



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Hautklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz

**Bedeutung des $\beta 2$ -Integrins $\alpha M\beta 2$
für die Differenzierung myeloider Zellen
und für Neutrophilenfunktionen
im Aspergillose-Mausmodell**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Am Fachbereich Biologie
Der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Anna Cholaszczyńska
geb. am 28.07.1984 in Wrocław, Polen

MAINZ, 2024

Dekan

Prof. Dr. Eckhard Thines

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIII
TABELLENVERZEICHNIS	XVII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIX
SUMMARY	XXV
ZUSAMMENFASSUNG	XXIX
1. EINLEITUNG	1
1.1. DIFFERENZIERUNG, REIFUNG UND FUNKTION DER IMMUNZELLEN	1
1.1.1. Immunzellbildung.....	1
1.1.2. Neutrophile Granulozyten.....	3
1.1.2.1. Differentiation und Reifung der neutrophilen Granulozyten.....	3
1.1.2.2. Phänotypische Charakterisierung der PMN.....	5
1.1.2.3. Die Rolle von PMN in der Immunstimulation und Immunsuppression	6
1.1.2.4. Neutrophile Phagozytose.....	8
1.1.2.5. Zytotoxische Funktionen der PMN.....	9
1.1.3. Dendritische Zellen	11
1.1.3.1. Differentiation und Maturation der dendritischen Zellen	11
1.1.3.2. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung der DC-Populationen.....	13
1.1.3.3. Bildung der Immunologischen Synapse zwischen DC und T-Zellen	15
1.1.3.4. DC-abgeleitete Antigen-Präsentation	16
1.2. BETA2-INTEGRINE	17
1.2.1. β 2-Integrin-Struktur	19
1.2.2. Konformationszuständen und Aktivierung der β 2-Integrinen	22
1.2.3. Liganden der β 2-Integrinen	24
1.2.4. Funktion des Integrins Mac-1	25
1.2.4.1. Mac-1-abhängige Leukozytenmigration.....	26
1.2.4.2. Mac-1 abhängige Leukozyten-Phagozytose	27
2. ERGEBNISSE	31
2.1. BEDEUTUNG VON MAC-1 FÜR DIE T-ZELL-STIMULATORISCHE EIGENSCHAFTEN VERSCHIEDENER DC-POPULATIONEN.....	31
2.1.1. CD11b ^{-/-} -Milz-DC weisen eine verminderte Kapazität zur Stimulation syngener antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen auf.....	31
2.1.2. CD11b ^{-/-} -Knochenmark-DC zeigen eine verminderte Kapazität zur Stimulierung syngener antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	33

2.1.3.	<i>CD11b^{-/-}- BMDC weisen keine Signifikante Unterschiede in der Aktivierungseigenschaften der syngenens antigenspezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen auf.....</i>	34
2.2.	PHÄNOTYPISIERUNG DER KNOCHENMARKZELLEN VON CD11B ^{-/-} -MÄUSEN.....	37
2.2.1.	<i>CD11b^{-/-}-KM-Zellen exprimieren tatsächlich kein CD11b und drücken verminderte CD18-Expression auf ihrer Zelloberfläche aus.....</i>	37
2.2.2.	<i>Knochenmark von CD11b^{-/-}-Mäusen zeigt veränderte Anteile myeloider Zellfraktionen.....</i>	38
2.3.	PHÄNOTYPISCHE ANALYSE DER MYELOIDEN KM-ZELLEN NACH 3-TAGIGER GM-CSF-INDUKTION IN VITRO.....	40
2.3.1.	<i>GM-CSF-Stimulation erhöht die Dysbalance zwischen Granulozyten- und Monozyten-Zahl in Knochenmarkzellen von CD11b^{-/-}-Mäusen.....</i>	40
2.3.2.	<i>GM-CSF-inkubierte CD11b^{-/-}-Knochenmarks-Zellkulturen weisen erhöhte Anzahl der CD11c⁺-Zellen auf.....</i>	41
2.3.3.	<i>Intrazelluläre Expression der Lineagemarker und β2-Untereinheiten in GM-CSF-differenzierten CD11b^{-/-}-myeloiden Knochenmarkzellen.....</i>	43
2.3.4.	<i>Charakterisierung der CD11c⁺ Zellen.....</i>	44
2.3.5.	<i>CD11c⁺Ly6G⁺ DC/PMN-Hybride der CD11b^{-/-}-Mäusen exprimieren weder MHC-II noch Kostimulatoren.....</i>	45
2.3.6.	<i>Wechselwirkungen von WT- mit Mac-1^{-/-}-KM-Zellen in GM-CSF-haltigen Kultur beeinflussen die CD11c-Expression auf PMN.....</i>	47
2.4.	CHARAKTERISIERUNG DER CD11B ^{-/-} -BMDC-KULTUR.....	48
2.4.1.	<i>Bei der CD11b^{-/-}-BMDC wird die CD11c-Expression hochreguliert.....</i>	48
2.4.2.	<i>Mac-1 beeinflusst die GM-CSF-bedingte Differenzierung der BMDC sowie die Reifung der BMDC nach der LPS-Stimulierung.....</i>	49
2.4.3.	<i>Mikroskopische Darstellung der PMN-DC-Hybriden.....</i>	54
2.4.4.	<i>Zytokin-Produktion der CD11b^{-/-}-BMDC.....</i>	54
2.5.	ZEITKINETIK DER GM-CSF-INDUZIERTEN BMDC-KULTIVIERUNG.....	55
2.5.1.	<i>Zeitabhängige Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung von GM-CSF Knochenmarkskulturen.....</i>	55
2.5.2.	<i>Genotyp-abhängige Unterschiede in der mRNA-Expression differenzierungsrelevanter Gene sowie von β2-Integrinen.....</i>	57
2.6.	BEDEUTUNG VON MAC-1 FÜR REIFUNG UND FUNKTION DER PMN.....	58
2.6.1.	<i>Phänotypische Eigenschaften der Milz- und Blut-PMN von WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen.....</i>	58
2.6.2.	<i>Morphologische und phänotypische Reifungsmerkmale der CD11b^{-/-}-PMN.....</i>	58
2.6.3.	<i>mRNA-Expression bei der CD11b^{-/-}-PMN nach 2 Tagen der GM-CSF-Stimulation.....</i>	60
2.6.4.	<i>Mac-1 ist für die CD8⁺ T-zell-stimulatorische Aktivität unstimulierter PMN erforderlich.....</i>	61
2.6.5.	<i>Natürliche Liganden von Mac-1 hemmen die CD8⁺ T-Zell-stimulatorische Kapazität der unstimulierter WT-PMN.....</i>	62
2.7.	EINFLUSS EINER MAC-1-DEFIZIENZ AUF DIE PMN-GETRAGENE IMMUNANTWORT BEI INVASIVER PULMONALER ASPERGILLOSE IM MAUSMODELL.....	63
2.7.1.	<i>Überlebensrate nach intratrachealer Aspergillus fumigatus Inokulation.....</i>	63

2.7.2.	<i>CFU vom Lungenhomogenat nach 24h der intratrachealen Aspergillus fumigatus Inokulation</i>	64
2.7.3.	<i>CD11b^{-/-}-PMN charakterisiert eingeschränkte Phagozytose von Aspergillus Konidien</i>	66
2.7.4.	<i>Zytokinen- und Chemokinen-Nachweis in der BAL-Flüssigkeit der CD11b^{-/-}-Mäusen</i>	66
2.7.5.	<i>CD11c⁺ PMN in CD11b^{-/-}-Lungen nach 24h der intratrachealen Aspergillus fumigatus Inokulation</i>	67
2.7.6.	<i>Frequenzen und Immunphänotyp von Leukozyten aus peripherem Blut und Milz von mit A. fumigatus infizierten WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen bleibt unverändert</i>	68
2.7.7.	<i>Gehalt der Zytokine und Chemokine im peripheren Blut von mi A. fumigatus infizierten WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen</i>	69
3.	DISKUSSION	71
3.1.	BEDEUTUNG VON MAC-1 FÜR DIE DIFFERENZIERUNG, REIFUNG UND AKTIVIERUNG MYELOIDER IMMUNZELLEN	72
3.1.1.	<i>Bedeutung von Mac-1 für die DC-vermittelte T-Zell-Stimulierung</i>	72
3.1.2.	<i>Bedeutung von Mac-1 für die Knochenmarkzellenbildung</i>	74
3.1.3.	<i>Bedeutung von Mac-1 in der GM-CSF-induzierten Knochenmarkzellendifferenzierung der myeloiden Linie</i>	76
3.1.4.	<i>Wechselwirkungen von WT- mit Mac-1-defizienten-KM-Zellen in GM-CSF-haltiger Kultur induzieren CD11c-Expression auf WT-Granulozyten und inhibieren die CD11c-Expression der CD11b^{-/-}-Granulozyten</i>	78
3.1.5.	<i>Charakteristik der CD11b^{-/-}-BMDC</i>	79
3.1.6.	<i>Bedeutung von Mac-1 für die GM-CSF-induzierte Ausreifung der PMN</i>	84
3.1.7.	<i>Bedeutung von Mac-1 für die T-Zell-Stimulierungs-Kapazität der PMN</i>	86
3.2.	DIE ROLLE VON MAC-1 IN ASPERGILLOSE	87
3.2.1.	<i>Mac-1 beeinflusst Neutrophil-Abwehrmechanismen gegen Aspergillus fumigatus: Infektionsgrad erhoben, Mortalität nicht beeinträchtigt</i>	90
3.2.2.	<i>Mac-1-Defizienz beschränkt zytotoxische Funktionen der PMN, womit erhöhte Einstrom von PMN in die mit Aspergillose-infizierten Lungen verbunden ist</i>	91
3.2.3.	<i>PMN-Phagozytose der A. fumigatus Konidien beeinträchtigt bei Mac-1-defizienten Mäusen</i>	92
3.2.4.	<i>Die BAL-Flüssigkeit von mit A. fumigatus infizierten CD11b^{-/-}-Mäusen enthält geringere Mengen an proinflammatorischen Zytokinen</i>	92
3.2.5.	<i>Modulation der PMN-Apoptose</i>	93
3.2.6.	<i>Mac-1 an PMN kann zur Aktivierung infiltrierender DCs beitragen</i>	94
3.2.7.	<i>Mac-1-abhängige zytotoxischen Funktionen der PMN gegen A. fumigatus</i>	95
3.2.8.	<i>Charakterisierung der BALF-, Milz- und Blutzellen</i>	95
4.	MATERIAL UND METHODEN	97
4.1.	MATERIAL	97
4.1.1.	<i>Labor- und Verbrauchsmaterial</i>	97
4.1.2.	<i>Laborgeräte</i>	99

4.2. METHODEN FÜR DIE BEURTEILUNG DER ROLLE DES B2-INTEGRINS MAC-1 IN DER DIFFERENZIERUNG MYELOIDER ZELLEN.....	104
4.2.1. Tiere	104
4.2.2. Präparation der Zellen	105
4.2.2.1. Präparation von Knochenmarkzellen	105
4.2.2.2. Präparation von Milzzellen	106
4.2.2.3. Präparation von peripheren Blutzellen	106
4.2.3. BMDC-Generierung und MACS-assoziierte Zellisolation	106
4.2.3.1. Generierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark (BMDC).....	106
4.2.3.2. Isolation der Zellen über Magnet assoziierte Zellsortierung (MACS)	107
4.2.3.2.1. Isolation der DC.....	107
4.2.3.2.2. Isolation der PMN	107
4.2.3.2.3. Isolation der CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen.....	108
4.2.4. Peptid-Beladung und Stimulation der Zellen.....	108
4.2.5. Funktionsanalyse der Zellen.....	108
4.2.5.1. Antigen-spezifische CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zell-Aktivierung	108
4.2.5.2. In vitro T-Zell-Proliferation	108
4.2.6. Charakterisierung der Zellen	109
4.2.6.1. Durchflusszytometrische Analyse	109
4.2.6.2. Anfertigung der Cytospin-Präparaten.....	109
4.2.6.3. Zytokin-Messung.....	110
4.2.6.4. Annexin-V-Apoptose-Nachweis	110
4.2.6.5. Quantitative PCR (qPCR)	110
4.3. METHODEN FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER BEDEUTUNG DES B2-INTEGRINS MAC-1 FÜR PMN FUNKTION BEI DER INVASIVEN PULMONALEN ASPERGILLOSE	112
4.3.1. <i>Aspergillus fumigatus</i> Inokulation.....	112
4.3.2. Organentnahme und -analyse.....	112
4.3.2.1. Bronchoalveoläre Lavage.....	112
4.3.2.2. Milz und periphere Blut.....	113
4.3.2.3. Lungen.....	113
4.3.3. Histopathologische Analyse	113
4.3.4. In-vivo-Pilzclearance	113
4.3.5. Cytospin-Analyse.....	113
4.3.6. Zytokin- und Chemokinkonzentration-Detektion	113
4.4. STATISTISCHE ANALYSE	114
LITERATURVERZEICHNIS.....	115
ANHANG	155
DANKSAGUNG	XXXI

VERÖFFENTLICHUNGEN	XXXIII
KONFERENZEN-TEILNAHME	XXXIII
LEBENS LAUF	XXXV

Abbilungsverzeichnis

<i>Abbildung 1. Immunzellbildung (mit Veränderungen nach https://beyondthedish.files.wordpress.com/2016/01/hematopoiesis-from-multipotent-stem-cell.jpg).</i>	2
<i>Abbildung 2. Transkriptionsfaktoren, die an der Differenzierung von PMN beteiligt sind (nach Zhichao & Udalova, 2019).</i>	4
<i>Abbildung 3. Veränderungen des Immunphänotyps während der Granulopoese (nach Zhichao & Udalova, 2019).</i>	5
<i>Abbildung 4. Polarisierung der naiven PMN zu N1- beziehungsweise N2- Phänotyp (nach Sionov et al., 2015).</i>	6
<i>Abbildung 5. Zytotoxische Funktionen der PMN (nach Mayadas et al., 2014).</i>	10
<i>Abbildung 6. DC-Entwicklung (nach Hasegawa & Matsumoto, 2018).</i>	12
<i>Abbildung 7. Phänotypische Marker und Position von Maus-DCs (nach Hasegawa & Matsumoto, 2018).</i>	12
<i>Abbildung 8. Funktionelle Spezialisierung dendritischer Zellen (nach Brandum et al., 2021).</i>	14
<i>Abbildung 9. Schema der frühen T-Zell-Aktivierung (nach immunology.org; Originalautor: Mary Cavanagh).</i>	15
<i>Abbildung 10. Antigen -Präsentation (nach Heath & Carbone, 2001).</i>	16
<i>Abbildung 11. Schematische Darstellung von Struktur der $\beta 2$ Integrinen (nach Tan, 2012).</i>	19
<i>Abbildung 12. α -I-Domäne von Mac-1 und die MIDAS-Stelle (nach Arnaout, 2016).</i>	20
<i>Abbildung 13. Drei Metallbindungsstellen der β-I-Domäne von $\beta 2$-Integrinen am Beispiel von $\alpha X\beta 2$ (nach Campbell & Humphries, 2011).</i>	21
<i>Abbildung 14. Konformationsänderungen der $\beta 2$-Integrinen (nach Zhang & Chen, 2012).</i>	23
<i>Abbildung 15. Liganden der $\beta 2$-Integrinen (nach Tan, 2012).</i>	24
<i>Abbildung 16. Mac-1 (nach MacPherson et al., 2013)</i>	25
<i>Abbildung 17. Adhäsionskaskade der Leukozyten (nach Ley et al., 2007).</i>	26

<i>Abbildung 18. Die αMβ2-abhängige Phagozytose von C3bi-opsonierter Partikel (nach Dupuy & Caron 2008).</i>	28
<i>Abbildung 19. Die Marker Expression von CD11b^{-/-}-Milz-DC bleibt unverändert.</i>	32
<i>Abbildung 20. Die antigen-spezifische CD8⁺ T-Zell-Aktivierung durch CD11b^{-/-}-Milz-DC ist wahrscheinlich reduziert.</i>	32
<i>Abbildung 21. Die Marker Expression von CD11b^{-/-}-Knochenmark-DC bleibt unverändert.</i>	33
<i>Abbildung 22. Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zell-Aktivierung durch die CD11b^{-/-}-dendritischen Reservezellen des Knochenmarks ist geschwächt.</i>	34
<i>Abbildung 23. Die Stimulierungsabhängige Expression von MHCII und CD86 auf BMDC wird durch die Abwesenheit von Mac-1 gehemmt.</i>	35
<i>Abbildung 24. CD11b^{-/-}-BMDC zeigen tendenziell erniedrigte Fähigkeit, naive CD8⁺ T-Zellen (OT-I) zu aktivieren.</i>	36
<i>Abbildung 25. CD11b^{-/-}-BMDC zeigen tendenziell erniedrigte Fähigkeit naive CD4⁺ T-Zellen (OT-II) zu aktivieren.</i>	36
<i>Abbildung 26. Oberflächenexpression von Differenzierungsmarker und β2-Integrinen auf den frisch isolierten Knochenmarkzellen.</i>	37
<i>Abbildung 27. Expression verschiedener Oberflächenmarker auf den frisch isolierten Knochenmarkzellen.</i>	38
<i>Abbildung 28. Durchflusszytometrische Analyse der CD11b^{-/-}-Knochenmark-Ausbeute weist einen höheren Anteil der granulozytotoetischen Zellen im Vergleich zu WT auf.</i>	39
<i>Abbildung 29. FACS-Analyse des CD11b^{-/-}-Knochenmarkes nach 3 Tagen der GM-CSF-Induktion zeigt erhöhten Anteil der Granulozyten im Vergleich zu WT auf.</i>	41
<i>Abbildung 30. Expression verschiedener Oberflächenmarker auf den CD11b^{-/-}-BMC am Tag3 der BMDC-Kultur weist auf Verzögerung der Zelldifferentiation.</i>	42
<i>Abbildung 31. Durchflusszytometrische Analyse der myeloiden Zellen am Tag3 der BMDC-Kultur.</i>	43
<i>Abbildung 32. Intrazelluläre CD11c-Überexpression in der CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen am Tag3 der GM-CSF-Kultur.</i>	44

<i>Abbildung 33. Charakterisierung der CD11c⁺-Knochenmarkzellen nach drei Tagen der GM-CSF-Induktion.</i>	45
<i>Abbildung 34. Differenzierungs- und Aktivierungsmarker Analyse der CD11c⁺-Zellen am Tag 4 der BMDC-Kultur.</i>	46
<i>Abbildung 35. Wechselwirkungen von WT- und CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen erzwingen teilweise die CD11c-Expression auf WT-Granulozyten und regulieren die CD11c-Expression der CD11b^{-/-}-Granulozyten runter.</i>	48
<i>Abbildung 36. CD11c-Expression in der BMDC-Mischkultur.</i>	49
<i>Abbildung 37. CD11b^{-/-}-BMDC-Mischkultur charakterisiert sich mit reduzierten Anteil der reifen Knochenmark-derivierten dendritischen Zellen.</i>	50
<i>Abbildung 38. CD11b^{-/-}-BMDC-Mischkultur beinhaltet CD11c^{low}Ly6G⁺CD48^{low/-}-PMN-DC-Hybride, deren Prozentsatz in Folge der LPS-Stimulierung signifikant zunimmt.</i>	53
<i>Abbildung 39. CD11c-Expression auf den CD11b^{-/-}-PMN.</i>	54
<i>Abbildung 40. Zytokinprofil der CD11b^{-/-}-BMDC nach der TLR-Liganden-Stimulation.</i>	55
<i>Abbildung 41. CD11b^{-/-}-Knochenmarkszellen zeigen eine veränderte Zelldifferenzierung bei GM-CSF- und LPS-Stimulation in vitro.</i>	56
<i>Abbildung 42. qPCR-basierte DNA-Quantifizierung weist veränderte Genexpressionsprofil der CD11b^{-/-}-Knochenmarkszellen am Tag 3 und 7 der GM-CSF-Kultur auf.</i>	57
<i>Abbildung 43. Oberflächenmarkerexpression der Milz- und Blut-PMN.</i>	58
<i>Abbildung 44. Morphologische Darstellung der PMN im Laufe der GM-CSF Kultur mit und ohne LPS-Stimulierung.</i>	59
<i>Abbildung 45. Expression von CD11c auf den CD11b^{-/-}-PMN steigt kontinuierlich im Laufe der GM-CSF-Kultur.</i>	60
<i>Abbildung 46. Genexpression.</i>	61
<i>Abbildung 47. Nicht stimulierte CD11b^{-/-}-PMN weisen keine CD8⁺ T-Zellen-Stimulationsaktivität auf.</i>	62
<i>Abbildung 48. Die Auswirkungen der natürlichen Liganden von Mac-1 auf die CD8⁺ T-Zell-stimulatorische Kapazität der PMN.</i>	63

<i>Abbildung 49. Überlebensrate.</i>	64
<i>Abbildung 50. Lungenschnitte-H&E-Färbung und CFU Quantifizierung in BAL-Flüssigkeit.</i>	65
<i>Abbildung 51. Quantifizierung von PMN in BAL-Flüssigkeit.</i>	65
<i>Abbildung 52. Quantitativer Nachweis der Phagozytose-Fähigkeit der PMN.</i>	66
<i>Abbildung 53. Zytokinen- und Chemokinen-Gehalt in BAL-Flüssigkeit.</i>	67
<i>Abbildung 54. Der Immunphänotyp von PMN in BAL-Flüssigkeit.</i>	67
<i>Abbildung 55. Zählfrequenz und Markerexpression in Blut und Milz.</i>	69
<i>Abbildung 56. Gehalt der Zytokine und Chemokine in peripherem Blut.</i>	70
<i>Abbildung 57. Erste Erkennung einer A. fumigatus-Infektion durch Lungenepithelzellen und gewebsresidente angeborene Zellen erfolgt in erster Linie in Neutrophil-Rekrutierung (nach Espinnosa et al., 2016).</i>	88
<i>Abbildung 58. Erste Erkennung einer A. fumigatus-Infektion durch Lungenepithelzellen und gewebsresidente (nach Gazendam et al., 2016).</i>	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Labor- und Verbrauchsmaterial.....	97
Tabelle 2. Laborgeräte.....	99
Tabelle 3. Chemikalien und Reagenzien.....	100
Tabelle 4. Puffer und Lösungen.....	102
Tabelle 5. Antikörper für die FACS-Analyse.....	103
Tabelle 6. Mäusestämme.....	105

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Apoptotische Zelle
Apc	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
ARG1	Arginase 1
AML-1	Akute myeloische Leukämie-Protein-1
BAL	Bronchoaleolare Lavage
BALF	Bronchoaleolare Lavage Flüssigkeit
BM-PMN	Aus Knochenmark gewonnene PMN
BMC	Aus dem Knochenmark stammende unreife Zellen (bone marrow derived cells)
BMDCs	Aus dem Knochenmark stammende dendritische Zellen (bone marrow derived dendritic cells)
BSA	Bovines Serumalbumin
C3	Komplementfaktor
CCL3	C-C-Motiv-Chemokin-Ligand 3
CCR7	C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 7
CD	Gruppe von Oberflächenantigenen (cluster of differentiation)
cDCs	Klassische dendritische Zellen (classical dendritic cells)
Csfl	Clony Stimulating Factor 1
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
cKit	Thyrosinkinase KIT
Cpm	counts per minute = Zähler pro Minute

Abkürzungsverzeichnis

CR3	Komplementrezeptor 3
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CD152)
CTLs	zytotoxischen Effektorzellen
Cy5	Cytochrom-5
Cy7	Cytochrom-7
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
D	Aspartate
DC-SIGN	Dendritische Zellen-spezifisches ICAM-greifendes Non-Integrin
DCs	Dendritische Zellen (dendritic cells)
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
E	Glutamat
ECM	Extrazellulärmatrix
Endkonz.	Endkonzentration
EGF	Epidermal Growth Factor
Egr2	Early Growth Response 2
FACS	Fluorescence activated cell sorting/scanning = Durchflusszytometrie
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin

Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
Gfi-1	Growth factor independence 1
GM-BMDCs	Mittels GM-CSF-Induktion ausgereifte Knochenmark-stammende dendritische Zellen
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HIV-1	Humanes Immunodefizienzvirus 1 (human immunodeficiency virus 1)
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILK	Integrin-gebundene Kinase
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
i.t.	intratracheal
KM	Knochenmark
KO	Knockout
LAD-1	Leukozyten-Adhäsionsmangel Typ 1
Lef-1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
LFA-1	Leukozytenfunktionsantigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetische Zellseparation
MAPK	Mitogen-aktivierter Proteinkinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity)

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MIDAS	Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle
Min	Minute(n)
moDC	monozyten-abgeleitete DC
MPO	Myeloperoxidase
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure (micro ribonucleic acid)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NK	Natürliche Killer Zellen
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pDCs	Plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PRR	Mustererkennungszepptoren (Pattern recognition receptors)
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SD	Standardabweichung
Strep	Streptomycin

Abkürzungsverzeichnis

T	Threonin
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
Th1	Typ-1 T-Helferzelle
Th2	Typ-2 T-Helferzelle
Th17	Typ-17 T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	Regulatorische T-Zellen
WT	Wildtyp

Summary

Beta2 integrins are leukocyte-specific adhesion molecules formed from a beta chain (CD18) and one of four alpha chains (CD11a, CD11b, CD11c, CD11d) – LFA-1, Mac-1, p150,95 and CD11d/CD18. These heterodimers are crucial for efficient binding of cells to the extracellular matrix and in cell surface signalling. They play important roles in the differentiation, activation, polarization and functional activity of leukocytes. Therefore, impaired activity of β 2 integrins leads to impaired immune responses.

