich aktivierte  $CD8^+$  T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen während sich  $CD4^+$  T-Zellen je nach ausgeschütteten Zytokinen in verschiedene Subpopulationen differenzieren können. Hierzu zählen die anti-inflammatorischen Th2- und  $T_{reg}$ -Zellen, sowie die pro-inflammatorischen Th1- und Th17-Zellen [Janeway (2008), Abbas (2015)]. Während unter Einfluss von IL12 eine Differenzierung zu Th1-Zellen stattfindet, führt die Ausschüttung von IL1, IL6 und IL23 von den DCs zu einer Th17-Differenzierung der T-Zellen. Insbesondere die Th17-Zellen sind anschließend für die weitere Rekrutierung neutrophiler Granulozyten verantwortlich [Abbas (2015)].

Die DCs dienen somit als wichtige Schnittstelle zwischen dem angeborenen und adaptivem Immunsystem und sind in der Lage durch Aktivierung spezifischer T-Zellen die Immunantwort des Wirtes zu beeinflussen.

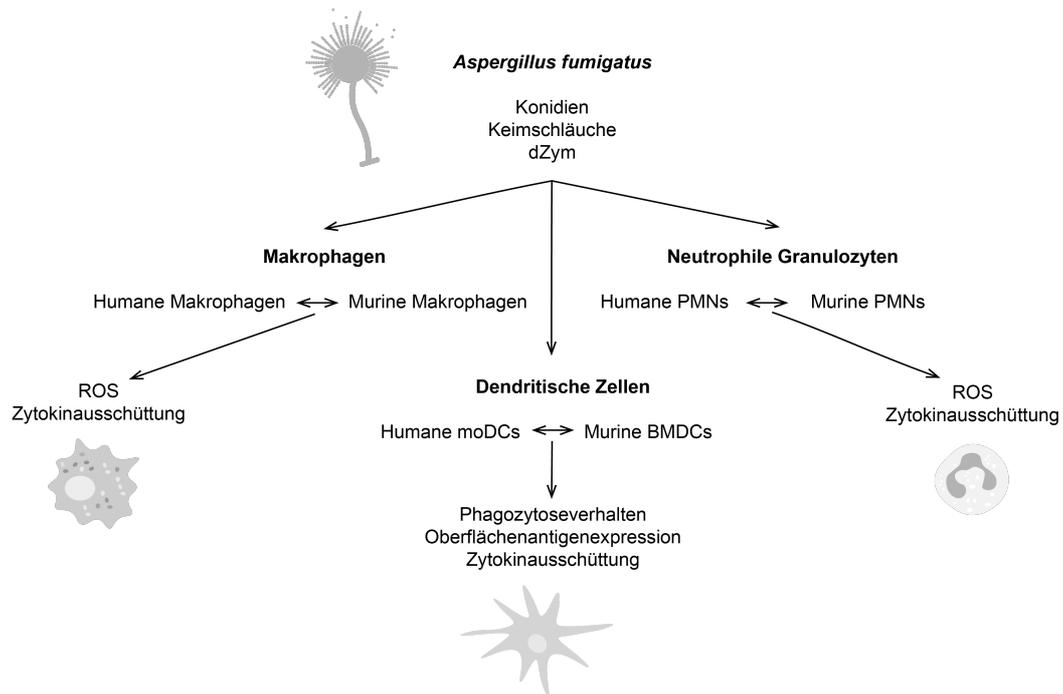
#### **1.4 Mausmodell**

Die genaue Pathophysiologie bzw. die Pathogen-Wirt-Interaktion vieler Infektionen ist auch in der heutigen Zeit weiterhin nicht vollständig verstanden. Um der Komplexität dieser Interaktion gerecht zu werden und um neue therapeutische Strategien zu entwickeln und zu testen sind Tiermodelle bei der Erforschung vieler Infektionserkrankungen unerlässlich. Bei der IA ist die Maus der Modell-Organismus der Wahl und wird mit einer Häufigkeit von 86% gegenüber dem Ratten- und Meerschweinchen-Modell deutlich bevorzugt [Desoubeaux and Cray (2017)]. Vorteilhaft am Mausmodell ist die gute Verfügbarkeit, kurze Generationsfolge sowie die Möglichkeit der genetischen Modifikation. Neben dem Unterschied von Maus und Mensch in Habitat,

Organismus- und Genomgröße sowie Lebensdauer gibt es Hinweise auf strukturelle und funktionelle Unterschiede in der Immunantwort der verschiedenen Spezies. Diese könnten die Übertragbarkeit von Daten auf den Menschen einschränken, welche auf Studien mit Mäusen basieren [Mestas and Hughes (2004), Reynolds and Haniffa (2015)]. Auf struktureller Ebene fällt bspw. ein ausgeprägtes Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe bei der Maus auf, welches beim Menschen kaum vorhanden ist [Pabst and Gehrke (1990)]. Diese Ausprägung könnte Ausdruck der höheren inhalativen Antigenbelastung von Nagetieren durch den bodennahen Lebensraum sein. Weiterhin zeigen sich Unterschiede im Blutbild: Humanes Blut ist reich an Neutrophilen (50-70 % PMNs, 30-50 % Lymphozyten). Im Gegensatz hierzu überwiegen im murinen Blutbild die Lymphozyten (75-90 % Lymphozyten, 10-25 % PMNs) [Doeing, Borowicz et al. (2003)]. Aber auch systemische Unterschiede sind beschrieben: So unterscheiden sich Mensch und Maus z.B. in der Typ IV allergischen Reaktion (vom verzögerten Reaktionstyp). Hierbei unterscheiden sich die Abfolge der beteiligten Immunzelltypen sowie die benötigte Antigenosis, um eine Reaktion auszulösen [Mestas and Hughes (2004)]. Ein analytischer Vergleich der Immunantwort zwischen Mensch und Maus im Zusammenhang der IA wurde bisher noch nicht untersucht.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Aufgrund der bis heute bestehenden hohen Letalität der IA besteht der dringende Bedarf an verbesserten und neuen diagnostischen sowie therapeutischen Strategien. Um diese entwickeln zu können, ist ein genaues Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion notwendig. Zur Weiterentwicklung neuer Therapieansätze werden oft Mausmodelle herangezogen, ohne dass jedoch die funktionellen Unterschiede bezüglich der Immunantwort des Wirtes bekannt sind. Ziel dieser Arbeit ist ein standardisierter Vergleich der *in vitro* Immunantwort humaner und muriner Makrophagen, DCs und PMNs in Gegenwart von *A. fumigatus* durchzuführen, um die Frage zu beantworten, inwiefern sich diese zwischen den Spezies Mensch und Maus unterscheiden und inwieweit Mausmodelle der IA auf den Menschen übertragbar sind. Hierfür erfolgte eine standardisierte Stimulation von verschiedenen Immunzellen mit *A. fumigatus* sowie eine anschließende Messung der Immunreaktion. Eine Darstellung der untersuchten Immunzellen und Parameter ist in Abb. 5 illustriert.



### Abbildung 5: Versuchsaufbau

In unterschiedlichen Versuchen wurde durch ein möglichst standardisiertes Vorgehen die Interaktion von humanen und murinen Zellen mit *A. fumigatus* studiert. Als fungale Stimuli wurden inaktivierte *A. fumigatus* Konidien, Keimschläuche sowie depletiertes Zymosan (dZym) verwendet. Miteinander verglichen wurden jeweils humane und murine Makrophagen, neutrophile Granulozyten (PMNs) sowie dendritische Zellen (*monocyte-derived dendritic cells*, moDCs; *bone marrow derived dendritic cell*, BMDCs). Gemessen wurde die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und Zytokinen, das Phagozytoseverhalten sowie die Oberflächenexpression von Maturationsmarkern und Dectin-1.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Die Verwendung von Vollblut-Bestandteilen gesunder Spenderinnen und Spender wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (#302/15). Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde eingeholt und die Daten anonymisiert ausgewertet. Die Bereitstellung der murinen Zellen erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Beilhack und Prof. Dr. Lutz. Die entsprechenden Tierversuchsanträge wurden durch die Arbeitsgruppen gestellt und durch die Regierung von Unterfranken genehmigt.

### 2.2 Material

#### 2.2.1 Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Brutschränke	Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific
	CO <sub>2</sub> Inkubator HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur	BD Biosciences
ELISA Reader	GENios Microplate Reader	Tecan
ELISA Washer	hydroFLEX microplate washer for 96-well	Tecan
Gefrierschränke	CUP3021	Liebherr
	HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific
Inkubationsschüttler	Multitron Standard	Infors HT
Kühlschrank	CUP3021	Liebherr
Magnethalter	QuadroMACS Seperator	Miltenyi Biotec
	MACS Multistand	Miltenyi Biotec
Mikroskope	Leica AF6000 time-lapse microscope	Leica
	Eclipse 50i	Nikon
	TS100	Nikon
Einkanalpipetten	Reference 10/100/1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe	pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Reagenzschüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific

Wasserbad	Memmert WB7	Memmert
Zählkammer	Neubauer improved	Hartenstein
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R	Eppendorf
	Heraeus Multifuge 3S/3S-R	Thermo Fisher Scientific
	MC-6400 Centrifuge	Hartenstein
	Microcentrifuge 5415R	Eppendorf
	Rotanta 46 RC	Hettich

Tabelle 1

### 2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Filtrationssäule	MACS LS Column	Miltenyi Biotec
Pipetten	Plastikpasteurpipetten	Hartenstein
	Serologische Pipetten 5/10/25 ml	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips 20/100 µl	Sarstedt
	graduated Filter Tip 1000 µl	StarLab
	Ohne Filter 10 µl	Sarstedt
	Ohne Filter 100/1000 µl	StarLab
Reaktionsgefäße	CELLSTAR Centrifuge Tubes 15/20 ml	Greiner, Bio-One
	Falcon Round-Bottom Tubes 5 ml	BD Biosciences
	Safe-Lock-Tubes 1,5/2 ml	Sarstedt
Zellfilter	BD Falcon TM Cell Strainer, 40 µm	BD Biosciences
Zellkulturplatten	6- <i>well</i> Platte Multiwell	BD Biosciences
	12- <i>well</i> Platte Multiwell	BD Biosciences
	24- <i>well</i> Platte Multiwell	BD Biosciences
	96- <i>well</i> Platte (ROS) Microplate, 96 <i>well</i> , PS, F-Bottom	Greiner, Bio-One
Zellschaber	Cell scraper	Sarstedt

Tabelle 2

### 2.2.3 Medien, Reagenzien und Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
Biocoll (Polysucrose 1,077 g/ml, isotonisch)	Biochrom
Dichlorfluorescein (DCF)	Sigma-Aldrich
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, 0,5 M)	Sigma-Aldrich
EL Buffer	Qiagen
Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow Sheath Solution	BD Biosciences
FACS Rinse Solution	BD Biosciences
Fetal Calf Serum (FCS) (human)	Sigma-Aldrich
Fetal Calf Serum (FCS) (murin)	PAA Laboratories
Gentamicin	Merck
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
rGM-CSF (Leukine sargramostim, human, 250 µg/ml)	Genzyme
rGM-CSF (murin, 200 U/ml)	Reprotech/Tebu
Hanks`Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
rIL4 (10 µg/ml)	Miltenyi Biotec
Lipopolysaccharid (LPS) (0,1 µg/ml)	Sigma-Aldrich
rM-CSF (human, 100 µg/ml)	ImmunoTools
M-CSF (murin, M-CSF Überstand, L929)	ImmunoTools
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Penicillin	Sigma-Aldrich
Polymorphprep (13,8 % Natriumdiatrizoat, 8 % Polysaccharid, 1,113 g/ml, 445 mOsm)	Axis-Shield
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Refobacin (Gentamicinsulfat 80 mg/ml)	Merck
Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) (human)	Life Technologies
Gibco RPMI1640 Medium (murin)	Thermo Fisher Scientific
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich

Wasser, steril	B. Braun
dZym (depletiertes Zymosan, 5 mg/ml)	InvivoGen

Tabelle 3

### 2.2.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Multiplex Panel Assay (individualisiert)	Affymetrix, eBioscience
EasySep Mouse Neutrophil Enrichment Kit	Stem Cell Technologies

Tabelle 4

### 2.2.5 Antikörper und Beads

Bezeichnung	Isotyp	Konjugation	Hersteller
Mouse-Anti-Human-HLA-ABC	IgG1	PE	BD Biosciences
Mouse-Anti-Human-HLA-DR	IgG2 <sub>a</sub>	PE	BD Biosciences
Mouse-Anti-Human-CD1a	IgG1	APC	BD Biosciences
Mouse-Anti-Human-CD14	IgG1	FITC	BD Biosciences
Mouse-Anti-Human-CD80	IgG1	APC	Miltenyi Biotec
Mouse-Anti-Human-CD86	IgG1	FITC	BD Biosciences
Mouse-Anti-Human-Dectin-1	IgG2 <sub>b</sub>	PE	R&D
Mouse-Isotypenkontrolle	IgG1	PE, FITC, APC	BD Biosciences
Mouse-Isotypenkontrolle	IgG2 <sub>a</sub>	PE	Miltenyi Biotec
Mouse-Isotypenkontrolle	IgG2 <sub>b</sub>	PE	BD Biosciences
Hamster-Anti-Mouse-CD11c	IgG	APC	BioLegend
Hamster-Anti-Mouse-CD11c	IgG	FITC	BioLegend
Hamster-Anti-Mouse-CD80	IgG	FITC	BioLegend
Rat-Anti-Mouse-CD86	IgG2 <sub>a</sub>	PE	BD Biosciences
Rat-Anti-Mouse-Dectin-1	IgG2 <sub>a</sub>	PE	R&D
Polystyren Beads			Sigma-Aldrich

Tabelle 5

## 2.2.6 Software

<b>Anwendung</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
Absorptionsmessung ELISA-Reader	XFluor 4	Tecan
Bildbearbeitung	Adobe Illustrator 8	Adobe Inc.
	Adobe Photoshop 2020	Adobe Inc.
	GraphPad Prism 8	GraphPad Software
	Image J 1.45s	Wayne Rasband
	Irfan View 4.32	Irfan Skiljan
Datenauswertung	Excel 16.30	Microsoft
	GraphPad Prism 8	GraphPad Software
Durchflusszytometrie	CellQuest 5.2	BD
	FlowJo 10	Tree Star
Mikroskopie	LAS AF Lite	Leica
Textverarbeitung	EndNote 9	Clarivate Analytics
	Word 16.30	Microsoft

Tabelle 6

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Humane Primärzellen

#### 2.3.1.1 Isolation von peripheren mononukleären Zellen

Periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Leukozytenkonzentraten von freiwilligen, gesunden Spendern (Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinik Würzburg) gewonnen, welche als Überschuss bei der Thrombozytenapherese entstehen. Zur Isolation der Zellen wurden die Leukozytenkonzentrate in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mit einer Pufferlösung (HBSS, 2 % EDTA, 1 % FCS) auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt. Hiervon wurden 25 ml vorsichtig auf ein bereitgestelltes Röhrchen mit 15 ml Biocoll-Lösung geschichtet und anschließend zentrifugiert (800 x g, 20 min, Raumtemperatur, RT, ohne Bremse). Die Interphase der PBMCs wurde mit einer Plastik-Pasteur-Pipette aufgenommen, in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mit der Pufferlösung auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit der Pufferlösung (120 x g, 15 min, RT) zur Entfernung verbliebender Thrombozyten. Im letzten Schritt erfolgte eine Zellzahlbestimmung, das Pelletieren der Zellen (120 x g, 15 min, RT) und Aufnahme der Zellen in der gewünschten Menge 4 °C kalter Pufferlösung (340 µl pro  $1 \times 10^8$  PBMCs). Die Zellzahl sowie die Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und der Verwendung von Trypanblau bestimmt.

#### 2.3.1.2 Isolation von Monozyten

Die Monozyten wurden mit Hilfe einer magnetischen Positiv-Selektion aus den PBMCs, welche sich aus B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten zusammensetzen, isoliert. Bei der magnetischen Positiv-Selektion werden die zu isolierenden Zellen mit spezifischen Antikörpern, welche an magnetische Micro-Beads konjugiert sind, gebunden und anschließend über eine Magnetsäule separiert. Zur Isolation von Monozyten wurden Beads, welche den monozytären Oberflächenmarker CD14 binden, verwendet.

Die PBMCs wurden hierfür mit 60 µl CD14 Micro-Beads pro  $1 \times 10^8$  PBMCs inkubiert (15 min, 4 °C). Es folgte ein anschließender Waschschrte (300 x g, 10 min, 4 °C), um nicht gebundene Beads zu entfernen. Das entstandene Pellet wurde nun in 1-2 ml kalter Pufferlösung aufgenommen und die Zellsuspension auf eine mit 3 ml kaltem Puffer vorher äquilibrierte Säule (LS-Säule) gegeben, welche in eine magnetische Halterung

(MACS Separator) eingespannt war. Es folgten drei Waschschr tte mit je 3 ml kalter Pufferlösung, um die nicht mit den magnetischen CD14-Beads gebundenen Zellen zu lösen. Danach wurden die Säule aus dem Magneten entfernt und mittels 5 ml kalter Pufferlösung die aufgereinigten Monozyten aus der Säule gewaschen. Nach der Zellzahlbestimmung mittels einer Neubauer-Zählkammer wurden die Monozyten pelletiert (300 x g, 4  C, 10 min) und zur Generierung von Makrophagen und dendritischen Zellen direkt weiterverwendet.

#### **2.3.1.3 *In vitro* Generieren von monozytären Makrophagen**

Die Monozyten wurden nun für die ROS-Experimente in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in Zellkulturmedium (RPMI 1640, 10% FCS, 500 IU/ml rM-CSF) aufgenommen und je 100  $\mu$ l in einer 96-well-Platte ausplattiert. Für die ELISA-Experimente (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) wurden die Monozyten in einer Konzentration von  $8,3 \times 10^6$  Zellen/ml in das entsprechende Zellkulturmedium aufgenommen und je 500  $\mu$ l in einer 24-well-Platte ausgesät. Beide Zellans tze wurden anschließend für insgesamt 5 Tage bei 37  C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 2 und 4 wurde das gesamte Medium erneuert. Hierfür wurde der gesamte Überstand abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Versuche erfolgten an Tag 6.

#### **2.3.1.4 *In vitro* Generieren von monozytären dendritischen Zellen**

Die zuvor isolierten Monozyten wurden in der gewünschten Menge Zellkulturmedium (RPMI 1640, 10 % FCS, 10 ng/ml IL4, 100 ng/ml rGM-CSF, 120  $\mu$ g/ml Gentamicin) aufgenommen, so dass eine Konzentration von  $10^6$  Monozyten/ml vorlag. Für die *in vitro* Generierung von moDCs wurde die Zellsuspension in einer 6-well-Platte mit 3 ml pro well ausplattiert und für 5 Tage bei 37  C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 2 und 4 wurde jeweils 1 ml des Zellkulturmediums durch frisches ersetzt. Hierfür wurden aus jedem well 1 ml Medium entnommen, dieses zentrifugiert, um die darin enthaltenen Zellen zu pelletieren (300 x g, 10 min, RT), der Überstand dekantiert und das Pellet in 1 ml des oben beschriebenen Zellkulturmediums aufgenommen. Am 6. Tag wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurden adh rente Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber gelöst, die wells mit Medium gewaschen, die Zellsuspension aufgenommen und mittels einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

### **2.3.1.5 Isolation von humanen neutrophilen Granulozyten**

PMNs wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation von EDTA-Blut gesunder, freiwilliger Spender gewonnen. Hierfür wurden jeweils in 15 ml Röhrchen 7,5 ml des EDTA-Blutes vorsichtig auf 5 ml Polymorphprep geschichtet. Nach einer Zentrifugation (500 x g, 30 min, RT) wurde zunächst die obere PBMC-Interphase mit einer Plastik-Pasteur-Pipette abgenommen und verworfen; folgend wurde die untere PMN-Interphase abgenommen und in 50 ml einer Pufferlösung (HBSS, 1 % FCS, 0,02 M EDTA) aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zur Lyse von verbliebenen Erythrozyten 5 min in 5 ml Erythrolyse Puffer gelöst. Es folgte ein Waschschrift mit Zellkulturmedium (RPMI, 5 % FCS) (300 x g, 2 min, RT) und die Auszählung mittels einer Neubauer-Zählkammer. Danach wurden die Zellen in Zellkulturmedium mit einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und für weitere Versuche verwendet.

### **2.3.2 Murine Primärzellen**

#### **2.3.2.1 Isolation von murinen Knochenmarkzellen und Generierung von murinen Makrophagen**

Murine Knochenmarkzellen wurden freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Lutz (Institut für Virologie und Immunologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die Knochenmarkzellen für die ROS-Experimente wurden in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in Zellkulturmedium (RPMI, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM 1-Glutamin, 10% muriner M-CSF Überstand) aufgenommen und je 100 µl in einer 96-*well*-Platte ausplattiert. Für die ELISA-Experimente wurden die Makrophagen in einer Konzentration  $8,3 \times 10^5$  Zellen/ml in oben genanntes Zellkulturmedium aufgenommen und je 500 µl in einer 24-*well*-Platte ausplattiert. Beide Zellansätze wurden für insgesamt 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 2 und 4 wurde das gesamte Medium erneuert. Hierfür wurde der gesamte Überstand abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Versuche erfolgten an Tag 6.

#### **2.3.2.2 Isolation von murinen Knochenmarkzellen und Generierung von murinen aus Knochenmarkzellen gereiften dendritischen Zellen**

Murine aus Knochenmarkzellen gereifte dendritische Zellen (bone marrow derived dendritic cells, BMDCs) wurden freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Lutz (Institut für

Virologie und Immunologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Dabei wurden Knochenmarkzellen gesunder Mäuse gewonnen und in Zellkulturmedium (RPMI, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM 1-Glutamin, 200 U/ml murines rGM-CSF) für 5 Tage kultiviert. Am 6. Tag wurden die nicht adhärenen Zellen geerntet und für die Experimente verwendet.

