

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)

**Wirt-Pathogen-Interaktionen mit *Aspergillus fumigatus*
bei der Zystischen Fibrose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Proissl, Theresa, geb. Straubinger

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Dr. A. Hector

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Bohn

3. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Hetzel

Tag der Disputation: 09.02.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. Zystische Fibrose.....	1
1.1.1. Epidemiologie und Genetik.....	1
1.1.2. Pathophysiologie.....	2
1.1.3. Klinisches Bild.....	3
1.1.4. Erregerspektrum.....	4
1.1.5. <i>Aspergillus fumigatus</i> und seine Rolle in der CF-Lunge.....	5
1.2. Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	7
1.2.1. Ablauf.....	7
1.2.2. Zelluläre Immunantwort.....	8
1.2.3. Humorale Immunantwort.....	12
1.3. Verwendete Zelllinien und Zymosan A.....	13
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	14
2. Materialien und Methoden.....	15
2.1. Materialien.....	15
2.1.1. Geräte und Materialien.....	15
2.1.2. Reagenzien, Chemikalien und Antikörper.....	17
2.1.3. Medien und andere verwendete Lösungen.....	19
2.1.4. Zellkulturen und fungale Bestandteile.....	20
2.2. Methoden.....	21
2.2.1. Zellkultur.....	21
2.2.2. <i>Aspergillus fumigatus</i> Kulturen.....	23
2.2.3. Infektionsversuche.....	24
2.2.3.1. Infektion.....	25

2.2.3.2. Durchflusszytometrie (FACS)	26
2.2.3.3. ELISA	30
3. Ergebnisse	34
3.1. Durchflusszytometrie (FACS)	34
3.1.1. Dectin-1	35
3.1.2. Dectin-2	37
3.1.3. TLR2	39
3.1.4. MMR und TLR4	41
3.2. ELISA	42
3.2.1. IL-8 ELISA	42
3.2.2. IL-6 ELISA	44
3.2.3. IL-1 β -, IL-10- und TARC-ELISA	45
4. Diskussion	46
4.1. Erkennung der Pilzbestandteile durch PRRs	46
4.1.1. Dectin-1	47
4.1.2. Dectin-2	48
4.1.3. TLR2	49
4.1.4. MMR und TLR4	50
4.2. Humorale Immunantwort auf Pilzbestandteile	51
4.2.1. IL-8	52
4.2.2. IL-6	53
4.2.3. IL-1 β , IL-10 und TARC	53
4.3. Einordnung der Ergebnisse und Ausblick	54
5. Zusammenfassung	58
6. Literaturverzeichnis	59
7. Erklärung zum Eigenanteil	67
Danksagung	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Geräte und Materialien	15
Tabelle 2 - Reagenzien und Chemikalien, Antikörper	17
Tabelle 3 - Medien und andere verwendete Lösungen	19
Tabelle 4 - Zellkulturen und fungale Bestandteile.....	20
Tabelle 5 - Herstellung der Verdünnungen.....	26
Tabelle 6 - Verdünnung der Standardreihe	32

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Zellwandaufbau bei <i>Aspergillus fumigatus</i> Konidien und Hyphen	9
Abbildung 2 - Ausgewählte PRRs, fungale Liganden und Signalkaskaden.....	11
Abbildung 3 - Modifizierte Air-Liquid Interface-Platte.....	23
Abbildung 4 - Vereinfachte Darstellung des Versuchsablaufes	25
Abbildung 5 - Färbung für die Durchflusszytometrie.....	28
Abbildung 6 - A, B: Durchflusszytometrische Ergebnisse von Dectin-1.....	36
Abbildung 7: PE Dectin-1 Häufigkeitsverteilung	37
Abbildung 8 - A, B: Durchflusszytometrische Ergebnisse von Dectin-2.....	38
Abbildung 9: APC Dectin-2 Häufigkeitsverteilung	39
Abbildung 10 - A, B: Durchflusszytometrische Ergebnisse von TLR2	40
Abbildung 11: Alexa flour 637 TLR2 Häufigkeitsverteilung.....	41
Abbildung 12: IL-8-Konzentration im Überstand der Kontrollproben.	42
Abbildung 13: IL-8-Konzentration in pg/ml	43
Abbildung 14: IL-6- Konzentration im Überstand der Kontrollproben	44
Abbildung 15: IL-6-Konzentration in pg/ml	45

Abkürzungsverzeichnis

ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
AP-1	Aktivatorprotein-1
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CLR	C-Typ Lektin-Rezeptor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
hemITAM	Immunoreceptor-tyrosine-based activation motif
IL-10	Interleukin-10
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MR, MMR	Mannose Rezeptor
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NIK	NF- κ B-induzierender Kinase
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PRR	Pattern Recognition Receptor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SYK	spleen tyrosine kinase
TARC	Thymusaktivitätsreguliertes Chemokin
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing IFN

1. Einleitung

1.1. Zystische Fibrose

1.1.1. Epidemiologie und Genetik

Die Zystische Fibrose (*engl. cystic fibrosis; CF*) ist die häufigste zum Tode führende autosomal-rezessive Erbkrankheit in der kaukasischen Bevölkerung. Ursache der Erkrankung ist eine Mutation im *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)*-Gen auf Chromosom Nummer 7 in der Region 7q31.2, welche zu einer Funktionseinschränkung oder einem Fehlen des Transmembranproteins führt (1).

Etwa eines von 2500 lebendgeborenen Kindern in Deutschland weist krankheitsauslösende Mutationen auf beiden Allelen auf und zeigt somit, je nach genauer Mutation, eine typische Ausprägung der Symptome. Der Anteil an Merkmalsträgern in der kaukasischen Bevölkerung beträgt etwa 4 %, jede 25. Person kann damit die Mutation vererben (2).

Über die letzten Jahrzehnte konnte ein starker Anstieg der medianen Überlebenszeit beobachtet werden (3), welche vor allem auf fortgeschrittenere Therapien, spezialisierte Behandlungszentren und frühere Diagnosestellung zurückzuführen ist. Die durchschnittliche Lebenserwartung eines Patienten mit CF liegt laut jährlichem Bericht der Cystic Fibrosis Foundation aus dem Jahr 2015 derzeit bei 41,6 Jahren (4). Laut Deutschem Mukoviszidose-Register lag das mittlere Sterbealter von CF-Patienten in Deutschland im Jahr 2017 bei 32 Jahren, das mediane Überlebensalter bei 47,52 Jahren. (5)

Bisher wurden über 2000 Mutationen am *CFTR*-Gen entdeckt (6), deren funktionelle Bedeutung ist aber nur in wenigen Fällen bekannt ist.

Die häufigste mit zystischer Fibrose assoziierte Mutation, F508del, zeigt sich in einem Fehlen der Aminosäure Phenylalanin im Genprodukt, und konnte bei über 70% der Patienten mit CF nachgewiesen werden (1, 7). In Deutschland liegt die

Häufigkeit der F508del Mutation mit über 85% sogar noch höher als im internationalen Vergleich (5). Das *CFTR*-Protein wird bei dieser Form der Mutation falsch gefaltet, was zu einem intrazellulären Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg führt (8).

Eine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp lässt sich zum Beispiel für den Grad der Pankreasinsuffizienz beobachten (7). Für den Ausprägungsgrad der Lungenerkrankung, welche in über 70% auch die Todesursache darstellt (9), trifft dies jedoch nicht zu; zu stark scheint der Einfluss von Umweltbedingungen und modifizierenden Gen-Polymorphismen (10, 11).

1.1.2. Pathophysiologie

Das *CFTR*-Protein ist ein membranständiger Anionenkanal, welcher vor allem Chlorid-Ionen transportiert. Er wird vorrangig in sekretorischen Organen exprimiert, weshalb ein Defekt zur gesteigerten Viskosität von Sekreten führt.

Eine gestörte Funktion des *CFTR*-Kanals führt in Schweißkanälen zu eingeschränkter Absorption von Cl^- (12, 13). Die erhöhte Cl^- -Konzentration im Schweiß von CF-Patienten wird zur Diagnosefindung verwendet (14).

In den Atemwegsepithelzellen liegt der *CFTR* in der apikalen Zellmembran und pumpt cAMP-abhängig Chlorid-Ionen aus der Zelle in das Organlumen (15, 16). Durch die osmotische Kraft der Chlorid-Ionen folgen passiv Wassermoleküle nach (13).

Gleichzeitig übt der *CFTR* regulatorische Funktionen auf andere Ionenkanäle aus, wie etwa eine tonische Inhibition auf den Epithelialen Natriumkanal (ENaC). Dieser ist ebenfalls apikal lokalisiert und nimmt Na^+ -Ionen ins Zellinnere auf (17, 18).

Wenn im Falle der CF ein funktionierender *CFTR*-Kanal fehlt, wird also einerseits die Cl^- -Sekretion eingeschränkt und andererseits der ENaC aus seiner tonischen Inhibition befreit. Beides führt dazu, dass über eine exzessive Na^+ -Aufnahme zum Ausgleich des elektrochemischen Gradienten und eine daraufhin gesteigerte Wasserresorption die physiologische Flüssigkeit auf der Zelloberfläche an Volumen verliert. Im Organlumen bleibt ein zähflüssiger Schleim zurück, welcher

der Erkrankung auch den alternativ verwendbaren Namen Mukoviszidose (von *mucus lat.* = Schleim, *viscidus lat.* = zäh, klebrig) gab.

Die Abnahme der periziliären Flüssigkeitsschicht, die zwischen Mukus und Oberfläche der Epithelzellen liegt und einen funktionierenden Zilienschlag ermöglicht, kann als auslösendes Ereignis zur Entwicklung der Lungenerkrankung bei CF gesehen werden. Denn durch ihren Verlust kommt es zum Anhaften von Schleim an der Zelloberfläche, was dessen Abtransport behindert (19). Es entstehen Mukus-Plaques, welche optimale Bedingungen für chronische bakterielle Infektionen bieten (20), allen voran *Pseudomonas aeruginosa*, die unter hypoxischen Bedingungen wachsen und sich durch Biofilmbildung resistent gegen antimikrobielle Einwirkungen zeigen kann.

Die Flüssigkeit auf Atemwegsoberflächen enthält antibakterielle Substanzen wie Lactoferrin und Lysozym, welche bakterielles Wachstum für etwa sechs Stunden unterdrücken können. Jedoch ist die Beseitigung des Mukus durch einen funktionierenden Zilienschlag des Epithels unabdingbar zur Vermeidung einer Infektion (21).

1.1.3. Klinisches Bild

Mutationen im *CFTR*-Gen betreffen Epithelzellen verschiedener Organe und machen CF somit zu einer Multisystemerkrankung. Die Symptome bzw. Einschränkungen sind je nach Organ unterschiedlich. Auch Zeitpunkt und Reihenfolge der Organmanifestationen können sich von Patient zu Patient unterscheiden (22).

Die Lungenerkrankung bei CF ist gekennzeichnet durch chronische bakterielle Infektion und Entzündung der luftleitenden Atemwege. Als Folge kann es zu Bronchiektasien, also Ausweitungen der Bronchien, und Atemversagen kommen.

Neben den pulmonalen Manifestationen der CF, die immer noch in den meisten Fällen die Todesursache darstellen, sind vor allem intestinale Symptome zu beobachten.

Der Defekt im *CFTR* macht sich in Darmepithel, Bauchspeicheldrüse und Leber bemerkbar. Das visköse Sekret führt im Pankreas über Zystenbildung und Fibrose bei 90% der Patienten zu einer Organinsuffizienz. Diese zeigt sich am Fehlen von Verdauungsenzymen und den damit verbundenen Folgen wie etwa einem Mangel an fettlöslichen Vitaminen, Gedeihstörung, Fettstühle und geblähtem Abdomen oder Analprolaps. Auch der bei etwa 15% der Patienten auftretende Mekoniumileus ist darauf zurückzuführen. Andererseits gehen bei circa einem Drittel der Patienten die Insulin-produzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse zugrunde, was zum so genannten Diabetes Mellitus Typ III oder CFRD (Cystic fibrosis-related diabetes) führt. Nicht selten tritt auch eine Leberbeteiligung auf, die bis zur sekundären biliären Zirrhose mit portaler Hypertension ausreifen kann (23).

Enzym- und Vitaminsupplementation sind bei intestinaler Beteiligung wichtige Therapiebestandteile, nicht nur zur Beseitigung der aufgezählten Symptome. Es konnte auch eine klare Korrelation zwischen Ernährungsstatus und Lungenfunktion (FEV₁) nachgewiesen werden (24).

Nahezu alle männlichen CF-Patienten sind unfruchtbar aufgrund eines beidseitigen Fehlens des Samenleiters (CBAVD, kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens), was zu einer Azoospermie, also dem Fehlen von Spermien im Ejakulat, führt. Eine CBAVD kann die einzige Manifestation des *CFTR*-Defektes sein. Patientinnen mit CF sind in der Regel fruchtbar (25).

1.1.4. Erregerspektrum

Die Lungenerkrankung bei CF entwickelt sich häufig in jungem Alter und ist charakterisiert durch chronische Entzündung und Infektionen (26, 27).

Die häufigsten Erreger in CF Atemwegen sind *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* (5, 28). Laut Berichtsband 2017 des Deutschen Mukoviszidose-Registers wurde beispielsweise bei 41,5% der CF-Patienten eine chronische Lungeninfektion mit *Staph. aureus* und bei 35% mit *Ps. aeruginosa* nachgewiesen. Dabei zeigten sich altersabhängige Unterschiede: *Staph. aureus* war

deutlich häufiger bei Patienten im Kindesalter die Ursache für Lungeninfektionen, während *Ps. aeruginosa* vor allem bei jungen Erwachsenen vermehrt nachgewiesen wurde. Aufgrund verbesserter antibiotischer Therapiestrategien konnte jedoch über die letzten Jahre eine Abnahme der Prävalenz von *Ps. aeruginosa* im Sputum von Patienten mit CF beobachtet werden (28, 29).

Weitere bakterielle Erreger, die im Zusammenhang mit chronischer Lungeninfektion in unter 5% mikrobiologisch nachgewiesen werden konnten, waren zum Beispiel *MRSA (Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus)*, *Burkholderia spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* oder *Achromobacter xylosoxidans* (5).

In den letzten Jahrzehnten wurden im Bronchialsekret von CF-Patienten zunehmend Pilze nachgewiesen. Die häufigsten isolierten Pilzerreger stellen dabei der Hefepilz *Candida albicans* und der Fadenpilz *Aspergillus fumigatus* dar. (30) Weitere Erreger aus der Gattung der Pilze wie etwa *Scedosporium spp.* kommen dagegen seltener vor (31).

1.1.5. *Aspergillus fumigatus* und seine Rolle in der CF-Lunge

A. fumigatus ist ein saprophytischer Pilz und ernährt sich damit von totem organischem Material. Er zeichnet sich durch ubiquitäres Vorkommen aus und ist typischerweise auf Topfpflanzen zu finden. Durch Bildung von Konidien, Pilzsporen zur ungeschlechtlichen Vermehrung, kann sich *A. fumigatus* auch aerogen ausbreiten und beim Menschen Haut und Schleimhäute kolonisieren.

Unter den Schimmelpilzen hat *A. fumigatus* die größte klinische Bedeutung als Erreger von Infektionen. Da es sich um einen typischen Opportunisten handelt (32), ist die Wahrscheinlichkeit und die klinische Präsentation einer Infektion abhängig vom Immunstatus des Patienten und vorbestehenden Lungenerkrankungen (33):

Während die Inhalation von *A. fumigatus* Konidien bei gesunden Menschen vor allem Allergien hervorruft (34), sind bei Immunsuppression Infektionen der Lunge mit Dissemination möglich (32).

Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) ist eine schwere allergische Reaktion, die zu Lungenschäden führen kann und vor allem bei Patienten mit allergischem Asthma und Mukoviszidose beobachtet wird (35).

Auch lokalisiertes Wachstum innerhalb der Lunge, zum Beispiel in Form von Aspergillomen, kann durch *A. fumigatus* ausgelöst werden (36).

Die invasive Aspergillose entsteht durch Invasion von Aspergillus Hyphen in umliegendes Gewebe und tritt fast ausschließlich bei Immunsuppression auf. Möglich ist eine konsekutive hämatogene Streuung in andere Organe wie etwa das Gehirn (37); die Mortalitätsraten liegen daher zwischen 30 und über 90 Prozent (38).

Zur genauen Prävalenz von pulmonaler Kolonisierung mit Pilzen bei CF-Patienten gibt es unterschiedliche Daten (39-41), die Angaben hierzu variieren je nach Quelle allein für *A. fumigatus* zwischen 16% und 56,7% (42). Sudfeld et al. stellten beispielsweise eine Zunahme der pulmonalen Kolonisierung mit Fadenpilzen bei CF Patienten von 2% in 1997 auf 28,7% in 2007 fest (40).

Verschiedene Faktoren könnten die Zunahme der pulmonalen Kolonisierung mit *A. fumigatus* bei CF-Patienten erklären. So wurde in einigen Studien ein Zusammenhang mit dem verlängerten Einsatz prophylaktischer Antibiotika (40, 43, 44) und Kortikosteroide (45) oder höherem Patientenalter (40, 44) festgestellt.

Wahrscheinlich ist aber auch, dass die Verbesserung diagnostischer Methoden zum vermehrten Nachweis von pulmonaler Kolonisierung geführt hat. (46, 47)

Der erfolgreiche Nachweis von Pilzen aus Sputum von CF-Patienten ist stark abhängig von der verwendeten Diagnostik. Nagano et al. untersuchten die Detektionsrate von Pilzen in CF Sputum unter Verwendung verschiedener diagnostischer Methoden und stellten fest, dass der alleinige Einsatz mykologischer Kulturen eine deutlich niedrigere Detektionsrate aufwies als zum Beispiel die direkte DNA-Extraktion. (46)

Ob die pulmonale Kolonisierung mit *A. fumigatus* die Lungenfunktion signifikant beeinträchtigt, ist noch nicht eindeutig geklärt (39, 44). Während manche Studien eine stärkere Abnahme der Lungenfunktion durch Kolonisierung mit *A.fu-*

migatus feststellen konnten (39, 48, 49), kamen andere zum gegenteiligen Ergebnis (44, 50). Ebenso bedarf die Frage nach dem Nutzen einer prophylaktischen antimykotischen Therapie weiterer Klärung (51).

Die chronische Kolonisierung mit *A. fumigatus* scheint vermehrt bei Patienten mit schwerer Lungenbeteiligung und intensiveren Therapien aufzutreten (40, 44) und gleichzeitig ein unabhängiger Risikofaktor für stationäre Aufnahmen zu sein (48).

Je nach Quelle gibt es Hinweise darauf, dass die Kolonisierung mit *A. fumigatus* mit einem erhöhten Risiko der Infektion mit *Ps. aeruginosa* assoziiert ist (52) oder beide Erreger einen agonistischen (53) oder antagonistischen Effekt aufeinander ausüben (54-56). Eine Ko-Kolonisierung scheint aber mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert zu sein (57).