The adhesion molecule Mac-1 is expressed by macrophages, activated lymphocytes and lymphoid natural killer cells as well as granulocytes, monocytes, including conventional DCs type 2 and appears to be the most versatile beta2 integrin. The first observations on its functions described various functions, including rolling, tight adhesion, and transmigration of leucocytes into inflamed tissue. CD11b/CD18 is also essential for immunological processes such as neutrophil phagocytosis and ROS production as well as T cell activation. Given the large number of potential ligands of Mac-1, it is assumed that many of its functions are still unknown and are a subject of ongoing studies.

In the present work, the importance of Mac-1 on dendritic cells (DC) for their T cell activation properties was analysed. DC phenotyping based on CD11c and activation markers MHCII and CD86 surface expression did not demonstrate significant genotype-related differences. However, the absence of Mac-1 on the DC cell surface limited the T cell stimulating capacity of spleen- and freshly isolated bone marrow DC. This raised the question of direct Mac-1 involvement in DC-T cell signalling and prompted consideration of the importance of Mac-1 in the DC formation and maturation process.

This study highlights also the importance of Mac-1 for GM-CSF driven BMDC differentiation in CD11b^{-/-} hematopoietic cells. In the absence of Mac-1, BMDC differentiation under GM-CSF treatment was slowed down and the expansion of granulocytes in the culture was favoured. These results indicate Mac-1 deficiency-related alterations in GM-CSF driven haematopoiesis.

However, analysis of the T cell stimulation capacity of BMDC surprisingly showed unimpaired ability of CD11b^{-/-} BMDC culture to stimulate CD8⁺ T cells. This could lead to the conclusion that Mac-1 is more important for DC differentiation in vivo than in vitro.

LPS stimulation slightly increased the T cell activation properties of the BMDC cultures regardless of the genotype. Although spectrophotometric analysis showed strong differences in

cellular composition of CD11b^{-/-} compared with WT BMDC. In this regard, LPS-stimulated CD11b^{-/-} BMDC cultures contained a significantly lower percentage of DCs compared to WT cultures, but DC-PMN-Hybrids emerged at a high level. Cell phenotyping of the LPS-stimulated BMDC demonstrated altered TLR ligand signalling in CD11b^{-/-} BMDC.

It soon conceived the question about Mac-1 involvement in PMN-T cell signalling. In the present work it was demonstrated that in the absence of pathogens, the CD8⁺ T cell stimulating properties of the PMN depended on Mac-1 since CD11b^{-/-} PMNs did not exert CD8⁺ T cell stimulatory ability, with WT PMNs bearing an intermediate capacity compared to WT BMDCs. Treatment of WT PMN with Mac-1 ligands impaired their CD8⁺ T cell stimulatory activity. The inhibition of CD8⁺ T cell proliferation capacity of WT PMN by fibrinogen, thrombospondin and vitronectin could be restored with LPS stimulation. TLR4 induction mediated the conversion of CD11b^{-/-} PMN into the DC-PMN-Hybrids, which thereby acquire APC ability and induce proliferation of CD8⁺ T cells to a similar extent as the WT PMN and the WT BMDC.

Furthermore, the role of Mac-1 for the functional properties of mouse PMNs in invasive aspergillosis in vivo, which exert primary immune responses against *Aspergillus fumigatus*, was investigated. Dysfunctional β 2 integrin activity is known to cause an immune deficiency syndrome called leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1). LAD-1 patients that suffer from dysfunction of β 2 integrins (LFA-1, Mac-1, CD11c/CD18 and CD11d/CD18) due to the impairment of their common CD18 β subunit are often confronted with recurrent lung infections such as aspergillosis. However, little is known to what extent Mac-1 is required for effective *Aspergillus fumigatus* defense.

This study demonstrated a significant increase in the level of infection in CD11b^{-/-} mice and an essential relevance of Mac-1 in PMN cytotoxic functions against *Aspergillus fumigatus*. Further, this study reports that in case of CD11b^{-/-} mice migration of CD11b^{-/-} PMNs to the lungs was not slowed during *Aspergillus fumigatus* infection, but increased lung PMN infiltration was observed. Impaired phagocytosis of *A. fumigatus* conidia by PMN in case of MAC-1 deficiency was also demonstrated, which may explain the significant increase in the degree of infection despite an increased lung PMN infiltration in CD11b^{-/-} mice. Actually, the latter may constitute a compensatory effect. Interestingly, CD11b^{-/-} PMNs in the BAL were characterized by moderate expression of the mouse DC marker CD11c, suggesting that the

formation of DC-PMN hybrids can be triggered not only by the LPS but also by other microbial components .

Zusammenfassung

Beta2-Integrine sind Leukozyten-spezifische Adhäsionsmoleküle, die aus einer Beta-Kette (CD18) und einer von vier Alpha-Ketten (CD11a, CD11b, CD11c, CD11d) bestehen – LFA-1, Mac-1, p150,95 und CD11d/CD18. Diese Heterodimere sind von entscheidender Bedeutung für die effiziente Bindung von Zellen an die extrazelluläre Matrix und für die Zelloberflächen-Signalübertragung. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Aktivierung, Polarisierung und funktionellen Aktivität von Leukozyten. Daher führt eine beeinträchtigte Aktivität der β 2-Integrine zu einer gestörten Immunantwort.

Das Adhäsionsmolekül Mac-1 wird von Makrophagen, aktivierten Lymphozyten und lymphoiden natürlichen Killerzellen sowie von Granulozyten, Monozyten, einschließlich konventioneller DCs vom Typ 2, exprimiert und scheint das vielseitigste Beta2-Integrin zu sein. Die ersten in der Literatur beschriebenen Entdeckungen zur Bedeutung von Mac-1 betreffen verschiedene Funktionen von Leukozyten, einschließlich dem Rollen, der festen Adhäsion und der Transmigration in entzündetes Gewebe. CD11b/CD18 ist auch für immunologische Prozesse wie die neutrophile Phagozytose und die ROS-Produktion wichtig. Angesichts der großen Zahl potenzieller Liganden von Mac-1 ist davon auszugehen, dass viele seiner Funktionen noch unbekannt sind und sind daher Gegenstand laufender Studien.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Mac-1 auf dendritischen Zellen (DC) für deren T-Zell-Aktivierungseigenschaften analysiert. Die Phänotypisierung von DC auf der Grundlage von CD11c und der Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker MHCII und CD86 ergab keine signifikanten Genotyp-bedingten Unterschiede. Das Fehlen von Mac-1 auf der DC-Zelloberfläche schränkte jedoch die T-Zell-stimulierende Kapazität von DC aus Milz und frisch isoliertem Knochenmark ein. Das konzipierte die Frage nach einer direkten Beteiligung von Mac-1 an der DC-T-Zell-Signalübertragung auf und veranlasste zu Überlegungen über die Bedeutung von Mac-1 im DC-Bildungs- und Reifungsprozess.

Diese Studie unterstreicht auch die Bedeutung von Mac-1 für die GM-CSF-getriebene Differenzierung der hämatopoetischen Zellen in BMDC. In Abwesenheit von Mac-1 wurde die Differenzierung von BMDCs unter GM-CSF-Behandlung verlangsamt und die Ausbreitung von Granulozyten in der Kultur wurde begünstigt. Diese Ergebnisse deuten auf Mac-1-Mangelbedingte Veränderungen in der GM-CSF-gesteuerten Hämatopoese hin.

Die Analyse der T-Zell-Stimulationskapazität von BMDC zeigte jedoch überraschenderweise, dass die Fähigkeit der CD11b^{-/-}-BMDC-Kultur, CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren, nicht beeinträchtigt ist. Dies kann zu dem Schluss führen, dass Mac-1 für die DC-Differenzierung in vivo wichtiger als in vitro ist.

Die LPS-Stimulation erhöhte leicht die T-Zell-Aktivierungseigenschaften der BMDC-Kulturen unabhängig vom Genotyp. Die spektrophotometrische Analyse zeigte jedoch starke Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung von CD11b^{-/-}- im Vergleich zu WT-BMDC. So enthielten LPS-stimulierte CD11b^{-/-}-BMDC-Kulturen im Vergleich zu WT-Kulturen einen deutlich geringeren Anteil an DCs, aber DC-PMN-Hybride entstanden in hohem Maße. Die Zellphänotypisierung der LPS-stimulierten BMDC zeigte eine veränderte TLR-Liganden-Signalübertragung in CD11b^{-/-}-BMDC.

Es stellte sich die Frage nach der Beteiligung von Mac-1 an der PMN-T-Zell-Signalübertragung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Krankheitserregern die CD8⁺ T-Zell-stimulierenden Eigenschaften der PMN von Mac-1 abhängen, da CD11b^{-/-}-PMNs keine CD8⁺ T-Zell-stimulierende Fähigkeit ausüben, während WT PMNs im Vergleich zu WT BMDCs eine mittlere Fähigkeit aufweisen. Die Behandlung von WT-PMN mit Mac-1-Liganden beeinträchtigte ihre CD8⁺ T-Zell-stimulierende Aktivität. Die Hemmung der CD8⁺ T-Zell-Proliferationskapazität von WT-PMN durch Fibrinogen, Thrombospondin und Vitronectin konnte durch LPS-Stimulation wiederhergestellt werden. Die TLR4-Induktion vermittelte die Umwandlung von CD11b^{-/-}-PMN in DC-PMN-Hybride, die dadurch APC-Fähigkeit erlangen und die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen in ähnlichem Maße wie die WT-PMN und die WT-BMDC induzieren.

Darüber hinaus wurde die Rolle von Mac-1 für die funktionellen Eigenschaften von Maus-PMNs bei invasiver Aspergillose in vivo untersucht, die eine primäre Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus* ausüben. Eine gestörte β 2-Integrin-Aktivität ist als Ursache für ein Immunschwächesyndrom bekannt, das als Leukozytenadhäsionsmangel Typ 1 (LAD-1) bezeichnet wird. LAD-1-Patienten, die an einer Dysfunktion der β 2-Integrine (LFA-1, Mac-1, CD11c/CD18 und CD11d/CD18) aufgrund der Beeinträchtigung ihrer gemeinsamen β -Untereinheit CD18 leiden, sind häufig mit wiederkehrenden Lungeninfektionen wie Aspergillose konfrontiert. Es ist jedoch wenig darüber bekannt, inwieweit Mac-1 für eine wirksame Abwehr von *Aspergillus fumigatus* erforderlich ist.

In dieser Studie wurde eine signifikante Erhöhung des Infektionsniveaus bei CD11b^{-/-} Mäusen und eine wesentliche Bedeutung von Mac-1 für die zytotoxischen Funktionen der PMN gegen *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen. Darüber hinaus wird in dieser Studie berichtet, dass bei CD11b^{-/-}-Mäusen die Migration von CD11b^{-/-} PMNs in die Lunge während einer *Aspergillus fumigatus* Infektion nicht verlangsamt ist, sondern eine erhöhte Lungeninfiltration von PMNs auftritt. Die Phagozytose von *A. fumigatus* Konidien durch PMN bei Mac-1-Mangel war ebenfalls beeinträchtigt, was den signifikanten Anstieg des Infektionsgrades trotz einer erhöhten Lungen-PMN-Infiltration bei CD11b^{-/-}-Mäusen erklären könnte. Letzteres könnte ein kompensatorischer Effekt sein. Interessanterweise waren CD11b^{-/-}-PMNs in der BAL durch eine mäßige Expression des Maus-DC-Markers CD11c gekennzeichnet, was darauf hindeutet, dass die Bildung von DC-PMN-Hybriden nicht nur durch das LPS, sondern auch durch andere mikrobielle Komponenten ausgelöst werden kann.

1. Einleitung

1.1. Differenzierung, Reifung und Funktion der Immunzellen

1.1.1. Immunzellbildung

Die Zellen des Immunsystems werden aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) unter Differenzierung der myeloiden und lymphatischen Zellen während der Blutzellbildung produziert. Früh in der Blutzellentwicklung werden HSC in eine myeloide und eine lymphatische Blutzellreihe differenziert. Aus lymphatischen Progenitorzellen entwickeln sich B- und T-Lymphozyten sowie intrathymale dendritische Zellen (Murphy & Weaver, 2018). Die Entwicklung der myeloiden Zellreihe findet über mehrere Zwischenstufen statt, wodurch die Erythrozyten, die Thrombozyten sowie ein Teil der Leukozyten wie neutrophile Granulozyten (auch PMN genannt), basophile und eosinophile Granulozyten sowie monozytäre dendritische Zellen (auch DC genannt) und Makrophagen entstehen (Abbildung 1).

Die Differenzierung der PMN sowie DC – als Teil der Hämatopoese – findet im pränatalen Stadium im Dottersack, in den ersten Wochen der Embryonalentwicklung in Milz, dann in Leber, danach in den Lymphknoten statt, um schließlich kontinuierlich im Knochenmark zu erfolgen. Der Prozess der Bildung, Entwicklung und Differenzierung dieser Immunzellen wird weitgehend durch Zytokine reguliert (Zhang & Lodish, 2008). Zytokine können durch die Bindung an membranständige Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, an deren Ende die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren steht. Somit wird über Zytokine die Spezifikation der Abstammungslinien bestimmt, aber auch die Homöostase des Immunsystems reguliert, indem Überlebens- und Proliferationssignale bereitgestellt werden (Robb et al., 2007).

Die Zytokine des hämatopoetischen Systems umfassen koloniestimulierende Faktoren (CSFs), Interleukine (ILs), Interferone, FLT3L, Erythropoietin (EPO) und Thrombopoietin (Tpo) (Nicola et al., 1994). Es wurde gezeigt, dass einige Wachstumsfaktoren die Differenzierung multipotenter hämatopoetischer Stammzellen in bestimmte Zelltypen unterstützen können, während andere die Entwicklung mehrerer Linien beeinflussen. Beispielsweise reguliert EPO hauptsächlich die Differenzierung von Erythrozyten-Vorläufern, während IL-3 das Wachstum der meisten Linien stimuliert (Metcalf et al., 2008). Der Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) gehört zu den multipotenten Wachstumsfaktoren. GM-CSF

induziert die Differenzierung und Proliferation von myeloiden Vorläufern im Knochenmark und ist für die Expansion und Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen verantwortlich (Mann et al., 2006). GM-CSF hat auch eine wichtige Funktion bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, indem es die Aktivierung und Migration von myeloiden Zellen zu Entzündungsstellen stimuliert, das Überleben von Zielzellen fördert und die Erneuerung von Granulozyten und Makrophagen stimuliert (Lotfi et al., 2019). GM-CSF weist unter homöostatischen Bedingungen niedrige basale Plasmaspiegel auf. Während einer Entzündungs- oder Autoimmunreaktionen wird die GM-CSF-Expression von Fibroblasten, Endothelzellen sowie einer Vielzahl von Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, DCs, PMN und Eosinophilen hochreguliert (Hamilton, 2019).

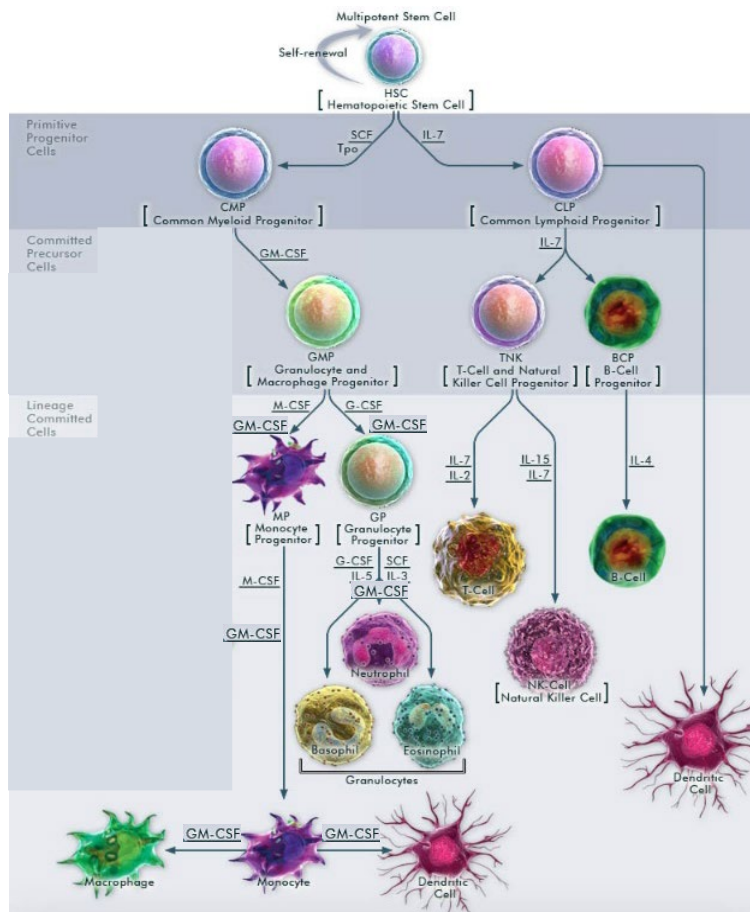


Abbildung 1. Immunzellbildung (mit Veränderungen nach <https://beyondthedish.files.wordpress.com/2016/01/hematopoiesis-from-multipotent-stem-cell.jpg>).

1.1.2. Neutrophile Granulozyten

PMN sind die am häufigsten vorkommenden Leukozyten in Menschen und sind wesentlich für die angeborene Immunantwort gegen eindringende Krankheitserreger (Maiani et al., 2004). Im Vergleich zu der erworbenen Immunantwort, die Zeit für die Entwicklung benötigt, ist die Fähigkeit von PMN Mikroorganismen zu töten unmittelbar und unspezifisch (Kobayashi et al., 2009). PMN bilden die erste Verteidigungslinie und töten über mehrere Mechanismen, einschließlich Phagozytose, Freisetzung von zytotoxischen Granula, Zytokinen und der Bildung von netzartigen extrazellulären Desoxyribonukleinsäuren (DNA)-Strukturen (NETs). PMN sind nicht nur ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität, sondern beteiligen sich auch an der Regulation der adaptiven Immunität durch Wechselwirkungen mit verschiedenen adaptiven Immunzellen (Wang et al., 2018). Neutrophile sind in der Lage den Phänotyp und die Funktion sowohl der CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen modulieren. PMN können die T-Zell-Aktivierung sowohl stimulieren als auch hemmen, abhängig vom Aktivierungszustand beider Zelltypen (Minns et al., 2021).

PMN entstehen und reifen im Knochenmark und werden anschließend in das periphere Gefäßsystem freigesetzt. PMN sind terminal differenziert und relativ kurzlebig. Ex vivo basierte Studien legen nahe, dass PMNs nur 8–12 Stunden im Kreislauf und bis zu 2 Tage im Gewebe überleben können (Basu et al., 2002). Pillay et al., 2010 zeigten jedoch, dass unter homöostatischen Bedingungen die durchschnittliche Lebensdauer der PMN im Kreislauf über 5 Tagen betragen kann. Diese polymorphkernige Leukozyten machen konstant 50-70% der Gesamt-Leukozyten-Population im peripheren Blut aus.

1.1.2.1. Differentiation und Reifung der neutrophilen Granulozyten

Die Entwicklung von PMN aus hämatopoetischen Vorläuferzellen beim Menschen dauert etwa 2 Wochen. Dieser Prozess besteht aus verschiedenen Reifungsstadien, die durch deutliche ultrastrukturelle und phänotypische Veränderungen gekennzeichnet sind, einschließlich einer Kernkondensation und Veränderungen der Zelloberflächenmarkerexpression (Cowland & Borregaard, 1999). Die Differenzierung der PMN im Knochenmark von hämatopoetischen Stammzellen wird durch ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren (TFs) reguliert (Rosenbauer & Tenen, 2007) (Abbildung 2).

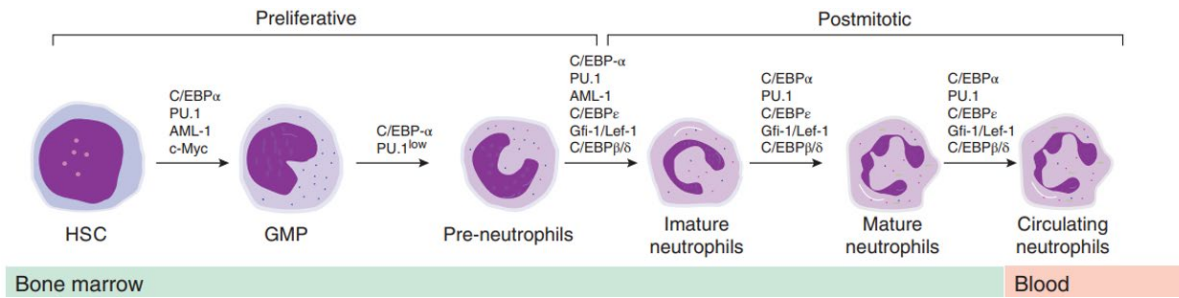


Abbildung 2. Transkriptionsfaktoren, die an der Differenzierung von PMN beteiligt sind (nach Zhichao & Udalova, 2019).

Des Weiteren können HSC auf Stress wie schwere Infektionen oder systemische Entzündungen reagieren, indem sie die Hämatopoese erhöhen (Zhao & Baltimore, 2015). CCAAT-Enhancer-Bindungsprotein α (C/EBP α), die akute myeloische Leukämie-Protein AML-1 und die Transkriptionsfaktoren PU.1 und c-Myc initiieren die Differenzierung der HSC zu Granulozyten/Monozyten-Vorläuferzellen (GMPs), die durch die C/EBP α -Hochregulation und die niedrige PU.1-Expression zur Prä-PMN differenzieren. Die PMN-Entwicklung wird bei der terminalen Differenzierung und Reifung durch die Proteine C/EBP α , β , δ und ϵ sowie die Hochregulation der Transkriptionsfaktoren PU.1, AML-1, Gfi-1 (growth factor independence 1) und Lef-1 (lymphoid enhancer-binding factor 1) unterstützt (Cowland & Borregaard, 1999). Es wurde gezeigt, dass C/EBP α für die Regulation mehrerer myeloid-spezifischer Gene verantwortlich ist (Avellino et al., 2016). C/EBP α ist an der Regulierung der Expression der Rezeptoren beteiligt, die entscheidend für die frühe myeloische Differenzierung sind, indem es spezifisch mit funktionellen Regionen der proximalen Promotoren der G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor) und GM-CSF-Gene interagiert (Zhichao & Udalova 2019). Die Hochregulierung der Gfi-1-Expression unterdrückt die Expression von Genen wie Egr2 (Early Growth Response 2) und Csf1 (colony stimulating Factor 1), die Faktoren kodieren, die die Differenzierung von Monozyten fördern (Zhang et al., 2019). C/EBP α fördert die granulozytäre Reifung durch die verstärkte Expression von miRNA-223 und die Herunterregulation von microRNAs (miRNAs), die die Monozyten-Differenzierung inhibieren, wie miRNA-21 und miRNA-196b (Zhichao & Udalova, 2019).

Bei der Granulopoese, Reifung und Aktivierung zeigen murine PMN-Stadien-abhängig unterschiedliche morphologische Merkmale und Zelloberflächen-Markerexpression (Abbildung 3). Prä-PMN (CD11b⁺CXCR4⁺GR-1⁺Ly6G⁺) unterscheiden sich von ausdifferenzierten PMN (CD11b⁺CXCR2⁺GR-1⁺Ly6G⁺) in der Expression von CXCR2 (CXC-

Motiv-Chemokinrezeptor 2) und CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4), die antagonistisch die Migration von PMN aus dem Knochenmark regulieren. CXCR4 als negativer Regulator der Migration blockiert das Eintreten der nicht ausdifferenzierten PMN in das Gefäßlumen. Ausdifferenzierte PMN sind durch den Verlust der CXCR4-Expression charakterisiert und regulieren die Expression des migrations-unterstützenden Chemokinrezeptor CXCR2 hoch, was zur Mobilisierung der PMN in den Kreislauf führt (Eash et al., 2010). Unter Stressbedingungen wird die Expression von inflammatorischen Zytokinen, insbesondere G-CSF, erhöht. Dabei wird die PMN-Mobilisierung gesteigert, indem G-CSF die CXCR4-Expression reduziert sowie die CXCR2-Expression aufreguliert (Goldberg et al., 2016).

