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

# Modulation der Immunantwort humaner NK-Zellen nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen von *Aspergillus fumigatus*

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

> vorgelegt von Anne Englert aus Schweinfurt

Würzburg, April 2019

Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler		
Korreferent:	Prof. Dr. med. Matthias Eyrich		
Dekan:	Prof. Dr. med. Matthias Frosch		

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung		itung		1
	1.1	NK-Z	ellen innerhalb des Immunsystems	1
		1.1.1	Überblick über das angeborene und erworbene Immunsyster	n 1
		1.1.2	Charakterisierung von NK-Zellen	2
		1.1.3	Zytokine als Effektormoleküle	5
	1.2	Asper	gillus fumigatus	10
		1.2.1	Biologie und Lebenszyklus	10
		1.2.2	Angeborene Immunabwehr gegen A. fumigatus	11
		1.2.3	A. fumigatus als Krankheitserreger	14
	1.3	Intera	ktion von NK-Zellen mit A. fumigatus	16
		1.3.1	Rolle von NK-Zellen und Effektormechanismen bei der	
			Immunantwort gegen A. fumigatus	16
		1.3.2	Klinische Bedeutung bei Immunsuppression und invasiver	
			Aspergillose	18
	1.4	Zielse	etzung der Arbeit	20
2	Mate	rial uno	d Methoden	21
2	Mater 2.1	rial uno Mater	d Methoden	<b>21</b> 21
2	Mater 2.1	rial und Mater 2.1.1	<b>d Methoden</b> ial Geräte	<b> 21</b> 21 21
2	Mater 2.1	rial uno Mater 2.1.1 2.1.2	<b>d Methoden</b> ial Geräte Verbrauchsmaterialien	<b> 21</b> 21 21 22
2	Mater 2.1	rial uno Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen	<b> 21</b> 21 21 22 23
2	Mater 2.1	rial und Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen Reagenzien, Medien und Zytokine	21 21 21 22 23 24
2	Mater 2.1	rial und Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen Reagenzien, Medien und Zytokine Primer	21 21 22 22 23 24 26
2	Mater 2.1	rial und Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen Reagenzien, Medien und Zytokine Primer Antikörper	21 21 22 22 23 24 26 27
2	Mater 2.1	rial und Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen Reagenzien, Medien und Zytokine Primer Antikörper Software	21 21 22 22 23 24 26 27 27
2	<b>Mater</b> 2.1 2.2	rial und Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7 Metho	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen Reagenzien, Medien und Zytokine Primer Antikörper Software	21 21 22 23 24 26 27 27 27 29
2	<b>Mater</b> 2.1 2.2	rial und Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7 Metho 2.2.1	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen Reagenzien, Medien und Zytokine Primer Antikörper Software zellbiologische Methoden	21 21 22 22 23 24 26 27 27 27 29 29
2	<b>Mater</b> 2.1 2.2	rial und Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7 Metho 2.2.1	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen Reagenzien, Medien und Zytokine Primer Antikörper Software Dden Zellbiologische Methoden 2.2.1.1 Kultivierung von <i>A. fumigatus</i>	21 21 21 22 23 23 24 26 27 27 27 29 29 29
2	Mater 2.1 2.2	rial und Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7 Metho 2.2.1	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen Reagenzien, Medien und Zytokine Primer Antikörper Software oden Zellbiologische Methoden 2.2.1.1 Kultivierung von <i>A. fumigatus</i> 2.2.1.2 Isolation von PBMZ	21 21 21 22 23 23 23 24 26 27 27 29 29 29 29 29 30
2	Mater 2.1 2.2	rial und Mater 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7 Metho 2.2.1	d Methoden ial Geräte Verbrauchsmaterialien Zellen Reagenzien, Medien und Zytokine Primer Antikörper Software oden Zellbiologische Methoden 2.2.1.1 Kultivierung von <i>A. fumigatus</i> 2.2.1.2 Isolation von PBMZ 2.2.1.3 Isolation und Stimulation von NK-Zellen	21 21 22 22 23 24 26 27 27 29 29 29 29 29 30 31

		2.2.2	Molekularbiologische Methoden	35
			2.2.2.1 Isolation von RNA	35
			2.2.2.2 Herstellung von cDNA	36
			2.2.2.3 Durchführung quantitativer PCRs	37
			2.2.2.4 Densitometrische Auswertung	39
		2.2.3	ELISA zur proteinbiochemischen Analyse	40
		2.2.4	Statistik	41
3	Erge	bnisse		42
	3.1	Expre	ssion von Oberflächenmarkern auf NK-Zellen nach Stimulation 1	mit
		steige	nden Konzentrationen von A. fumigatus	42
		3.1.1	MOI-abhängige Expression von CD56, CD69 und NKp30	. 42
		3.1.2	MOI 0,5 als geeignete Pilzkonzentration	45
		3.1.3	Reproduzierbarkeit der MOI-abhängigen Expression von CD56	546
	3.2	Screet	ning der Produktion und Freisetzung immunmodulatorischer	
		Zytok	ine durch NK-Zellen nach Stimulation mit A. fumigatus	48
		3.2.1	Analyse der mRNA-Expression mittels qPCR	48
		3.2.2	Densitometrische Analyse der mRNA-Expression	51
		3.2.3	Freisetzung von Zytokinen	52
	3.3	Produ	ktion und Freisetzung ausgewählter Zytokine durch NK-Zellen	
		nach S	Stimulation mit steigenden Konzentrationen von A. fumigatus	54
		3.3.1	MOI-abhängige mRNA-Expression von Zytokinen	54
		3.3.2	MOI-abhängige Zytokinfreisetzung	56
4	Disk	ussion		58
	4.1	Vorbe	reitende Experimente zur Stimulation von NK-Zellen mit	
		steige	nden Konzentrationen von A. fumigatus	. 59
		4.1.1	MOI-abhängige Bindung und Aktivierung von NK-Zellen mitte	els
			CD56, CD69 und NKp30	. 59
		4.1.2	Relevanz hinsichtlich klinischer Studien und Reproduzierbarkei	it
			der MOI-Versuche	61
	4.2	Ausw	ahl relevanter Zytokine bei der Interaktion von NK-Zellen mit A.	
		fumig	atus	62

	4.3	Charakterisierung der Immunantwort durch NK-Zellen bei Stimulation		
		mit steigenden Konzentrationen von A. fumigatus		
		4.3.1 Bedeutung der Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 und MOI-		
		abhängige Produktion und Freisetzung66		
		4.3.2 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ und IL-1 $\alpha$ als bekannte Zytokine bei der		
		Pilzabwehr		
	4.4	Ausblick		
5	Zusar	nmenfassung		
6	Litera	turverzeichnis		
7	Anha	ng90		
	7.1	Abbildungsverzeichnis		
	7.2	Tabellenverzeichnis		
	7.3	Abkürzungen		
	7.4	Publikationen, Kongressbeiträge		
Danl	esonna			

#### Danksagung

Curriculum vitae

## 1 Einleitung

#### 1.1 NK-Zellen innerhalb des Immunsystems

#### 1.1.1 Überblick über das angeborene und erworbene Immunsystem

Das menschliche Immunsystem dient dem Schutz vor pathogenen Organismen und der Erhaltung der körperlichen Integrität. Es setzt sich aus unterschiedlichen Bestandteilen zusammen, welche man entweder der zellvermittelten oder nicht-zellulären/humoralen Abwehr zuteilen kann.

Bei Eindringen eines Krankheitserregers wird dieser zunächst mit dem angeborenen Immunsystem konfrontiert. Als erste Barriere dienen dabei die Haut und Schleimhäute sowie Körperflüssigkeiten mit saurem pH- (lat. potentia hydrogenii-) Wert und antimikrobiellen Peptiden. Werden die initialen Schutzmechanismen überwunden, greift die weitere Abwehr mit Bestandteilen des Komplementsystems, verschiedenen Effektormolekülen wie Zytokinen (siehe 1.1.3) und den angeborenen Immunzellen, welche natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (siehe 1.1.2), Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen (DZ), Mastzellen und die Gruppe der Granulozyten umfassen (Murphy et al., 2018). Die Erkennung der Pathogene geschieht durch sog. Pathogenassoziierte molekulare Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), bakteriellen Zellwand die Bestandteil der sind und bspw. von sog. Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern recognition receptors, PRRs) der Immunzelle gebunden werden (Janeway et al., 2002). So ist eine schnelle, unspezifische Bekämpfung eines Erregers gewährleistet, welche bei Zweitkontakt mit gleicher Intensität erfolgt.

Bei Erregerpersistenz kann durch die Prozessierung und Präsentation von Peptidfragmenten des Pathogens sowie die Sekretion von Effektormolekülen das erworbene/adaptive Immunsystem aktiviert werden. Dieses besteht aus den T- sowie B-Lymphozyten, wobei erstere nochmals in die CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen mit TH1- sowie TH2-Subtyp sowie die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unterteilt werden. CD steht für engl. *cluster of differentiation* und bezeichnet bestimmte Oberflächenmoleküle auf Zellen, die man zu deren Unterscheidung nutzt. Die B-Lymphozyten repräsentieren den humoralen Part des adaptiven Immunsystems und reifen zu den Antikörperproduzierenden Plasmazellen aus. Anders als bei der angeborenen Immunabwehr kommt es hierbei zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gegen bestimmte Antigene des Erregers, wodurch die Immunreaktion bei einer Zweitinfektion deutlich schneller und effektiver erfolgen kann (Murphy *et al.*, 2018).

#### 1.1.2 Charakterisierung von NK-Zellen

1975 beschrieben Kiessling *et al.* im Mausmodel erstmals eine Untergruppe von Lymphozyten, die ohne vorherige Antigensensibilisierung eine spontane Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen zeigte. Aufgrund dieser "natürlichen Zytotoxizität" nannte man die entsprechenden Zellen "natürliche Killerzellen" (NK-Zellen) (Kiessling *et al.*, 1975).

NK-Zellen entwickeln sich postembryonal im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen und machen ca. 10% aller mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) aus (Lodoen *et al.*, 2006). Sie gelten als Hauptvertreter der stetig wachsenden Gruppe der angeborenen Lymphozyten (engl. *innate lymphoid cells*, ILCs) (Vivier *et al.*, 2016). Neben der Fähigkeit zur Bekämpfung entarteter Zellen wird NK-Zellen v.a. auch wegen der Eliminierung virusinfizierter Zellen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem zugewiesen (Caligiuri, 2008). Heute weiß man, dass NK-Zellen ebenfalls einige für B- und T-Zellen typische Eigenschaften besitzen und bedeutend bei der adaptiven Abwehr sind (Sun *et al.*, 2011; Narni-Mancinelli *et al.*, 2011). So stellt die Interaktion von NK-Zellen mit DZ eine Schnittstelle zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem dar. NK-Zellen sind in der Lage, DZ, die keinen adäquaten Reifungsprozess durchlaufen, zu eliminieren und durch Selektion die weitere Antigenpräsentation und Induktion einer TH-1-Antwort zu kontrollieren (Marcenaro *et al.*, 2005; Agaugué *et al.*, 2008).

#### **NK-Zell-Rezeptoren**

Anders als bei B- und T-Zellen, welche einen dominierenden Antigenrezeptor besitzen, wird die Funktion von NK-Zellen durch eine Vielzahl hemmender sowie aktivierender Rezeptoren und Korezeptoren zur Erkennung von Zielzellen geregelt (Bryceson *et al.*, 2008; Lanier, 2008). Die Art und Weise wie NK-Zellen dabei zwischen zu eliminierenden Zellen auf der einen sowie gesunden Zellen auf der anderen Seite

unterscheiden, wurde durch die *missing-self*-Hypothese beschrieben (Kärre *et al.*, 1986): Die inhibierenden Killerzellen-immunglobulinähnlichen Rezeptoren (engl. *killer cell immunoglobulin-like receptors*, KIRs) sowie das später entdeckte CD94/NKG2A (Braud *et al.*, 1998) dienen der Erkennung von MHC- (engl. *major histocompatibility complex-*, Haupthistokompatibilitätskomplex-) I-Molekülen, welche sich auf der Oberfläche nahezu aller kerntragenden Zellen befinden und bei deren Bindung es zu einem hemmenden Signal kommt. Sind MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche der Zielzellen nicht ausreichend exprimiert oder fehlen ganz, wie es bei entarteten oder virusinfizierten Zellen der Fall ist, so überwiegen aktivierende Signale, was zu einer erhöhten Zytotoxizität und Zelllyse führt (siehe Abb. 1).



## Abb. 1: Zusammenwirken von aktivierenden und inhibierenden Signalen bei der Elimination von Zielzellen durch NK-Zellen

NK-Zellen verfügen über verschiedene Rezeptoren zur Übermittlung der Information, ob eine gebundene Zelle abgetötet werden soll. Obere Reihe: Inhibitorische Rezeptoren erkennen die auf nahezu allen kerntragenden Zellen exprimierten MHC-I-Moleküle, wodurch es zu keiner Eliminierung der Zielzelle kommt. Untere Reihe: Sind auf einer bspw. virusinfizierten Zelle keine MHC-I-Moleküle vorhanden, wird aufgrund eines Überwiegens von aktivierender Rezeptoren die Apoptose durch verschiedene Mechanismen – u.a. durch Freisetzung zytotoxischer Granula – ausgelöst. (Abb. modifiziert nach Murphy *et al.*, 2018)

Zu den Aktivierungsrezeptoren auf NK-Zellen gehören u.a. das in dieser Arbeit analysierte CD69 (Sancho et al., 2005), CD16, die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (engl. natural cytotoxicity receptors, NCRs) NKp30 und NKp46 sowie aktivierende KIRs und eine Reihe an Korezeptoren (Moretta et al., 2014; Ivarsson et al., 2014). Sog. Toll-ähnliche Rezeptoren (engl. toll-like receptors, TLRs) und NOD-ähnliche Rezeptoren (engl. nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, NLRs) kommen ebenfalls auf NK-Zellen vor und dienen als PRRs der unmittelbaren Erkennung von Pathogenen (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012; Del Zotto et al., 2017). Ein wichtiger Marker und gleichzeitig ein Molekül zur Adhäsion ist CD56. Dieses wird während der Reifung humaner NK-Zellen gebildet und anschließend zu deren phänotypischen Charakterisierung mit CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> – letzteres zur Abgrenzung gegenüber T-Zellen – genutzt. Je nach Entwicklungsstufe kann anschließend zwischen einer frühen CD56<sup>bright</sup>-Subpopulation mit hoher CD56-Expression sowie einer zahlenmäßig überlegenen CD56<sup>dim</sup>-Subpopulation mit reduzierter CD56-Expression differenziert werden. Unterschiede im Vorhandensein von Oberflächenrezeptoren korrelieren mit einer anderen Hauptfunktion sowie Gewebeverteilung der beiden Zellgruppen. Während bei den in sekundär lymphatischen Organen dominierenden CD56<sup>bright</sup>-Zellen immunregulatorische Effektormechanismen überwiegen, finden sich die CD56<sup>dim</sup>-Zellen häufiger im peripheren Blut, wo sie verstärkt zytotoxische Eigenschaften zeigen (Cooper et al., 2001).

#### Effektormechanismen

Nachdem die NK-Zellen mittels Adhäsionsmolekülen an die Zielzelle gebunden und Aktivierungssignale erhalten haben, stehen verschiedene Mechanismen zur Ausübung ihrer Zytotoxizität zur Verfügung. Sie sind in der Lage, über CD16 mit Antikörpern markierte entartete oder infizierte Zellen zu erkennen und zu lysieren, was als Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) bezeichnet wird (Vivier *et al.*, 2008). Mittels Fas-Ligand (engl. *fragment, apoptosis stimulating-ligand*, FasL) sowie TNF-verwandter Apoptoseinduzierender Ligand (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL) können Zielzellen auch direkt gebunden werden. Dies löst eine Caspasereaktion und schließlich die Apoptose aus (Zamai *et al.*, 1998). Im Zytosol der NK-Zellen befinden sich außerdem Granula, die zytotoxische Proteine wie Perforin und Granzyme enthalten. Nach Aktivierung der NK-Zelle können diese abgegeben werden und die Lyse der Zielzelle bewirken (Smyth *et al.*, 2005).

Neben der Funktion als zytotoxische "Killerzelle" spricht man den NK-Zellen immunregulatorische Aufgaben zu. Sie setzen große Mengen Zytokine und Chemokine sowie Wachstumsfaktoren frei und beeinflussen so andere Immunzellen (siehe 1.1.3).

#### 1.1.3 Zytokine als Effektormoleküle

Als Zytokine bezeichnet man verschiedene Gruppen von Proteinen, welche der Signalübermittlung dienen, zahlreiche zelluläre Reaktionen koordinieren und so eine wichtige Rolle bei Wachstum, Differenzierung und Aktivierung im Immunsystem spielen. Sie werden von verschiedenen Zelltypen sezerniert und können durch Rezeptorbindung andere Zellen beeinflussen (Murphy *et al.*, 2018).

Die Informationsübertragung von extrazellulär in das Zytoplasma der Zielzelle erfolgt dabei bevorzugt über den JAK-STAT-Signalweg (JAK = engl. *janus kinase*; STAT = engl. *signal transducers and activators of transcription*) unter Tyrosin-Phosphorylierung (Darnell *et al.*, 1994).

#### Verschiedene Gruppen von Zytokinen und deren Eigenschaften

Die Zytokine kann man aufgrund ihrer Struktur in Familien einteilen – die Interleukin-(IL-) 1-Familie, die Hämatopoetinsuperfamilie, die Interferone und die Tumornekrosefaktor- (TNF-) Familie. Eine wichtige Untergruppe stellen außerdem die Chemokine dar (s.u.) (Murphy *et al.*, 2018). Im Folgenden sollen insbesondere die in dieser Arbeit vorkommenden Vertreter vorgestellt werden.

Die Mitglieder der IL-1-Familie mit IL-1 $\alpha$  gehören zur Gruppe der Interleukine und werden hauptsächlich von Zellen des mononukleären Phagozytensystems wie Monozyten und Makrophagen als unreife Proteinvorstufen produziert. Eine wichtige Eigenschaft dieser Proteine ist es, durch verstärkte IL-2-Produktion und IL-2-Rezeptorexpression T-Lymphozyten zu aktivieren. IL-1 interagiert zudem mit dem zentralen Nervensystem und kann Krankheitssymptome wie Fieber hervorrufen. Es stimuliert die Synthese von Akute-Phase Proteinen sowie die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und trägt zur Hypotension bei septischem Schock bei (Commins *et*  *al.*, 2010). Mit IL-16 wurde ein weiteres Interleukin betrachtet. Es gilt als T-Zell-Produkt und chemotaktisch für CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, Eosinophile und Monozyten (Center *et al.*, 1995; Laberge *et al.*, 1996).

Die große Hämatopoetinfamilie umfasst Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie Erythropoetin und Wachstumshormone, Interleukine mit Funktionen in der angeborenen und adaptiven Immunität sowie den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Letzterer unterstützt die Anreifung neuer DZ, Neutrophiler sowie Makrophagen sowie die Produktion von Thrombo- und Erythrozyten und aktiviert reife Granulozyten und mononukleäre Phagozyten (Murphy et al., 2018). Wichtig ist GM-CSF in der Lunge, wo er zur Reifung der Alveolarmakrophagen und deren Expression von Matrix-Metalloproteinasen sowie reaktiven Sauerstoffspezies und der Prozessierung von Surfactant-Protein beiträgt (Ochs et al., 2004; Guth et al., 2009). Außerdem ermöglicht GM-CSF ein verlängertes Überleben von Eosinophilen und spielt somit eine Rolle bei allergischen Erkrankungen (Commins et al., 2010).

Die Familie der Interferone besitzt ihren Namen aufgrund der Fähigkeit, mit Viren zu interferieren und diese an der Infektion von Zellen zu hindern. Innerhalb der Interferone gibt es drei Hauptgruppen, wobei IFN- $\gamma$  das einzige Typ-II-Interferon ist (Schroder *et al.*, 2004). Es wird hauptsächlich von TH1-Zellen, aber auch von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen (s.u.) produziert sowie zu einem geringeren Teil von anderen Immunzellen wie Makrophagen. IFN- $\gamma$  erhöht die MHC-I- und II-Expression und stimuliert die Antigenpräsentation sowie Zytokinproduktion durch antigenpräsentierende Zellen (APZ). Außerdem verstärkt es die Zytotoxizität von mononukleären Phagozyten, Neutrophilen und NK-Zellen und die Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen (Commins *et al.*, 2010).

TNF-α gilt als Hauptvertreter der mehr als 17 Zytokine umfassenden TNF-Familie. Die Hauptproduzenten sind mononukleäre Phagozyten, aber auch Neutrophile, Lymphozyten, NK-Zellen (s.u.) sowie Endothel- und Mastzellen. Es liegt zunächst membrangebunden vor und kann enzymatisch freigesetzt werden und an die Oberflächenrezeptoren TNF-Rezeptor 1 und 2 binden. TNF tragen zur Bekämpfung von Tumorzellen bei, indem sie direkt zytotoxische Effekte ausüben sowie die Immunabwehr gegenüber den kanzerösen Zellen einschalten. Bei Monozyten und

6

Granulozyten unterstützt TNF- $\alpha$  die Adhäsion an Endothelzellen und ermöglicht die Extravasation und den Zugang zum Ort von Entzündungen. Neutrophile werden aktiviert und die Degranulation sowie der *respiratorische Burst* mit Bildung von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid verstärkt. Daneben besitzt TNF- $\alpha$  eine Reihe weiterer, teilweise dem IL-1 ähnliche Funktionen und ist bspw. wichtig im Rahmen einer Sepsis (Commins *et al.*, 2010).

#### Chemokine als wichtige Untergruppe der Zytokine

Abschließend geht es um die Gruppe der Chemokine, auf der in einigen Versuchen der Schwerpunkt lag. Diese Proteine werden von verschiedenen Zelltypen in der Anfangsphase einer Infektion bzw. bei physikalischer Schädigung eines Gewebes freigesetzt und induzieren eine Chemotaxis, indem sie die Durchdringung von Endothelzellen ermöglichen und entlang ihres Konzentrationsgradienten zum Infektionsort leiten. So wirken sie als Chemoattraktoren für Leukozyten und rekrutieren APZ inklusive DZ und Zellen der Monozyten-/Makrophagen-Linie (Murphy et al., 2018). Auch bei der Koordination der adaptiven Immunantwort spielen Chemokine eine entscheidende Rolle. So regulieren sie die Hämatopoese von Lymphozyten und die Migration unreifer lymphatischer Vorläuferzellen, die Zirkulation naiver T- und B-Lymphozyten sowie die Antigenpräsentation in sekundär lymphatischen Organen und also die Rückkehr immunkompetenter, antigenspezifischer Tdas *homing*. Effektorzellen (Moser et al., 2001). Ihre Wirkung entfalten die Chemokine anders als die meisten Zytokine durch Bindung an G-Protein gekoppelte 7-Transmembran-Rezeptoren. Ein einzelnes Chemokin kann dabei mehr als einen Rezeptor binden und ein Rezeptor wiederum mit mehreren Chemokinen interagieren, wodurch eine Vielfalt an möglichen Signalwegen besteht (Balakin et al., 2008).