### **2.3.2.3 Isolation von murinen neutrophilen Granulozyten**

Murine neutrophile Granulozyten wurden freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Dr. Beilhack (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde ein *EasySep™ Mouse Neutrophil Enrichment* Kit verwendet. Danach wurden die Zellen in Zellkulturmedium (RPMI, 5% FCS) aufgenommen.

### **2.3.3 *Aspergillus fumigatus* Pilzgenerierung und –kultivierung**

Zur Generierung von *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen für die Stimulationsversuche wurden  $10^7$  Konidien des Stammes 46645 der *American Type Culture Collection* (ATCC) aus einer Stocklösung (Konzentration  $10^8$ /ml, 4 °C) auf Bierwürz-Agar-Platten (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg) ausplattiert und für 72 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die herangewachsenen Konidien durch Spülen der Platten mit sterilem Wasser geerntet und im Anschluss durch einen 40 µm Zellfilter gefiltert. Die Konzentration der gewonnenen Konidien suspension wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Zur Generierung von Keimschläuchen wurden  $10^8$  Konidien der Suspension in 30 ml RPMI-Medium aufgenommen und in ein 50 ml Tube gegeben. Dieses wurde 5-6 h bei 37 °C auf einer Schüttelplatte (120 rpm) inkubiert bis die Keimschläuche die gewünschte Größe erreicht hatten. Die Größe wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und sollte bei der zwei- bis dreifachen Größe der Konidien liegen.

Um standardisierte Bedingungen für die Analysen zu schaffen und eine Konstanz der Pilzmorphologien zu gewährleisten wurde bei den Experimenten ausschließlich mit inaktivierten Pilzmorphologien gearbeitet. Hierfür wurden jeweils Konidien und Keimschläuche mit Ethanol für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, fünfmalig mit sterilem Wasser gewaschen und in RPMI-Medium aufgenommen. Die inaktivierten Pilzmorphologien wurden dann bei -20 °C gelagert.

Für die *Live-cell Imaging* Experimente wurde der rot fluoreszierende Pilz *Afu-dTomato* verwendet, welcher freundlicherweise von Frau Dr. Lothar bereitgestellt wurde.

### 2.3.4 Messung des oxidativen Bursts (ROS-Ausschüttung)

Ziel dieses Versuchs war der Nachweis von radikalen Sauerstoffspezies, welche unter anderem von Makrophagen und PMNs als Antwort auf einen Antigenstimulus freigesetzt werden.

Durch die Bildung radikaler Sauerstoffspezies wird das im nicht-oxidierten Zustand nicht-fluoreszierende Molekül 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCF) oxidiert. Die Fluoreszenzzunahme des fluoreszierenden oxidierten DCFs kann daraufhin erfasst werden und korreliert mit der Menge der produzierten ROS. Die Exzitations- und Emissions-Wellenlänge zur Messung der Fluoreszenz beträgt 498 und 522 nm.

#### 2.3.4.1 Messung des oxidativen Bursts bei Makrophagen

1,5 x 10<sup>6</sup>/ml Makrophagen wurden in einer 96-well-Platte (100 µl/well) mit inaktivierten *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen (MOI = 1, *multiplicity of infection*) sowie mit 100 µg/ml depletiertem Zymosan stimuliert. Das in den Versuchen verwendete Zymosan *depleted* (dZym) wird durch verschiedene Verfahren wie z.B. Behandlung mit heißem Alkali modifiziert, so dass es seine TLR-2-Bindungseigenschaften verliert und als spezifischer Dectin-1-Ligand fungiert. Als Positivkontrolle diente 10 µg/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Makrophagen verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurden zum Nachweis der Bildung von ROS 10 µl einer 1:50 Verdünnung des nicht-fluoreszierenden DCFs zugegeben. Die Fluoreszenzzunahme wurde zeitabhängig alle 5 min bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm über 2 h bei 37 °C gemessen.

#### 2.3.4.2 Messung des oxidativen Bursts bei neutrophilen Granulozyten

80 µl einer Zellsuspension wurde mit jeweils humanen oder murinen PMNs in einer Konzentration von 2,5 x 10<sup>6</sup>/ml in einer 96-well-Platte ausplattiert (100 µl/well) und mit inaktivierten *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen (MOI = 1) und 100 µg/ml dZym stimuliert. Als Positivkontrolle diente 10 µg/ml PMA. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte PMNs verwendet. Zum Nachweis der Bildung von ROS wurden direkt nach der Stimulation 10 µl einer 1:300 Verdünnung des nicht-fluoreszierenden DCFs zugegeben. Die Fluoreszenzzunahme wurde zeitabhängig alle 5 min bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm über 2 h bei 37 °C gemessen.

### 2.3.5 Analyse der Zytokinsekretion mittels Multiplex-ELISA

Bei einem ELISA handelt es sich um einen antikörperbasierten Assay zum Nachweis spezifischer Proteine. Hierbei werden Proben in eine mit einem Antikörper (sog. *Capture*-Antikörper) beschichtete *Mikrowell*-Platte gegeben und binden an diesen. Im folgenden Schritt bindet ein zweiter spezifischer Antikörper (sog. Detektions-Antikörper) an dem zu bestimmenden Antigen. Dieser Detektions-Antikörper bindet zusätzlich ein Enzym, welches nach Zugabe eines Substrates ein farbiges Reaktionsprodukt bildet. Diese Farbveränderung ist proportional zu der Konzentration des gesuchten Antigens und kann durch Absorptionsmessung mit einem ELISA-Reader detektiert werden.

Mittels eines Multiplex-ELISA-Assays erfolgte die Quantifizierung der Zytokinsekretion humaner und muriner Makrophagen, PMNs und DCs nach Stimulation. Hierfür wurden humane oder murine Makrophagen ( $8 \times 10^5/\text{ml}$ ), PMNs ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) und DCs ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit jeweils *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen (MOI = 1), dZym (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder Lipopolysaccharid (LPS) (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert. Als Negativkontrolle diente Zellkulturmedium. Die Kulturüberstände wurden nach 12 h (Makrophagen), 3 h (PMNs) oder 24 h (DCs) abgenommen und bei  $-20^\circ \text{C}$  gelagert.

Folgende Zytokine wurden analysiert: IL1 $\beta$ , IL4, IL6, IL8(human)/Gro $\alpha$  (murin), IL10, IL12p70, IL18, IL23, IP10, MCP1, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , TNF $\alpha$ .

Die Analyse der Proben erfolgte durch Frau Dr. Hünninger (Hans-Knöll-Institut, Jena) nach dem Protokoll des Herstellers (Affymetrix, eBioscience).

### 2.3.6 Live-cell Imaging

Zur Analyse der Interaktionen von DCs mit *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen wurde eine *Live-cell Imaging*-Mikroskopie durchgeführt. Hierbei wurde ein fluoreszierender Pilz verwendet (*Afu-dTomato*), welcher nach Aufnahme in die DCs im Zytoplasma der Zelle erkennbar ist. Es wurden  $7 \times 10^4$  humane moDCs bzw. murine BMDCs gelöst in 35  $\mu\text{l}$  Zellmedium mit *Afu-dTomato* Konidien oder Keimschläuchen (MOI = 10, gelöst in 35  $\mu\text{l}$  Zellmedium) stimuliert und anschließend über 3 h mit einer Bilderfrequenz von 10/min gefilmt. Als unspezifischer Stimulus dienten Polystyren-Kugeln. Für die Aufnahmen wurde ein Leica AF6000 *time lapse* Mikroskop verwendet; die Auswertung erfolgte mittels der Software LAS AF lite. Analysiert wurden die Kontakte der DCs mit den Pilzmorphologien sowie die phagozytierten Pilzmorphologien pro Zelle über die besagte Zeitspanne. Hierfür wurden für jeden Stimulationsansatz exemplarisch 3 Zellen pro Versuch beobachtet und deren Verhalten ausgewertet.

### 2.3.7 Durchflusszytometrische Analysen

In der Durchflusszytometrie wird die optische Emission von Zellen bei Durchtritt durch einen Laserstrahl untersucht. Dabei wird neben der Streuung des Lichts die Fluoreszenz gemessen.

Die Streuung des Lichts gibt einerseits Hinweise auf das Volumen der Zellen der gemessenen Zellpopulation (FSC, *forward scatter*), andererseits lässt es Rückschlüsse auf die Granularität zu (SSC, *sideward scatter*). Somit können Aussagen über die Morphologie der Zelle und damit verbundenen Eigenschaften wie z.B. dem Zelltyp oder die Vitalität gemacht werden. Zur Beurteilung der Oberflächenantigen-Expression können mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper verwendet werden, welche spezifisch an die zu detektierenden Oberflächenmoleküle binden können. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienen beispielsweise Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Hierbei wird die nach Anregung emittierte Fluoreszenz mittels verschiedener Detektoren gemessen. Da sich bei Mehrfachfärbungen Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome überschneiden können, wurde zuvor eine Kompensation durchgeführt.

#### 2.3.7.1 Durchflusszytometrische Analyse der Maturation von dendritischen Zellen

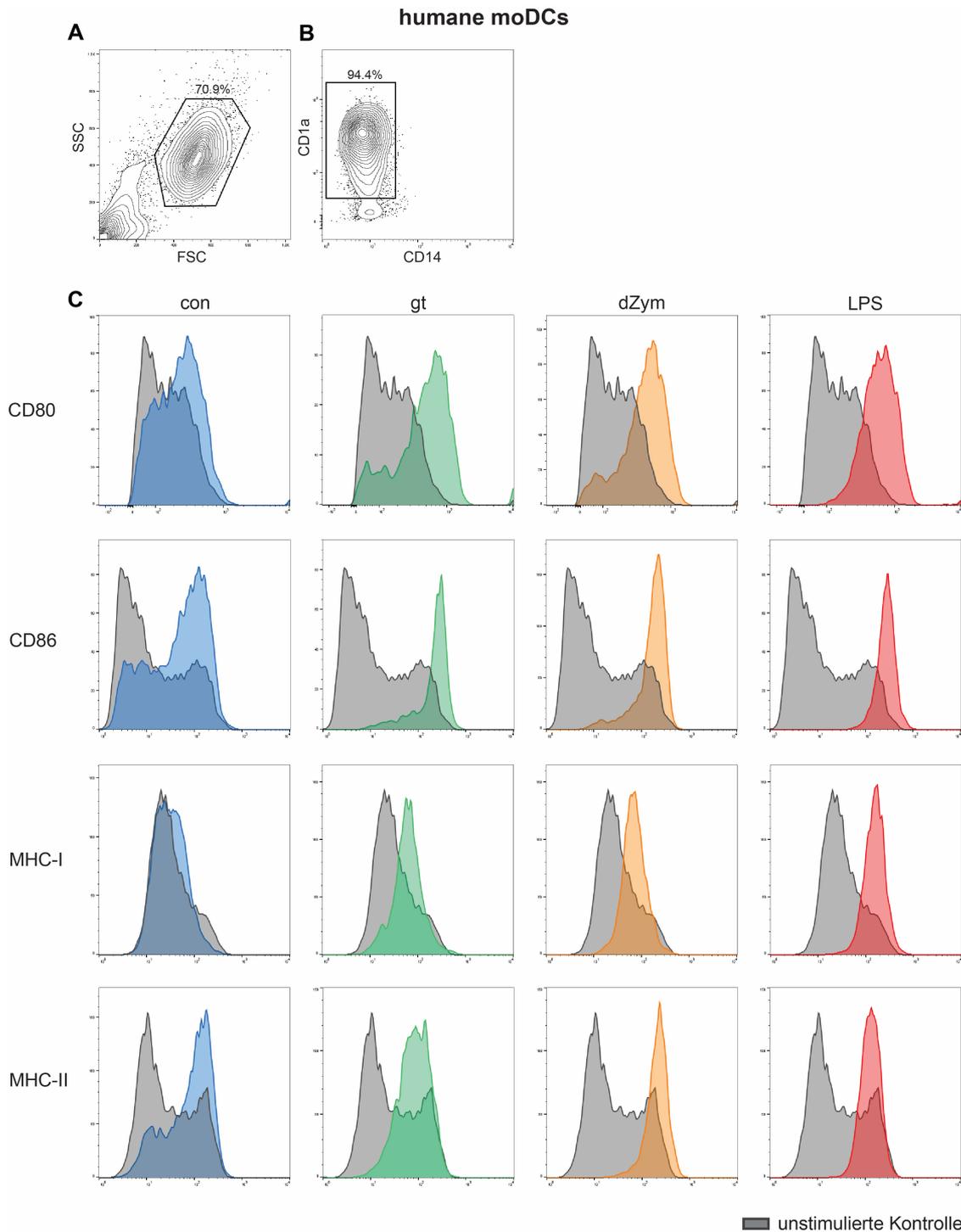
Für die Versuche wurden die DCs in einer 24-*well*-Platte in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  /ml Zellen ausgesät und 24 h vor der Messung wie folgt stimuliert: Die humanen und murinen Zellen wurden mit inaktivierten *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen (MOI = 1), 100 µg/ml dZym und 1 mg/ml LPS stimuliert und 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte DCs. Nach 24 h wurden die Zellen durch vorsichtiges Spülen des *well*-Bodens geerntet, das überstehende Medium abzentrifugiert (300 x g, 5 min, RT) und die Zellen in 50 µl kaltem HBSS-Puffer resuspendiert. 20 µl dieser Zellsuspension wurden daraufhin mit zwei Antikörper-Paneln inkubiert. Es wurden die vom Hersteller angegebenen Verdünnung verwendet.

I	Human	HLA-DR PE (MHC-II), CD14 FITC, CD1a APC
	Murin	CD11c APC, CD80 FITC, CD86 PE
II	Human	HLA-ABC (MHC-I) PE, CD86 FITC, CD80 APC
	Murin	CD 11c APC, HLA-2KB FITC (MHC-I), HLA-1A PE (MHC-II)

Es folgte eine Inkubationszeit der Zellen mit den Antikörpern von 20 min auf Eis. Anschließend wurden 3 ml eiskalter HBSS-Puffer hinzugefügt, die Proben erneut zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT) und erneut mit 3 ml kaltem HBSS-Puffer resuspendiert.

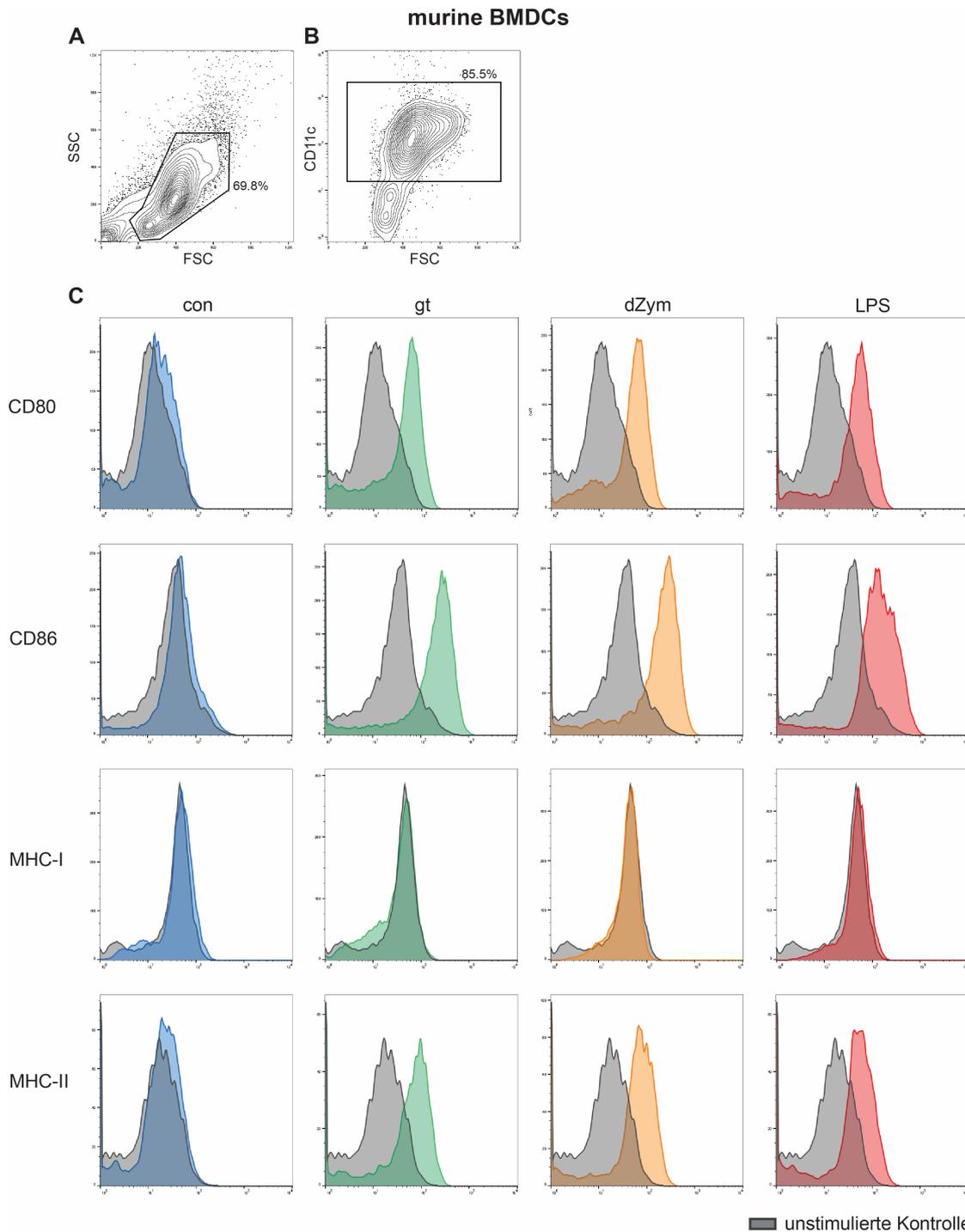
Dieser Waschschritt wurde zweimalig wiederholt mit nachfolgender durchflusszytometrischer Analyse. Zum Ausschluss eines Einflusses von unspezifischen Bindungen erfolgte eine Isotypenkontrolle. Abb. 6 und 7 zeigen exemplarisch die Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse von humanen oder murinen Zellen. Die Plots wurden nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen aufgetragen und die vitalen Zellen ausgewählt (*gating*) (Abb. 6 A bzw. 7 B). Im nächsten Schritt (Abb. 6 B bzw. 7 B) wurden die CD14 negativen und CD1a positiven humanen Zellen als moDCs sowie konsekutiv die CD11c positiven murinen Zellen als BMDCs definiert.

Für jede Messprobe wurden 10.000 Zellen gemessen und die *mean fluorescence intensity* (MFI) für die Oberflächenmarker CD80, CD86, HLA-ABC/-2Kb (MHC-I), HLA-DR/-I-A (MHC-II) 24 h nach Stimulation mit den beschriebenen Antigenen bzw. der Kontrolle bestimmt.



**Abbildung 6: Durchflusszytometrische Bestimmung der Maturationsmarker humaner moDCs**

Exemplarische Darstellung der Auswertung einer humanen moDC Probe. **(A)** Das Gate stellt die vitalen Zellen dar. **(B)** Das Gate stellt die CD14 negative und CD1a positive moDC Population dar. **(C)** Beispielhafte Darstellung der Maturationsmarker 24 h nach Stimulation mit Konidien (con, blau dargestellt), Keimschläuchen (*germ tubes*, gt, grün dargestellt), dZym (gelb dargestellt) und LPS (rot dargestellt). Die unstimulierte Kontrolle ist in grau dargestellt.



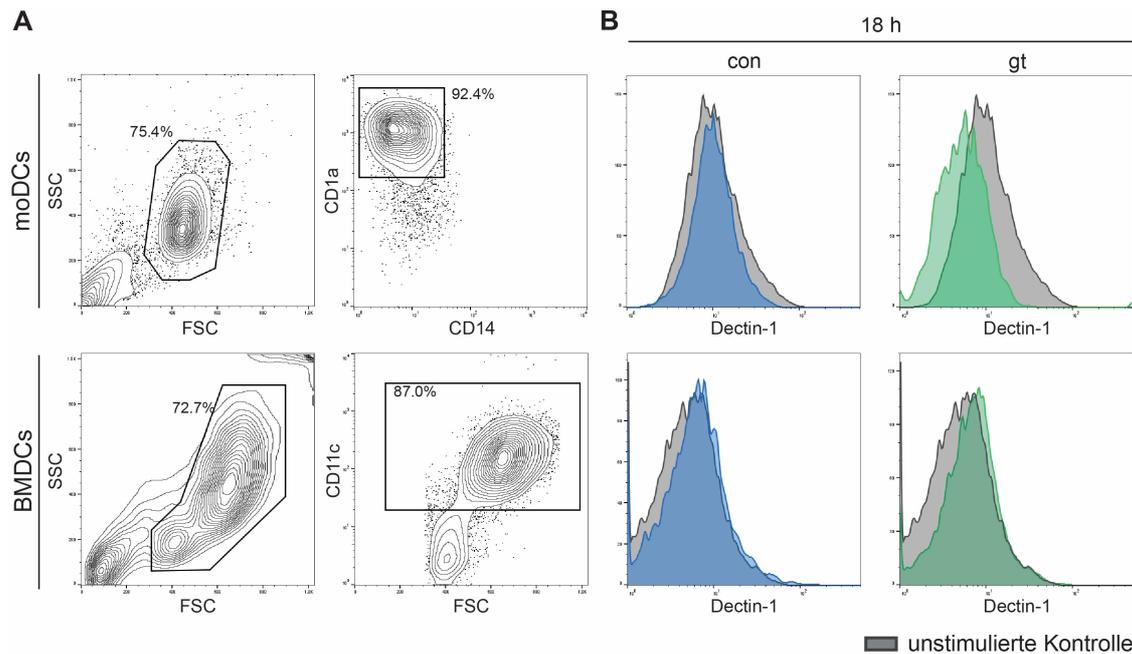
**Abbildung 7: Durchflusszytometrische Bestimmung der Maturationsmarker muriner BMDCs**

Exemplarische Darstellung der Auswertung einer murinen BMDC Probe. **(A)** Das Gate stellt die vitalen Zellen dar. **(B)** Das Gate stellt die C11c positive BMDC Population dar. **(C)** Beispielhafte Darstellung der Oberflächenexpression der Maturationsmarker 24 h nach Stimulation mit Konidien (con, blau dargestellt), Keimschläuchen (gt, grün dargestellt), dZym (gelb dargestellt) und LPS (rot dargestellt). Die unstimulierte Kontrolle ist in grau dargestellt.