Bone marrow					Blood	
		GMPs	Pre-neutrophils	Immature neutrophils	Mature neutrophils	Circulating neutrophils
Immuno-phenotype	Mouse	Linage- CD117 ⁺ CD34 ⁺ CD16 ⁻ CD11b ⁺	Linage- CD115- Siglec-F- CD11b ⁺ CXCR4 ⁺ Gr-1 ⁺	Linage- Siglec-F- CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ Ly6G ⁺ CXCR2 ⁺ CD101 ⁻	Linage- Siglec-F- CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ Ly6G ⁺ CXCR2 ⁺ CD101 ⁺	Fresh CXCR2 ⁺ CXCR4 ⁺ CD62L ^{hi}
	Human	Linage- CD117 ⁺ CD38 ⁺ CD10- CD135 ⁻	Linage- CD66b ⁺ CD15 ⁺ CD33 ^{int} CD49d ^{int} CD101 ⁻	Linage- CD66b ⁺ CD15 ⁺ CD10- CD33 ^{int} CD49d ⁺ CD16 ^{int} CD101 ^{int}	Linage- CD66b ⁺ CD15 ⁺ CD10- CD33 ^{int} CD49d ⁺ CD16 ^{hi} CD101 ^{int}	Aged CXCR2 ⁺ CXCR4 ⁺ CD62L ^{low}
TFs		PU.1 C/EBP α AML-1 c-Myc	C/EBP α PU.1 Gfi-1 Lef-1 CEBP ϵ	CEBP ϵ Gfi-1 Lef-1 PU.1 C/EBP α C/EBP β C/EBP δ	CEBP ϵ Gfi-1 Lef-1 PU.1 C/EBP α C/EBP β C/EBP δ	Bmal-1

Abbildung 3. Veränderungen des Immunphänotyps während der Granulopoese (nach Zhichao & Udalova, 2019).

Ein typischer Phänotyp der murinen unreifen BM-PMN (aus Knochenmark gewonnene PMN) ist CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁺. Reife BM-PMN weisen CD101-Expression auf. Nach dem Eintreten in die Blutgefäße sind die jungen blutzirkulierenden PMN durch eine hohe Expression von CD62L charakterisiert. Bei der Aktivierung wird die CD62L-Expression deutlich reduziert (CD11b⁺CD62L^{low}Ly6C⁺Ly6G⁺). Alte PMN im Blutkreislauf weisen erhöhte CXCR4-Spiegel auf und werden zurück in das Knochenmark geleitet, wo sie von Makrophagen eliminiert werden (Stockfelt et al., 2020).

1.1.2.2. Phänotypische Charakterisierung der PMN

Nach Abschluss der Granulopoese verlassen die reifen PMN das Knochenmark. Sie können aber unterschiedliche Phänotypen aufweisen (Rosales, 2018). Während einer Infektion führen mikrobielle Komponenten zur Umwandlung der PMN zum N1-Phänotyp und fördern deren pro-inflammatorische Aktivität (Gabilovich et al., 2017). Während die Typ-1-Aktivierung bei akuten Entzündungen dominiert, überwiegt die Typ-2-Aktivierung normalerweise bei chronischen Entzündungen, einschließlich der Tumormikroumgebung (Sionov et al., 2015).

N2-PMN sind durch eine höhere Expression von Faktoren, die das Tumorstadium unterstützen, gekennzeichnet (Wang et al., 2018). In der Tumormikromilieu können N1-polarisierte PMN dem Fortschreiten von Malignitäten durch Tumorzytotoxizität und Tumorstoß entgegenwirken (Piccard et al., 2012). Ohms et al. (2020) haben mit einem Polarisationsversuch zur Erzeugung von N1- und N2-PMN aus primären menschlichen PMN gezeigt, dass zum N1-Phänotyp in vitro polarisierte PMN proinflammatorische Eigenschaften aufweisen, die unter anderem durch einen höheren Gehalt an interzellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) und eine hohe Sekretion von IFN γ -induziertem Protein 10 (IP-10, CXCL10) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) gekennzeichnet sind. Des Weiteren wurde in der Studie gezeigt, dass N2-PMN eine höhere Expression von Pro-Tumor-Faktoren aufweisen, wie einer hohen Zelloberflächenexpression des C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptors 2 (CXCR2) sowie hohe Mengen an Interleukin-8 (IL-8) ausschütten. Die multifunktionalen Rollen von PMN bei Krankheiten beruhen hauptsächlich auf ihrer Produktion verschiedener Effektormoleküle unter verschiedenen Bedingungen. Die Polarisation der PMN in Richtung pro-tumoralen N2-Phänotyps wird von unterschiedlichen Signalen wie PGE₂, TGF β , VEGF, sowie IL-10 im Mikromilieu koordiniert, während mikrobielle Komponenten wie LPS (Lipopolysaccharid) oder fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) die Polarisation zum pro-inflammatorischen N1-Phänotyp unterstützen (Abbildung 4).

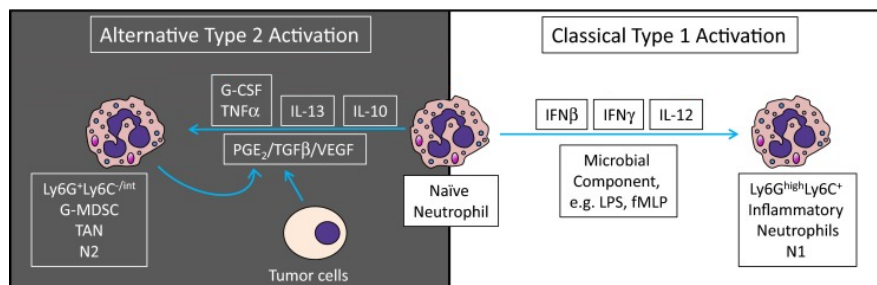


Abbildung 4. Polarisation der naiven PMN zu N1- beziehungsweise N2- Phänotyp (nach Sionov et al., 2015).

1.1.2.3. Die Rolle von PMN in der Immunstimulation und Immunsuppression

PMN haben zusätzlich die Fähigkeit, andere Immunzellen zu modulieren. Sie können auf verschiedenen Ebenen mit dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakte oder durch die Sekretion von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) interagieren (van Kessel et al., 2014, Kruger, 2015).

PMN üben auch verschiedene Effektorfunktionen durch Sekretion von Proteinen wie MPO (Myeloperoxidase), ARG1 (Arginase 1), iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase), Dectin-1 (ein Mustererkennungsrezeptor) oder NE (Neutrophile Elastase) aus, die weitreichend die Immunantwort modulieren können (Giacalone, 2019).

Die Regulation von DC erfolgt durch viele PMN-Produkte, einschließlich Lactoferrin, α -Defensinen und Chemokinen (wie CCL3 – C-C-Motiv Chemokin-Ligand 3), die für DCs chemotaktisch wirken und für eine schnelle DC-Rekrutierung an die Infektionsstelle erforderlich sind (Mayadas et al., 2014). Eine direkte Bindung von PMN an DCs vermittelt die Immunmodulation dendritischer Zellen und fördert die Aktivierung von DCs zu effektiven Antigen-präsentierenden Zellen (van Gisbergen et al., 2005). Dabei ist die von PMN vermittelte Immunmodulation der dendritischen Zellen von den Interaktionen zwischen Integrin Mac-1 (auch Makrophagen-Antigen-1, Integrin α M β 2 oder Komplementrezeptor CR3 genannt) und DC-SIGN (dendritische Zellen-spezifisches ICAM-greifendes Non-Integrin) abhängig (Klaas et al., 2005). PMN selbst können auch als Antigen-präsentierende Zellen fungieren, da sie über MHC II (MHC-Klasse-II-Komplex) - und Kostimulatoren-Expression die Differenzierung von Typ-1-Helferzellen (Th1) und Typ-17 T-Helferzellen (Th17) stimulieren (Abdallah et al., 2011).

PMN stellen außerdem die terminale Reifung von NK-Zellen, sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen sicher (Jaeger et al., 2012). Während einer Infektion aktivieren die PMN direkt die NK-Zellfunktion durch Freisetzung von Zytokinen. Beispielsweise fördern PMNs bei einer Infektion mit Legionella die NK-Zell-Effektorfunktionen in IL-18/MyD88-abhängiger Weise (Spörri et al., 2008). NK-Zellen abgeleitete Zytokine wie IFN- γ (Interferon gamma) und GM-CSF können auf PMN zurückwirken und die Entzündungsreaktionen verstärken (Mayasad et al., 2014).

PMN hemmen die T-Zell-Proliferation durch Freisetzung von ROS und durch einen NO-abhängigen Mechanismus (Aarts et al., 2019). Neutrophils können in Lymphknoten auch mit B-Zellen interagieren und mittels TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor β) die B-Zell-Differentiation und Antikörper-Produktion Antworten hemmen (Lelifeld et al., 2015). Um Lymphknoten zu erreichen, müssen PMN über Mac-1 und CXCR-4-Interaktion über Hochendothelvenolen zu den Lymphknoten migrieren. Außerdem wurde berichtet, dass PMN durch Produktion von BAFF (B-Zell-aktivierender Faktor), APRIL

(proliferationsinduzierender Ligand) und IL-21 an der Polarisierung aktivierter B-Zellen beteiligt sein können (Puga et al., 2011).

Viele Studien zeigen, dass PMN effizient sowohl an angeborenen als auch an adaptiven Immunantworten teilnehmen können. PMN sind nicht nur Phagozyten, sondern können auch Antigenpräsentierenden Zellen (APC)-ähnliche Eigenschaften annehmen.

1.1.2.4. Neutrophile Phagozytose

PMN spielen eine herausragende Rolle bei der Beseitigung der Aspergillose (Urban & Nett, 2019). Die Hauptfunktion der PMN ist das Zerstören eindringender Konidien durch Phagozytose (Richardson et al., 1995). Die Phagozytose von Pathogen beginnt nach der Erkennung pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs) durch PMN über Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) (Thomas & Schroder, 2013) wie TLRs, und Dectin-1 (extrazellulär) sowie Nod-ähnliche Rezeptoren (NLRs) (intrazellulär), die an verschiedene PAMPs binden können (Teng et al., 2017). Des Weiteren binden PMN die mit Komplement (z. B. C3b) und Antikörpern (z. B. IgG) opsonisierte Pathogene durch Fc-Rezeptoren (FcRs) beziehungsweise Komplementrezeptoren (CRs) (Teng et al., 2017). Die Aktivierung opsonischer Rezeptoren erhöht schnell die Effizienz der Phagozytose und ist entscheidend für die durch Neutrophile vermittelte Abtötung von Krankheitserregern.

Der phagozytische Prozess bei PMN unterscheidet sich deutlich von dem bei anderen Phagozyten. PMN weisen eine höhere Phagozytoserate und eine höhere Intensität der oxidativen Atemreaktion auf als DC oder Makrophagen (Nordenfelt & Tapper, 2011). PMN sind äußerst effiziente Phagozyten und können ein IgG-opsonisiertes Pathogen in weniger als 20 Sekunden aufnehmen, wobei Monozyten einige Minuten dafür brauchen (Segal et al., 1980). Anders als bei Monozyten ist der Phagosomenreifungsweg in PMN nicht mit dem endozytischen Weg verbunden. Der Phagosomen-Reifungsweg wird in Neutrophilen durch die schnelle Abgabe vorgeformter Granula an nichtsaure Phagosomen ersetzt. (Nordenfelt & Tapper, 2011).

Mac-1, auch als Komplementrezeptor 3 bezeichnet, vermittelt die Phagozytose von komplementopsonierten *A. fumigatus* Konidien, kann aber auch die Phagozytose von nichtopsonierten Konidien, durch seine Bindungsaffinität an das Pathogen beeinflussen (Diamond et al., 1995). Die Internalisierung von Mikroben durch PMN erfolgt mithilfe von Umlagerungen des Zytoskeletts. Die Plasmamembran eines Phagozyten erstreckt sich um sein

Ziel und initiiert einen Prozess, der schließlich einen Phagosom erzeugt. Azurophile Granulate werden mobilisiert, sobald PMN zu phagozytieren beginnen und verschmelzen mit vollständig gebildeten Phagosomen, aber auch mit entstehenden, nicht geschlossenen Phagosomen und der Plasmamembran (N'Diaye et al., 1998, Lee et al., 2003). Bei diesem Prozess werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mittels NADPH-Oxidase produziert, die zur oxidativen Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden des Pathogens führen. Zugleich liefern die Granulen spezifische anti-mikrobielle Proteine, wie neutrophile Elastase (NE), Cathepsin G und MPO, die zusammen mit ROS eine effiziente Abtötung von Mikroben verursachen (Bardoel et al., 2014, van Kessel et al., 2014).

1.1.2.5. Zytotoxische Funktionen der PMN

NET-osis

Die Phagozytose von Mikroorganismen führt zur vollständigen Aktivierung des antimikrobiellen Arsenal der PMN. Nach der Aktivierung setzen PMN netzartige extrazelluläre Strukturen (NETs) frei (Stephan & Fabri, 2015). NETs bestehen aus DNA, Histonen und anti-mikrobiellen Substanzen wie Myeloperoxidase (MPO) oder neutrophiler Elastase (NE) (Kaplan & Radic, 2012). Krankheitserreger werden durch Unterschiede in der elektrostatischen Ladung in den NETs gefangen und durch darin enthaltene Enzyme abgetötet (Gardiner & Andrews, 2012). Obwohl diese Immunfunktion am besten zur Bekämpfung von Bakterien beschrieben wurde (Azzouz et al., 2018), weisen die NETs auch eine weitreichende Wirksamkeit gegen Pilze wie *Candida albicans* (Urban et al., 2009) und *Aspergillus fumigatus* (McCormick et al., 2010), aber auch gegen Parasiten (*Toxoplasma gondii*, *Leishmania*) (Baker et al., 2008) und Viren (*HIV-1*, *Hantavirus*) auf (Zawrotniak et al., 2017).

Degranulation

Eine zusätzliche Abwehr aktivierter PMN gegen Pathogene ist ein Exozytoseprozess, Degranulation genannt, bei dem die neutrophile Granula mit der zytoplasmatischen Membran verschmelzen und ihren Inhalt in das umgebende Gewebe freisetzen. Bei Degranulation entsteht an der Infektionsstelle ein antimikrobielles Milieu, das zytotoxische Wirkung gegen Krankheitserreger hat (Bardoel et al., 2014, Lacy, 2006). Die PMN-Granula werden kontinuierlich während des Differenzierungsprozesses ab dem Promyelozytenstadium gebildet und können in vier verschiedenen Arten unterteilt werden (Lawrence et al., 2018): primäre, sekundäre, tertiäre Granula und sekretorische Vesikel, die in Promyelozyten, in Myelozyten

beziehungsweise in Bandzellen und in segmentierten PMN hergestellt werden (Bardoel et al., 2014). Die Primären Granula, auch als azurophile Granula bekannt, enthalten Peptide, die sowohl über oxidative als auch über nicht-oxidative Wege eine starke antimikrobielle Aktivität aufweisen, wie MPO, Alpha-Defensine, Elastase, bakterizides/permeabilitätssteigerndes Protein (BPI), NE, Proteinase 3 (PR3) und Cathepsin G (CG) (Selders et al., 2017). Sekundäre Granula (spezifische Granula) sind durch das Vorhandensein von antimikrobiellen Proteinen einschließlich Lactoferrin, Gelatinase, Cathelicidin (hCAP-18), Pentraxin, Haptoglobin und einige Metalloproteinasen (MMPs) gekennzeichnet. Tertiäre (oder Gelatinase) Granula enthalten unter anderem Gelatinase, Lysozym und Cathepsine (Xu & Håkansson 2002, Selders et al., 2017). Dem Exozytoseprozess unterliegen auch sekretorische Vesikel, die plasmatische Proteine, wie Alkalische Phosphatase oder NADPH-Oxidase 2 beinhalten (Sheshachalam et al., 2014).

ROS

Infolge der Phagozytose tritt ein dramatischer Anstieg des Sauerstoffverbrauchs auf, da NADPH-Oxidase aktiviert wird und dies zur ROS-Produktion führt (Mayadas et al., 2014). Nach der Aktivierung setzen PMNs große Mengen an ROS an der Infektionsstelle oder intrazellulär im Phagolysosom frei (Dupre-Crochet et al., 2013). Der Aufbau einer funktionellen NADPH-Oxidase erfordert die induzierbare Translokation der zytosolischen NADPH-Oxidase-Komponenten p47phox, p67phox und p40phox zur Membran, wo sich gp91phox (NOX2), gp22phox und die GTPase Rac2 (oder Rac1) befinden (Mayadas et al., 2014). Das primäre Granulatprotein MPO kann die Beseitigung eindringender Krankheitserreger verbessern, indem es durch Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Chloriden die Bildung hochreaktiver Hypochlorsäure (HOCl) katalysiert (Peake & Suzuki, 2004) (Abbildung 5).

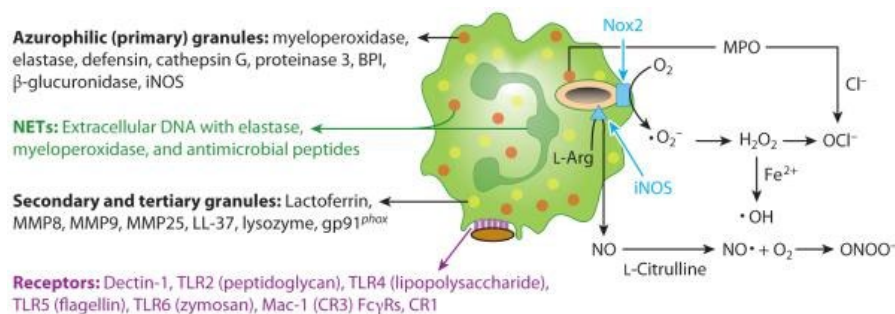


Abbildung 5. Zytotoxische Funktionen der PMN (nach Mayadas et al., 2014).

EVs

Aktiviert PMN setzen extrazellulären Vesikeln (EV) frei, die unterschiedlichen biologisch aktiven Moleküle wie Nukleinsäuren (DNA, RNA, miRNA), Proteine, Kohlenhydrate und Lipide tragen, die das Bakterienwachstum beeinträchtigen können (Dalli et al., 2013; Kolonics et al., 2020). Ihre Mobilisierung wird durch Stimuli wie fMLP und vor allem durch immunologische Signale, die durch Kontakt von PMN mit aktiviertem Endothel entstehen, erzeugt. Dieselbe Population von PMN ist in der Lage, EVs mit unterschiedlichen funktionalen Eigenschaften zu erzeugen, die entzündungsfördernde oder entzündungshemmende Wirkungen auf benachbarte Zellen übertragen (Shopova et al., 2020).

1.1.3. Dendritische Zellen

Zur Induktion einer adaptiven Immunität ist die Aktivierung einer spezialisierter Antigen-präsentierender Zellen ein notwendiger erster Schritt. DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen und spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Immunität. Sie haben im aktivierten Zustand eine immunstimulierende beziehungsweise unter homöostatischen Bedingungen eine toleranzinduzierende Funktion. Daher wirken DC an der Schnittstelle von Immunität und peripherer Toleranz (Kubach et al., 2005). DCs kommen in fast jedem Gewebe des Körpers vor und bilden dort die entscheidende Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem, indem sie Krankheitserreger erkennen und beseitigen können sowie T- und B-Lymphozyten aktivieren. DCs präsentieren mittels MHC (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex)-Molekülen der Klasse I und II auf ihrer Oberfläche Antigene gegenüber naiven oder ruhenden T-Zellen und spielen folglich eine zentrale Rolle bei der Induktion der T-Zellen und damit indirekt der B-Zellen (Steinbrink et al., 1997). Durch DCs können pathogenspezifische T-Lymphozyten reaktiviert werden aber auch naive CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen aktiviert werden, was als eine einzigartige Fähigkeit der DCs gilt (Banchereau et al., 2000).

1.1.3.1. Differentiation und Maturation der dendritischen Zellen

Die Entwicklung aller DC-Populationen hängt vom FMS-ähnlichen Tyrosinkinase-3-Liganden (FLT3L) und seinen Rezeptor FLT3 ab (McKenna et al., 2000). Die Zusammenwirkung des FLT3-Liganden mit dem GM-CSF oder dem G-CSF induziert die Ausdifferenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu Prä-DC und mobilisiert sie in das periphere Blut von Mäusen (Brasel et al., 1997) (Abbildung 6). DC-Subpopulationen entwickeln sich unter der Kontrolle eines spezifischen Repertoires, insbesondere Interferon-regulatorischen Faktoren

IRF8 und IRF4, in Zusammenarbeit mit Transkriptionsfaktoren PU.1, ID2, E2-2, ZEB2, KLF4, IKZF1 und BATF3 (Collin & Bigley, 2018).

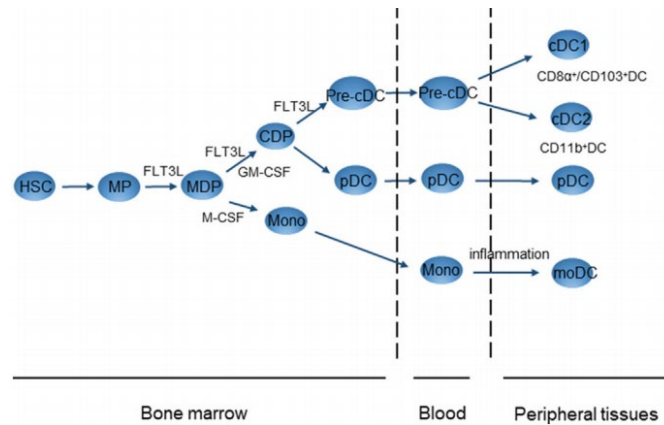


Abbildung 6. DC-Entwicklung (nach Hasegawa & Matsumoto, 2018).

DC, dendritische Zellen; HSC, hämatopoetische Stammzellen; MP, myeloischer Vorläufer; MDP, Makrophagen / DC-Vorläufer; CDP, gemeinsamer DC-Vorläufer; cDC, herkömmlicher DC; pDC, Plasmazytoide DC; moDC, von Monozyten abgeleitetes DC.

Murine DC sind durch die Ko-Expression von CD11c (der α -Untereinheit des β -integrins p150,95) und von MHCII gekennzeichnet (Steinman & Cohn, 1979). Viele Oberflächenrezeptoren der DC werden in Abhängigkeit von der Lokalisierung und des Reifungsstatus differenziell exprimiert (Steinman, 2001). Es wurden wie beim Menschen drei Maus-DC-Untergruppen definiert: plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) und klassische dendritische Zellen von Typ 1 und Typ 2: cDC1 und cDC2 (Guilliams et al., 2014) (Abbildung 7).

DC subset	Conventional DCs 1	Conventional DCs 2	Plasmacytoid DC	
Mouse	CD8 α /CD103 ⁺ DCs	CD11b ⁺ DCs		
	BTLA ⁺ MHCII ⁺ CD45 ⁺ CD14 ⁻ CD11c ⁺ CCR7 ⁺ FLT3 ⁺ CD26 ⁺ XCR1 ⁺ CLEC9A ⁺ TLR3 ⁺	BTLA ⁺ MHCII ⁺ CD45 ⁺ CD14 ⁻ CD11c ⁺ CCR7 ⁺ FLT3 ⁺ CD4 ⁺ CX3CR1 ⁺ CD11b ⁺ SIRP α ⁺	BTLA ⁺ MHCII ⁺ CD45 ⁺ CD14 ⁻ CD45RA ⁺ CD123 ⁺ CD4 ⁺	<div style="background-color: #e6f2ff; padding: 5px;">Lymphoid organ</div> <div style="background-color: #e6ffe6; padding: 5px;">Skin</div> <div style="background-color: #ffe6e6; padding: 5px;">Intestine</div>
	CD8 α ⁺ CD103 ⁺ CD205 ⁺ Langerin ⁺	CD24 ⁺	B220/CD45R ⁺ BST2 ⁺ Ly6C ⁺ Siglech ⁺	<div style="background-color: #e6f2ff; padding: 5px;">cDC1 cDC2 CD8α⁺ CD11b⁺ CD4⁺ CD4⁺</div> <div style="background-color: #e6ffe6; padding: 5px;">cDC1 cDC2 langerin⁺ langerin⁻ (CD207⁺) (CD207⁻) CD103⁺ CD11b⁻</div> <div style="background-color: #ffe6e6; padding: 5px;">cDC1 cDC2 CD103⁺ CD103⁺ CD11b⁺ CD11b⁺</div>

Abbildung 7. Phänotypische Marker und Position von Maus-DCs (nach Hasegawa & Matsumoto, 2018).