1.2. Infektion mit *Aspergillus fumigatus*

1.2.1. Ablauf

Aufgrund ihres geringen Durchmessers von 2-3µm (58) können *Aspergillus* Konidien nach der Inhalation die mukoziliäre Clearance des Bronchialepithels umgehen und bis in die Lungenalveolen gelangen. (59). Die ersten Zellen, die mit Konidien in Berührung kommen, sind also Atemwegsepithelzellen der Bronchien oder der Alveolen (60). Bei intaktem Immunsystem wird in der Regel eine adäquate Immunantwort ausgelöst, wohingegen es bei anfälligen Patienten zur Infektion kommen kann. (61)

Nach der Adhäsion an Zellwandbestandteile wie Glucosaminoglykane, findet bei einem Teil der Konidien eine Internalisierung in die Wirtszelle statt. Diese Methode wird verwendet, um das Immunsystem zu umgehen und eine disseminierte Ausbreitung zu erleichtern (60). Die Internalisierung kann sowohl durch spezialisierte Makrophagen als auch durch Atemwegsepithelzellen erfolgen (60, 62). Vermittelt wird sie unter anderem durch den Dectin-1-Rezeptor (siehe Kapitel 1.2.2) (63).

Sobald die Konidien durch Zellen der angeborenen Immunabwehr erkannt werden (siehe Seite 8), wird eine Immunantwort eingeleitet. Diese führt über eine

gesteigerte Zytokinproduktion und somit lokale Entzündungsreaktion zum Abtöten der Erreger (60). Bei unzureichender Immunantwort können *Aspergillus* Konidien am Ort der Infektion auskeimen. Es kommt zur Formung von Hyphen, welche Atemwegsepithel und Gefäßendothel durchwandern und sich so weiter ausbreiten (64).

A. fumigatus verfügt über eine Reihe von Mechanismen zum Entgehen der menschlichen Immunabwehr. So schützen einige Zellwandbestandteile vor Phagozytose und intrazellulärer Degradation. Katalase und Superoxiddismutase werden zum Schutz vor Sauerstoffradikalen produziert. Außerdem kann *A. fumigatus* durch die Bildung von Gliotoxin Granulozyten und Gewebe schädigen und mithilfe von Proteasen umliegendes Gewebe auflösen, in welches die Pilzhyphen anschließend einwachsen können. (32)

Die angeborene Immunabwehr spielt bei CF die wichtigste Rolle in der Entzündungsantwort gegen pulmonale Erreger. Diese unspezifische Immunantwort auf körperfremde Zellen lässt sich unterteilen in eine zelluläre und eine humorale Komponente (65).

1.2.2. Zelluläre Immunantwort

Die angeborene zelluläre Immunantwort bei CF wird hauptsächlich getragen durch neutrophile Granulozyten (66), jedoch konnte gezeigt werden, dass auch das Atemwegsepithel daran beteiligt ist (67). Die Zellen des unspezifischen Immunsystems verfügen über sogenannte Pattern Recognition Receptors (PRR, *engl.* für Mustererkennungsrezeptoren), die erregertypische Strukturen auf körperfremden Zellen erkennen, die Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPS, *engl. pathogen-associated molecular patterns*). Abbildung 1 zeigt Strukturen in der Zellwand von *A. fumigatus*, die durch PRRs erkannt werden können.

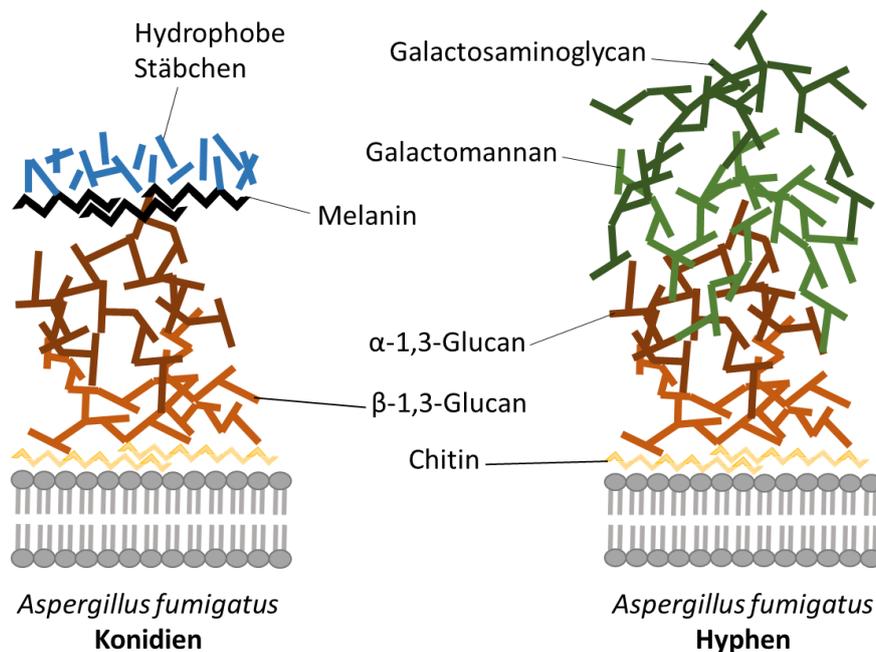


Abbildung 1 - Zellwandaufbau bei *Aspergillus fumigatus* Konidien und Hyphen

Die innere Zellwand wird gebildet aus Chitin und den Polysacchariden β -1,3-Glucan und α -1,3-Glucan. Bei Konidien besteht die äußere Schicht aus hydrophoben Proteinen in Form von Stäbchen, welche vor Enzymen, Oxidantien und Phagozytose schützen sollen. Bei der Auskeimung zu Hyphen wird die Integrität der hydrophoben Schicht verletzt und Galactosaminoglycane, Galactomannane und die Polysaccharide kommen zum Vorschein und können von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Modifiziert nach Gow et al. (68).

PRRs können sowohl transmembranär als auch zytoplasmatisch lokalisiert sein und führen durch die Auslösung einer Signalkaskade zur Einleitung der angeborenen Immunabwehr und Aktivierung der erworbenen Immunabwehr.

In dieser Arbeit wurden die Expression wichtiger transmembranäre PRRs aus den Familien der C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLRs) und Toll-like-Rezeptoren (TLRs) (65) untersucht.

CLRs:

Rezeptoren aus der Gruppe der CLRs haben eine C-Typ-Lektin-ähnliche Domäne zur Bindung an Kohlenhydrate oder Ca^{2+} gemeinsam. Der wohl am meisten untersuchte CLR im Zusammenhang mit Pilzinfektionen ist Dectin-1. Dieser ist bekannt dafür, an β -Glucane verschiedener Erreger zu binden. Die daraufhin

ausgelösten Signalwege (siehe Abbildung 2) führen zu unterschiedlichen Mechanismen der Immunabwehr wie zum Beispiel Phagozytose, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Zytokinproduktion und Aktivierung des Inflammasoms (69). Dectin-1 scheint eine bedeutende Rolle in der Immunantwort gegen Pilze einzunehmen. So konnte etwa gezeigt werden, dass Dectin-1 Knockout-Mäuse anfälliger waren für Infektionen mit fungalen Erregern wie *Candida albicans* (70) und *Aspergillus fumigatus* (71). Außerdem wurde für Patienten mit Polymorphismen im Dectin-1-Rezeptor eine verstärkte Prädisposition für Aspergillosen (72) oder *Candida*-assoziierte Erkrankungen nachgewiesen (73).

Der Dectin-2-Rezeptor bindet an Mannane in den Zellwänden von Pilzen und ist ebenfalls wichtig für die Einleitung einer Immunantwort (siehe Abbildung 2) (69, 74). Er scheint außerdem an allergischen Reaktionen gegen *A. fumigatus* beteiligt zu sein (75).

Auch der Mannose-Rezeptor gehört zur Familie der CLRs. Als fungaler Ligand wird von ihm Mannose erkannt (69).

TLRs:

Toll-like Rezeptoren sind die bedeutendsten PRRs in der Erkennung bakterieller Erreger (65).

Sie enthalten eine C-terminale Toll/II-1-Rezeptor-Domäne und N-terminale Leucin-reiche Wiederholungen. TLR2 formt zur Erkennung von Pathogenen Heterodimere mit TLR1 oder TLR6, wohingegen andere TLRs Homodimere bilden. Die durch TLRs ausgelösten Signalwege können über einen TRIF-(TIR-domain-containing adapter-inducing IFN) abhängigen oder MyD88-(Myeloid differentiation primary response 88) abhängigen Weg zur Auslösung einer Immunantwort führen (siehe Abbildung 2) (69).

Fungale Liganden, die durch den TLR2-Rezeptor erkannt werden, sind Phospholipomannane und β -Glucane. Es konnte gezeigt werden, dass TLR2-Rezeptoren spezifisch zu Zymosan-haltigen Phagosomen rekrutiert werden (76). Außerdem induzieren *A. fumigatus*-Konidien und Hyphen eine TLR2-medierte Zytokinausschüttung (77).

Lipopolysaccharid (LPS) in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien wie *Ps. aeruginosa* wird hauptsächlich durch TLR4 erkannt (78). In der fungalen Zellwand bindet TLR4 O-Mannan (79). Nach Bindung durch den Rezeptor kommt es zur Komplexbildung von TLR4/LPS und anschließender Endozytose und lysosomaler Degradation (80).

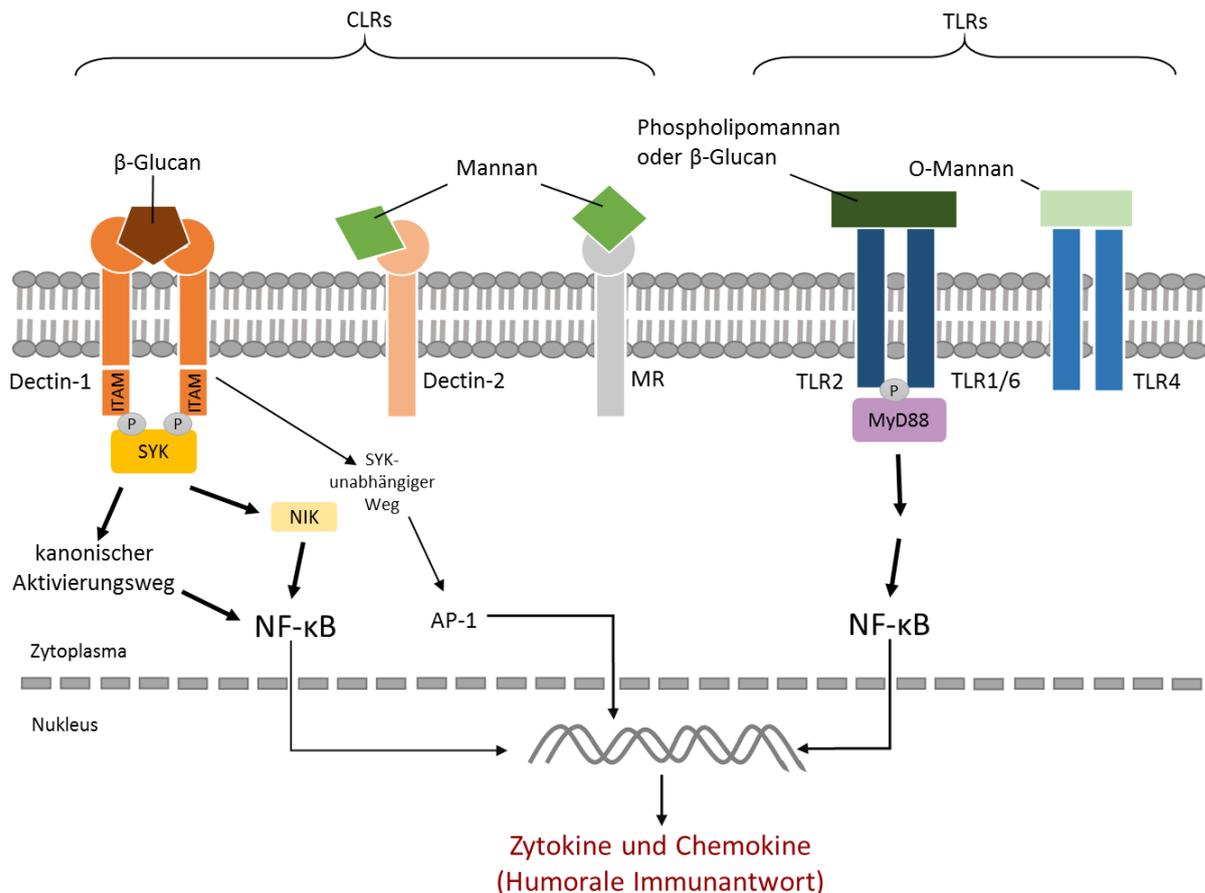


Abbildung 2 - Ausgewählte PRRs, fungale Liganden und Signalkaskaden.

Vereinfachte Darstellung, Dectin-1 und TLR2 exemplarisch detaillierter abgebildet. **Dectin-1:** Nach Bindung von β-Glucanen durch Dectin-1 wird die hemITAM (immunoreceptor-tyrosine-based activation motif)-Domäne im zytoplasmatischen Schwanz des Rezeptors phosphoryliert. Dies führt zur Rekrutierung von SYK (spleen tyrosine kinase) und damit Mediation zellulärer Antworten. Über einen kanonischen NF-κB- (Nuclear Factor κB) Aktivierungsweg oder einen nicht-kanonischen Weg mittels NF-κB-induzierender Kinase (NIK) kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Es gibt außerdem SYK-unabhängige Wege, welche zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Aktivatorprotein-1 (AP-1) führen. Über Aktivierung verschiedener Signalwege kommt es zur gesteigerten Produktion von einer Vielzahl an Interleukinen. **Dectin-2:** Die Bindung hyphaler Mannane löst über eine ITAM-Domäne und SYK-Rekrutierung den kanonischen

NF- κ B- Aktivierungsweg aus. TLRs: Durch Ligandenbindung wird ein MyD88- abhängiger oder, bei endosomalen Rezeptoren, TRIF-abhängiger Signalweg aktiviert. Dieser führt zu gesteigerter NF- κ B-Produktion und damit zu vermehrter Transkription proinflammatorischer Zytokine (69, 79).

1.2.3. Humorale Immunantwort

Bei der humoralen Immunantwort handelt es sich um im Blut zirkulierende Proteine zur direkten Abwehr von Erregern und Einleitung der spezifischen Immunabwehr. Teil des angeborenen humoralen Systems sind kleine Proteine, die als Botenstoffe zwischen Zellen fungieren, die Zytokine. Sie werden hauptsächlich von T-Helferzellen und Makrophagen produziert, aber auch von anderen Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen.

Zytokine können nach ihrer Funktion unterschieden werden in pro- und antiinflammatorisch.

Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) führen zu einer Hochregulation inflammatorischer Reaktionen (81).

In bronchoalveolärer Lavage von CF-Patienten finden sich erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine und gesteigerte Zahlen neutrophiler Granulozyten (82-84). Zu diesen proinflammatorischen Zytokinen zählt auch das IL-8, das unter anderem von Epithelzellen der Lunge produziert wird. Es induziert vor allem Chemotaxis, also eine Anlockung und Rekrutierung von Leukozyten und gehört damit zur Gruppe der Chemokine (85). Zur gesteigerten Ausschüttung von IL-8 kommt es durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B über unterschiedliche Signalwege. Diese werden ausgelöst durch Erkennung von Pathogenen über PRRs (siehe Abbildung 2) oder durch weitere Zytokine wie IL-1 β und TNF- α . Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass das *CFTR*-Protein den NF- κ B-medierten Zytokinanstieg negativ reguliert. Daher lässt sich durch die mangelnde Funktion von *CFTR* bei der Mukoviszidose eine exzessive Zytokinausschüttung erklären (86). Die gesteigerte Rekrutierung von Neutrophilen und das dadurch entstehende inflammatorische Milieu führen in der CF-Lunge zum progredienten Untergang von Lungengewebe und zur Entstehung von Bronchiektasien (86).

IL-6 spielt eine zentrale Rolle in der Orchestrierung einer Entzündungsreaktion, da es je nach Situation pro- oder antiinflammatorische Funktionen ausüben kann. Diese funktionelle Vielfalt entsteht wahrscheinlich dadurch, dass es membrangebundene und lösliche IL-6-Rezeptoren gibt. Letztere sind induzierbare Agonisten für die IL-6-Aktivität und können durch Bildung eines Protein-komplexes unabhängig von membrangebundenen IL-6-Rezeptoren interagieren (87).

Antiinflammatorische Zytokine halten als Gegenspieler die proinflammatorische Antwort unter Kontrolle. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Interleukin-10 (IL-10), welches die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 unterdrücken kann. Dies geschieht durch Hochregulation von Anti-Zytokinen und Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokinrezeptoren (81).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer Pilzinfektion auf die Produktion der Zytokine IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-10 und Thymusaktivitätsreguliertem Chemokin (TARC) zu untersuchen.

1.3. Verwendete Zelllinien und Zymosan A

Wir verwendeten in den Versuchen die Zelllinien CFBE41o- und 16HBE14o-. CFBE41o- ist homozygot für F508del, die häufigste bei CF bekannte Mutation im Gen für *CFTR*-Kanäle. Sie wurde in den 1990er Jahren generiert, indem bronchiale Epithelzellen eines CF-Patienten mithilfe des Simian-Virus 40 (SV40) Antigens transformiert wurden. Die auf diese Weise immortalisierten CFBE41o- - Zellen finden breite Verwendung in der in vitro Erforschung von CF (8). Bei der Zelllinie 16HBE14o- handelt es sich um normale bronchiale Epithelzellen, die ebenfalls durch SV40 transformiert wurden (88).

Zur Simulation einer Pilzinfektion verwendeten wir unter anderem Zymosan A, einen Bestandteil der Zellwände von Hefepilzen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*. Es ruft eine sterile Entzündung hervor und findet Anwendung in der Untersuchung der angeborenen Immunantwort des menschlichen Organismus auf

Pilzpartikel. Zymosan A ist vor allem aus β -1,3-Glucan aufgebaut und enthält weitere Bestandteile wie Mannan und Chitin (89). Seine Größe von 3 μ m gleicht in etwa der von *Aspergillus* Konidien (90). Zymosan ist bekannt als Ligand für verschiedene PRRs, darunter TLR2 (im Rezeptorenkomplex mit TLR6) und Dec-1 (89, 91).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich die Erkennung von fungalen Liganden und die daraufhin eingeleitete Immunantwort zwischen CF- und Kontrollatemwegszellen unterscheiden. Dazu wurde die Expression verschiedener Rezeptoren nach Infektion mit Zymosan und *A. fumigatus* Bestandteilen mittels Durchflusszytometrie nach 24h und 48h erfasst.