### 2.3.7.2 Dectin-1-Messungen mittels Durchflusszytometrie

Für die Versuche wurden die humanen moDCs und murinen BMDCs in einer 96-*well*-Platte mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  /ml Zellen ausgesät (200  $\mu$ l/*well*) und 1 h, 2 h, 3 h, 6 h und 18 h vor der Messung wie folgt stimuliert: Die humanen und murinen Zellen wurden mit inaktivierten *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen (MOI = 1) stimuliert und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte DCs. Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Zellen durch vorsichtiges Spülen des *well*-Bodens geerntet, das überstehende Medium abzentrifugiert (300 x g, 5 min, RT), und die Zellen in 100  $\mu$ l kaltem HBSS-Puffer resuspendiert. 25  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurde daraufhin mit den folgenden Antikörpern in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung inkubiert: anti-human-CD1a APC, anti-human-Dectin1 PE, anti-Maus-CD11c APC und anti-Maus-Dectin1 PE.

Es folgte eine Inkubationszeit von 15 min sowie die in Abschnitt 3.7.1 beschriebenen Waschschrte. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Analyse wie folgt. Es wurden die vitalen Zellen durch Auftragen im FSC und SSC abgegrenzt. Im folgenden Schritt wurden CD1a- bzw. CD11c-positiven Zellen bestimmt und als moDCs bzw. BMDCs definiert (Abb. 8 A). Des Weiteren erfolgte die Bestimmung der MFI bezüglich der Dectin-1-Expression (Abb. 8 B).



**Abbildung 8: Durchflusszytometrische Bestimmung der Dectin-1-Expression auf humanen moDCs und murinen BMDCs**

(A) Exemplarische Darstellung der Auswertung jeweils einer humanen moDC und einer murinen BMDC Probe. Das Gate stellt die moDC bzw. BMDC Population da. (B) Beispielhafte Darstellung der Dectin-1-Expression 18 h nach Stimulation mit Konidien (con) in blauer Farbe sowie 18 h nach Stimulation mit Keimschläuchen (gt) in grüner Farbe. Die unstimulierte Kontrolle ist in grau dargestellt.

### 2.3.8 Statistik

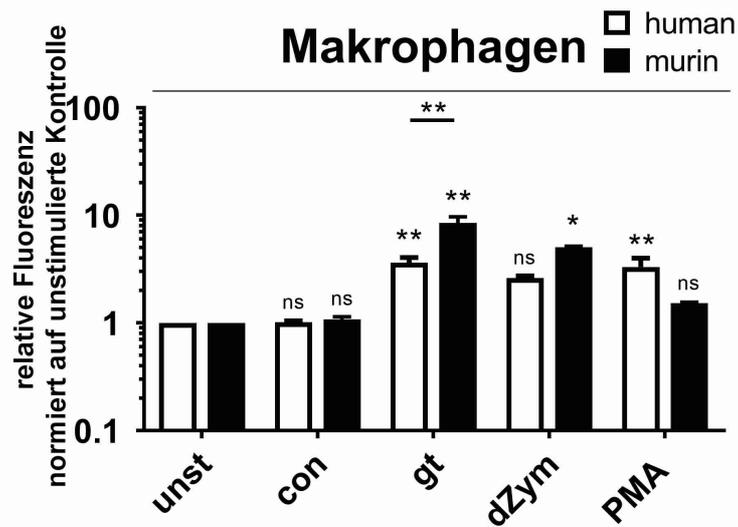
Statistische Analysen wurden mittels GraphPad Prism (GraphPadSoftware, Inc.) berechnet. Die Anzahl der eingesetzten Spender sind im jeweiligen Versuchsteil aufgeführt. Statistische Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Signifikanz zu den unstimulierten Proben wurde mittels ANOVA und Tukey post-test berechnet, Signifikanz zwischen humanen und murinen Zellen mit ungepaartem  $t$ -Test.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Vergleichende Untersuchung der ROS-Ausschüttung zwischen humanen und murinen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten**

#### **3.1.1 ROS-Ausschüttung von Makrophagen**

Verglichen wurde die Ausschüttung von ROS von humanen und murinen Makrophagen in Gegenwart von Konidien, Keimschläuchen und dZym. Als Positivkontrolle wurde PMA in einer 1:1000 Verdünnung verwendet (s. Abschnitt 3.4.1). Im Vergleich zu den unstimulierten Makrophagen zeigten die mit Konidien stimulierten humanen und murinen Makrophagen keine vermehrte ROS-Ausschüttung. Bei einer Stimulation mit Keimschläuchen konnte ein Anstieg der ROS-Ausschüttung bei beiden Spezies im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (human 3,6-fach vs. murin 8,5-fach) beobachtet werden. Interessanterweise war der Anstieg bei den murinen Makrophagen jedoch ausgeprägter als bei den humanen Makrophagen und somit der Unterschied zwischen humanen und murinen Makrophagen signifikant (Abb. 9). Mit dZym konnte sowohl ein Anstieg bei humanen (2,6-fach) als auch bei murinen Makrophagen (5,0-fach) im Vergleich zur Kontrolle gesehen werden, wobei nur bei den murinen Makrophagen ein signifikanter Anstieg vorlag. Bei der Stimulation mit PMA konnte nur bei humanen Makrophagen ein signifikanter Anstieg (3,7-fach) der Sekretion beobachtet werden.



**Abbildung 9: ROS-Ausschüttung humaner und muriner Makrophagen nach Stimulation mit *A. fumigatus***

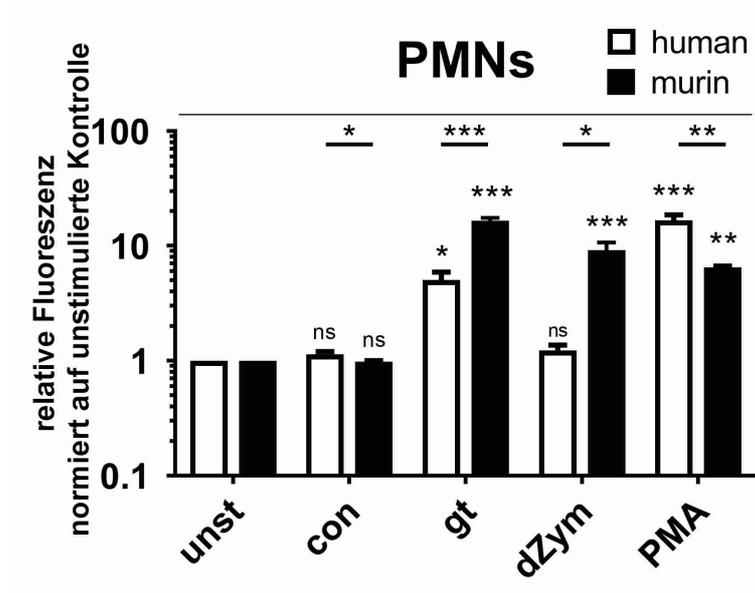
Humane und murine Makrophagen wurden mit *A. fumigatus* Konidien (con), Keimschläuchen (gt), depletiertem Zymosan (dZym) oder Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ko-kultiviert und im Anschluss wurde die ROS-Ausschüttung Fluoreszenz-basiert gemessen.

Dargestellt ist die Änderung der relativen Fluoreszenz im Vergleich zu unstimulierten Proben nach 3 h. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Es wurden sieben humane und drei murine Proben analysiert. Signifikanz im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wird direkt über den Säulen dargestellt, Signifikanz zwischen humanen und murinen Zellen über den Balken. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ns = nicht signifikant.

### 3.1.2 ROS-Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten

Nach der Analyse der ROS-Ausschüttung bei Makrophagen wurde dieses Experiment auch bei humanen und murinen PMNs durchgeführt. Auch hier wurde die ROS-Ausschüttung in Gegenwart von *A. fumigatus* Konidien, Keimschläuchen und dZym gemessen (s. Abschnitt 3.4.2). Als Positivkontrolle wurde PMA in einer 1:1000 Verdünnung verwendet. Wie auch bei den Makrophagen zeigten humane und murine PMNs keinen signifikanten Anstieg der ROS-Sekretion nach Stimulation mit Konidien. Die mit Keimschläuchen stimulierten PMNs zeigten jeweils für die humanen (5,0-fach) und murinen Zellen (16,5-fach) einen hochsignifikanten Anstieg der ROS-Sekretion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Hierbei sekretierten die murinen Zellen ebenfalls signifikant mehr ROS als die humanen PMNs. Auch bei der Stimulation mit dZym sekretierten die murinen PMNs signifikant vermehrt ROS (9,2-fach), wohingegen die humanen PMNs keine vermehrte Sekretion zeigten. PMA führte sowohl bei humanen

als auch bei murinen PMNs zu einer signifikanten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies.



**Abbildung 10: ROS-Ausschüttung humaner und muriner PMNs nach Stimulation mit *A. fumigatus***

Humane und murine PMNs wurden mit Konidien (con), Keimschläuchen (gt), depletiertem Zymosan (dZym) oder Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ko-kultiviert und im Anschluss wurde die ROS-Ausschüttung Fluoreszenz-basiert gemessen. Dargestellt ist die Änderung der relativen Fluoreszenz im Vergleich zu unstimulierten Proben (unst) nach 2 h. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Es wurden sieben humane und drei murine Proben analysiert. Signifikanz im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wird direkt über den Säulen dargestellt, Signifikanz zwischen humanen und murinen Zellen über den Balken. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigte sich sowohl bei humanen als auch murinen Makrophagen und PMNs keine Steigerung der ROS-Ausschüttung nach der Ko-Kultivierung mit Konidien. Nach der Stimulation mit Keimschläuchen und dZym (beides Liganden für Dectin-1) kam es zu einer signifikant höheren Ausschüttung von ROS durch murine Makrophagen und PMNs im Vergleich zu den humanen Zellen. Im Gegensatz hierzu zeigten humane Makrophagen und PMNs einen höheren Anstieg der ROS-Ausschüttung auf die Positiv-Kontrolle PMA.

## 3.2 Analyse der Zytokinsekretion von humanen und murinen Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen

### 3.2.1 Zytokinsekretion von Makrophagen

Verglichen wurde die Zytokinausschüttung von humanen und murinen Makrophagen nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien, Keimschläuchen, dZym und LPS mittels Multiplex-ELISA (s. Abschnitt 3.5).

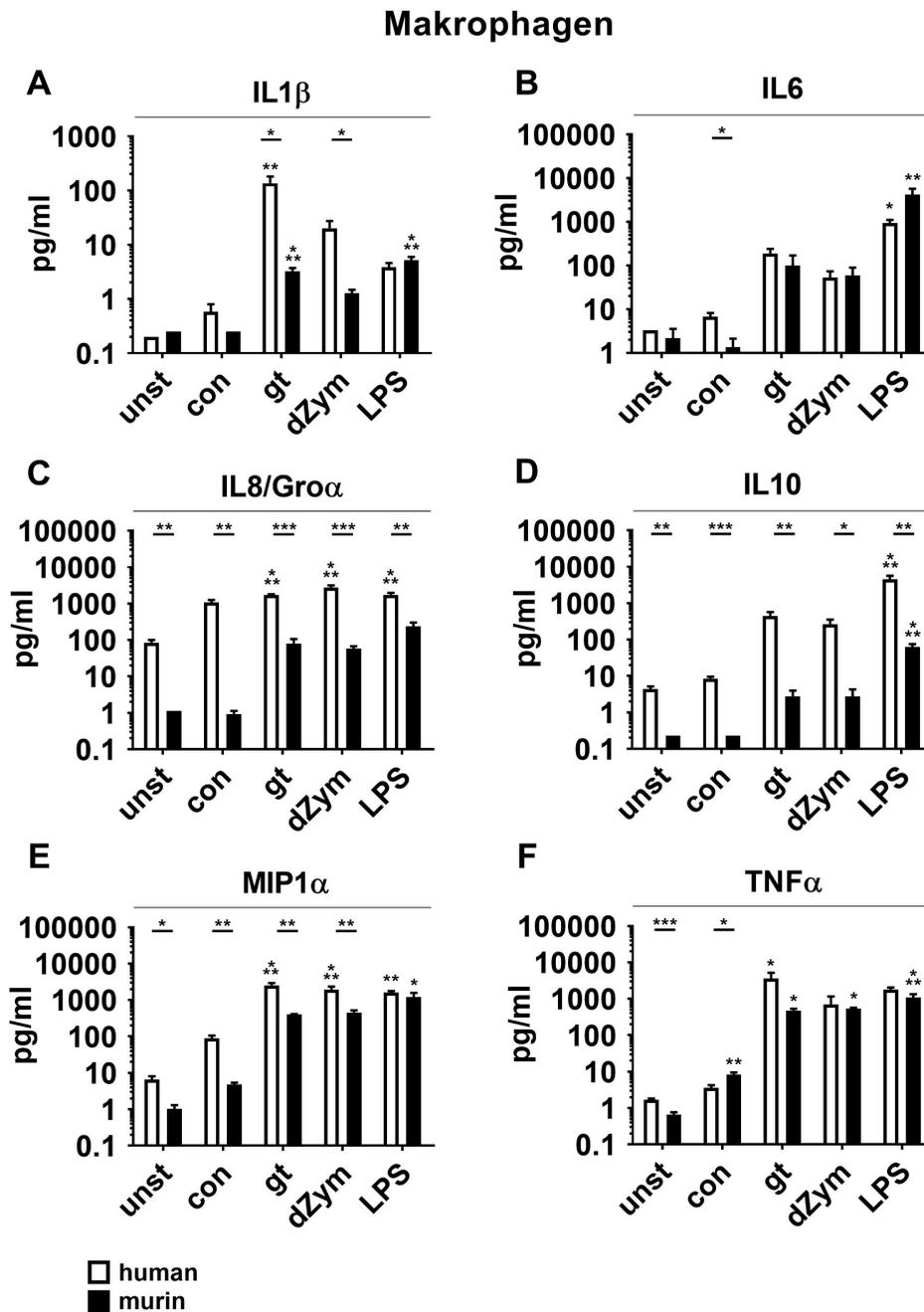
Nach Stimulation mit Konidien zeigte sich auch hier, vergleichbar zu den ROS-Daten, weder bei humanen noch murinen Makrophagen ein signifikanter Anstieg der Zytokinausschüttung von IL1 $\beta$ , IL6, IL8(hu)/Gro $\alpha$ (mu), IL10 und MIP1 $\alpha$  (Abb. 11). Interessanterweise konnte nach der Stimulation mit Konidien ein signifikanter Anstieg der Ausschüttung von TNF $\alpha$  bei murinen Makrophagen gezeigt werden (Abb. 11 F). Pro wie auch anti-inflammatorische Zytokine wurden nach Stimulation mit *A. fumigatus* Keimschläuchen sowie dem Dectin-1-Rezeptor-Agonist dZym und dem TLR-Rezeptor-Agonist LPS sowohl durch humane als auch murine Makrophagen ausgeschüttet.

Humane Makrophagen zeigten für IL1 $\beta$ , IL6, IL8/Gro $\alpha$ , IL10, MIP1 $\alpha$  und TNF $\alpha$  in der Regel höhere Level an Zytokinsekretion (basal und nach Stimulation) als murine Makrophagen. Vor allem bei IL8 wurde ein stark signifikanter Anstieg der Zytokinsekretion durch humane Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit Keimschläuchen (22,9-fach), dZym (21,9-fach) und LPS (34,2-fach) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet (Abb. 11 C). Unter Beachtung der zumeist niedrigeren Sekretion unstimulierter muriner Zellen, imponierten die murinen Makrophagen mit einem stärkeren relativen Anstieg der Zytokine IL8/Gro $\alpha$  und MIP1 $\alpha$  (Abb. 11 C, E).

Beim anti-inflammatorischen IL10 zeigten humane Makrophagen unstimuliert als auch für jeden Stimulus eine stärkere Zytokinsekretion im Vergleich zu murinen Zellen (unst = human 4,4 pg/ml vs. murin 0,2 pg/ml, con = human 8,5 pg/ml vs. murin 0,2 pg/ml, gt = human 450,6 pg/ml vs. murin 2,8 pg/ml, dZym = human 267,8 pg/ml vs. murin 2,8 pg/ml, LPS = human 4498,1 pg/ml vs. murin 62,5 pg/ml), jedoch war der Anstieg der Sekretion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle sowohl bei humanen als auch bei murinen Zellen nur für LPS hochsignifikant (Abb. 11 D).

Im Vergleich hierzu zeigte sich auch für das proinflammatorische Zytokin IL6 der Anstieg der Zytokinsekretion nur für den Stimulus LPS signifikant; dies galt für humane und murine Makrophagen (Abb. 11 B).

Bezüglich  $\text{TNF}\alpha$  zeigten murine Makrophagen auffälligerweise für jeden Stimulus einen signifikanten Anstieg der Zytokinsekretion, wohingegen humane Makrophagen nur einen signifikanten  $\text{TNF}\alpha$ -Anstieg nach Stimulation mit Keimschläuchen zeigten (Abb. 11 F).



**Abbildung 11: Zytokinausschüttung humaner und muriner Makrophagen nach Stimulation mit *A. fumigatus***

Gezeigt sind unterschiedliche Zytokinantworten von humanen und murinen Makrophagen unstimuliert (unst) sowie nach Stimulation mit *A. fumigatus*. Humane und murine Makrophagen

wurden 12 h mit *A. fumigatus* Konidien (con), Keimschläuchen (gt), depletierem Zymosan (dZym) oder Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Im Anschluss wurde die Zytokinkonzentration im Zellkulturmedium mittels Multiplex-ELISA gemessen. Daten von Makrophagen von vier humanen Spendern (weiße Säulen) sowie vier Mäusen (schwarze Säulen) wurden analysiert. Gezeigt werden die Zytokin-Konzentrationen von IL1 (A), IL6 (B), IL8(hu)/Gro $\alpha$ (mu) (C), IL10 (D), MIP1 $\alpha$  (E) und TNF $\alpha$  (F). Dargestellt sind die absoluten Zytokinkonzentrationen in pg/ml. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikanz im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wird direkt über den Säulen dargestellt, Signifikanz zwischen humanen und murinen Zellen über den Balken. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

### 3.2.2 Zytokinsekretion von neutrophilen Granulozyten

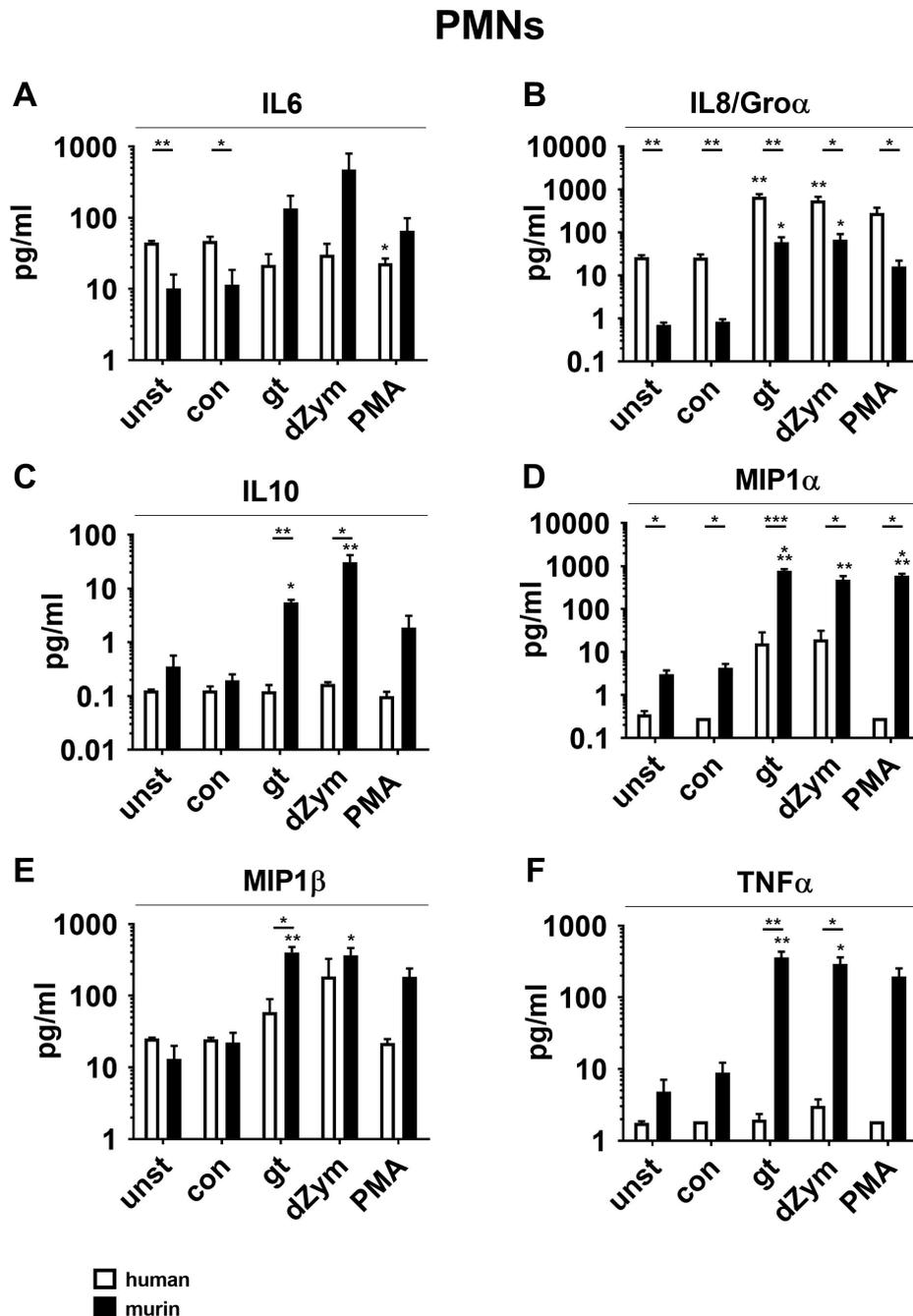
Verglichen wurde die Zytokinausschüttung von humanen und murinen PMNs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien, Keimschläuchen, dZym und PMA in einer 1:1000 Verdünnung mittels Multiplex-ELISA (s. Abschnitt 3.6).