1.1.3.2. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung der DC-Populationen

DCs sind durch eine hohe funktionelle Plastizität charakterisiert. Ihre Eigenschaften sind vom Mikromilieu abhängig, die ihre Reifung, Aktivierung und Polarisation beeinflussen (Radice et al., 2015) (Abbildung 8). DCs sind eine heterogene Zellpopulation. Prä-cDCs entwickeln sich im Knochenmark und wandern in die Gewebe, wo die terminale cDC-Differenzierung stattfindet, während Prä-pDCs im Knochenmark zu pDCs differenzieren (Onai et al., 2007).

cDCs fungieren als Wächterzellen, sie kommen in fast allen Geweben vor und patrouillieren die lokale Umgebung (Guilliams et al., 2016). Infolge einer DAMP (Schaden-assoziierte molekulare Muster) -vermittelten Aktivierung wandern cDCs in C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) -abhängiger Weise in die T-Zellzonen der drainierenden Lymphknoten. Dort präsentieren sie die Peptide (naiven) T-Lymphozyten in einem proinflammatorischen Kontext und induzieren ihre Proliferation sowie Polarisation (Tiberio et al., 2018). cDC1 exprimieren CD8 α oder CD103 auf ihrer Oberfläche, sind für die Immunität gegen intrazelluläre Pathogene, Viren und Krebs kritisch und sind auf die Antigen-Kreuzpräsentation zur Stimulierung CD8⁺ T-Zellen spezialisiert (Granot et al., 2017, Allan et al., 2003; Hildner et al., 2008; Pooley et al., 2001; Sung et al., 2006). cDC2 sind durch die Expression von CD11b gekennzeichnet und fördern die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen. cDC2 sind in der Lage antivirale, -fungale und -parasitäre Immunität zu modulieren (Granot et al., 2017, Plantinga et al., 2013, Schlitzer et al., 2013). cDCs können die mehrere Umweltsignale integrieren und an CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten weiterleiten (Guilliams et al., 2016). Abhängig von empfangenen Signalen können die naive T-Lymphozyten in Antigen-spezifische Effektorzellen oder regulatorische T-Zellen ausdifferenzieren (Sichien et al., 2017). Naive CD4⁺ T-Zellen können in verschiedene Effektor-T-Helferzell-Untergruppen differenzieren, die verschiedene Arten von Immunantworten fördern. Zuerst wurden Th1- und Th2-T-Zellen beschrieben, wobei Th1-T-Zellen hauptsächlich IFN- γ produzieren, was bei der Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺ T Zellen und Makrophagen hilft, wobei Th2-T-Zellen über IL-4-Produktion die B-Zellen aktivieren können (Mosmann et al., 1986). Nachfolgend gefundene IL17-produzierende proinflammatorische Th17-Zellen helfen bei der Rekrutierung von PMN und Makrophagen (Awasthi & Kuchroo, 2009). Follikuläre T-Helferzellen (Tfh) fördern die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen über die Produktion der Zytokine IL-21 und IL-4 (Vinuesa et al., 2016). Antagonistisch zu den vorgenannten Subtypen der T-

Helferzellen wirken die regulatorische T-Zellen (Treg), die Immunantworten unterdrücken können und dadurch die Homöostase und Selbsttoleranz aufrechterhalten. Tregs können die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion hemmen und spielen damit eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung von Autoimmunität und Allergien (Kondělková et al, 2010).

pDCs sind auf die Produktion von Typ-I-Interferonen (IFN-I) während Virusinfektionen spezialisiert und für antivirale Immunantworten von entscheidender Bedeutung (Sichien et al., 2017). Aufgrund ihrer regulatorischen Funktionen bei der angeborenen und adaptiven Immunität, sind IFNs vom Typ I nicht nur für die antivirale Resistenz wichtig, sondern auch für andere Arten von Infektionen und für die Autoimmunkrankheiten und Allergien (Asselin-Paturel & Trinchieri, 2005). pDCs reichern sich hauptsächlich im Blut an und gelangen über den Blutkreislauf in die Lymphknoten (Sisirak et al., 2011).

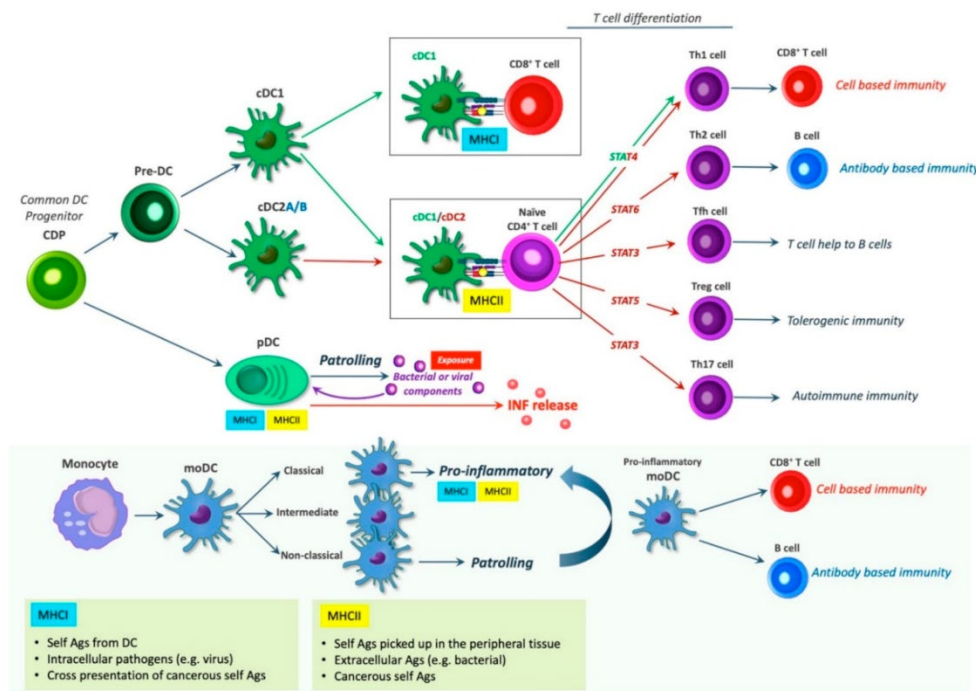


Abbildung 8. Funktionelle Spezialisierung dendritischer Zellen (nach Brandum et al., 2021).

Insbesondere aufgrund der Verwendung von DCs in vielen Krebsimmuntherapien werden auch monozyten-abgeleitete (mo)DCs diskutiert. moDCs werden routinemäßig in vitro durch eine Differenzierung von Monozyten mit Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) erzeugt (Sichien et al., 2017). Ihr Vorhandensein in vivo bleibt jedoch umstritten.

DCs sind nicht nur für die Induktion primärer Immunantworten und für die Regulation des Typs der T-Zell-vermittelten Immunantwort kritisch, sondern sind auch wichtig für die Induktion immunologischer Toleranz (Banchereau et al., 2000). DC, die die immunhemmenden Signale wie IL-10 und Kortikosteroide empfangen, erwerben die Fähigkeit, IL-10 selbst zu generieren und zu lymphoiden Organen zu wandern, wo von DC sezerniertes IL-10 zur Differenzierung und Proliferation von supprimierenden T-Zellen, die als regulatorische T-Zellen (Treg) bezeichnet werden, beiträgt und somit Immuntoleranz moduliert (Maldonado & Andrian, 2010). Darüber hinaus sind DC an der Induktion der immunologischen Toleranz durch die Eliminierung autoreaktiver T-Lymphozyten beteiligt (Hasegawa & Matsumoto, 2018).

1.1.3.3. *Bildung der Immunologischen Synapse zwischen DC und T-Zellen*

Wechselwirkungen von T-Zellen mit Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen erfordern physikalische Zell-Zell-Kontakte, die zur Signalweiterleitung und T-Zell-Aktivierung führen (Ni & ONell, 1997; Gunzer et al., 2000) (Abbildung 9).

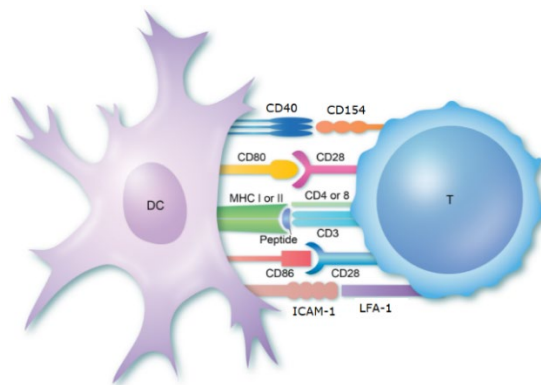


Abbildung 9. Schema der frühen T-Zell-Aktivierung (nach immunology.org; Originalautor: Mary Cavanagh).

Dabei wird die Wechselwirkung zwischen der T-Zelle und der APC hauptsächlich durch Zelladhäsionsmoleküle wie LFA-1 (Leukozytenfunktionsantigen 1) und ICAM-1 (interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1) bereitgestellt (Anderson & Siahaan, 2003).

Die funktionelle Kapazität von DC hängt auch mit einer hochgradigen Expression von MHC-Molekülen der Klasse I und II und der hohen Expression von ko-stimulatorischen Molekülen zusammen, wie CD80 und CD86, was im Falle einer antigen-spezifischen Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) und das Triggern von CD28 T-Zell-Signaling hervorruft (Gunzer et al., 2000).

1.1.3.4. DC-abgeleitete Antigen-Präsentation

Antigenpräsentation über MHC I dient hauptsächlich der Unterscheidung der intrazellulären Selbst- von (viralen) Fremdproteinen und umfasst Verarbeitungsprozess der endogenen Antigene und ihre Präsentation gegenüber naiven $CD8^+$ T-Zellen (Cruz et al., 2017). Die Proteine werden durch das Proteasom zu Peptiden abgebaut und diese dann durch die Transporter von Antigen-prozessierenden (TAP)-Molekülen in das endoplasmatische Retikulum transportiert und auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. Wenn eine Zelle mit einem Pathogen infiziert ist, werden „fremden“ Antigene den naiven $CD8^+$ T-Zellen präsentiert, die als Folge zu zytotoxischen Effektorzellen (CTLs) umwandeln (Heath & Carbone, 2001) (Abbildung 10 a).

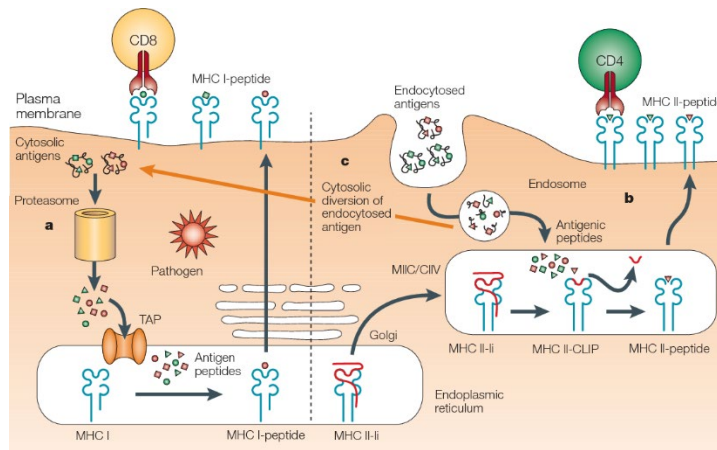


Abbildung 10. Antigen -Präsentation (nach Heath & Carbone, 2001).

Im Gegensatz dazu präsentieren MHC-Klasse-II-Moleküle Proteine, die über den endozytischen Weg in die Zelle gelangen (Cruz et al., 2017). Während der Reifung von MHC-Klasse-II-Molekülen werden sie mit der invarianten Kette (Ii) assoziiert (MHC II-Ii), was die Bindung endogener Antigene verhindert. Die Ii wird im MIIC (MHC-Klasse-II-Kompartiment) /CIIV(MHC-Klasse-II-Vesikel) -Kompartiment zu CLIP abgebaut, das dann (CLIP-MHC-Klasse-II-Komplex) gegen ein antigenes Peptid ausgetauscht wird (Heath & Carbone, 2001). Der Antigen-MHCII-Komplex aktiviert (naive) antigen-spezifische $CD4^+$ -T-Zellen und führt zu deren Ausdifferenzierung zu klassischen T-Helfer 1 (Th1) und Th2, Th9, Th17, folliculäre Helfer-T-Zellen (Tfh) oder Treg, deren jeweilige Abundanz hauptsächlich von der Art des Krankheitserregers und folglich dem Zytokinmilieu der Mikroumgebung abhängt (Luckheeram et al., 2012) (Abbildung 10 b).

Bestimmte Subpopulationen der dendritischen Zellen (einschließlich cDC1, cDC2 und pDC) können auch eine spezialisierte Fähigkeit demonstrieren, exogene Antigene in den MHC-Klasse-I-Weg über die sogenannte Kreuzpräsentation einzuschleusen (Heath & Carbone, 2001) (Abbildung 10 c). Der klassische Weg der MHC-I-Präsentation erfordert Antigentranslokation durch endosomales TAP-Protein. Dafür gelangen bei der Kreuzpräsentation in erstem Schritt die im Endosom prozessierten exogenen Peptide in das Proteasom. Aus dem Proteasom werden die Peptide durch TAP in das Endozytoplasmatisches Retikulum transportiert, wo sie an MHC-I binden können (Embgenbroich et al., 2018; Lawand et al., 2016).

Die Kreuzpräsentation exogener Antigene in einem proinflammatorischen Kontext führt zu der Differenzierung antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen (CTLs) (Halle et al., 2017). In den meisten Fällen werden vom gleichen Protein abgeleitete Antigene auch in den MHC-Klasse-II-Präsentationsweg zur Erkennung durch CD4⁺-Helfer-T-Zellen eingeschleust, die dann ihrerseits Hilfe bei der CD8⁺ T-Zell-Aktivierung bereitstellen.

1.2. Beta2-Integrine

β2-Integrine werden ausschließlich in Leukozyten exprimiert und sind bei vielen immunologischen Prozessen des Immunsystems von entscheidender Bedeutung (Abraham et al., 2009). β2-Integrine sind heterodimere Typ I-Transmembranproteine, die aus der β2-Untereinheit (CD18) und vier verschiedenen, jedoch hoch homologen α-Untereinheiten aufgebaut sind (Zhang, et al., 1999). Durch nichtkovalente Bindungen mit αL (CD11a), αM (CD11b), αX (CD11c) sowie αD (CD11d) bildet die β2-Untereinheit CD18 vier in Bezug auf Struktur und Funktion verschiedene Heterodimere (Anderson et al., 2014). Diese werden auch als LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 oder CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18) beziehungsweise CD11d/CD18 bezeichnet (Shaw et al., 2001). Die N-terminale Verbindung der α- und β-Untereinheiten wird im endoplasmatischen Retikulum erstellt und nur die heterodimere Form der Integrine wird in die Zellmembran transportiert (Rosa et al, 1989). Die transmembrane Lokalisierung ermöglicht die mechanische Verbindung der ECM (Extrazellulärmatrix) mit dem Zytoskelett der Zelle (Schwartz, 2010).

Das β2-Integrin-Expressionsmuster variiert zwischen den Leukozyten-Subpopulationen. LFA-1 wird auf allen Leukozyten exprimiert, überwiegt jedoch auf Lymphozyten. Mac-1 wird hauptsächlich auf myeloiden Zellen exprimiert, einschließlich PMN, Monozyten, Makrophagen aber auch auf aktivierten Lymphozyten und lymphoiden natürlichen Killerzellen (Shutong et

al., 2017), wobei es auf PMN dominiert. CD11c/CD18 ist in der Maus das am häufigsten vorkommende Integrin auf myeloischen DC, kann aber auch auf NK-, B- und T-Zellen vorkommen (Arnaout, 2016). Bei Mäusen ist die CD11d-Expression unter basalen Bedingungen auf einen kleinen Prozentsatz zirkulierender Leukozyten beschränkt, wird aber auf Fresszellen an lokalen Entzündungsstellen und auf differenzierten Makrophagen hochreguliert, was ihre Retention an Entzündungsherden erleichtern kann (Yakubenko et al., 2008).

Mac-1 ist unter den β 2-Integrinen der am vielseitigste Rezeptor (Vorup-Jensen et al., 2018). Die Komplexität der Mac-1-Funktionen ergibt sich zum Teil aus der Fähigkeit, eine Vielzahl von strukturell und funktionell unterschiedlichen Liganden zu erkennen (Podolnikova et al., 2016). Zu denen gehören zahlreiche extrazelluläre Matrixproteine, aber auch sogenannte Alarmine, die während einer Entzündungsreaktion mit der extrazellulären Matrix assoziiert werden und während einer Gewebeverletzung aus beschädigten Zellen freigesetzt werden und chemotaktische und aktivierende Wirkungen auf Leukozyten ausüben (Podolnikova et al., 2015).

Der Mechanismus, der es Mac-1 ermöglicht, eine breite Ligandenbindungsspezifität aufzuweisen, basiert auf der Art seines Erkennungsmotivs, das auch in vielen nicht verwandten Proteinen gefunden werden kann (Podolnikova et al., 2015). Mac-1 hat mehrere Ligandenbindungsstellen im Bereich der α -I-Domäne (Hyun et al., 2009). Zhang & Plow (1999) haben gezeigt, dass die C3bi-Bindungstasche aus drei Regionen, P147-R152, P201-K217 und K245-R261 von α M besteht, die die Kationenbindungsstelle innerhalb des MIDAS-Motivs der I-Domäne umgeben. Lys 245 des K245-R261-Regions spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der C3bi-Bindung an α M β 2-Integrin. Während für die Fibrinogen-Bindung wurde eine Bindungstasche, die drei Aminosäuren-Motiv: Phe246, Asp254, Pro257 innerhalb des K245-R261-Regions beinhaltet festgestellt (Yakubenko et al., 2002), was stützt die Hypothese von Zhang & Plow (1999), dass Liganden von α M β 2 an überlappende, aber nicht identische Stellen innerhalb der I-Domäne binden können. Lishko et al. (2018) schlagen hingegen vor, dass die α M-I-Domäne nicht an bestimmte Aminosäuresequenzen bindet, sondern die Sequenzmuster bevorzugt, die aus einem Kern basischer Reste bestehen, die von hydrophoben Rückständen flankiert werden. Basierend auf diesem Befund sollen in Leukozytengranulaten gespeicherte kationische Wirtsabwehrproteine und -peptide, die auffallend an den

Erkennungsmustern der α MI-Domäne angereichert sind, eine neue Klasse von Mac-1-Liganden darstellen (Lishko et al., 2018).

1.2.1. β 2-Integrin-Struktur

α - und β -Untereinheiten der β 2-Integrine besitzen eine große extrazelluläre Domäne ($\alpha > 940$, $\beta > 640$ Aminosäuren), einen Transmembran (TM)-Helix und eine kurze zytoplasmatische Domäne ($\alpha, \beta < 60$ Aminosäuren) (Shimaoka et al., 2002) (Abbildung 11).

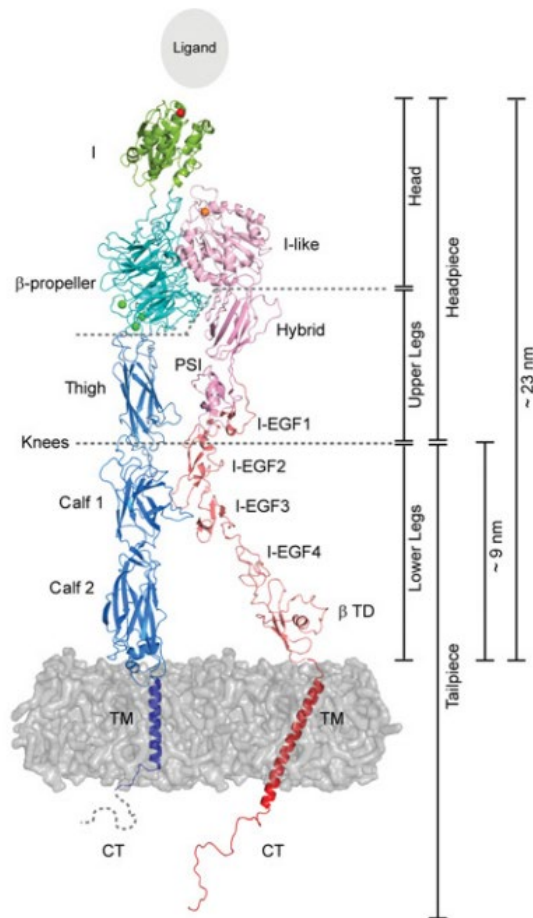


Abbildung 11. Schematische Darstellung von Struktur der β 2 Integrinen (nach Tan, 2012).

Integrin- α - und - β -Untereinheiten bestehen aus extrazellulären, transmembranen und intrazellulären Domänen. Die große extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit unterteilt sich in 2 Calf und Thigh Regionen des α -Bein sowie β -Propeller und I-Domäne, die zusammen mit N-Terminaler I-ähnlicher Domäne der β -Untereinheit den Kopf des Integrin bilden. Der β -Bein besteht aus β -Teil, vier 4-Disulfid-EGF-Domänen sowie PSI- und Hybrid- Domänen. Die Positionen der Kationen-Bindungsstellen sind wie folgend angegeben: Grüne und Golde Kügelchen – Ca^{2+} , rote – Mg^{2+} (Tan, 2012).

Der C-Terminus des Rezeptors liegt im Zytosol und der N-Terminus in extrazellulärer Matrix (Danen et al., 2013). Extrazelluläre Domäne der α -Kette besteht aus linearem Stelzen-Region, der aus Calf-1, Calf-2 und Thigh-Motive gebildet ist, und einer Kopfgruppe, die eine Ligandenbindungsstelle beinhaltet (Campbell & Humphries, 2011). Die Calf-1, Calf-2 und

Thigh-Domäne weisen ähnliche Immunglobulin-ähnliche β -Sandwich-Falten auf (Campbell & Humphries, 2011). Zu der Kopfgruppe der α -Untereinheit gehört ein siebenblättriger β -Propeller, wobei jedes Blatt aus einem viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt besteht (Chouhan et al., 2011) und einer I-Domäne, deren Homologe ausschließlich bei $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αE und bei der α -Ketten der $\beta 2$ -Integrine (αL , αM , αX , αD) vorkommen (Pan et al., 2016). α -I-Domäne besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, das von sieben α -Helixen umgeben ist (Lee et al., 1995). Sie beinhaltet Kontaktfläche, mit der die Ligandenbindung erfolgt und damit eine entscheidende Rolle bei der Funktion der $\beta 2$ -Integrine spielt (Zhang et al, 2012).

Des Weiteren beinhaltet α -I-Domäne eine Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS) mit den Schlüsselresten von zwei Aspartate (D), Threonin (T) und Serin (S), an den zweiwertige Kation Mg^{2+} binden kann und damit die Spezifität und Affinität der Bindungsstelle zu dem Liganden beeinflusst (Morgan et al., 2019). Ein saurer Rest eines Liganden, Aspartat (D) oder Glutamat (E), und zwei Wassermolekülen ($w1$, $w2$) vervollständigen die Metallionenkoordination (Bergelson et al., 1995).

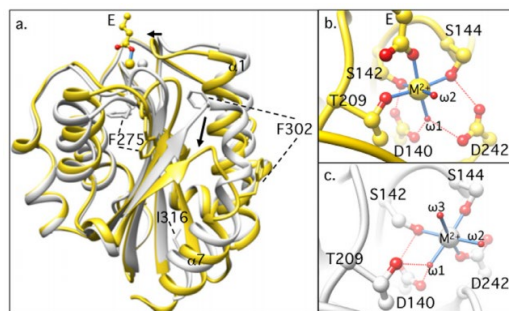


Abbildung 12. α -I-Domäne von Mac-1 und die MIDAS-Stelle (nach Arnaout, 2016).

α -I-Domänenkonformation ändern sich nach der Bindung an metallionenabhängige Adhäsionsstelle (MIDAS) von Mg^{2+} . Banddiagramme zeigen die überlagerten Strukturen der inaktiven (grau) und aktiven (gelb) α -I-Domäne der $\beta 2$ -Integrin Mac-1. Wichtige Konformationsunterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die beiden in inaktiver Form vergrabenen Phenylalaninreste (F275 und F302) sind im aktiven Zustand lösungsmittel exponiert. Ein Glutamat (E) aus dem Liganden ist im ligandengebundenen Zustand gezeigt, der das Kation an der MIDAS-Stelle Mg^{2+} ligiert (a). Das MIDAS-Motiv ist im ligandengebundenen (b) und inaktiven (c) Zustand gezeigt. Das Metallion bei MIDAS wird durch drei Aminosäurenreste der α -I-Domäne, zwei Wassermolekülen und ein Glutamat-Carbonylsauerstoff aus dem Liganden gebunden, was den oktaedrischen Koordinationszustand vervollständigt (b). Im inaktiven Zustand ersetzt ein Sauerstoffatom eines Wassermoleküls den Sauerstoff des Ligandes (c) (Arnaout, 2016).

Mit der Ligandenbindung sind zwei wichtigsten tertiären Veränderungen verbunden: Verschiebung der $\alpha 1$ N-terminalen Helix in die Richtung von MIDAS und Einwärtsbewegung der N-terminalen $\alpha 1$ -Helix in die Richtung der Zellmembran (Arnaout, 2016) (Abbildung 12).