Außerdem wurde die Zytokinproduktion der Zellen durch ELISA untersucht.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte und Materialien

Tabelle 1 - Geräte und Materialien

Gerät/Produkt, Beschreibung	Hersteller (Standort)
Absauggerät	KNF Neuberger GmbH (Freiburg, Deutschland)
Cell Culture Inserts, PET Membran, 6-Well, 0,4µm Porengröße	Falcon® (Corning, USA)
Inkubator, HERAcell CO ₂	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Inkubator	Heraeus instruments (Hanau, Deutschland)
Durchflusszytometer, FACSCalibur	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
ELISA-Lesegerät, ELx800™ Absorbance microplate reader	BioTek® (Winooski, USA)
ELISA-Platte, 96-Well Mikrotestplatte, High Binding, Rundboden	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Erlemeyerkolben	Kavalier (Prag, Tschechische Republik)
Flockeneisbereiter AF80	Scotsman® (Vernon Hills, USA)
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr (Kirchberg, Deutschland)
Gefrierschrank, -80°C	Sanyo (Osaka, Japan)
Gefrierlagerröhrchen, Cryo.s™	Greiner bio-one (Gremsmünster, Österreich)
Heizblock, Thermo-Shaker	Universal Labortechnik (Leipzig, Deutschland)

Kühlschrank, 4°C	Siemens (München, Deutschland)
Membranfilter, MF-Millipore™, 0,45µm	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Mikro Teströhrchen, Titertube®	Bio-Rad (Hercules, USA)
Mikroreaktionsgefäße, Safe-Lock Tubes; 1,5ml und 2ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop	Helmut Hund GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Mikrotiterplatten, 96-Well, U-Boden, Tissue culture	Orange scientific (Braine-l'Alleud, Belgien)
Multiwell-Platten, 6-Well-Platten	Falcon® (Corning, USA)
Pasteurpipetten, aus Glas, 230 mm lang	neoLab® (Heidelberg, Deutschland)
Petrischalen, 94mm ø	Greiner bio-one (Gremsmünster, Österreich)
Pipetten manuell, Eppendorf Research® plus 0,5-10µl, 10-100µl, 30-300µl, 100-1000µl Mehrkanalpipette 30-300µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 10µl	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen 200µl,300µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen 1000µl	Greiner bio-one (Gremsmünster, Österreich)
Pipettierhilfe halbautomatisch, SWIFTPET+	HTL (Warschau, Polen)
Röhre, 5ml, 75x12mm, aus Polystyrol	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipette, Corning® Costar® Stripette® aus Glas, 50ml,25ml,10ml,5ml,2ml	Corning, Inc. (Corning, USA)

Sicherheitswerkbank	BDK® (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Schüttelinkubator, Orbital ES-20	Grant Instruments (Shepreth, Großbritannien)
Vortexmischer PV-1	Grant Instruments (Shepreth, Großbritannien)
Wasserbad	Memmert GmbH (Schwabach, Deutschland)
Zellkultur Flaschen, CELLSTAR® 25cm ²	Greiner bio-one (Gremsmünster, Österreich)
Zell-Schaber, 25cm Griff/ 1,8cm Blatt	Falcon® (Corning, USA)
Zentrifuge, HERAEUS MEGAFUGE 16R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifugenröhrchen, CELLSTAR® Tubes; 15ml, 50ml	Greiner bio-one (Gremsmünster, Österreich)

2.1.2. Reagenzien, Chemikalien und Antikörper

Tabelle 2 - Reagenzien und Chemikalien, Antikörper

0,25% Trypsin-EDTA (1x):Dissoziationsreagenz	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ethanol absolute	VWR Chemicals (Radnor, USA)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
2 N H ₂ SO ₄	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie:	
Antikörper:	APC anti-hDectin-2/ CLEC6A
	R&D Systems (Minneapolis, USA)
	FITC Anti-TLR4 (HTA125)
	Novus Biologicals (Centennial, USA)

	FITC anti-human CD206 (MMR)	BioLegend (San Diego, USA)
	PE anti-human CD369 (Dectin-1/CLEC7A)	
	Alexa Fluor® 647 anti-human CD282 (TLR2)	
Puffer:	FOXP3 Fix/Perm Buffer (4x)	BioLegend (San Diego, USA)
	FOXP3 Perm Buffer (10x)	
FACS-Puffer:	DPBS mit 1 % BSA und 0.2%NaN3	Gibco®, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ELISA:		
ELISA Set:	Human CXCL8/IL-8 DuoSet ELISA Kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)
	Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA Kit	
	Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit	
	Human IL-10 Quantikine ELISA Kit	
	Human CCL17/TARC Quantikine ELISA Kit	
	Human IL-6 ELISA MAX™ Deluxe Set	
Ergänzend:	DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	R&D Systems (Minneapolis, USA)

2.1.3. Medien und andere verwendete Lösungen

Tabelle 3 - Medien und andere verwendete Lösungen

Medium:		
450ml	Minimal Essential Medium w/Earle's salt Mit 0,292g/L L-Glutamin, 1g/L D-Glucose, 2,2g/L NaHCO ₃ (Sodium Bicarbonat)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
50ml	Fetal bovine serum	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
5ml	L-Glutamin 200mM	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
5ml	Penicillin/Streptomycin (100x)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Fibronectin Coating Solution:		
88ml	LHC Basal Medium	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
10ml	Bovine serum albumin (1mg/ml, 0,1% Lösung), lösen in LHC Basal, dann Filtersterilisation	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
1ml	Vitrogen 100 (3mg/ml Collagen I, bovine)	BD (Franklin Lakes, USA)
1ml	Human fibronectin (1mg/ml)	BD (Franklin Lakes, USA)
	In Nuklease-freiem Wasser	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Freezing Solution:		
25ml	Fetal bovine serum	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

20ml	Minimal essential medium complete	UCSF (San Francisco, USA)
5ml	DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<u>DPBS:</u>	Dulbecco's Phosphate buffered saline (ohne CaCl ₂ , ohne MgCl ₂)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<u>SAB-Agar Medium:</u>	Sabouraud 4% Glukose Agar Enthält pro Liter: 15g Agar, 40g D(+) Glukose, 10g Peptone	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<u>RPMI 1640:</u>	RPMI 1640 Flüssigmedium mit 2g/l NaHCO ₃	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)

2.1.4. Zellkulturen und fungale Bestandteile

Tabelle 4 - Zellkulturen und fungale Bestandteile

CFBE41o-:	Generiert von Kunzelmann et al.(92)
16HBE14o-:	
Zymosan A:	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>A. fumigatus</i> Stamm ATCC46645 zur Gewinnung der Konidien und Hyphen:	ATCC (Manassas, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Herstellung der Fibronectin Coating Solution:

Humanes Fibronectin wurde 15min bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann 1ml LAL-Wasser darauf gegeben. Nach 30min konnte die Lösung mit LHC Basal Medium, Bovinem Serum Albumin (5min im Wasserbad aufgewärmt) und Collagen I gemischt werden.

1ml der Fibronectin coating solution wurde in jede zu beschichtende Flasche gegeben und die Lösung auf dem Boden der Flasche verteilt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurde die restliche Flüssigkeit abgesaugt und die Flasche bis zur Benutzung aufrecht gelagert.

Kultivieren der Epithelzellen:

Von den eingefrorenen 16HBE14o- und CFBE41o- Zellen wurde je ein Fläschchen im 37°C warmen Wasserbad für zwei Minuten aufgetaut. Nach dem Mischen mit 4ml Medium wurde für vier Minuten bei 1200rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann mit 2ml Medium resuspendiert und je 1ml der Suspension wurde in belüftete T-25 Flaschen überführt. Die mit Fibronectin Coating Solution beschichteten T-25 Flaschen waren zuvor mit jeweils 4ml MEM-Medium befüllt worden.

Subkultivierung:

Die Subkultivierung der Zelllinien konnte alle zwei Tage durchgeführt werden, wenn 90 Prozent der Platte sich mikroskopisch bewachsen zeigten.

Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 5ml DPBS gewaschen.

Nach dem Absaugen des DPBS wurde 1ml Trypsin auf der Oberfläche verteilt und die Flasche wurde für fünf Minuten im CO₂-Inkubator gelagert. Danach wurde händisch seitlich an die Flasche geklopft und die Ablösung der Zellen unter dem

Mikroskop kontrolliert. Falls >5% der Zellen noch am Flaschenboden anhafteten, wurde die Zellkultur erneut für wenige Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Trypsinierung wurde mit 4ml Medium gestoppt, was durch sorgfältiges Mischen gewährleistet wurde. Die Zellsuspension wurde in einem 15ml Zentrifugenröhrchen für vier Minuten bei 1200rpm und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 2ml MEM-Medium resuspendiert. Je 1ml der Zelllösung wurde in eine zuvor mit 4ml Medium befüllte 25-T Flasche gegeben.

Die Passage wurde zweimal durchgeführt, sodass acht Flaschen pro Zelllinie zur Verfügung standen, bevor die Zellen in Air-Liquid Interface (ALI)-Platten überführt werden konnten.

Air-Liquid Interface (ALI)-Platten:

ALI-Kulturen finden breite Verwendung in der Erforschung von Atemwegsepithel. Die Zellen werden hierbei auf einen permeablen Filter gegeben, unter dem sich Medium befindet; die andere Seite wird direkt der Raumluft exponiert. Dies führt zur Bildung polarisierter Zellschichten mit Mikrovilli und Zilien an der apikalen Membran und basolateralen Zell-Zell-Verbindungen an dem Medium zugewandten Membran. Die Differenzierung und elektrischen Eigenschaften werden so verbessert, wodurch die Zellen vermehrt ihrem Ursprungsgewebe entsprechen (93). Nach Ehrhardt et al. (2002) wurden modifizierte ALI- Kulturen eingesetzt, indem auch auf die apikale Seite der CFBE41o- und 16HBE14o- Zellen 0,5ml Medium gegeben wurde, um konfluierende Zellschichten und Tight Junctions zu bilden (8, 88) (siehe Abbildung 3).

Nach dem letzten Schritt der Subkultivierung (vgl S.21) wurde das Zellpellet mit 1,5 ml MEM-Medium resuspendiert und 0,5 ml auf einen porösen Membraneinsatz gegeben, unter dem sich 2 ml MEM-Medium befand. Die Platten wurden bei 37°C im CO₂-Inkubator gelagert und das Medium alle zwei bis drei Tage ausgewechselt. Nach 14 Tagen konnten die Zellen zum FACS verwendet werden.

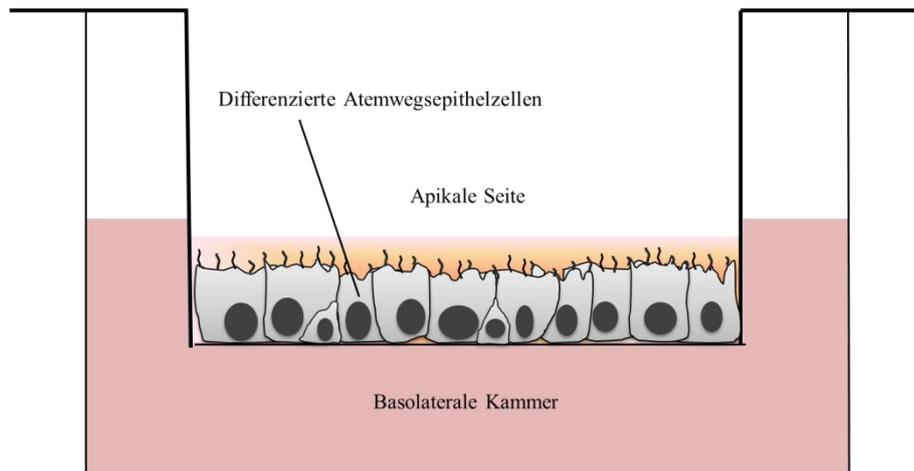


Abbildung 3 - Modifizierte Air-Liquid Interface-Platte

Lagerung im flüssigen Stickstoff:

Nach dem letzten Zentrifugieren bei der Subkultivierung der Zellen (vgl S.18) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 3ml Freezing Solution resuspendiert und je 1,5ml in ein Gefrierlagerröhrchen gefüllt. Dieses wurde bei -80°C aufbewahrt und schnellstmöglich in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2. *Aspergillus fumigatus* Kulturen

Die *A. fumigatus* Kulturen vom Stamm ATCC46645 wurden bei -80°C in Glycerin gelagert. Die Anzucht erfolgte auf Sabouraud-Agar Platten.

Hyphen und Konidien wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Anurag Singh. Die Gewinnung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Gewinnung der Konidien:

10µl der Konidien-Lösung wurden in die Mitte einer Platte pipettiert. Nach vier Tagen Inkubation bei 37°C war die Platte vollständig mit Konidien bedeckt, welche dann geerntet wurden. Dazu wurden mittels einer PBS/0,1% Tween 20 - Lösung die Konidien resuspendiert und für 5min bei 300g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und anschließend mit PBS für 5min bei 300g und RT gewaschen. Die gezählten Konidien wurden bis zur Herstellung der Infektionslösungen bei 4°C gelagert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte im Heizblock für 30min bei 90°C.

Gewinnung der Hyphen:

Hierzu wurden Konidien in einem Erlenmeyerkolben mit RPMI1640 + 10%FCS inkubiert bei einer Konzentration von 10^6 Konidien/ml. Die Inkubation erfolgte im Schüttelinkubator für 16h bei 150 rpm und 37°C und anschließend wurde das Wachstum mit dem Mikroskop überprüft. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 300g wurde mit PBS gewaschen und 30min lang bei 90°C hitzeinaktiviert.

2.2.3. Infektionsversuche

Um die Infektionen mit unterschiedlichen Pilzbestandteilen zu imitieren, wurden hitzeinaktivierte *A.fumigatus* Konidien oder *A.fumigatus* Hyphen oder der kommerziell erhältliche fungale Ligand Zymosan auf die kultivierten HBE- und CFBE-Zellen gegeben. Nach 24h oder 48h wurden anschließend die Zellen gesammelt und zur Durchflusszytometrie gefärbt. Der Überstand wurde für spätere ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) verwendet (siehe Abbildung 4).

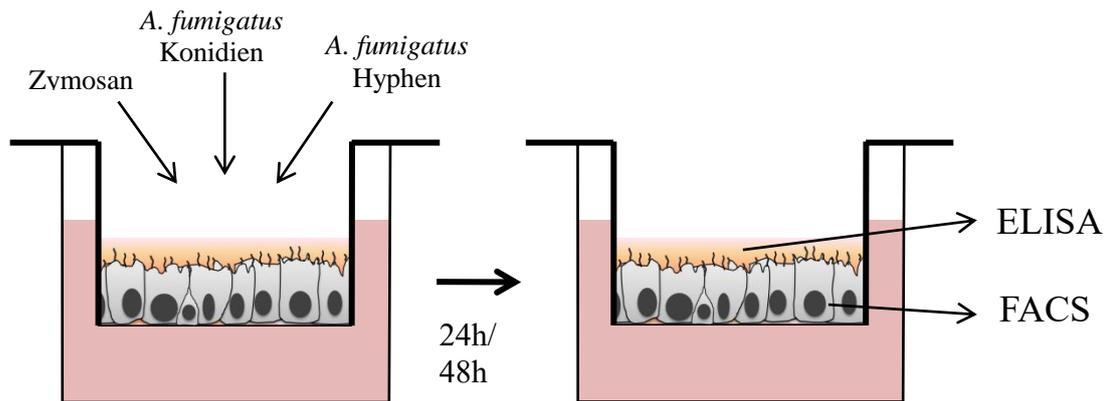


Abbildung 4 - Vereinfachte Darstellung des Versuchsablaufes

2.2.3.1. Infektion

Vor der Infektion wurde das apikale und basale Medium durch FBS-freies Medium ersetzt und für zwei Stunden im CO₂-Inkubator gelagert, um die Zytokinproduktion der Zellen nicht zusätzlich durch die Serumbestandteile zu stimulieren (94).

Wir wählten *A. fumigatus* Konidien, *A. fumigatus* Hyphen und Zymosan für die Infektion aus. Es gab neben der Vergleichsreihe mit Medium 1:4, 1:20 und 1:100 Verdünnungen (auf eine Million CFBE- bzw. HBE- Zellen kamen also zum Beispiel 4Mio/20Mio/100Mio Konidien). Nach dem Absaugen des FBS-freien Mediums wurden je 500µl der Verdünnungen für die Inokulation auf ein Well gegeben. Jeweils die Hälfte der infizierten Zellen wurde nach 24h und 48h für die Durchflusszytometrie geerntet.

Tabelle 5 - Herstellung der Verdünnungen

(gerechnet für die Inokulation eines Wells mit 500µl):

Verdünnung	Konidien-Stammlösung (800Mio Zellen/ml) bzw. Zymosan-Stammlösung (1mg/ml)	FBS-freies Medium
1:4	5,0µl	495µl
1:20	25,0µl	475µl
1:100	125,0µl	375µl
	Hyphen-Stammlösung (200Mio Zellen/ml)	
1:4	28,5µl	471,5µl
1:20	142,8µl	357,2µl
1:100	500,0µl	

2.2.3.2. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (oder auch FACS; engl. für Fluorescence Activated Cell Sorting oder Fluorescence Activated Cell Scanning) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulär exprimierten Proteinen. Es erfolgt dabei eine Analyse und Aufbereitung von Einzelzellen in einer Suspension auf Grundlage von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften mit zeitgleicher Sortierung der zu analysierenden Zellen. Eine Zellsuspension wird dazu in eine Kapillare gesaugt und die einzelnen Zellen anschließend in einer Messkammer durch Laserlicht angeregt.

Durch die hervorgerufene Lichtstreuung in der Messprobe können Zellpopulationen voneinander unterschieden werden. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter = FSC) definiert dabei die Größe der Zelle, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter =SSC) die Granularität anzeigt.

Neben der Lichtstreuung kann außerdem das emittierte Fluoreszenzlicht von Antikörper-gekoppelten Fluorochromen gemessen werden. Die Antikörper binden an Oberflächenproteine oder intrazelluläre Proteine. Durch den Laser werden die Antikörper-gekoppelten Fluorochrome angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht einer spezifischen Wellenlänge, wodurch ein quantitativer Rückschluss auf das

Vorkommen der gesuchten Zielmoleküle gezogen werden kann. Eine Suspension kann mit verschiedenen Antikörpern versetzt werden, wenn die genutzten Fluorochrome verschiedene Emissionsspektren aufweisen.

In den durchgeführten Versuchen wurden folgende Antikörper-gekoppelten-Fluorochrome verwendet: Phycoerythrin (PE), Alexa Fluor® 647, APC und Fluoresceinisothiozyanat (FITC). Dies diente zum Nachweis von Dectin-1-, TLR2- und MMR-, sowie TLR4- und Dectin-2-Rezeptoren (siehe Tabelle 2).

24h/48h nach der Infektion (siehe Seite 25) wurde das apikale Medium für spätere ELISA-Versuche abgenommen und in Mikroreaktionsgefäßen bei -20°C eingefroren.

Auf jeden Membraneinsatz wurde 1ml DPBS gegeben und die Zellen mittels eines Einweg-Zell-Schabers vom Boden gelöst. Die Zellsuspension wurde in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und auf 5ml mit DPBS aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung für fünf Minuten bei 400g und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 150µl kaltem FACS-Puffer (DPBS mit 1 % BSA und 0.2%NaN₃) resuspendiert.

Je 1x10⁶ Zellen wurden in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Abbildung 5 zeigt das verwendete Schema für die Färbungen.