Die verschiedenen Chemokine besitzen alle ähnliche Aminosäuresequenzen und werden anhand der Position ihres N-terminalen Cystein-Restes in vier Gruppen unterteilt. Bei der CXC-Familie sind die beiden Cysteinreste durch eine Aminosäure getrennt. CXCL8 bindet v.a. an den CXCR2-Rezeptor und besitzt eine angiogenetische Wirkung. Außerdem veranlasst CXCL8 die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark sowie deren Wanderung vom Blut in das umgebende Gewebe und fördert den respiratorischen Burst. Die Neutrophilen setzten zudem verstärkt den antimikrobiellen Inhalt ihrer Granula frei (Murphy et al., 2018).

Die CC-Chemokine tragen zwei nebeneinanderstehende Cysteine an ihrem Aminoterminus (Murphy *et al.*, 2018). Eine Untergruppe bildet das Makrophageninflammatorische Protein (MIP) mit CCL3 (MIP-1α) sowie CCL4 (MIP-1β). Diese werden hauptsächlich von aktivierten Immunzellen gebildet, darunter Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile, DZ, Mastzellen und NK-Zellen (s.u.). Neben ihrer Rolle im Rahmen der Gewebehomöostase entfalten sie v.a. eine chemotaktische und proinflammatorische Wirkung und sind insbesondere wichtig für die Zirkulation von T-Zellen zu Entzündungsherden sowie die transendotheliale Migration von Monozyten, Makrophagen, DZ und NK-Zellen. Neutrophile reagieren anders als bei den CXC-Chemokinen weniger stark (Maurer *et al.*, 2004). Zusammen mit dem ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten CCL5 können CCL3 und CCL4 über den CCR5-Rezeptor direkt bzw. indirekt über die Erhöhung der IL-12 Produktion durch APZ die Differenzierung von T-Zellen fördern (Luther *et al.*, 2001). Letzteres wurde bspw. bei Infektion mit *Toxoplasma gondii* gezeigt und trug entscheidend zur Erregerelimination bei (Venge *et al.*, 1996).

Die Mehrzahl der bekannten Chemokine gehört den oben aufgeführten Gruppen an. Eine dritte Chemokin-Familie bilden die C-Chemokine mit nur einem Cysteinrest. XCL1 ist ein Vertreter dieser Familie, welcher von T- und NK-Zellen sowie Epithelzellen im Thymus gebildet wird. Die Interaktion von XCL1 und XCR1 spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der DZ-vermittelten Antigenpräsentation und zytotoxischen Immunantwort sowie der Entwicklung von Selbst-Toleranz und Bildung regulatorischer T-Zellen im Thymus (Lei *et al.*, 2012).

Die vierte Gruppe bilden schließlich die CX<sub>3</sub>C-Chemokine mit CX3CL1, bei welchen die zwei N-terminalen Cysteinreste durch drei variable Aminosäuren getrennt werden (Bazan *et al.*, 1997).

#### **NK-Zellen und Zytokine**

Für diese Arbeit war es v.a. wichtig, NK-Zellen eine Rolle innerhalb des Zytokinnetzwerkes zuzuordnen und diejenigen Zytokine herauszustellen, welche einen Einfluss auf NK-Zellen haben bzw. von ihnen produziert werden.

Um ihre zytotoxische und immunregulatorische Funktion effektiv ausüben zu können, müssen NK-Zellen im Knochenmark reifen und anschließend zum Infektionsort bzw. zu den entarteten Zellen gelangen. So induzieren die Zytokine IL-2, IL-4, IL-7, IL-12 und IL-15 die NK-Zell-Proliferation und die CXC-Chemokine CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12 sowie XCL1, CX3CL1 und die CC-Chemokine CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL19 und CCL21 die Migration (Robertson, 2002; Montaldo et al., 2012). Auch in vivo konnte gezeigt werden, dass CCL3 die Wanderung von NK-Zellen in die Lungen von mit Cytomegalievirus (CMV) infizierten Mäusen fördert (Salazar-Mather et al., 1998) und die Injektion von XCL1 zu einem Einstrom von Lymphozyten und v.a. NK-Zellen in die Peritonealhöhle führt (Hedrick et al., 1997). NK-Zellen erhalten außerdem Signale zur Steuerung der Aktivität durch Zytokine wie IL-1, IL-10, IL-12, IL-15 und IL-18 (Fauriat et al., 2010). Bestimmte Zytokine verstärken die Zytotoxizität von NK-Zellen und ermöglichen es, dass eigentlich resistente virusinfizierte bzw. maligne Zellen von NK-Zellen abgetötet werden können, was als Lymphokin-aktivierte Killer- (LAK-) Aktivität bezeichnet wird. Hierzu gehören IL-2, IL-12 und IL-15 sowie die Chemokine CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL10 und CX3CL1 (Robertson, 2002).

Sind NK-Zellen über diese Zytokine bzw. via PRRs aktiviert, werden sie selbst zu Produzenten einer Reihe an Signalstoffen. Am stärksten setzen sie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  frei. Daneben die Zytokine TNF- $\beta$ , IL-5, IL-10, IL-13 sowie GM-CSF, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL8, CXCL10, XCL1 (Cooper *et al.*, 2001; Robertson, 2002; Fauriat *et al.*, 2010; Montaldo *et al.*, 2012). Es konnte beobachtet werden, dass die Gruppe der Chemokine mit CCL3, CCL4 und CCL5 v.a. dafür zuständig ist, früh zusätzliche Immunzellen zu rekrutieren (Fauriat *et al.*, 2010). Die abgegebenen Zytokine tragen im weiteren Verlauf zur Alarmierung der adaptiven Immunantwort bei und können erste zytotoxische Wirkungen entfalten, bevor die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen die Produktion übernehmen (Murphy *et al.*, 2018). Neben der Rekrutierung und Stimulation von anderen Immunzellen locken die Zytokine zur Unterstützung auch

zusätzliche NK-Zellen selbst und verstärken wiederum deren Produktion von CCL3, CCL4 und CCL5 (Robertson, 2002). Ein klinischer Bezug konnte u.a. im Mausmodell demonstriert werden, bei dem von NK-Zellen freigesetzte Zytokine und Chemokine wichtig bei der schnellen Immunantwort gegenüber bakteriellen und parasitären Erregern wie Listerien, Toxoplasmen und Leishmanien sowie bei einer CMV-Infektion waren (Wherry *et al.*, 1991; Gazzinelli *et al.*, 1993; Scharton *et al.*, 1993; Orange *et al.*, 1995). Die Produktion von CCL3, CCL4 und CCL5 durch NK-Zellen kann darüber hinaus die *in vitro* Replikation des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) inhibieren (Fauci *et al.*, 2005).

#### **1.2** Aspergillus fumigatus

#### 1.2.1 Biologie und Lebenszyklus

Aspergillus (A.) fumigatus ist ein saprophytisch wachsender Schimmelpilz, welcher aufgrund seiner Fähigkeit zur Sporulation und Verbreitung über die Luft ubiquitär aufzufinden ist (van de Veerdonk et al., 2017). Während bevorzugt der Erdboden und zerfallende Biomasse wie Kompost als ökologische Nischen besiedelt werden, sind die Sporen von A. fumigatus (Konidien) auch häufig als Komponenten in Luftproben allgemein sowie in Krankenhäusern enthalten (Falvey et al., 2007). Der Lebenszyklus des Pilzes beginnt im Stadium dieser Konidien, welche einen Durchmesser von 2-3µm haben und deren Bildung an Konidiophoren - spezielle Strukturen, die aus Fußzellen der Pilzhyphen entstehen - stattfindet (Latgé, 1999). Die Sporen werden in großer Menge produziert, besitzen ein hydrophobes Äußeres und können für Stunden in der Luft bleiben (Park et al., 2009). Sie sind zudem stark thermotolerant und weisen aufgrund einer umgebenden Proteinschicht, die als Rodlet bezeichnet wird, eine große Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen auf (Paris et al., 2003). Ruhend bleiben Konidien metabolisch inaktiv und über Monate hinweg überlebensfähig (Park et al., 2009). Sind sie einer geeigneten Umgebung mit ausreichend Wärme und Feuchtigkeit ausgesetzt, kommt es zur Keimung. Nach Anschwellen bilden sich zunächst kurze Fortsätze aus und nach ca. 6 h Hyphen, welche sich verzweigen und schließlich zum Myzel werden. A. fumigatus weist unter den Pilzen eine der schnellsten Wachstumsraten auf (van de Veerdonk et al., 2017). An der Oberfläche des Myzels entstehen einzelne Konidiophoren, deren Aufgabe die Produktion neuer Konidien ist (siehe Abb. 2).



#### Abb. 2: Darstellung von A. fumigatus

(A) Lichtmikroskopische Aufnahme einer Konidiophore von *A. fumigatus*. An deren oberen Ende werden durch Abschnürung Konidien erzeugt. (B) Lebenszyklus von *A. fumigatus* beginnend im Stadium der Konidien. Unter geeigneten Wachstumsbedingungen kommt es zum Anschwellen und Auskeimen von Hyphen. Diese verzweigen sich und bilden ein Myzel. Aus Fußzellen einzelner Hyphen dieses Myzels können schließlich erneut Konidiophore zur Konidienproduktion entstehen. (Abb. modifiziert nach Latgé, 1999 sowie Latgé, 2001)

Während man lange von einer rein asexuellen Vermehrung ausging und *A. fumigatus* der Gruppe der Deuteromyceten zuordnete, konnte mittlerweile unter spezifischen Bedingungen auch ein sexueller Vermehrungszyklus beschrieben werden (O'Gorman *et al.*, 2009).

#### 1.2.2 Angeborene Immunabwehr gegen A. fumigatus

Man weiß, dass der Mensch mehrere hundert Konidien täglich einatmet und diese den Respirationstrakt erreichen (Ben-Ami *et al.*, 2010) (siehe Abb. 3).



Abb. 3: Schematische Darstellung der Komponenten der Immunabwehr bei Inhalation von A. *fumigatus*-Konidien

Werden Konidien inhaliert, greifen die ersten Abwehrmechanismen in Form von zilientragenden Epithelzellen und Alveolarmakrophagen sowie löslichen und zellgebundenen Rezeptoren. Bei fehlender Erregerbeseitigung und Auskeimung der Konidien, kommt es zur Rekrutierung weiterer Immunzellen, darunter Neutrophile, NK-Zellen, Monozyten und DZ. Letztere können als antigenpräsentierende Zellen zum drainierenden Lymphknoten gelangen und dort die Differenzierung von TH-Zellen initiieren. (Abb. modifiziert nach Park *et al.*, 2009)

Im oberen Respirationstrakt kommt es das erste Mal zum Zusammentreffen zwischen *A. fumigatus* und dem angeborenen Immunsystem, was entscheidend dafür ist, ob der Mikroorganismus eliminiert werden kann oder es zur Kolonisierung und Entstehung von Krankheiten (siehe 1.2.3) kommt. Die erste natürliche Barriere stellen die mit Mukus bedeckten Epithelzellen dar. Dort bleiben die Pilzsporen haften und können durch die den Zellen aufsitzenden Zilien Richtung Oropharynx rücktransportiert und geschluckt oder wieder abgehustet werden (Knowles *et al.*, 2002). Der geringe Durchmesser ermöglicht es, dass ein Teil der Konidien diese Epithelzellen passiert und den unteren Respirationstrakt erreicht, wo *A. fumigatus* aufgrund spezifischer PAMPs –

v.a. Zellwandbestandteile wie Glucan und Mannan - von PRRs erkannt wird (Romani, 2011). Letztere können sowohl in löslicher Form sowie zellgebunden vorliegen. In den Lungenalveolen kommt es zur Sekretion der Kollektine Surfactant-Protein A und D durch Typ II Pneumozyten (Madan et al., 2001). Weiterhin beteiligt sind insbesondere zellgebundene TLRs sowie Dectin-1, DC-SIGN, der Mannose-Rezeptor sowie Komplementkomponenten (Lass-Flörl et al., 2013). Die Bindung von PRRs an PAMPs der Pilzsporen führt zur Aktivierung und Verstärkung der nachfolgenden angeborenen, zellulären Immunantwort. Eine wichtige Rolle spielen Alveolarmakrophagen, welche in der Lunge die größte ansässige Leukozytenpopulation darstellen und der frühen Abwehr gegen A. fumigatus dienen. Sie sind in der Lage, die eingeatmeten Konidien zu internalisieren und durch Phagozytose abzutöten, was eine Verbreitung der Sporen verhindert (Ibrahim-Granet et al., 2003). Ist die Pilzbelastung zu groß und die Kapazität dieser lokalen Abwehrmechanismen überschritten, beginnen die nicht eliminierten Konidien zu keimen und durch die Epithelschicht der Alveolen zu wandern. Die morphologischen Veränderungen des Pilzes erleichtern gleichzeitig die Erkennung durch die Immunzellen, da diese weniger auf ruhende, aber verstärkt auf vitale, schwellende Konidien reagieren (Lass-Flörl et al., 2013). Nun erfolgt die Rekrutierung weiterer Leukozyten, insbesondere neutrophiler Granulozyten, welche in der Lage sind, die Pilzkonidien sehr schnell zu binden, zu phagozytieren und mittels reaktiver Sauerstoffspezies zu eliminieren (Cunha et al., 2014). Zudem spielen Thrombozyten und NK-Zellen eine Rolle bei der Abwehr gegen A. fumigatus (Park et al., 2009), wobei auf letzteren der Schwerpunkt dieser Arbeit lag (siehe 1.3). Monozyten sind eine weitere Zellpopulation, welche über das Blut zum Infektionsort in die Lunge migrieren, wo sie zur Eliminierung des Erregers beitragen und schließlich zu DZ differenzieren (Morton et al., 2012). DZ stellen schließlich die Verbindung zum adaptiven Immunsystem her, indem sie Pilzbestandteile phagozytieren, prozessieren und zu drainierenden Lymphknoten transportieren, wo die Antigenpräsentation und nachfolgende T-Zell-Reifung stattfindet (Cramer et al., 2011).

A. *fumigatus* wiederum besitzt einige Strategien, um seine Virulenz zu erhöhen und dem Immunsystem zu entgehen. Bspw. ist er in der Lage, die Erkennung seiner Konidien zu erschweren (Aimanianda *et al.*, 2009) und Komplementfaktoren zu binden oder zu degradieren. Des Weiteren interferiert der Pilz mit pulmonalen Epithelzellen,

13

Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten und beeinträchtigt deren Effektormechanismen wie Phagozytose, intrazelluläre Prozessierung und NET- (= engl. *neutrophil extracellular traps-*) Bildung und erschwert bzw. verhindert so die Elimination durch die Immunzellen (Heinekamp *et al.*, 2015).

#### 1.2.3 A. fumigatus als Krankheitserreger

Während seines Lebenszyklus produziert *A. fumigatus* also Sporen, welche leicht in die Luft gelangen und so effizient verteilt werden (Kwon-Chung *et al.*, 2013). Unter der Gattung *Aspergillus* ist *A. fumigatus* die Art mit der größten Pathogenität (Sugui *et al.*, 2014). Obwohl der Mensch täglich den Sporen von *A. fumigatus* ausgesetzt ist, kommt es bei intakter Barriere- und Immunfunktion (s.o.) in der Regel zu keiner Erkrankung (Margalit *et al.*, 2015). Die Wahrscheinlichkeit der Krankheitsentstehung hängt also mit dem Gesundheitszustand des Wirtes zusammen. Dabei können drei klinische Krankheitskategorien unterschieden werden (siehe Abb. 4).



# Abb. 4: Darstellung der mit *Aspergillus* assoziierten Erkrankungen in Abhängigkeit der Immunreaktion

Die durch *Aspergillus* hervorgerufenen Erkrankungen lassen sich anhand ihrer Pathophysiologie in drei Gruppen unterteilen. Eine überschießende Immunreaktion bei Hypersensibilität gegenüber *Aspergillus*-Antigenen kann zu Asthma oder zu einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) führen. Davon abzugrenzen ist eine Kolonisierung mit *Aspergillus*, welche v.a. bei struktureller Lungenvorschädigung auftritt und oftmals asymptomatisch bleibt. Im Falle eines stark geschwächten Immunsystems nimmt i.d.R. die Erkrankungsschwere zu und es kommt zu invasiven Infektion wie der invasiven Aspergillose (IA). (Abb. modifiziert nach Park *et al.*, 2009)

Die meisten Erkrankungen beginnen im unteren Respirationstrakt (Park *et al.*, 2009). Allergische Reaktionen mit Hypersensibilität wie asthmatische Erkrankungen und allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) sind durch eine überschießende Immunantwort gegenüber den Pilz-Antigenen bedingt (Shah *et al.*, 2016).

Bei vorbestehenden Pathologien der Lunge mit Bronchiektasien oder tuberkulösen Kavernen besteht aufgrund einer defekten mukosalen Abwehrfunktion die Gefahr einer pulmonalen Kolonisierung von *A. fumigatus* (Dagenais *et al.*, 2009). Die Körpertemperatur von 37°C bietet optimale Wachstumsbedingungen, sodass die Konidien zu keimen beginnen, was mit morphologischen Veränderungen der Zellwand und einem Verlust der hydrophoben Proteinschicht einhergeht (van de Veerdonk *et al.*, 2017). Bei Tuberkulosepatienten kann sich so ein Myzelkonglomerat bilden und in einer präformierten Lungenhöhle zum Aspergillom werden (Passera *et al.*, 2012). Charakteristisch für die nichtinvasiven Aspergillosen ist also, dass es zu einer Kolonisierung des Lungenepithels kommt – jedoch ohne Infiltration des umliegenden Gewebes (Dagenais *et al.*, 2009).

Dies ist der Fall bei der dritten Krankheitsgruppe, den invasiven Infektionen. Ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer invasiven Aspergillose (IA) besteht bei defektem Immunsystem. Die zelluläre Abwehr und insbesondere die beteiligten neutrophilen Granulozyten (siehe 1.2.2) sind nicht in der Lage zu verhindern, dass es zur Hyphenbildung des Pilzes und Durchdringung der Endothelzellen mit Eintritt in die Blutbahn und Verbreitung in anderen Organen kommt. Gefährdet sind somit v.a. Menschen mit qualitativen oder quantitativen Defekten der Neutrophilen. Zu diesem Risikokollektiv zählen insbesondere Patienten mit hämatologischen Erkrankungen wie Leukämie nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (engl. hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) oder Organtransplantierte. Diese benötigen i.d.R. eine Hochdosis-Chemotherapie, welche neben den sich schnell teilenden Krebszellen auch das Knochenmark sowie die dort produzierten hämatopoetischen Stammzellen und somit die Vorstufen der Immunzellen angreift. Um eine Graft-versus-Host-Erkrankung (engl. graft-versus-host disease, GvHD) zu verhindern, werden die Patienten zudem mit Immunsuppressiva behandelt, was ebenfalls die Effektormechanismen der Pilzabwehr negativ beeinflussen kann (Barnes et al., 2007; Dagenais et al., 2009; Person et al., 2011). Die Fortschritte bei der Behandlung von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und der damit einhergehende verbreitete Einsatz immunsupprimierender Therapiestrategien bedingen steigende Fälle von Aspergillus-assoziierten Erkrankungen.

Trotz präventiver Maßnahmen wie Patientenisolation und prophylaktische antimykotische Therapie im Falle eines bestehenden Risikos bspw. bei Neutropenie nach HSCT (Cornely *et al.*, 2007) werden jährlich mehr als 200.000 lebensbedrohliche Infektionen verzeichnet (Brown *et al.*, 2012). V.a. die frühe Diagnosestellung durch den Pilznachweis ist entscheidend für den Therapieerfolg, aber auch schwierig und gelingt derzeit am besten durch eine Kombination aus *Aspergillus*-PCR und Detektion von Galactomannan – ein Bestandteil der Pilzzellwand (Rogers *et al.*, 2013). Die Sterblichkeitsrate je nach Risikoprofil ist mit 40 – 90% nach wie vor hoch (Lin *et al.*, 2001).

#### 1.3 Interaktion von NK-Zellen mit A. fumigatus

# 1.3.1 Rolle von NK-Zellen und Effektormechanismen bei der Immunantwort gegen A. *fumigatus*

Während NK-Zellen zunächst v.a. eine wichtige Rolle bei der Tumorabwehr und Bekämpfung von Viren zugesprochen wurde, weiß man heute zusätzlich von der Bedeutung bei Infektionen mit Bakterien, Parasiten und einer Reihe an Pilzen (Schmidt *et al.*, 2013). Im Folgenden soll es um NK-Zellen bei Konfrontation mit *A. fumigatus* gehen.

NK-Zellen sind nach der Milz am häufigsten in der Lunge vertreten, wo sie sich in vaskulären bzw. interstitiellen Kompartimenten und somit in unmittelbarer Nähe zu eingeatmeten Mikroorganismen befinden (Lass-Flörl *et al.*, 2013). Bei einer Infektion kommt es dann zur Migration zusätzlicher NK-Zellen vom Blut in die Lunge und zu deren Aktivierung (Culley, 2009). In einem Neutropenie-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die CCL2-vermittelte Rekrutierung von NK-Zellen einen wichtigen Verteidigungsmechanismus gegen IA darstellt. Die Neutralisation von CCL2 führte bestätigend zu weniger NK-Zellen in der Lunge und einer erhöhten Mortalität (Morrison *et al.*, 2003). NK-Zellen üben ihre zytotoxische Wirkung gegenüber *A. fumigatus* abhängig von dessen Morphologie sowie vermutlich kontaktabhängig und -unabhängig aus (Schmidt *et al.*, 2017). Zur Bindung und Interaktion bei Infektionen dienen PRRs, wobei für Pilzliganden u.a. TLRs (Souza-Fonseca-Guimaraes *et al.*, 2012), NKp30 (Li *et al.*, 2013) und NKp46 (Vitenshtein *et al.*, 2016) sowie CD56

beschrieben wurden (Ziegler et al., 2017). Der Schutzeffekt von NK-Zellen ist neben ihrer direkt fungiziden Aktivität v.a. mit der Produktion von Zytokinen und der durch sie vermittelten Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems assoziiert. Somit besitzen sie eine wichtige immunregulatorische Funktion. Bspw. produzieren NK-Zellen GM-CSF und CCL5 (siehe 1.1.3), welche bekannt dafür sind, die Aktivität von Neutrophilen, Makrophagen und T-Zellen - also Immunzellen, welche eine entscheidende Rolle in der Pilzbekämpfung spielen (siehe 1.2.2) – zu verstärken. Weiterhin demonstrierten Park et al. im Tiermodell von Morrison et al. den Zusammenhang zwischen der protektiven Rolle von NK-Zellen und deren Freisetzung von IFN-y. NK-Zellen gelten als Hauptproduzent während der Frühphase einer Infektion, bevor die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen diese Funktion übernehmen. IFN-y als wichtiges proinflammatorisches Zytokin erhöht nicht nur den antimykotischen Effekt der NK-Zellen selbst, sondern auch von Makrophagen und induziert die Produktion von Chemokinen in der Lunge (Park et al., 2009). Zwei neuere Studien zur Interaktion zwischen NK-Zellen und A. fumigatus bestätigten die Abwehrfunktion von NK-Zellen. Schmidt et al. zeigten, dass NK-Zellen mit oder ohne Stimulation durch IL-2 sowie kontaktabhängig und –unabhängig Pilzhyphen – jedoch keine Konidien – mittels Perforin abtöten konnten (Schmidt et al., 2011). Bouzani et al. demonstrierten wie bereits im Neutropenie-Mausmodell von Park et al. die Freisetzung von IFN-y durch NK-Zellen. Hierzu bedarf es zunächst einer kontaktabhängigen Aktivierung der NK-Zellen durch Pilzhyphen, während das freigesetzte IFN-y anschließend auch gegenüber Hyphen ohne direkten Kontakt zu den NK-Zellen einen fungiziden Effekt zeigte. Dieser Mechanismus war unabhängig von der Degranulierung von Perforin durch die NK-Zellen (Bouzani et al., 2011).