Vergleichbar zu den ROS-Daten zeigten weder humane noch murine PMNs einen signifikanten Anstieg der Zytokinausschüttung von IL6, IL8(hu)/Gro $\alpha$ (mu), IL10, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$  und TNF $\alpha$  nach Ko-Kultivierung mit Konidien (Abb. 12).

Zudem zeigten murine PMNs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Keimschläuchen und dZym einen deutlichen Anstieg der Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL6 (gt 14,1-fach, dZym 39,9-fach), Gro $\alpha$  (gt 80,4-fach, dZym 92,3-fach), MIP1 $\alpha$  (gt 271,1-fach, dZym 162,2-fach), MIP1 $\beta$  (gt 41,3-fach, dZym 35,7-fach) und TNF $\alpha$  (gt 94,1-fach, dZym 73,2-fach) (Abb. 12 A, B, D, E, F) sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL10 (gt 30,9-fach, dZym 119,2-fach) (Abb. 12 C).

Humane PMNs zeigten nach Stimulation mit Keimschläuchen und dZym einen deutlichen, signifikanten Anstieg der Sekretion von IL8 (gt 20,7-fach, dZym 21,5-fach) (Abb. 12 B) sowie einen Anstieg der Zytokinausschüttung von MIP1 $\alpha$  (gt 27,0-fach, dZym 38,3-fach) und MIP1 $\beta$  (gt 2,1-fach, dZym 5,7-fach) (Abb. 12 E, F).

Zusammenfassend zeigten die murinen PMNs ein breiteres Spektrum an sekretierten Zytokinen sowie eine höhere Konzentration der einzelnen Zytokine im Zellkulturmedium nach Stimulation mit *A. fumigatus* Keimschläuchen und dZym im Vergleich zu humanen PMNs.



**Abbildung 12: Zytokinausschüttung humaner und muriner PMNs nach Stimulation mit *A. fumigatus***

Gezeigt werden unterschiedliche Zytokinantworten von humanen und murinen PMNs unstimuliert (unst) sowie nach Stimulation mit *A. fumigatus*. Humane und murine PMNs wurden 3 h mit *A. fumigatus* Konidien (con), Keimschläuchen (gt), depletiertem Zymosan (dZym) und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in einer 1:1000 Verdünnung stimuliert. Im Anschluss wurde die Zytokinkonzentration im Zellmedium mittels Multiplex-ELISA gemessen. Stimulation mit *A. fumigatus* Keimschläuchen und dZym führten zu einer starken pro-inflammatorischen

Zytokinausschüttung von murinen PMNs. Daten von PMNs von drei humanen Spendern (weiße Säulen) sowie drei Mäusen (schwarze Säulen) wurden analysiert. Gezeigt werden die Zytokin-Konzentrationen von IL6 (A), IL8(hu)/Gro $\alpha$ (mu) (B), IL10 (C), MIP1 $\alpha$  (D), MIP1 $\beta$  (E) und TNF $\alpha$  (F). Dargestellt sind die absoluten Zytokinkonzentrationen in pg/ml. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikanz im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wird direkt über den Säulen dargestellt, Signifikanz zwischen humanen und murinen Zellen über den Balken. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

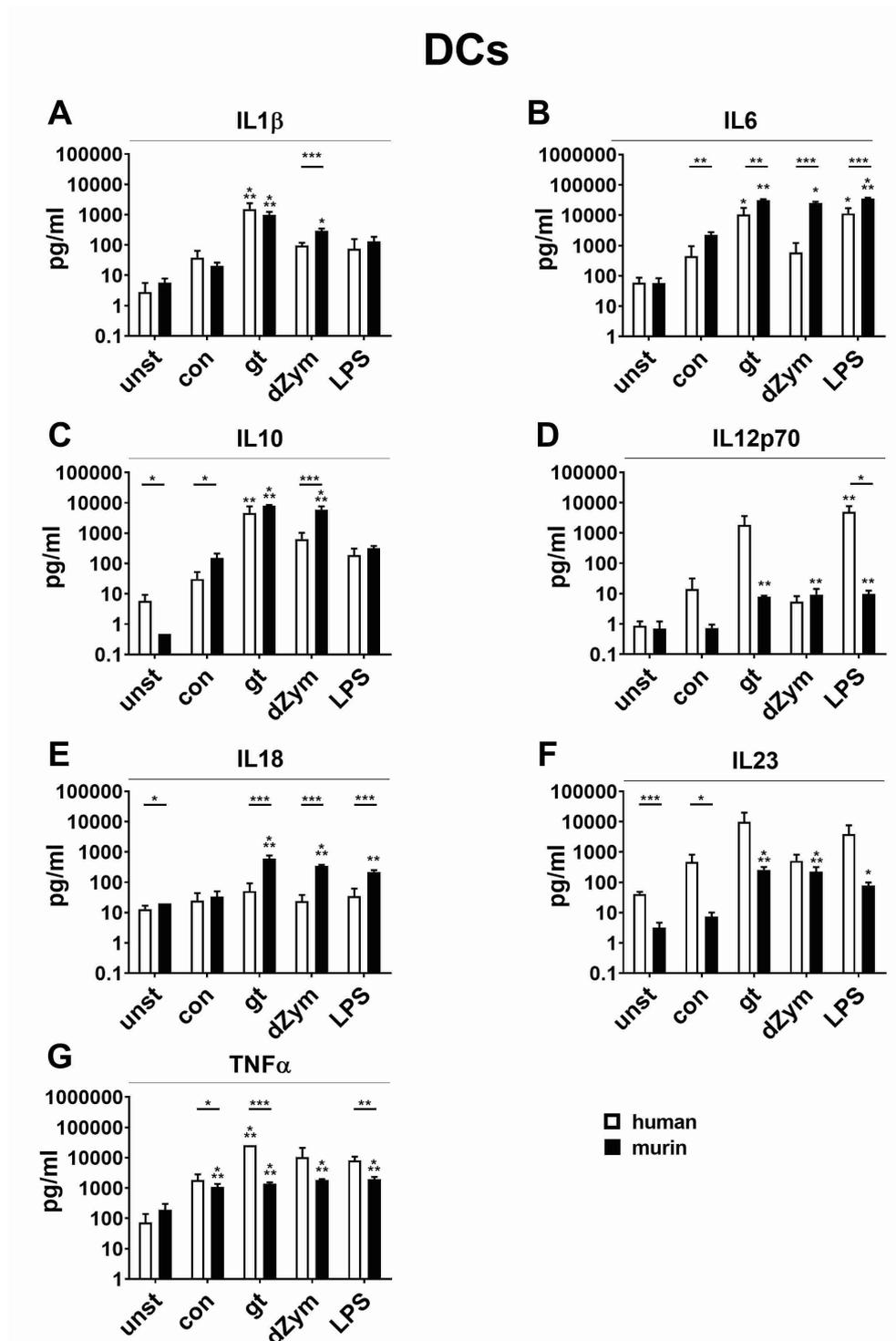
### 3.2.3 Zytokinsekretion von dendritischen Zellen

Verglichen wurde die Zytokinausschüttung von humanen moDCs und murinen BMDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien, Keimschläuchen, dZym und LPS mittels Multiplex-ELISA (s. Abschnitt 3.7).

Im Gegensatz zu Makrophagen und PMNs kam es bei den DCs zu einem Anstieg der Zytokinkonzentrationen bei verschiedenen Zytokinen auch nach der Stimulation mit Konidien (Abb. 13). Dieser Anstieg war für die TNF $\alpha$ -Konzentration bei murinen BMDCs signifikant (Abb. 13 G).

Nach Stimulation mit *A. fumigatus* Keimschläuchen, dZym und LPS kam es sowohl bei humanen moDCs als auch bei murinen BMDCs zur Ausschüttung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine. Humane moDCs zeigten dabei eine höhere Ausschüttung von TNF $\alpha$  (gt = human 25.489,2 pg/ml vs. murin 1398,0 pg/ml, dZym = human 10.473,5 pg/ml vs. murin 1832,1 pg/ml, LPS = human 8066,9 pg/ml vs. murin 1931,7 pg/ml) (Abb. 13 G) sowie eine Tendenz zu einer höheren Sekretion von IL12p70 (gt = human 1835,6 pg/ml vs. murin 7,8 pg/ml, dZym = human 5,37 pg/ml vs. murin 9,3 pg/ml, LPS = human 4990,1 pg/ml vs. murin 9,8 pg/ml) (Abb. 13 D) sowie IL23 (gt = human 9938,2 pg/ml vs. murin 257,4 pg/ml, dZym = human 646,9 pg/ml vs. murin 222,3 pg/ml, LPS = human 3914,64 pg/ml vs. murin 77,4 pg/ml) (Abb. 13 F). Auf der anderen Seite zeigten murine BMDCs eine hochsignifikant höhere Ausschüttung von IL6 (gt = human 10.472,1 pg/ml vs. murin 31.903,6 pg/ml, dZym = human 650,7 pg/ml vs. murin 24.903,1 pg/ml, LPS = human 11.477,6 pg/ml vs. murin 36.016,6 pg/ml) (Abb. 13 B) sowie IL18 (gt = human 51,3 pg/ml vs. murin 615,8 pg/ml, dZym = human 23,9 pg/ml vs. murin 347,0 pg/ml, LPS = human 34,7 pg/ml vs. murin 219,2 pg/ml) (Abb. 13 E).

Bezüglich des anti-inflammatorischen Zytokins IL10 zeigten, verglichen zur unstimulierten Kontrolle, murine BMDCs einen deutlich höheren Anstieg im Vergleich zu humanen moDCs bei Stimulation mit Keimschläuchen (human 855,5-fach vs. murin 16.750,3-fach) und dZym (human 108,7-fach vs. murin 12.484,2-fach) (Abb. 13 C).



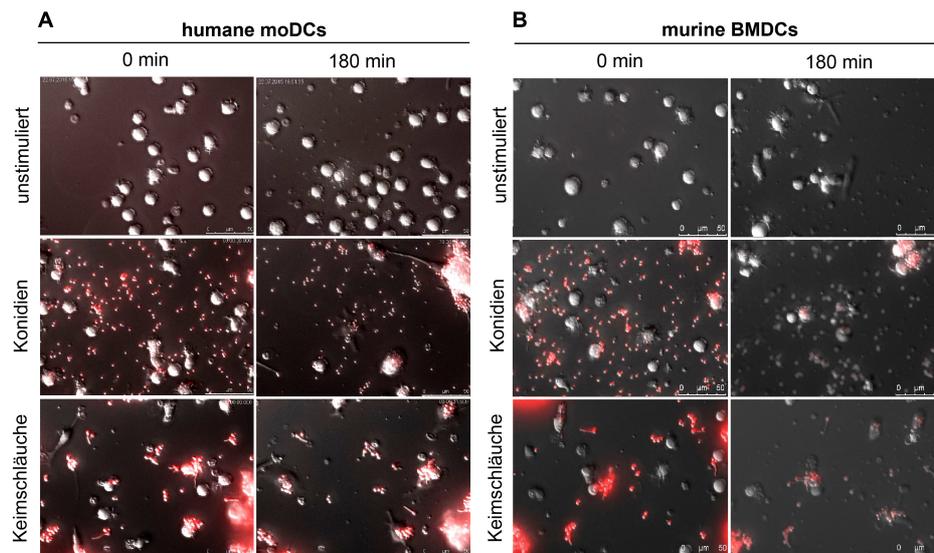
**Abbildung 13: Zytokinausschüttung humaner moDCs und muriner BMDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus***

Humane moDCs und murine BMDCs wurden 24 h mit *A. fumigatus* Konidien (con), Keimschläuchen (gt), depletiertem Zymosan (dZym) und Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Als

Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (unst). Im Anschluss wurde die Zytokinkonzentration im Zellkulturmedium mittels Multiplex-ELISA gemessen. Daten von DCs von vier humanen Spendern (weiße Säulen) sowie vier Mäusen (schwarze Säulen) wurden analysiert. Gezeigt sind die Zytokin-Konzentrationen von IL1 $\beta$  (A), IL6 (B), IL10 (C), IL12p70 (D), IL18 (E), IL23 (F) und TNF $\alpha$  (G). Dargestellt sind die absoluten Zytokinkonzentrationen in pg/ml. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikanz im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wird direkt über den Säulen dargestellt, Signifikanz zwischen humanen und murinen Zellen über den Balken. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

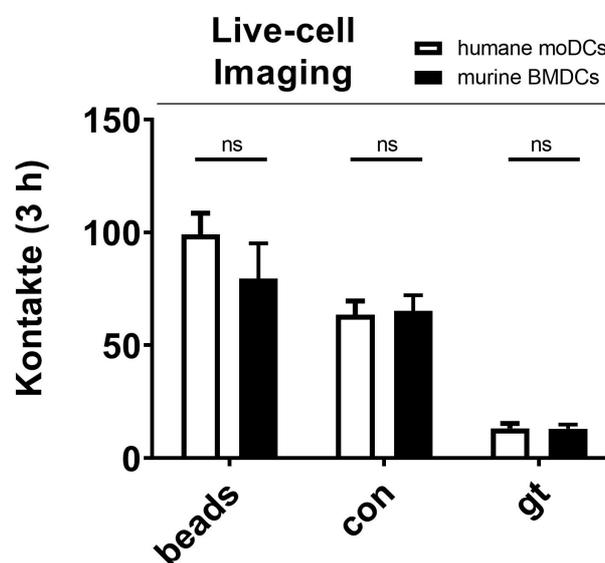
### **3.3 Analyse des Phagozytoseverhaltens von dendritischen Zellen mittels *Live-cell Imaging***

*Live-cell Imaging* wurde durchgeführt (s. Abschnitt 3.6), um die Interaktion von humanen moDCs und murinen BMDCs mit Konidien und Keimschläuchen von *A. fumigatus* zu analysieren. Untersucht wurde hierbei die Anzahl der Kontakte der Zellen mit *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen sowie einer unspezifischen Kontrolle (Abb. 14 und 15) sowie die Anzahl der phagozytierten Pilzmorphologien und Kontroll-Beads (Abb. 16). Es fiel auf, dass sich über 3 h keine signifikanten Unterschiede zwischen humanen und murinen DCs zeigten in Bezug auf die Kontakte der Zellen mit den Pilzmorphologien oder den Polystyren-Kugeln, welche als Kontrolle einer unspezifischen Phagozytose dienten (Abb. 15). Jedoch konnte eine erhöhte Phagozytoserate von Konidien und Keimschläuchen nach 3 h (Abb. 16) bei humanen moDCs festgestellt werden. Bei der Quantifizierung einer unspezifischen Phagozytose mit Polystyren-Kugeln konnte kein Unterschied zwischen humanen und murinen Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich hierbei eine verringerte Phagozytoserate der Zellen von Beads im Vergleich zu Konidien oder Keimschläuchen (Abb. 16).



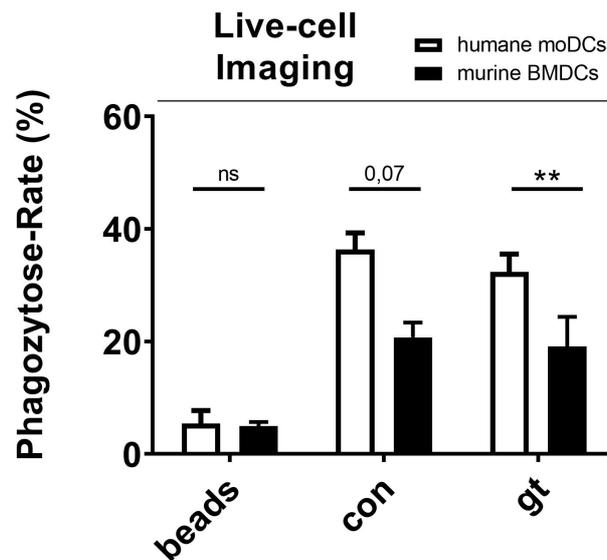
**Abbildung 14: Exemplarische *Live-cell Imaging* Aufnahmen von humanen moDCs und murinen BMDCs**

Gezeigt werden repräsentative Bildausschnitte für humane moDCs (A) und murine BMDCs (B) zu Beginn der Aufnahme und nach 3 h jeweils unstimuliert und in Ko-Kultur mit rot fluoreszierenden Konidien oder Keimschläuchen.



**Abbildung 15: Kontakte von humanen moDCs und murinen BMDCs mit *A. fumigatus***

Absolute Anzahl der Kontakte von humanen moDCs (weiße Balken) und murinen BMDCs (schwarze Balken) mit Polystyren-Kugeln (beads), *A. fumigatus* Konidien (con) oder Keimschläuchen (gt). Sechs humane und sechs murine Spender wurden analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Kontakte der jeweiligen Zellen mit den einzelnen Stimuli. ns = nicht signifikant.



**Abbildung 16: Phagozytoserate von humanen moDCs und murinen BMDCs von *A. fumigatus***

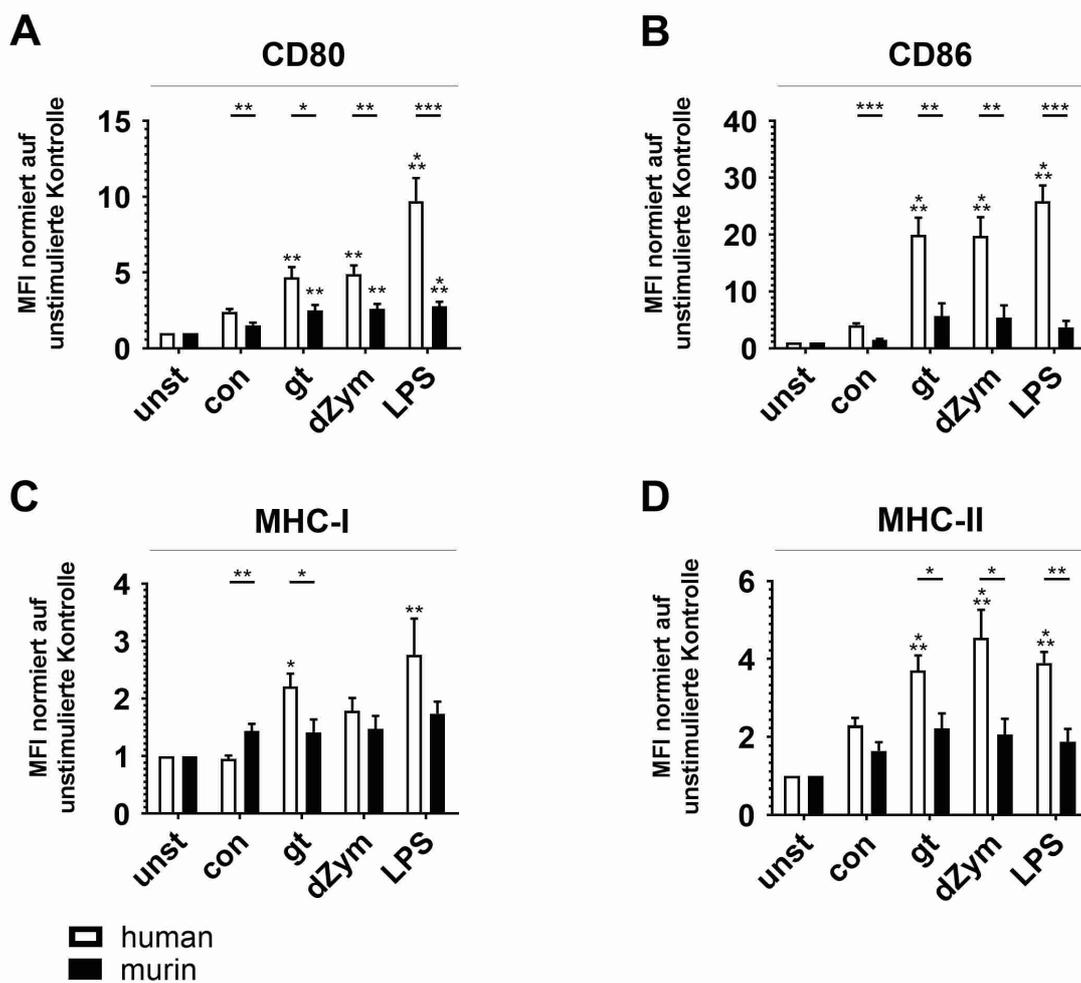
Phagozytoserate von humanen moDCs (weiße Balken) und murinen BMDCs (schwarze Balken) von Polystyren-Kugeln (beads), *A. fumigatus* Konidien (con) oder Keimschläuchen (gt). Die Phagozytoserate ergibt sich als prozentualer Anteil der ingestierten Kontroll-Kugeln oder Pilzmorphologien im Verhältnis zu der Anzahl von Kontakten der jeweiligen Morphologie innerhalb von 3 h. Sechs humane und sechs murine Spender wurden analysiert. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichung der Phagozytoserate der jeweiligen Zellen mit den einzelnen Stimuli. ns = nicht signifikant, \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.4 Untersuchung der Oberflächenexpression auf dendritischen Zellen nach Stimulation mit *Aspergillus fumigatus*

#### 3.4.1 Oberflächenexpression von Maturationsmarkern auf dendritischen Zellen

Zur Beurteilung der Reifung von dendritischen Zellen wurde die Expression von Maturationsmarkern (CD80, CD86, MHC-I und MHC-II) auf humanen moDCs und murinen BMDCs nach 24-stündiger Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien, Keimschläuchen, dZym und LPS gemessen und verglichen (s. Abschnitt 3.7.1). Die CD80 Expression zeigte einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bei humanen und murinen DCs nach Stimulation mit Keimschläuchen (human 4,7-fach vs. murin 2,5-fach), dZym (human 4,9-fach vs. murin 2,6-fach) und LPS (human 9,7-fach vs. murin 2,75-fach), nicht jedoch nach Stimulation mit Konidien (human 2,4-fach vs. murin 1,5-fach) (Abb. 17 A). Weiterhin fiel auf, dass humane moDCs nach Stimulation mit Konidien, Keimschläuchen, dZym und LPS einen signifikant höheren

Anstieg der CD80-Oberflächenexpression zeigten als die murinen Zellen. Bezüglich der Oberflächenexpression von CD86 zeigten ausschließlich humane moDCs einen signifikanten Anstieg nach Stimulation mit Keimschläuchen (human 19,9-fach vs. murin 5,6-fach), dZym (human 19,8-fach vs. murin 5,4-fach) und LPS (human 25,9-fach vs. murin 3,7-fach) und somit eine signifikant unterschiedliche Reaktion im Vergleich zu den murinen BMDCs (Abb. 17 B). Nach Stimulation mit Konidien zeigten murine BMDCs eine signifikant höhere Oberflächenexpression von MHC-I (human 0,9-fach vs. murin 1,4-fach), wohingegen ausschließlich die humanen moDCs einen signifikanten Anstieg der Oberflächenexpression von MHC-I nach Stimulation mit Keimschläuchen (human 2,2-fach vs. murin 1,4-fach) und LPS (human 2,8-fach vs. murin 1,7-fach) zeigten (Abb. 17 C). Betrachtet man die Oberflächenexpressionsanalyse von MHC-II der humanen und murinen Zellen fällt erneut auf, dass nur die humanen moDCs einen signifikanten Anstieg von MHC-II nach Stimulation mit Keimschläuchen (human 3,7-fach vs. murin 2,2-fach), dZym (human 4,5-fach vs. murin 2,1-fach) und LPS (human 3,9-fach vs. murin 1,9-fach) zeigten, was einen hochsignifikanten Unterschied zu den murinen BMDCs darstellt, welche nur eine milde Erhöhung der Oberflächenexpression von MHC-II nach Stimulation zeigten (Abb. 17 D).