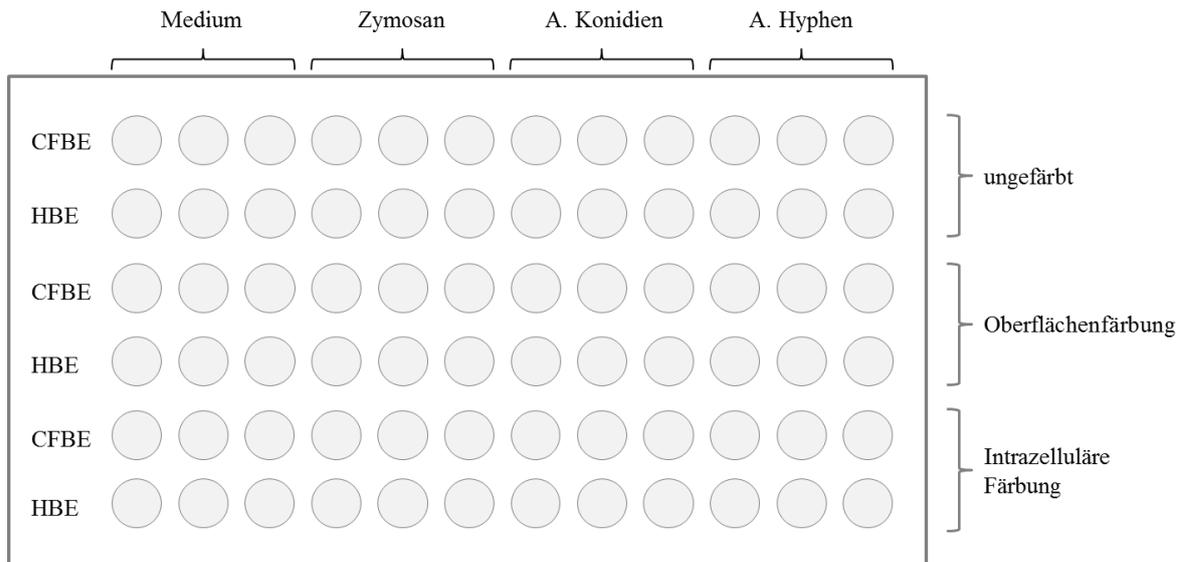


Abbildung 5 - Färbung für die Durchflusszytometrie

Extrazelluläre Färbung:

Für eine extrazelluläre Färbung der Oberflächenproteine wurden jeweils 5µl Antikörper-gekoppelte Fluorochrome zur Zellsuspension hinzugefügt und gut durchmischt. Für die Färbung mit APC anti-hDectin-2/CLEC6A- Antikörper wurden 10 µl pro 1×10^6 Zellen und für die Färbung mit FITC anti-TLR4 1µl pro 1×10^6 Zellen verwendet. Anschließend wurde die Platte für 35min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 150µl FACS-Puffer hinzugegeben, die Platte für sieben Minuten bei 350g und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Messung der extrazellulären Färbung wurde das Zellpellet in 100µl FACS-Puffer resuspendiert und in kleine FACS-Röhrchen (Titertubes®) transferiert.

Intrazelluläre Färbung:

Für die folgenden Schritte der intrazellulären Färbung wurden die Zellen in 200µl Fix/Perm – Puffer (BioLegend, USA) resuspendiert und für 20min im Dunkeln bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Platte für sieben Minuten bei 350g und RT zentrifugiert und das Zellpellet mit 200µl Perm/Wash (BioLegend, USA) resuspendiert. Fix/Perm- (Zellfixierung) und Perm- (Permeabilisierung) Puffer wurden frisch mit FACS-Puffer nach Seite 17 verdünnt.

Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 50µl Perm- Puffer resuspendiert, erneut gefärbt (5µl für Dectin-1- oder TLR2-Färbung und 10µl für Dectin-2) und für 45min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100µl FACS-Puffer hinzugegeben, bei 350g und RT für sieben Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben wurden mit 100µl FACS-Puffer resuspendiert und in kleine FACS-Röhrchen (Titertubes®) umgefüllt. Es folgte die Durchflusszytometrie aller Proben mit BD *FACSCalibur*.

Auswertung der Daten:

Die Analyse der Daten erfolgte mit FlowJO v10 und GraphPad Prism 7.03. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-Test für ungepaarte Proben mit nichtparametrischer Verteilung verwendet, bei gepaarten Proben der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

2.2.3.3. ELISA

ELISA (= Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein halbquantitatives Verfahren zum Nachweis spezifischer Antigene über eine enzymatische Farbreaktion. Bei den verwendeten Kits handelte es sich um Sandwich-ELISAs, bei denen zwei Antikörper an verschiedene Epitope desselben Antigens binden.

Alle Versuche wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die optische Extinktion der Proben wurde in allen Versuchen bei 450nm Wellenlänge abgelesen.

IL-8 DuoSet ELISA und IL-1 β Duo Set ELISA (R&D Systems):

Eine 96-Well-Mikrotestplatte wurde mit 100 μ l verdünntem Capture Antibody (4 μ g/ml PBS) pro Well beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Die Platte wurde anschließend dreimal mit 400 μ l Wash Buffer (0,05% Tween@20 in PBS) gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Durchgängen alle Flüssigkeit durch Klopfen auf saubere Papierhandtücher entfernt wurde. Nach Zugabe von 300 μ l Block Buffer (1%BSA in PBS) wurde für eine Stunde bei RT inkubiert und erneut dreimal gewaschen.

Je 100 μ l Proben bzw. Standards für die Kalibriergerade (sieheTabelle 6) wurden auf die Platte gegeben, wobei ein Doppelansatz bestimmt wurde. Nach zwei Stunden Inkubation bei RT und einem Waschschrift (wie oben beschrieben), wurde 100 μ l Detection-Antikörper Lösung (20ng in 1ml Reagent Diluent) in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde anschließend für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschvorgang wurden 100 μ l Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase)-Lösung (40-fach verdünnt in Reagent Diluent) in jedes Well gegeben und anschließend im Dunkeln für 20min inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang wurde die Substratlösung auf die Platte gegeben (100 μ l/ Well; bestehend aus Color Reagent A und B 1:1). Nach 20min Inkubation bei RT wurde der Farbumschlag durch 50 μ l Stop Solution (2 N H₂SO₄) pro Well beendet.

IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA und IL-10 Quantikine ELISA (R&D Systems):

Auf die bereits mit Capture-Antibody beschichtete Platte wurde 200µl Probenmaterial oder Standards für die Kalibriergerade (siehe Tabelle 6) gegeben. Nach zwei Stunden Inkubationszeit bei RT und folgendem dreifachen Waschdurchgang wurden 200µl IL-1β- bzw. IL-10- Konjugat in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde anschließend für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde 200µl Substrat-Lösung in jedes Well gegeben und für 20min im Dunkeln bei RT inkubiert. Der Farbumschlag wurde durch 50µl Stop Solution (2 N H₂SO₄) pro Well beendet.

CCL17/TARC Quantikine ELISA (R&D Systems):

Auf die bereits mit Capture-Antibody beschichtete Platte wurde 100µl Assay Diluent RD1W und 50µl Probe bzw. Standards für die Kalibriergerade (siehe Tabelle 6) gegeben. Nach zwei Stunden Inkubationszeit bei RT und wurde die Platte dreimal gewaschen und 200µl Human-TARC-Konjugat in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde 200µl Substrat-Lösung in jedes Well gegeben, und 30min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch 50µl Stop Solution (2 N H₂SO₄) pro Well beendet.

IL-6 ELISA MAX™ Deluxe Set (BioLegend):

Eine 96-Well-Mikrotestplatte wurde mit 100µl verdünntem Capture Antibody (*5µl pro ml Coating Buffer*) pro Well beschichtet, über Nacht im Kühlschrank inkubiert und anschließend in vier Durchgängen gewaschen. Nach der Zugabe von 200µl Assay Diluent A-Lösung (1ml Assay Diluent A in 4ml PBS) wurde für eine Stunde bei RT inkubiert und viermal gewaschen.

Je 100µl Probe bzw. Standards für die Kalibriergerade (siehe Tabelle 6) wurde als Doppelbestimmung auf die Platte gegeben. Nach zwei Stunden Inkubationszeit bei RT wurde die Platte viermal gewaschen und anschließend wurde 100µl Detection-Antikörper (5µl in 1ml Assay Diluent A-Lösung) in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurde 100µl Avidin-HRP Lösung (1µl/ml Assay Diluent A-Lösung) in jedes Well gegeben und anschließend im Dunkeln für 30min inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang wurde frische TMB Substrat Lösung auf die Platte hinzu gegeben (100µl/ Well; bestehend aus Substrat-Lösung A und B 1:1). Nach 15min Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Farbreaktion durch 100µl Stop Solution (2 N H₂SO₄) pro Well beendet.

Tabelle 6 - Verdünnung der Standardreihe

(in pg/ml gelöst in Millipore Wasser bzw. Assay Diluent A (5X) bei IL-6 ELISA)

	Verdünnungen der Standards:							
ELISA:	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
IL-8	2000	1000	500,0	250,0	125,0	62,5	31,3	0
IL-6	500	250	125,0	62,5	31,25	15,625	7,8125	0
IL-1β	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	0
IL-1β quantikine	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	1,95	0
IL-10 quantikine	500	250	125,0	62,5	31,25	15,625	7,8125	0
TARC quantikine	2000	1000	500,0	250,0	125,0	62,5	31,3	0

Auswertung der Daten:

Zur Bestimmung der unbekanntenen Probenkonzentrationen wurde eine Kalibrierungskurve erstellt, indem zunächst die Extinktionen bekannter Standard-Verdünnungen (siehe Tabelle 6) gemessen wurden. Anschließend wurde eine Re-

gressionsanalyse durchgeführt, also eine Ausgleichskurve definiert, die möglichst nahe an den gemessenen Werten lag. Anhand dieser konnten nun die Zytokin- und Interleukin-Konzentrationen der Proben errechnet werden.

Die weitere Analyse der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 7.03.

Zur statistischen Auswertung wurde für ungepaarte Proben ein Mann-Whitney-Test mit nichtparametrischer Verteilung verwendet, für gepaarte Proben der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich die Erkennung von fungalen Liganden und die daraufhin eingeleitete Immunantwort zwischen CF- und Kontrollatemwegszellen unterscheiden. Dazu wurde die Expression von verschiedenen Rezeptoren nach Infektion mit Zymosan und *Aspergillus fumigatus* Bestandteilen mittels Durchflusszytometrie erfasst.

Außerdem wurde die Zytokinproduktion der Zellen durch ELISA untersucht.

3.1. Durchflusszytometrie (FACS)

Mit der Durchflusszytometrie wurde die Immunfluoreszenz der untersuchten Zellpopulationen gemessen. Mittels Auswertung durch FlowJo v10 wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) berechnet. Diese ist ein Maß dafür, wieviel Fluoreszenzfarbstoff pro Partikel gebunden wurde. Aus den Werten der gefärbten und ungefärbten Zellen wurde im Anschluss die Differenz berechnet, um die zelluläre Autofluoreszenz aus der Auswertung auszuschließen und nur die tatsächlich angefärbten Rezeptoren dazustellen (siehe Formel (1)). In diesem Kapitel dargestellte Abbildungen zeigen die berechnete mittlere Fluoreszenzintensität Δ MFI.

$$(1) \quad \Delta\text{MFI} = \text{MFI}_{\text{gefärbt}} - \text{MFI}_{\text{ungefärbt}}$$

$$(2) \quad \Delta\text{MFI}_{\text{Intrazellulär}} = \Delta\text{MFI}_{\text{Total}} - \Delta\text{MFI}_{\text{Oberfläche}}$$

Zur Feststellung der intrazellulären Rezeptorendichte wurde anhand von Formel (2) die Differenz der Δ MFI der sowohl oberflächlich als auch intrazellulär gefärbten Zellen ($\Delta\text{MFI}_{\text{Total}}$) und der oberflächlich gefärbten Zellen ($\Delta\text{MFI}_{\text{Oberfläche}}$) herangezogen.

Vorversuche zur Dosisabhängigkeit:

Als Vorversuch wurden 16HBE14o⁻- und CFBE41o⁻-Zellen mit Zymosan, *A. fumigatus* Konidien und *A. fumigatus* Hyphen in Lösungen verschiedener Konzent-

rationen infiziert, um eine eventuelle Dosisabhängigkeit bei der zunächst untersuchten Expression von Dectin-1- und TLR2-Rezeptoren festzustellen. Zwischen den Verdünnungen mit 1:4-, 1:20- und 1:100- Konzentrationen waren in der anschließenden Auswertung keine Unterschiede zu erkennen. Alle weiteren Versuche wurden mit der Verdünnung 1:20 (auf eine Million Zellen kommen zum Beispiel 20 Millionen Konidien) durchgeführt.

3.1.1. Dectin-1

Dectin-1 an der Zelloberfläche:

Bei beiden untersuchten Zellreihen HBE und CFBE schien die gemessene Anzahl an oberflächlichen Dectin-1-Rezeptoren nach 48h niedriger als nach 24h. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant.

Die Dectin-1 Expression unterschied sich auch nicht signifikant zwischen CFBE- und HBE-Zellen, tendenziell war sie bei CFBE-Zellen etwas höher als bei HBE-Zellen.

Die Infektion mit Zyosan, *Aspergillus* Konidien und *Aspergillus* Hyphen zeigte bei beiden Zellreihen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keinen Einfluss auf die Expression von Dectin-1 (siehe Abbildung 6 - A).

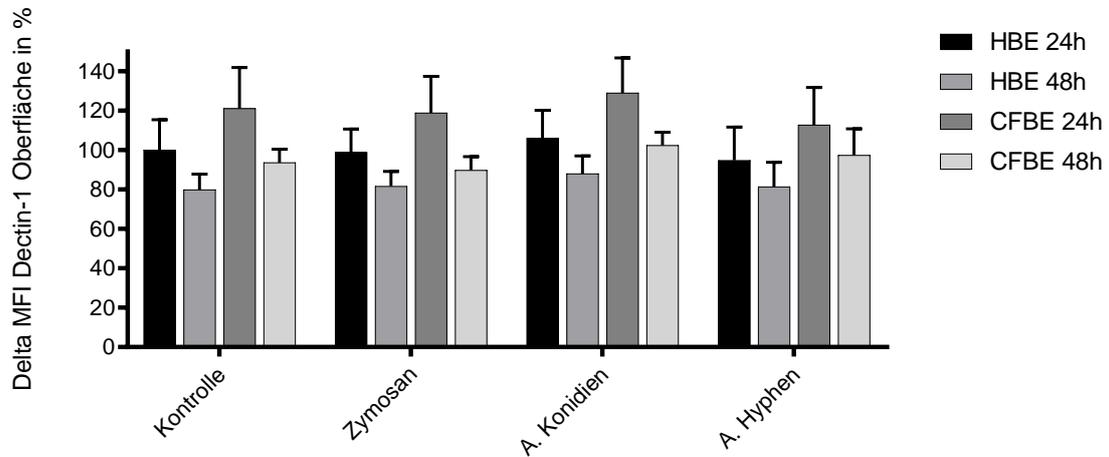
Dectin-1 intrazellulär:

HBE-Zellen und CFBE-Zellen zeigten einen nicht signifikanten Anstieg der intrazellulären Dectin-1- Expression im zeitlichen Verlauf bei den unbehandelten Kontrollproben und nach Infektion mit Pilzbestandteilen.

Bei den CFBE-Zellen schienen die Dectin-1 Werte nach 24h und 48h jeweils höher als bei HBE-Zellen zum selben Zeitpunkt, es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Zellreihen.

Während nach Infektion mit Zyosan und *Aspergillus* Konidien keine Änderung der Dectin-1-Expression im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten war, zeigten sich nach Infektion mit *Aspergillus* Hyphen tendenziell niedrigere intrazelluläre Dectin-1-Werte. Diese nicht signifikante Veränderung trat bei beiden Zellreihen nach 24h und 48h auf (siehe Abbildung 6 – B).

(A)



(B)

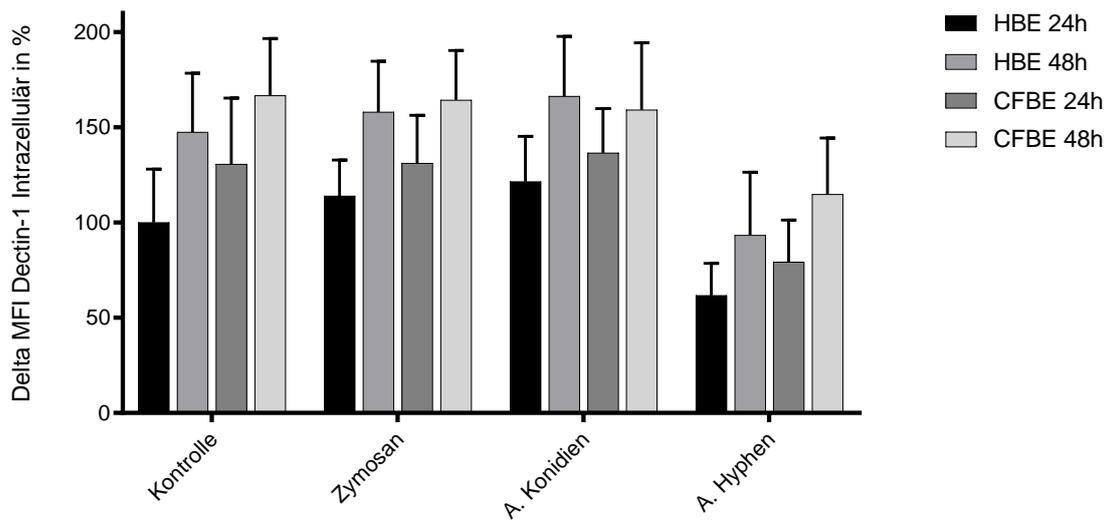


Abbildung 6 - A, B: Durchflusszytometrische Ergebnisse von Dectin-1

an der Zelloberfläche (A) und intrazellulär (B) von/in 16HBE14 σ - und CFBE41 σ -Zellen, 24 und 48 Stunden nach Stimulation mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien oder *Aspergillus* Hyphen. Kontroll-Proben: Nur FBS-freies Medium. Dargestellte Daten stammen aus (A) n=11 und (B) n=10 und Experimenten. 100% entsprechen Delta MFI der HBE Kontrolle nach 24h. Durchgeführte Signifikanztests: s.S. 29.