Die NK-Zell-Aktivität wiederum wird auch durch andere Immunzellen sowie Pilzerreger beeinflusst (Schmidt *et al.*, 2017). So sind bspw. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für eine optimale NK-Zell-Effektorfunktion gegenüber *Pneumocystis murina* notwendig (Kelly *et al.*, 2013). *A. fumigatus* verfügt über verschiedene Abwehrstrategien gegenüber dem Immunsystem (siehe 1.2.2) und kann eine Schädigung von NK-Zell-assoziierten Immunfunktionen durch Herunterregulation von GM-CSF und IFN- $\gamma$  bei Kontakt bewirken (Schneider *et al.*, 2016).

#### 1.3.2 Klinische Bedeutung bei Immunsuppression und invasiver Aspergillose

Interessant ist die Betrachtung von Patienten bei Immunsuppression nach HSCT, da diese wie unter 1.2.3 beschrieben ein erhöhtes Risiko aufweisen, an IA zu erkranken (Marr, 2008). Durch eine allogene HSCT kann eine Leukämie mithilfe des Graftversus-Leukämie- (engl. graft-versus-leukemia-, GvL-) Effektes geheilt werden, wohingegen Infektionen limitierend sind (Ullah et al., 2016). Zu einer Besiedlung mit A. fumigatus kommt es entweder früh nach Transplantation während der Phase der Neutropenie oder später im Verlauf aufgrund einer GVHD und notwendigen prolongierten immunsuppressiven Behandlung (Richardson, 2005). Hierbei hat die Rekonstruktion des Immunsystems einen Einfluss. Insbesondere NK-Zellen sind bekannt für ihre antileukämischen sowie zunehmend auch fungiziden Eigenschaften und können außerdem einer GVHD entgegenwirken (Ullah et al., 2016). Nachdem bei HSCT zunächst Zellen der angeborenen Abwehr wie Granulozyten, Monozyten und DZ von 2 bis 4 Wochen sind NK-Zellen innerhalb regenerieren, die erste Lymphozytenpopulation im peripheren Blut. Bis zur vollständigen Rekonstruktion des adaptiven Immunsystems kann es bis zu zwei Jahre andauern (Mehta et al., 2016) (siehe Abb. 5).





Die Rekonstruktion des Immunsystems nach HSCT beginnt mit den angeborenen Immunzellen. NK-Zellen erreichen innerhalb einiger Wochen ihre normale Zellzahl und regenerieren somit unter allen Lymphozyten am schnellsten. Die vollständige Wiederherstellung des adaptiven Immunsystem hingegen kann mehrere Jahre beanspruchen. (Abb. modifiziert nach Mehta *et al.*, 2016)

Während NK-Zellen ihre normale Zellzahl i.d.R. schnell wiedererlangen, dauert es mehrere Monate, bis auch der Immunphänotyp sowie die funktionellen Eigenschaften der NK-Zellen mit denen in Gesunden identisch sind. So ist die  $CD56^{bright}$ -Subpopulation, welche als Hauptproduzent von Zytokinen gilt, innerhalb der ersten 3 bis 6 Monate verstärkt vorhanden. Da die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung verglichen mit den direkt zytotoxischen Eigenschaften trotzdem herabgesetzt ist, wirken sich vermutlich auch zusätzliche Veränderungen von Oberflächenstrukturen und das Expressionsmuster funktioneller Proteine auf die NK-Zell-Funktion zu Beginn nach HSCT aus (Ullah *et al.*, 2016).

Stuehler et al. konnten die klinische Relevanz der Interaktion von NK-Zellen mit A. fumigatus demonstrieren. Hierzu beobachtete man Patienten nach HSCT für 12 Monate und detektierte diejenigen Fälle mit IA. Bei Patienten ohne IA erreichten die NK-Zellen nach 30 Tagen Normwerte. Gleichzeitig zeigte sich ein Zusammenhang mit der Entwicklung einer IA und einer niedrigen Anzahl an NK-Zellen. Interessanterweise war die NK-Zell-Menge bereits vor Auftreten der Erkrankung herabgesetzt. Zudem wurden bei Patienten mit kontrollierter IA mehr NK-Zellen gezählt als bei solchen mit schlechter Heilungschance. Dies spricht dafür, dass die Anzahl der NK-Zellen mit der IA-Wahrscheinlichkeit und -Schwere korreliert und ihnen folglich eine essentielle Rolle bzgl. der Kontrolle und Bekämpfung der Pilzinfektion zukommt (Stuehler et al., 2015). Bei einem vorherigen Vergleich von Patienten mit und ohne GVHD fiel zudem eine niedrigere NK-Zell-Proliferation im Falle der GVHD-Betroffenen auf (Kheav et al., 2014). Auch die Stimulation mit A. fumigatus bewirkte einen Proliferationsdefekt der NK-Zellen und somit eine mögliche Erhöhung der Suszeptibilität gegenüber einer IA (Stuehler et al., 2015). Eine ähnliche Studie wie die von Stuehler et al. wurde bei Patienten nach solider Organtransplantation durchgeführt, bei der das Auftreten einer IA ebenfalls ein Problem darstellt. Übereinstimmend mit obigen Ergebnissen verzeichnete man bei den an IA Erkrankten nach einem Monat signifikant weniger NK-Zellen als bei den gesunden Vergleichspersonen, sodass NK-Zellen auch hier eine Rolle spielen (Fernández-Ruiz et al., 2016).

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit plante die AG Löffler die Durchführung einer Studie zur Charakterisierung von NK-Zellen in Patienten nach HSCT. Insbesondere war die Analyse von Besonderheiten im Falle der Entwicklung einer IA verglichen zu denen bei Patienten ohne IA und Reaktionen auf *A. fumigatus* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation vorgesehen. Die folgenden Experimente dienten als Vorbereitungen für künftige klinische Studien.

Hierbei sollte getestet werden, ob es in Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion (engl. *multiplicity of infection*, MOI), also unter Verwendung steigender Konzentrationen von *A. fumigatus*, zu einer Modulation der Immunantwort durch NK-Zellen entsprechend der Höhe des Erregerbefalles kommen würde. Es galt, zunächst bereits publizierte Daten zum MOI-abhängigen Expressionsverhalten bekannter Oberflächenmoleküle zu verifizieren, um anschließend diejenige MOI mit optimalem Effekt auf die Immunreaktion von NK-Zellen zu definieren. Da im Rahmen klinischer Studien von der Gewinnung wechselnder und tlw. sehr niedriger Zellzahlen auszugehen ist, sollte weiterhin die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Verwendung von Zellkulturplatten mit unterschiedlicher Anzahl an Kavitäten, d.h. mit entsprechend verschieden großen Volumina an Zellkulturlösung, überprüft werden.

Neben ihrer direkt zytotoxischen Aktivität besitzen NK-Zellen bei der Abwehr gegen Pilzinfektionen v.a. eine immunregulatorische Funktion und wirken als früher Alarmgeber für weitere Abwehrzellen. Die vorliegende Arbeit diente daher der Identifizierung relevanter immunmodulierender Moleküle bei der Interaktion zwischen NK-Zellen und *A. fumigatus*. Analog zur durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenrezeptoren sollte anschließend der Einfluss steigender MOIs auf die Expression und Freisetzung ausgewählter Zytokine untersucht werden.

Durch die Verbindung zu der geplanten Patientenstudie stand die klinische Relevanz der vorliegenden experimentellen Arbeit im Vordergrund, wobei ein differenziertes Verständnis für die Interaktion von NK-Zellen mit *A. fumigatus* letztlich der Verbesserung diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten bei IA dienen sollte.

20

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

## 2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heraeus® Heracell® 240	Thermo Fischer Scientific
DNA-/RNA UV-Reinigungsbox, UVC/T-	BioSan
M-AR	Diosan
ELISA Microplate Reader Infinite M200	Tecan
PRO	
ELISA Microplate Washer HydroFlex	Tecan
FACSCalibur	BD Biosciences
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Scientific
HydroFlex <sup>™</sup> Mikroplatten-Washer für 96-	Tecan
well Format	recail
Inkubationsschüttler Minitron	Infors HT
K Series Cryostorage System	Taylor-Wharton
Kühl- und Gefrierschrank 4 °C/-20 °C	Liebherr
Mastercycler ep Gradient S	Eppendorf
Mikroskop Eclipse 50i und TS100	Nikon
Mikrowelle MM 41568	Micromaxx
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf
Mikrozentrifuge Galaxy Mini	VWR
MultiImage <sup>™</sup> Light Cabinet	Alpha Innotech
Multipette® plus	Eppendorf
Multiskan <sup>TM</sup> GO Mikrotiterplatten-	Thermo Fischer Scientific
Spektrophotometer	
Pipetten Reference 10/100/1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand
Präzisionswaage GF-2000	A&D Company Ltd

Bezeichnung	Hersteller
QuadroMACS Separator, MACS	Miltenvi Biotec
MultiStand	Winterly! Diotee
Sicherheitswerkbank Heraeus® Herasafe®	Kendro
KS	Kendro
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab
StepOnePlus Real-Time PCR-System	Applied Biosystems
Transformator BluePower 500	Serva
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries
Wasserbad Memmert	Memmert
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein
Zentrifuge Heraeus® Multifuge 3S und	Thermo Fischer Scientific
3S-R	

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96 Fast PCR-Platte	Sarstedt
Abdeckfolie EasySeal <sup>TM</sup> Transparent	Greiner bio-one
Biosphere® Filter Tips 20 und 100 µl	Sarstedt
CELLSTAR® Serologische Pipetten	Greiner bio-one
5/10/25 ml	
CELLSTAR® Tubes 15 und 50 ml	Greiner bio-one
CryoTube™ Vials	Nunc Thermo Scientific
Discardit <sup>™</sup> II Spritze 10 ml	BD
ELISA-Platte Med. Bind. F	Sarstedt
FACS-tubes Polystyrene Rundboden 5 ml	Falcon® Corning
Filtrationssäule MACS LS Column	Miltenyi Biotec
Hydrodermic Needle-Pro®	B. Braun
Sicherheitskanüle 20G	
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt
Micro tube 1,5 und 2 ml	Sarstedt

Bezeichnung	Hersteller
Pasteurpipetten 3 ml	Hartenstein
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml	Biozym
Pipettenspitzen 10µl ohne Filter	Sarstedt
S-Monovette® 9 ml AH (Ammonium-	Sarstedt
Heparin)	
Safety-Multifly®-Kanüle	Sarstedt
TipOne® Pipettenspitzen 100µl/1000µl	StarLab
ohne Filter	
TipOne® Pipettenspitzen 1000µl XL	StarLab
Graduated Filter Tip	
Zellkulturplatten 6-/12-/24-/48-/96-well	Corning Inc.
Flachboden	
Zellkulturplatte 96-well u-Boden	Corning Inc.
Zellkulturplatte 96-well v-Boden	Greiner bio-one
Zellschaber Cell Scraper 16 cm	Sarstedt

#### 2.1.3 Zellen

Für die Isolation von PBMZ verwendete man Lymphozyten von freiwilligen, gesunden Spendern des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikum Würzburg, wobei die Zellen während der Blutspende in sog. *leukocyte reduction chamber systems* ("Zapfen" bzw. "Kegeln") konzentriert wurden.

Alle Experimente erfolgten mit *A. fumigatus* des Pilzstammes ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) 46645, welcher initial vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt wurde.

## 2.1.4 Reagenzien, Medien und Zytokine

## Gebrauchsfertige Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Agarose NEEO Ultra-Qualität (100g)	Carl Roth
Ampuwa® Spüllösung 1000ml Plastipur®	Fresenius Kabi France
Biocoll-Trennlösung	Biochrom GmbH
CryoStore®	BioLife Solutions®
DNA-Ladder (100bp)	New England BioLabs GmbH
EDTA 0,5 M	Sigma-Aldrich
Ethanol 70%	CHEMSOLUTE®
Ethidiumbromid	Fluka BioChemika
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences
FACS Rinse Solution	BD Biosciences
FKS	Sigma-Aldrich
GelPilot® DNA Loading Dye, 5x	QIAGEN
HBSS	Sigma-Aldrich
IL-2 Proleukin S [Stock 50 U/µl]	Novartis
IL-15 rh [Stock 1,375µl/ml]	ImmunoTools
iTaq <sup>™</sup> Universal SYBR <sup>®</sup> Green supermix	Bio-Rad
Refobacin® (Gentamicinsulfat 80 mg)	Merck
RNAprotect Cell Reagent	QIAGEN
RNase ZAP <sup>TM</sup>	Sigma-Aldrich
RPMI Medium 1640 GlutaMAX <sup>TM</sup>	Life Technologies
Schwefelsäure	Carl Roth
TMB Substrate Solution A	BioLegend®
TMB Substrate Solution B	BioLegend®
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich

Kits

Bezeichnung	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fischer Scientific
Human CCL3/ MIP-1 alpha DuoSet	R&D Systems
ELISA	
Human CCL4/ MIP-1 beta DuoSet ELISA	R&D Systems
Human CCL5/RANTES ELISA MAX <sup>TM</sup>	BioLegend
Deluxe	
Human IFN-γ ELISA MAX <sup>™</sup> Standard	BioLegend
Human IL-1α ELISA MAX <sup>™</sup> Deluxe	BioLegend
Human TNF- $\alpha$ ELISA MAX <sup>TM</sup> Standard	BioLegend
MACS NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec
RNeasy Mini Kit (250)	QIAGEN

## Puffer und selbsthergestellte Lösungen

Bezeichnung	Einzelkomponenten
HBSS-Puffer	500 ml HBSS, 5 ml FKS, 2 ml EDTA
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
TAE-Puffer	TRIS 0,4 M, EDTA 0,01 M, Essigsäure
	0,2 M
Waschpuffer	0.05% Tween <sup>®</sup> 20 in PBS
Zellkulturmedium	500 ml 1640 RPMI Medium, 1,5 ml
	Refobacin, 10 % FKS

## 2.1.5 Primer

Gen	Sequenz	Fragmentgröße
		[Basenpaare]
ALAS1	forward GGCAGCACAGATGAATCAGA	150
	reverse CCTCCATCGGTTTTCACACT	
CCL3 (MIP-1a)	forward TGCAACCAGTTCTCTGCATC	198
	reverse TTTCTGGACCCACTCCTCAC	
CCL4 (MIP-1β)	forward GCTTCCTCGCAACTTTGTGG	111
	reverse TCACTGGGATCAGCACAGAC	
CCL5 (RANTES)	forward TCATTGCTACTGCCCTCTGC	115
	reverse TACTCCTTGATGTGGGCACG	
CXCL8 (IL-8)	forward GGTGCAGTTTTGCCAAGGAG	183
	reverse TTCCTTGGGGTCCAGACAGA	
XCL1 (Lymphotaktin)	forward CTCCTTGGCATCTGCTCTCT	137
	reverse CCTTCCGTGATGGTGTAGGTC	
IFNG (IFN-γ)	forward GCATCCAAAAGAGTGTGGAG	255
	reverse GCAGGCAGGACAACCATTAC	
TNF (TNF-α)	forward TGCTTGTTCCTCAGCCTCTT	185
	reverse TGGGCTACAGGCTTGTCACT	
GM-CSF (CSF2)	forward GCCCTGGGAGCATGTGAATG	223
	reverse CTTGTAGTGGCTGGCCATCAT	
IL16 (IL-16)	forward CGAAGACTCAGCTGCAAATGG	167
	reverse GCAGGGAGATAACGGACTGAC	
IL1A (IL-1α)	forward TGATCAGTACCTCACGGCTG	156
	reverse TGGTCTTCATCTTGGGCAGT	

Antikörper	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller	Volumen [µl]*
CD3	mouse IgG1	PerCP	BD Biosciences	3,5
CD14	mouse IgG2a	FITC	BD Biosciences	2,5
CD19	mouse IgG1	APC	Biolegend	2,5
CD56	mouse IgG1	FITC	BD Biosciences	2,5
CD69	mouse IgG1	APC	Miltenyi Biotec	5
NKp30	mouse IgG1	PE	Biolegend	2,5
NKp46	mouse IgG1	PE	BD Biosciences	2,5

## 2.1.6 Antikörper

\* Die Antikörper wurden zur Verwendung der optimalen Menge titriert. Die Volumina sind angegeben für die FACS-Färbung von Immunzellen in 100  $\mu$ l Puffer (ca. 1 x 10<sup>5</sup> Zellen).

Isotypkontrolle	Fluorochrom	Hersteller	Volumen [µl]*
IgG1	APC	Miltenyi Biotec	5
IgG1	APC	Biolegend	2,5
IgG1	FITC	BD Biosciences	2,5
IgG1	PE	BD Biosciences	2,5
IgG1	PE	Biolegend	2,5
IgG1	PerCP	BD Biosciences	3,5
IgG2a	FITC	BD Biosciences	2,5

\* Volumen entsprechend des eingesetzten Antikörpers

#### 2.1.7 Software

Bezeichnung	Hersteller
BD CellQuest Pro	BD Biosciences
FlowJo 7.6.5	Tree Star Inc.
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc.
i-control 1.12	Tecan

Bezeichnung	Hersteller
ImageJ 1.51	NIH
Microsoft Excel 15.38	Microsoft
Microsoft Power Point 15.38	Microsoft
Microsoft Word 15.38	Microsoft
NanoDrop 3.1.0	PeqLab
StepOne 2.2.2	Applied Biosystems

#### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von A. fumigatus

#### Herstellung einer Konidiensuspension

Zunächst erfolgte die Kultivierung von *A. fumigatus* des Stammes ATCC 46645 auf Bierwürzplatten für etwa 3 Tage bei 37 °C. Anschließend wurden die Platten mit den herangewachsenen Konidien unter der Sterilwerkbank mit mehreren ml destillierten Wassers übergossen und mithilfe eines Wattestäbchens abgelöst. Durch Verwendung eines Zellsiebs der Porengröße 40 µm konnte die entstandene Zellsuspension von Myzelresten befreit werden. Nach Bestimmung der Pilzkonzentration – diese lag beim Ansatz vom 01.06.2015 bei 3,29 x  $10^8/ml$  – erfolgte die Lagerung bei 4 °C.

#### Anzucht von Keimschläuchen und Hyphen

Vom Pilz wurden insgesamt 2 x  $10^7$  Zellen im Kulturmedium RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute*) 1640 unter Zugabe von Refobacin in einer Konzentration von 1 x  $10^6$ /ml aufgenommen. Durch Schüttelinkubation für 15 h bei 200 rpm und Raumtemperatur mit Steigerung auf 37 °C in den letzten vier Stunden, kam es zur Auskeimung der Konidien zu Keimschläuchen. Nach lichtmikroskopischer Beurteilung und Zentrifugieren der Zellkultur für 10 min bei 5000 g, wurde der Pilz in der gewünschten Konzentration in RPMI 1640-Medium mit Refobacin sowie 10% FKS gegeben. Für die Versuche zur MOI stellte man eine Verdünnungsreihe her, indem der Pilz (2 x  $10^7$  Zellen) nach Zentrifugation durch Zugabe von Zellkulturmedium (5 ml) zunächst auf eine Ausgangskonzentration von 4 x  $10^6/ml$  – was bei unserem experimentellen Vorgehen einer MOI von 2 entsprach – gebracht wurde. Zusätzlich verwendete man vier weitere Falcons, in die man zur Hälfte Zellkulturmedium vorlegte. Diese Falcons wurden anschließend zur anderen Hälfte mit der jeweils höher konzentrierten Pilz-Zellkulturmedium-Mischung ergänzt und so zur nächstkleineren MOI verdünnt.

#### 2.2.1.2 Isolation von PBMZ

Isolation Lymphozytenkonzentraten, durch die Die erfolgte aus die des Universitätsklinikum Transfusionsmedizin und Hämotherapie Würzburg bereitgestellten wurden. Ein Puffer aus HBSS (engl. Hanks' Balanced Salt solution) sowie 1% FKS und 0,4% EDTA diente der Verdünnung des Konzentrates. Zur Auftrennung in die verschiedenen Bestandteile wurde das Blut anschließend in 50 ml-Falcons vorsichtig auf eine vorgelegte Schicht aus Ficoll (Dichte = 1,077 g/ml) aufgetragen. Eine anschließende Dichtegradientenzentrifugation mit langsamer Beschleunigung bei 2000 rpm für 20 min diente der Auftrennung des Blutes in die verschiedenen Bestandteile gemäß ihrer jeweiligen Dichte. Granulozyten, Erythrozyten und tote Zellen sammelten sich dabei im Sediment, Thrombozyten und Blutplasma im Überstand sowie PBMZ mit NK-Zellen, T- und B-Lymphozyten sowie Monozyten in der Interphase-Schicht, welche direkt der Ficolllösung auflag. Die PBMZ wurden mithilfe einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen, mit HBSS-Puffer versetzt und zur Entfernung von restlicher Ficolllösung und Thrombozyten zweimalig bei 120 g für 15 min zentrifugiert und gewaschen.

#### Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden der PBMZ-Lösung (*Faktor Volumen*) 10 µl entnommen und ggf. durch Zugabe von HBSS-Puffer 1:10 sowie anschließend mit dem Farbstoff Trypanblau 1:2 verdünnt (*Faktor Verdünnung*). Trypanblau besitzt die Eigenschaft, in tote Zellen einzudringen und sie blau zu färben, während vitale Zellen farblos bleiben und daher zu unterscheiden sind. Aus der Verdünnung wurden anschließend 10 µl entnommen und in die Neubauer-Zählkammer gegeben, welche in verschiedene Quadranten eingeteilt ist und ein definiertes Kammervolumen besitzt. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die durchschnittliche Zellzahl aus den vier Eckquadranten errechnet (*Faktor Mittelwert*) und unter Berücksichtigung des *Kammerfaktors* 10<sup>4</sup> in folgende Formel eingesetzt:

*Gesamtzellzahl* = *Volumen x Verdünnung x Mittelwert x Kammerfaktor*
## Weitere Behandlung der PBMZ

Die PBMZ wurden zur Gewinnung von NK-Zellen direkt weiterverwendet. Dabei erfolgte zunächst die Bestimmung des prozentualen Anteils an NK-Zellen unter den isolierten PBMZ mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse anhand NK-Zell-spezifischer Oberflächenmarker (vgl. 2.2.1.4). Entsprechend konnte anschließend die nötige Anzahl an PBMZ zur NK-Zell-Isolation eingeschätzt werden.