Die β -Untereinheit der $\beta 2$ Integrine besteht aus acht flexiblen extrazellulären Domänen, die durch eine transmembrane α -Helix mit intrazellulärer Kette verbunden ist (Morgan et al., 2019). Extrazelluläre β -Kette besitzt eine β -Tail-Domäne, vier Cystein-reiche EGF-Module (Epidermal Growth Factor), eine Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI) -Domäne eine Hybriddomäne und eine zur α -I-Domäne homologe β -I-Domäne (Xiong et al., 2003). Die kleine PSI-Domäne ist durch einer α/β -Faltung gekennzeichnet, während die Hybriddomäne eine β -Sandwich-Konstruktion aufweist (Campbell & Humphries, 2011). I-ähnliche Domäne (β -I-Domäne) enthält, sowohl ein strukturell ähnliches zu α -I-Domäne Metallbindungsmotiv MIDAS, aber auch zwei weiteren Metallionenbindungsstellen (Humphries et al. 2003). An einer benachbarten Stelle zu MIDAS (ADMIDAS) wird ein Ca^{2+} -Ion verbunden, der diese Domäne im geschlossenen Zustand stabilisiert, indem $\alpha 1$ -Helise und F- $\alpha 7$ -Schleife durch Ca^{2+} verknüpft werden (Arnaout, 2016) (Abbildung 13). Die Brechung der ionischen Verbindung der $\alpha 1$ - und $\alpha 7$ -Helise kann durch Bewegung der $\alpha 1$ -Helise nach innen erfolgen, was Ligandenbindung oder Besetzung der MIDAS-Stelle hervorruft (Arnaout, 2016, Xiao et al., 2004). Des Weiteren wird die Ligandenbindungsaffinität der α -I-Domäne von der I-ähnliche Domäne allosterisch moduliert, indem die unveränderliche GLU-Rest der α -I-Domäne mit der MIDAS-Stelle an der aktivierten β -I-Domäne verbunden wird, was die Aktivierung des $\beta 2$ -Integrins ermöglicht (Zhang et al, 2012, Xie et al., 2010). Die Bindung von Ca^{2+} an die dritte Ionenbindungsstelle SYMBS der β -Untereinheit stabilisiert das Metallion bei MIDAS-Stelle (Rui et al., 2014). Komplexe strukturelle Umlagerungen steuern die Fähigkeit von Integrinen, Liganden zu binden und verschiedene nachgeschaltete Signalnetzwerke zu aktivieren, wodurch die Zelladhäsion und -dynamik moduliert werden (Fagerholm et al 2019, Lou et al., 2007).

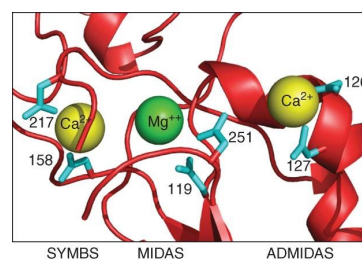


Abbildung 13. Drei Metallbindungsstellen der β -I-Domäne von $\beta 2$ -Integrinen am Beispiel von $\alpha X\beta 2$ (nach Campbell & Humphries, 2011).

β -I-Domäne enthält drei Metallionenbindungsstellen, wobei MIDAS im Zentrum liegt und von dem synergistischen Metall Ionenbindungsstelle (SYMBS) und angrenzend an MIDAS-ADMIDAS flankiert wird. Die Aspartatreste, die mit Metallionen verbunden sind, sind in Cyan gezeit (Campbell & Humphries, 2011).

Die zytoplasmatischen Domänen der α - und β -Untereinheit sind kurze Proteinketten, die weniger als 60 Aminosäuren beinhalten. Die spielen aber Schlüsselrolle bei der Verknüpfung

der Integrin mit dem Aktin-Zytoskelett und bei dem Inside-out-Signalübertragung von Zytoplasma zu Extrazellulärer Matrix (Brakebusch & Fässler, 2003). Die beiden zytoplasmatischen Domänen der Integrine enthalten in der Nähe des transmembranären Bereichs hochkonservierte Sequenzen. Bei allen α -Untereinheiten ist es das GFFKR-Motiv, bei der β -Untereinheit NPXY-Motiv, wobei X meistens für eine unpolare Aminosäure steht (Moser et al., 2009, Cox et al., 2010). Die Proteinsequenz GFFKR der α -Kette ist bei der Dimerisierung der Integrine im Endozytoplasmatischen Retikulum sowie bei der Stabilisierung der inaktiven Konformation des Rezeptors von entscheidender Bedeutung (Briesewitz et al., 1995). Die membran-distale Aminosäuresequenzen der β -Kette sind Bindungsstellen für große Anzahl von zytoplasmatischen Zytoskelett- und Signalproteinen. Zu den wichtigsten Adapterproteinen für die Integrinaktivierung gehört Kindlin und Talin (Sun et al., 2019). Diese Adapterproteine können Signaltransduktion modulieren, indem sie die Ligandenbindungsaffinität regulieren können und intrazelluläre Adapter-Moleküle, wie Integrin-gebundene Kinase (ILK) und fokale Adhäsionskinase (FAK) rekrutieren (Legate & Fässler, 2009). Kindlin und Talin sind essentiellere Co-Aktivatoren der β 2-Integrinen und binden über ihre FERM F3-Subdomäne mit dem NPXY-Motiv der β 2-Untereinheit (Fagerholm et al., 2019). Kindlin kommt in drei Isoformen vor, die unterschiedliche Bindungsaffinität zu β -Ketten der Integrinen aufweisen: Kindlin-3 zeigt die beste Bindungskapazität zu β 2-Integrinen, Kindlin-2 kann schwach an β 2-Untereinheiten binden, während Kindlin-1 ist nicht mit denen kompatibel (Rognoni et al., 2016). Von den beiden Isoformen der Talin, weist Talin1 bessere Bindung auf (MacPherson et al., 2013). Die Bindung der Talin oder Kindlin an die zytoplasmatische Kette von β -Integrin bewirkt eine Dissoziation der zytoplasmatischen Ketten und induziert eine Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne, einschließlich in der Ligandenbindungsseite der I-Domäne, was die Integrinaffinität erhöht (Danen et al., 2000-2013). Darüber hinaus kann die Tyrosinphosphorylierung im NPXY-Motiv einen Regulationsmodus für Integrin-Wechselwirkungen im zytoplasmatischen Region darstellen (Gupta et al., 2015).

1.2.2. Konformationszuständen und Aktivierung der β 2-Integrinen

Viele Integrine sind nicht konstitutiv aktiv. Sie werden auf Zelloberflächen exprimiert, existieren aber hauptsächlich in einer gebogenen Form, die einer „low-affinity“ Konformation entspricht und die Integrine in einem inaktiven Zustand hält (Xiong et al., 2003). Bei der inaktiven Konformation kommen beide, α - und β -Ketten näher zueinander, wobei der

Kopfmodul in die Richtung Zellmembran gebogen wird und die Affinität zu Liganden gering ist (Evans et al., 2009). Des Weiteren weist die inaktive Integrinkonformation Assoziation der C-Terminalen Beinen auf, was die Auswirkungen auf die zytoplasmatischen Domänen behindert. Erst die Konformationsänderungen, indem eine Streckung des Rezeptors und Trennung deren Beinen vorkommt, ermöglichen die Aktivierung des Rezeptors (Carman, 2003). Die Konformationsänderungen sind reversible Prozesse und können in beide Richtungen Signale übertragen, sogenannte Inside-Out- aber auch Outside-In-Signale (Hynes, 2002). Das Umschalten der Integrine zwischen den beiden Konformationszuständen kann intrazellulär und extrazellulär gesteuert werden und hängt von der Konzentration und Affinität extrazellulärer Liganden und der Aktivität intrazellulärer Faktoren ab (Hynes, 2002; Guanyuan Fu et al. 2012). Die Konformation der extrazellulären Domäne des Integrins und ihre Affinität zum Liganden werden dynamisch durch einen Prozess reguliert, der als Inside-Out-Signalisierung bezeichnet wird (Jianghai Zhu et al., 2008). Für die Übertragung des Inside-Out-Signals ist die Bindung der zytoplasmatischen Proteine an die intrazelluläre Domäne entscheidend. Die Bindung von zytoplasmatischen Proteinen an carboxyterminale Schwänze der α - und/oder β -Untereinheit verursacht die Trennung der zytoplasmatischen Domänen und trägt zu Konformationsänderungen bei (Gahmberg et al., 2009) (Abbildung 14).

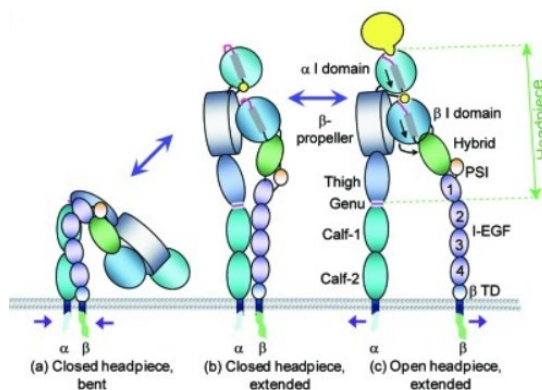


Abbildung 14. Konformationsänderungen der β 2-Integrinen (nach Zhang & Chen, 2012).

Es wird angenommen, dass Integrine in seiner gebogenen Form inaktiv sind und weisen eine geringe Affinität zu deren Liganden (links). Eine mittlere Affinität kann durch Begradigen des Integrins erreicht werden (in der Mitte) aber erst Ligandenbindung oder Auswirkungen auf die zytoplasmatischen Domänen führen zu einer Streckung und Trennung der Beinen, was Aktivierung und Signalübertragung hervorruft (rechts) (Gahmberg et al., 2009, Hynes et al., 2002)

Proteinbindung an zytoplasmatische Domäne ist ein wesentlicher Bestandteil des Aktivierungsprozesses, da diese Wechselwirkungen die erweiterte Integrin-Konformation stabilisieren und Verbindungen zum Zytoskelett herstellen und damit die Signalübertragung ermöglichen (Hynes et al., 2002). Ligandenbindung wandelt Signale von der extrazellulären

Domäne zum Zytoplasma um in einem Prozess, der Outside-In-Signalisierung bezeichnet wird (Guanyuan Fu et al., 2012). Die Bindung des extrazellulären Liganden an die erweiterte Form des Integrins löst eine Vielzahl von Signaltransduktion-Ereignissen aus, die das Zellverhalten wie Adhäsion, Proliferation, Überleben oder Apoptose, Form, Polarität, Motilität und Differenzierung modulieren, hauptsächlich durch Auswirkungen auf das Zytoskelett (Dinasarapu et al., 2013)

1.2.3. Liganden der β 2-Integrinen

β 2-Integrine charakterisieren sich mit unterschiedlicher Bindungskapazität der Liganden, die auf der Oberfläche anderer Zellen gefunden werden. Proteinliganden für α M β 2 (Mac-1) umfassen über 40 Moleküle, unter denen extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Laminin, Kollagen und Vitronectin, Blutgerinnungsproteine wie Fibrinogen, Faktor X und Kininogen und das Komplementkomponent iC3b, sowie Gegenrezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie wie ICAM-1 und ICAM-2, Fibrinogen, mikrobielle Lipopolysaccharide (LPS) oder Zymosan sind (Zhang, 1999; Tan, 2012; Bergelson et al., 1995). Viele Proteine der Mac-1-Liganden-Palette werden auch von dem CD11c/CD18 Integrin gebunden. Während das Integrin CD11a/CD18 ist nur für die Liganden der ICAM-Familie (die mit Mac-1 Liganden überlappen) und JAM-1 spezialisiert. Die Liganden von CD11d/CD18 schließen nur ICAM-3 und VCAM-1, die keine Affinität zur α M β 2-Integrin haben (Fagerholm et al., 2019) (Abbildung 15).

Integrin	Other names	Expression	Ligands
α L β 2	CD11a/CD18 or LFA-1	All leucocytes	ICAM-1 [89], ICAM-2 [327], ICAM-3 [91], ICAM-4 [328], ICAM-5 [329] and JAM-1 [93].
α M β 2	CD11b/CD18, Mac-1, CR3 or Mo1	Monocytes, macrophages, NK cells, neutrophils and $\gamma\delta$ T-cells	iC3b [330], fibrinogen [331] and ICAM-1 [332], ICAM-2 [332] and ICAM-4 [328], JAM-3 [130], Factor X [333], heparin [334], neutrophil inhibitory factor [335], MBP [169], high-molecular-mass kininogen [336], microbial saccharides e.g. LPS [337], plasminogen [338], fibronectin [339], laminin [339], collagen II and VI [340], collagen I [341], tissue growth factor [342], RAGE [343], cysteine-rich 61 [342], connective denatured proteins [131], uPAR [147] and more.
α X β 2	CD11c/CD18, p150,95 or CR4	Monocytes, macrophages, dendritic cells and NK cells	Shares many ligands with α M β 2, including iC3b [344], fibrinogen [345], ICAM-1 [346], ICAM-4 [347], LPS [348], collagen I [349], heparin [350], denatured proteins [131]. α X β 2 is also a receptor for osteopontin [351].
α D β 2	CD11d/CD18	Macrophages and eosinophils	ICAM-3 [179] and VCAM-1 [184].

Abbildung 15. Liganden der β 2-Integrinen (nach Tan, 2012).

1.2.4. Funktion des Integrins Mac-1

Die Ligandenbindung durch Mac-1 löst eine Vielzahl von Leukozytenreaktionen aus (Abbildung 16). Dieses komplexe Adhäsionsmolekül ist der Hauptrezeptor für die Zelladhäsion, die die Migration und Aktivierung von Leukozyten im Immunsystem vermittelt (Phillipson et al 2006). Das $\alpha M\beta 2$ -Integrin ist sowohl an der Leukozytenadhäsion an Endothel als auch an der Internalisierung opsonierter Mikroorganismen beteiligt (Hogg et al., 1999). Dieser Komplementrezeptor-3 (CR3) vermittelt durch die Bindung an iC3b die Phagozytose komplementopsonierter Körper, wie Krankheitserreger aber auch Immunkomplexe und apoptotische Zellen (Shutong Xu et al., 2017). Des Weiteren ist Mac-1 in den zytotoxischen PMN-Funktionen beteiligt, wie Phagozytose, Degranulation und ROS-Produktion (Coxon et al., 1996, Lu et al., 1997). Mac-1 spielt auch eine Rolle bei Toleranz-Induktion durch die Einschränkung der Th17-Zelldifferenzierung (Ehriouchi et al., 2007) sowie in Desensibilisierung der Makrophagen, indem Mac-1 die TLR-Signalisierung (Toll-like Rezeptor) einschränkt (Yee et al., 2013).

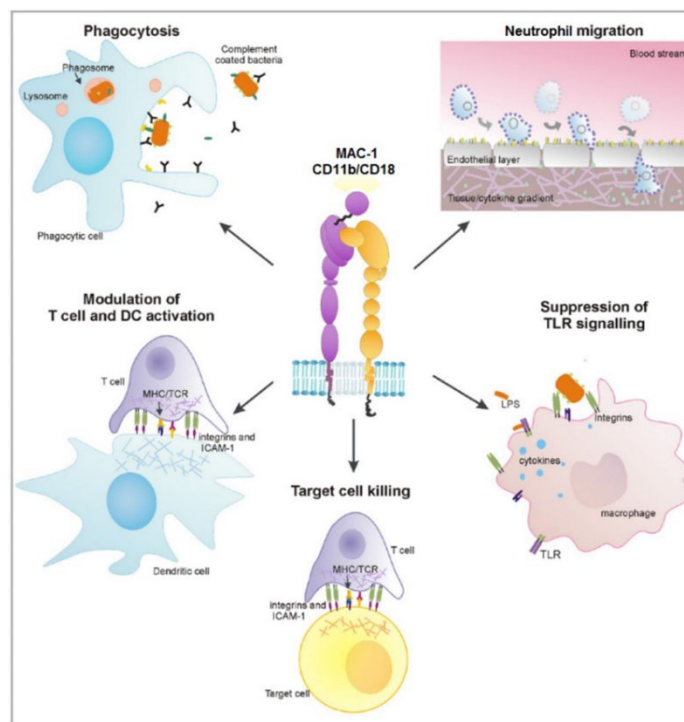


Abbildung 16. Mac-1 (nach MacPherson et al., 2013)

Des Weiteren zeigten Varga et al., 2007, dass durch die Mg^{2+} -Ionen aktivierter Mac-1 die APC-induzierte T-Zell-Aktivierung hemmen kann, während Neelamegham et al., 1998, über die entscheidende Bedeutung Mac-1 für die Fc-Rezeptor-vermittelte immunologische

Synapsenbildung zwischen PMN mit Tumor-Zellen berichteten. Zusätzlich Graf et al. zeigten anderes $\beta 2$ -Integrin – LFA-1 – als essentielles Molekül bei dem Aufbau der Immunsynapse zwischen DC und T Zellen an. Wichtige Teilnahme des Integrins LFA-1 in der DC-T-Zell-Synapsebindung und die enorme Komplexität der Wechselwirkungen von Mac-1 wurden Inspiration für die Untersuchung der Rolle von $\alpha M\beta 2$ -Integrin bei der T-Zell Aktivierung.

1.2.4.1. Mac-1-abhängige Leukozytenmigration

Die Leukozytenmigration ist ein lebenswichtiger physiologischer Prozess, der sowohl während der adaptiven als auch der angeborenen Immunantwort, sowie während der routinemäßigen Immunüberwachung auftritt. $\beta 2$ -Integrine sind bei der Rekrutierung von Immunzellen an Entzündungs- oder Gewebeschädigungsstellen von entscheidender Bedeutung (Wittchen et al., 2009). Durch die Bindung der $\beta 2$ -Integrine an Proteine der ECM und Oberflächenrezeptoren wird die Haftung einer Zelle am Endothel und Extravasieren der Blutgefäße ermöglicht (Bednarczyk et al., 2020).

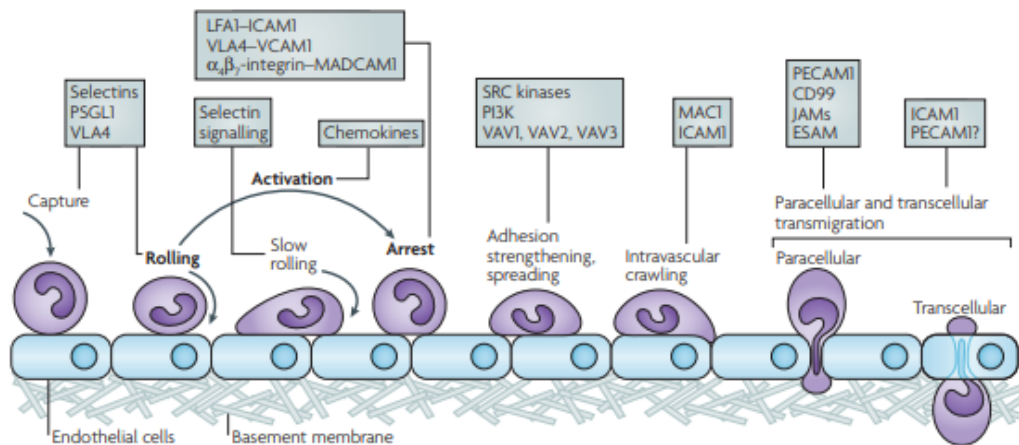


Abbildung 17. Adhäsionskaskade der Leukozyten (nach Ley et al., 2007).

Adhäsionskaskade der Leukozyten beginnt das Rollen von Leukozyten entlang des Endothels, das abhängig von der Bindung von Selektinen an ihre Liganden ist (Vestweber, 2007). P- und E-Selektine, die wichtigsten Selektine das Endothel sind, interagieren mit P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1). Die Exposition gegenüber Chemokinen, wie Interleukin-8, MCP-1, SDF-1 kann über ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Aktivierung von Leukozyten und deren Integrine induzieren. Für die Leukozytenrekrutierung sind Integrine VLA-4, $\alpha 4\beta 7$ sowie LFA-1 (der $\beta 2$ -Integrinfamilie), die mit ihren Gegenliganden binden können: VCAM-1, MADCAM1 oder ICAM-1 und ICAM-2. Stabile Leukozyten-Endothel-Adhäsion wird über die Signalwege des Vav-Familienmitglieders oder Kinasen der SRC-Familie moduliert. Ligation von Mac-1 und ICAM ermöglicht die transendotheliale Migration durch venuläre Wände (Chavakis, 2012). Verschiedene adhäsive Ereignisse sind im Verlauf der transendothelialen Migration beteiligt, die Interaktion von LFA-1 und Mac-1 und JAM-Familie, und Wechselwirkungen von CD99 sowie PECAM-1 umfasst (Phillipson et al., Schenkel et al., 2004, 2006, Bixel et al., 2010).

Es wurde Adhäsionskaskade der Leukozyten vorgeschlagen, die ein langsames Rollen, Adhäsionsverstärkung, intraluminales Kriechen, parazellulär oder transzelluläre Migration und

Migration durch die Basalmembran umfasst (Ley et al., 2007) (Abbildung 17). Von besonderer Bedeutung bei der Rekrutierung und Auswanderung von Leukozyten sind die Wechselwirkungen von LFA-1 und Mac-1 mit ICAMs (Sumagin et al., 2010). Während LFA-1 an die D1-Domäne von ICAM-1 bindet, erkennt Mac-1 die ICAM-1-D3-Domäne (Frick et al. 2005). LFA-1 spielt eine dominante Rolle gegenüber Mac-1 bei der Vermittlung der festen Adhäsion von Leukozyten an das Endothel während Mac-1 interagiert mit ICAM-1, um das intraluminale Kriechen nach Leukozytenstillstand zu vermitteln (Hyun et al., 2009).

ICAM-Mac-1-Ligation ruft ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} hervor und aktiviert p38 Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) und RAS-Homolog (RHO) GTPase, die gemeinsam die Kinase der leichten Kette von Myosin aktivieren können, was zu einer verstärkten Kontraktion der Endothelzellen führt und daher die Öffnung der interendothelialen Kontakte moduliert (Ley et al., 2007). Leukozyten-Extravasation erfolgt grundsätzlich durch interendotheliale Übergänge über den parazellulären Weg (Luscinskas et al., 2002). Jedoch morphologische Studien haben gezeigt, dass die Migration von Leukozyten auch durch einzelne Endothelzellen möglich ist (Wittchen et al., 2009). Obwohl es keinen spezifischen molekularen Beweis für einen transzellulären Weg der Leukozytenmigration durch das Endothel gibt, es wird spekuliert, dass dieselben Moleküle, die für die intraendothelialen Migration erforderlichen sind, die transzelluläre Signale auslösen können (Engelhardt et al., 2004).

1.2.4.2. *Mac-1 abhängige Leukozyten-Phagozytose*

Die Phagozytose ist ein aktiver Rezeptor-vermittelter Prozess, bei dem eine Zelle einen Zielorganismus oder ein Partikel internalisiert. Mithilfe von Umlagerungen des Zytoskeletts dehnt sich die Plasmamembran eines Phagozyten um sein Ziel aus und leitet einen Prozess ein, der schließlich eine membrangebundene Vakuole namens Phagosom erzeugt (Nordenfelt et al., 2011). Die Phagozytose umfasst die Aufnahme und Entsorgung von Partikeln in aufeinanderfolgenden Schritten, einschließlich Partikelerkennung, Umbau des Zytoskeletts, Membranvorsprung, Partikelverschlingung und phagolysosomaler Verdauung (Tores-Gomez et al.).

Integrin $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ ist ein gut etablierter Rezeptor für Phagozyten und hat eine wesentliche Rolle in der Aufnahme von iC3b-komplementopsonisierten Mikroorganismen sowie von Immunkomplexen und Apoptotischen Zellen (ACs) aber auch in der Fc-Rezeptor-vermittelte Partikelaufnahme (Shutong et al. 2017; van Spriel, 2001). Die durch das $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrin

auftretende Phagozytose wird nicht konstitutiv durchgeführt, sondern erfordert extrazelluläre stimulierende Signale, wie Chemokine, Zytokine und Bakterienprodukte (Aderem & Underhill, 1999). Ligandenbindung an extrazelluläre Domänen aktivierter Integrine stimuliert Signalwege von außen nach innen, indem viele strukturelle Bestandteile, wie Vinculin, Paxillin und Actin rekrutiert werden und die Signalwege aktivieren (wie p130Cas, FAK- und Rho-GTPasen), was zur Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts und zur Bildung von Adhäsionsstrukturen führt (Dupuy & Caron, 2008) (Abbildung 18).

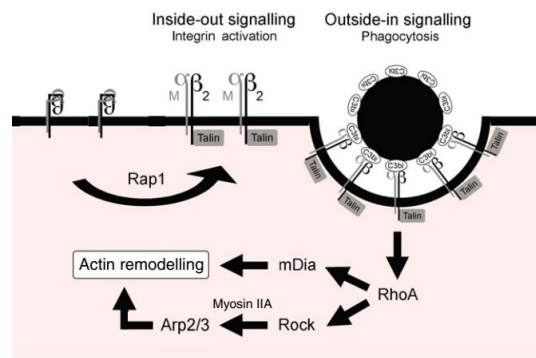


Abbildung 18. Die $\alpha M\beta 2$ -abhängige Phagozytose von $C3bi$ -oponierter Partikel (nach Dupuy & Caron 2008).

Die kleine GTPase Rap1 wurde als Hauptregulator der $\alpha M\beta 2$ -Aktivität bezeichnet (Torres-Gomez et al., 2020). Rap1 ist ein Mediator für die Signalübertragung von innen nach außen und Aktivierung der phagozytischen Eigenschaften. Rap1 wird stromabwärts von Oberflächenrezeptoren aktiviert. Die $\alpha M\beta 2$ -abhängige Phagozytose wird durch RhoA vermittelt, indem RhoA die Aktin-Dynamik moduliert (Dupuy & Caron, 2008). Für die Phagozytose sind zwei spezifische RhoA-Effektoren erforderlich – die Formin-bezogene Verlängerung Faktor mDia und die Serin/Threonin-Kinase Rock, die mit der Aktin-verwandten Protein Arp2/3 kooperiert (Colucci-Guyon et al., 2005, Olazabal et al., 2002, Jaumouille et al., 2019).