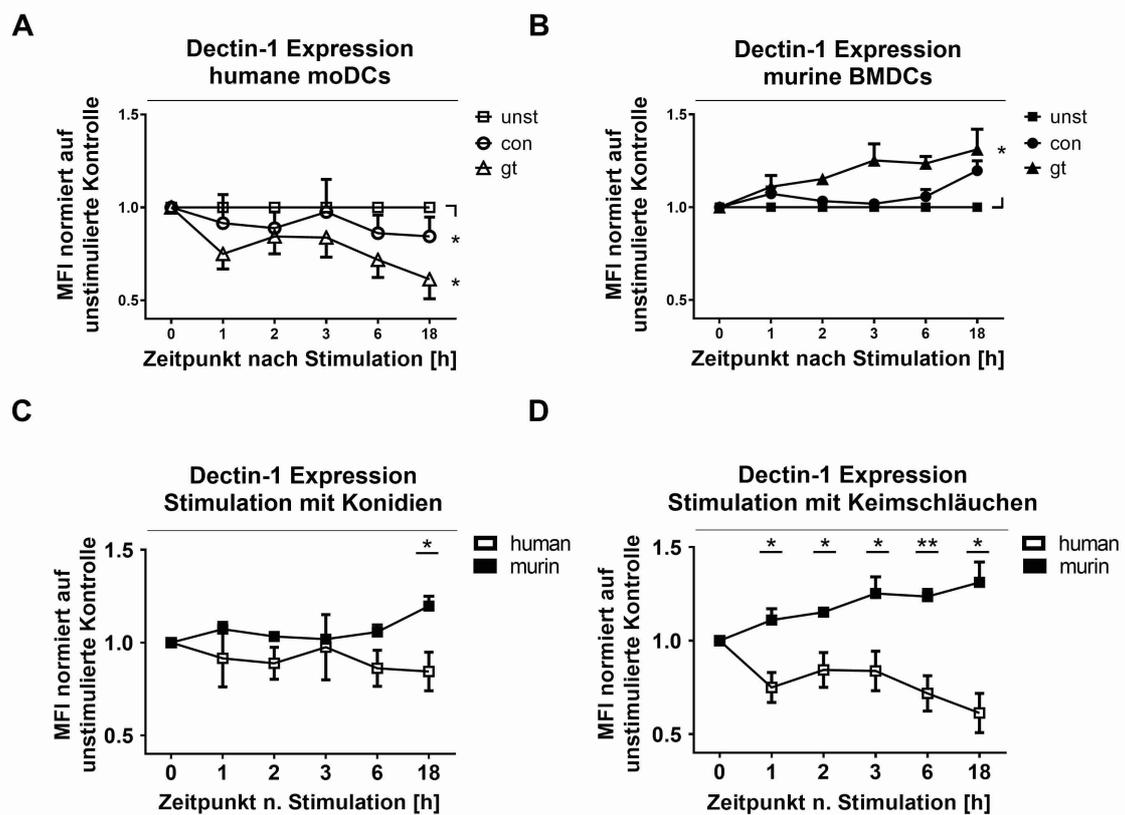


**Abbildung 17: Expression von Maturationsmarkern auf humanen moDCs und murinen BMDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus***

Nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con), Keimschläuchen (gt), depletierem Zymosan (dZym) und Lipopolysaccharid (LPS) zeigte sich eine deutliche stärkere Expression CD80 (A), CD86 (B), MHC-I (C) und MHC-II (D) auf der Oberfläche von humanen moDCs (weiße Balken) im Vergleich zu murinen BMDCs (schwarze Balken). Gemessen wurde die Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie nach 24 h Stimulation. Als Kontrolle dienten unstimulierte DCs (unst). Dargestellt ist die relative MFI (*mean fluorescence intensity*) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. Sechs humane und sechs murine Spender wurden analysiert. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikanz im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wird direkt über den Säulen dargestellt, Signifikanz zwischen humanen und murinen Zellen über den Balken. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.4.2 Dectin-1-Oberflächenexpression auf dendritischen Zellen

Die Oberflächenexpression des Transmembranproteins Dectin-1, welches als Phagozytoserezeptor fungiert, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 19 h nach Ko-Kultivierung) auf humanen moDCs und murinen BMDCs mittels Durchflusszytometrie untersucht (s. Abschnitt 3.7.2). Hierzu wurden humane moDCs und murine BMDCs mit inaktivierten *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen ko-kultiviert. Als Kontrolle wurden nicht-stimulierte Zellen verwendet. Danach wurden jeweils die stimulierten Proben mit der unstimulierten Probe verglichen, sowie die Reaktion der humanen mit der der murinen DCs verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Dectin-1-Expression auf humanen moDCs im Zeitverlauf abnimmt; dieses Verhalten ist nach Stimulation mit Keimschläuchen ausgeprägter als nach Stimulation mit Konidien (nach 18 h auf 84,4% der initialen Expression für con vs. 61,3% für gt) (Abb. 18 A). Gegenläufig hierzu konnte festgestellt werden, dass murine BMDCs mit einem entgegengesetzten Verhalten, das heißt einer Erhöhung der Dectin-1-Oberflächenexpression im Zeitverlauf, reagierten (nach 18 h auf 119,7% der initialen Expression für con vs. 131,2% für gt) (Abb. 18 B). Auch hier konnte eine stärkere Erhöhung nach Stimulation mit Keimschläuchen im Vergleich zu Konidien nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich von humanen und murinen DCs zeigte sich für *A. fumigatus* Keimschläuche zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied (Abb. 18 D). Bei *A. fumigatus* Konidien erreichte die Dectin-1-Expression erst nach 18 h Stimulation einen signifikanten Unterschied (Abb. 18 C).



**Abbildung 18: Dectin-1-Oberflächenexpression auf humanen moDCs und murinen BMDCs nach Stimulation mit *A. fumigatus***

Humane und murine dendritische Zellen zeigen eine inverse Dectin-1-Oberflächenexpression nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen. Gezeigt wird die mittels Durchflusszytometrie gemessene Dectin-1-Oberflächenexpression auf (A) humanen (moDCs) und (B) murinen (BMDCs) dendritischen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 19 h) nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien (con) und Keimschläuchen (gt), relativ zu unstimulierten Zellen (unst). Direkter Vergleich der relativen MFI von humanen und murinen DCs nach Stimulation mit Konidien (C) und Keimschläuchen (D). Dargestellt ist die relative MFI (*mean fluorescence intensity*) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. Vier humane und zwei murine Spender wurden analysiert. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

## 4 Diskussion

Das Krankheitsbild der invasiven Aspergillose, am häufigsten verursacht durch *Aspergillus fumigatus*, gewinnt bei zunehmender, v.a. iatrogen bedingter, Immunsuppression von Patientinnen und Patienten an Relevanz. Aufgrund der oft spät gestellten Diagnose, bedingt durch eine unspezifische Symptomatik, der schweren Grund- und Nebenerkrankungen der betroffenen Person sowie der nebenwirkungsreichen Therapie, ist die invasive Aspergillose mit einer hohen Letalität verbunden. Zur Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieansätze ist ein detailliertes Wissen über Host-Pathogen-Interaktion zwingend notwendig.

Viele Studien werden primär *in vitro* durchgeführt. Nach erfolgreicher Testung im Tiermodell erfolgt die klinische Testung am Menschen. Strukturelle wie auch funktionelle Unterschiede zwischen den Spezies sind bekannt, jedoch fehlt die genaue Kenntnis vieler Pathomechanismen im Vergleich zwischen Tiermodell und Mensch. Die Extrapolation von gewonnenen Daten ist bei fehlender Kenntnis über speziesspezifische Unterschiede in der Host-Pathogen-Interaktion schwierig. Fehlende Kenntnisse über speziesspezifische Unterschiede können neben einer Fehlinterpretation von Daten auch zu schwerwiegenden Komplikationen führen. So führte beispielsweise der Einsatz von TGN1412, einem agonistischen Antikörper gegen CD28 zur Therapie der Multiplen Sklerose, in einer Phase I Studie zu schweren Komplikationen. Bedingt waren diese durch interspeziesspezifische Unterschiede in der Oberflächenrezeptorbesetzung von T-Gedächtniszellen zwischen den Versuchstieren (Makaken), bei denen das Medikament ohne schwerwiegende Komplikationen erprobt wurde, und den menschlichen Probanden [Hunig (2016)]. In der Literatur finden sich immer wieder Beispiele, in denen sich auch unterschiedliche Reaktionsverhalten bei humanen und murinen Zellen zeigten [Panitch, Hirsch et al. (1987), Oehler and Bicknell (2000), Sykes (2001), Monaco (2003), Shepherd and Sridhar (2003), Wood (2003)], so dass eine direkte Übertragung von Erkenntnissen aus dem Tiermodell auf den Menschen nicht immer möglich ist.

Nichtsdestotrotz ist das Mausmodell momentan ein wichtiger Teil der Grundlagen- und translationalen Forschung, vor allem wenn komplexe Zusammenhänge des Immunsystems sowie die Interaktion der Immunzellen untereinander erforscht werden sollen. Im Falle der Erforschung der invasiven Aspergillose erlauben Knockout- und Knockdown-Modelle [Seyedmousavi, Davis et al. (2018)] sowie die Gabe von

Immunsuppressiva [Szigeti, Talas et al. (2018)] eine systemische Immunsuppression und somit die Entwicklung einer invasiven Aspergillose im Tiermodell.

Studien über den Vergleich der humanen und murinen Immunreaktion finden sich zum Krankheitsbild der Multiplen Sklerose sowie der Allergie Typ IV [Mestas and Hughes (2004)]; jedoch gab es zu unserer Kenntnis keine Studie, welche die Interaktion humaner und muriner Immunzellen in der Pathogenese der IA systematisch untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen strukturierten Vergleich der humanen und murinen Immunantwort in Gegenwart von *A. fumigatus* durchzuführen, um einerseits Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede aufzudecken.

Es wurden gezielt Zellpopulation gewählt, welche in der Pathogenese der IA eine wichtige Rolle spielen und üblicherweise in *A. fumigatus*-Studien verwendet werden. Die gewonnen Erkenntnisse dieser Arbeit sollen hierbei eine verbesserte Interpretation der im Mausmodell gewonnen Ergebnisse ermöglichen.

#### **4.1 Vergleich von humanen und murinen Makrophagen**

Alveolarmakrophagen erfüllen eine wichtige Aufgabe bei der initialen Abwehr von Mikroorganismen, welche in die tiefen Atemwege eingedrungen sind. Bei einem Kontakt mit *A. fumigatus* ist ihre primäre Aufgabe das Abtöten von eingedrungenen *A. fumigatus* Konidien durch Phagozytose, Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies und eine Immunmodulation durch Freisetzung verschiedener Zytokine, welche unter anderem zu einer Einwanderung weiterer Immunzellen in das Gewebe führen. In dieser Arbeit wurden humane Makrophagen aus CD14<sup>+</sup> Monozyten und murine Makrophagen aus Knochenmarkzellen unter Stimulation mit M-CSF generiert.

Nach Stimulation mit *A. fumigatus* Keimschläuchen sowie mit dem modifizierten Zellwandbestandteil dZym zeigten murine Makrophagen eine stärkere Ausschüttung von ROS, welches auf eine stärkere primäre, direkte Immunantwort gegen *A. fumigatus* im murinen Immunsystem hinweisen könnte. Interessanterweise zeigte sich entgegen den Erwartungen keine Reaktion auf Konidien, obwohl die Hauptaufgabe der Alveolarmakrophagen die Elimination von Konidien aus den tiefen Atemwegen ist. Diese Beobachtung könnte durch die Tatsache bedingt sein, dass murine Alveolarmakrophagen eine deutlich höhere Tötungsrate bei geschwollenen Konidien zeigten, nicht jedoch bei den in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten ruhenden Konidien [Philippe, Ibrahim-Granet et al. (2003)]. Gersuk et al. zeigte sowohl für humane als auch murine Makrophagen, dass Makrophagen ruhende Konidien von

geschwollenen Konidien mittels des Dectin-1-Rezeptors und der Bindung von  $\beta$ -Glucan unterscheiden können [Gersuk, Underhill et al. (2006)]. So phagozytierten Makrophagen zwar auch effizient ruhende Konidien, jedoch produzierten die Makrophagen hier keine inflammatorische Immunantwort und kein ROS. Diese fehlende Inflamationsreaktion bei ruhenden Konidien verhindert dabei eine Gewebsschädigung bei ständiger Exposition gegenüber Konidien in der Umwelt laut Gersuk et al. Um eine Standardisierung der Experimente zu erreichen und ein unkontrolliertes Anschwellen und Ausknospen der Konidien unter experimentellen Bedingungen, wie z.B. der Inkubation bei 37 °C, zu verhindern, wurden inaktivierte Konidien verwendet. Die chemische Behandlung mit Ethanol führt zur biologischen Inaktivierung der Konidien und verhindert somit ein Anschwellen und konsekutives Ausknospen des Pilzes. Die Inaktivierung bewahrt die Pilzmorphologie-spezifische Immunantwort und erlaubt somit eine Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Experimente [Hohl (2009)]. Dies könnte die fehlende Reaktion auf Konidien in den Makrophagenexperimenten begründen.

Ein wichtiger Unterschied zu unseren *in vitro* Experimenten im Vergleich zu der *in vivo* Interaktion zwischen *A. fumigatus* und Makrophagen ist die Verwendung von *in vitro* generierten Makrophagen aus Monozyten und nicht die Verwendung von primären Alveolarmakrophagen. Die Gewinnung von humanen Alveolarmakrophagen ist nur durch eine aufwendige und invasive BAL möglich. Für unsere Experimente war eine Gewinnung von Alveolarmakrophagen von gesunden Probandinnen und Probanden bei fehlender Indikation für eine BAL sowie potentiellen Risiken des Eingriffs aus ethischen Gründen ausgeschlossen.

Bezüglich der Zytokinsekretion zeigten humane Makrophagen im Vergleich zu murinen Makrophagen ein deutlich erhöhtes IL10-Level. Das humane basale IL10-Level war 20-fach höher als das der murinen Makrophagen. Auch nach Stimulation mit *A. fumigatus* Keimschläuchen sowie dZym zeigte sich ein deutlich stärkerer Anstieg der IL10-Zytokinsekretion der humanen Zellen. IL10 wirkt hierbei antiinflammatorisch; es hemmt den CD 28/MHC-II-Signalweg. Weiterhin führt es zu einer verstärkten Th2-Antwort und einer verminderten Th1-Antwort, welche die Plasmazellproliferation und Antikörper-Produktion fördert. Interessanterweise konnten Clemons et al. [Clemons, Grunig et al. (2000)] zeigen, dass im murinen System IL10 einen nachteiligen Effekt auf das Überleben von Mäusen mit invasiver Aspergillose hat. So überlebten IL10-Knockoutmäuse länger als Wildtyp-Mäuse im *in vivo* Modell. Im Gegensatz hierzu konnte beim Menschen ein protektiver Effekt von IL10 gezeigt werden. Beispielsweise

konnte bei Patientinnen und Patienten mit chronischer Besiedlung mit *A. fumigatus*, wie sie bei Patientinnen und Patienten mit Zystischer Fibrose vorkommen kann, ein protektiver Effekt von IL10 gezeigt werden, indem es die T-Zell-Toleranz fördert und somit die Inflammationsreaktion vermindert [Casaulta, Schoni et al. (2003)]. Auch bei der Invasiven Aspergillose trägt die Inflammation zur Zerstörung des Gewebes bei [Wong, Fric et al. (2019)], so dass auch hier von einem protektiven Effekt ausgegangen werden könnte. Die beschriebenen Effekte könnten eine mögliche Erklärung für die Beobachtung der unterschiedlichen IL10-Sekretionen zwischen murinen und humanen Zellen in unseren Versuchen erklären.

#### 4.2 Vergleich von humanen und murinen neutrophilen Granulozyten

Als Teil der angeborenen Immunantwort fungieren neutrophile Granulozyten als schnelle, unspezifische Abwehr bei Eindringen eines mikrobiellen Erregers in den Organismus. Hierbei verlassen sie, angezogen durch Chemokine, die Blutbahn und gelangen zum Ort der Infektion. Zur Abwehr des Körpers gegen den fremden Organismus dienen ihnen die Ausschüttung von Zytokinen, löslichen antimikrobiellen Substanzen wie reaktiven Sauerstoffspezies und die Phagozytose des Pathogens [Arnhold and Flemmig (2010)]. Humane und murine PMNs wurden in unserer Studie in vergleichbaren Methoden aus Blut gewonnen.

Murine PMNs zeigten in unseren Experimenten eine stärkere Ausschüttung von ROS nach Stimulation mit *A. fumigatus* Keimschläuchen sowie dZym im Vergleich zu humanen PMNs.

Neben der regulatorischen Aufgabe als Signalmolekül [Brakhage, Bruns et al. (2010)] führt die Ausschüttung von ROS zu einer Abtötung von *A. fumigatus*. Zudem können reaktive Sauerstoffspezies einen programmierten Zelltod auslösen [Shlezinger, Irmer et al. (2017)]. Diese stärkere Reaktion der murinen PMNs als Teil der *first-line of defense* könnte ein Hinweis auf eine stärkere Antwort des angeborenen Immunsystems sein. Eine Erklärung hierfür könnte die höhere inhalative Exposition der Maus gegenüber *A. fumigatus* sein, bedingt durch die bodennahe Lebensweise.

Hinsichtlich der ausgeschütteten Zytokine durch PMNs nach Stimulation fällt auf, dass humane PMNs deutlich mehr IL8 ausschütten. Dabei gilt es zu beachten, dass murine Zellen kein IL8 ausschütten und daher das funktionelle murine Homolog Gro $\alpha$  zum Vergleich herangezogen wurde. Die benannten Zytokine wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und sind somit als positiver *Feedback Loop* zu verstehen. Interessanterweise konnte beim Menschen gezeigt werden, dass eine erhöhte IL8-

Konzentration im Blut, nachgewiesen in der frühen Phase einer IA, mit einem schlechteren klinischen Outcome verknüpft ist [Chai, Netea et al. (2010)]. Dieses Ergebnis wurde mit einer IL8 vermittelten Inflammationsreaktion begründet, welche zu einer Gewebeschädigung und somit früherem Organversagen führt. Im Gegensatz hierzu konnte Mehrad et al. zeigen, dass immunsupprimierte Mäuse mit einer transienten Hyperexpression von  $Gro\alpha$  ein besseres Überleben zeigten [Mehrad, Wiekowski et al. (2002)]. Durch  $Gro\alpha$  wurden hier nicht nur weitere PMNs, sondern auch Monozyten und Makrophagen rekrutiert. Das verbesserte Überleben wurde durch die vorteilhafte Immunmodulation bei gleichzeitig verstärkter Abtötung des Pilzes begründet. Des Weiteren fällt auf, dass murine PMNs ein breiteres Spektrum an ausgeschütteten Zytokinen zeigen, hierunter  $MIP1\alpha$ ,  $MIP1\beta$ ,  $TNF\alpha$  und das antiinflammatorische Zytokin IL10. Bei initial zwar stärkerer antifungizider Reaktion der murinen PMNs zeigt sich somit auch eine immunmodulatorische und auch antiinflammatorische Reaktion. Auch dies könnte auf den bodennahen Lebensraum zurückzuführen sein. Aufgrund der höheren Exposition muss das murine Immunsystem eine Balance zwischen Abwehr der Mikroorganismen einerseits und Immuntoleranz und Schutz vor einer überschießenden Inflammationsreaktion andererseits finden.