# 2.2.1.3 Isolation und Stimulation von NK-Zellen

# NK-Zell-Isolation mittels indirekter magnetischer Zelltrennung (negative Selektion)

Die Gewinnung von NK-Zellen aus den frisch isolierten PBMZ erfolgte mithilfe des *NK Cell Isolation Kit, human* der Firma Miltenyi Biotec gemäß dem Prinzip der indirekten magnetischen Zelltrennung (negative Zellselektion).

Nach Suspension in der entsprechenden Menge HBSS-Puffer wurden alle in den PBMZ enthaltenen Zellen außer den NK-Zellen zunächst an Biotin-markierte Antikörper und diese nach fünfminütiger Kühlung bei 2 bis 8 °C und erneuter Zugabe von Puffer in einem zweiten Schritt an Streptavidin-gekoppelte metallische Mikrokügelchen gebunden. Nach einer Kühlung für 10 min und Puffer-Zugabe erfolgte die Zelltrennung mittels MACS-Separator. Hierzu wurde die Zellsuspension in eine spezielle magnetische LS-Säule überführt und eine Depletion der markierten Nicht-NK-Zellen im magnetischen Feld erreicht. Die unmarkierten NK-Zellen hingegen passierten die Säule und konnten in einem 50 ml Falcon aufgefangen werden.

## Zellzahlbestimmung und Messung der Reinheit der NK-Zellen mittels FACS

Abschließend wurde nach Waschen mit Puffer und Zentrifugation (10 min, 1300 rpm) die Anzahl der gewonnenen NK-Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (Prinzip siehe 2.2.1.2) und die Reinheit via FACS-Analyse spezifischer Oberflächenmarker und Abgrenzung gegenüber anderen PBMZ kontrolliert (siehe Abb. 6). Diese betrug in allen Fällen > 95%.



Abb. 6: Reinheitsbestimmung isolierter NK-Zellen mittels FACS Die Definition von NK-Zellen erfolgte mit NKp46 sowie als Abgrenzung gegenüber anderen PBMZ mit CD14 (Monozyten/Makrophagen), CD3 (T-Lymphozyten) und CD19 (B-Lymphozyten).

## Kultivierung und Stimulation der NK-Zellen

Die NK-Zellen wurden in einer Konzentration von 1 x  $10^6$ /ml unter Zugabe von IL-2 1000 IE/ml in Zellkulturmedium aufgenommen und für 15 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend folgte das Sammeln der NK-Zellen in einem 50 ml Falcon und nach Zentrifugation (10 min, 1300 rpm) und erneuter Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer (s.o.) die Zugabe von Kulturmedium zur Konzentrierung der NK-Zellen auf 2 x  $10^6$ /ml. Danach wurden verschiedene Ansätze in Zellkulturplatten vorbereitet, welche sich zu gleichen Teilen aus der NK-Zell- sowie *A. fumigatus*-Lösung zusammensetzten. Die Zugabe von Medium anstatt des Pilzes ohne weiteren Zusatz diente als Negativ- sowie die Zugabe von Medium zusammen mit IL-2 500 IE/ml und IL-15 500 IE/ml zur Stimulation der NK-Zellen als Positivkontrolle.

Für die MOI-Experimente wurden NK-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von *A. fumigatus* konfrontiert (siehe Tab. 1).

MOI	NK-Zellen [x 10 <sup>6</sup> /ml]	A. fumigatus [x 10 <sup>6</sup> /ml]
0,125		0,25
0,25		0,5
0,5	2	1
1		2
2		4
0,123 0,25 0,5 1 2	2	0,5 1 2 4

Tab. 1: Konzentration von NK-Zellen und Pilz bei den MOI-Experimenten

Es folgte die drei- bzw. sechsstündige Inkubation im Brutschrank unter oben genannten Inkubationsbedingungen.

#### Weiterbehandlung der NK-Zellen und Kryokonservierung

Nach der Inkubation wurden die verschiedenen Ansätze entweder direkt weiterverwendet (s.u.) oder zur Aufbewahrung kryokonserviert.

Bspw. entnahm man die Überstände aus den Zellkulturplatten, überführte sie nach einem fünfminütigen Zenrifugationsschritt bei 5400 rpm in 1,5 ml Eppendorfgefäße und fror sie bis zur anschließenden Nutzung für ELISA- (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay-*) Experimente bei -20 °C ein.

Die NK-Zellen selbst wurden mittels Zellschaber vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und nach einem Waschschritt mit HBSS-Puffer z.B. zur durchflusszytometrischen Analyse mittels FACS verwendet. Im Falle einer weiteren Isolation von Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid, RNA) suspendierte man die Zellen (i.d.R.  $1 - 5 \ge 10^6$ ) zum Schutz der RNA-Integrität in 500 µl RNAprotect, was eine einwöchige Lagerung bei -20 °C ermöglichte. Um Zellen für weitere Experimente auch langfristig haltbar zu machen, wurde bei anderen Versuchen 1 ml CryoStor pro 5 x 10<sup>6</sup> Zellen zum Pellet hinzugegeben. Das dem Einfriermedium zugesetzte Dimethylsulfoxid (DMSO) bewirkte dabei eine Reduktion der Eiskristallbildung und dadurch eine Erhöhung der Überlebensrate der Zellen. In einem speziellen Kryoröhrchen war so eine Konservierung bei schrittweise -20 °C, -80°C sowie schließlich in flüssigem Stickstoff möglich.

33

## 2.2.1.4 Durchflusszytometrische Analyse

NK-Zellen wurden durchflusszytometrisch mittels FACS (engl. *fluorescence activated cell screening*) analysiert. Dieses Verfahren diente neben der Bestimmung des prozentualen NK-Zell-Anteils von PBMZ (siehe 2.2.1.2) und der Reinheit nach NK-Zell-Isolation (siehe 2.2.1.3) v.a. zur Untersuchung der Größe und Granularität sowie Expression bestimmter Oberflächenproteine.

## Vorbereiten der NK-Zellen für das FACS

Von den NK-Zellen wurden nach Inkubation jeweils 1 x 10<sup>5</sup> Zellen in 5 ml FACS-Röhrchen überführt und unter Hinzugabe von FACS-Puffer (= HBSS ohne Zusatz von FKS und EDTA) durch fünfminütige Zentrifugation bei 1800 rpm gewaschen und pelletiert. Anschließend folgte die FACS-Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern sowie mit Isotypkontrollen. Bei letzteren handelt es sich um Antikörper derselben Klasse und mit demselben Farbstoff, jedoch ohne spezifische Bindungskapazität. Diese dienten zur Detektion und Abgrenzung unspezifischer, falsch positiver Antikörperbindungen. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C und Dunkelheit folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min, 1800 rpm) mit 2 ml Puffer, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Nach Dekantieren der Überstände wurde das Zellpellet in 100 µl Puffer resuspendiert.

### Messung im Durchflusszytometer

Das Prinzip der FACS-Messung beruht auf der Detektion unterschiedlicher optischer Signale je nach den zu untersuchenden Zellen und Proteinen. Die in Suspension befindlichen NK-Zellen wurden von einer Kapillare angesaugt und durch einen Laserstrahl im Inneren des Durchflusszytometers geführt. Bei Auftreffen des Laserstrahles auf eine Zelle änderte sich abhängig von der Zellgröße das in Vorwärtsrichtung gestreute Licht ( $FSC = forward \ scatter$ ) und abhänig von der Zellgranularität das seitwärts gestreute Licht ( $SCC = side \ scatter$ ). Diese Werte wurden im Zytometer erfasst und anschließend durch das Programm CellQuest Pro grafisch dargestellt, was eine Einteilung in tote oder vitale Zellen und verschiedene Zellarten ermöglichte. Weiterhin konnten durch die spezifischen Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper Oberflächenmoleküle gezielt detektiert werden. Dies erlaubte eine genauere Klassifizierung der untersuchten Zellpopulation. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit der Software *FlowJo* ausgewertet.

### 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Genexpressionsanalysen dienten bei den Konfrontationsexperimenten von NK-Zellen mit *A. fumigatus* zur Untersuchung der Zytokinexpression auf mRNA-Ebene.

## 2.2.2.1 Isolation von RNA

Nach dem Auftauen der in RNAprotect gelagerten Zellen, erfolgte die RNA-Isolation mithilfe des *RNeasy Mini Kit*. Die Zellen wurden hierzu abzentrifugiert (5 min, 5000 g) und entsprechend der Herstellerangaben in 350 µl Lysepuffer sowie 350 µl 70 %igem Ethanol aufgenommen. Ersteres diente dabei der Lyse der Zellen und letzteres der Herabsetzung der Löslichkeit der zu isolierenden Nukleinsäuren. So konnte das Lysat anschließend auf eine spezielle Filtersäule aufgetragen werden und die enthaltene RNA blieb nach Zentrifugation (30 s, 8000 g) am Säulenmaterial haften, während andere Moleküle eluiert wurden. Es folgte ein Waschschritt mit 700 µl RW1-Puffer und Zentrifugation für 30 s bei 8000 g, zwei weitere mit jeweils 500 µl RPE-Puffer sowie eine einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit von 16100 g. Die so vollständig trockene Säule wurde auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µl RNAse-freiem Wasser benetzt. Durch Zentrifugation für 1 min bei 8000 g konnte schließlich die RNA aus der Säule eluiert werden.

## Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Spektralphotometer *NanoDrop ND-1000*. Hierzu wurden nach Kalibrierung mittels Wasser 2 µl der RNA-Lösung auf die vorgesehene Messfläche gegeben. Durch die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm konnte mithilfe des *Lambert-Beer'schen Gesetzes* die RNA-Konzentration ermittelt werden.

### 2.2.2.2 Herstellung von cDNA

Da die Genexpressionsanalysen ausgehend von Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) erfolgten, wurde die RNA entweder direkt im Anschluss an die Isolation oder ggf. nach Lagerung für wenige Stunden bei -20 °C mithilfe des *First Strand cDNA Synthesis Kit* in komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Dies geschah nach dem Prinzip der reversen Transkription durch das Enzym reverse Transkriptase – eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Primer dienten dabei als Startsequenz, von wo aus die komplementäre Basenanlagerung und Synthese eines RNA-DNA-Hypbridstranges erfolgte. Nach Abbau des RNA-Anteils resultierte die cDNA.

Von den RNA-Proben wurden hierzu jeweils zwischen 100 - 500 ng verwendet und mit der entsprechenden Menge an RNAse-freiem Wasser versetzt, sodass Ansätze von jeweils 8,8 µl verdünnter RNA entstanden. Diese ergänzte man durch Zugabe eines Mastermix mit insgesamt 11,2 µl zu einem Endvolumen von 20 µl (siehe Tab. 2). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, bei dem H<sub>2</sub>O anstatt der reversen Transkriptase zugefügt wurde.

Reagenz	Volumen [µl]
5 x Reaktions-Puffer	4
Oligo (dT) Primer (1 µM)	0,2
Random Hexamer Primer (10 µM)	1
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1
10 mM dNTP Mix	2
M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl)	2
H <sub>2</sub> O	1
RNA 100 - 500 ng	8,8
Summe	20

Tab. 2: Reaktionsreagenzien zur cDNA-Synthese aus mRNA

Nach kurzer Zentrifugation folgte die Inkubation der Proben im Thermocycler gemäß unten aufgeführtem Programm (Tab. 3):

Schritt	Dauer [min]	Temperatur [°C]	
1	5	25	
2	60	37	
3	5	70	
4	$\infty$	4	

Tab. 3: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese

Die gewonnene cDNA wurde zur kurzen Lagerung bei 4 °C sowie für längere Lagerzeiten bei -20 °C aufbewahrt.

# 2.2.2.3 Durchführung quantitativer PCRs

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) können cDNA-Fragmente amplifiziert werden. Das spezielle Verfahren der quantitativen PCR (qPCR) ermöglicht durch Messung der Fluoreszenz während jedes Zyklus zudem die Quantifizierung der Genexpression.

## Vorbereitung für die qPCR

Die zu analysierenden Gene wurden der Gendatenbank des NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*, Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation) entnommen. Um die entsprechenden Primerpaare für die qPCR zu designen, verwendete man die Programme *Spidey* (Wheelan *et al.*, 2001) und *Primer-BLAST* (Ye *et al.*, 2012). Es wurde darauf geachtet, dass die Primer alle mRNA-Spleißvarianten abdeckten, durch Überspannen von Introns spezifisch für den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt waren und bei einer Temperatur von 60 °C funktionierten. Die Lagerung erfolgte als Stock-Lösung [100 µM].

Zur Vorbereitung für die qPCR-Messung wurden die Primer aus der Stock-Lösung sowie die cDNA 1:10 verdünnt. Danach führte man in einer 96-*well* Platte folgende Reagenzien zusammen (Tab. 4):

Reagenz	Volumen [µl]
SYBR-Green-Lösung	10
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
H <sub>2</sub> O	4
cDNA	4
Summe	20

Tab. 4: Reaktionsreagenzien zur qPCR-Analyse

Als Negativprobe diente der Zusatz von nukleasefreiem Wasser anstatt cDNA. Es folgte eine kurze Zentrifugation zur Sammlung der Flüssigkeit am Boden.

## Durchführung der qPCR-Zyklen mittels StepOne Plus

Die Amplifikation und Messung der Proben erfolgte im PCR-Gerät *StepOne Plus*. Zur Aktivierung des Enzymes Taq-Polymerase musste die Temperatur initial auf 95 °C erhöht werden. Danach schlossen sich mehrere DNA-Verdopplungszyklen an. Die cDNA wurde dabei zunächst in Einzelstränge denaturiert, bevor in einem nächsten Schritt die sequenzspezifischen Primer bei herabgesetzter *annealing*-Temperatur von 60 °C binden konnten. Schließlich folgte die Elongation durch komplementäre Anlagerung von Nukleotiden mithilfe der DNA-Polymerase.

### Auswertung der qPCR

Die Auswertung der qPCR-Ergebnisse basierte auf der mathematischen Berechnung der qPCR-Effizienz sowie dem sog. *crossingpoint* (CP) (Pfaffl, 2001). Letzterer wurde mithilfe einer Kurvenanalyse des Fluoreszensignales von *SYBR-Green* ermittelt. Sobald die DNA doppelsträngig vorlag, konnte der Cyanin-Farbstoff interkalieren und es kam zu einem exponentiellen Anstieg des Signales während der qPCR-Zyklen. Zwischen der Fluoreszenzintensität des *SYBR Green* sowie der DNA-Menge bestand somit ein proportionaler Zusammenhang: Je höher die Messung der Fluoreszenz ausfiel, desto mehr Amplifikat lag vor.

Um die Gene relativ zu quantifizieren, führte man bei den Experimenten  $\delta$ -Aminolävulinat-Synthase 1 (ALAS1) als Referenzgen (engl. *housekeeping gene*) mit,

welches unabhängig von verschiedenen äußeren Bedingungen immer gleich stark exprimiert wird. So konnten die Messwerte des Zielgenes mit denen des Referenzgenes verglichen und die relative Expression R bestimmt werden. Gleichzeitig sagten die ALAS1-Werte auch etwas über die Qualität der Experimente aus, da sie bei allen Proben gleiche Wert haben sollten.

### 2.2.2.4 Densitometrische Auswertung

Die Elektrophorese diente dem Nachweis und der Kontrolle der Größe und Quantität von amplifizierten DNA-Fragmenten.

#### Vorbereitung und Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung des 2 %igen Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE- (TRIS- (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-) Acetat-EDTA-) Puffer durch Erhitzen gelöst und nach Ausgleich des Gewichtsverlustes durch vollentsalztes Wasser mit 4 µl Ethidiumbromid versetzt. Die flüssige Lösung überführte man zunächst zur Aushärtung in eine spezielle Apparatur mit eingestecktem Kamm zur Entstehung von Aussparungen im Gel. Die nächsten Schritte erfolgten in einer Elektrophoresekammer, in die das fertige Gel mit Zugabe von TAE als Laufpuffer gegeben wurde. Die ausgesparten Geltaschen besetzte man mit jeweils einer Mischung aus 1 µl Farbstoff (10 x Blue Juice Gel Loading Buffer) zur Anfärbung und Erhöhung des Gewichtes der DNA sowie mit 10 µl der DNA selbst. Zudem wurde ein DNA-Standard als Vergleich aufgetragen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit 130 V wanderten die negativ geladenen Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell in Richtung der Anode und interkalierten dabei mit dem sich gegenläufig bewegenden Ethidiumbromid. Da sich die Partikel des blauen Farbstoffes schneller als die größeren DNA-Moleküle in Richtung Anode bewegten, war es möglich anhand deren Position im Gel das Ende des Elektrophoreselaufs nach ca. 15 min zu bestimmen.

# Bildliche Darstellung und Auswertung der Gelbanden

Durch das mit den Nukleinsäuren interkalierende Ethidiumbromid konnten die DNA-Banden unter ultraviolettem Licht im *MultiImage Light Cabinet* sichtbar gemacht und abfotografiert werden. Die entstandenen Bilder wurden im Anschluss mithilfe von *ImageJ* analysiert. Dieses Programm ermöglichte die Darstellung der integrierten Farbdichte einzelner Gelbanden als Messkurven. Je stärker deren Intensität auf dem Foto war, desto höher fiel auch die Messspitze und die Fläche unter der Kurve aus. Indem letzterer jeweils ein Zahlenwert zugeordnet wurde, war die relative quantitative Bestimmung der DNA-Menge möglich.

### 2.2.3 ELISA zur proteinbiochemischen Analyse

Zur Konzentrationsbestimmung ausgewählter Proteine in den Zellkulturüberständen wurden ELISA durchgeführt. Aufgrund des Vorgehens spricht man dabei von einem *sandwich*-Prinzip: Nach Auftragen eines ersten Antikörpers wurde die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen hinzugefügt. In einem weiteren Schritt diente ein zweiter Antikörper der Detektion der gebundenen Proteine. Über ein zusätzliches Biotin-Molekül war dieser Detektions-Antikörper wiederum an das an Streptavidin gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase gebunden. Dadurch konnte die Umsetzung des Substrates TMB in einen blauen Farbstoff katalysiert werden.

#### Durchführung und Auswertung der ELISA

Für die ELISA verwendete man Kits und ging gemäß Herstellerangaben vor. Der *Capture Antibody* wurde entsprechend 1:200 in *Coating Puffer* verdünnt und zu je 100  $\mu$ l in die Kavitäten einer 96-*well* Mikrotiterplatte transferiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C und Waschen der ELISA-Platte mit Waschpuffer zur Entfernung von überschüssigem Antikörper erfolgte eine Blockierung mit 200  $\mu$ l *Assay Diluent*, um unspezifische Bindungen des Analyts an die Plattenoberfläche zu verhindern. Es folgte ein weiterer Waschschritt sowie die Besetzung der Platte mit jeweils 100  $\mu$ l der Proben sowie eines Standards, der sich aus verschiedenen Verdünnungsstufen eines Referenzproteins aus dem Kit mit *Assay Diluent* zusammensetzte. Zudem wurde ein *Blank* aus *Assay Diluent* ganz ohne Proteinzusatz mitgeführt. Nach zweistündiger Inkubation auf dem Schüttelinkubator folgte die Auftragung von je 100  $\mu$ l des 1:200 in *Assay Diluent* verdünnten Detektions-Antikörper, einstündige Schüttelinkubation und anschließend das Waschen. Dann wurden 100  $\mu$ l 1:1000 verdünnter Avidin-HRP-Lösung zu den Ansätzen gegeben, erneut für 30 min inkubiert und gewaschen. Abschließend erfolgte die Auftragung von 100  $\mu$ l TMB-Lösung und mindestens

zehnminütige Inkubation bei Dunkelheit bis zur Entstehung einer Türkisfärbung. Durch das Stopp-Reagenz Schwefelsäure kam es zu einem pH-abhängigen Farbumschlag nach gelb.

Die Intensität der Farbe war dabei proportional zur initial gebundenen Menge des zu quantifizierenden Zytokins und konnte mittels Absorptionsmessung bei 450 nm im *ELISA-reader* ermittelt werden. Der Vergleich mit den Konzentrationen der Standardproben ermöglichte so die Konzentrationsbestimmung der Proteine aus den Zellkulturüberständen.

# 2.2.4 Statistik

Zur Ermittlung der Signifikanz diente der student's t-test für gepaarte Daten.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Expression von Oberflächenmarkern auf NK-Zellen nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen von *A. fumigatus*

Um eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Interaktion zwischen NK-Zellen und *A. fumigatus* zu erhalten, untersuchte man zunächst die Präsenz bekannter immunologischer Markermoleküle auf NK-Zellen. Insbesondere galt es herauszufinden, ob und wie sich die Immunreaktion bei Konfrontation mit verschiedenen Konzentrationen an Pilz verändern würde.

## 3.1.1 MOI-abhängige Expression von CD56, CD69 und NKp30

Während der Durchführung der Experimente für diese Arbeit publizierte die gleiche Arbeitsgruppe Daten zu dem Zelloberflächenmarker CD56 als PRR für *A. fumigatus* (Ziegler *et al.*, 2017). Zur Verifizierung sollte nun die CD56-Verfügbarkeit auf der Oberfläche von NK-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen MOIs geprüft werden. Hierzu wurden frisch isolierte NK-Zellen über Nacht unter Hinzugabe von IL-2 vorinkubiert und anschließend mit *A. fumigatus* in einer MOI von 0,125 bis 2 stimuliert (siehe hierzu auch Tab. 1). Daneben führte man eine Negativkontrolle ohne Zusatz von Pilz sowie eine Positivprobe mit IL-2/IL-15 mit. Nach sechsstündiger Inkubation und Anfärbung der NK-Zellen konnte die Markerexpression mittels Durchflusszytometrie gemessen werden.

Abb. 7 zeigt anhand eines Spenders beispielhaft den prozentualen Anteil der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen in Abhängigkeit verschiedener MOIs.



**Abb. 7: CD56<sup>+</sup> NK-Zellen bei Verwendung verschiedener MOIs in der FACS-Analyse** Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD56<sup>+</sup> NK-Zellen nach 6 h ohne Stimulation (-/-) oder mit Kontakt zu *A. fumigatus* in unterschiedlichen MOIs.

Während die unstimulierten NK-Zellen nahezu alle CD56<sup>+</sup> waren, konnte mit steigender Menge Pilz eine Verringerung der Zugänglichkeit von CD56 auf der Zelloberfläche beobachtet werden. Bei einer MOI von 2 wiesen nur noch ein Drittel aller NK-Zellen eine messbare CD56-Expression auf. Besonders eindrücklich ist, dass diese Herunterregulation genau graduell entsprechend der jeweiligen MOI geschah.

Zusätzlich zu CD56 wurde die Expressionsstärke des Aktivierungsmarkers CD69 sowie des NK-Zell-Markers NKp30 als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gemessen (siehe Abb. 8).