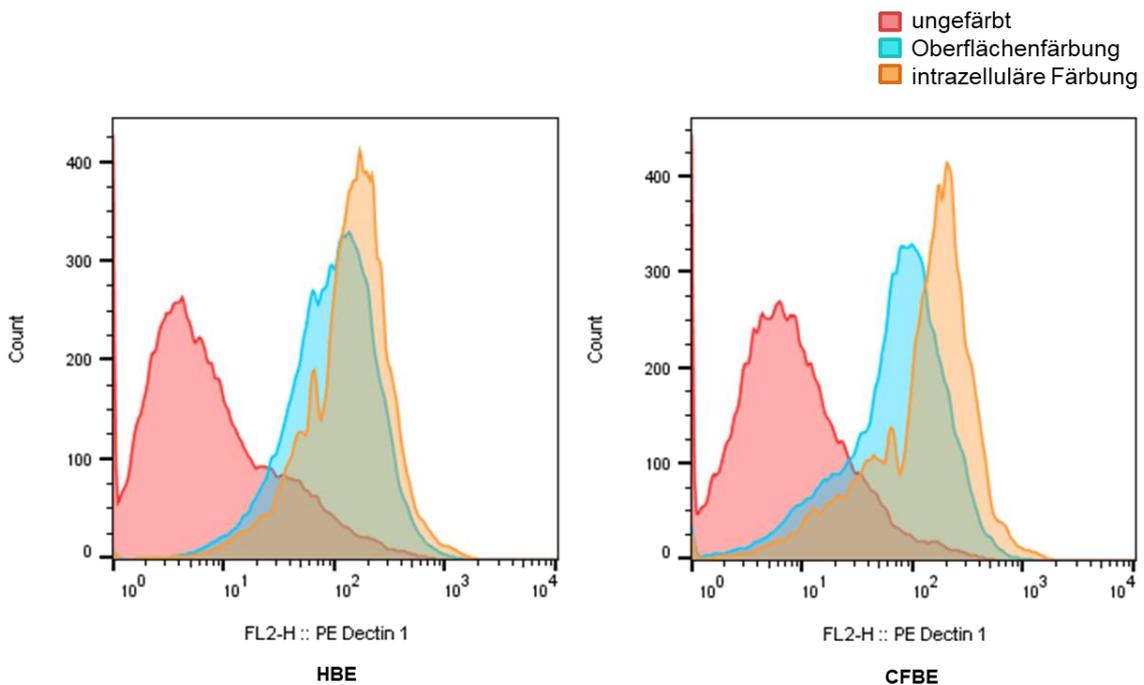


Abbildung 7: PE Dectin-1 Häufigkeitsverteilung in der Durchflusszytometrie
ungefärbter, oberflächengefärbter und intrazellulär gefärbter 16HBE14o⁻(links) und CFBE41o⁻ (rechts) - Zellen der Kontrollgruppe nach 24h. Beispielhafte Daten eines Versuches.

3.1.2. Dectin-2

Dectin-2 an der Zelloberfläche:

In HBE- und CFBE-Zellen blieb die Expression von oberflächlichem Dectin-2 im zeitlichen Verlauf konstant.

Zymosan, *Aspergillus* Konidien und *Aspergillus* Hyphen führten bei beiden Zellreihen zu keiner Veränderung in der Dectin-2-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

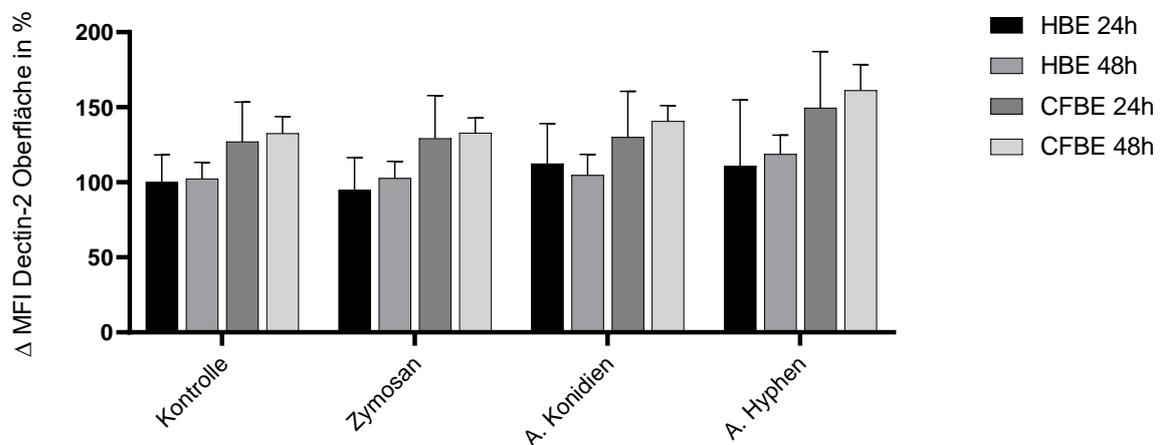
Die oberflächliche Expression von Dectin-2 unterschied sich sowohl nach 24h als auch nach 48h nicht signifikant zwischen HBE- und CFBE-Zellen (siehe Abbildung 8- A).

Dectin-2 intrazellulär:

Die Stimulation mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien oder *Aspergillus* Hyphen führte bei beiden Zelllinien zu keiner signifikanten Veränderung der intrazellulären Dectin-1- Expression.

Die intrazelluläre Expression von Dectin-2 unterschied sich nicht signifikant zwischen HBE- und CFBE-Zellen (siehe Abbildung 8 - B).

(A)



(B)

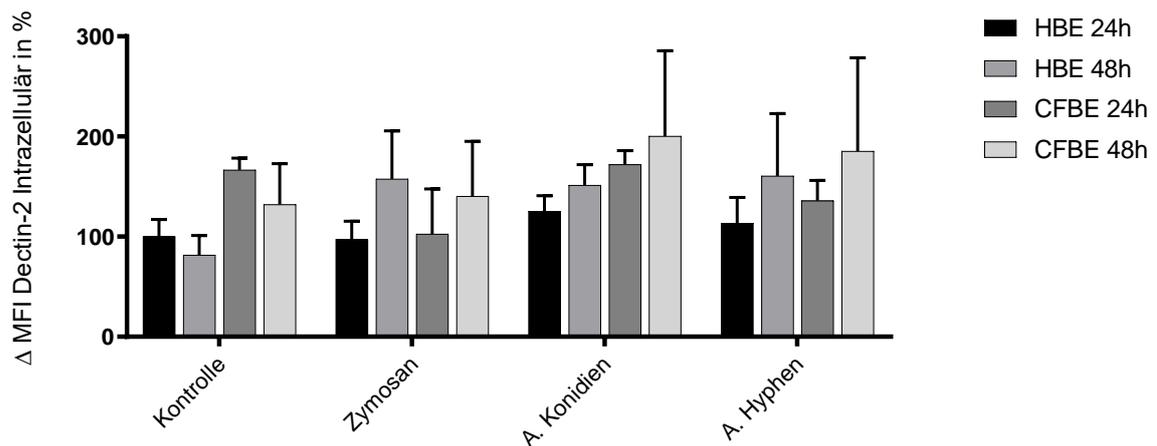


Abbildung 8 - A, B: Durchflusszytometrische Ergebnisse von Dectin-2

an der Zelloberfläche (A) und intrazellulär (B) von/in 16HBE14 σ - und CFBE41 σ -Zellen, 24 und 48 Stunden nach Stimulation mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien oder *Aspergillus* Hyphen. Kontroll-Proben: Nur FBS-freies Medium. Dargestellte Daten stammen aus n=3 Experimenten. 100% entsprechen HBE Kontrolle nach 24h. Durchgeführte Signifikanztests: s.S.29.

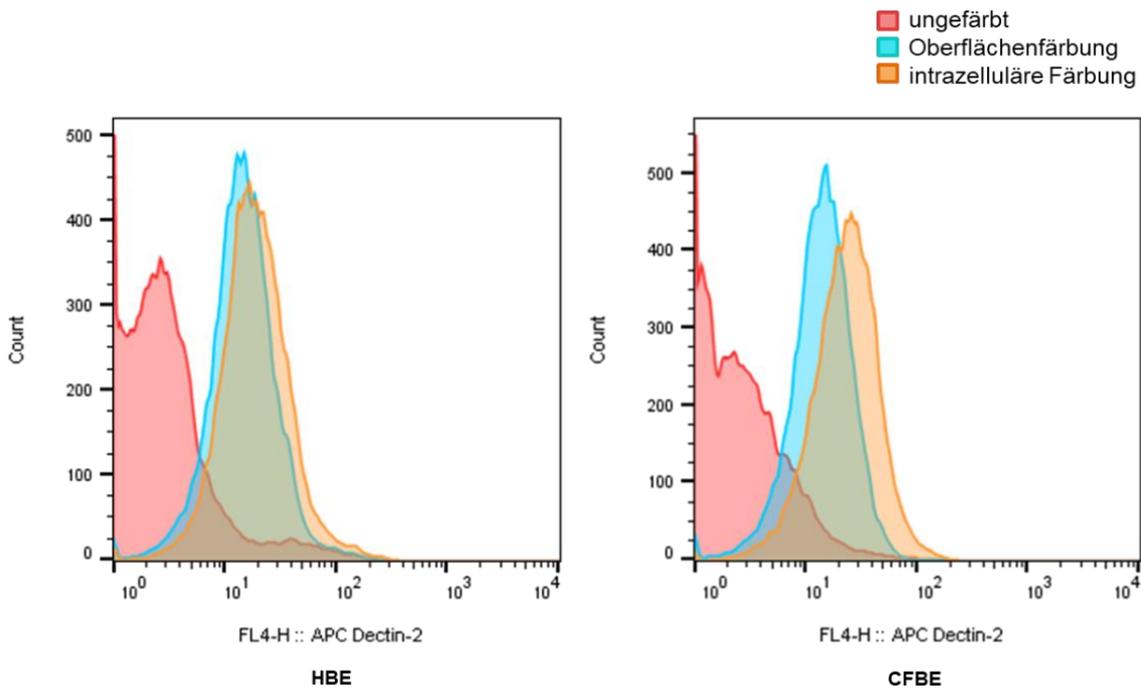


Abbildung 9: APC Dectin-2 Häufigkeitsverteilung in der Durchflusszytometrie
ungefärbter, oberflächengefärbter und intrazellulär gefärbter 16HBE14o⁻(links) und CFBE41o⁻ (rechts) - Zellen der Kontrollgruppe nach 24h. Beispielhafte Daten eines Versuches.

3.1.3. TLR2

TLR2 an der Zelloberfläche:

Ein Unterschied der Expressionsdichte des TLR2-Rezeptors an der Oberfläche der HBE- und CFBE-Zellen war 24h bzw. 48h nach Infektion mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien oder *Aspergillus* Hyphen nicht zu erkennen gegenüber der un- behandelten Kontrolle.

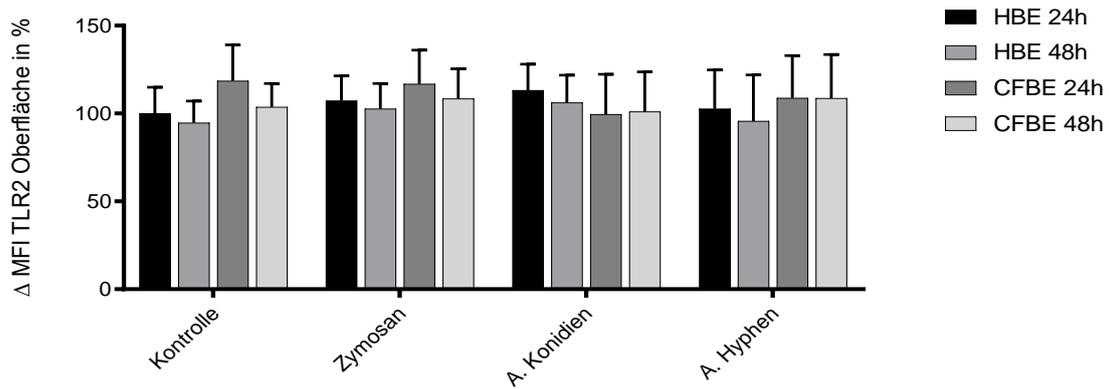
Zwischen den Zelllinien HBE und CFBE zeigte die Δ MFI TLR2 keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 10 – A).

TLR2 intrazellulär:

Auch die Anzahl intrazellulärer TLR2-Rezeptoren veränderte sich nicht signifikant nach Infektion mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien oder *Aspergillus* Hyphen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 10 –B).

Die intrazelluläre TLR2-Expression unterschied sich nicht signifikant zwischen HBE- und CFBE-Zellen.

(A)



(B)

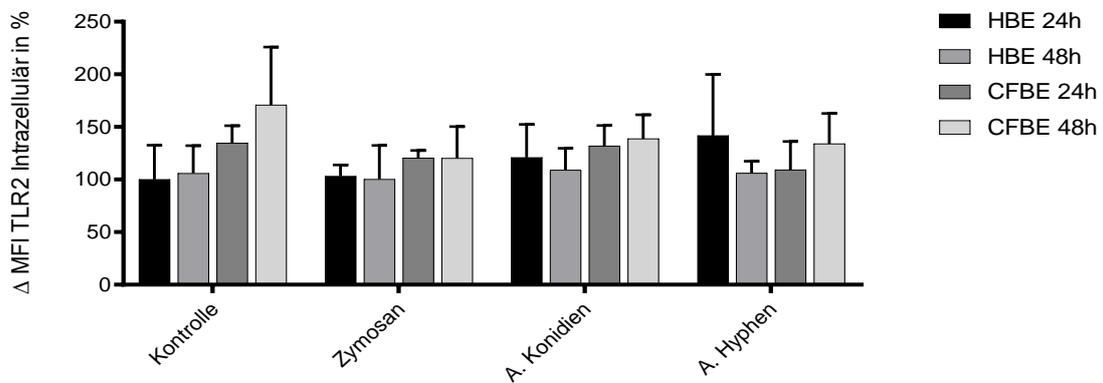


Abbildung 10 - A, B: Durchflusszytometrische Ergebnisse von TLR2

an der Oberfläche (A) und intrazellulär (B) von/in 16HBE14o⁻ und CFBE41o⁻-Zellen, 24 und 48 Stunden nach Stimulation mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien oder *Aspergillus* Hyphen. Kontroll-Proben: Nur FBS-freies Medium. Dargestellte Daten stammen aus (A)n=8 und (B)n=3 Experimenten. 100% entsprechen HBE Kontrolle nach 24h. Durchgeführte Signifikanztests: s.S.29.

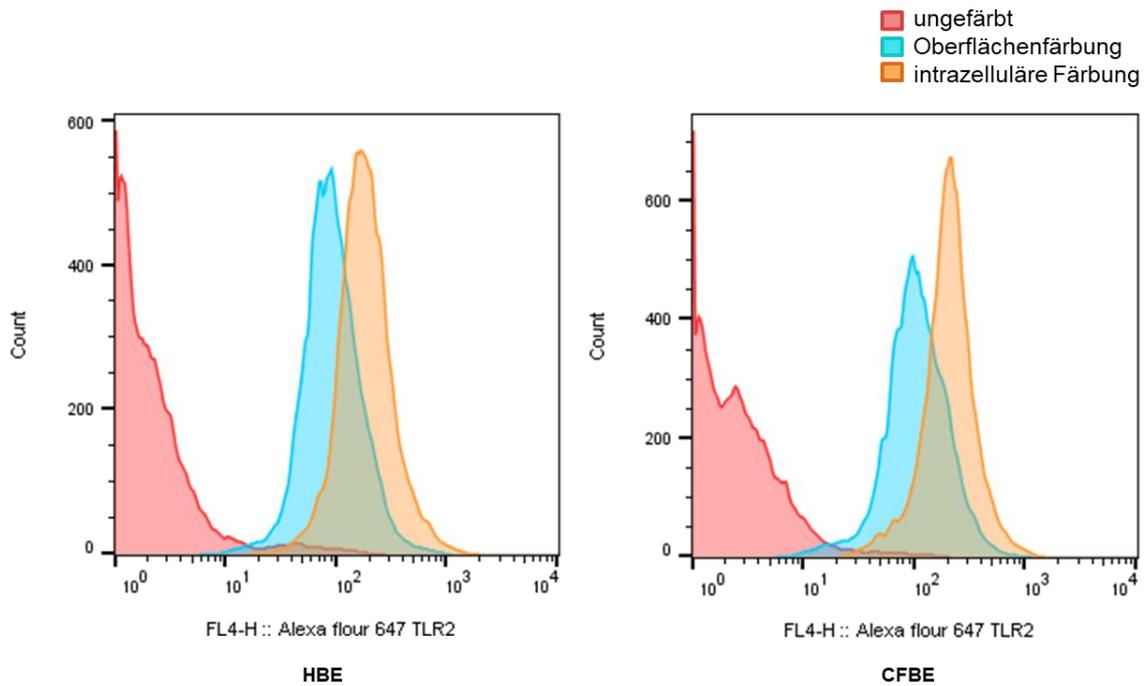


Abbildung 11: Alexa flour 637 TLR2 Häufigkeitsverteilung in der Durchflusszytometrie
ungefärbter, oberflächengefärbter und intrazellulär gefärbter 16HBE14o⁻(links) und CFBE41o⁻(rechts) -Zellen der Kontrollgruppe nach 24h. Beispielhafte Daten eines Versuches.

3.1.4. MMR und TLR4

Die MMR- und TLR4- Rezeptoren waren in den durchgeführten Versuchen nicht detektierbar.

3.2. ELISA

3.2.1. IL-8 ELISA

Zur Bestimmung der IL-8-Konzentration im Überstand der ALI-Platten wurde das *Human CXCL8/IL-8 DuoSet ELISA Kit* der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet.

Bei HBE- und CFBE- Zellen kam es im zeitlichen Verlauf zu einer Zunahme der IL-8-Konzentration im Überstand im Sinne einer kontinuierlichen Produktion, bei den HBE-Kontrollproben war dieses Ergebnis signifikant ($p=0,008$). Außerdem war die basale Produktion von IL-8 bei CFBE-Zellen mehr als doppelt so hoch wie bei den HBE-Zellen ($p=0,008$; siehe Abbildung 12).

Die Infektion mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien und *Aspergillus* Hyphen nahm sowohl bei HBE- Zellen als auch bei CFBE-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion. Einzig die Infektion mit *Aspergillus* Hyphen führte bei HBE-Zellen nach 48h zu einer signifikant niedrigeren IL-8-Konzentration als bei der Kontrolle (siehe Abbildung 13, rechts oben).

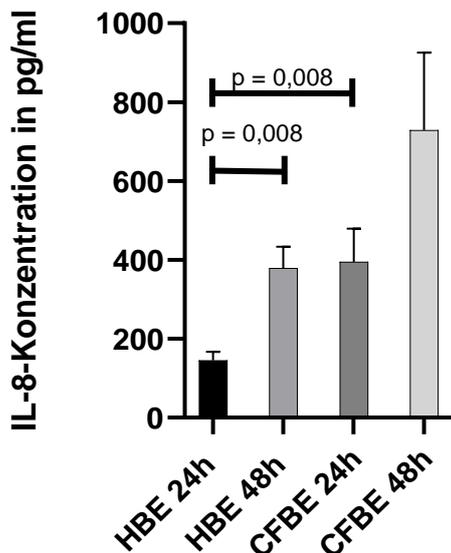


Abbildung 12: IL-8-Konzentration im Überstand der Kontrollproben (FBS-freies Medium) in pg/ml.

bei 16HBE140⁻ und CFBE410⁻-Zellen nach 24h und 48h. Dargestellte Daten stammen aus n=5 Experimenten.