Wohingegen die humanen PMNs ihre vermeintlich schwächere ROS-Ausschüttung möglicherweise durch den genannten positiven *Feedback Loop* und somit Rekrutierung weiterer PMNs kompensieren.

### 4.3 Vergleich von humanen und murinen dendritischen Zellen

Zur Generierung humaner moDCs wurden  $CD14^+$  Monozyten mit GM-CSF und rIL4 kultiviert. Murine dendritische Zellen wurden aus murinem Knochenmark generiert, welches mit GM-CSF angereichert wurde. Dendritische Zellen wandern nach Antigenkontakt und -aufnahme im infizierten Gewebe in regionale Lymphknoten und führen hier über Antigenpräsentation sowie Zytokinausschüttung zur Aktivierung von T-Zellen.

Die Phagozytose von Antigenen durch die DCs stellt hierbei die Voraussetzung zur T-Zell-Aktivierung dar. Antigene, hier der eingedrungene Pilz, werden phagozytiert, im Zellinneren prozessiert und anschließend im lymphatischen Gewebe der T-Zelle präsentiert. Die dendritischen Zellen stellen hierbei eine entscheidende Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar [Steinman and Hemmi (2006)].

In unseren *Live-cell Imaging* Experimenten waren sowohl humane als auch murine DCs in der Lage *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuche zu phagozytieren. Hierbei zeigte sich beim Interspeziesvergleich eine gleiche Anzahl an Kontakten mit dem Pilz; jedoch phagozytierten humane dendritische Zellen mehr Konidien und Keimschläuche und zeigten somit eine höhere Phagozytosekapazität.

Unterschiede konnten auch bei der Dectin-1-Expression festgestellt werden: Der Dectin-1-Rezeptor fungiert als  $\beta$ -Glucan-Rezeptor und führt nach Oberflächenbindung zur Internalisierung und somit Phagozytose des Antigens. Neben seiner Funktion als Phagozytoserezeptor führt die Aktivierung von Dectin-1 auch zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen [Brown, Herre et al. (2003)]; dies konnte ebenso bei Mäusen gezeigt werden [Reid, Gow et al. (2009)]. Postuliert wird zudem, dass durch Liganden des Dectin-1-Rezeptors Autoimmunität hervorgerufen werden kann, welche durch Inhibition des Rezeptors wieder aufgehoben werden konnte. In Zusammenschau der Ergebnisse könnte die Hochregulation der Dectin-1-Expression auf murinen DCs eine Kompensation sein, um die geringere Phagozytoserate auszugleichen, indem mehr Rezeptoren zur Phagozytose bereitgestellt werden sowie ein stärkerer Anreiz auf weitere Zellen via Chemotaxis ausgelöst wird. Auf der anderen Seite könnte der Nachweis eines vermehrten Phagozytose-Rezeptorbesatzes der murinen DCs auch nur Ausdruck dessen sein, dass noch nicht viele Rezeptoren internalisiert wurden und somit an der Zelloberfläche verblieben sind. Die Herunterregulation des Rezeptors auf den humanen DCs könnte dem Schutz vor einer ausgeprägten und unkontrollierten Inflammation sein, wohingegen das murine Immunsystem scheinbar einen stärkeren Stimulus zur effektiven Abtötung des Pilzes benötigt. Werner et al. konnte interessanterweise zeigen, dass Dectin-1<sup>-/-</sup>-Mäuse eine deutlich erhöhte Mortalität nach endotrachealer Infektion mit *A. fumigatus* aufweisen [Werner, Metz et al. (2009)]; dies wurde vor allem auf die verringerte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zurückgeführt, welches unter anderem zu einer insuffizienten Rekrutierung von PMNs in das infizierte Areal zur Folge hatte. Zudem beschreiben die Autoren eine geringere ROS-Produktion von Dectin-1-Knockout Mäusen sowie eine verringerte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen. Somit wäre in weiteren Versuchen eine vergleichende Analyse der Dectin-1-Expression auf humanen und murinen PMNs und Makrophagen analog zur Analyse der DCs sehr interessant und muss in Folgestudien untersucht werden.

Bei der Interpretation der Zytokinausschüttung humaner und muriner DCs fiel auf, dass murine DCs im Vergleich zu humanen DCs einen starken Anstieg der IL6 Produktion

nach Stimulation mit *A. fumigatus* Konidien, Keimschläuchen und dZym zeigten. Bereits Cenci et al. [Cenci, Mencacci et al. (2001)] zeigte die entscheidende Rolle von IL6 in der Abwehr gegen *A. fumigatus* im murinen Organismus. IL6-defiziente Mäuse waren hier anfälliger für eine IA im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen; hierbei wurden Immunzellen zum Ort der Infektion rekrutiert, jedoch zeigten die Immunzellen an sich eine eingeschränkte Effektivität in der Abwehr gegen den Pilz. Zudem ging eine IL6-Defizienz mit einer erhöhten Inflammation und Destruktion der Lunge einher. Somit kommt IL6 im murinen Organismus eine komplexe sowohl pro- als auch antiinflammatorische Rolle in der Pathogenese der IA zu. Auch IL10 als antiinflammatorisches Zytokin wurde von murinen DCs vermehrt ausgeschüttet. Wohingegen humane DCs eine eher proinflammatorische Zytokinausschüttung mit erhöhten TNF $\alpha$ -, MCP1- und IL12p70-Spiegeln zeigten.

Die dendritischen Zellen stellen einen wichtigen Schnittpunkt zum adaptiven Immunsystem durch ihre Interaktion mit den T-Zellen im lymphatischen Gewebe dar. Die DCs nehmen das Antigen im peripheren Gewebe durch Phagozytose auf, wandern in das lymphatische Gewebe und präsentieren dort das prozessierte Antigen via MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Zur Präsentation der Antigene werden neben MHC-I und MHC-II ko-stimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 benötigt. Die Expression dieser MHC-I-, MHC-II- sowie CD80- und CD86-Molekülen an der Zelloberfläche wird als Maß der Reifung der Zelle gewertet.

In unserer Untersuchung der Maturationsmarker humaner und muriner DCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* zeigte sich, dass ausschließlich humane DCs hochsignifikant mit einem Expressionsanstieg von CD86 und MHC-II nach Stimulation mit *A. fumigatus* Keimschläuchen und dZym reagierten, wohingegen murine DCs in Bezug auf die genannten Maturationsmarker keine Reaktion zeigten. Auf Konidien reagierten keine der DCs, was darauf schließen könnte, dass DCs in der Regel keinen Kontakt zu Konidien haben, da diese nur durch Aussprossen in Keimschläuche in Gewebe eindringen können. Das Ansteigen von MHC-II und CD80 auf humanen DCs lässt den Schluss zu, dass die Einleitung der adaptiven Immunantwort eine entscheidende Rolle in der Interaktion des humanen Immunsystems mit dem Pilz ist. Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch Antigen-Präsentation via MHC-II führt konsekutiv zur Entwicklung einer humoralen Immunantwort durch Stimulation der B-Zell-Differenzierung sowie zu einer zellulär vermittelten Immunität durch Stimulation von Makrophagen und Granulozyten [Abbas (2015)]. Somit wird eine langwirkende Immunisierung des Organismus eingeleitet, um eine effiziente Immunantwort bei erneuter Interaktion mit dem Pathogen zu ermöglichen.

Zusammenfassend könnten die Ergebnisse einen Hinweis auf die unterschiedliche Funktion der DCs im humanen und murinen Organismus geben. Es zeigt sich hierbei in den humanen Zellen eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems über Maturation der DCs und folglich einer Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Auf der anderen Seite leiten murine DCs eher eine immunmodulatorisch bzw. immunsupprimierende Reaktion ein, um möglicherweise der starken primären Immunantwort durch PMNs und Makrophagen entgegenzuwirken.

#### 4.4 Weitere Versuchsmodelle

Die Verwendung von Säugetieren als Modellsystem in der Forschung wirft immer wieder ethische und wirtschaftliche Fragen auf. Die Etablierung eines Mausmodells nimmt viel Zeit in Anspruch, welches bei der schnellen Entwicklung von Resistenzen ein entscheidender Faktor in der infektiologischen Forschung sein kann. Zudem benötigen die Nagetiere ausreichend viel Platz, eine adäquate Pflege und Zeit zur regelmäßigen Beurteilung der Tiere, um die Belastung der Tiere auf einem möglichst geringen Niveau zu halten. Die Zulassung für ein Tierexperiment mit Mäusen wird umfassend geprüft, die Anzahl der zu verwendenden Tieren sowie jegliche Prozedur mit oder an den Tieren muss beantragt werden und darf nicht eigenmächtig während des Versuchs verändert werden. Diese Vorkehrungen machen Mausexperimente zwar teuer, zeitaufwendig und wenig flexibel, sind jedoch aus ethischen Aspekten sinnvoll und notwendig.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte sollte zum einen nach Alternativen zum Mausmodell gesucht werden und zum anderen die Übertragbarkeit von im Mausmodell gewonnenen Daten auf den Menschen verbessert werden.

Zur Erweiterung der klassischen *in vitro* Zellkultur-Experimente können humane Gewebemodelle [Ronaldson-Bouchard, Ma et al. (2018), Nerger and Nelson (2019)] herangezogen werden. Hierbei können z.B. Alveolarmodelle verwendet werden, um der Dreidimensionalität in der Pathogenese der IA gerecht zu werden [van Riet, Ninaber et al. (2020)].

Neben dem Mausmodell stehen unter anderem Invertebraten als *in vivo* Modell-Systeme zur Verfügung, die sich je nach Fragestellung als vielversprechende Alternative bzw. Bereicherung zum Mausmodell erweisen. Während die Maus sich zwar durch ihre Ähnlichkeit zum Menschen in der Anatomie und Physiologie und insbesondere des Immunsystems auszeichnet, sind Invertebraten (ausgenommen Cephalopoden und Dekapoden) in der Regel gut und in großer Anzahl verfügbar, benötigen wenig Platz und Versuche sind nach §8a des Tierschutzgesetzes weder genehmigungs- noch

anzeigepflichtig. Hier sollte ebenfalls auf die artgerechte Haltung zum Wohl der Tiere geachtet werden. Zudem kann die Haltung der Tiere maßgeblich die Ergebnisse der Experimente beeinflussen. So konnte z.B. für die Wachsmotte gezeigt werden, dass Stress, wie ein zu langer Transport, zu einer verminderten Immunantwort führen kann [Mowlds, Barron et al. (2008)].

Die Larven der großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) werden seit einiger Zeit in der Erforschung der Pathogenese verschiedener durch Pilze verursachter Erkrankungen verwendet. Zunächst dienten sie der Erforschung entomopathogener Pilze, welche krankheitserregend für Insekten sind [Götz, Matha et al. (1997)], gewannen jedoch zunehmend Anwendung in der Erforschung von humanpathogenen Pilzen [Firacative, Khan et al. (2020)]. Die Larve der Wachsmotte kann bei 37 °C wachsen [Arvanitis, Glavis-Bloom et al. (2013)], welches für Experimente mit den thermotoleranten *A. fumigatus* von Bedeutung ist [Bhabhra and Askew (2005)] und somit eine gute Imitation der Bedingungen im menschlichen Körper darstellt. Zudem ist ein Vorteil dieses Invertebraten-Modelles, dass durch die Größe der Larve eine Applikation einer definierten Menge des Pathogens bzw. Therapeutikums möglich ist [Arvanitis, Glavis-Bloom et al. (2013)]. Die Larve der Wachsmotte erreicht eine Größe von 25-30 mm Länge und 5-7 mm Durchmesser [Kwadha, Ong'amo et al. (2017)]. Das Immunsystem von *Galleria mellonella* besteht aus verschiedenen Populationen von Hämozyten; der primäre Abwehrmechanismus gegen eingedrungene Erreger ist die Phagozytose. Parallelen zum humanen Immunsystem konnten hierbei im NADPH-Oxidase-System gefunden werden [Renwick, Reeves et al. (2007)]; außerdem weist *Galleria mellonella* auch PRRs auf [Renwick, Reeves et al. (2007)]. Bergin et al. konnte zudem zeigen, dass die humorale Immunantwort variabel ist und die Wachsmotte nach vorherigem Kontakt mit dem eingedrungenen Pilz (hier *Candida albicans*) eine stärkere Ausschüttung antimikrobieller Peptide zeigte und sich so vor sonst letalen Pilzinfektionen schützen konnte [Bergin, Murphy et al. (2006)]. *Galleria mellonella* wurde bereits zur Testung verschiedener Antimykotika sowie Untersuchung von Virulenzfaktoren von *A. fumigatus* verwendet und konnte hier vergleichende Ergebnisse in Bezug auf das Mausmodell erzielen [Vu and Gelli (2010), Slater, Gregson et al. (2011), Mesa-Arango, Forastiero et al. (2013), Jemel, Guillot et al. (2020)]. 2018 wurde erstmalig das Genom der Wachsmotte sequenziert [Lange, Beier et al. (2018)], jedoch gibt es bislang keine vergleichenden Interspezies-Genomanalysen zwischen *Galleria mellonella* und dem humanen und murinen Genom. Auch etablierte Protokolle zur genetischen Modifikation der Wachsmotte fehlen. Durch die Anfälligkeit der Immunantwort der Larve auf äußere

Faktoren wie Stress, Nahrung oder Temperatur [Mowlds, Barron et al. (2008), Banville, Browne et al. (2012)] bedarf es zudem einem standardisierten Vorgehen im Umgang mit diesem Modellorganismus [Firacative, Khan et al. (2020)].

Als Alternative stehen die Larven des Seidenspinners (*Bombyx mori*) als Modell zur Verfügung. Durch jahrelange industrielle Nutzung der Tiere in der Seidenindustrie ist ihre Haltung und Aufzucht gut etabliert. *Bombyx mori* eignet sich vor allem zur Testung von Antibiotika und Antimykotika. Durch die Größe der Larve (ca. 40-50 mm) [Sekar, Kalpana et al. (2016)] ist die Applikation einer bestimmten Menge einer Substanz möglich. Außerdem sind im Gegensatz zur Larve der Wachsmotte verschiedene Applikationsrouten sowie die Entnahme von Hämolymphe und Mitteldarm möglich. Dies erlaubt eine Bestimmung von Substanzkonzentrationen in verschiedenen anatomischen Kompartimenten [Hamamoto, Kurokawa et al. (2004), Meng, Zhu et al. (2017)]. Wie auch die Wachsmotte verfügt *Bombyx mori* über ein angeborenes Immunsystem, welcher aus einer zellulären und humoralen Komponente besteht. Die zelluläre Komponente setzt sich aus Hämocyten zusammen, welche eingedrungene Erreger phagozytieren. Zudem können die Hämocyten sogenannte antimikrobiellen Peptide bilden, die die humorale Komponente bilden. Eindringene Erreger werden hierbei über PRRs erkannt [Romoli, Saviane et al. (2017)]. Für mehrere humanpathogene Erreger, unter anderem *Candida albicans*, konnte bereits gezeigt werden, dass diese Erreger auch pathogen für die Larve des Seidenspinners sind sowie dass eine Reihe an Antiinfektiva auch bei den Invertebraten wirken und vergleichbare Pharmakokinetik wie im Mausmodell aufweisen [Kaito, Akimitsu et al. (2002), Hamamoto, Kurokawa et al. (2004), Matsumoto, Miyazaki et al. (2012)]. Auch für *A. fumigatus* erfolgten Screening-Untersuchungen zur Entdeckung neuer Antimykotika im Seidenspinnermodell [Nakamura, Kanasaki et al. (2017)]. Des Weiteren kann *Bombyx mori* zur Untersuchung von Virulenzfaktoren verwendet werden [Hanaoka, Takano et al. (2008)]. Durch die vollständige Sequenzierung des Seidenspinner-Genoms [Xia, Zhou et al. (2004), Xia, Guo et al. (2009)] können vergleichende Genomanalysen mit anderen Invertebraten sowie mit Säugetieren wie dem Menschen [Consortium (2008)] und die Etablierung von Knockout-Stämmen [Wang, Li et al. (2013)] erfolgen. Ein Nachteil des Seidenspinners als Invertebraten-Modell ist, dass seine optimale Haltungs- und Wachstumstemperatur bei 24-28 °C liegt [Kunhamed (2012)], welche weit unter den physiologischen Bedingungen einer *A. fumigatus* Infektion im menschlichen Organismus liegt und somit zu einer eingeschränkten Übertragbarkeit der Daten führt.

Ein weiteres Versuchstiermodell stellt *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) dar. Hierbei handelt es sich um einen im ausgewachsenen Zustand ca. 1 mm langen Fadenwurm [Uppaluri and Brangwynne (2015)]. Er wächst auf Petrischalen bei 15-25 °C und ernährt sich von Mikroorganismen wie *Escherichia coli*. Zudem kann er gefroren über lange Zeit gelagert werden. Dies macht seine Handhabung einfach und kostengünstig [Park, Jung et al. (2017)]. Durch seine transparente Erscheinung und kleine Größe ist sein Inneres durch ein Lichtmikroskop ersichtlich. Sein Genom ist vollständig sequenziert und es gibt eine Reihe an etablierten Methoden wie interferierende RNAs (siRNAs, *small interfering ribonucleic acid*) und CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), um das Genom je nach Versuchszweck zu editieren [Park, Jung et al. (2017)]. Zudem besitzt *C. elegans* als Hermaphrodit die Fähigkeit, sich selber zu befruchten und somit genetisch identische Nachkommen zu produzieren [Arvanitis, Glavis-Bloom et al. (2013)]. Im Gegensatz zur Wachsmotte und dem Seidenspinner hat der Fadenwurm keine mobilen Immunzellen. Zudem scheinen PRRs wie TLRs sowie Zytokine und der NF-κB-Signalweg keine Rolle zu spielen [Pukkila-Worley and Ausubel (2012)]. Das Immunsystem des Fadenwurms besteht aus den Epithelzellen des Darms; hier werden Erreger erkannt und verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert [Pukkila-Worley, Feinbaum et al. (2012)]. Somit kann *C. elegans* gut als Versuchsmodell dienen, um TLR und NF-κB unabhängige Signalwege zu untersuchen. Aufgrund seiner einfachen Handhabung und guten Verfügbarkeit findet er zudem vor allem Anwendung bei der Entschlüsselung neuer Virulenzfaktoren sowie bei dem Screening nach neuen wirksamen Substanzen und der Evaluation deren Toxizität [Arvanitis, Glavis-Bloom et al. (2013), Hunt (2017)]. Auch für *A. fumigatus* wurden erste Infektionsversuche mit *C. elegans* publiziert [Okoli and Bignell (2015), Ahamfule, Qin et al. (2020)]. Nachteile des *C. elegans*-Modells sind zum einen die kleine Größe des Organismus, da Erreger, Substanzen oder siRNAs nicht direkt mit einer Kanüle appliziert werden können, sondern über die Nahrung durch den Fadenwurm aufgenommen werden. Dies ist zwar einfach durchführbar, lässt aber keine Applikation einer definierten Erreger- oder Substanzmenge zu. Zum anderen weicht die Wachstumstemperatur von in der Regel 20 °C deutlich von der menschlichen Körperkerntemperatur ab und kann somit keine idealen Umgebungsbedingungen widerspiegeln. Durch die doch deutlichen Unterschiede zum Immunsystem von Wirbeltieren sind zudem keine vergleichenden Untersuchungen bezüglich Immunzell-Interaktionen möglich.

Zusammenfassend können Invertebraten-Modelle wie die Wachsmotte, der Seidenspinner oder der Fadenwurm als wertvolle Ergänzung zu Nagetier-Modellen

betrachtet werden. Sie ermöglichen unter anderem eine breite Untersuchung von Virulenzfaktoren und Antimykotika und können somit zu einer schnelleren therapeutischen Antwort auf die Entwicklung von resistenten *Aspergillus*-Stämmen beitragen. Im Vergleich zur Testung neuer Substanzen in der Zellkultur können zudem Hinweise auf Toxizität auf einen, wenn auch weniger komplexen, Organismus gewonnen werden. Die Verwendung von Invertebraten-Modellen kann somit die Anzahl der für Nagetierversuche notwendigen Versuchstiere senken.