Abb. 8: Expression von Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen MOIs von A. fumigatus

Die Expressionsstärke von CD56, CD69 und NKp30 wurde nach 6 h mittels FACS-Analyse untersucht. (-/-) entspricht den Ergebnissen der Negativ- und (IL-15) denen der Positivkontrolle. Die Anzahl der durchgeführten Versuche ist für jeden Rezeptor angegeben. Die Daten zu NKp30 sowie von 4 Spendern bei CD56 und CD69 stammen von Experimenten anderer Mitglieder der AG Löffler und wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. \*p<0,05

Passend zur vorherigen Abbildung konnte bei Messung der MFI eine signifikante, graduelle Verminderung der Zugänglichkeit von CD56 auf der Oberfläche stimulierter NK-Zellen beobachtet werden, welche die jeweilige Höhe der MOI von *A. fumigatus* widerspiegelt. Wie zu erwarten, stieg umgekehrt die CD69-Expression entsprechend höherer MOIs. Die Expression von NKp30 hingegen wurde durch die Präsenz von *A. fumigatus* kaum beeinflusst.

### 3.1.2 MOI 0,5 als geeignete Pilzkonzentration

Für die anschließenden *Screening*-Experimente sowie künftige Patientenstudien sollte eine Pilzkonzentration mit optimalem Effekt auf die Immunreaktion durch NK-Zellen ausgewählt werden. Dafür, dass eine MOI von 0,5 geeignet ist, sprachen die Messergebnisse von CD56 auf der Oberfläche von NK-Zellen im Vergleich mit geringeren als auch höheren Mengen von *A. fumigatus* (siehe Abb. 9).



Abb. 9: Exemplarischer Vergleich der CD56-Präsenz auf NK-Zellen bei Verwendung verschiedener MOIs

Die Abbildung zeigt beispielhaft die Messdaten eines Blutspenders zu CD56 auf der Oberfläche von NK-Zellen nach Stimulation mit ansteigender Menge *A. fumigatus*: (A) Histogramm der MFI-Werte sowie (B) Prozentualer Anteil der Subpopulation CD56<sup>bright</sup> bei verschiedenen MOIs.

Bei Betrachtung der MFI-Werte in Abb. 9 (A) kann man zwei Messgipfel abgrenzen, wobei MOI 0,5 (hellgrüner Graph) die erste war, ab der sich eine Tendenz zur linken Seite hin und somit eine deutlich geringere CD56-Expression erkennen ließ. In (B) wurde zusätzlich ein *Gate* so gewählt, dass unter allen CD56<sup>+</sup> NK-Zellen der prozentuale Anteil der Subpopulation CD56<sup>bright</sup> gesondert zur Darstellung kam. Anhand dieser Zellgruppe zeigte sich zum einen nochmals die Herunterregulation von CD56 mit steigender MOI. Zum anderen bestätigte sich auch hier die Entscheidung für eine MOI von 0,5 bei anderen Experimenten, da es ab dieser zu keiner relevanten Abnahme von CD56<sup>+</sup> Zellen innerhalb der Population CD56<sup>bright</sup> mehr kam.

# 3.1.3 Reproduzierbarkeit der MOI-abhängigen Expression von CD56

Im Rahmen weiterer Experimente und Studien könnte es vorkommen, dass je nach Spendervariabilität teilweise unterschiedliche Mengen an Zellen aus dem Blut gewonnen werden. Dennoch sollten die verschiedenen Ansätze miteinander vergleichbar sein, weshalb man *Multiwell*-Zellkulturplatten verschiedener Größe und Zellkapazität bzgl. der Eignung für die Messung von CD56 auf NK-Zellen testete (siehe Tab. 5).

n Kavitäten	Fläche	Volumen	Zellzahl	Zellzahl/Fläche
	[cm <sup>2</sup> ]	[µl]	[x 10 <sup>6</sup> ]	$[x \ 10^{6}/cm^{2}]$
12	3,84	1000	1	
24	1,91	500	0,5	
48	0,95	250	0,25	0.26
96				0,20
96 u-Boden	0,32	85	0,08	
96 v-Boden				

Tab. 5: Verwendete Zellkulturplatten verschiedener Größe und Bodenbeschaffenheit

Hierzu wurden unterschiedliche Mengen von NK-Zellen wie unter 3.1.1 beschrieben vorbehandelt und für 6 h mit ansteigenden Mengen an *A. fumigatus* in Zellkulturplatten mit 12 bis 96 Kavitäten und flacher Bodenform stimuliert sowie im Anschluss im Hinblick auf die CD56-Verfügbarkeit auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellzahl in Bezug zur Bodenfläche blieb in allen Fällen die gleiche. Wie bei Punkt 3.1.1 bereits gezeigt – hier unter standardmäßiger Verwendung einer 24-*well* Zellkulturplatte –, kam es auch bei allen anderen Zellkulturplatten mit flachem Boden zur graduellen Verminderung der Präsenz von CD56.

Im Falle der 96-*well* Zellkulturplatte wurden zusätzlich zwei weitere Bodenplatten getestet, welche durch eine u- bzw. v-Form im Gegensatz zum herkömmlichen flachen Boden einen stärkeren Kontakt zwischen NK-Zellen und Pilz ermöglichten. Es galt herauszufinden, ob dies einen Einfluss auf die MFI haben könnte. Die Ergebnisse sind in der Abb. 10 dargestellt:





Bei den Platten mit u- und v-Boden kam es aufgrund der konischen Form der Kavitäten zu einer höheren effektiven MOI durch Kompression des Raumes für NK-Zellen und Pilz. Hier resultierte eine stärkere Herunterregulation von ungebundenem CD56 schon ab MOI 0 (-/-) zu MOI 0,125 im Vergleich zur Platte mit flachem Boden (A). Außerdem erreichte die Präsenz von CD56 bereits bei MOI 0,5 nahezu ihr Minimum, was die Ergebnisse aus der Abbildung zuvor bestätigt. Auch die Histogramme verdeutlichen dies (B). Im Falle der Platten mit flachem Boden konnte bei MOI 0,5 eine CD56<sup>bright</sup>-Population beobachtet werden (siehe zusätzlicher Peak des hellgrünen Graphen nach rechts), jedoch nicht bei den u- und v-Bodenplatten.

# 3.2 *Screening* der Produktion und Freisetzung immunmodulatorischer Zytokine durch NK-Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*

Da NK-Zellen bei der Abwehr gegenüber *A. fumigatus* v.a. aufgrund ihrer immunregulatorischen Funktion eine wichtige Rolle spielen, stand die Analyse von Signalmolekülen im Vordergrund. Nach den beschriebenen Voruntersuchungen erfolgte zur Abgrenzung potentiell interessanter Zytokine zunächst ein *Screening* mittels verschiedener biochemischer Methoden. Dazu wurden NK-Zellen wie bereits beschrieben mit IL-2 über Nacht und anschließend unter Verwendung einer MOI von 0,5 stimuliert. Auch hier führte man sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen mit. Nach 3 bzw. 6 h konnten anschließend die Zytokinmengen bestimmt werden, sodass ein Eindruck davon entstand, an welcher Stelle weitere Untersuchungen lohnenswert wären.

## 3.2.1 Analyse der mRNA-Expression mittels qPCR

Von den NK-Zellen wurde nach erfolgter Stimulation RNA isoliert und für ein erstes *Screening* verschiedener Zytokine mittels qPCR verwendet. Die Ergebnisse der stimulierten Proben sind dabei relativ und beziehen sich auf den Messwert der unstimulierten NK-Zellen als Negativkontrollen (-/-) und Vergleichswert – angegeben mit "1" (siehe Abb. 11).



**Abb. 11:** *Screening* der mRNA-Expression verschiedener Zytokine mittels qPCR Frisch isolierte NK-Zellen wurden nach Inkubation und Hinzugabe von IL-2 mit IL-2/IL-15 (IL-15) oder *A. fumigatus*-Keimschläuchen (Afum) für 3 h (A) bzw. 6 h (B) stimuliert. n=3 nach 3 h sowie n=5 nach 6 h. Die Messungen zu den Spendern 4 und 5 wurden freundlicherweise von Mitgliedern der AG Löffler zur Verfügung gestellt. \*p<0,05

Um die genauen Zahlenwerte für die Messungen der Zytokinexpression nachvollziehen zu können, sind die Mittelwerte zusätzlich in Form einer Tabelle aufgetragen (siehe Tab. 6):

		3 h	6 h
	_/_	1,00	1,00
$CCI 3 (MID 1\alpha)$	IL-15	14,19	8,63
CCL3 (MIF-Ia)	Afum	10,75	13,79
$CCL A (MIP_1R)$	IL-15	4,19	2,84
CCL4 (WIII - Ip)	Afum	4,91	6,30
CCI 5 (RANTES)	IL-15	0,62	0,51
CCLS (RANTES)	Afum	1,08	0,82
CXCI 8 (II -8)	IL-15	0,70	0,55
CACLO (IL-0)	Afum	2,75	7,14
XCI 1 (I ymnhotaktin)	IL-15	2,48	2,71
ACLI (Lymphotakim)	Afum	1,84	2,47
IFNC (IFN-a)	IL-15	20,80	8,25
<b>H</b> <sup>(10</sup> ( <b>H</b> <sup>(1-</sup> ))	Afum	5,53	16,83
$TNF(TNF-\alpha)$	IL-15	10,75	5,72
	Afum	4,79	8,24
CM-CSF (CSF2)	IL-15	14,18	9,34
GMI-CSF (CSF2)	Afum	2,21	5,67
Ш 16 (Ш -16)	IL-15	0,56	0,54
1110 (11-10)	Afum	1,03	0,59
$\Pi 1A (\Pi - 1\alpha)$	IL-15		1,43
	Afum		2,51

Tab. 6: Relative qPCR-Messwerte für die mRNA-Expression verschiedener ZytokineAufgeführt sind die Mittelwerte nach 3 h (n=3) sowie 6 h (n=5).

Die mRNA-Expression der Chemokine CCL3, CCL4, CXCL8, XCL1 und der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF und IL-1 $\alpha$  stieg nach Konfrontation mit *A. fumigatus* an. Vergleicht man die 3 h- und 6 h-Werte, so fiel eine mit der Dauer der *A. fumigatus*-Stimulation deutliche Zunahme der mRNA-Expression auf. Im Falle von CCL3, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  überwog nach 6 h sogar der Effekt des Pilzes auf die mRNA-Expression gegenüber einer IL-2/IL-15-Stimulation. Signifikant herunterreguliert wurde hingegen nach 6 h die Produktion der mRNA für CCL5 sowie IL-16. Insgesamt zeigt der

Vergleich der 3 h- und 6 h-Ergebnisse somit, dass der Stimulationseffekt von IL-2/IL-15 recht schnell einsetzte, während der Effekt von *A. fumigatus* erst nach 6 h deutlicher wurde – dann, wenn die Wirkung von IL-2/IL-15 bereits wieder nachließ.

# 3.2.2 Densitometrische Analyse der mRNA-Expression

Nach Vorstimulation der NK-Zellen wie oben beschrieben, wurde RNA isoliert und für die PCR-Untersuchung der Expression von CCL3, CCL4 und XCL1 genutzt. Zur Visualisierung diente anschließend die Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese. Die relative Farbintensität jeder DNA-Bande als Maß für die Menge der mRNA wurde mittels *ImageJ* quantifiziert. Die densitometrische Untersuchung erfolgte ohne ALAS1 (Referenzgen) zur Normalisierung (siehe Abb. 12).



**Abb. 12: mRNA-Expression von CCL3, CCL4 und XCL1 in der konventionellen PCR** Die obere Reihe stellt die Messwerte nach 3 h, die untere Reihe diejenigen nach 6 h dar. (A) Gelelektrophorese der PCR-Produkte eines Spenders, (B) Quantifizierung der Farbintensität der DNA-Banden mithilfe von *ImageJ*, wobei sich das Ergebnis aus dem Mittelwert dreier Spender, n=3 zusammensetzt. \*p<0,05

Die Expression aller drei untersuchten Chemokine durch NK-Zellen wurde bereits nach 3 h Stimulation hochreguliert. Der Effekt von *A. fumigatus* fiel auch hier bei CCL3 und CCL4 nach 6 h etwas höher aus als nach nur 3 h. Wie unter 3.2.1 beschrieben, ergab sich in der qPCR mit ALAS1-Normalisierung eine höhere Expression für CCL3 und CCL4 nach 6 h *A. fumigatus*- versus IL-2/IL-15-Stimulation. Die densitometrische Analyse zeigte das gleiche Expressions-Level für beide Stimulationen bzw. sogar eine höhere Expression bei dem Ansatz mit IL-15.

## 3.2.3 Freisetzung von Zytokinen

Die Vorbehandlung der NK-Zellen verlief wie oben beschrieben. Die Überstände der stimulierten sowie unstimulierten Ansätze wurden zur Analyse bestimmter Zytokine mittels ELISA verwendet. Das Augenmerk richtete sich dabei aufgrund der Reaktionen aus den beiden ersten Versuchen auf CCL3 und CCL4, wovon Messergebnisse nach 3 und 6 h vorliegen. Zum Vergleich wurden Daten zur Freisetzung von CCL5, bei welchem es im ersten Versuch zu einer Herunterregulation der mRNA bei dem Ansatz NK-Zellen und Pilz kam, sowie von den Zytokinen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  bei Kontakt mit *A. fumigatus* erhoben. Die Konzentrationen sind dabei in pg/ml anstatt relativ angegeben, um die tatsächliche Höhe der Zytokinausschüttung besser beurteilen zu können (siehe Abb. 13).



Abb. 13: Freisetzung von Zytokinen durch stimulierte NK-Zellen (A) stellt die Ergebnisse von CCL3 und CCL4 nach 3 h Stimulation dar, (B) die Ergebnisse von weiteren Messungen nach 6 h. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist jeweils angegeben. Die graphische Darstellung erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Herr Eisele (AG Topp). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

Bei den Chemokinen CCL3 und CCL4 zeigte sich bereits nach 3 h und noch deutlicher nach 6 h eine hohe absolute Zytokinausschüttung nach Stimulation der NK-Zellen mit IL-15 und Pilz. Die Ergebnisse von 6 h offenbarten in beiden Fällen signifikante Unterschiede, wobei v.a. bei den Ansätzen mit *A. fumigatus* eine zur Negativkontrolle verhältnismäßig stärkere Hochregulation nach 6 h zu 3 h im Vergleich zu den Ansätzen mit IL-15 nach 6 h zu 3 h beobachtet wurde. Auch für CCL5 konnte eine deutliche Reaktion auf *A. fumigatus* mit erhöhter Freisetzung gemessen werden. Insgesamt fielen in der Untergruppe der Chemokine im Vergleich zu den Zytokinen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  deutliche höhere Absolutwerte auf.

# 3.3 Produktion und Freisetzung ausgewählter Zytokine durch NK-Zellen nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen von *A. fumigatus*

Nachdem durch die Versuche unter Punkt 3.1 ein dosisabhängiger Effekt von *A. fumigatus* auf Zellmarker von NK-Zellen bestätigt werden konnte, ging es abschließend darum, ob daneben auch die Immunantwort mittels Signalmolekülen bei Konfrontation mit steigenden Pilzmengen entsprechend stärker ausfallen würde. Hierzu betrachtete man den Effekt verschiedener MOIs auf die Produktion und Freisetzung der zuvor *gescreenten* und ausgewählten Zytokine. Der Fokus lag v.a. auf der Untergruppe der im Zusammenhang mit NK-Zellen noch weniger untersuchten Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5, während man drei weitere Zytokine als Vergleich hierzu mitführte. Vorgegangen wurde dabei wie oben beschrieben mit Hinzugabe von IL-2 zu den NK-Zellen über Nacht und anschließender fehlender bzw. sechsstündiger Stimulation mit *A. fumigatus* der MOIs 0,125 bis 2.

## 3.3.1 MOI-abhängige mRNA-Expression von Zytokinen

Um einen Eindruck vom MOI-abhängigen Effekt auf die Immunreaktion durch NK-Zellen zu bekommen, isolierte man bei den jeweiligen Ansätzen zunächst RNA und führte qPCR-Analysen zur Bestimmung der Zytokinproduktion auf mRNA-Ebene durch. Die Ergebnisse sind relativ zur unstimulierten Negativprobe (-/-) dargestellt (siehe Abb. 14).



Abb. 14: Relative mRNA-Expression von Zytokinen durch NK-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen MOIs von *A. fumigatus* 

Die vier oben gezeigten Zytokine wiesen alle einen tendenziellen Anstieg der relativen mRNA-Expression nach Pilzkontakt auf, wobei sich v.a. die mRNA-Produktion für CCL4 und IFN- $\gamma$  MOI-abhängig verhielt. Bei den beiden in der unteren Reihe aufgeführten Zytokinen hingegen konnte eher ein Rückwärtstrend beobachtet werden – im Falle von CCL5 passend zu dem orientierenden *Screening*-Versuch. Insgesamt vermitteln die Ergebnisse den Eindruck, dass die Produktion der Chemokine eher MOI-abhängig sei – einzig MOI 1 fiel bei CCL3 und CCL5 leicht aus der Reihe – als die der Zytokine, welche hier auf der rechten Seite dargestellt werden.

Es erfolgte die Analyse nach 6 h mittels qPCR. Die Expression der mRNA in unstimulierten NK-Zellen (-/-) wurde auf den Wert "1" gesetzt. n=1

## 3.3.2 MOI-abhängige Zytokinfreisetzung

Zur Ergänzung wurden anschließend umfangreichere Analysen der Zytokinfreisetzung bei Konfrontation von NK-Zellen mit verschiedenen MOIs mittels ELISA durchgeführt (siehe Abb. 15).



Abb. 15: Freisetzung von Zytokinen durch NK-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen MOIs von *A. fumigatus* 

Die Analyse erfolgte nach 6 h mittels ELISA. Angegeben ist die jeweilige Anzahl der durchgeführten Experimente pro Zytokin. \*p<0,05

Die Chemokine CCL3, CCL4 und auch CCL5 zeigten bei dieser Analyse alle einen signifikanten, graduellen Anstieg der Freisetzung entsprechend steigender MOIs – im Falle von CCL4 bis zu 1000 pg/ml. Für CCL5 ergab sich somit eine Diskrepanz zwischen der zuvor beobachteten Herunterregulation auf mRNA-Ebene. Bei den Zytokinen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  ließ sich ebenfalls ein schrittweiser Anstieg der

Freisetzung erkennen, aber signifikante Unterschiede zu den unstimulierten NK-Zellen waren nur mit den höchsten MOIs feststellbar. Die INF- $\gamma$ -Freisetzung stieg insgesamt an, jedoch im Gegensatz zur Voruntersuchung der mRNA-Expression mit nur einem Spender ohne kontinuierliche Erhöhung entsprechend der MOIs. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Proteinfreisetzung aller Zytokine außer IFN- $\gamma$  und besonders deutlich sichtbar bei den Chemokinen graduell mit höheren MOIs anstieg.

# **4** Diskussion

NK-Zellen haben wichtige Funktionen sowohl für das angeborene als auch erworbene Immunsystem. Anders als T- und B-Zellen benötigen sie keinen primären Antigenkontakt und können so schneller auf Erreger reagieren. Außerdem gelten sie als Produzent einer Vielzahl an Zytokinen und können andere Immunzellen in der Frühphase einer Immunreaktion alarmieren. Neben der Fähigkeit zur Abtötung von mit Viren befallenen und entarteten Zellen, weiß man heute auch von der NK-Zell-Beteiligung bei weiteren Infektionserkrankungen und insbesondere ihrer antimykotischen Aktivität. So tragen sie zur Bekämpfung diverser Pilze bei – darunter A. fumigatus (Schmidt et al., 2017). Dieser ist aufgrund seiner Fähigkeit zur Sporulation ubiquitär in der Umgebungsluft verbreitet, wodurch der Mensch täglich mehrere hundert Konidien einatmet (van de Veerdonk et al., 2017). Trotz der Konfrontation mit dem Pilz und der hohen Pathogenität, kann eine Krankheitsentstehung normalerweise durch das Immunsystem verhindert werden. Bei Immunkomprimierten hingegen stellen Infektionen mit A. fumigatus ein relevantes Problem dar, wobei Patienten nach allogener HSCT mit einer IA-Inzidenz von 5 - 10% als besonders gefährdet gelten (Marr, 2008).

Im Hinblick darauf behandelt diese Arbeit die Interaktion von NK-Zellen mit *A. fumigatus* und ihre Rolle als Zytokinproduzenten. Es erfolgte die Stimulation von frisch aus peripherem Blut gesunder Spender isolierten und mit IL-2 vorbehandelten NK-Zellen durch den Pilz. Um zu bestimmen, inwieweit es zu einer Modulation der Immunantwort von NK-Zellen bei Konfrontation mit *A. fumigatus* kommen würde, wählte man verschiedene MOIs. Nach der durchflusszytometrischen Analyse bekannter Oberflächenmarker zur Definition geeigneter experimenteller Bedingungen und Prüfung auf Reproduzierbarkeit, sollten v.a. die Zytokinexpression und -freisetzung mittels (q)PCR bzw. ELISA gemessen werden. Aufgrund der Ergebnisse des *Screenings* lag der Schwerpunkt auf der Untergruppe der Chemokine.

Die Experimente wurden im Hinblick auf ihre klinische Bedeutung durchgeführt. Von Studien zur Rolle der NK-Zellen bei IA nach HSCT erhofft man sich neue Erkenntnisse bezüglich Diagnostik und Therapieoptimierung.

# 4.1 Vorbereitende Experimente zur Stimulation von NK-Zellen mit steigenden Konzentrationen von *A. fumigatus*

Zunächst ging es darum, die Expression bekannter Oberflächenmoleküle auf NK-Zellen bei Konfrontation mit verschiedenen Konzentrationen von *A. fumigatus* mittels durchflusszytometrischer Analyse zu prüfen. Es galt herauszufinden, ob der Pilzeffekt eine strenge MOI-Abhängigkeit zeigt, also eine höhere MOI gleichzeitig mit einer stärkeren Veränderung der Markerexpression assoziiert seien würde, oder ob bspw. ab einer bestimmten Pilzkonzentration kein weiterer Effekt mehr erzielt werden könne. Die Versuche dienten dazu, geeignete experimentelle Bedingungen für klinische Studien zu schaffen und die Reproduzierbarkeit solcher Untersuchungen zu evaluieren.

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden frisch isolierte NK-Zellen genutzt, über Nacht mit IL-2 inkubiert und anschließend mit *A. fumigatus* stimuliert. Man wählte eine MOI von 0 als Negativprobe bis 2 als stärkste Stimulation. Es wurden bereits zu Hyphen herankeimende Pilzstrukturen verwendet, bei denen die Hüllstruktur, welche die Konidien umgibt und die Erkennung von *A. fumigatus* durch Immunzellen verhindert (Aimanianda *et al.*, 2009), bereits abgebaut war. Um den tatsächlichen Pilzeffekt einordnen zu können, führte man außerdem Positivkontrollen mit IL-15-Stimulation mit.