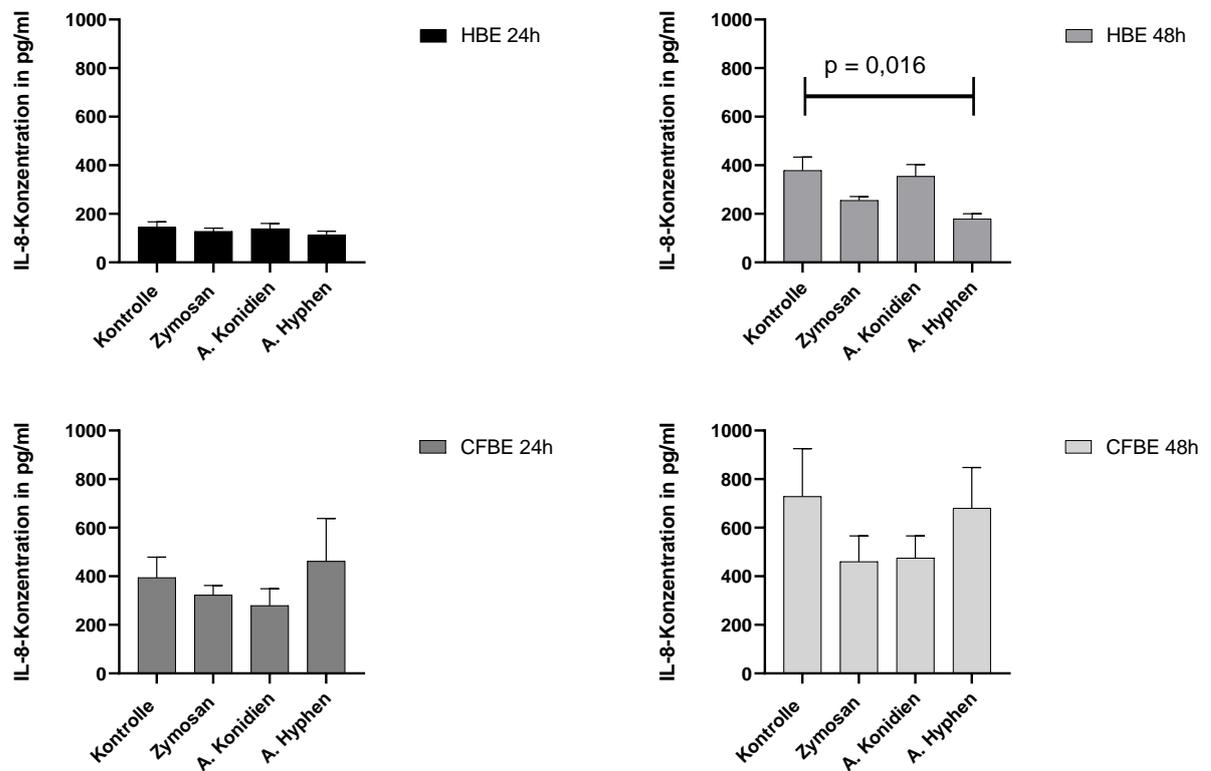


Abbildung 13: IL-8-Konzentration in pg/ml

im Überstand von 16HBE14o⁻-Zellen 24h (links oben) und 48h (rechts oben) nach Stimulation mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien oder *Aspergillus* Hyphen und CFBE41o⁻-Zellen 24h (links unten) und 48h (rechts unten) nach Stimulation. Kontrollproben: nur FBS-freies Medium. Dargestellte Daten stammen aus n=5 Experimenten. Durchgeführte Signifikanztests: s.S. 32.

3.2.2. IL-6 ELISA

Zur Bestimmung der IL-6-Konzentration im Überstand der Zellkulturen wurde das *Human IL-6 ELISA MAX™ Deluxe Set* der Firma BioLegend (San Diego, USA) verwendet.

Bei beiden Zellreihen nahmen die IL-6-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf bei allen Proben zu, jedoch nicht signifikant.

Die basale Produktion von IL-6 war bei CFBE-Zellen etwa dreimal so hoch wie bei den HBE-Zellen (nicht signifikant, siehe Abbildung 14).

Die Infektion mit Zymosan und *Aspergillus* Konidien führte bei beiden Zellreihen zu keiner Veränderung der IL-6-Produktion. Lediglich nach Infektion mit *Aspergillus* Hyphen ließ sich bei HBE- und CFBE-Zellen nach 24h und 48h eine - nicht signifikante - reduzierte IL-6-Produktion im Vergleich zu den Kontrollproben beobachten (siehe Abbildung 15).

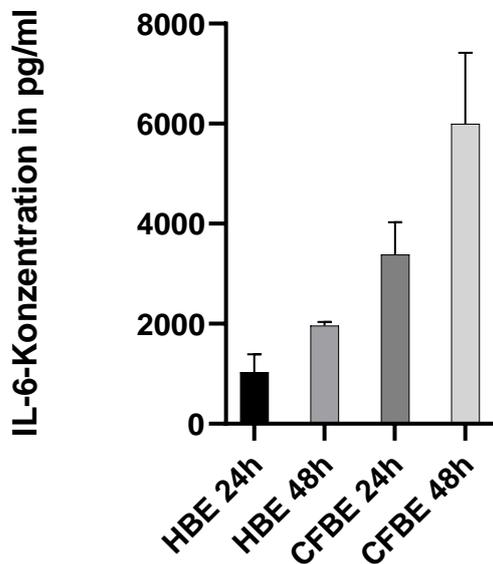


Abbildung 14: IL-6- Konzentration im Überstand der Kontrollproben (FBS-freies Medium) in pg/ml.

bei 16HBE140⁻ und CFBE410⁻-Zellen nach 24h und 48h. Dargestellte Daten stammen aus n=3 Experimenten.

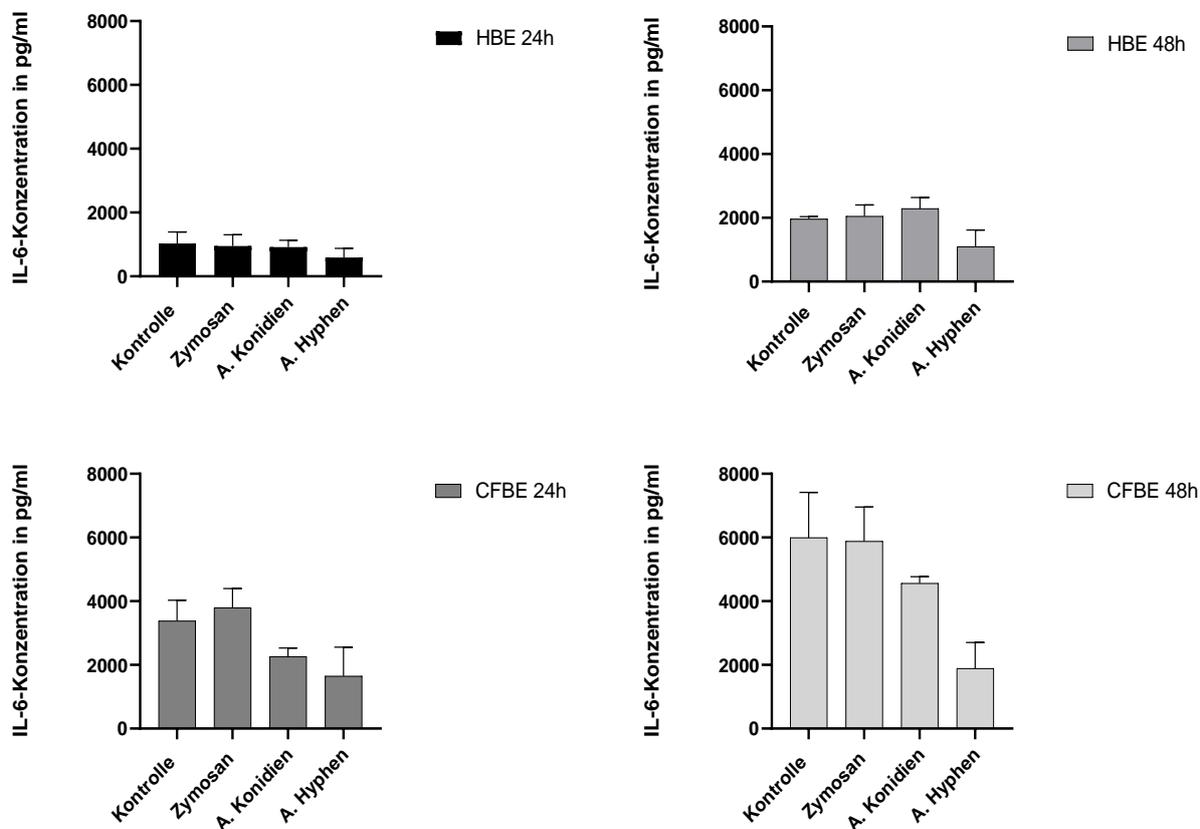


Abbildung 15: IL-6-Konzentration in pg/ml

im Überstand von 16HBE14o⁻-Zellen 24h (links oben) und 48h (rechts oben) nach Stimulation mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien oder *Aspergillus* Hyphen und CFBE41o⁻-Zellen 24h (links unten) und 48h (rechts unten) nach Stimulation. Kontrollproben: nur FBS-freies Medium. Dargestellte Daten stammen aus n=3 Experimenten. Durchgeführte Signifikanztests: s.S. 32.

3.2.3. IL-1 β -, IL-10- und TARC-ELISA

In weiteren durchgeführten ELISAs zum Nachweis von IL-1 β , IL-10 und TARC konnte bei korrekten Standardkurven keine messbare Konzentration der gesuchten Zytokine festgestellt werden.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Immunreaktion auf Pilzerreger durch HBE- und CFBE-Zellen zu untersuchen und mögliche Unterschiede auszumachen. Dazu wurden die Zellen mit Pilzbestandteilen infiziert und die anschließende Immunantwort nach 24h und 48h analysiert.

Um die Erkennung der fungalen Liganden zu untersuchen, führten wir Durchflusszytometrische Analysen auf verschiedene PRRs durch. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zellreihen. Auch die Infektion mit Pilzbestandteilen führte zu keiner signifikanten Veränderung.

Zur Untersuchung der humoralen Immunantwort der beiden Zellreihen wurden ELISAs zur Bestimmung verschiedener Zytokine im Überstand durchgeführt. Dabei war eine Zunahme der IL-6- und IL-8-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf im Sinne einer kontinuierlichen Produktion zu beobachten. Auffällig war, dass die basale Produktion von IL-6 und IL-8 bei CFBE-Zellen deutlich höher lag als bei HBE-Zellen. Die Infektion mit Pilzbestandteilen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion.

4.1. Erkennung der Pilzbestandteile durch PRRs

In den durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Dectin-1, Dectin-2 und TLR2 zwischen den beiden Zellreihen. Diese Beobachtung traf sowohl für intra- als auch extrazelluläre Rezeptoren zu.

Auch die Infektion mit Pilzbestandteilen führte zu keiner Veränderung in der Rezeptorendichte. Einzige Ausnahme hierbei war eine nicht signifikante Abnahme der intrazellulären Dectin-1-Rezeptoren nach Infektion mit *Aspergillus fumigatus* Hyphen.

4.1.1. Dectin-1

Die Expression von Dectin-1 unterschied sich in unseren Versuchen nicht signifikant zwischen CFBE- und HBE-Zellen. Zum Unterschied der Expression von Dectin-1 auf CFBE- und HBE-Zellen wurden bisher keine vergleichbaren Studien veröffentlicht.

In unseren Versuchen zeigte die Infektion mit Zymosan und *Aspergillus* Konidien und Hyphen keinen Einfluss auf die Expression oberflächlicher Dectin-1-Rezeptoren. Ähnliche Experimente anderer Forschungsgruppen brachten jedoch abweichende Ergebnisse hervor. So untersuchten zum Beispiel Sun et al. die Expression und Regulierung von Dectin-1 nach Infektion von HBE-Zellen mit *A. fumigatus* und fanden eine TLR2-abhängige Expression von Dectin-1-mRNA und -Protein, die durch *A. fumigatus* induziert wurde.

Bei experimenteller Simulation einer *Aspergillus*-Infektion mit Konidien ist zu unterscheiden, ob die inaktivierten Konidien sich in der Ruhephase oder der Phase der Schwellung befinden, da der Wegfall der hydrophoben äußeren Schicht der Zellwand die Erkennung durch PRRs erleichtert (s.S.9) (95). So konnten zum Beispiel Steele et al. zeigen, dass die Entzündungsantwort gegen *A. fumigatus* durch Dectin-1 auf Alveolarmakrophagen am stärksten durch auskeimende und geschwollene, Konidien ausgelöst wurde (96). Für unsere Arbeit wurden ruhende, hitzeinaktivierte Konidien verwendet. Dies könnte folglich eine Ursache dafür sein, dass die Expression der Dectin-1-Rezeptoren nach Infektion mit *Aspergillus* Konidien weitgehend unverändert blieb. Weitere Untersuchungen mit auskeimenden oder geschwollenen Konidien sind hier notwendig, um die Dectin-1-vermittelte Immunantwort auf *A. fumigatus* genauer zu erforschen.

Im zeitlichen Verlauf nach Infektion war kein signifikanter Unterschied in der Dectin-1-Expression zu beobachten. Tendenziell nahm die Anzahl transmembranärer Dectin-1 Rezeptoren im Verlauf jedoch ab, während gleichzeitig ein Anstieg der intrazellulären Rezeptorenzahl zu verzeichnen war. Dies könnte dafür sprechen, dass die Dectin-1 Rezeptoren nach Ligandenbindung internalisiert wurden. Dectin-1 reguliert nicht nur die Genexpression verschiedener Zytokine über einen NF- κ B-abhängigen Weg (siehe Kapitel 1.2.2.), sondern kann auch als phagozytischer Rezeptor agieren. Hernanz-Falcon et al. untersuchten die Folgen einer

Internalisierung des Rezeptors. Sie schlossen aus ihren Versuchen, dass die Einleitung einer proinflammatorischen Genexpression durch Dectin-1 hauptsächlich von der Zelloberfläche aus gesteuert wird und diese Signalwege nach Internalisierung des Rezeptors in abgeschwächter Form ablaufen (97). Dies konnte durch die Messung der Zytokinkonzentrationen mittels ELISA in unseren Versuchen nicht bestätigt werden. Die Infektion mit *Aspergillus* Hyphen führte zur niedrigsten intrazellulären Expression von Dectin-1 (nicht signifikant); nach Hernanz-Falcon et al. wären aufgrund des Verbleibs von Rezeptoren an der Oberfläche höhere Zytokinwerte zu erwarten gewesen als bei den Kontrollzellen und nach Infektion mit Zymosan oder Konidien. Stattdessen nahm die IL-8 und IL-6 Produktion nach Infektion mit Hyphen sogar ab, dieses Ergebnis war allerdings nur signifikant bei HBE-Zellen nach 48h.

Eine Infektion mit *Aspergillus* Hyphen führte in unseren Versuchen bei beiden untersuchten Zellreihen tendentiell zu geringeren intrazellulären Werten an Dectin-1. Hier schienen die Rezeptoren nach Erkennung der hyphalen Strukturen also weniger internalisiert zu werden. Soweit feststellbar wurden bisher keine vergleichbaren Versuche in anderen Forschungsgruppen durchgeführt. Infektionen mit *Aspergillus* Hyphen waren vor allem an menschlichem Kornealepithel simuliert worden, dabei zeigte sich als Reaktion eine gesteigerte Dectin-1 Expression (98, 99). Die intrazelluläre Konzentration von Dectin-1 in Atemwegsepithel nach Infektion mit *A. fumigatus* war zuvor nicht untersucht worden. Da *Aspergillus* Hyphen deutlich größer sind als Konidien (100), könnte eine ausbleibende Internalisierung in diesem Fall durch mechanisch gesetzte Grenzen des Dectin-1 Rezeptors verursacht worden sein.

4.1.2. Dectin-2

Die Dectin-2-Expression unterschied sich sowohl oberflächlich als auch intrazellulär nicht signifikant zwischen CFBE- und HBE-Zellen. Auch nach Infektion mit Pilzbestandteilen war keine Veränderung in der Dectin-2-Expression zu beobachten.

Bisher wurden keine vergleichbaren Studien zur Dectin-2-Expression auf Atemwegsepithelzellen durchgeführt.

Nach Sun et al. ist die Dectin-2 Expression in der Lunge generell niedrig, wird aber durch *A. fumigatus*-Invasion hochreguliert und scheint somit eine Rolle in der Abwehr gegen *Aspergillus* zu spielen. Außerdem wird Dectin-2 in der Lunge laut Sun et al. nur von Alveolarmakrophagen exprimiert (101). Die Expression von Dectin-2 auf Atemwegsepithelzellen konnte durch unsere Versuche jedoch nachgewiesen werden.

Die Erkennung von *Aspergillus* Hyphen durch Dectin-1 und Dectin-2 auf plasmazytoiden dendritischen Zellen wurde von Loures et al. untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Hyphen als Liganden für Dectin-2 fungieren und zur vermehrten Produktion der Zytokine TNF- α und IFN- α führen. Weitere Zytokine wurden in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Außerdem führte die Erkennung von *Aspergillus* Hyphen durch Dectin-2 zur Bildung sogenannter extrazellulärer Fallen, die DNA und antimikrobielle Proteine zum Abbau der Hyphen enthalten. Es wurde in diesen Experimenten keine Dectin-1-vermittelte Immunreaktion beobachtet, was vor allem darauf schließen ließ, dass dieser Rezeptor auf plasmazytoiden dendritischen Zellen nicht exprimiert wird (102).

4.1.3. TLR2

Auch nach Infektion mit Zymosan, *Aspergillus* Konidien oder Hyphen blieben sowohl transmembranäre als auch intrazelluläre TLR2-Werte in den durchgeführten Versuchen konstant. Vergleichbare Studien zur Quantifizierung von TLR2 als Reaktion auf Pilzpartikel wurden bisher nicht veröffentlicht. Jedoch gaben ähnliche Versuche Hinweise darauf, dass TLR2 eine Rolle in der Einleitung einer Immunantwort gegen *A. fumigatus* spielt.

So untersuchten Mambula et al. die TLR2- und TLR4- abhängige TNF- α Produktion von Peritonealmakrophagen als Reaktion auf *A. fumigatus* Konidien und Hyphen. Dabei zeigte sich, dass TLR2 für die Einleitung dieser proinflammatorischen Zytokinproduktion notwendig war und vor allem die Reaktion auf Hyphen

vornehmlich durch TLR2 getragen wurde (77). Auch Braedel et al. konnten zeigen, dass dendritische Zellen und Granulozyten als Reaktion auf *A. fumigatus*-Antigene über TLR2 und TLR4 aktiviert wurden (103).

In weiteren Versuchen durch Netea et al. war bei TLR2-Knockout-Mäusen eine verminderte proinflammatorische Zytokinantwort auf *A. fumigatus* Konidien und Hyphen durch Makrophagen zu beobachten. Außerdem wurde die IL-10-Produktion über TLR2 durch Hyphen, nicht aber durch Konidien stimuliert. In derselben Studie zeigte sich, dass proinflammatorische Signale über TLR4 bei der Auskeimung von Konidien zu Hyphen verloren gingen, antiinflammatorische TLR2-medierte Signale wie die Produktion von IL-10 jedoch erhalten blieben (104).