Als nachteilig sind die eindeutigen Einschränkungen der Invertebraten-Modelle anzusehen. Vor allem die nur geringe Homologie des humanen Immunsystems im Vergleich zu dem der Invertebraten ist hier zu nennen. Das Immunsystem der Invertebraten erlaubt somit keine Rückschlüsse auf die Interaktion der Immunzellen untereinander bzw. auf die Reaktion eines adaptiven Immunsystems auf ein bereits bekanntes Pathogen. Somit können beim Screening auf potentiell neue Antimykotika wichtige Substanzen übersehen werden, welche z.B. durch immunmodulatorische Effekte zur Bekämpfung des Pilzes beitragen (z.B. Caspofungin, Voriconazol) [Fidan, Yesilyurt et al. (2014)]. Zudem besteht bei manchen Invertebraten-Modellen nicht die Möglichkeit, eine genau definierte Menge des Pathogens oder auch des möglichen Therapeutikums zu applizieren. Dies führt zu einer unzureichenden Standardisierung der Experimente und folglich einer Ungenauigkeit der Ergebnisse. Durch deutliche Unterschiede in der Anatomie und Physiologie der Invertebraten zu Säugetieren können Eintrittspforten des Pilzes und die Applikationsart des Therapeutikums nicht nachempfunden werden, so dass eine Studie z.B. über Infektionswege, -dosis sowie Metabolisierung einer Substanz nur eingeschränkt möglich sind. Außerdem sind die Genome der verschiedenen Spezies nur teilweise sequenziert und Methoden zur genetischen Modifikation der Tiere nicht ausreichend etabliert.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Verbesserung der Übertragbarkeit von Daten vom Mausmodell auf den Menschen. Hierbei ist beispielhaft die Verwendung von humanisierten Mäusen zu nennen. Dabei wird eine Maus, welche humanes Gewebe oder humane Zellen trägt oder humane Gene exprimiert, als humanisiert bezeichnet [Shultz, Ishikawa et al. (2007)]. Um dies zu ermöglichen, muss das murine Immunsystem teilweise oder vollständig ausgeschaltet werden. So führt beispielsweise die Ausschaltung des *Prkdc<sup>scid</sup>*-Gens (Proteinkinase, DNA aktiviert, katalytisches Polypeptid, *severe combined immunodeficiency*) in einer NOD-Maus (*non-obese diabetic*) zu einer fehlenden Ausreifung von T- und B-Zellen. Durch ein zusätzliches Ausschalten der *gamma*-Untereinheit des IL2-Rezeptors (*Il2rg<sup>-/-</sup>*) kommt es weiterhin zu

einem Mangel an NK-Zellen [Shultz, Ishikawa et al. (2007)] und somit zu einer schwersten Immundefizienz. Die Unterdrückung bzw. Ausschaltung des murinen Immunsystems ermöglicht es nun, humane Zellen zu transplantieren. Weitere genetische Modifikationen des murinen Erbgutes können das Anwachsen der humanen Zellen oder des humanen Gewebes im murinen Umfeld verbessern. Hierzu zählen z.B. die Expression von humanen MHC-Molekülen oder humanen Zytokinen. So exprimieren MISTRG-Mäuse ( $M\text{-CSF}^{h/h}$   $IL3/GM\text{-CSF}^{h/h}$   $SIRPa^{tg}$   $TPO^{h/h}$   $RAG2^{-/-}$   $IL2Rg^{-/-}$ ) humane Zytokine unter einem murinen Promotor, welcher die Expression steuert [Rongvaux, Willinger et al. (2014)]. Die Expression von humanem IL3 und GM-CSF fördert vor allem die Entwicklung von Alveolarmakrophagen nach Transplantation von humanen hämatopoetischen Stammzellen und ermöglicht so die Erforschung der Immunzellinteraktionen in der Lunge [Willinger, Rongvaux et al. (2011)]. In der Infektionsforschung findet das humanisierte Mausmodell z.B. in der HIV-Forschung breite Anwendung [Shultz, Brehm et al. (2012)], da für die Infektion die *in vivo* Interaktion des Virus mit den humanen Immunzellen von besonderer Bedeutung ist. Bezüglich der invasiven Aspergillose werden hauptsächlich primär immunkompetente Mausmodelle verwendet, wobei eine Immunsuppression iatrogen durch Gabe von Medikamenten oder Bestrahlung herbeigeführt wird. Zudem spielen Knock-out Modelle eine wichtige Rolle. Hierbei werden gezielt Maus-Gene inaktiviert, um deren Bedeutung in der Pathogenese der IA zu untersuchen [Desoubeaux and Cray (2017)]. Als Nachteil von humanisierten Mausmodellen ist die zeit- und kostenaufwendige Züchtung und Haltung aufzuführen. Zudem können durch die Reaktion der transplantierten menschlichen Zellen schwerwiegende allogene Komplikationen auftreten wie bspw. eine Hämophagozytische Lymphohistiozytose. Hierbei kann es zu einer potentiell letalen schweren Anämie und Thrombopenie sowie Infiltration von humanen Immunzellen in die murinen Organe kommen [Yoshihara, Li et al. (2019), Tian, Lyu et al. (2020)]. Als weitere Komplikation ist die *Graft-vs-Host*-Erkrankungen in der humanisierten Maus zu nennen. Bei dieser kommt es zu einer Abstoßungsreaktion von murinem Gewebe durch humane Lymphozyten [Greenblatt, Vrbanac et al. (2012)]. Diese und weitere Faktoren sollten besondere Beachtung bei der Beurteilung gewonnener Daten finden.

#### 4.5 Limitationen und Ausblick

Es ist davon auszugehen, dass Mausmodelle auch in Zukunft nicht an Relevanz verlieren werden [Desoubeaux and Cray (2018)]. Sie erlauben Analysen von komplexen

Zellinteraktionen des Immunsystems. Unser *in vitro* Studiendesign einzelner Zellgruppen ist eine eindimensionale Darstellung eines mehrdimensionalen Systems, es erlaubt jedoch einen standardisierten Vergleich der Immunzellen von sehr unterschiedlichen Spezies, die sich u.a. in Organismusgröße, Lebenserwartung, Umweltbedingungen und ökologischer Nische unterscheiden. Wir konnten zeigen, dass es Gemeinsamkeiten, jedoch auch Unterschiede in der Ausprägung und Direktion der Immunantwort beider Spezies gibt. Hierbei schien eine schnelle Elimination des eingedrungenen Pathogens sowie anschließende Immuntoleranz und Antiinflammation im murinen System eine entscheidende Rolle zuzukommen, was evtl. auf die ständige Exposition des Organismus gegenüber dem potentiell pathogenen Pilz zurückzuführen ist. Im humanen System scheint dem adaptiven Immunsystem eine größere Rolle zuzukommen, um möglicherweise über viele Jahrzehnte eine sehr effiziente Immunantwort abrufen zu können.

Unter ethischen Gesichtspunkten sollte auf eine bewusste, möglichst restriktive und effiziente Nutzung des Tiermodells geachtet werden. Zweck dieser Studie war es, einen tieferen Einblick in die Host-Pathogen-Interaktion zwischen humanen und murinen Immunzellen im Hinblick auf die IA zu ermöglichen, um zukünftig erhobene Daten, ob in Zellkultur oder Mausmodell erworben, besser interpretierbar zu machen und somit bei der Entwicklung neuer Diagnostika und Therapeutika beizutragen.

## 5 Zusammenfassung

*Aspergillus fumigatus* ist der häufigste Erreger der invasiven Aspergillose, welche vornehmlich immunsupprimierte Patientinnen und Patienten betrifft und mit einer hohen Letalität einhergeht. Zur Entwicklung neuer diagnostischer sowie therapeutischer Ansätze ist ein besseres Verständnis der Interaktion von *A. fumigatus* mit dem humanen Immunsystem zwingend erforderlich. Zur Erforschung dieser Interaktion werden häufig Mausmodelle herangezogen, welche aufgrund der unterschiedlichen Biologie des Wirts jedoch nicht direkt übertragbar sind. Ziel dieser Studie war es, einen funktionellen *in vitro* Vergleich zwischen humanen und murinen Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen in ihrer Interaktion mit *A. fumigatus* Konidien, Keimschläuchen sowie depletiertem Zymosan zu erstellen, um eine bessere Beurteilung und Übertragbarkeit des Mausmodells bei der invasiven Aspergillose zu ermöglichen. Dabei wurden die verschiedenen Zellen des Immunsystems auf standardisierte und reproduzierbare Weise generiert und Stimulationsversuche durchgeführt.

Hierbei zeigten humane und murine Zellen *in vitro* eine unterschiedliche Antwort auf die Stimulation mit *A. fumigatus*: Murine Makrophagen und neutrophile Granulozyten zeigten im Vergleich zu den humanen Zellen eine stärkere primäre Immunantwort mit einer vermehrten ROS-Ausschüttung. Humane DCs hingegen, welche als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem fungieren, zeigten nach Stimulation mit *A. fumigatus* eine vermehrte Oberflächenexpression von Maturationsmarkern sowie eine höhere Phagozytoserate als die murinen DCs. Weiterhin konnte eine inverse Dectin-1-Expression auf humanen und murinen DCs nach Stimulation mit *A. fumigatus* nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass es für alle untersuchten Zelltypen Unterschiede zwischen humanen und murinen Zellen in der basalen und der Zytokinausschüttung nach Stimulation mit *A. fumigatus* gab.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit zeigt das murine Immunsystem eine stärkere angeborene Immunantwort mit vermehrter ROS-Ausschüttung, jedoch auch eine anti-inflammatorische Zytokinantwort, um möglicherweise eine überschießende Inflammation zu verhindern. Dies könnte durch die stärkere Exposition der Maus gegenüber *A. fumigatus* durch den bodennahen Lebensraum sowie ihrer kurzen Lebensdauer bedingt sein. Im humanen System kommt hingegen der Aktivierung des adaptiven Immunsystems über die DCs eine übergeordnete Rolle zu. So zeigen beide Spezies distinkte Unterschiede in ihrer *in vitro* Immunantwort gegenüber *A. fumigatus*, welche bei der Übertragung von experimentellen Daten von der Maus auf den Menschen beachtet werden sollten.

## 6 Literaturverzeichnis Literaturverzeichnis

Abbas, A. K. L., A.H.; Pillai S. (2015). Cellular and Molecular Immunology, Saunders Elsevier.

Abdelazeem, M., A. Gamea, H. Mubarak and N. Elzawawy (2015). "Epidemiology, causative agents, and risk factors affecting human otomycosis infections." Turk J Med Sci **45**(4): 820-826.

Ahamefule, C. S., Q. Qin, A. S. Odiba, S. Li, A. N. Moneke, J. C. Ogbonna, C. Jin, B. Wang and W. Fang (2020). "Caenorhabditis elegans-Based Aspergillus fumigatus Infection Model for Evaluating Pathogenicity and Drug Efficacy." Front Cell Infect Microbiol **10**: 320.

Alflen, A., P. Aranda Lopez, A. K. Hartmann, J. Maxeiner, M. Bosmann, A. Sharma, J. Platten, F. Ries, H. Beckert, W. Ruf and M. P. Radsak (2020). "Neutrophil extracellular traps impair fungal clearance in a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis." Immunobiology **225**(1): 151867.

Arnhold, J. and J. Flemmig (2010). "Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity." Arch Biochem Biophys **500**(1): 92-106.

Arvanitis, M., J. Glavis-Bloom and E. Mylonakis (2013). "Invertebrate models of fungal infection." Biochim Biophys Acta **1832**(9): 1378-1383.

Balloy, V. and M. Chignard (2009). "The innate immune response to Aspergillus fumigatus." Microbes Infect **11**(12): 919-927.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.

Banville, N., N. Browne and K. Kavanagh (2012). "Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of Galleria mellonella larvae to infection." Virulence **3**(6): 497-503.

Bazaz, R. and D. W. Denning (2018). "Subacute Invasive Aspergillosis Associated With Sorafenib Therapy for Hepatocellular Carcinoma." Clin Infect Dis **67**(1): 156-157.

Ben-Ami, R., R. E. Lewis and D. P. Kontoyiannis (2010). "Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection." Br J Haematol **150**(4): 406-417.

Bender, A., M. Sapp, G. Schuler, R. M. Steinman and N. Bhardwaj (1996). "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood." J Immunol Methods **196**(2): 121-135.

Bergin, D., L. Murphy, J. Keenan, M. Clynes and K. Kavanagh (2006). "Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides." Microbes Infect **8**(8): 2105-2112.

Bhabhra, R. and D. S. Askew (2005). "Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus." Med Mycol **43 Suppl 1**: S87-93.

Bouzani, M., M. Ok, A. McCormick, F. Ebel, O. Kurzai, C. O. Morton, H. Einsele and J. Loeffler (2011). "Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release." J Immunol **187**(3): 1369-1376.

Bozza, S., R. Gaziano, A. Spreca, A. Bacci, C. Montagnoli, P. di Francesco and L. Romani (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." J Immunol **168**(3): 1362-1371.

Braedel, S., M. Radsak, H. Einsele, J. P. Latge, A. Michan, J. Loeffler, Z. Haddad, U. Grigoleit, H. Schild and H. Hebart (2004). "*Aspergillus fumigatus*

- antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4." Br J Haematol **125**(3): 392-399.
- Brakhage, A. A., S. Bruns, A. Thywissen, P. F. Zipfel and J. Behnsen (2010). "Interaction of phagocytes with filamentous fungi." Curr Opin Microbiol **13**(4): 409-415.
- Brown, G. D. (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nat Rev Immunol **6**(1): 33-43.
- Brown, G. D., J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall and S. Gordon (2003). "Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans." J Exp Med **197**(9): 1119-1124.
- Busca, A. and L. Pagano (2018). "Prophylaxis for aspergillosis in patients with haematological malignancies: pros and cons." Expert Rev Anti Infect Ther **16**(7): 531-542.
- Casaulta, C., M. H. Schoni, M. Weichel, R. Cramer, M. Jutel, I. Daigle, M. Akdis, K. Blaser and C. A. Akdis (2003). "IL-10 controls Aspergillus fumigatus- and Pseudomonas aeruginosa-specific T-cell response in cystic fibrosis." Pediatr Res **53**(2): 313-319.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters and A. Lanzavecchia (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." Nature **388**(6644): 782-787.
- Cenci, E., A. Mencacci, A. Casagrande, P. Mosci, F. Bistoni and L. Romani (2001). "Impaired antifungal effector activity but not inflammatory cell recruitment in interleukin-6-deficient mice with invasive pulmonary aspergillosis." J Infect Dis **184**(5): 610-617.

Chai, L., M. G. Netea, S. Teerenstra, A. Earnest, A. G. Vonk, H. T. Schlamm, R. Herbrecht, P. F. Troke and B. J. Kullberg (2010). "Early proinflammatory cytokines and C-reactive protein trends as predictors of outcome in invasive Aspergillosis." J Infect Dis **202**(9): 1454-1462.

Chai, L. Y., A. G. Vonk, B. J. Kullberg, P. E. Verweij, I. Verschueren, J. W. van der Meer, L. A. Joosten, J. P. Latge and M. G. Netea (2011). "Aspergillus fumigatus cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses." Microbes Infect **13**(2): 151-159.

Chignard, M., V. Balloy, J. M. Sallenave and M. Si-Tahar (2007). "Role of Toll-like receptors in lung innate defense against invasive aspergillosis. Distinct impact in immunocompetent and immunocompromized hosts." Clin Immunol **124**(3): 238-243.

Clemons, K. V., G. Grunig, R. A. Sobel, L. F. Mirels, D. M. Rennick and D. A. Stevens (2000). "Role of IL-10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10 gene knockout mice to lethal systemic aspergillosis." Clin Exp Immunol **122**(2): 186-191.

Consortium, I. S. G. (2008). "The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*." Insect Biochem Mol Biol **38**(12): 1036-1045.

Denning, D. W. (1998). "Invasive aspergillosis." Clin Infect Dis **26**(4): 781-803; quiz 804-785.

Desoubeaux, G. and C. Cray (2017). "Rodent Models of Invasive Aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus*: Still a Long Path toward Standardization." Front Microbiol **8**: 841.

Desoubeaux, G. and C. Cray (2018). "Animal Models of Aspergillosis." Comp Med **68**(2): 109-123.

Doeing, D. C., J. L. Borowicz and E. T. Crockett (2003). "Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods." BMC Clin Pathol **3**(1): 3.

Feldman, M. B., J. M. Vyas and M. K. Mansour (2019). "It takes a village: Phagocytes play a central role in fungal immunity." Semin Cell Dev Biol **89**: 16-23.

Feldmesser, M. (2006). "Role of neutrophils in invasive aspergillosis." Infect Immun **74**(12): 6514-6516.

Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, B. J. Kullberg, M. G. Netea and G. J. Adema (2008). "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." Cell Microbiol **10**(10): 2058-2066.

Fidan, I., E. Yesilyurt, A. Kalkanci, S. O. Aslan, N. Sahin, M. C. Ogan and M. Dizbay (2014). "Immunomodulatory effects of voriconazole and caspofungin on human peripheral blood mononuclear cells stimulated by *Candida albicans* and *Candida krusei*." Am J Med Sci **348**(3): 219-223.

Firacative, C., A. Khan, S. Duan, K. Ferreira-Paim, D. Leemon and W. Meyer (2020). "Rearing and Maintenance of *Galleria mellonella* and Its Application to Study Fungal Virulence." J Fungi (Basel) **6**(3).

Forster, R., A. C. Davalos-Miszlitz and A. Rot (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol **8**(5): 362-371.

Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.

- Gersuk, G. M., D. M. Underhill, L. Zhu and K. A. Marr (2006). "Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states." J Immunol **176**(6): 3717-3724.
- Ghez, D., A. Calleja, C. Protin, M. Baron, M. P. Ledoux, G. Damaj, M. Dupont, B. Dreyfus, E. Ferrant, C. Herbaux, K. Laribi, R. Le Calloch, M. Malphettes, F. Paul, L. Souchet, M. Truchan-Graczyk, K. Delavigne, C. Dartigeas, L. Ysebaert and C. L. L. g. French Innovative Leukemia Organization (2018). "Early-onset invasive aspergillosis and other fungal infections in patients treated with ibrutinib." Blood **131**(17): 1955-1959.
- Götz, P., V. Matha and A. Vilcinskas (1997). "Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*." J Insect Physiol **43**(12): 1149-1159.
- Greenblatt, M. B., V. Vrbanac, T. Tivey, K. Tsang, A. M. Tager and A. O. Aliprantis (2012). "Graft versus host disease in the bone marrow, liver and thymus humanized mouse model." PLoS One **7**(9): e44664.
- Grimm, M. J., A. C. D'Auria and B. H. Segal (2014). "Assessing anti-fungal activity of isolated alveolar macrophages by confocal microscopy." J Vis Exp(89).
- Hamamoto, H., K. Kurokawa, C. Kaito, K. Kamura, I. Manitra Razanajatovo, H. Kusuhara, T. Santa and K. Sekimizu (2004). "Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms." Antimicrob Agents Chemother **48**(3): 774-779.
- Hanaoka, N., Y. Takano, K. Shibuya, H. Fugo, Y. Uehara and M. Niimi (2008). "Identification of the putative protein phosphatase gene PTC1 as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection." Eukaryot Cell **7**(10): 1640-1648.

Herbrecht, R., A. Moghaddam, L. Mahmal, S. Natarajan-Ame, L. M. Fornecker and V. Letscher-Bru (2005). "Invasive aspergillosis in the hematologic and immunologic patient: new findings and key questions in leukemia." Med Mycol **43 Suppl 1**: S239-242.

Hill, J. A., D. Li, K. A. Hay, M. L. Green, S. Cherian, X. Chen, S. R. Riddell, D. G. Maloney, M. Boeckh and C. J. Turtle (2018). "Infectious complications of CD19-targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy." Blood **131**(1): 121-130.

Hohl, T. M. (2009). "Stage-specific innate immune recognition of *Aspergillus fumigatus* and modulation by echinocandin drugs." Med Mycol **47 Suppl 1**: S192-198.

Humrich, J. Y., J. H. Humrich, M. Averbeck, P. Thumann, C. Termeer, E. Kampgen, G. Schuler and L. Jenne (2006). "Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration." Immunology **117**(2): 238-247.

Hunig, T. (2016). "The rise and fall of the CD28 superagonist TGN1412 and its return as TAB08: a personal account." FEBS J **283**(18): 3325-3334.

Hunt, P. R. (2017). "The *C. elegans* model in toxicity testing." J Appl Toxicol **37**(1): 50-59.

Janeway, C. A., Jr, Travers, P., Walport, M. (2008). Immunobiology, Garland Science.

Jemel, S., J. Guillot, K. Kallel, F. Botterel and E. Dannaoui (2020). "Galleria mellonella for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review." Microorganisms **8**(3).

- Jenks, J. D. and M. Hoenigl (2018). "Treatment of Aspergillosis." J Fungi (Basel) **4**(3).
- Kaito, C., N. Akimitsu, H. Watanabe and K. Sekimizu (2002). "Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans." Microb Pathog **32**(4): 183-190.
- Kunhamed, R. (2012). "Management of Climatic Factors for Successful Silkworm (*Bombyx mori* L.) Crop and Higher Silk Production: A Review." Psyche **2012**.
- Kwadha, C. A., G. O. Ong'amo, P. N. Ndegwa, S. K. Raina and A. T. Fombong (2017). "The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*." Insects **8**(2).
- Lange, A., S. Beier, D. H. Huson, R. Parusel, F. Iglauer and J. S. Frick (2018). "Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth)." Genome Announc **6**(2).
- Latgé, J.-P. and G. Chamilos (2019). "Aspergillosis in 2019." Clinical Microbiology Reviews **33**(1): e00140-00118.
- Latge, J. P. (1999). "Aspergillus fumigatus and aspergillosis." Clin Microbiol Rev **12**(2): 310-350.
- Latge, J. P. (2001). "The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*." Trends Microbiol **9**(8): 382-389.
- Latge, J. P. and G. Chamilos (2019). "Aspergillus fumigatus and Aspergillosis in 2019." Clin Microbiol Rev **33**(1).
- Lawrence, T. (2009). "The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(6): a001651.

Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol **23**(9): 445-449.

Madan, S., D. Abbas, R. L. Jowett and K. Mounce (2001). "Salmonella enteritidis infection in total knee replacement." Rheumatology (Oxford) **40**(1): 112-113.

Madan, T., U. Kishore, M. Singh, P. Strong, E. M. Hussain, K. B. Reid and P. U. Sarma (2001). "Protective role of lung surfactant protein D in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis." Infect Immun **69**(4): 2728-2731.

Mambula, S. S., K. Sau, P. Henneke, D. T. Golenbock and S. M. Levitz (2002). "Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*." J Biol Chem **277**(42): 39320-39326.

Margalit, A. and K. Kavanagh (2015). "The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface." FEMS Microbiol Rev **39**(5): 670-687.

Matsumoto, Y., S. Miyazaki, D. H. Fukunaga, K. Shimizu, S. Kawamoto and K. Sekimizu (2012). "Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*." J Appl Microbiol **112**(1): 138-146.

McCormick, A., J. Loeffler and F. Ebel (2010). "*Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen." Cell Microbiol **12**(11): 1535-1543.

McCullough, A. K. and R. S. Lloyd (2019). "Mechanisms underlying aflatoxin-associated mutagenesis - Implications in carcinogenesis." DNA Repair (Amst) **77**: 76-86.