# 4.1.1 MOI-abhängige Bindung und Aktivierung von NK-Zellen mittels CD56, CD69 und NKp30

Durch Oberflächenrezeptoren sind NK-Zellen in der Lage, direkt mit anderen Zellen zu interagieren. Dies umfasst die Bindung einer Zielzelle, die Erkennung eines Pathogens mittels PRR sowie schließlich die Aktivierung der NK-Zelle und direkte Entfaltung ihrer Zytotoxizität bzw. Alarmierung weiterer Immunzellen. Bspw. gelten TLRs (v.a. TLR-2 und TLR-4) als wichtige PRRs auf NK-Zellen. Die TLR-abhängige Freisetzung von α-Defensin konnte bereits gezeigt werden (Chalifour et al., 2004). Inwieweit es zwingend einer vorherigen kontaktabhängigen Aktivierung zur Ausübung der Zytotoxizität von NK-Zellen bedarf, ist noch nicht gänzlich geklärt. So wurde die Abtötung von A. fumigatus durch NK-Zellen ohne vorherige Kontaktaufnahme bereits beschrieben (Schmidt et al., 2011). Die Oberflächenrezeptoren und deren Expressionsmuster sind also entscheidend zur Charakterisierung des

Aktivierungszustandes von NK-Zellen nach Stimulation. Um die MOI-Abhängigkeit der NK-Zell-Aktivität ein erstes Mal zu testen, wählte man daher bekannte Markerproteine aus und führte FACS-Analysen zu deren Expression in Abhängigkeit steigender Konzentrationen von *A. fumigatus* durch.

CD56 ist ein wichtiges Oberflächenmolekül auf NK-Zellen und dient deren Unterscheidung von anderen Lymphozyten sowie zur Definition der beiden Subpopulationen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>. Ziegler et al. bewiesen vor Kurzem, dass mittels CD56 außerdem Pathogene gebunden werden können und dieses somit einen PRR auf NK-Zellen darstellt. Es zeigte sich durchflusszytometrisch eine signifikante Herunterregulation von CD56 bei Kontakt mit A. fumigatus unterschiedlicher Konzentrationen bis zu einer MOI von 0,75 (Ziegler et al., 2017). Vor diesem Hintergrund sollte die Messung der MOI-abhängigen CD56-Expression als eine Positivkontrolle für weitere Experimente dienen und mit Messungen bis zu MOI 2 erweitert werden. Dabei kam es zu einer signifikanten und der jeweiligen MOI entsprechenden, schrittweisen Herunterregulation von CD56 auf der NK-Zell-Oberfläche, was gleichzeitig eine graduelle Zunahme der an der Pilzbindung beteiligten und somit bei der FACS-Messung nicht detektierbaren CD56-Moleküle bedeutete. Bei den Experimenten von Ziegler et al. konnte weiterhin eine Verbindung zwischen der CD56-Bindung und dem Level der NK-Zell-Aktivierung und damit einhergehend der Zytokinproduktion hergestellt werden (Ziegler et al., 2017).

Da CD69 als wichtiger Aktivierungsmarker auf Immunzellen bekannt ist (Sancho *et al.*, 2005; Cibrián *et al.*, 2017), testete man anhand des CD69-Expressionsmusters konkret, ob neben der Bindung auch die Aktivierung der NK-Zellen MOI-abhängig geschah. Dies konnte bestätigt werden. In gleicher Weise wie es zur schrittweisen Herunterregulation von CD56 kam, erfolgte entsprechend steigender *A. fumigatus*-Konzentrationen eine graduelle Hochregulation von CD69 und somit NK-Zell-Aktivierung.

Auch NKp30 ist als Bindungsrezeptor für Pilze auf NK-Zellen beschrieben. Li *et al.* konfrontierten NK-Zellen mit steigenden Mengen an Zellwand- bzw. Zellmembranbestandteilen von *Cryptococcus* und konnten entsprechend eine verminderte NKp30-Expression messen (Li *et al.*, 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte FACS-Analyse hingegen zeigte nur eine geringe Herunterregulation von

NKp30 bei steigenden MOIs. Dennoch war der Unterschied im Falle der höchsten MOI von 2 signifikant verglichen mit der Messung der unstimulierten Negativkontrolle.

# 4.1.2 Relevanz hinsichtlich klinischer Studien und Reproduzierbarkeit der MOI-Versuche

Die klinische Relevanz von NK-Zellen bzgl. A. fumigatus-Infektionen wird v.a. bei Immunsupprimierten ersichtlich – insbesondere bei an Leukämie erkrankten Patienten nach HSCT, welche ein erhöhtes Risiko aufweisen, an IA zu erkranken. Als erste Lymphozytenpopulation bei der Immunrekonstruktion besitzen NK-Zellen neben einem potenten GvL-Effekt auch fungizide Eigenschaften (Vacca et al., 2016). Zusätzlich zu Experimenten in vitro und an Mausmodellen konnte die Bedeutung der Interaktion von NK-Zellen mit A. fumigatus für an IA Erkrankte auch anhand einer klinischen Studie demonstriert werden. Der Vergleich von HSCT-Patienten ohne IA und solchen mit Entwicklung einer IA zeigte, dass die NK-Zell-Zahlen bei ersteren früher als in der Gruppe der Erkrankten wieder Normwerte erreichten und dass eine NK-Zell-Erhöhung mit weniger Schäden durch A. fumigatus und einer besseren Heilungschance assoziiert war (Stuehler et al., 2015). Da dies für eine relevante klinische Rolle der NK-Zellen bei IA spricht, könnte eine genauere Analyse nicht nur quantitative, sondern auch funktionelle Unterschiede zwischen den NK-Zellen bei an IA erkrankten und nicht erkrankten Patienten nach HSCT herausstellen - bspw. das Expressionsmuster von Oberflächenmarkern oder die Zytokinfreisetzung in Bezug zur Pilzmenge betreffend.

Die Experimente zur Interaktion von NK-Zellen mit *A. fumigatus* in dieser Arbeit dienten als Voruntersuchungen für weitere klinische Studien. Hierzu war es interessant zu wissen, inwiefern sich unterschiedliche Pilzkonzentrationen auf NK-Zellen und deren Immunantwort auswirken würden. Ab einer MOI von 0,5 wurden optimale Effekte bei den FACS-Analysen des Markermoleküls CD56 erzielt, weshalb es sich empfiehlt, diese auch für zukünftige Experimente mit *A. fumigatus* zu nutzen. Die Spendervariabilität bei klinischen Studien mit variierenden Mengen an verfügbaren NK-Zellen erfordert mitunter die Verwendung von Zellkulturplatten verschiedener Größe und Zellkapazität. Anhand der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Messergebnisse dabei dennoch vergleichbar blieben mit einer der MOI entsprechenden graduellen Herunterregulation von CD56. Dies unter der Voraussetzung, dass in allen Fällen die

gleiche Zellzahl in Bezug zur Bodenfläche sowie die gleiche Bodenform verwendet wurde. Wählte man hingegen statt einer flachen Bodenform eine u- bzw. v-Form, so kam es zu einem stärkeren Kontakt zwischen NK-Zellen und *A. fumigatus*, was eine höhere effektive MOI bedeutete. So war es also möglich, Pilzeffekte entweder direkt durch die Erhöhung der Pilzkonzentration oder durch einen engeren Kontakt zu verstärken.

Ergänzend anzumerken ist, dass sich die Interaktion zwischen NK-Zellen und *A. fumigatus* nicht nur auf Reaktionen seitens der Immunzellen beschränkt, sondern auch Pilze immunsuppressive Wirkung besitzen (Stanzani *et al.*, 2005). So werden NK-Zellen bspw. durch *C. neoformans* in ihrer Produktion von GM-CSF und TNF- $\alpha$  gehemmt (Murphy *et al.*, 1997) und mittels Hitze abgetötete Hyphen und Hefen von *C. albicans* vermindern die Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen (Murciano *et al.*, 2006). Auch im Falle von *A. fumigatus* konnte man demonstrieren, dass dieser die Immunfunktion von NK-Zellen durch Herabregulation von GM-CSF und IFN- $\gamma$  negativ beeinträchtigt (Schmidt *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2016). Im Hinblick auf klinische Studien und Unterschiede der NK-Zellen bei Gesunden und an IA Erkrankten sollte daher immer bedacht werden, dass diese sowohl die Konsequenz als auch die Ursache für eine IA seien könnten (Stuehler *et al.*, 2015).

# 4.2 Auswahl relevanter Zytokine bei der Interaktion von NK-Zellen mit *A*. *fumigatus*

Nach der Aktivierung und Bindung von NK-Zellen kommt es zu einer Immunreaktion gegenüber *A. fumigatus*. NK-Zellen wirken dabei nicht nur zytotoxisch, sondern v.a. auch indirekt als Signalgeber für andere Immunzellen via Zytokinen. Dafür, dass dies sogar die entscheidende Funktion von NK-Zellen bei IA seien könnte, spricht die Beobachtung, dass Patienten mit isolierten NK-Zell-Defekten keine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Pilzinfektionen aufweisen und NK-Zellen somit ohne das Vorliegen einer Neutropenie eine weniger entscheidende Rolle zu spielen scheinen (Orange, 2006).

Den Schwerpunkt dieser Arbeit stellte somit die Charakterisierung relevanter Signalmoleküle dar. Nachdem in den vorbereitenden Experimenten auf Oberflächenmarker von NK-Zellen mit bekannter MOI-Abhängigkeit zurückgriffen

62

wurde, war zur Auswahl relevanter Zytokine und Chemokine für weitere biochemische MOI-Analysen zunächst ein *Screening* sinnvoll. Man nutzte hierzu die Erkenntnisse aus den Voruntersuchungen und führte dieses mit einer MOI von 0,5 durch. Zur differenzierten Betrachtung erfolgte eine zusätzliche Messung nach 3 h Stimulation.

Zytokine spielen bei Infektionen eine wichtige Rolle und dienen der Regulation der Immunantwort und der Feinabstimmung zwischen den verschiedenen Immunzellen. NK-Zellen gelten als wichtige Zytokinproduzenten v.a. von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Bekannt ist außerdem die Freisetzung von TNF-β, IL-5, IL-10, IL-13 sowie GM-CSF, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL8, CXCL10, XCL1 (Cooper et al., 2001; Robertson, 2002; Fauriat et al., 2010; Montaldo et al., 2012) (siehe 1.1.3). Bei der Abwehr von Pilzinfektionen sind Zytokine ebenfalls von Bedeutung. So stimulieren hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie GM-CSF die Reifung von phagozytierenden Zellen wie Neutrophilen oder Monozyten aus hämatopoetischen Vorläufern und deren Aktivität. Beteiligt sind auch T-Helfer-Zytokine wie IFN-y, IL2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13 und IL-18 sowie des Weiteren IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNF- α, TGF-β (Antachopoulos et al., 2005; Gafa et al., 2007; Fidan et al., 2008). Was die Bedeutung von Zytokinen speziell bei der Konfrontation von NK-Zellen mit A. fumigatus anbelangt, gilt INF-y als wichtiges Molekül und auch die Ausschüttung von TNF-a konnte gezeigt werden (Bouzani et al., 2011) (siehe 1.3.1). Darüber hinaus gab es lange Zeit wenige Daten.

Um eine Auswahl für das *Screening* zu treffen, wurden also bereits bei der NK-Zell-Abwehr und bei Pilzinfektionen bekannte Zytokine berücksichtigt sowie zusätzlich bei der Immunabwehr allgemein relevante und solche mit potentieller Bedeutung für die NK-Zell-Interaktion mit *A. fumigatus* wie bspw. IL-16 (siehe 1.1.3) getestet. Im *Screening* bzgl. der mRNA-Expression ergab sich nach Stimulation mit *A. fumigatus* ein Anstieg der Chemokine CCL3, CCL4, XCL1 und CXCL8 sowie der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und GM-CSF. Zur Veranschaulichung konnte dies exemplarisch bei den drei erst genannten Molekülen auch gelelektrophoretisch bestätigt werden. Signifikant herunterreguliert wurde hingegen nach 6 h die Produktion der mRNA von CCL5 sowie IL-16. Für die weiteren Experimente entschied man sich wegen der deutlichsten mRNA-Steigerung in den qPCR-Versuchen dazu, sich auf die Chemokine CCL3 und CCL4 zu konzentrieren. Als Vergleich zog man mit CCL5 ein weiteres CCL-Chemokin

heran, welches konträr eine Herunterregulation gezeigt hatte sowie die Zytokine IFN-y, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , deren Regulation bereits im Zusammenhang mit A. fumigatus bekannt war. Bei den ELISA-Versuchen ergab sich für alle gemessenen Signalmoleküle interessanterweise auch im Falle von CCL5 – eine gesteigerte Ausschüttung nach A. fumigatus-Stimulation. Die Absolutwerte der Chemokinkonzentrationen waren gegenüber den Zytokinkonzentrationen stark erhöht und überstiegen sie schon nach 3 h deutlich. Bereits bei den qPCR-Versuchen überwog bei den A. fumigatus-Ansätzen der 3 h-Wert für die Chemokine denjenigen der Zytokine. Dies ist im Einklang mit Beobachtungen von Fauriat et al., wonach die Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 schon in einer sehr frühen Phase der Immunantwort freigesetzt werden und hierzu schwache Aktivierungssignale und wenig Stimulation ausreichen, während die TNF-aund IFN-y-Produktion einer stärkeren Kontrolle ausgesetzt ist, eine komplexere Rezeptorinteraktion benötigt und tendenziell später stattfindet (Fauriat et al., 2010). Daher scheinen NK-Zellen einer Pilzinfektion schrittweise entgegenzuwirken mit einer frühen Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen, während die adaptive Immunität durch Zytokine erst im Falle einer persistierenden Infektion alarmiert wird. Vergleicht man bei der qPCR den Stimulationseffekt von IL-15 mit dem des Pilzes nach 3 h bzw. 6 h, zeigte sich die Wirkung von IL-15 recht schnell, während der deutlichste Effekt von A. fumigatus dennoch sowohl bei den Chemokinen als auch den Zytokinen erst nach 6 h Stimulation beobachtet werden konnte. Dann überstiegen die Messungen aller A. fumigatus-Proben der für die weiteren MOI-Versuche ausgewählten Moleküle diejenigen der Positivkontrollen mit IL-15. Auch Bouzani et al. beschrieben solch einen zeitabhängigen Effekt (Bouzani et al., 2011).

Vor Kurzem führten Schneider *et al.* ähnliche Versuche zur Zytokinexpression bei NK-Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus* durch. Übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit kam es hierbei zu einer Hochregulation der mRNA von IFN- $\gamma$ , GM-CSF, CCL3 und CCL4. Die Analyse der Zellkulturüberstände hingegen erbrachte eine nichtsignifikante Herunterregulation der IFN- $\gamma$ -, CCL3- und CCL4-Freisetzung (Schneider *et al.*, 2016). Auch für IFN- $\gamma$ , GM-CSF sowie CCL5 wurde zuvor gegensätzlich zu den hier gezeigten Daten im Falle der Zytokine eine Herunterregulation des Proteinlevels nach 6 h *A. fumigatus*-Stimulation sowie bei Letzterem keine veränderte Produktion beobachtet (Schmidt *et al.*, 2011). Erklären könnte man die divergierenden Ergebnisse mit der unterschiedlichen Vorbehandlung der NK-Zellen: Schneider *et al.* stimulierten die NK-Zellen zehn Tage lang alle drei Tage mit IL-2 1000 U/ml, bevor die Koinkubation mit *A. fumigatus* erfolgte. Im Falle des zytotoxischen Proteins Perforin diskutieren die Autoren, dass schon alleine durch solch eine Vorstimulation mit IL-2 relativ hohe extrazelluläre Perforinkonzentrationen resultieren und dass die anschließende Zugabe von *A. fumigatus* nur einen marginalen zusätzlichen Effekt auf die Perforinkonzentration ausüben würde. Der Gedanke liegt nahe, dies könnte nicht nur für Perforin gelten, sondern auch für die Zytokinproduktion generell. Eine IL-2 Vorstimulation nur über Nacht – wie in dieser Arbeit – würde so die NK-Zell-Aktivität nur initiieren und eine Erhöhung der IFN- $\gamma$ -, CCL3- und CCL4-Freisetzung durch *A. fumigatus*-Stimulation ermöglichen.

# 4.3 Charakterisierung der Immunantwort durch NK-Zellen bei Stimulation mit steigenden Konzentrationen von *A. fumigatus*

Da eine MOI-Abhängigkeit bekannter Marker auf NK-Zellen nach Konfrontation mit A. fumigatus in den Vorexperimenten bestätigt werden konnte und das anschließende Screening zur Detektion interessanter Signalmoleküle bei der NK-Zell-Interaktion mit sollten diese analog fumigatus beitrug, abschließend und **Z**11 den Α. Oberflächenproteinen in Abhängigkeit verschiedener Pilzkonzentrationen getestet werden. Die Frage war, ob es nach MOI-abhängiger Bindung und Aktivierung entsprechend auch zu einer an die A. fumigatus-Konzentration angepassten Zytokinfreisetzung kommen und eine höhere MOI gleichzeitig mit einer stärkeren Immunantwort assoziiert seien würde. Man entschied sich aufgrund der beobachteten deutlicheren Ergebnisse nach längerer Stimulationszeit für eine sechsstündige Inkubation. Der Schwerpunkt soll im Folgenden auf der Charakterisierung ausgewählter Chemokine mit ebenfalls an der Pilzabwehr beteiligten Zytokinen als Vergleich liegen.

# 4.3.1 Bedeutung der Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 und MOI-abhängige Produktion und Freisetzung

Entsprechend der ersten *Screening*-Untersuchungen sollten v.a. die Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 bezüglich ihrer Rolle bei der NK-Zell-Abwehr und MOI-abhängigen Ausschüttung näher betrachtet werden. Die im qPCR-*Screening* beobachtete Hochregulation von CCL3 und CCL4 sowie die geringe Herunterregulation von CCL5 nach Pilzstimulation bestätigten sich bei den MOI-Experimenten, wobei man hier zusätzlich demonstrieren konnte, dass dies im Falle von CCL3 und CCL5 tendenziell sowie bei CCL4 sogar streng abhängig von der *A. fumigatus*-Konzentration geschah. Die ELISA-Versuche wurden anschließend mit höheren Spenderzahlen durchgeführt und zeigten besonders deutlich für alle Chemokine – einschließlich CCL5 – einen signifikanten, klar graduellen Anstieg der Proteinfreisetzung entsprechend steigender MOIs von bis zu 1000 pg/ml bei CCL4.

Vorhergehende Studien betrachteten die Chemokinexpression durch andere Immunzellen bei Konfrontation mit A. fumigatus. So ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit eine mRNA-Hochregulation nach Pilzkontakt von CCL3 und CCL4 in DZ und Monozyten beschrieben (Steele et al., 2005; Cortez et al., 2006; Gafa et al., 2007; Morton et al., 2011; Morton et al., 2014). Zusätzlich wurden durch genetische Untersuchungen single nucleotide polymorphisms (SNPs) bei CCL3 und CCL4 detektiert, welche signifikant mit Pilzinfektionen korrelieren (Loeffler et al., 2010). Insbesondere CCL3 stellte sich in Tierstudien als entscheidend bei der Abwehr gegen A. fumigatus heraus (Gao et al., 1997; Shahan et al., 1998; Mehrad et al., 2000). Zusammen mit CCL4 und CCL5 ist CCL3 verantwortlich für die Rekrutierung verschiedener Immunzellen wie Monozyten, T-Zellen, Granulozyten, DZ und NK-Zellen (Schall et al., 1990; Lukacs et al., 1996; Menten et al., 2002; Le et al., 2004). CCL3 und CCL4 spielen also eine wichtige Rolle bei der Organisation einer schnellen antimykotischen Immunantwort gegen A. fumigatus. Die MOI-Versuche bestätigen zusätzlich, wie präzise die Alarmierung durch NK-Zellen bei A. fumigatus-Infektionen geschieht und genau auf die jeweilige Pilzmenge abgestimmt verläuft.

Studien bzgl. der CCL5-Expression und -Freisetzung durch Immunzellen hingegen zeigen tlw. weniger stimmige Ergebnisse. Während die mRNA in DZ hochreguliert wird, ist das zugehörige Protein nach 20 h Ko-Kultivierung mit *A. fumigatus* kaum
detektierbar. In Monozyten kommt es zu einer Herunterregulation der mRNA -Expression und -Freisetzung von CCL5 (Cortez et al., 2006; Gafa et al., 2007; Morton et al., 2011; Morton et al., 2014). Thrombozyten hingegen zeigen eine Erhöhung der Freisetzung von CCL5-Protein nach A. fumigatus-Stimulation (Rødland et al., 2010). Die Resultate sowohl bei den Screening- als auch den MOI-Versuchen dieser Arbeit mit Herunterregulation von CCL5 auf mRNA-Ebene sowie deutlich erhöhter Proteinfreisetzung demonstrieren also Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede im Vergleich zu anderen Abwehrzellen bei der Signalübermittlung via CCL5. Anzumerken ist, dass die CCL5-Expression in T-Zellen vor ca. 20 Jahren intensiv analysiert wurde hauptsächlich aufgrund eines anti-HIV-Effektes, jedoch auch wegen der charakteristischen späten Expression des CCL5-Genes (Song et al., 2000). Dies könnte die geringfügige CCL5-Herunterregulation zu einem frühen Analysezeitpunkt wie hier nach 6 h begründen. Daneben gibt es andere mögliche Erklärungen für die Ergebnisse dieser Arbeit. Bspw. enthalten ruhende Maus-NK-Zellen wenig Perforin- und Granzyme B-Protein, während die korrespondierende mRNA in großen Mengen vorliegt. Bei Aktivierung wird die bereits vorhandene mRNA translatiert, während es nur zu geringfügigen Änderungen der mRNA-Menge kommt (Fehniger et al., 2007). Es ist möglich, dass dies im Falle von CCL5 ähnlich geschieht. Alternativ könnten NK-Zellen initial bei Erkennung von A. fumigatus ihre CCL5-Granula entleeren und die Pilzinfektion im weiteren Verlauf mittels Expression anderer Zytokine als CCL5 bekämpfen. Es wäre für weitere Studien von Interesse, ob und wenn ja wann das Expressionslevel von CCL5 nach erfolgter Stimulation wieder ansteigen würde.

#### 4.3.2 IFN-γ, TNF-α und IL-1α als bekannte Zytokine bei der Pilzabwehr

Um einen Vergleich zu den Chemokinen zu haben, führte man die gleichen Analysen auch mit den Zytokinen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  durch. Während bei den qPCR-Versuchen zur MOI mit nur einem Spender IFN- $\gamma$  als einziges Zytokin graduell anzusteigen schien und IL-1 $\alpha$  sogar tendenziell herunterreguliert wurde, kam es bei den ELISAs insgesamt zu einem Anstieg der Proteinausschüttung. Dies geschah jedoch nicht streng MOI-abhängig wie bei den Chemokinen. Zudem fielen die Absolutkonzentrationen deutlich geringer aus und vermutlich deshalb war der Unterschied zur Freisetzung durch unstimulierte NK-Zellen nur bei den höchsten A. *fumigatus*-Konzentrationen signifikant.