In unseren Versuchen konnte kein Unterschied in der TLR2-Expression zwischen CFBE- und HBE-Zellen ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu waren bei Shuto et al. die basale TLR2-Expression und Immunantwort auf Peptidoglykane bei CFBE41o- -Zellen im Vergleich zu 16HBE14o- -Zellen gesteigert. Sie erklärten dies über eine Hypomethylierung des TLR2-Promoters in kausalem Zusammenhang mit der Dysfunktion von *CFTR* (105).

Auffällig war, dass die intrazellulären TLR2-Werte bei den CFBE-Zellen ohne Pilzinfektion am höchsten waren. Da unsere Versuchsanzahl gering war (n=3) ist ein arbiträrer Fehler in den Ergebnissen allerdings nicht auszuschließen.

4.1.4. MMR und TLR4

In der Durchflusszytometrie konnten MMR- und TLR4-Rezeptoren in beiden untersuchten Zellreihen nicht nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, dass der Mannose-Rezeptor vor allem auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird (69). Er kann sowohl in membrangebundener als auch löslicher Form vorkommen. Gazi et al. zeigten, dass die Erkennung fungaler β -Glukane durch Dectin-1 zur gesteigerten Freisetzung von MR-Rezeptoren von Makrophagen führt (106). Die Rolle des Mannose-Rezeptors auf Kornealepithel bei Infektion mit *Aspergillus* wurde durch Wang et al. untersucht. Die Expression von MR war hierbei nach Kontakt mit *Aspergillus* hochreguliert (107).

Zur Expression von MMR an der Zelloberfläche von Atemwegsepithel gibt es aktuell keine Daten. Die von uns durchgeführten Versuche sprechen dafür, dass dieser Rezeptor auf CFBE- und HBE-Zellen nicht exprimiert wird.

Im Gegensatz dazu konnte der TLR4-Rezeptor schon durch andere Forschungsgruppen auf Atemwegsepithel nachgewiesen werden. John et al. zeigten sogar, dass die TLR4-medierte angeborene Immunität in CF Atemwegszellen reduziert ist. Sie fanden eine deutlich reduzierte Anzahl an oberflächlichen TLR4-Rezeptoren bei CFBE410- Zellen, und reduzierte IL-8 und IL-6-Ausschüttung als Reaktion auf LPS gramnegativer Bakterien (108, 109). In Versuchen durch Muir et al. wurden eine basolaterale Verteilung von TLR4-Rezeptoren auf Atemwegsepithel und eine untergeordnete Rolle in der epithelialen Immunantwort beobachtet (110). Andere Arbeiten ließen darauf schließen, dass TLR4 einen Beitrag zur Entzündungsantwort gegen *A. fumigatus* Konidien, nicht aber gegen Hyphen leistet (77, 104). *In vivo* Versuche zeigten bei TLR4-/- Mäusen eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber *A. fumigatus* im Vergleich zu Kontrollmäusen und lassen so eine klinische Bedeutung von TLR4 in der Pilzabwehr vermuten (111).

4.2. Humorale Immunantwort auf Pilzbestandteile

Die durchgeführten ELISAs zum Nachweis von IL-8 und IL-6 im Überstand der Atemwegsepithelzellen ergaben, dass CFBE-Zellen eine höhere basale Produktion proinflammatorischer Zytokine aufweisen als HBE-Zellen.

Die Ausschüttung von IL-8 und IL-6 stieg im zeitlichen Verlauf an, was im Sinne einer kontinuierlichen Zytokinproduktion gesehen werden kann.

Die Infektion mit Pilzbestandteilen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion.

Davon unterscheiden sich die Ergebnisse von Reihill et al. zur Erforschung der proinflammatorischen Zytokinantwort bei Atemwegsepithel: Nach Inkubation von CFBE- und HBE-Zellen mit *A. fumigatus* Konidien für 24h wurden IL-8- und IL-6-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Es zeigten sich ein 1,65-facher Anstieg

der IL-8-Konzentration und eine 1,45-fach gesteigerte IL-6-Konzentration bei CFBE-Zellen im Vergleich zu den Basalwerten. Bei den IL-6-Bestimmungen fanden sich ebenfalls gesteigerte basale Konzentrationen bei CFBE-Zellen. Daraus wurde geschlossen, dass *Aspergillus* Konidien in CF-Atemwegen eine ausgeprägte proinflammatorische Zytokinantwort stimulieren. Bei HBE-Zellen wurde insgesamt eine schwächere Zytokinantwort ausgelöst (112).

4.2.1. IL-8

Durch Infektion mit Zymosan und *Aspergillus* Konidien wurde die IL-8-Ausschüttung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in unseren Versuchen nicht beeinflusst.

Im Gegensatz dazu konnten Sun et al. zeigen, dass eine Infektion von HBE-Zellen mit *A. fumigatus* Konidien die Expression von IL-8 induzierte. Knockdown von Dectin-1 führte zu verminderter IL-8 Expression, was dafür sprach, dass die Hochregulation proinflammatorischer Zytokine bei *A. fumigatus* Dectin-1 vermittelt abläuft (95).

Eine Infektion mit *Aspergillus* Hyphen führte bei HBE-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der IL-8-Produktion nach 48h. Bei CFBE-Zellen wurde dadurch keine signifikante Veränderung hervorgeführt.

In anderen Studien zu *Aspergillus* Infektionen wurden hauptsächlich Konidien verwendet. Peng et al. infizierten humane korneale Epithelzellen mit *A. fumigatus* Hyphen und konnten zeigen, dass dadurch eine Dectin-1-vermittelte Steigerung der IL-8-Ausschüttung induziert wurde (113). Weitere ähnliche Versuche mit *Aspergillus* Hyphen an Atemwegsepithel müssten durchgeführt werden, um die inflammatorische Reaktion der Zellen genauer zu erforschen.

Unsere Versuche zeigten, dass die IL-8-Produktion in CFBE-Zellen generell gesteigert ist.

4.2.2.IL-6

Auch die IL-6-Level nahmen im zeitlichen Verlauf deutlich zu.

Außerdem waren hier auch die absoluten Konzentrationen fast zehnmal höher als bei HBE-Zellen. Im Vergleich: HBE 24h Kontrolle bei IL-8 = 145,26pg/ml und bei IL-6 = 1027,29pg/ml. Sowohl gesunde, als auch CF-Atemwegszellen produzierten damit mehr IL-6 als IL-8.

Die IL-6-Konzentrationen wurden durch Infektion mit Pilzbestandteilen nicht signifikant beeinflusst. Auch bei Sun et al. blieben die IL-6-Konzentrationen nach Infektion von HBE-Zellen mit *Aspergillus* Konidien weitgehend unverändert. In ihren Versuchen lag die IL-8-Produktion jedoch deutlich über der von IL-6 (95). In Untersuchungen von bronchoalveolärer Lavage (BAL) fanden McGreal et al. stark erhöhte IL-8-Konzentrationen und erniedrigte IL-6-Konzentrationen bei CF-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen (87). Tiringer et al. stellten dagegen in BAL von CF-Patienten signifikant erhöhte IL-6- und IL-1 β -Konzentrationen fest (115). Untersuchungen der BAL sind jedoch in diesem Zusammenhang kritisch zu betrachten, da die hier nachgewiesenen Zytokine durch verschiedene Immunzellen und nicht ausschließlich von Atemwegsepithel produziert werden und die Zytokinproduktion außerdem durch Infektionen mit weiteren Erregern wie etwa *Ps. aeruginosa* gesteigert sein kann.

Nach Infektion mit *Aspergillus* Hyphen nahmen die IL-6-Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei beiden Zellreihen ab und verhielt sich damit vergleichbar mit der IL-8-Produktion bei HBE-Zellen. Jedoch war dieses Ergebnis bei den durchgeführten IL-6-ELISAs nicht signifikant. Vergleichbare Untersuchungen der IL-6-Produktion nach Infektion mit *Aspergillus* Hyphen wurden bisher nicht an Atemwegsepithel durchgeführt.

4.2.3. IL-1 β , IL-10 und TARC

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β wurde in unseren ELISAs nicht detektiert. Zur Produktion von IL-1 β im Zusammenhang mit Pilzinfektionen und CF gibt es aktuell unterschiedliche Daten. Beim Vergleich von Monozyten von CF-Patienten

und gesunden Patienten durch Zaman et al. konnte beispielsweise kein Unterschied in der IL-1 β -Konzentration im Überstand festgestellt werden (82). Coyne et al. fanden hingegen eine erhöhte IL-1 β -Produktion bei CF-Atemwegsepithel (114). Liu et al. führten eine Transfektion von Dectin-1 bei Dectin1 $^{-/-}$ Mäusen durch. Es wurde eine gesteigerte Produktion von IL-1 β , eine niedrigere Pilzbelastung bei Infektion mit *A. fumigatus* und eine gesteigerte Überlebensrate beobachtet. Damit konnte nicht nur eine wichtige Rolle von Dectin-1 in der Abwehr fungaler Erreger demonstriert, sondern auch ein Zusammenhang zwischen Dectin-1 und der Produktion von IL- β aufgezeigt werden (116).

Bei IL-10 handelt es sich um ein antiinflammatorisches Zytokin, welches aufgrund gesteigerter Inflammation auch bei CF-Patienten im Sputum üblicherweise nicht messbar ist (83, 84). Insofern ist es nicht überraschend, dass IL-10 auch in den hier durchgeführten ELISAs nicht detektiert wurde.

TARC/CCL17 war in unseren Versuchen nicht detektierbar. Im Gegensatz dazu konnten Sekiya et al. die Produktion von TARC durch die bronchialen Epithelzelllinie A549 nachweisen (117). Dieser Unterschied könnte zum Beispiel dadurch bedingt sein, dass die in unseren Versuchen verwendeten HBE14o- - und CFBE41o- -Zellen eine dazu abweichende TARC-Produktion aufweisen.

Bisher wurde TARC vorrangig im Zusammenhang mit Asthma (118) und anderen allergischen Erkrankungen untersucht (119). Adib-conquy et al. konnten zeigen, dass im Überstand von Neutrophilen bei CF-Patienten erhöhte Level von TARC/CCL17 nachweisbar waren. Außerdem war die Genexpression für TARC hochreguliert (120). Bei Tiringer et al. war die TARC-Konzentration im Sputum von Patienten gesteigert, die in den nächsten 24 Monaten eine Infektion mit *Ps. aeruginosa* entwickelten (115).

4.3. Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

In unseren Versuchen konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von PRRs und der Zytokinproduktion zwischen CFBE- und HBE-Zellen festge-

stellt werden. Es ließ sich außerdem kein signifikanter Unterschied in der Immunreaktion auf Pilzbestandteile zwischen den beiden Zellreihen beobachten. Lediglich die Infektion mit *Aspergillus* Hyphen schien zu niedrigeren IL-6- und IL-8-Konzentrationen sowie geringeren intrazellulären Werten von Dectin-1 zu führen. Um die fehlende Zytokinproduktion nach Pilzinfektion bei beiden Zellreihen genauer untersuchen und einordnen zu können, wäre eine Wiederholung der Versuche mit einem weiteren Stimulus sinnvoll. Hier würde sich zum Beispiel TNF- α anbieten, von dem bekannt ist, über eine Aktivierung von NF κ B die IL-8-Produktion zu steigern (s.S.12).

Auffällig war, dass die basale Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 bei CFBE-Zellen deutlich höher lag als bei HBE-Zellen.

Unsere Untersuchungen passen damit teilweise zu den bisherigen Forschungsergebnisse zur angeborenen Immunreaktion bei Mukoviszidose, welche das Bild einer Hyperinflammation bei CF zeichnen.

Jedoch lassen sich unsere *in vitro* Untersuchungen nur schwer auf die angeborene Immunreaktion *in vivo* übertragen. Zu viele andere Faktoren, wie zum Beispiel zirkulierende Immunzellen, weitere lokale Zelltypen oder Coinfektionen bei CF-Patienten, können das Entzündungsgeschehen in der CF-Lunge beeinflussen.

Warum eine gesteigerte Inflammation bei CF beobachtet werden kann und ob dies direkt mit der *CFTR*-Mutation zusammenhängt, wird kontrovers diskutiert. So wollten zum Beispiel Hampton et al. herausfinden, ob eine häufig beobachtete gesteigerte Inflammation in Lungen von CF-Patienten im Zusammenhang mit der *CFTR*-Mutation stehen könnte. CFBE410- -Zellen wurden hierzu mit Wildtyp-*CFTR* vervollständigt und daraufhin die Zytokinproduktion nach Infektion mit *Ps. aeruginosa* untersucht. Die Zellen mit Wildtyp-*CFTR* produzierten dabei mehr Zytokine als solche mit F508del-Mutation. Hampton et al. gingen deshalb davon aus, dass Hyperinflammation in CF-Lungen *in vivo* vor allem durch zirkulierende Immunzellen erklärt werden kann und nicht durch direkten Einfluss der *CFTR*-Mutation in den Epithelzellen (121). Das Einfügen von Wildtyp-*CFTR* in CFBE410- -Zellen wäre auch bei unseren Versuchen sinnvoll, um die gesteigerte Zytokinproduktion überprüfen und verstehen zu können.

Im Gegensatz dazu sahen Chaudhary et al. im *CFTR*-Protein eine wichtige Rolle in der Reinigung der Atemwegsepithelzellen von *A. fumigatus* Sporen und den Ausfall des *CFTR*-Proteins als ursächlich für eine aberrante Entzündungsantwort durch *Aspergillus*. Sie verglichen für ihre Studie IB3 Atemwegsepithelzellen mit F508del-Mutation und die *CFTR*-korrigierte Wildtyp-Zelllinie S9 nach Infektion mit *Aspergillus* Konidien und *Aspergillus* Hyphen auf die daraufhin eingeleitete Immunreaktion (122).

Auffällig war bei unseren Versuchen, dass sich die Immunantwort auf *Aspergillus* Hyphen unterschiedlich zeigte je nach untersuchtem PRR oder Zytokin. Zur Immunantwort von Atemwegsepithel auf Infektion mit *Aspergillus* Hyphen müssten weitere Studien durchgeführt werden, um diese interessanten Veränderungen genauer zu erforschen.

Außerdem fiel auf, dass sich auch bei den unbehandelten Kontrollzellen die Expression von PRRs im zeitlichen Verlauf veränderte oder teilweise die Kontrollzellen die höchsten Zytokinkonzentrationen aufwiesen. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass vor Beginn der Infektionsversuche das bisherige Medium durch FBS-freies Medium ersetzt wurde. Eine solche Veränderung könnte durch zusätzlichen zellulären Stress das Entzündungsverhalten der Zellen beeinflussen. Um dies zu bestätigen müssten die durchgeführten Versuche um dieselben Messungen direkt vor oder nach der Infektion ergänzt werden.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse scheint sich die Erkennung der fungalen Liganden sich also nicht signifikant zwischen HBE- und CFBE-Zellen zu unterscheiden. Die Prädisposition für eine Kolonisierung mit *Aspergillus fumigatus*, welche bei CF-Patienten beobachtet wurde, könnte also durch nachgeschaltete Prozesse in der Immunabwehr bedingt sein oder eher durch Umgebungsfaktoren bei chronischer Infektion und Inflammation begünstigt werden.

Auch unsere Untersuchungen zeigten eine gesteigerte basale Produktion proinflammatorischer Zytokine bei CFBE-Zellen. Ob dies jedoch mit der *CFTR*-Mutation an sich oder eher durch weitere Unterschiede in den beiden Zellreihen erklärt

werden kann, lässt sich momentan nicht sagen. Dazu müssten weitere Untersuchungen an CFBO41o- -Zellen nach Vervollständigung mit Wildtyp-CFTR durchgeführt werden.

Zum besseren Verständnis und Ausbau der bisherigen Versuchsergebnisse ist auch der Einsatz weiterer Methoden in Betracht zu ziehen. Dazu gehört etwa der mRNA-Nachweis der proinflammatorischen Zytokine. Auch die Untersuchung der zugrundeliegenden Transkriptionswege, zum Beispiel mittels NF- κ B-PCR, könnte weitere Unterschiede zwischen den Zelllinien aufzeigen.

Weitere Forschungen sind nötig, um Unterschiede in der Immunabwehr zwischen gesunden und CF-Atemwegszellen besser beleuchten und interpretieren zu können.

5. Zusammenfassung

Die Lungenerkrankung bei Zystischer Fibrose ist gekennzeichnet durch chronische Infektion und Inflammation. Morbidität und Mortalität werden hierbei vor allem durch bakterielle Erreger bestimmt, doch auch eine pulmonale Kolonisierung mit Pilzerregern wird immer häufiger nachgewiesen. Während die klinische Bedeutung dieses Umstandes noch nicht vollständig geklärt wurde, lag in dieser Arbeit der Fokus auf dem Ablauf der Infektion mit Pilzen. Dazu wurden immortalisierte bronchiale Epithelzellen von Gesunden (HBE) und CF-Patienten (CFBE) mit Pilzbestandteilen infiziert, um anschließend Unterschiede in der Erkennung der Pathogene und der daraufhin eingeleiteten Immunantwort zu untersuchen.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression verschiedener Rezeptoren zur Pilzerkennung auf den Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von Dectin-1, Dectin-2 und TLR2-Rezeptoren zwischen CFBE- und HBE-Zellen. Außerdem konnte kein signifikanter Einfluss der Infektion mit Pilzbestandteilen beobachtet werden. Die PRRs TLR4 und MMR waren in unseren Versuchen nicht detektierbar.

Unterschiede in der eingeleiteten Zytokinantwort wurden durch ELISAs aus den Zellkulturüberständen ermittelt. Auffällig war, dass die basale Produktion von IL-6 und IL-8 bei CFBE-Zellen deutlich höher lag als bei HBE-Zellen. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie führte auch hier die Infektion mit Pilzbestandteilen zu keiner signifikanten Veränderung. Die Zytokine IL-1 β , IL-10 und TARC waren in unseren Versuchen nicht detektierbar.

Zusammenfassend ließ sich also in der Expression von PRRs kein Unterschied zwischen den beiden Zellreihen beobachten. Die basale Produktion von IL-6 und IL-8 war bei CFBE-Zellen jedoch höher als bei HBE-Zellen. Die Infektion mit Pilzbestandteilen führte zu keinen signifikanten Veränderungen.

Unsere Ergebnisse stimmen damit nur teilweise mit bisherigen Forschungsergebnissen zur angeborenen Immunreaktion und Pilzinfektionen bei Mukoviszidose überein. Zur genaueren Beleuchtung und Interpretation der Ergebnisse sind weitere Untersuchungen zur Immunreaktion auf Pilzerreger bei Mukoviszidose nötig.