- Mehrad, B., M. Wiekowski, B. E. Morrison, S. C. Chen, E. C. Coronel, D. J. Manfra and S. A. Lira (2002). "Transient lung-specific expression of the chemokine KC improves outcome in invasive aspergillosis." Am J Respir Crit Care Med **166**(9): 1263-1268.
- Mellinghoff, S. C., J. Panse, N. Alakel, G. Behre, D. Buchheidt, M. Christopeit, J. Hasenkamp, M. Kiehl, M. Koldehoff, S. W. Krause, N. Lehnert, M. von Lilienfeld-Toal, A. Y. Lohnert, G. Maschmeyer, D. Teschner, A. J. Ullmann, O. Penack, M. Ruhnke, K. Mayer, H. Ostermann, H. H. Wolf and O. A. Cornely (2018). "Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: 2017 update of the recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Haematology and Medical Oncology (DGHO)." Ann Hematol **97**(2): 197-207.
- Meng, X., F. Zhu and K. Chen (2017). "Silkworm: A Promising Model Organism in Life Science." J Insect Sci **17**(5).
- Mesa-Arango, A. C., A. Forastiero, L. Bernal-Martinez, M. Cuenca-Estrella, E. Mellado and O. Zaragoza (2013). "The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast." Med Mycol **51**(5): 461-472.
- Mestas, J. and C. C. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." J Immunol **172**(5): 2731-2738.
- Mezger, M., S. Kneitz, I. Wozniok, O. Kurzai, H. Einsele and J. Loeffler (2008). "Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes." J Infect Dis **197**(6): 924-931.
- Monaco, A. P. (2003). "Chimerism in organ transplantation: conflicting experiments and clinical observations." Transplantation **75**(9 Suppl): 13S-16S.

Moura, S., L. Cerqueira and A. Almeida (2018). "Invasive pulmonary aspergillosis: current diagnostic methodologies and a new molecular approach." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **37**(8): 1393-1403.

Mowlds, P., A. Barron and K. Kavanagh (2008). "Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*." Microbes Infect **10**(6): 628-634.

Nakamura, I., R. Kanasaki, K. Yoshikawa, S. Furukawa, A. Fujie, H. Hamamoto and K. Sekimizu (2017). "Discovery of a new antifungal agent ASP2397 using a silkworm model of *Aspergillus fumigatus* infection." J Antibiot (Tokyo) **70**(1): 41-44.

Nerger, B. A. and C. M. Nelson (2019). "3D culture models for studying branching morphogenesis in the mammary gland and mammalian lung." Biomaterials **198**: 135-145.

Netea, M. G., A. Warris, J. W. Van der Meer, M. J. Fenton, T. J. Verver-Janssen, L. E. Jacobs, T. Andresen, P. E. Verweij and B. J. Kullberg (2003). "Aspergillus fumigatus evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction." J Infect Dis **188**(2): 320-326.

O'Gorman, C. M., H. Fuller and P. S. Dyer (2009). "Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*." Nature **457**(7228): 471-474.

Oehler, M. K. and R. Bicknell (2000). "The promise of anti-angiogenic cancer therapy." Br J Cancer **82**(4): 749-752.

Okoli, I. and E. Bignell (2015). "Caenorhabditis elegans-Aspergillus fumigatus (Nematode-mould) Model for Study of Fungal Pathogenesis." British Microbiology Research Journal **7**: 93-99.

Pabst, R. and I. Gehrke (1990). "Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans?" Am J Respir Cell Mol Biol **3**(2): 131-135.

Panitch, H. S., R. L. Hirsch, A. S. Haley and K. P. Johnson (1987). "Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon." Lancet **1**(8538): 893-895.

Park, H. H., Y. Jung and S. V. Lee (2017). "Survival assays using *Caenorhabditis elegans*." Mol Cells **40**(2): 90-99.

Park, S. J. and B. Mehrad (2009). "Innate immunity to *Aspergillus* species." Clin Microbiol Rev **22**(4): 535-551.

Perlin, D. S., R. Rautemaa-Richardson and A. Alastruey-Izquierdo (2017). "The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management." Lancet Infect Dis **17**(12): e383-e392.

Philippe, B., O. Ibrahim-Granet, M. C. Prevost, M. A. Gougerot-Pocidalo, M. Sanchez Perez, A. Van der Meer and J. P. Latge (2003). "Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates." Infect Immun **71**(6): 3034-3042.

Pukkila-Worley, R. and F. M. Ausubel (2012). "Immune defense mechanisms in the *Caenorhabditis elegans* intestinal epithelium." Curr Opin Immunol **24**(1): 3-9.

Pukkila-Worley, R., R. Feinbaum, N. V. Kirienko, J. Larkins-Ford, A. L. Conery and F. M. Ausubel (2012). "Stimulation of host immune defenses by a small molecule protects *C. elegans* from bacterial infection." PLoS Genet **8**(6): e1002733.

Ravindran, M., M. A. Khan and N. Palaniyar (2019). "Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology." *Biomolecules* **9**(8).

Reid, D. M., N. A. Gow and G. D. Brown (2009). "Pattern recognition: recent insights from Dectin-1." *Curr Opin Immunol* **21**(1): 30-37.

Renwick, J., E. P. Reeves, F. B. Wientjes and K. Kavanagh (2007). "Translocation of proteins homologous to human neutrophil p47phox and p67phox to the cell membrane in activated hemocytes of *Galleria mellonella*." *Dev Comp Immunol* **31**(4): 347-359.

Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold and P. Ricciardi-Castagnoli (1998). "Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways." *J Exp Med* **188**(11): 2175-2180.

Reynolds, G. and M. Haniffa (2015). "Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species?" *Front Immunol* **6**: 330.

Romoli, O., A. Saviane, A. Bozzato, P. D'Antona, G. Tettamanti, A. Squartini, S. Cappellozza and F. Sandrelli (2017). "Differential sensitivity to infections and antimicrobial peptide-mediated immune response in four silkworm strains with different geographical origin." *Sci Rep* **7**(1): 1048.

Ronaldson-Bouchard, K., S. P. Ma, K. Yeager, T. Chen, L. Song, D. Sirabella, K. Morikawa, D. Teles, M. Yazawa and G. Vunjak-Novakovic (2018). "Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells." *Nature* **556**(7700): 239-243.

Ronchetti, S., E. Ricci, G. Migliorati, M. Gentili and C. Riccardi (2018). "How Glucocorticoids Affect the Neutrophil Life." *Int J Mol Sci* **19**(12).

Rongvaux, A., T. Willinger, J. Martinek, T. Strowig, S. V. Gearty, L. L. Teichmann, Y. Saito, F. Marches, S. Halene, A. K. Palucka, M. G. Manz and R.

A. Flavell (2014). "Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model." Nat Biotechnol **32**(4): 364-372.

Sato, M., H. Sano, D. Iwaki, K. Kudo, M. Konishi, H. Takahashi, T. Takahashi, H. Imaizumi, Y. Asai and Y. Kuroki (2003). "Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A." J Immunol **171**(1): 417-425.

Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni and M. A. Cassatella (2000). "The neutrophil as a cellular source of chemokines." Immunol Rev **177**: 195-203.

Schmidt, S., L. Tramsen, M. Hanisch, J. P. Latge, S. Huenecke, U. Koehl and T. Lehrnbecher (2011). "Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia." J Infect Dis **203**(3): 430-435.

Sekar, Kalpana, Ganga, G. John, K. N and R. Krishnamoorthy (2016). "Studies on the Growth Parameters (Length & Weight) and Cocoon Production in *Bombyx mori*, Fed on Mulberry Leaves Fortified with a Putative Probiotic, *Lactobacillus casei*." International Journal of Current Research **8**: 29127-29132.

Seyedmousavi, S., M. J. Davis, J. A. Sugui, T. Pinkhasov, S. Moyer, A. M. Salazar, Y. C. Chang and K. J. Kwon-Chung (2018). "Exogenous Stimulation of Type I Interferon Protects Mice with Chronic Granulomatous Disease from Aspergillosis through Early Recruitment of Host-Protective Neutrophils into the Lung." mBio **9**(2).

Shapouri-Moghaddam, A., S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S. A. Esmaeili, F. Mardani, B. Seifi, A. Mohammadi, J. T. Afshari and A. Sahebkar (2018). "Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease." J Cell Physiol **233**(9): 6425-6440.

Shepherd, F. A. and S. S. Sridhar (2003). "Angiogenesis inhibitors under study for the treatment of lung cancer." Lung Cancer **41 Suppl 1**: S63-72.

Shevchenko, M. A., A. O. Bogorodskiy, N. I. Troyanova, E. A. Servuli, E. L. Bolkhovitina, G. Buldt, C. Fahlke, V. I. Gordeliy, T. Gensch, V. I. Borshchevskiy and A. M. Sapozhnikov (2018). "Aspergillus fumigatus Infection-Induced Neutrophil Recruitment and Location in the Conducting Airway of Immunocompetent, Neutropenic, and Immunosuppressed Mice." J Immunol Res **2018**: 5379085.

Shlezinger, N., H. Irmer, S. Dhingra, S. R. Beattie, R. A. Cramer, G. H. Braus, A. Sharon and T. M. Hohl (2017). "Sterilizing immunity in the lung relies on targeting fungal apoptosis-like programmed cell death." Science **357**(6355): 1037-1041.

Shultz, L. D., M. A. Brehm, J. V. Garcia-Martinez and D. L. Greiner (2012). "Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges." Nat Rev Immunol **12**(11): 786-798.

Shultz, L. D., F. Ishikawa and D. L. Greiner (2007). "Humanized mice in translational biomedical research." Nat Rev Immunol **7**(2): 118-130.

Slater, J. L., L. Gregson, D. W. Denning and P. A. Warn (2011). "Pathogenicity of Aspergillus fumigatus mutants assessed in Galleria mellonella matches that in mice." Med Mycol **49 Suppl 1**: S107-113.

Steinman, R. M. and H. Hemmi (2006). "Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity." Curr Top Microbiol Immunol **311**: 17-58.

Sykes, M. (2001). "Mixed chimerism and transplant tolerance." Immunity **14**(4): 417-424.

Szigeti, Z. M., L. Talas, Z. Palicz, P. Szentesi, Z. Hargitai, L. Csernoch, J. Balla, I. Pocsi, G. Banfalvi and G. Szeman-Nagy (2018). "Murine model to follow hyphal development in invasive pulmonary aspergillosis." Appl Microbiol Biotechnol **102**(6): 2817-2825.

Taccone, F. S., A. M. Van den Abeele, P. Bulpa, B. Misset, W. Meersseman, T. Cardoso, J. A. Paiva, M. Blasco-Navalpotro, E. De Laere, G. Dimopoulos, J. Rello, D. Vogelaers, S. I. Blot and I. C. U. S. I. Asp (2015). "Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes." Crit Care **19**: 7.

Tan, S. Y. and M. A. Krasnow (2016). "Developmental origin of lung macrophage diversity." Development **143**(8): 1318-1327.

Taylor, P. R., G. D. Brown, D. M. Reid, J. A. Willment, L. Martinez-Pomares, S. Gordon and S. Y. Wong (2002). "The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages." J Immunol **169**(7): 3876-3882.

Taylor, P. R., S. V. Tsoni, J. A. Willment, K. M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon and G. D. Brown (2007). "Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection." Nat Immunol **8**(1): 31-38.

Tian, H., Y. Lyu, Y. G. Yang and Z. Hu (2020). "Humanized Rodent Models for Cancer Research." Front Oncol **10**: 1696.

Uppaluri, S. and C. P. Brangwynne (2015). "A size threshold governs *Caenorhabditis elegans* developmental progression." Proc Biol Sci **282**(1813): 20151283.

Valsecchi, I., V. Dupres, E. Stephen-Victor, J. I. Guijarro, J. Gibbons, R. Beau, J. Bayry, J. Y. Coppee, F. Lafont, J. P. Latge and A. Beauvais (2017). "Role of Hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*." J Fungi (Basel) **4**(1).

van Riet, S., D. K. Ninaber, H. M. M. Mikkers, T. D. Tetley, C. R. Jost, A. A. Mulder, T. Pasman, D. Baptista, A. A. Poot, R. Truckenmuller, C. L. Mummery, C. Freund, R. J. Rottier and P. S. Hiemstra (2020). "In vitro modelling of alveolar repair at the air-liquid interface using alveolar epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells." Sci Rep **10**(1): 5499.

von Lilienfeld-Toal, M., J. Wagener, H. Einsele, O. A. Cornely and O. Kurzai (2019). "Invasive Fungal Infection." Dtsch Arztebl Int **116**(16): 271-278.

Vu, K. and A. Gelli (2010). "Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*." Med Mycol **48**(2): 255-262.

Wang, Y., Z. Li, J. Xu, B. Zeng, L. Ling, L. You, Y. Chen, Y. Huang and A. Tan (2013). "The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*." Cell Res **23**(12): 1414-1416.

Werner, J. L., A. E. Metz, D. Horn, T. R. Schoeb, M. M. Hewitt, L. M. Schwiebert, I. Faro-Trindade, G. D. Brown and C. Steele (2009). "Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*." J Immunol **182**(8): 4938-4946.

Willinger, T., A. Rongvaux, H. Takizawa, G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, W. Auerbach, E. E. Eynon, S. Stevens, M. G. Manz and R. A. Flavell (2011). "Human IL-3/GM-CSF knock-in mice support human alveolar macrophage development and human immune responses in the lung." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(6): 2390-2395.

Wong, A. Y. W., J. Fric and T. Zelante (2019). "Learning to control tissue damage while fighting *Aspergillus*." Med Mycol **57**(Supplement\_2): S189-S195.

Wood, K. J. (2003). "Passenger leukocytes and microchimerism: what role in tolerance induction?" Transplantation **75**(9 Suppl): 17S-20S.

Xia, Q., Y. Guo, Z. Zhang, D. Li, Z. Xuan, Z. Li, F. Dai, Y. Li, D. Cheng, R. Li, T. Cheng, T. Jiang, C. Becquet, X. Xu, C. Liu, X. Zha, W. Fan, Y. Lin, Y. Shen, L. Jiang, J. Jensen, I. Hellmann, S. Tang, P. Zhao, H. Xu, C. Yu, G. Zhang, J. Li, J. Cao, S. Liu, N. He, Y. Zhou, H. Liu, J. Zhao, C. Ye, Z. Du, G. Pan, A. Zhao, H. Shao, W. Zeng, P. Wu, C. Li, M. Pan, J. Li, X. Yin, D. Li, J. Wang, H. Zheng, W. Wang, X. Zhang, S. Li, H. Yang, C. Lu, R. Nielsen, Z. Zhou, J. Wang, Z. Xiang and J. Wang (2009). "Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*)." Science **326**(5951): 433-436.

Xia, Q., Z. Zhou, C. Lu, D. Cheng, F. Dai, B. Li, P. Zhao, X. Zha, T. Cheng, C. Chai, G. Pan, J. Xu, C. Liu, Y. Lin, J. Qian, Y. Hou, Z. Wu, G. Li, M. Pan, C. Li, Y. Shen, X. Lan, L. Yuan, T. Li, H. Xu, G. Yang, Y. Wan, Y. Zhu, M. Yu, W. Shen, D. Wu, Z. Xiang, J. Yu, J. Wang, R. Li, J. Shi, H. Li, G. Li, J. Su, X. Wang, G. Li, Z. Zhang, Q. Wu, J. Li, Q. Zhang, N. Wei, J. Xu, H. Sun, L. Dong, D. Liu, S. Zhao, X. Zhao, Q. Meng, F. Lan, X. Huang, Y. Li, L. Fang, C. Li, D. Li, Y. Sun, Z. Zhang, Z. Yang, Y. Huang, Y. Xi, Q. Qi, D. He, H. Huang, X. Zhang, Z. Wang, W. Li, Y. Cao, Y. Yu, H. Yu, J. Li, J. Ye, H. Chen, Y. Zhou, B. Liu, J. Wang, J. Ye, H. Ji, S. Li, P. Ni, J. Zhang, Y. Zhang, H. Zheng, B. Mao, W. Wang, C. Ye, S. Li, J. Wang, G. K. Wong, H. Yang and G. Biology Analysis (2004). "A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*)." Science **306**(5703): 1937-1940.

Yanagihara, S., E. Komura, J. Nagafune, H. Watarai and Y. Yamaguchi (1998). "EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation." J Immunol **161**(6): 3096-3102.

Yoshihara, S., Y. Li, J. Xia, N. Danzl, M. Sykes and Y. G. Yang (2019). "Posttransplant Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Driven by Myeloid Cytokines and Vicious Cycles of T-Cell and Macrophage Activation in Humanized Mice." Front Immunol **10**: 186.

Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1996). "CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2588-2592.

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

ABPA	Allergische bronchopulmonalen Aspergillose
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BMDC	Bone marrow derived dendritic cell
CCR	C-C chemokine receptor
CD	Cluster of differentiation
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
con	Konidien
CT	Computertomographie
DC	Dendritische Zelle
DCF	Dichlorfluorescein
dZym	Depletiertes Zymosan
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
FSC	Forward scatter
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
Gro	Growth-related gene product
gt	Germ tubes
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HLA	Human leucocyte antigen
IA	Invasive Aspergillose
IF $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
IP	Interferon- $\gamma$ -inducible protein
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Monocyte chemoattractant protein

---

M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
MOI	Multiplicity of infection
moDC	Monocyte derived dendritic cell
MIP	Macrophage inflammatory protein
NET	Neutrophil extracellular trap
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NK-Zelle	Natural-Killer-Zelle
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PMN	Polymorphonuclear neutrophil
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Pattern-recognition receptor
r	rekombinant
ROS	Radical oxygen species
RT	Raumtemperatur
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SSC	Sideward scatter
Th	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungszyklus von <i>A. fumigatus</i> .....	2
Abbildung 2: Aspergillus-assoziierte Erkrankungen in Abhängigkeit der Immunantwort des Wirtsorganismus .....	4
Abbildung 3: Pathogenese der invasiven Aspergillose.....	6
Abbildung 4: Vergleichende Röntgen-Thorax- und CT-Thorax-Aufnahmen einer Patientin mit invasiver Pilzinfektion .....	9
Abbildung 5: Versuchsaufbau.....	16
Abbildung 6: Durchflusszytometrische Bestimmung der Maturationsmarker humaner moDCs.....	30
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Bestimmung der Maturationsmarker muriner BMDCs .....	31
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Bestimmung der Dectin-1-Expression auf humanen moDCs und murinen BMDCs .....	33
Abbildung 9: ROS-Ausschüttung humaner und muriner Makrophagen nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> .....	35
Abbildung 10: ROS-Ausschüttung humaner und muriner PMNs nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> .....	36
Abbildung 11: Zytokinausschüttung humaner und muriner Makrophagen nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> .....	38
Abbildung 12: Zytokinausschüttung humaner und muriner PMNs nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> .....	40
Abbildung 13: Zytokinausschüttung humaner moDCs und muriner BMDCs nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> .....	42
Abbildung 14: Exemplarische <i>Live-cell Imaging</i> Aufnahmen von humanen moDCs und murinen BMDCs .....	44
Abbildung 15: Kontakte von humanen moDCs und murinen BMDCs mit <i>A. fumigatus</i> .....	44
Abbildung 16: Phagozytoserate von humanen moDCs und murinen BMDCs von <i>A. fumigatus</i> .....	45
Abbildung 17: Expression von Maturationsmarkern auf humanen moDCs und murinen BMDCs nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> .....	47
Abbildung 18: Dectin-1-Oberflächenexpression auf humanen moDCs und murinen BMDCs nach Stimulation mit <i>A. fumigatus</i> .....	49

---

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte .....	18
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	18
Tabelle 3: Medien, Reagenzien und Zytokine .....	20
Tabelle 4: Kits .....	20
Tabelle 5: Antikörper und Beads .....	20
Tabelle 6: Software .....	21

#### **IV Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Löffler für die sehr gute Betreuung und Organisation der Promotionsarbeit sowie die Möglichkeit in seinem Labor tätig zu sein.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Hermann Einsele, dass ich an seiner Klinik meine Doktorarbeit anfertigen konnte.

Herzlich danken möchte ich dem gesamten Team der Arbeitsgruppe von Prof. Löffler für die Unterstützung bei den Experimenten sowie die vielen schönen Momenten im Labor. Mein besonderer Dank gilt Dr. Jasmin Lothar für die ausgezeichnete Betreuung, stetige Motivation und Unterstützung im Labor. Vielen Dank auch Dr. Sebastian Wurster für die Unterstützung bei den Experimenten sowie Dr. Jan Springer für das Korrekturlesen der Dissertation.

Ich danke Prof. Dr. Lutz und seiner Arbeitsgruppe für den wissenschaftlichen Austausch sowie die Anzucht und Bereitstellung von murinen dendritischen Zellen und Makrophagen.

Prof. Dr. Dr. Beilhack und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung der murinen Neutrophilen Granulozyten.

Ich danke Prof. Dr. Eyrich für die fachliche Unterstützung und Bereitstellung von Laborarbeitsplätzen.

Frau Dr. Hünninger möchte ich für die Durchführung der Multiplex-ELISA-Analyse danken.

Vielen Dank an meine Familie und Freunde für die unermüdliche Unterstützung während des Studiums sowie der Promotion.

## V Eigene Veröffentlichungen

Hellmann AM, Lothar J, Wurster S, Lutz MB, Schmitt AL, Morton CO, Eyrich M, Czakai K, Einsele H, Loeffler J. (2017) "Human and murine innate immune cell populations display common and distinct response patterns during their *in vitro* interaction with the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*." Front Immunol. 6;8:1716. doi: 10.3389/fimmu.2017.01716.

Decker D, Wurster S, Lazariotou M, Hellmann AM, Einsele H, Ullmann AJ, Löffler J. (2018) "Analysis of the *in vitro* activity of human neutrophils against *Aspergillus fumigatus* in presence of antifungal and immunosuppressive agents." Med Mycol. 1;56(4):514-519. doi: 10.1093/mmy/myx069.