IFN-γ gilt als Hauptaktivator von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen und verstärkt die TH1-Immunantwort. Frühere Studien zeigten bereits vorteilhafte Effekte von IFN-y bei A. fumigatus-Infektionen (Maheshwari et al., 1988; Shao et al., 2005; Bandera et al., 2008). In einem neutropenen Mausmodell konnte man speziell die Bedeutung der schnellen INF-y-Produktion durch NK-Zellen bei IA demonstrieren. Bei Mäusen, die man einer NK-Zell-Depletion unterzog und anschließend mit einer letalen Dosis A. fumigatus infizierte, führte nur der Transfer von NK-Zellen von Mäusen des Wildtypes – nicht jedoch von INF-y-defizienten Mäusen – zur Wiederherstellung der antimykotischen Immunität (Park et al., 2009). Der protektive Effekt schien dabei mit der Funktion von NK-Zellen als Alarmgeber und einer durch INF-y induzierten Aktivitätssteigerung von Makrophagen und weiteren Immunzellen assoziiert zu sein. Bouzani *et al.* demonstrierten, dass durch NK-Zellen freigesetztes IFN-γ darüber hinaus auch einen direkt fungiziden Effekt hat. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Studie konnte dabei die mRNA-Expression von IFN-y bereits nach 6 h gemessen werden. Das IFN- $\gamma$ -Protein hingegen wurde nur gering freigesetzt, bevor es nach 12 h deutlich im Überstand der NK-Zellen vorhanden war.

Auch im Falle von TNF- $\alpha$  ist in anderen Immunzellen wie DZ und Monozyten bereits eine Hochregulation der mRNA nach Kontakt mit *A. fumigatus* bekannt (Steele *et al.*, 2005; Cortez *et al.*, 2006; Gafa *et al.*, 2007; Morton *et al.*, 2011; Morton *et al.*, 2014). In der zuvor beschriebenen Studie zum fungiziden Effekt von IFN- $\gamma$  analysierte man auch die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung durch NK-Zellen und stellte schon nach 6 h eine erhöhte mRNA-Expression und – anders als für IFN- $\gamma$  und wie bei dieser Arbeit – auch eine gesteigerte Proteinfreisetzung fest (Bouzani *et al.*, 2011). Weiterhin konnten genetische Studien auch bei TNF- $\alpha$  eine Korrelation zwischen SNPs und TNFR2 sowie dem Risiko einer Erkrankung durch *A. fumigatus* zeigen (Ok *et al.*, 2011).

IL-1 $\alpha$  stellt ein wesentliches Zytokin bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Infektionen dar. Im Hinblick auf antimykotische Effekte ist IL-1 $\alpha$  entscheidend für die Leukozytenrekrutierung bei einer pulmonalen *A. fumigatus*-Infektion (Mayer-Barber *et al.*, 2017), bewirkt die antimikrobielle Peptidexpression in Epithelzellen (Bando *et al.*, 2007) und gilt als Hauptkoordinator bei der Bekämpfung von *C. albicans* durch Neutrophile (Altmeier *et al.*, 2016). Effekte von IL-1 $\alpha$  konnten bereits ab Konzentrationen um 10 pg/ml erkannt werden (Eigenbrod *et al.*, 2008), was geringer als die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Konzentration ist.

Zusammenfassend ist die Hochregulation der mRNA-Expression und die – nach Bouzani *et al.* bei IFN- $\gamma$  leicht zeitversetzt im Verlauf (Bouzani *et al.*, 2011) folgende – Proteinfreisetzung der drei hier analysierten Zytokine als essentieller Beitrag zur Immunantwort gegen *A. fumigatus* anzusehen. Dabei erfolgte die Ausschüttung der Zytokine in Übereinstimmung mit Fauriat *et al.* (siehe 1.1.3 und 4.2) nicht nur später als bei den Chemokinen, sondern auch weniger MOI-abhängig und war erst bei höheren Pilzmengen signifikant.

#### 4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit diente der Charakterisierung der Immunantwort humaner NK-Zellen bei Konfrontation mit *A. fumigatus* anhand der Analyse von Oberflächenmarkern und schwerpunktmäßig von Zytokinen mit der Untergruppe der Chemokine unter Berücksichtigung verschiedener MOIs. Künftige Untersuchungen werden wichtig sein, um die aus diesen Vorarbeiten gewonnenen Erkenntnisse zu erweitern und einen Nutzen für die klinische Praxis zu gewinnen. Zur Verbesserung der Heilungschancen von IA sollte v.a. auch auf die Optimierung von diagnostischen Möglichkeiten sowie das Etablieren neuer Therapieoptionen hingearbeitet werden.

Dabei wären Marker hilfreich, um idealerweise bereits die Entstehung einer IA zu erkennen und so früh eine Prophylaxe zu initiieren bzw. bei bereits an IA Erkrankten den Erfolg einer antimykotischen Therapie zu überwachen. Im Hinblick auf die Ergebnisse von Stuehler *et al.* (siehe 1.3.2 und 4.1.2) könnte die Bestimmung der NK-Zell-Menge bei HSCT-Patienten eine einfach in die Praxis umzusetzende Möglichkeit hierfür sein. Diese war bei den Untersuchungen bereits vor der Entstehung einer IA erniedrigt und bei Krankheitsausbruch mit den Heilungschancen assoziiert. Neben einem solch quantitativen Monitoring wäre es auch interessant, die NK-Zellen von Gesunden und IA-Patienten qualitativ, also funktionell zu vergleichen. Hierzu könnte man Oberflächenmoleküle sowie relevante NK-Zell-Zytokine, wie sie in dieser Arbeit analysiert wurden, heranziehen. Insbesondere CCL4, welches dosisabhängig schon nach kurzer Stimulationszeit in hohen Absolutkonzentrationen freigesetzt wurde, scheint als

solch ein Marker für die NK-Zell-Aktivierung und -Funktion in Frage zu kommen. So wäre von Interesse, ob bei IA eine geringere Aktivierung von NK-Zellen festzustellen ist.

Weiterhin unternahm man bereits Versuche, das Immunsystem von Patienten nach allogener HSCT durch den adoptiven Transfer diverser Spender-Immunzellen sowie von Zytokinen, Interferonen und Wachstumsfaktoren zu stärken und so die Entstehung invasiver Pilzinfektionen zu verhindern bzw. besser bekämpfen zu können (Lehrnbecher *et al.*, 2013). Insbesondere der NK-Zell-Transfer scheint aufgrund der Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen und Infektionserregen eine interessante Option mit gleichzeitig guter Verträglichkeit. Anders als bei T-Zellen besteht hier kein Risiko der Entstehung einer GvHD (Mehta *et al.*, 2018). Neben dem Versuch im Mausmodell (Park *et al.*, 2009) konnten bereits erste klinische Studien an Leukämiepatienten erfolgreich durchgeführt werden mit einer signifikanten Reduktion von Erkrankungsrückfällen, einer längeren Überlebenszeit und weniger Todesfällen als in der Vergleichsgruppe (Ruggeri *et al.*, 2007; Rubnitz *et al.*, 2010). Im Zusammenhang mit den Erkenntnissen dieser Arbeit wären außerdem Studien zum NK-Zell-Transfer insbesondere bei HSCT-Patienten mit IA und Fokus auf dem protektiven Effekt durch deren Zytokinfreisetzung interessant.

# 5 Zusammenfassung

NK-Zellen werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet und besitzen neben den zytotoxischen Eigenschaften gegenüber Tumorerkrankungen auch eine wichtige Rolle bei Pilzinfektionen wie der durch *A. fumigatus* hervorgerufenen IA, welche gehäuft bei immunsupprimierten Patienten nach HSCT auftritt.

Diese Arbeit diente der differenzierten Charakterisierung der Immunantwort von NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus*. Bzgl. der untersuchten Oberflächenmarker wurden bestehende Ergebnisse zu CD56 und NKp30 geprüft sowie die MOI-abhängige Bindung und Aktivierung von NK-Zellen via CD69 demonstriert. Im Hinblick auf künftige klinische Studien ist ab der Verwendung einer MOI von 0,5 mit einer ausreichenden Stimulation von NK-Zellen zu rechnen. Weiterhin ist davon auszugehen, dass im Falle unterschiedlicher Zellmengen bei Verwendung verschieden großer Zellkulturplatten – unter Berücksichtigung der selben Zellzahl pro Bodenfläche sowie Bodenform – die Vergleichbarkeit zwischen Spendern erhalten bleibt. Soll eine Verstärkung des Pilzeffektes erzielt werden, ist es entweder möglich eine höhere MOI auszuwählen oder den Kontakt zwischen NK-Zellen und Pilz durch andere Zellkulturplattenformen zu erhöhen.

Bei der immunregulatorischen Funktion von NK-Zellen als eine der ersten Alarmgeber für weitere Abwehrzellen, konnte man die entscheidende Beteiligung der Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 zeigen. Hier kam es nach Stimulation mit *A. fumigatus* früher und stärker zur Expression und Freisetzung als bei den Zytokinen, welche für die Rekrutierung der adaptiven Immunabwehr im Falle einer Persistenz der Pilzinfektion zuständig sind. Durch Konfrontation mit höheren Pilzkonzentrationen war eine graduelle Steigerung der Chemokinfreisetzung und somit eine Modulation der Immunantwort zu beobachten. Daher wurde nicht nur die Information über die Präsenz von *A. fumigatus* vermittelt, sondern auch bzgl. der Menge des Pathogens.

Die Ergebnisse zum MOI-abhängigen Verhalten von NK-Zellen gegenüber *A. fumigatus* bestätigen deren Relevanz bei der antimykotischen Immunantwort und verdeutlichen, weshalb ihnen zunehmende diagnostische und therapeutische Bedeutung bei der Entwicklung und dem Verlauf einer IA in immunkomprimierten Patienten nach HSCT zukommt. Künftige klinische Patientenstudien können auf den Erkenntnissen dieser Arbeit aufbauen.

# 6 Literaturverzeichnis

Agaugué, S.; Marcenaro, E.; Ferranti, B.; Moretta, L.; Moretta, A.: Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2008, 112(5): S. 1776-83

Aimanianda, V.; Bayry, J.; Bozza, S.; Kniemeyer, O.; Perruccio, K.; Elluru, S. R.; Clavaud, C.; Paris, S.; Brakhage, A. A.; Kaveri, S. V.; Romani, L.; Latgé, J. P.: Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*. 2009, 460(7259): S. 1117-21

Altmeier, S.; Toska, A.; Sparber, F.; Teijeira, A.; Halin, C.; LeibundGut-Landmann, S.: IL-1 Coordinates the Neutrophil Response to C. albicans in the Oral Mucosa. *PLoS Pathog.* 2016, 12(9). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005882

Antachopoulos, C.; Roilides, E.: Cytokines and fungal infections. *Br. J. Haematol.* 2005, 129(5): S. 583-96

Balakin, K. V.; Ivanenkov, Y. A.; Tkachenko, S. E.; Kiselyov, A. S.; Ivachtchenko, A.V.: Regulators of chemokine receptor activity as promising anticancer therapeutics.*Curr. Cancer Drug Targets*. 2008, 8(4): S. 299-340

Bandera, A.; Trabattoni, D.; Ferrario, G.; Cesari, M.; Franzetti, F.; Clerici, M.; Gori, A.: Interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony stimulating factor therapy in three patients with pulmonary aspergillosis. *Infection*. 2008, 36(4): S. 368-73

Bando, M.; Hiroshima, Y.; Kataoka, M.; Shinohara, Y.; Herzberg, M. C.; Ross, K. F.; Nagata, T.; Kido, J.: Interleukin-1alpha regulates antimicrobial peptide expression in human keratinocytes. *Immunol. Cell. Biol.* 2007, 85(7): S. 532-7

Barnes, P. D.; Marr, K. A.: Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Br. J. Haematol.* 2007, 139(4): S. 519-31

Bazan, J. F.; Bacon, K. B.; Hardiman, G.; Wang, W.; Soo, K.; Rossi, D.; Greaves, D.
R.; Zlotnik, A.; Schall, T. J.: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1977, 385(6617): S. 640-4

Ben-Ami, R.; Lewis, R. E.; Kontoyiannis, D. P.: Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of Aspergillus fumigatus infection. *Br. J. Haematol.* 2010, 150(4): S. 406-17

Bouzani, M.; Ok, M.; McCormick, A.; Ebel, F.; Kurzai, O.; Morton, C. O.; Einsele, H.; Loeffler, J.: Human NK cells display important antifungal activity against Aspergillus fumigatus, which is directly mediated by IFN-γ release. *J. Immunol.* 2011, 187(3): S. 1369-76

Braud, V. M.; Allan, D. S.; O'Callaghan, C. A.; Söderström, K.; D'Andrea, A.; Ogg, G. S.; Lazetic, S.; Young, N. T.; Bell, J. I.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L.; McMichael, A. J.: HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998, 391(6669): S. 795-9

Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A.; Levitz, S. M.; Netea, M. G.; White, T. C.: *Sci. Transl. Med.* 2012, 4(165). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404

Bryceson, Y. T.; Long, E. O.: Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr. Opin. Immunol.* 2008, 20(3): S. 344-52

Caligiuri, M. A.: Human natural killer cells. Blood. 2008, 112(3): S. 461-9

Center, D. M.; Berman, J. S.; Kornfeld, H.; Theodore, A. C.; Cruikshank, W. W.: The lymphocyte chemoattractant factor. *J. Lab. Clin. Med.* 1995, 125(2): S. 167-72

Chalifour, A.; Jeannin, P.; Gauchat, J. F.; Blaecke, A.; Malissard, M.; N'Guyen, T.; Thieblemont, N.; Delneste, Y.: Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood.* 2004, 104(6): S. 1778-83

Cibrián, D.; Sánchez-Madrid, F.: CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.* 2017, 47(6): S. 946-53

Commins, S. P.; Borish, L.; Steinke, J. W.: Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 125(2): S. 53-72

Cooper, M. A.; Fehniger, T. A.; Caligiuri, M. A.: The biology of human natural killercell subsets. *Trends Immunol*. 2001, 22(11): S. 633-40

Cornely, O. A.; Maertens, J.; Winston, D. J.; Perfect, J.; Ullmann, A. J.; Walsh, T. J.; Helfgott, D.; Holowiecki, J.; Stockelberg, D.; Goh, Y. T.; Petrini, M.; Hardalo, C.; Suresh, R.; Angulo-Gonzalez, D.: Posaconazole vs. fluconazole or itrconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 2007, 356(4): S. 348-59

Cortez, K. J.; Lyman, C. A.; Kottilil, S.; Kim, H. S.; Roilides, E.; Yang, J.; Fullmer, B.; Lempicki, R.; Walsh, T. J.: Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to Aspergillus fumigatus. *Infect. Immun.* 2006, 74(4): S. 2353-65

Cramer, R. A.; Rivera, A.; Hohl, T. M.: Immune response against Aspergillus fumigatus: what have we learned? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2011, 24(4): S. 315-22

Culley, F. J.: Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology*. 2009, 128(2): S. 151-63

Cunha, C.; Kurzai, O.; Löffler, J.; Aversa, F.; Romani, L.; Carvalho, A.: Neutrophil responses to aspergillosis: new roles for old players. *Mycopathologia*. 2014, 178(5-6): S. 387-93

Dagenais, T. R.; Keller, N. P.: Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009, 22(3): S. 447-65

Darnell, J. E. Jr.; Kerr, I. M.; Stark, G. R.: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994, 264(5164): S. 1415-21

Del Zotto, G.; Marcenaro, E.; Vacca, P.; Sivori, S.; Pende, D.; Della Chiesa, M.; Moretta, F.; Ingegnere, T.; Mingari, M. C.; Moretta, A.; Moretta, L.: Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2017, 92(2): S. 100-114

Eigenbrod, T.; Park, J. H.; Harder, J.; Iwakura, Y.; Núñez, G.: Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha release from dying cells. *J. Immunol.* 2008, 181(12): S. 8194-8

Falvey, D. G.; Streifel, A. J.: Ten-year air sample analysis of Aspergillus prevalence in a university hospital. *J. Hosp. Infect.* 2007, 67(1): S. 35-41

Fauci, A. S.; Mavilio, D.; Kottilil, S.: NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat. Rev. Immunol.* 2005, 5(11): S. 835-43

Fauriat, C.; Long, E. O.; Ljunggren, H. G.; Bryceson, Y. T.: Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010, 115(11): S. 2167-76

Fehniger, T. A.; Cai, S. F.; Cao, X.; Bredemeyer, A. J.; Presti, R. M.; French, A. R.; Ley, T. J.: Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a preexisting pool of granzyme B and perform mRNAs. *Immunity*. 2007, 26(6): S. 798-811

Fidan, I.; Kalkanci, A.; Bolat, S.; Yesilyurt, E.; Erdal, B.; Yolbakan, S.; Kustimur, S.; Imir, T.: Expression of the surface antigens of lymphocytes and the levels of cytokines in mice infected with Aspergillus fumigatus. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2008, 2(1): S. 34-9

Gafa, V.; Remoli, M. E.; Giacomini, E.; Gagliardi, M. C.; Lande, R.; Severa, M.; Grillot, R.; Coccia, E. M.: In vitro infection of human dendritic cells by Aspergillus fumigatus conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment. *Microbes Infect.* 2007, 9(8): S. 971-80

Gao, J. L.; Wynn, T. A.; Chang, Y.; Lee, E. J.; Broxmeyer, H. E.; Cooper, S.; Tiffany, H. L.; Westphal, H.; Kwon-Chung, J.; Murphy, P. M.: Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J. Exp. Med.* 1997, 185(11): S. 1959-68

Gazzinelli, R. T.; Hieny, S.; Wynn, T. A.; Wolf, S.; Sher, A.: Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993, 90(13): S. 6115-9

Guth, A. M.; Janssen, W. J.; Bosio, C. M.; Crouch, E. C.; Henson, P. M.; Dow, S. W.: Lung environment determines unique phenotype of alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2009, 296(6): L936-46

Hedrick, J. A.; Saylor, V.; Figueroa, D.; Mizoue, L.; Xu, Y.; Menon, S.; Abrams, J.; Handel, T.; Zlotnik, A.: Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J. Immunol.* 1997, 158(4): S. 1533-40

Heinekamp, T.; Schmidt, H.; Lapp, K.; Pähtz, V.; Shopova, I.; Köster-Eiserfunke, N.; Krüger, T.; Kniemeyer, O.; Brakhage, A. A.: Interference of Aspergillus fumigatus with the immune response. *Semin. Immunopathol.* 2015, 37(2): S. 141-52

Ibrahim-Granet, O.; Philippe, B.; Boleti, H.; Boisvieux-Ulrich, E.; Grenet, D.; Stern, M.; Latgé, J. P.: Phagocytosis and intracellular fate of Aspergillus fumigatus conidia in alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 2003, 71(2): S. 891-903

Ivarsson, M. A.; Michaëlsson, J.; Fauriat, C.: Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front. Immunol.* 2014, 5. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00184

Janeway, C. A. Jr.; Medzhitov, R.: Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20: S. 197-216

Kärre, K.; Ljunggren, H. G.; Piontek, G.; Kiessling, R.: Selective rejection of H-2deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 2008, 319(6055): S. 675-8

Kelly, M. N.; Zheng, M.; Ruan, S.; Kolls, J.; D'Souza, A.; Shellito, J. E.: Memory CD4+ T cells are required for optimal NK cell effector functions against the opportunistic fungal pathogen Pneumocystis murina. *J. Immunol.* 2013, 190(1): S. 285-95

Kheav, V. D.; Busson, M.; Scieux, C.; Peffault de Latour, R.; Maki, G.; Haas, P.; Mazeron, M. C.; Carmagnat, M.; Masson, E.; Xhaard, A.; Robin, M.; Ribaud, P.; Dulphy, N.; Loiseau, P.; Charron, D.; Socié, G.; Toubert, A.; Moins-Teisserenc, H.: Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2014, 99(12): S. 1860-7

Kiessling, R.; Klein, E.; Wigzell, H.: "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 1975, 5(2): S. 112-7

Kiessling, R; Klein, E; Pross, H; Wigzell, H.: "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* 1975, 5(2): S. 117-21

Knowles, M. R.; Boucher, R. C.: Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* 2002, 109(5): S. 571-7

Kwon-Chung, K. J.; Sugui, J. A.: Aspergillus fumigatus – what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog.* 2013, 9(12). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003743

Laberge, S.; Cruikshank, W. W.; Beer, D. J.; Center, D. M.: Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. *J. Immunol.* 1996, 156(1): S. 310-5

Lanier, L. L.: Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 2008, 9(5): S. 495-502

Lass-Flörl, C.; Roilides, E.; Löffler, J.; Wilflingseder, D.; Romani, L.: Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses.* 56(4): S. 403-13

Latgé, J. P.: Aspergillus fumigatus and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12(2): S. 310-50

Latgé, J. P.: The pathobiology of Aspergillus fumigatus. *Trends Microbiol*. 2001, 9(8): S. 382-9

Le, Y.; Zhou, Y.; Iribarren, P.; Wang, J.: Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell. Mol. Immunol.* 2004, 1(2): S. 95-104

Lei, Y.; Takahama, Y.: XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect.* 2012, 14(3): S. 262-7

Lehrnbecher, T.; Kalkum, M.; Champer, J.; Tramsen, L.; Schmidt, S.; Klingebiel, T.: Immunotherapy in invasive fungal infection – focus on invasive aspergillosis. *Curr. Pharm. Des.* 2013, 19(20): S. 3689-712

Li, S. S.; Kyei, S. K.; Timm-McCann, M.; Ogbomo, H.; Jones, G. J.; Shi, M.; Xiang, R. F.; Oykhman, P.; Huston, S. M.: Islam, A.; Gill, M. J.; Robbins, S. M.; Mody, C. H.: The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients. *Cell Host Microbe*. 2013, 14(4): S. 387-97

Lin, S. J.; Schranz, J.; Teutsch, S. M.: Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 32(3): S. 358-66

Lodoen, M. B.; Lanier, L. L.: Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 2006, 18(4): S. 391-8

Loeffler, J.; Ok, M.; Morton, O. C.; Mezger, M.; Einsele, H.: Genetic polymorphisms in the cytokine and chemokine system: their possible importance in allogeneic stem cell transplantation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010, 341: S. 83-96

Lukacs, N. W.; Standiford, T. J.; Chensue, S. W.; Kunkel, R. G.; Strieter, R. M.; Kunkel, S. L.: C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 1996, 60(5): S. 573-8

Luther, S. A.; Cyster, J. G.: Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2001, 2(2): S. 102-7

Madan, T.; Kishore, U.; Singh, M.; Strong, P.; Hussain, E. M.; Reid, K. B.; Sarma, P. U.: Protective role of lung surfactant protein D in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* 2001, 69(4): S. 2728-31

Maheshwari, R. K.; Tandon, R. N.; Feuillette, A. R.; Mahouy, G.; Badillet, G.; Friedman, R. M.: Interferon inhibits Aspergillus fumigatus growth in mice: an activity against an extracellular infection. *J. Interferon Res.* 1988, 8(1): S. 35-44

Marcenaro, E.; Della Chiesa, M.; Bellora, F.; Parolini, S.; Millo, R.; Moretta, L.; Moretta, A.: IL-12 or IL4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J. Immunol.* 2005, 174(7): S. 3992-8

Margalit, A.; Kavanagh, K.: The innate immune response to Aspergillus fumigatus at the alveolar surface. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015, 39(5): S. 670-87

Marr, K. A.: Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med. Mycol.* 2008, 46(4): S. 293-302

Maurer, M.; von Stebut, E.: Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004, 36(10): S. 1882-6

Mayer-Barber, K. D.; Yan, B.: Clash of the Cytokine Titans: counter-regulation of interleukin-1 and type I interferon-mediated inflammatory responses. *Cell. Mol. Immunol.* 2017, 14(1): S. 22-35