Externe Stimuli induzieren einen Inside-Out-Signalweg, der das kleine GTP-bindende Protein Rap1 aktiviert. Dies induziert Strukturänderungen in $\alpha M\beta 2$ und führt zu einer erhöhten Affinität für seine Liganden wie z.B. das iC3b-Komplementfragment auf opsonierten Pathogenen (Medraño-Fernandez et al., 2013). Die Bindung eines iC3b-opsonierten Partikels durch Mac-1/CR3 löst Prozesse aus, die das Partikel innerhalb der Zelle entlang eines Rho-abhängigen Aktinpolymerisationsweges bewegen, an dem Rock und mDia beteiligt sind (Mao & Finnemann, 2015). Des Weiteren haben Jaumouille et al., 2019, gezeigt, dass die Partikelaufnahme durch mechanische Kopplung von Integrinen an das Aktin-Zytoskelett durch Talin verstärkt wird. Es wurde auch gezeigt, dass die Bindung von $C3bi$ -opsonierten Partikeln und deren Phagozytose durch Fc-Rezeptor-abgeleitete Signale Mac-1 aktivieren können. Die Aktivierung von Mac-1 durch Fc-Rezeptoren erfordert die Tyrosinkinase Src

(Phosphatidylinositol-3-Kinase) und Phospholipase C unter Freisetzung von Diacylglycerin und Stimulation der Proteinkinase C (Jongstra-Bilen et al., 2003).

Obwohl Phagozytose über Mac-1-Rezeptor am effizientesten ist, wenn die Zielpartikel mit C3bi-Komplement beschichtet sind, haben in-vitro-Studien gezeigt, dass selbst FcR- und Mac-1-Wechselwirkungen ausreichen, um eine effiziente Phagozytose zu induzieren (Graham et al., 1989).

Mac-1 kann die Phagozytose von Mikroben beeinflussen, durch die Bindungsaffinität zu den Pathogensubstrate (Diamond et al., 1995). Die meisten Pathogensubstrate binden am N-Terminus der I-Domäne der CD11b-Untereinheit, aber einige binden an anderen Stellen, wie einer Lectin-ähnlichen Bindungsdomäne, die sich am C-Terminus der I-Domäne befindet und bestimmte Kohlenhydrate einschließlich (1,3) - β -Glucan erkennen kann (Xia et al., 2002). Des Weiteren kann Mac-1 die Phagozytose durch die Modulation von Signalwegen beeinflussen, die an der Genexpression und der Umlagerung des Zytoskeletts beteiligt sind. Mac-1 kooperiert auch funktional mit anderen Oberflächenrezeptoren, einschließlich TNF-Rezeptoren, Fc γ -Rezeptoren, Toll-like Rezeptoren 2 (TLR2) und CD14 (LPS-Rezeptor) (Kebir & Filep, 2013). Mac-1 ist außerdem an der Bildung von Transmembransignalkomplexen mit GPI-verankerten Glykoproteinen wie CD16b (Fc γ RIIIb) beteiligt (Xia et al., 2002).

2. Ergebnisse

2.1. Bedeutung von Mac-1 für die T-Zell-stimulatorische Eigenschaften verschiedener DC-Populationen

Mac-1 ist wichtig, um verschiedene Funktionen von Leukozyten, einschließlich Motilität und Transmigration in entzündetes Gewebe zu vermitteln und ist in die T-Zell-Aktivierung während der Antigenpräsentation involviert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des β 2-Integrins Mac-1 für die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-stimulatorische Kapazität von DCs unterschiedlichen Ursprungs untersucht. Dabei wurden frisch isolierte DCs aus dem Knochenmark und aus der Milz sowie BMDCs, die aus Knochenmarks-Vorläuferzellen unter GM-CSF ausdifferenziert wurden, untersucht. Zu diesem Zweck wurden DCs von WT- und $CD11b^{-/-}$ -Mäusen mit OT-I- beziehungsweise OT-II-T-Zellen in T-Zell-Proliferationsassays eingesetzt. Für jedes Experiment wurden DCs mittels anti- $CD11c$ -MicroBeads (Miltenyi Biotec) über positive Selektion isoliert. Aus OT-I oder OT-II-Mäusen wurden entsprechend die $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen mittels anti- $CD4$ - beziehungsweise anti- $CD8$ -MicroBeads (Miltenyi Biotec) über positive Selektion aufgereinigt. Alle DC-Populationen wurden mit OVA-Peptid beladen und in Parallelkulturen mit LPS stimuliert. Im Hinblick auf die OVA-Epitop-Spezifität der OT-I- und OT-II- T-Zellen wurde die Stimulierung der $CD8^+$ T-Zellen durch $OVA_{257-264}$ (SIINFEKL) beladene DCs getestet und für die $CD4^+$ T-Zell-Aktivierung wurden $OVA_{323-339}$ beladene DC verwendet. Die DC wurden seriell verdünnt. Die T-Zell-Proliferation-Quantifizierung wurde entweder mit der Hilfe des [3H]-Thymidin-Einbau-Assays oder von CFSE-Proliferationsassay durchgeführt. Parallel wurden DCs und T-Zellen mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.1.1. $CD11b^{-/-}$ -Milz-DC weisen eine verminderte Kapazität zur Stimulation syngener antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen auf

Für den $CD8^+$ T-Zellen-Proliferationsassay wurden die Milz-DC aufgereinigt und auf Aktivierungsmarker-Expression untersucht. Nahezu alle der unstimulierten wie auch der stimulierten DC beider Mausstämme exprimierten MHCII. $CD86^+$ wurde hingegen Genotyp-unabhängig nur von etwa 50-70% der unstimulierten DC exprimierten. Nach der LPS-Stimulierung stieg der Prozentsatz der $CD86^+$ Zellen jeweils auf rund 95% an (Abbildung 19).

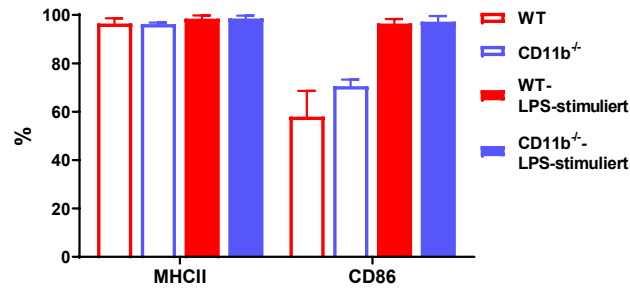


Abbildung 19. Die Marker Expression von CD11b^{-/-}-Milz-DC bleibt unverändert.

Differentiell vorbehandelte Milz-DCs von WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen wurden für die durchflusszytometrische Analyse der Marker CD11c-PE-Cy7, MHCII-APC und CD86-PE gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von BD FACSDiva™ Software. Die Ergebnisse zeigen die Frequenz an MHCII bzw. CD86 exprimierenden CD11c⁺ DC und sind als Mittelwert ± SD (n=2) dargestellt.

Um die Rolle von CD11b für die antigen-spezifische CD8⁺ T-Zell-Aktivierungsfähigkeit der DC zu untersuchen, wurden CD8⁺ T-Zellen von OT-I Mäusen mit DCs aus der Milz von WT- beziehungsweise CD11b^{-/-}-Mäusen stimuliert. Die DCs wurden vorher mit OVA-Peptid beladen und in Parallelansätzen mit LPS stimuliert, am Folgetag gewaschen und schließlich in den CD8⁺ T-Zell-Proliferationsassay in 96-Napf-Platten eingesetzt. Für die letzten 16 h der Kokultur wurden die Zellen mit 0,25 µCi [³H]-Thymidin pro Napf gepulst. Die CD8⁺-T-Zell-Stimulierungsaktivität der WT- und CD11b^{-/-}-DC wurde über den [³H]-Thymidin-Einbau (cpm) gemessen (Abbildung 20).

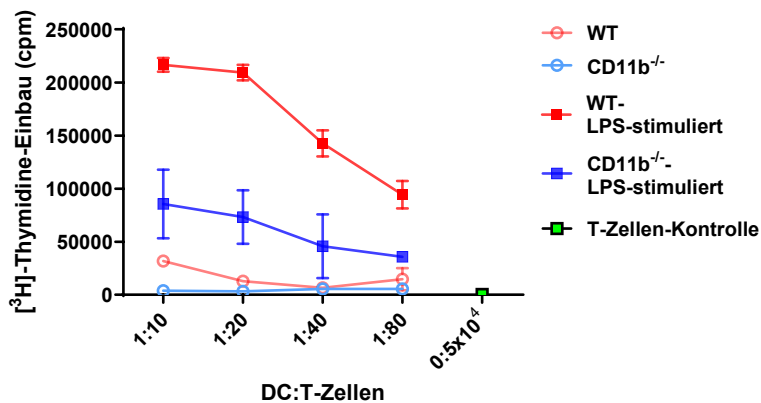


Abbildung 20. Die antigen-spezifische CD8⁺ T-Zell-Aktivierung durch CD11b^{-/-}-Milz-DC ist wahrscheinlich reduziert.

Die T-Zell-stimulatorische Aktivität von CD11b^{-/-}-Milz-DCs wurde durch die Quantifizierung der CD8⁺ T-Zell-Proliferation analysiert. CD11b^{-/-}-Milz-DCs wurden drei Stunden lang mit 100 ng/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL)-Peptid beladen und dann in Parallelansätzen über Nacht mit 100 ng/ml LPS stimuliert. In 96-Napf-Platten wurden in seriellen Verdünnungen unstimulierte und stimulierte DCs (0,625x10³-5x10³/Welle) in Triplikaten ausgesät. CD8⁺ T-Zellen (5x10⁴/Napf) wurden zugegeben und die Ansätze bei 37 °C für 96 h kultiviert. Für die letzten 16 Stunden wurden die Zellen mit 0,25 µCi [³H]-Thymidin pro Napf gepulst. Die Messung erfolgte mittels Beta-Zähler. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD (n=2) ausgedrückt.

Die unstimulierten WT-DC zeigten nur eine geringe Fähigkeit die CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren, wobei die CD11b^{-/-}-DC keine CD8⁺ T-Zell-Proliferation vermitteln. Die LPS-Stimulierung induzierte eine starke CD8⁺ T-Zell-Aktivierungskapazität der WT-DC, während die DC aus der Milz von CD11b^{-/-}-Mäusen eine im Vergleich dazu geringere CD8⁺ T-Zell-stimulatorische Fähigkeit aufwiesen.

2.1.2. CD11b^{-/-}-Knochenmark-DC zeigen eine verminderte Kapazität zur Stimulierung syngener antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen

Als nächstes wurde die CD8⁺ T-Zellstimulatorische Eigenschaft frisch isolierter Knochenmark-DCs beider Genotypen geprüft. Bei der Aktivierungsmarker-Expressionsmessung wurden keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen beobachtet (Abbildung 21).

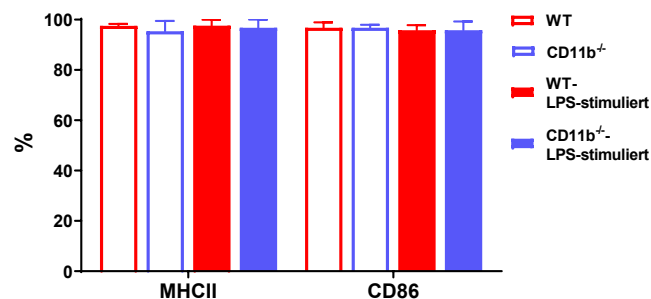


Abbildung 21. Die Marker Expression von CD11b^{-/-}-Knochenmark-DC bleibt unverändert.

Differentiell vorbehandelte Knochenmark-DCs von WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen wurden für die durchflusszytometrische Analyse der Marker CD11c-PE-Cy7, MHCII-APC und CD86-PE gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von BD FACSDiva™ Software. Die Ergebnisse zeigen die Frequenz an MHCII bzw. CD86 exprimierenden CD11c⁺ DC und sind als Mittelwert ± SD (n=2) dargestellt.

Unstimulierte Knochenmark-DCs beider Mausstämme zeigten keine CD8⁺ T-Zell-Aktivierungskapazität. Infolge der LPS-Stimulierung zeigte die CD11c⁺ Fraktion des Knochenmarks von WT-Mäusen ähnlich wie WT-Milz-DCs eine starke CD8⁺ T-Zell-Aktivierungskapazität. Im Vergleich dazu wiesen die CD11b^{-/-}-Knochenmark-DC eine geringere Potenz auf, CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren, ähnlich wie die CD11b^{-/-}-Milz-DC (Abbildung 22).

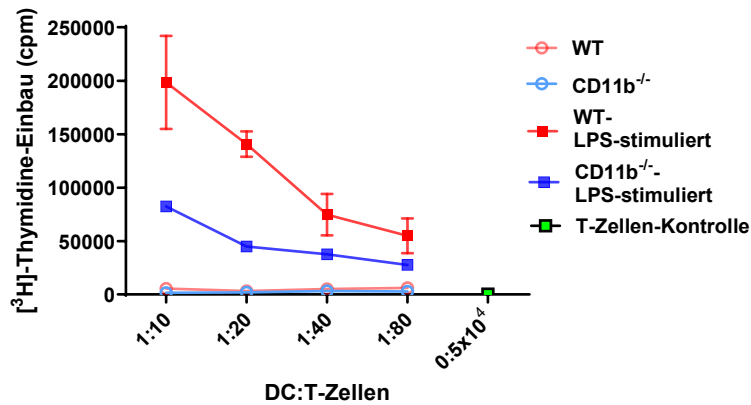


Abbildung 22. Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zell-Aktivierung durch die CD11b^{-/-}-dendritischen Reservezellen des Knochenmarks ist geschwächt.

Die T-Zell-stimulatorische Aktivität von CD11b^{-/-}-Knochenmark-DCs wurde durch die Quantifizierung der CD8⁺ T-Zell-Proliferation analysiert. CD11b^{-/-}-Knochenmark-DCs wurden drei Stunden lang mit 100 ng/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL)-Peptid beladen und dann in Parallelansätzen über Nacht mit 100 ng/ml LPS stimuliert. In 96-Napf-Platten wurden in seriellen Verdünnungen unstimulierte und stimulierte DCs ($0,625 \times 10^3$ – 5×10^3 /Welle) in Triplikaten ausgesät. CD8⁺ T-Zellen (5×10^4 /Napf) wurden zugegeben und die Ansätze bei 37 °C für 96 h kultiviert. Für die letzten 16 Stunden wurden die Zellen mit 0,25 µCi [³H]-Thymidin pro Napf gepulst. Die Messung erfolgte mittels Beta-Zähler. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD (n=2) ausgedrückt.

2.1.3. CD11b^{-/-}- BMDC weisen keine Signifikante Unterschiede in der Aktivierungseigenschaften der syngenene antigenspezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen auf

Anschließend wurden die T-Zell-Aktivierungseigenschaften von CD11b^{-/-}-BMDCs untersucht. Für die Generierung der BMDCs wurden erythrozytenfreie Knochenmarkszellen in GM-CSF-haltigem Medium für 7 Tage kultiviert. Am Tag 6 der Kultur fand die OVA-Peptid-Beladung und die LPS-Stimulierung von Aliquoten statt. Im Gegensatz zu primären DC aus Knochenmark und Milz, die keine signifikante Genotyp-bedingten Unterschiede in der Expression von MHCII und CD86 auf der DC-Oberfläche zeigten, zeigten GM-CSF-differenzierte BMDC im Falle einer CD11b-Defizienz eine geringere Expression an MHCII und CD86, sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach einer LPS-Stimulierung (Abbildung 23).

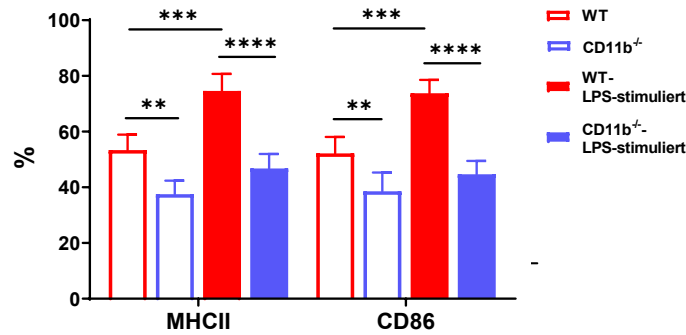


Abbildung 23. Die Stimulierungsabhängige Expression von MHCII und CD86 auf BMDC wird durch die Abwesenheit von Mac-1 gehemmt.

Differentiell vorbehandelte BMDC von WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen wurden für die durchflusszytometrische Analyse der Marker CD11c-PE-Cy7, MHCII-APC und CD86-PE gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von BD FACSDiva™ Software. Die Ergebnisse zeigen die Frequenz an MHCII bzw. CD86 exprimierenden CD11c⁺ DC und sind als Mittelwert ± SD (n=4) dargestellt; statistisch signifikante Unterschiede werden als **p≤0,005, ***p≤0,001 und ****p≤0,0001 bezeichnet.

Die Analyse der CD8⁺ T-Zell-Stimulierungskapazität der BMDC zeigten nur tendenziell erniedrigte Fähigkeit der CD11b^{-/-}-BMDC die CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren im Vergleich zu WT-BMDC. Die LPS-stimulierte BMDC beider Mausstämmen charakterisierte erhöhte und Genotyp-unabhängige CD8⁺ T-Zell-Stimulierungskapazität im Vergleich zu unstimulierten BMDC. Die CD8⁺-T-Zell-Stimulierungsaktivität der WT- und CD11b^{-/-}-DC wurde über den [³H]-Thymidin-Einbau (cpm) gemessen (Abbildung 24).

Zusätzlich wurde die CD4⁺ T-Zell-Stimulierungskapazität der BMDC untersucht. Für diese Analyse wurden die CD4⁺ T-Zellen mit dem Fluoreszenzmarker CFSE markiert. Basierend auf der Tatsache, dass sich der zelluläre CFSE-Gehalt bei der Zellteilung halbiert, wurde die BMDC-induzierte Proliferation der CFSE-markierten OVA-spezifischen T-Zellen über die Abnahme des CFSE-Signals in der durchflusszytometrischen Analyse quantifiziert. Die durchflusszytometrische Analyse der CD4⁺ T-Zellen zeigte auch eine gleiche Anzahl an T-Zell-Teilungen infolge der BMDC-Stimulierung beider Genotypen (Ergänzung 1). Sowohl die WT- als auch die CD11b^{-/-}-BMDC aktivierten naive CD4⁺ T-Zellen (OT-II). Infolge der LPS-Stimulierung nahm die CD4⁺ T-Zell-Proliferation, ähnlich wie im Falle der CD8⁺ T-Zellen, moderat zu. Es wurden dabei tendenzielle Genotyp-abhängige Unterschiede beobachtet (Abbildung 25).

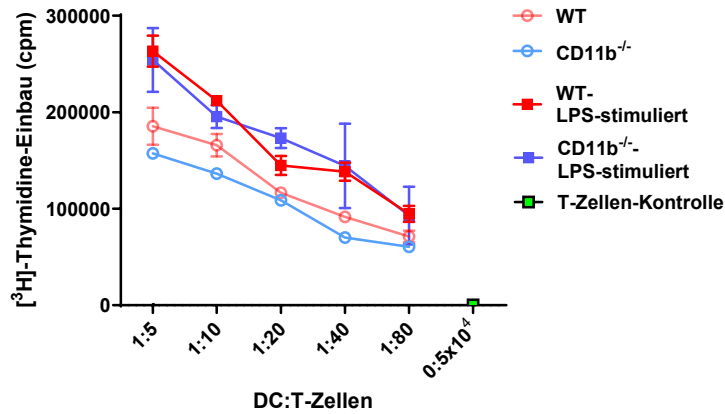


Abbildung 24. CD11b^{-/-}-BMDC zeigen tendenziell erniedrigte Fähigkeit, naive CD8⁺ T-Zellen (OT-I) zu aktivieren.

Die T-Zell-stimulatorische Aktivität von CD11b^{-/-}-BMDCs wurde durch die Quantifizierung der CD8⁺ T-Zell-Proliferation analysiert. CD11b^{-/-}-BMDCs wurden drei Stunden lang mit 100 ng/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL)-Peptid beladen und dann in Parallelansätzen über Nacht mit 100 ng/ml LPS stimuliert. In 96-Napf-Platten wurden in seriellen Verdünnungen unstimulierte und stimulierte DCs (0,625x10³-2x10⁴/Napf) in Triplikaten ausgesät. CD8⁺ T-Zellen (5 x 10⁴/Napf) wurden zugegeben und die Ansätze bei 37 °C für 96 h kultiviert. Für die letzten 16 Stunden wurden die Zellen mit 0,25 µCi [³H]-Thymidin pro Napf gepulst. Die Messung erfolgte mittels Beta-Zähler. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD (n=2) ausgedrückt.

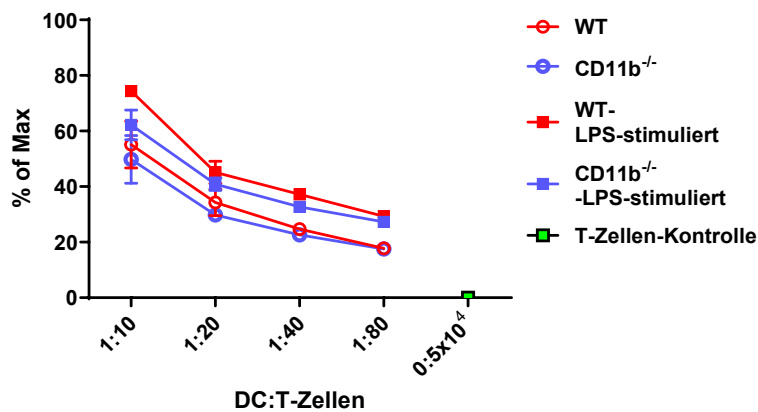


Abbildung 25. CD11b^{-/-}-BMDC zeigen tendenziell erniedrigte Fähigkeit naive CD4⁺ T-Zellen (OT-II) zu aktivieren.

Die T-Zell-stimulatorische Aktivität von CD11b^{-/-}-BMDCs wurde durch die Quantifizierung der CD4⁺ T-Zell-Proliferation analysiert. CD11b^{-/-}-BMDCs wurden drei Stunden lang mit 100 ng/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen und dann in Parallelansätzen über Nacht mit 100 ng/ml LPS stimuliert. In 96-Napf-Platten wurden in seriellen Verdünnungen unstimulierte und stimulierte DCs (0,625x10³-5x10³/Napf) in Triplikaten ausgesät. CD4⁺ T-Zellen (5 x 10⁴/Napf) wurden zugegeben und die Ansätze bei 37 °C für 96 h kultiviert. Für die letzten 16 Stunden wurden die Zellen mit 15 µM CFSE gefärbt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturen mit anti-CD4-Pacyfic blue gefärbt. Anschließend wurden die Kulturen durchflusszytometrisch analysiert, CFSE-Fluoreszenzintensität wurde gemessen und somit die Proliferation der T-Zellen detektiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD (n=2) ausgedrückt.

2.2. Phänotypisierung der Knochenmarkszellen von CD11b^{-/-}-Mäusen

2.2.1. CD11b^{-/-}-KM-Zellen exprimieren tatsächlich kein CD11b und drücken verminderte CD18-Expression auf ihrer Zelloberfläche aus

Im Weiteren wurde die Expression von β 2-Integrinen auf den frisch isolierten Knochenmarkszellen analysiert. Die Beobachtung der Oberflächenexpression der verschiedenen α - (CD11a, CD11b, CD11c) und der gemeinsamen β - (CD18) Einheit der β 2-Integrine belegte eine geringere Dichte der CD18-Expression auf der CD11b^{-/-}-Zelloberfläche gegenüber WT-Zellen (Abbildung 26 A und B).

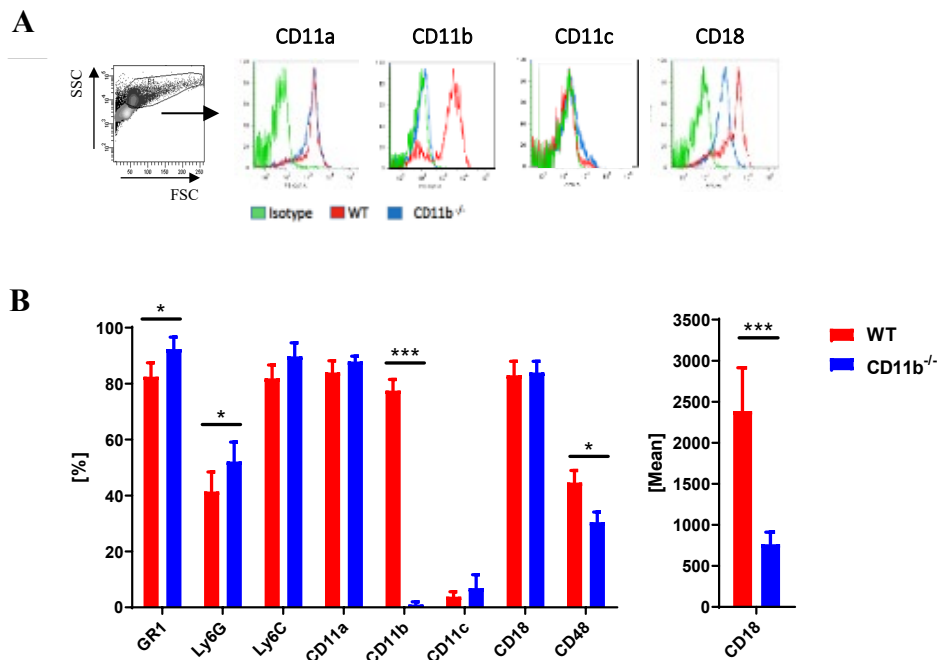


Abbildung 26. Oberflächenexpression von Differenzierungsmarkern und β 2-Integrinen auf den frisch isolierten Knochenmarkszellen.