6. Literaturverzeichnis

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
2. Wat D, editor. *Cystic Fibrosis in the Light of New Research*: InTech.
3. Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J*. 2007;29(3):522-6.
4. (2015) CFF. Annual Data Report 2015 [Available from: <https://www.cff.org/Our-Research/CF-Patient-Registry/2015-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>].
5. L.Nährlich (Hrsg.) MB, J. Wosniok. Deutsches Mukoviszidose-Register, Berichtsband 2017.
6. Database CFM. 2017 [Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>].
7. Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med*. 1990;323(22):1517-22.
8. Ehrhardt C, Collnot EM, Baldes C, Becker U, Laue M, Kim KJ, et al. Towards an in vitro model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o. *Cell Tissue Res*. 2006;323(3):405-15.
9. Mukoviszidose-Register D. Berichtsband 2015 [Available from: https://muko.info/fileadmin/redaktion/datei_gruppen/muko_institut/Register/Berichtsbaende/2016_12_12_MUKO_Berichtsband_2015_klein.pdf].
10. Collaco JM, Vanscoy L, Bremer L, McDougal K, Blackman SM, Bowers A, et al. Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *JAMA*. 2008;299(4):417-24.
11. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, et al. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353(14):1443-53.
12. Cutting GR. Genotype defect: Its effect on cellular function and phenotypic expression. *Semin Respir Crit Care Med* 15 (1994).
13. Borowitz D. CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2015;50 Suppl 40:S24-S30.
14. Pagaduan JV, Ali M, Dowlin M, Suo L, Ward T, Ruiz F, et al. Revisiting sweat chloride test results based on recent guidelines for diagnosis of cystic fibrosis. *Pract Lab Med*. 2018;10:34-7.
15. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature*. 1990;347(6291):358-63.
16. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*. 1991;66(5):1027-36.

17. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*. 1995;269(5225):847-50.
18. Jiang C, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, McCray PB, Jr., Miller SS. Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science*. 1993;262(5132):424-7.
19. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*. 1998;95(7):1005-15.
20. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*. 2002;109(3):317-25.
21. Cole AM, Dewan P, Ganz T. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect Immun*. 1999;67(7):3267-75.
22. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009;373(9678):1891-904.
23. Griese M, Nicolai T. *Praktische Pneumologie in der Pädiatrie - Therapie*: Georg Thieme Verlag KG; 2013.
24. Peterson ML, Jacobs DR, Jr., Milla CE. Longitudinal changes in growth parameters are correlated with changes in pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Pediatrics*. 2003;112(3 Pt 1):588-92.
25. Grangeia A, Barro-Soria R, Carvalho F, Damas AM, Mauricio AC, Kunzelmann K, et al. Molecular and functional characterization of CBAVD-causing mutations located in CFTR nucleotide-binding domains. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22(1-4):79-92.
26. Wielputz MO, Puderbach M, Kopp-Schneider A, Stahl M, Fritzsching E, Sommerburg O, et al. Magnetic resonance imaging detects changes in structure and perfusion, and response to therapy in early cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(8):956-65.
27. Ramsey KA, Ranganathan S, Park J, Skoric B, Adams AM, Simpson SJ, et al. Early respiratory infection is associated with reduced spirometry in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(10):1111-6.
28. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2017 Annual Data Report Maryland. 2018.
29. Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, et al. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(9):995-1001.
30. Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nubling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*. 2003;46(1-2):19-23.
31. Blyth CC, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, et al. Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):314-6.
32. H. Hof WHH. *Kompendium medizinische Mykologie* 2010;Aesopus Verlag;

33. Bandres MV, Sharma S. *Aspergillus Fumigatus*. StatPearls. Treasure Island (FL)2019.
34. de Barros Bezerra GF, Haidar DM, da Silva MA, Filho WE, Dos Santos RM, Rosa IG, et al. IgE serum concentration against airborne fungi in children with respiratory allergies. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2016;12:18.
35. Kumar R. Mild, moderate, and severe forms of allergic bronchopulmonary aspergillosis: a clinical and serologic evaluation. *Chest*. 2003;124(3):890-2.
36. Patterson KC, Strek ME. Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. *Chest*. 2014;146(5):1358-68.
37. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):310-50.
38. Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, Misset B, Meersseman W, Cardoso T, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care*. 2015;19:7.
39. Saunders RV, Modha DE, Claydon A, Gaillard EA. Chronic *Aspergillus fumigatus* colonization of the pediatric cystic fibrosis airway is common and may be associated with a more rapid decline in lung function. *Med Mycol*. 2016;54(5):537-43.
40. Sudfeld CR, Dasenbrook EC, Merz WG, Carroll KC, Boyle MP. Prevalence and risk factors for recovery of filamentous fungi in individuals with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2010;9(2):110-6.
41. Chen SC, Meyer W, Pashley CH. Challenges in Laboratory Detection of Fungal Pathogens in the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Mycopathologia*. 2018;183(1):89-100.
42. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med Mycol*. 2009;47(4):387-97.
43. Bargon J, Dauletbaev N, Kohler B, Wolf M, Posselt HG, Wagner TO. Prophylactic antibiotic therapy is associated with an increased prevalence of *Aspergillus* colonization in adult cystic fibrosis patients. *Respir Med*. 1999;93(11):835-8.
44. de Vrankrijker AM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJ, Bonten MJ, et al. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(9):1381-6.
45. Noni M, Katelari A, Dimopoulos G, Kourlaba G, Spoulou V, Alexandrou-Athanassoulis H, et al. Inhaled corticosteroids and *Aspergillus fumigatus* isolation in cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2014;52(7):715-22.
46. Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Walker JM, Goldsmith CE, Rendall J, et al. Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2010;48(1):166-76 e1.
47. Bouchara JP, Hsieh HY, Croquefer S, Barton R, Marchais V, Pihet M, et al. Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2009;47(1):142-52.
48. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2010;137(1):171-6.

49. Fillaux J, Bremont F, Murriss M, Cassaing S, Tetu L, Segonds C, et al. Aspergillus sensitization or carriage in cystic fibrosis patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(7):680-6.
50. Baxter CG, Moore CB, Jones AM, Webb AK, Denning DW. IgE-mediated immune responses and airway detection of Aspergillus and Candida in adult cystic fibrosis. *Chest*. 2013;143(5):1351-7.
51. Aaron SD, Vandemheen KL, Freitag A, Pedder L, Cameron W, Lavoie A, et al. Treatment of Aspergillus fumigatus in patients with cystic fibrosis: a randomized, placebo-controlled pilot study. *PLoS One*. 2012;7(4):e36077.
52. Hector A, Kirn T, Ralhan A, Graepler-Mainka U, Berenbrinker S, Riethmueller J, et al. Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2016;15(3):340-9.
53. Briard B, Heddergott C, Latge JP. Volatile Compounds Emitted by Pseudomonas aeruginosa Stimulate Growth of the Fungal Pathogen Aspergillus fumigatus. *MBio*. 2016;7(2):e00219.
54. Reece E, Doyle S, Grealley P, Renwick J, McClean S. Aspergillus fumigatus Inhibits Pseudomonas aeruginosa in Co-culture: Implications of a Mutually Antagonistic Relationship on Virulence and Inflammation in the CF Airway. *Front Microbiol*. 2018;9:1205.
55. Anand R, Moss RB, Sass G, Banaei N, Clemons KV, Martinez M, et al. Small Colony Variants of Pseudomonas aeruginosa Display Heterogeneity in Inhibiting Aspergillus fumigatus Biofilm. *Mycopathologia*. 2018;183(1):263-72.
56. Ferreira JA, Penner JC, Moss RB, Haagensen JA, Clemons KV, Spormann AM, et al. Inhibition of Aspergillus fumigatus and Its Biofilm by Pseudomonas aeruginosa Is Dependent on the Source, Phenotype and Growth Conditions of the Bacterium. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134692.
57. Reece E, Segurado R, Jackson A, McClean S, Renwick J, Grealley P. Co-colonisation with Aspergillus fumigatus and Pseudomonas aeruginosa is associated with poorer health in cystic fibrosis patients: an Irish registry analysis. *BMC Pulm Med*. 2017;17(1):70.
58. Mullins J, Harvey R, Seaton A. Sources and incidence of airborne Aspergillus fumigatus (Fres). *Clin Allergy*. 1976;6(3):209-17.
59. Latge JP. The pathobiology of Aspergillus fumigatus. *Trends Microbiol*. 2001;9(8):382-9.
60. Croft CA, Culibrk L, Moore MM, Tebbutt SJ. Interactions of Aspergillus fumigatus Conidia with Airway Epithelial Cells: A Critical Review. *Front Microbiol*. 2016;7:472.
61. Fukahori S, Matsuse H, Tsuchida T, Kawano T, Nishino T, Fukushima C, et al. Clearance of Aspergillus fumigatus is impaired in the airway in allergic inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113(2):180-6.
62. WasylInka JA, Moore MM. Uptake of Aspergillus fumigatus Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun*. 2002;70(6):3156-63.
63. Han X, Yu R, Zhen D, Tao S, Schmidt M, Han L. beta-1,3-Glucan-induced host phospholipase D activation is involved in Aspergillus fumigatus internalization into type II human pneumocyte A549 cells. *PLoS One*. 2011;6(7):e21468.

64. Hope WW. Invasion of the alveolar-capillary barrier by *Aspergillus* spp.: therapeutic and diagnostic implications for immunocompromised patients with invasive pulmonary aspergillosis. *Med Mycol.* 2009;47 Suppl 1:S291-8.
65. Ralhan A, Laval J, Lelis F, Ballbach M, Grund C, Hector A, et al. Current Concepts and Controversies in Innate Immunity of Cystic Fibrosis Lung Disease. *J Innate Immun.* 2016;8(6):531-40.
66. Laval J, Ralhan A, Hartl D. Neutrophils in cystic fibrosis. *Biol Chem.* 2016;397(6):485-96.
67. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):210-29.
68. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr.* 2017;5(3).
69. Patin EC, Thompson A, Orr SJ. Pattern recognition receptors in fungal immunity. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;89:24-33.
70. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, et al. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 2007;8(1):31-8.
71. Werner JL, Metz AE, Horn D, Schoeb TR, Hewitt MM, Schwiebert LM, et al. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol.* 2009;182(8):4938-46.
72. Sainz J, Lupianez CB, Segura-Catena J, Vazquez L, Rios R, Oyonarte S, et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PLoS One.* 2012;7(2):e32273.
73. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spriel AB, Venselaar H, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med.* 2009;361(18):1760-7.
74. Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, et al. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity.* 2010;32(5):681-91.
75. Barrett NA, Rahman OM, Fernandez JM, Parsons MW, Xing W, Austen KF, et al. Dectin-2 mediates Th2 immunity through the generation of cysteinyl leukotrienes. *J Exp Med.* 2011;208(3):593-604.
76. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 1999;401(6755):811-5.
77. Mambula SS, Sau K, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem.* 2002;277(42):39320-6.
78. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med.* 2013;45:e66.
79. Becker KL, Ifrim DC, Quintin J, Netea MG, van de Veerdonk FL. Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks. *Semin Immunopathol.* 2015;37(2):107-16.
80. Husebye H, Halaas O, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger O, Bogen B, et al. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 2006;25(4):683-92.

81. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
82. Zaman MM, Gelrud A, Junaidi O, Regan MM, Warny M, Shea JC, et al. Interleukin 8 secretion from monocytes of subjects heterozygous for the deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation is altered. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(5):819-24.
83. Colombo C, Costantini D, Rocchi A, Cariani L, Garlaschi ML, Tirelli S, et al. Cytokine levels in sputum of cystic fibrosis patients before and after antibiotic therapy. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40(1):15-21.
84. Ordonez CL, Kartashov AI, Wohl ME. Variability of markers of inflammation and infection in induced sputum in children with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 2004;145(5):689-92.
85. Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP, 3rd, Toews GB, et al. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest.* 1990;86(6):1945-53.
86. Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS One.* 2009;4(2):e4664.
87. McGreal EP, Davies PL, Powell W, Rose-John S, Spiller OB, Doull I, et al. Inactivation of IL-6 and soluble IL-6 receptor by neutrophil derived serine proteases in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(7-8):649-58.
88. Ehrhardt C, Kneuer C, Fiegel J, Hanes J, Schaefer UF, Kim KJ, et al. Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an in vitro model for bronchial drug absorption studies. *Cell Tissue Res.* 2002;308(3):391-400.
89. Punsmann S, Liebers V, Lotz A, Bruning T, Raulf M. Ex vivo cytokine release and pattern recognition receptor expression of subjects exposed to dampness: pilot study to assess the outcome of mould exposure to the innate immune system. *PLoS One.* 2013;8(12):e82734.
90. Di Carlo FJ, Fiore JV. On the composition of zymosan. *Science.* 1958;127(3301):756-7.
91. Faro-Trindade I, Willment JA, Kerrigan AM, Redelinguys P, Hadebe S, Reid DM, et al. Characterisation of innate fungal recognition in the lung. *PLoS One.* 2012;7(4):e35675.
92. Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, Kuo WL, Stanton BA, Gruenert DC. An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;8(5):522-9.
93. Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, Widdicombe JH. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am J Physiol.* 1992;262(6 Pt 1):L713-24.
94. Antypas H, Libberton B, Melican K. Reducing background cytokine expression in epithelial cells without serum starvation. *MethodsX.* 2014;1:251-3.
95. Sun WK, Lu X, Li X, Sun QY, Su X, Song Y, et al. Dectin-1 is inducible and plays a crucial role in *Aspergillus*-induced innate immune responses in human bronchial epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(10):2755-64.
96. Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, et al. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 2005;1(4):e42.

97. Hernanz-Falcon P, Joffre O, Williams DL, Reis e Sousa C. Internalization of Dectin-1 terminates induction of inflammatory responses. *Eur J Immunol.* 2009;39(2):507-13.
98. Li C, Zhao GQ, Che CY, Li N, Lin J, Xu Q, et al. Expression of dectin-1 during fungus infection in human corneal epithelial cells. *Int J Ophthalmol.* 2014;7(1):34-7.
99. Zhao GQ, Qiu XY, Lin J, Li Q, Hu LT, Wang Q, et al. Co-regulation of Dectin-1 and TLR2 in inflammatory response of human corneal epithelial cells induced by *Aspergillus fumigatus*. *Int J Ophthalmol.* 2016;9(2):185-90.
100. Loeffler J, Ebel F. Size matters - how the immune system deals with fungal hyphae. *Microbes Infect.* 2018;20(9-10):521-5.
101. Sun H, Xu XY, Shao HT, Su X, Wu XD, Wang Q, et al. Dectin-2 is predominately macrophage restricted and exhibits conspicuous expression during *Aspergillus fumigatus* invasion in human lung. *Cell Immunol.* 2013;284(1-2):60-7.
102. Loures FV, Rohm M, Lee CK, Santos E, Wang JP, Specht CA, et al. Recognition of *Aspergillus fumigatus* hyphae by human plasmacytoid dendritic cells is mediated by dectin-2 and results in formation of extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2015;11(2):e1004643.
103. Braedel S, Radsak M, Einsele H, Latge JP, Michan A, Loeffler J, et al. *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol.* 2004;125(3):392-9.
104. Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, et al. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis.* 2003;188(2):320-6.
105. Shuto T, Furuta T, Oba M, Xu H, Li JD, Cheung J, et al. Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB J.* 2006;20(6):782-4.
106. Gazi U, Rosas M, Singh S, Heinsbroek S, Haq I, Johnson S, et al. Fungal recognition enhances mannose receptor shedding through dectin-1 engagement. *J Biol Chem.* 2011;286(10):7822-9.
107. Wang Q, Zhao G, Lin J, Li C, Jiang N, Xu Q, et al. Role of the Mannose Receptor During *Aspergillus fumigatus* Infection and Interaction With Dectin-1 in Corneal Epithelial Cells. *Cornea.* 2016;35(2):267-73.
108. John G, Chillappagari S, Rubin BK, Gruenert DC, Henke MO. Reduced surface toll-like receptor-4 expression and absent interferon-gamma-inducible protein-10 induction in cystic fibrosis airway cells. *Exp Lung Res.* 2011;37(6):319-26.
109. John G, Yildirim AO, Rubin BK, Gruenert DC, Henke MO. TLR-4-mediated innate immunity is reduced in cystic fibrosis airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(4):424-31.
110. Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van Heeckeren A, et al. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30(6):777-83.

111. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol*. 2004;172(5):3059-69.
112. Reihill JA, Moore JE, Elborn JS, Ennis M. Effect of *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* on pro-inflammatory response in cystic fibrosis epithelium. *J Cyst Fibros*. 2011;10(6):401-6.
113. Peng XD, Zhao GQ, Lin J, Jiang N, Xu Q, Zhu CC, et al. Fungus induces the release of IL-8 in human corneal epithelial cells, via Dectin-1-mediated protein kinase C pathways. *Int J Ophthalmol*. 2015;8(3):441-7.
114. Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell*. 2002;13(9):3218-34.
115. Tiringier K, Treis A, Fucik P, Gona M, Gruber S, Renner S, et al. A Th17- and Th2-skewed cytokine profile in cystic fibrosis lungs represents a potential risk factor for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(6):621-9.
116. Liu ZC, Wang M, Sun WK, Xia D, Tan MM, Ding Y, et al. Up-regulation of Dectin-1 in airway epithelial cells promotes mice defense against invasive pulmonary aspergillosis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(10):17489-97.
117. Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, et al. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 2000;165(4):2205-13.
118. Berin MC, Eckmann L, Broide DH, Kagnoff MF. Regulated production of the T helper 2-type T-cell chemoattractant TARC by human bronchial epithelial cells in vitro and in human lung xenografts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24(4):382-9.
119. Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol*. 2002;38(12-13):881-5.
120. Adib-Conquy M, Pedron T, Petit-Bertron AF, Tabary O, Corvol H, Jacquot J, et al. Neutrophils in cystic fibrosis display a distinct gene expression pattern. *Mol Med*. 2008;14(1-2):36-44.
121. Hampton TH, Ballok AE, Bomberger JM, Rutkowski MR, Barnaby R, Coutermarsh B, et al. Does the F508-CFTR mutation induce a proinflammatory response in human airway epithelial cells? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(6):L509-18.
122. Chaudhary N, Datta K, Askin FB, Staab JF, Marr KA. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates epithelial cell response to *Aspergillus* and resultant pulmonary inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(3):301-10.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung für Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie, unter Betreuung von Dr. med. Andreas Hector durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Andreas Hector, Dr. rer. nat. Anurag Singh und Dr. rer. nat. Anjali Ralhan-Singh.

Die ELISAs zum Nachweis von IL-1 β , IL-10 und TARC wurden von Carolin Schroth durchgeführt. Die Gewinnung der *Aspergillus fumigatus* Konidien und Hyphen wurde durch Dr. rer. nat. Anurag Singh durchgeführt. Alle anderen Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. med. Andreas Hector durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei dieser Doktorarbeit unterstützt und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Danke an Prof. Dominik Hartl, dass er mir die Möglichkeit gab, die Arbeit in dieser Forschungsgruppe aufzunehmen.

Mein größter Dank gilt Dr. med. Andreas Hector für die ausgezeichnete Betreuung, Beratung und Unterstützung sowie für die Korrektur der Niederschrift.

Ich danke Dr. rer. nat. Anurag Singh und Dr. rer. nat. Anjali Ralhan-Singh für die fachliche Betreuung und Hilfestellungen. Außerdem danke ich Carolin Schroth und Aysegül Canak für die Einarbeitung und ihre Arbeit.

Vielen Dank auch an die Nachbarn aus der AG Kormann, die mir bei jeder Fragestellung zur Hilfe eilten.

Große Dankbarkeit gilt meinen Eltern und meinem Mann für ihre großartige Unterstützung und Bestärkung.