Mehrad, B.; Moore, T. A.; Standiford, T. J.: Macrophage inflammatory protein-1 alpha is a critical mediator of host defense against ivasive pulmonary aspergillosis in neutropenic hosts. *J. Immunol.* 2000, 165(2): S. 962-8

Mehta, R. S.; Randolph, B.; Daher, M.; Rezvani, K.: NK cell therapy for hematologic malignancies. *Int. J. Hematol.* 2018, 107(3): S. 262-270

Mehta, R. S.; Rezvani, K.: Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence*. 2016, 7(8): S. 901-16

Menten, P.; Wuyts, A.; Van Damme, J.: Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002, 13(6): S. 455-81

Montaldo, E.; Vitale, C.; Cottalasso, F.; Conte, R.; Glatzer, T.; Ambrosini, P.; Moretta, L.; Mingari, M. C.: Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood*. 2012, 119(17): S. 3987-96

Moretta, L.; Pietra, G.; Montaldo, E.; Vacca, P.; Pende, D.; Falco, M.; Del Zotto, G.; Locatelli, F.; Moretta, A.; Mingari, M. C.: Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors. *Front. Immunol.* 2014, 5. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00087

Morrison, B. E.; Park, S. J.; Mooney, J. M.; Mehrad, B.: Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. *J. Clin. Invest.* 2003, 112(12): S. 1862-70

Morton, C. O.; Bouzani, M.; Loeffler, J.; Rogers, T. R.: Direct interaction studies between Aspergillus fumigatus and human immune cells; what have we learned about pathogenicity and host immunity? *Front. Microbiol.* 2012, 3. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00413

Morton, C. O.; Fliesser, M.; Dittrich, M.; Mueller, T.; Bauer, R.; Kneitz, S.; Hope, W.; Rogers, T. R.; Einsele, H.; Loeffler, J.: Gene expression profiles of human dendritic cells interacting with Aspergillus fumigatus in a bilayer model of the alveolar epithelium/endothelium interface. *PLoS One.* 2014, 9(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098279 Morton, C. O.; Varga, J. J.; Hornbach, A.; Mezger, M.; Sennefelder, H.; Kneitz, S.; Kurzai, O.; Krappmann, S.; Einsele, H.; Nierman, W. C.; Rogers, T. R.; Loeffler, J.: The temporal dynamics of differential gene expression in Aspergillus fumigatus interacting with human immature dendritic cells in vitro. *PLoS One.* 2011, 6(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016016

Moser, B.; Loetscher, P.: Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* 2001, 2(2): S. 123-8

Murciano, C.; Villamón, E.; O'Connor, J. E.; Gozalbo, D.; Gil, M. L.: Killed Candida albicans yeasts and hyphae inhibit gamma interferon release by murine natural killer cells. *Infect. Immun.* 2006, 74(2): S. 1403-6

Murphy, J. W.; Zhou, A.; Wong, S. C.: Direct interactions of human natural killer cells with Cryptococcus neoformans inhibit granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha production. *Infect. Immun.* 1997, 65(11): S. 4564-71

Murphy, K.; Weaver, C.: Janeway Immunologie. *Springer Spektrum* 2018. ISBN 978-3-662-56003-7

Narni-Mancinelli, E.; Vivier, E.; Kerdiles, Y. M.: The ,T-cell-ness' of NK cells: unexpected similarities between NK cells and T cells. *Int. Immunol.* 2011, 23(7): S. 427-31

Ochs, M.: Knudsen, L.; Allen, L.; Stumbaugh, A.; Levitt, S.; Nyengaard, J. R.; Hawgood, S.: GM-CSF mediates alveolar epithelial type II cell changes, but not emphysema-like pathology, in SP-D-deficient mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2004, 287(6). https://doi.org/10.1152/ajplung.00137.2004

O'Gorman, C. M.; Fuller, H.; Dyer, P. S.: Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus. *Nature*. 2009, 457(7228): S. 471-4

Ok, M.; Einsele, H.; Loeffler, J.: Int. J. Med. Microbiol. 2011, 301(5): S. 445-52

Orange, J. S.: Human natural killer cell deficiencies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 6(6): S. 399-409

Orange, J. S.; Wang, B.; Terhorst, C.; Biron, C. A.: Requirement for natural killer cellproduced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* 1995, 182(4): S. 1045-56

Paris, S.; Debeaupuis, J. P.; Crameri, R.; Carey, M.; Charlès, F.; Prévost, M. C.; Schmitt, C.; Philippe, B.; Latgé, J. P.: Conidial hydrophobins of Aspergillus fumigatus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69(3): S. 1581-8

Park, S. J.; Hughes, M. A.; Burdick, M.; Strieter, R. M.; Mehrad, B.: Early NK cellderived IFN-{gamma} is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J. Immunol.* 2009, 182(7): S. 4306-12

Park, S. J.; Mehrad, B.: Innate immunity to Aspergillus species. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009, 22(4): S. 535-51

Passera, E.; Rizzi, A.; Robustellini, M.; Rossi, G.; Della Pona, C.; Massera, F.; Rocco,G.: Pulmonary aspergilloma: clinical aspects and surgical treatment outcome. *Thorac.Surg. Clin.* 2012, 22(3): S. 345-61

Person, A. K.; Kontoyiannis, D. P.; Alexander, B. D.: Fungal infections in transplant and oncology patients. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2011, 25(1): S. 193-213

Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29(9). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886

Richardson, M. D.: Changing patterns and trends in systemic fungal infections. J. Antimicrob. Chemother. 2005, 56(1). https://doi.org/10.1093/jac/dki218

Robertson, M. J.: Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* 2002, 71(2): S. 173-83

Rødland, E. K.; Ueland, T.; Pedersen, T. M.: Halvorsen, B.; Muller, F.; Aukrust, P.; Frøland, S. S.: Activation of platelets by Aspergillus fumigatus and potential role of platelets in the immunopathogenesis of Aspergillosis. *Infect. Immun.* 2010, 78(3): S. 1269-75

Rogers, T. R.; Morton, C. O.; Springer, J.; Conneally, E.; Heinz, W.; Kenny, C.; Frost, S.; Einsele, H.; Loeffler, J.: Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 2013, 161(4): S. 517-24

Romani, L.: Immunity to fungal infections. Nat. Rev. Immunol. 2011, 11(4): S. 275-88

Rubnitz, J. E.; Inaba, H.; Ribeiro, R. C.; Pounds, S.; Rooney, B.; Bell, T.; Pul, C. H.; Leung, W.: NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010, 28(6): S. 955-9

Ruggeri, L.; Mancusi, A.; Capanni, M.; Urbani, E.; Carotti, A.; Aloisi, T.; Stern, M.; Pende, D.; Perruccio, K.; Burchielli, E.; Topini, F.; Bianchi, E.; Aversa, F.; Martelli, M. F.; Velardi, A.: Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood.* 2007, 110(1): S. 433-40

Salazar-Mather, T. P.; Orange, J. S.; Biron, C. A.: Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J. Exp. Med.* 1998, 187(1): S. 1-14

Sancho, D.; Gómez, M.; Sánchez-Madrid, F.: CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005, 26(3): S. 136-40

Schall, T. J.; Bacon, K.; Toy, K. J.; Goeddel, D. V.: Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990, 347(6294): S. 669-71

Scharton, T. M.; Scott, P.: Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. *J. Exp. Med.* 1993, 178(2): S. 567-77

Schmidt, S.; Condorelli, A.; Koltze, A.; Lehrnbecher, T.: NK Cells and Their Role in Invasive Mold Infection. J. Fungi (Basel). 2017, 3(2). https://doi.org/10.3390/jof3020025

Schmidt, S.; Tramsen, L.; Hanisch, M.; Latgé, J. P.; Huenecke, S.; Koehl, U.; Lehrnbecher, T.: Human natural killer cells exhibit direct activity against Aspergillus fumigatus hyphae, but not against resting conidia. *J. Infect. Dis.* 2011, 203(3): S. 430-5

Schmidt, S.; Zimmermann, S. Y.; Tramsen, L.; Koehl, U.; Lehrnbecher, T.: Natural killer cells and antifungal host response. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013, 20(4): S. 452-8

Schneider, A.; Blatzer, M.; Posch, W.; Schubert, R.; Lass-Flörl, C.; Schmidt, S.; Lehrnbecher, T.: Aspergillus fumigatus responds to natural killer (NK) cells with upregulation of stress related genes and inhibits the immunoregulatory function of NK cells. *Oncotarget*. 2016, 7(44): S. 71062-71

Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T.; Hume, D. A.: Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004, 75(2): S. 163-89

Shah, A.; Panjabi, C.: Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Perplexing Clinical Entity. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2016, 8(4): S. 282-97

Shahan, T. A.; Sorenson, W. G.; Paulauskis, J. D.; Morey, R.; Lewis, D. M.: Concentration- and time-dependent upregulation and release of the cytokines MIP-2, KC, TNF, and MIP-1alpha in rat alveolar macrophages by fungal spores implicated in airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1998, 18(3): S. 435-40

Shao, C.; Qu, J.; He, L.; Zhang, Y.; Wang, J.; Wang, Y.; Zhou, H.; Liu, X.: Transient overexpression of gamma interferon promotes Aspergillus clearance in invasive pulmonary aspergillosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2005, 142(2): S. 233-41

Smyth, M. J.; Cretney, E.; Kelly, J. M.; Westwood, J. A.; Street, S. E.; Yagita, H.; Takeda, K.; van Dommelen, S. L.; Degli-Esposti, M. A.; Hayakawa, Y.: Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 2005, 42(4): S. 501-10

Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Adib-Conquy, M.; Cavaillon, J. M.: Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol. Med.* 2012, 18: S. 270-85

Stanzani, M.; Orciuolo, E.; Lewis, R.; Kontoyiannis, D. P.; Martins, S. L.; St. John, L. S.; Komanduri, K. V.: Aspergillus fumigatus suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood.* 2005, 105(6): S. 2258-65

Steele, C.; Rapaka, R. R.; Metz, A.; Pop, S. M.; Williams, D. L.; Gordon, S.; Kolls, J.
K.; Brown, G. D.: The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of Aspergillus fumigatus. *PLoS Pathog.* 2005, 1(4). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010042

Stuehler, C.; Kuenzli, E.; Jaeger, V. K.; Baettig, V.; Ferracin, F.; Rajacic, Z.; Kaiser, D.; Bernardini, C.; Forrer, P.; Weisser, M.; Elzi, L.; Battegay, M.; Halter, J.; Passweg, J.; Khanna, N.: Immune Reconstitution After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Association With Occurrence and Outcome of Invasive Aspergillosis. *J. Infect. Dis.* 2015, 212(6): S. 959-67

Song, A.; Nikolcheva, T.; Krensky, A. M.: Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 2000, 177: S. 236-45

Sugui, J. A.; Kwon-Chung, K. J.; Juvvadi, P. R.; Latgé, J. P.; Steinbach, W. J.: Aspergillus fumigatus and related species. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014, 5(2). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019786

Sun, J. C.; Lopez-Verges, S.; Kim, C. C.; DeRisi, J. L.; Lanier, L. L.: NK cells and immune "memory". *J. Immunol.* 2011, 186(4): S. 189-7

Ullah, M. A.; Hill, G. R.; Tey, S. K.: Functional Reconstitution of Natural Killer Cells in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* 2016, 7. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00144

Vacca, P.; Montaldo, E.; Croxatto, D.; Moretta, F.; Bertaina, A.; Vitale, C.; Locatelli, F.; Mingari, M. C.; Moretta, L.: NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* 2016, 7. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00188

van de Veerdonk, F. L.; Gresnigt, M. S.; Romani, L.; Netea, M. G.; Latgé, J. P.: Aspergillus fumigatus morphology and dynamic host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017, 15(11): S. 661-74

Venge, J.; Lampinen, M.; Håkansson, L.; Rak, S.; Venge, P.: Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, 97(5): S. 1110-5

Vitenshtein, A.; Charpak-Amikam, Y.; Yamin, R.; Bauman, Y.; Isaacson, B.; Stein, N.; Berhani, O.; Dassa, L.; Gamliel, M.; Gur, C.; Glasner, A.; Gomez, C.; Ben-Ami, R.; Osherov, N.; Cormack, B. P.; Mandelboim, O.: NK Cell Recognition of Candida glabrata through Binding of NKp46 and NCR1 to Fungal Ligands Epa1, Epa6, and Epa7. *Cell Host Microbe*. 2016, 20(4): S. 527-34

Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S.: Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 2008, 9(5): S. 503-10

Vivier, E.; van de Pavert, S.A.; Cooper, M.D.; Belz, G.T.: The evolution of innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* 2016, 17(7): S. 790-4

Wheelan, S. J.; Church, D. M.; Ostell, J. M.: Spidey – a tool for mRNA-to-genomic alignments. *Genome Res.* 2001, 11(11): S. 1952-7

Wherry, J. C.; Schreiber, R. D.; Unanue, E. R.: Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in scid mice: roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. *Infect. Immun.* 1991, 59(5): S. 1709-15

Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T. L.: Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012, 13. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134

Zamai, L.; Ahmad, M.; Bennett, I. M.; Azzoni, L.; Alnemri, E. S.; Perussia, B.: Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* 1998, 188(12): S. 2375-80

Ziegler, S.; Weiss, E.; Schmitt, A. L.; Schlegel, J.; Burgert, A.; Terpitz, U.; Sauer, M.; Moretta, L.; Sivori, S.; Leonhardt, I.; Kurzai, O.; Einsele, H.; Loeffler, J.: CD56 Is a Pathogen Recognition Receptor on Human Natural Killer Cells. *Sci. Rep.* 2017, 7(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-06238-4

# 7 Anhang

# 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.	1: Zusammenwirken von aktivierenden und inhibierenden Signalen bei der
]	Elimination von Zielzellen durch NK-Zellen
Abb. 2	2: Darstellung von A. fumigatus*11
Abb. 3	3: Schematische Darstellung der Komponenten der Immunabwehr bei Inhalation
,	von A. fumigatus-Konidien*
Abb. 4	4: Darstellung der mit Aspergillus assoziierten Erkrankungen in Abhängigkeit der
]	Immunreaktion*14
Abb. :	5: Rekonstruktion des Immunsystems nach HSCT im Zeitverlauf*
Abb. (	6: Reinheitsbestimmung isolierter NK-Zellen mittels FACS
Abb. ′	7: CD56 <sup>+</sup> NK-Zellen bei Verwendung verschiedener MOIs in der FACS-Analyse43
Abb. 8	8: Expression von Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen nach Stimulation mit
,	verschiedenen MOIs von A. fumigatus
Abb. 9	9: Exemplarischer Vergleich der CD56-Präsenz auf NK-Zellen bei Verwendung
,	verschiedener MOIs
Abb.	10: Vergleich der Expression von CD56 bei graduell mit A. fumigatus stimulierten
]	NK-Zellen nach Kultivierung in verschiedenen 96-well Zellkulturplatten
Abb.	11: Screening der mRNA-Expression verschiedener Zytokine mittels qPCR 49
Abb.	12: mRNA-Expression von CCL3, CCL4 und XCL1 in der konventionellen PCR 51
Abb.	13: Freisetzung von Zytokinen durch stimulierte NK-Zellen
Abb.	14: Relative mRNA-Expression von Zytokinen durch NK-Zellen nach Stimulation
]	mit verschiedenen MOIs von A. fumigatus
Abb.	15: Freisetzung von Zytokinen durch NK-Zellen nach Stimulation mit
,	verschiedenen MOIs von A. fumigatus

\* Abb. mit Genehmigung den jeweiligen Publikationen entnommen, siehe Abbildungsbeschriftung und Literaturverzeichnis

### 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Konzentration von NK-Zellen und Pilz bei den MOI-Experimenten	. 33
Tab. 2: Reaktionsreagenzien zur cDNA-Synthese aus mRNA	. 36
Tab. 3: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese	. 37
Tab. 4: Reaktionsreagenzien zur PCR-Analyse	. 38
Tab. 5: Verwendete Zellkulturplatten verschiedener Größe und Bodenbeschaffenheit .	.46
Tab. 6: Relative qPCR-Messwerte für die mRNA-Expression verschiedener Zytokine	. 50

## 7.3 Abkürzungen

Kommen Abkürzungen in dieser Arbeit erstmals im Fließtext vor, wird ihre Bedeutung an der jeweiligen Stelle erklärt. Bei Mehrfachverwendung folgt zusätzlich die Listung im Abkürzungsverzeichnis. Nicht aufgeführt sind die allgemein bekannten Einheiten des Internationalen Einheitensystems (französisch *système international d'unités*, SI), Summenformeln chemischer Verbindungen sowie die Eigennamen der verschiedenen Zytokine und Antikörper.

Abkürzung	Bedeutung
*р	engl. probability-value, p-Wert, Signifikanzwert
A. fumigatus	Aspergillus fumigatus
Abb.	Abbildung
ABPA	allergische bronchopulmonale Aspergillose
AG	Arbeitsgruppe
ALAS1	δ-Aminolävulinat-Synthase 1
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle(n)
ATCC	engl. American Type Culture Collection
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	engl. cluster of differentiation, "Unterscheidungsgruppen"

Abkürzung	Bedeutung
cDNA	engl. complementary deoxyribonucleic acid, komplementäre
	Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
d.h.	das heißt
DNA	engl. deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle(n)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	lat. et alii/alia, und andere
engl.	englisch
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting
FKS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl. forward scatter, Vorwärtsstreulicht
g	engl. gravity of earth, Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor, Granulozyten-
	Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GvHD	engl. graft-versus-host disease, Graft-versus-Host-Erkrankung
GvL	engl. graft-versus-leukemia, Graft-versus-Leukämie
h	Stunde(n)
HBSS	engl. Hanks' Balanced Salt solution
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSCT	engl. hematopoietic stem cell transplantation, hämatopoetische
nser	Stammzelltransplantation
IA	invasive Aspergillose
i.d.R.	in der Regel
IE	internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

Abkürzung	Bedeutung
IL	Interleukin
	engl. killer cell immunoglobulin-like receptor(s), Killerzellen-
KIK(S)	immunglobulinähnliche(r) Rezeptor(en)
1	Liter
lat.	lateinisch
MACS	engl. magnetic-activated cell sorting, magnetisch unterstützte
MACS	Zellsortierung
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
мис	engl. major histocompatibility complex,
MILC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
MIP	Makrophagen-inflammatorisches Protein
MOI	engl. multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
NCDI	engl. National Center for Biotechnology Information, Nationales
NCDI	Zentrum für Biotechnologieinformation
NK-Zelle(n)	Natürliche Killerzelle(n)
$\mathbf{D}\mathbf{A}\mathbf{M}\mathbf{D}(\mathbf{c})$	engl. pathogen associated molecular pattern(s), Pathogen-assoziierte(s)
I AIVII (S)	molekulare(s) Muster
PBMZ	mononukleäre Zelle(n) des peripheren Blutes
PBS	engl. phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR(s)	engl. <i>polymerase chain reaction(s)</i> , Polymerase Kettenreaktion(en)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
pН	lat. potentia hydrogenii
PRR(s)	engl. <i>pattern recognition receptor(s)</i> , Mustererkennungsrezeptor(en)
	engl. <i>quantitative polymerase chain reaction(s)</i> , quantitative
yrck(s)	Polymerase-Kettenreaktion(en)
RNA	engl. ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	engl. revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute

Abkürzung	Bedeutung
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute
s.o./u.	siehe oben/unten
SNP(s)	engl. single nucleotide polymorphism(s), Einzelnukleotid-
	Polymorphismus(/en)
sog.	sogenannte(n/r/s)
SSC	engl. side scatter, Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TH(-Zelle)	T-Helfer(zelle)
TLR(s)	engl. <i>toll-like receptor(s)</i> , Toll-ähnliche(r) Rezeptor(en)
tlw.	teilweise
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor(en)
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

### 7.4 Publikationen, Kongressbeiträge

### Originalarbeit

Marischen, L.; Englert, A.; Schmitt, A.-L.; Einsele, H. and Loeffler, J.: Human NK cells adapt their immune response towards increasing multiplicities of infection of Aspergillus fumigatus. *BMC Immunol.* 2018, 19(1). https://doi.org/10.1186/s12865-018-0276-6

### Poster

Marischen, L.; Schmitt, A.-L.; **Englert, A.**; Weiß, E.; Hünniger, K.; Kurzai, O.; Einsele, H. and Loeffler, J.: Human NK cells from alloSCT patients show reduced activity against A. fumigatus compared to NK cells from healthy donors. (P285). 2017, Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI), Erlangen.

Marischen, L.; **Englert, A.**; Schmitt A.-L.; Einsele, H. and Loeffler, J.: Human NK cells adapt their immune response towards increasing amounts of A. fumigatus. (P28). 2017, Novel Concepts in Innate Immunity, Tübingen.

Marischen, L.; Schmitt, A.-L.; **Englert, A.**; Weiß, E.; Hünniger, K.; Kurzai, O.; Einsele, H. and Loeffler, J.: Reduced activity against A. fumigatus by human NK cells from alloSCT patients vs. healthy donors. 612/IIP. 2017, Joint Conference of the DGHM & VAAM, Würzburg.

**Englert, A.**; Schmitt, A.-L.; Einsele, H.; Loeffler, J. and Marischen, L.: Human NK cells show a modulated immune response towards different concentrations of Aspergillus fumigatus. P NK 22. 2016, Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI), Hamburg.

Marischen, L.; Schmitt, A.-L.; **Englert, A.**; Hünniger, K.; Kurzai, O.; Einsele, H. and Loeffler, J.: Human NK cells release a distinct pattern of cytokines after confrontation with A. fumigatus. P NK 13. 2016, Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI), Hamburg.

#### Vorträge

Marischen, L.; **Englert, A.**; Schmitt A.-L.; Einsele, H. and Loeffler, J.: Interaction of A. fumigatus with human NK cells – CCL4/MIP-1 as marker protein for NK cell functionality. A2. 2017, 4th Joint Meeting CRC/Transregio 124 and Invasive Mycoses in Haematological Malignancies (IMIHM) XI, Würzburg.

# Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mir das Schreiben dieser Arbeit ermöglicht haben, insbesondere bei:

- Prof. Dr. med. Hermann Einsele für die Möglichkeit, an seiner Klinik wissenschaftlich tätig zu sein.
- Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler, der mir das Thema der Arbeit anvertraute und in dessen AG ich experimentelle Forschung betreiben durfte. Vielen Dank für die freundliche Unterstützung und Betreuung!
- Prof. Dr. med. Matthias Eyrich für die Mitgliedschaft im Betreuungskomitee der Promotion.
- Dr. rer. nat. Lothar Marischen, der mich bei allen Experimenten sowohl durch sein theoretisches Wissen als auch bei der praktischen Umsetzung immer unterstütze und neue Fragestellungen und Aspekte einbrachte. Auch beim Schreiben der Dissertation waren seine Tipps und Korrekturhinweise sehr wertvoll.
- Den weiteren Mitarbeitern der AG Löffler für die Einarbeitung in die naturwissenschaftlichen Methoden und die angenehme Zusammenarbeit.
- Meinem Mitbewohner und Mitglied der AG Topp Florian Eisele, mit dessen Unterstützung ich Abbildungen in *GraphPad Prism* erstellen konnte.
- Allen Blutspendern, darunter meinen Freunden Katharina, Anja, Fabienne und Julian.
- Meiner Familie für alles.

Curriculum vitae