Auf den frisch isolierten Knochenmarkszellen wurde die Expression der Differenzierungsmarker und der β 2-Integrinen mittels durchflusszytometrischer Methoden analysiert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von 3 Experimenten A) als Histogramme und B) als Prozentuale Anteil von P1 aus gesamter Knochenmark-Population; für CD18 zusätzlich MFI-Wert. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit SD dar (n=5). Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede werden als * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die P1-Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkszellen betrachtet.

Jedoch war der Anteil der CD18-exprimierenden Zellen Genotyp-unabhängig vergleichbar und lag bei 90% der P1-Fraktion (Ausschluss von Zelltrümmern) (Abbildung 27 B). Hingegen schien die LFA-1-Expression nicht betroffen zu sein: CD11a wurde auf über 95% sowohl der

WT- als auch der CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen detektiert. Das Histogramm (Abbildung 26A) weist auch auf ähnliche CD11a-Expression auf MFI-Ebene. Während das Integrin LFA-1 (CD11a/CD18) konstitutiv von Leukozyten exprimiert wird, wird CD11c/CD18 (p150,95) erst von differenzierten DC exprimiert. Die P1-Fraktion sowohl der WT- als auch CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen beinhalteten jeweils nur bis zu 5% an CD11c⁺DC (Abbildung 26).

Zusätzlich wurde der Einfluss von Mac-1 auf die Expression von CD115, CD68, CD62L, F4/80 und MHCII in frisch isolierten Knochenmarkszellen analysiert. Beim Vergleich der WT- und CD11b^{-/-}-P1-Fractionen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression dieser Moleküle gefunden (Abbildung 27).

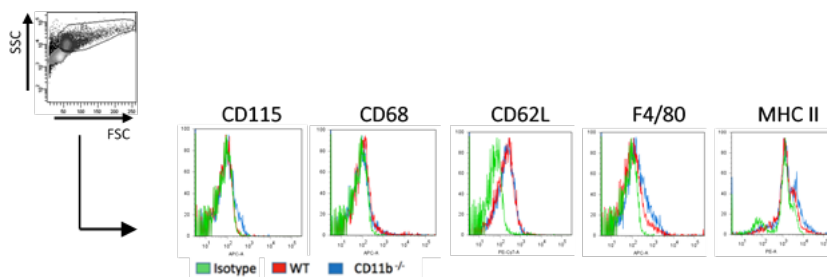


Abbildung 27. Expression verschiedener Oberflächenmarker auf den frisch isolierten Knochenmarkzellen.

Auf den frisch isolierten Knochenmarkzellen wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die repräsentativen Histogramme eines von 2 Experimenten.

2.2.2. Knochenmark von CD11b^{-/-}-Mäusen zeigt veränderte Anteile myeloider Zellfraktionen

Um die Zellzusammensetzung des Knochenmarks von CD11b^{-/-}-Mäusen zu beurteilen, wurden die frisch isolierte Knochenmarkzellen mit Hilfe der durchflusszytometrischen Methode analysiert. Die Histogramme zeigen auf größeren Anteil der Ly6C⁺ und Ly6G⁺ Zellen und verminderte Anzahl der CD48⁺ Zellen in den CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen im Vergleich zu WT-Gegenständen (Abbildung 28 A). Die Analyse der Differenzierungsmarker-Expression enthüllte eine verstärkte Granulozytopoese und eine verminderte Monozytopoese im Knochenmark der CD11b^{-/-}-Mäuse im Vergleich zum WT, was die Anzahl der Ly6G⁺CD48⁻-Granulozyten und Ly6C⁺Ly6G⁻-Monozyten in den Kulturen darstellt (Abbildung 28 B). Der durchschnittliche Anteil der WT-Knochenmarkzellen beträgt 46% der Ly6C^{low}Ly6G⁻CD48^{+/-} monozytären Zellen einschließlich 15% der Ly6C^{high}CD48⁺Ly6C⁻Ly6G⁻CD48⁺- monozytären Zellen. Bei den CD11b-defizienten Mäusen zählen die analoge Zellpopulation der P1-Fraktion dementsprechend 35% der Ly6C^{low}Ly6G⁻CD48^{+/-} monozytären Zellen einschließlich 16% der

Ly6C^{high} Monozyten, 52% der Ly6C^{low}Ly6G⁺CD48⁻ granulozytären Zellen und circa 7% der Ly6C⁻Ly6G⁻CD48⁺ Zellen (Abbildung 28 C).

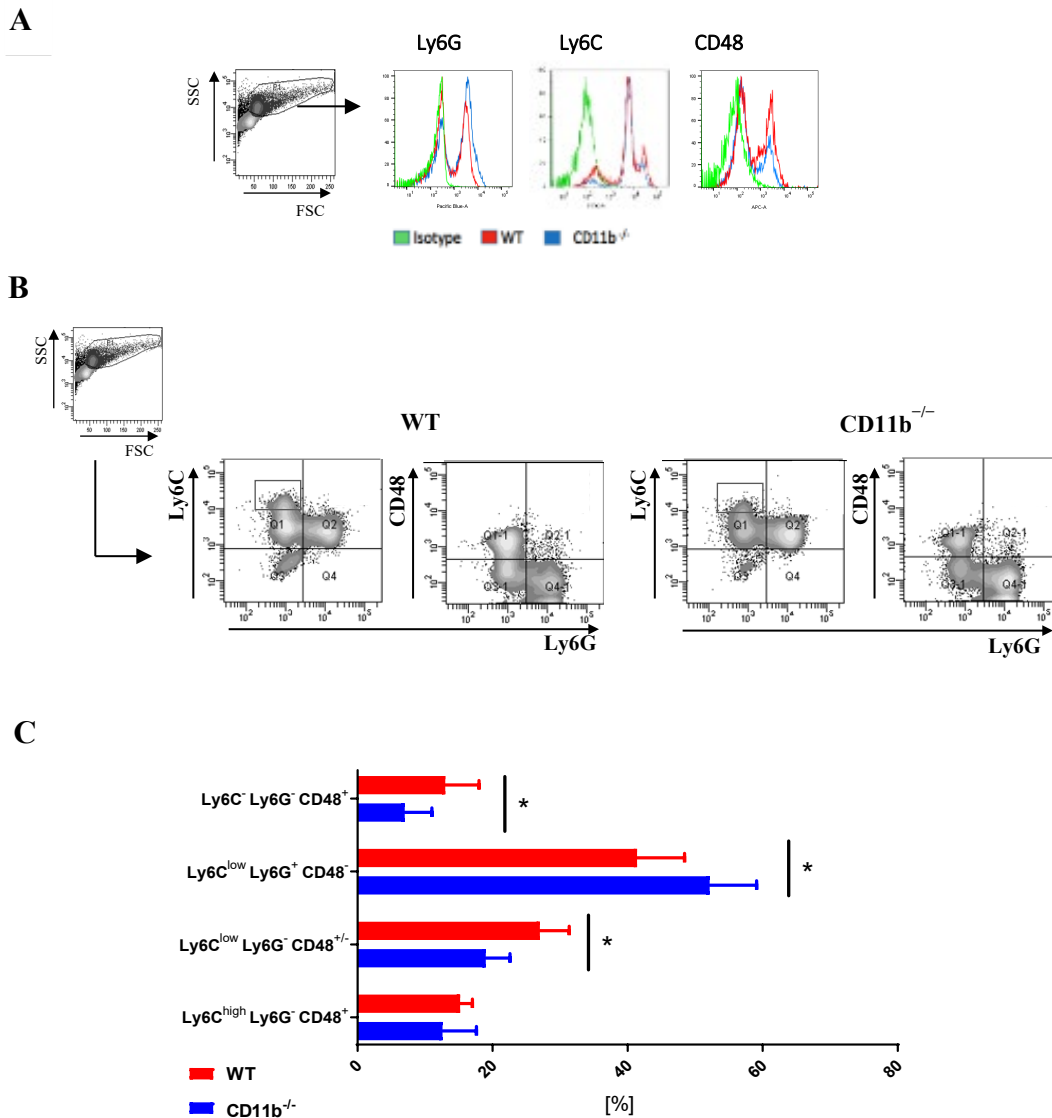


Abbildung 28. Durchflusszytometrische Analyse der CD11b^{-/-}-Knochenmark-Ausbeute weist einen höheren Anteil der granulozytopoetischen Zellen im Vergleich zu WT auf.

Die frisch isolierten Knochenmarkszellen wurden in Bezug auf Ly6G, Ly6C und CD48 Expression zur CD48^{+/-}Ly6G⁻Ly6C⁺ Monozyten sowie Ly6G⁺Ly6C⁺CD48⁻ Granulozyten zugewiesen. Ein kleiner Teil der CD48^{+/-}Ly6G⁻Ly6C⁺ Fraktion exprimiert Ly6C auf hohem Niveau. Der Rest der Zellen konstituieren Ly6C⁻Ly6G⁻CD48⁺ Zellen. (A) Dargestellte Histogramme repräsentieren eins von 5 Experimenten. (B) Dargestellt sind die repräsentativen Dot-plots aus 5 Versuchen. (C) Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit SD dar (n=5). Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede werden als *p<0,05 bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkszellen betrachtet.

2.3. Phänotypische Analyse der myeloiden KM-Zellen nach 3-tägiger GM-CSF-Induktion in vitro

2.3.1. GM-CSF-Stimulation erhöht die Dysbalance zwischen Granulozyten- und Monozyten-Zahl in Knochenmarkszellen von CD11b^{-/-}-Mäusen

Demnächst wurde die durchflusszytometrische Analyse der Differenzierungsmarker der WT- und CD11b^{-/-}-Knochenmarkszellen nach der 3-Tägigen GM-CSF-Kultur durchgeführt. Die Histogramme zeigen, ähnlich wie bei den frisch isolierten Knochenmarkszellen, auf größeren Anteil der Ly6G⁺ Zellen und verminderte Anzahl der CD48⁺ Zellen in den CD11b^{-/-}-Knochenmarkszellen im Vergleich zu WT-Gegenständen (Abbildung 29 A).

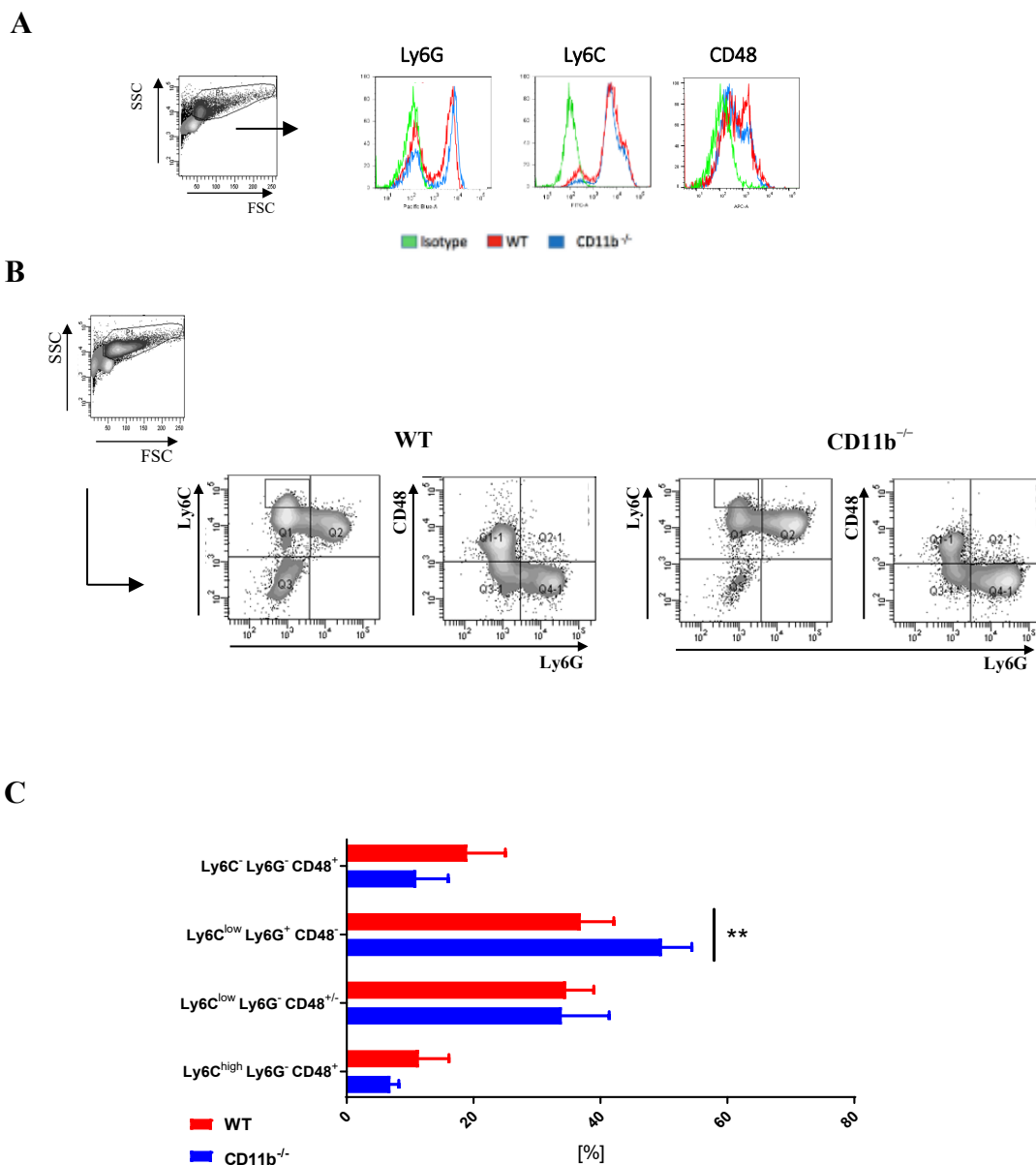


Abbildung 29. FACS-Analyse des CD11b^{-/-}-Knochenmarkes nach 3 Tagen der GM-CSF-Induktion zeigt erhöhten Anteil der Granulozyten im Vergleich zu WT auf.

Die Expression der Oberflächenmarker auf den Knochenmarkzellen am Tag3 der BMDC-Kultur wurde durchflusszytometrisch analysiert. Phänotypisierung der Knochenmarkzellen erfolgte in Bezug auf Ly6G, Ly6C und CD48 Expression. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet. (A) Dargestellte Histogramme repräsentieren eins von 5 Experimenten. (B) Dargestellt sind die repräsentativen Dot-plots aus 5 Versuchen. (C) Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit SD dar (n=5). Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede werden als ****p≤0,005** bezeichnet.

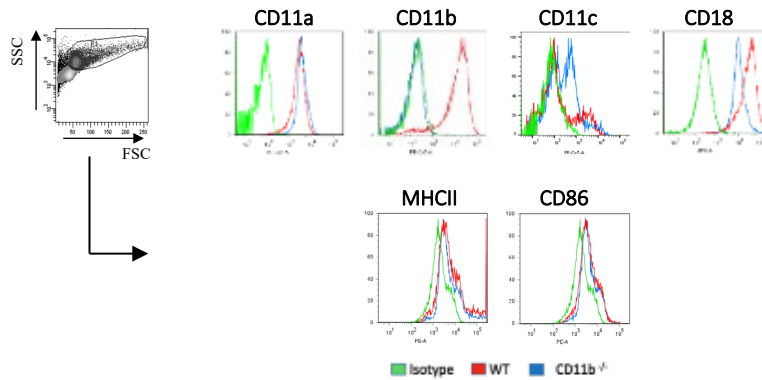
Durchflusszytometrische Analyse der GM-CSF-stimulierten CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen zeigt auf deutlich geringeren Anteil der Monozyten (CD48⁺Ly6G⁻ Zellen) und größeren Anteil der Granulozyten (CD48⁻Ly6G⁺ Zellen) im Vergleich zu WT-Gegenständen. Der durchschnittliche Anteil der Ly6C^{low}Ly6G⁺CD48⁻ granulozytären Zellen in der WT-Kultur beträgt durchschnittlich 37% und in der CD11b^{-/-}-Kultur – 50%. Anteil der Ly6C^{low}Ly6G⁻CD48⁺ monozytären Zellen und Ly6C^{high} Monozyten bleibt Genotyp-unabhängig (Abbildung 29 B, C).

2.3.2. GM-CSF-inkubierte CD11b^{-/-}-Knochenmarks-Zellkulturen weisen erhöhte Anzahl der CD11c⁺-Zellen auf

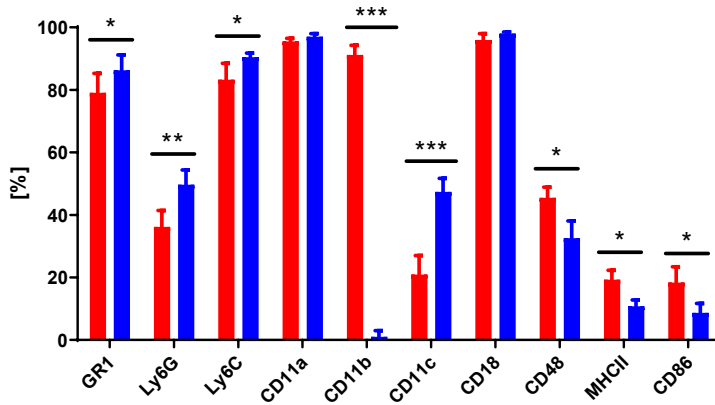
Die Analyse der Oberflächenexpression ausgewählter Oberflächenmarker auf den Knochenmarkzellen am Tag 3 der BMDC-Kultur zeigte signifikante Unterschiede in der Zelldifferenzierung der CD11b^{-/-}-Vorläuferzellen im Vergleich zu den WT-Kontrollansätzen. Diese Kulturen wiesen einen signifikant größeren Anteil an CD11c⁺ Zellen in der CD11b^{-/-}-P1-Fraktion (Ausschluss von Zelltrümmern) auf (Abbildung 30 A und B).

Jedoch die Histogramm-Darstellung zeigte, dass CD11c in unterschiedlicher Dichte auf den Zellen vorkommt. CD11c auf der Oberfläche von WT-CD11c⁺ Zellen wird stark exprimiert. Hingegen der Großteil der CD11b^{-/-}-CD11c⁺ Zellen exprimiert CD11c auf niedrigem Niveau (Abbildung 30 A). Die Mittlere Fluoreszenzintensität deutete auch auf eine starke Runterregulation der CD18-Molekül-Expression auf CD11b^{-/-}-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen hin (Abbildung 30 C). Jedoch war der prozentuale Anteil der CD18⁺ Zellen unverändert (Abbildung 30 B). Die Expression der CD11a-Untereinheit blieb auf prozentuale- sowie MFI-Ebene von einer CD11b-Deletion unbeeinflusst.

A



B



C

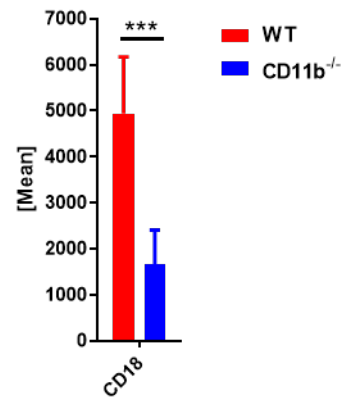


Abbildung 30. Expression verschiedener Oberflächenmarker auf den CD11b^{-/-}-BMC am Tag3 der BMDC-Kultur weist auf Verzögerung der Zelldifferenziation.

Analyse des BMC-Phänotyps am Tag3 der BMDC-Kultur wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. (A) Dargestellt sind die repräsentativen Histogramme der Differenzierungs- und Aktivierungsmarker-Expression aus 3 bis 5 Versuchen. (B) Das Diagramm stellt die Ergebnisse der Differenzierungs- und Aktivierungsmarker-Expression-Analyse. (C) MFI-Wert-Abbildung ergibt stärkere CD18-Expression auf der Zelloberfläche. Die Diagramme stellen die Mittelwerte mit SD dar (n=3-5). Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede werden als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,001$ bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

Weitere durchflusszytometrische Analysen der CD115-, CD62L-, CD54-, CD49d-, $\beta 7$ -, F4/80- und CD68-Markerexpression auf den myeloiden Zellen am Tag3 der BMDC-Kultur hat keine signifikante Genotyp-abhängige Unterschiede nachgewiesen (Abbildung 31).

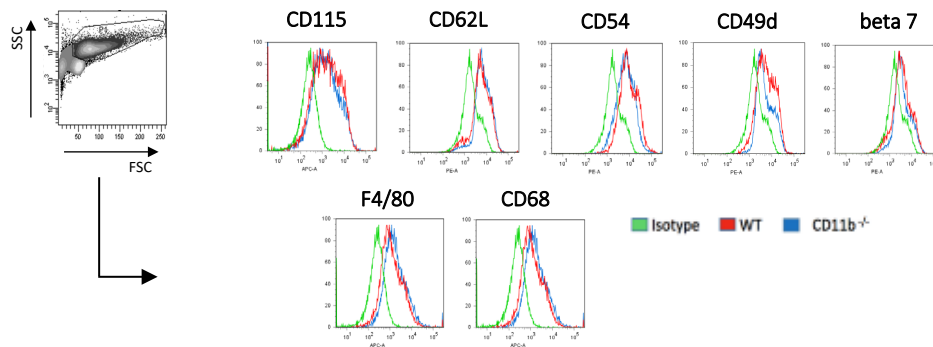


Abbildung 31. Durchflusszytometrische Analyse der myeloiden Zellen am Tag3 der BMDC-Kultur.
 Durchflusszytometrische Analyse der CD115, CD62L, CD54, CD49d, B7, F4/80 und CD68-Markereexpression auf den myeloiden Zellen am Tag3 der BMDC-Kultur. Dargestellt sind die repräsentativen Histogramme der Differenzierungs- und Aktivierungsmarker-Expression von 3 bis 5 Versuchen. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

2.3.3. Intrazelluläre Expression der Lineagemarker und β -Untereinheiten in GM-CSF-differenzierten CD11b^{-/-}-myeloiden Knochenmarkzellen

Die Analyse der CD18-Oberflächen-Expression zeigte auf Genotyp-unabhängige prozentuale Anteil der CD18⁺ Zellen in den Kulturen (Abbildung 30B, Kapitel 2.3.2), jedoch die Mittlere Fluoreszenzintensität deutete auf eine starke Runterregulation der CD18-Molekül-Expression auf CD18-positiven CD11b^{-/-}-Zellen im Vergleich zu den CD18-positiven WT-Zellen hin (Abbildung 30 C, Kapitel 2.3.2). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die α - und β -Untereinheiten der Beta-2-Integrinen im endoplasmatischen Retikulum erstellt werden und nur die heterodimere Form der Integrine in die Zellmembran transportiert wird, könnte man vermuten, dass die verringerte Konzentration von CD18 auf der Zelloberfläche von CD11b^{-/-}-Zellen auf das Fehlen eines Partners in Form von CD11b ist und die intrazelluläre Expression des CD18-Untereinheit auf der intrazellulären Ebene bei beiden Genotypen vergleichbar ist. Allerdings zeigte die durchflusszytometrische Analyse nach der intrazellulären Färbung, dass bei dem unveränderten Anteil der CD18-positiven Zellen (Abbildung 32A) die intrazelluläre CD18-Expression bei den CD18-positiven CD11b^{-/-}-Zellen im Vergleich zu CD18-positiven WT-Zellen stark reduziert ist (Abbildung 32 B).

Die durchflusszytometrische Analyse nach der intrazellulären Färbung zeigte nicht nur auf Runterregulation der CD18-Oberflächenexpression. Auch bei dem vorgenannten Marker ließen sich Genotyp-abhängige Unterschiede mit der intrazellulären Färbung nachweisen, die meist mit der Oberflächenmarker-Expression korrelierten: Es wurde eine tendenziell erhöhte Ly6G-,

Ly6C- und GR1-Expression sowie eine reduzierte CD48-Expression nachgewiesen. Der intrazelluläre Nachweis der CD11c-Expression deutete auch auf signifikanten Anstieg des Anteils von CD11c-positiven Zellen in der CD11b^{-/-}-Kultur im Vergleich zur WT-Kultur (Abbildung 32 A).

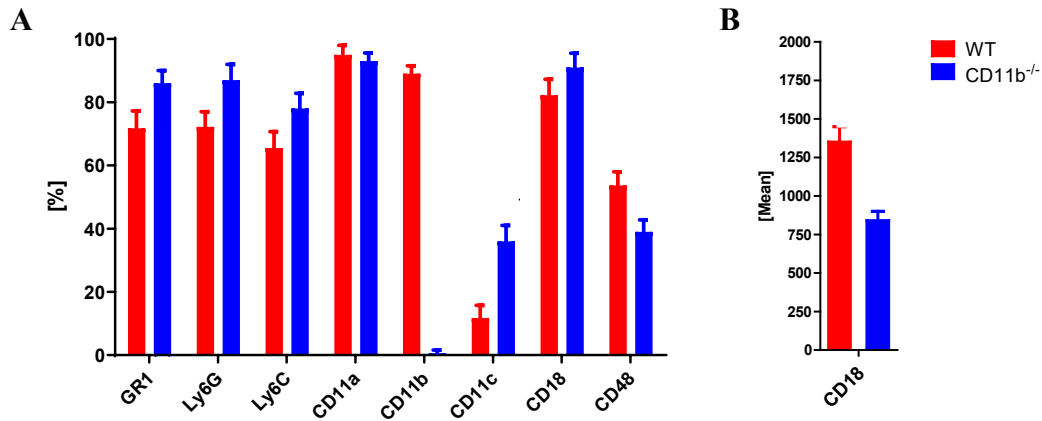


Abbildung 32. Intrazelluläre CD11c-Überexpression in der CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen am Tag3 der GM-CSF-Kultur.

Mittels durchflusszytometrischen Methoden wurden die Zellen am Tag 3 der Kultur für intrazelluläre Differenzierungsmarker-Expression analysiert. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit SD dar (n=2). Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

2.3.4. Charakterisierung der CD11c⁺ Zellen

Zur Phänotypisierung der CD11c⁺ Zellen wurde ihre Oberflächen-Expression an Ly6G, CD48, Ly6C, GR1, CD86 und MHCII analysiert. Am Tag3 der GM-CSF- Kultur sind ca. 20% der Zellen zu BMDC (CD11c⁺MHCII⁺Ly6G⁻) ausdifferenziert. Nur eine sehr kleine Fraktion der WT-CD11c⁺MHCII⁺Ly6G⁻ Zellen exprimierte Ly6C auf ihrer Oberfläche. Eine nähere Charakterisierung der CD11c⁺ Fraktion der CD11b^{-/-}-Population zeigte jedoch eine signifikante Ly6G-Expression auf ihrer Oberfläche. Nahe alle CD11c⁺ Zellen sind durch Ly6C-Expression gekennzeichnet. Diese CD11c⁺Ly6G⁺ DC/PMN-Hybride zählen annähernd 30% der CD11b^{-/-}-Population und besitzen keine MHCII- und CD86-Expression (Abbildung 33).

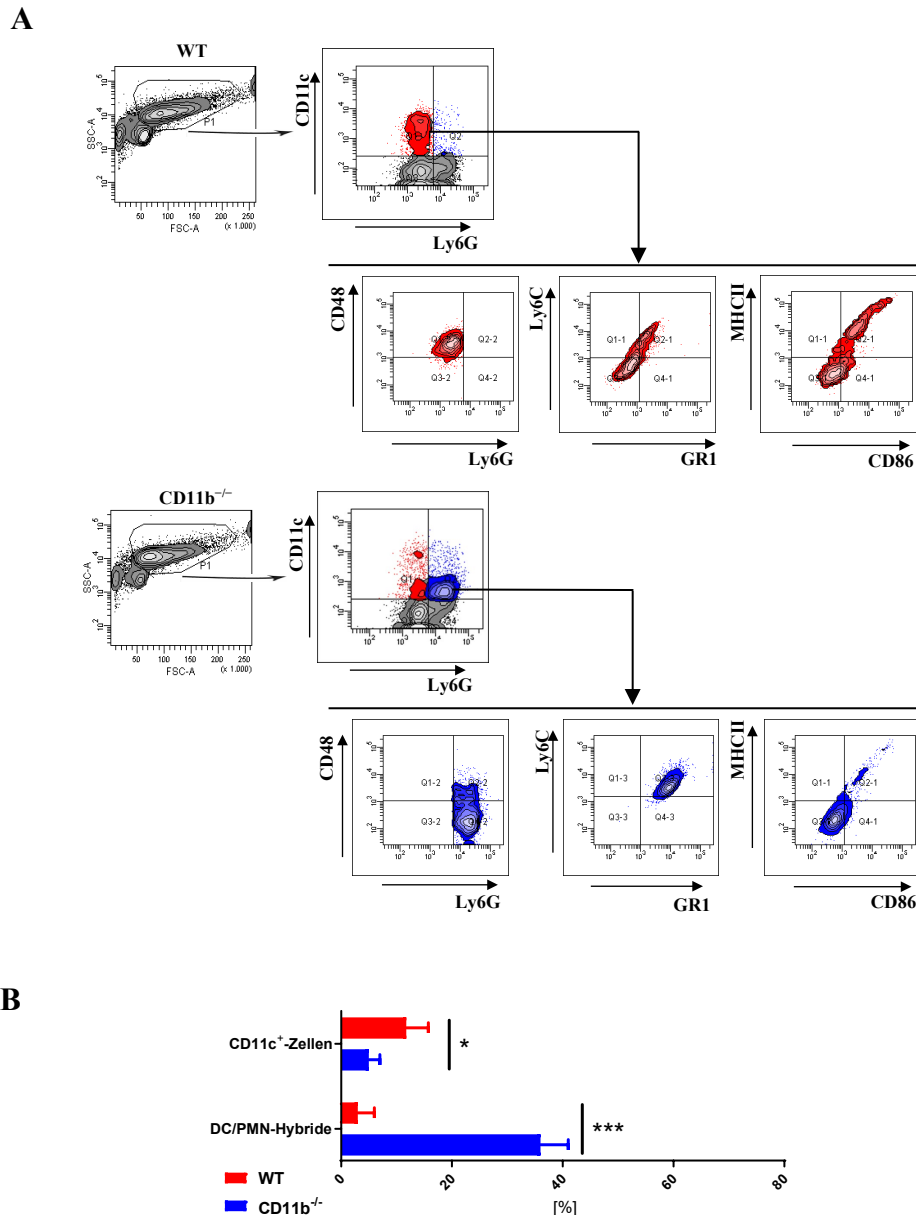


Abbildung 33. Charakterisierung der CD11c⁺-Knochenmarkszellen nach drei Tagen der GM-CSF-Induktion.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Differenzierungsmarker Expression auf der BMC am Tag3 der BMDC-Kultur analysiert. Granulozyten des Knochenmarks der CD11b^{-/-}-Mäusen exprimieren CD11c⁺ auf ihrer Oberfläche nach 3 Tagen der GM-CSF-stimulation. Dargestellt sind die repräsentativen Dot plots aus 5 Versuchen(A). Die Diagramme stellen die Mittelwerte mit SD dar (n=5.) Die statistische Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA und Turkey-Test mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Die statistisch signifikanten Unterschiede werden als *p<0,05 und ***p<0,001 bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die CD11c⁺-Zellfraktion als Startpopulation berücksichtigt.

2.3.5. CD11c⁺Ly6G⁺ DC/PMN-Hybride der CD11b^{-/-}-Mäusen exprimieren weder MHC-II noch Kostimulatoren

Um einen besseren Überblick über den Immunphänotyp der CD11c⁺ Granulozyten zu gewinnen, wurden Knochenmarkszellen 4 Tage mit GM-CSF kultiviert und anschließend unter positiver Selektion mittels anti-CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec) isoliert. Diese

Populationen wurden für die FACS-Analyse von Differenzierungs- und Aktivierungsmarkern verwendet. Die CD11c⁺ Population von WT-Mäusen war homogen und bestand primär aus CD11c⁺MHCII⁺CD80⁺ BMDCs (Abbildung 34 A, obere Reihe, B). Demgegenüber umfasste die CD11c⁺ Population von CD11b^{-/-}-Mäusen CD11c⁺MHCII⁺CD80⁺ BMDCs und CD11c⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}MHCII⁻ DC/PMN-Hybride (Abbildung 34 A untere Reihe, B).

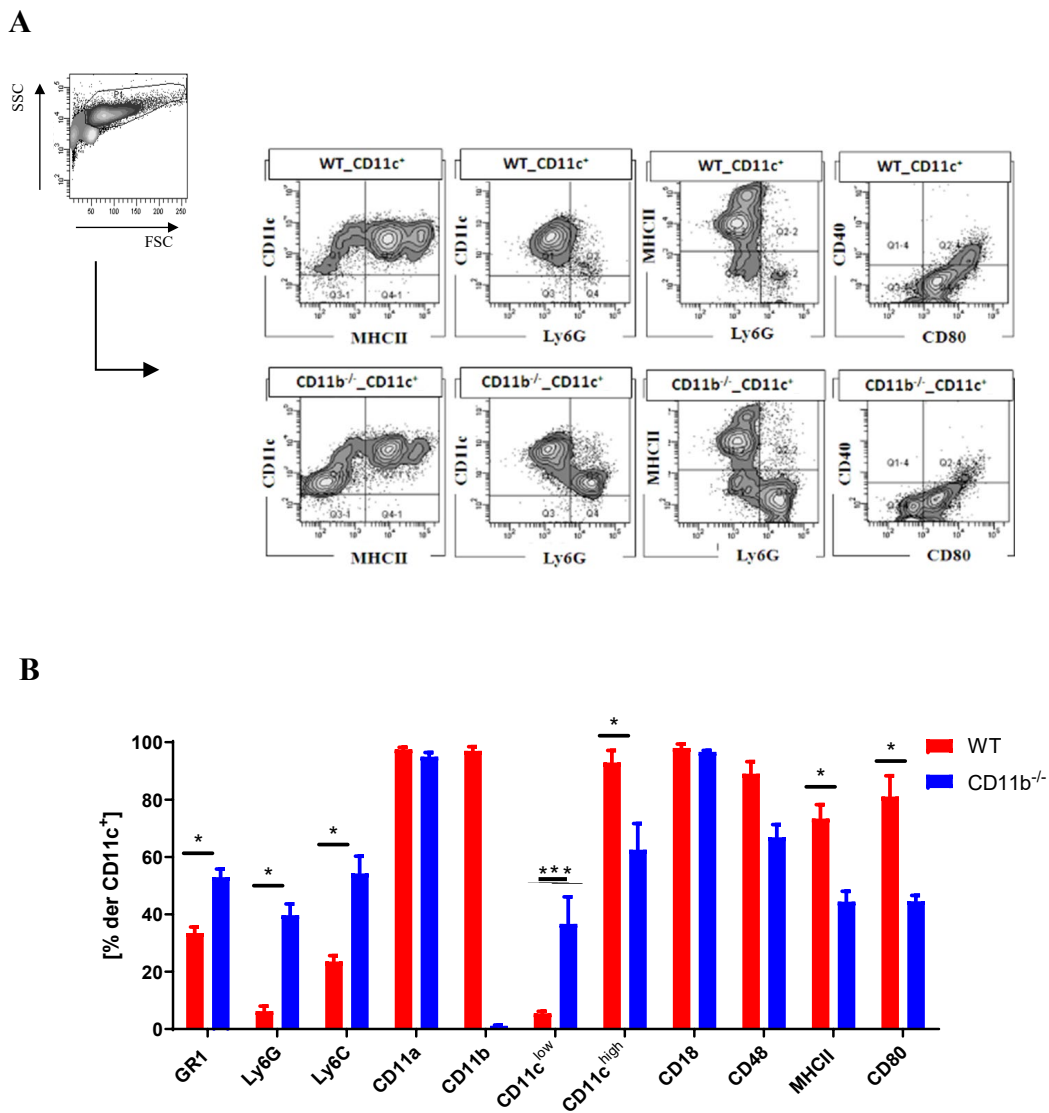


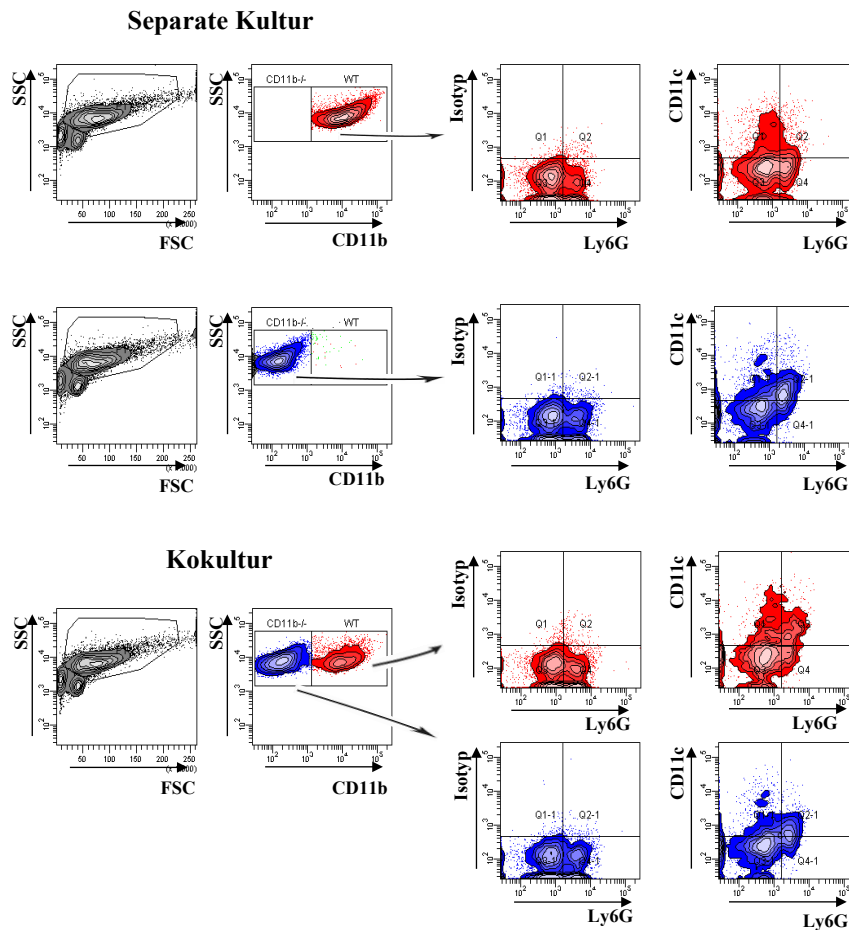
Abbildung 34. Differenzierungs- und Aktivierungsmarker Analyse der CD11c⁺-Zellen am Tag 4 der BMDC-Kultur.

(A) Dargestellt sind die repräsentativen Dot plots. (B) Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit SD dar (n=2). Bei der Auswertung wurde die PI Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten CD11c⁺-Knochenmarkszellen aus 2 Versuchen betrachtet.

2.3.6. Wechselwirkungen von WT- mit Mac-1^{-/-}-KM-Zellen in GM-CSF-haltigen Kultur beeinflussen die CD11c-Expression auf PMN

Es entstand die Vermutung, dass Mac-1 über Kontakt mit ICAM-1 Zell-Zell-Interaktion der Knochenmarkszellen und damit ihre Differenzierung beeinflussen könnte. Um die Relevanz von Mac-1-abhängigen Zellkontakten auf die GM-CSF-abhängige Zelldifferenzierung zu testen, wurden beide frisch isolierte WT- und CD11b^{-/-}-Populationen miteinander an Tag 0 der Kultur gemischt und drei Tage in Anwesenheit von GM-CSF ko-kultiviert. Anschließend wurde das Resultat der Wechselwirkungen dieser Zellen auf Oberflächenexpressionsebene durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 35, Ergänzung 2).

A



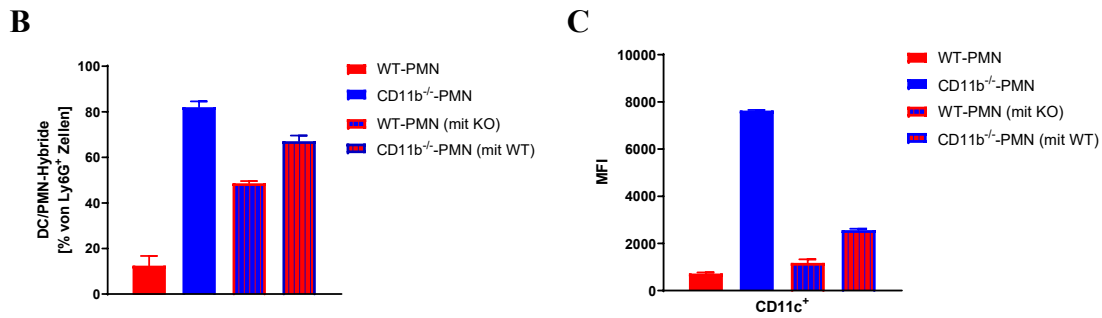


Abbildung 35. Wechselwirkungen von WT- und CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen erzwingen teilweise die CD11c-Expression auf WT-Granulozyten und regulieren die CD11c-Expression der CD11b^{-/-}-Granulozyten runter.

Knochenmarkzellen der WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen wurden zusammen in die GM-CSF Kultur eingesetzt. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen am Tag 3 der Kultur für Differenzierungsmarkerexpression analysiert. (A) Dargestellt sind die repräsentativen Dot plots aus 2 Versuchen. (B,C) Die Diagramme stellen die Mittelwerte mit SD dar (n=2). Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

In Folge der Kokultur der WT- mit CD11b^{-/-}-KM-Zellen wurde die CD11c-Expression auf der Oberfläche von WT-PMN hochreguliert. Die CD11c-Expression wurde auf über 50% aller WT-PMN erfasst. Die Marker-Analyse zeigte jedoch nur wenige Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der WT-CD11c⁺ Zellen aus der Kokultur im Vergleich zu der gewöhnlichen WT-Kultur, was auf Spurmengen der CD11c-Moleküle auf ihrer Oberfläche hindeutet. Des Weiteren wies die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) auf die erhebliche Runterregulation der CD11c-Expression auf der Zelloberfläche von CD11b^{-/-}-Mäusen verglichen mit gewöhnlich kultivierten CD11b^{-/-}-Zellen.

2.4.Charakterisierung der CD11b^{-/-}-BMDC-Kultur

2.4.1. Bei der CD11b^{-/-}-BMDC wird die CD11c-Expression hochreguliert

Um die Bedeutung von Mac-1 auf die Differenzierung der DC zu beurteilen, wurden WT- und CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen nach dem BMDC-Isolation-Protokoll (siehe Kapitel 5.2.3.1) in vitro kultiviert. Eine GM-CSF-induzierte BMDC-Kultur präsentiert eine diverse Mischkultur, die standardmäßig nur bis zu 70% der ausdifferenzierten BMDC beinhaltet. Der Rest der in den Kulturen wachsenden Zellen umfasst eine Mischung von Makrophagen und anderen uncharakterisierten Zellen (Helft et al., 2015).

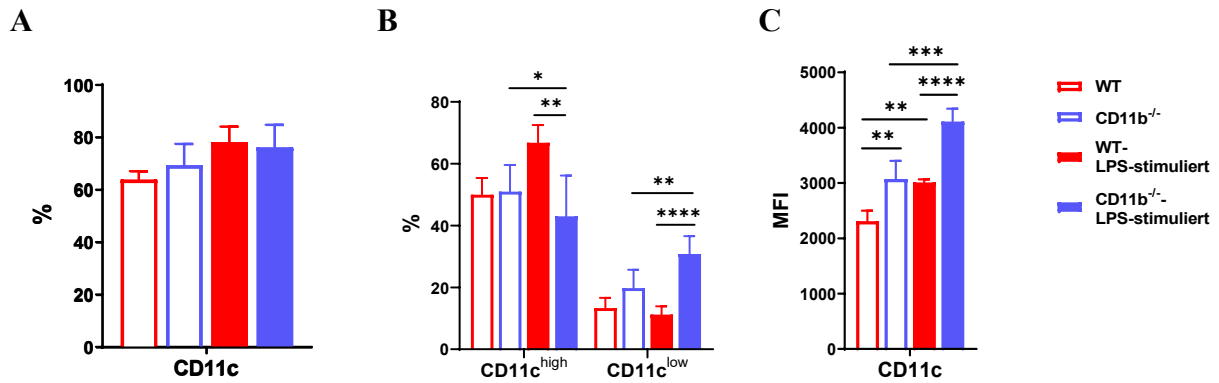


Abbildung 36. CD11c-Expression in der BMDC-Mischkultur.

Diagramme stellen prozentuale (A, B) und auf MFI bezogene (C) CD11c-Expression auf der WT- und CD11b^{-/-} BMDC-Mischkulturen dar. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte mit SD (n=5). Die statistische Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA und Turkey-Test mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Die statistisch signifikanten Unterschiede werden als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

Die dargestellten Diagramme zeigen die Anzahl der CD11c⁺ Zellen in der WT- und CD11b^{-/-} BMDC-Mischkulturen und die Dichte (MFI) von CD11c auf ihrer Oberfläche. Die mit GM-CSF-gewonnene BMDC-Mischkulturen beider Genotypen beinhalten durchschnittlich 70% der CD11c⁺ Zellen (Abbildung 36A). Genotyp-abhängige Unterschiede bezogen sich auf den Prozentsatz der CD11c^{high} und CD11c^{low} Zellen in den LPS-stimulierten BMDC-Mischkulturen. Die LPS-Stimulierung erfolgte bei WT in der Zunahme der Zahl von CD11c^{high} Zellen. Hingegen verringerte sich in CD11b^{-/-}-Kultur die Anzahl der CD11c^{high} Zellen, stattdessen nahm die Anzahl der CD11c^{low} Zellen zu (Abbildung 36 B). Jedoch sowohl unstimulierte als auch stimulierte CD11c⁺ Gesamtpopulation der CD11b^{-/-}-Mäusen weist höhere CD11c-oberflächen-MFI im Vergleich zu ihren WT-Gegenständen, was auf stärkere CD11c-Expression auf den CD11c^{high} Zellen der CD11b^{-/-}-Mäusen hindeutet (Abbildung 36 C).

2.4.2. Mac-1 beeinflusst die GM-CSF-bedingte Differenzierung der BMDC sowie die Reifung der BMDC nach der LPS-Stimulierung

Weitere durchflusszytometrische Zell-Phänotypisierung der BMDC-Mischpopulation deuteten auf eine eingeschränkte Expression des Antigen-präsentierenden Rezeptors MHCII und des Ko-Stimulators CD86 bei unstimulierten und LPS-stimulierten CD11b^{-/-} DC.

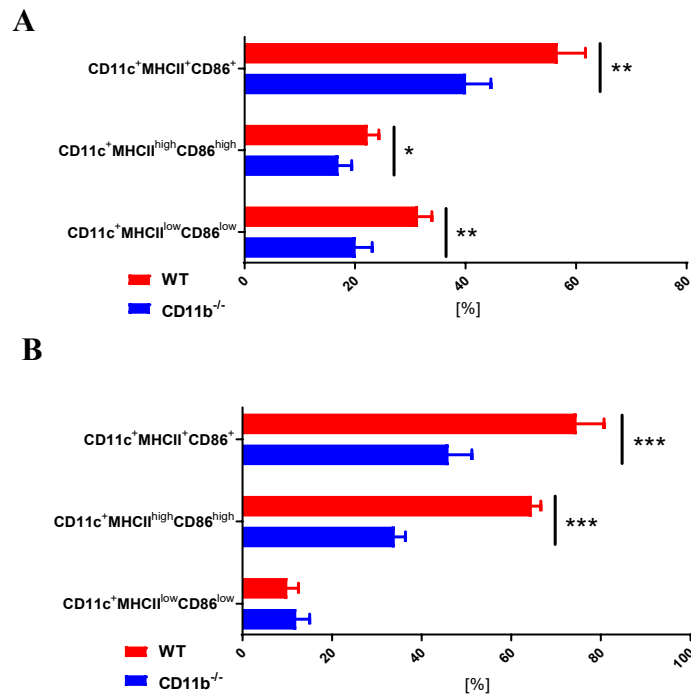


Abbildung 37. CD11b^{-/-}-BMDC-Mischkultur charakterisiert sich mit reduziertem Anteil der reifen Knochenmark-derivierten dendritischen Zellen.

Die Diagramme präsentieren nicht stimulierte BMDC (A) und mit LPS-stimulierte BMDC (B) am Tag 7 der GM-CSF-Kultur. Die Diagramme stellen die Mittelwerte mit SD dar (n=4). Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Die statistisch signifikanten Unterschiede werden als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, und *** $p \leq 0,001$ bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkszellen betrachtet.

Die Frequenz sowohl der gesamten BMDC-Population (CD11c⁺MHCII⁺CD86⁺), als auch reifer BMDC (CD11c⁺MHCII^{high}CD86^{high}) (Abbildung 37 A) in der CD11b^{-/-}-Mischkultur war signifikant niedriger im Vergleich zu der WT-BMDC-Mischkultur. Nach 7 Tagen der BMDC-Kultur beinhaltet die WT-BMDC-Mischkultur durchschnittlich 60% der CD11c^{high}MHCII⁺CD86⁺ BMDC, davon fast 25 % der CD11c^{high}MHCII^{high}CD86^{high} BMDC, andererseits die CD11b^{-/-}-BMDC-Mischkultur bestand aus nur ca. 40 % der BMDC-Gesamtpopulation, davon weniger als 20% der reifen BMDC. Diese Ergebnisse deuten auf einen wesentlichen Einfluss von Mac-1 auf die GM-CSF-bedingte DC-Differenzierung aus den Knochenmark-Vorläuferzellen hin.

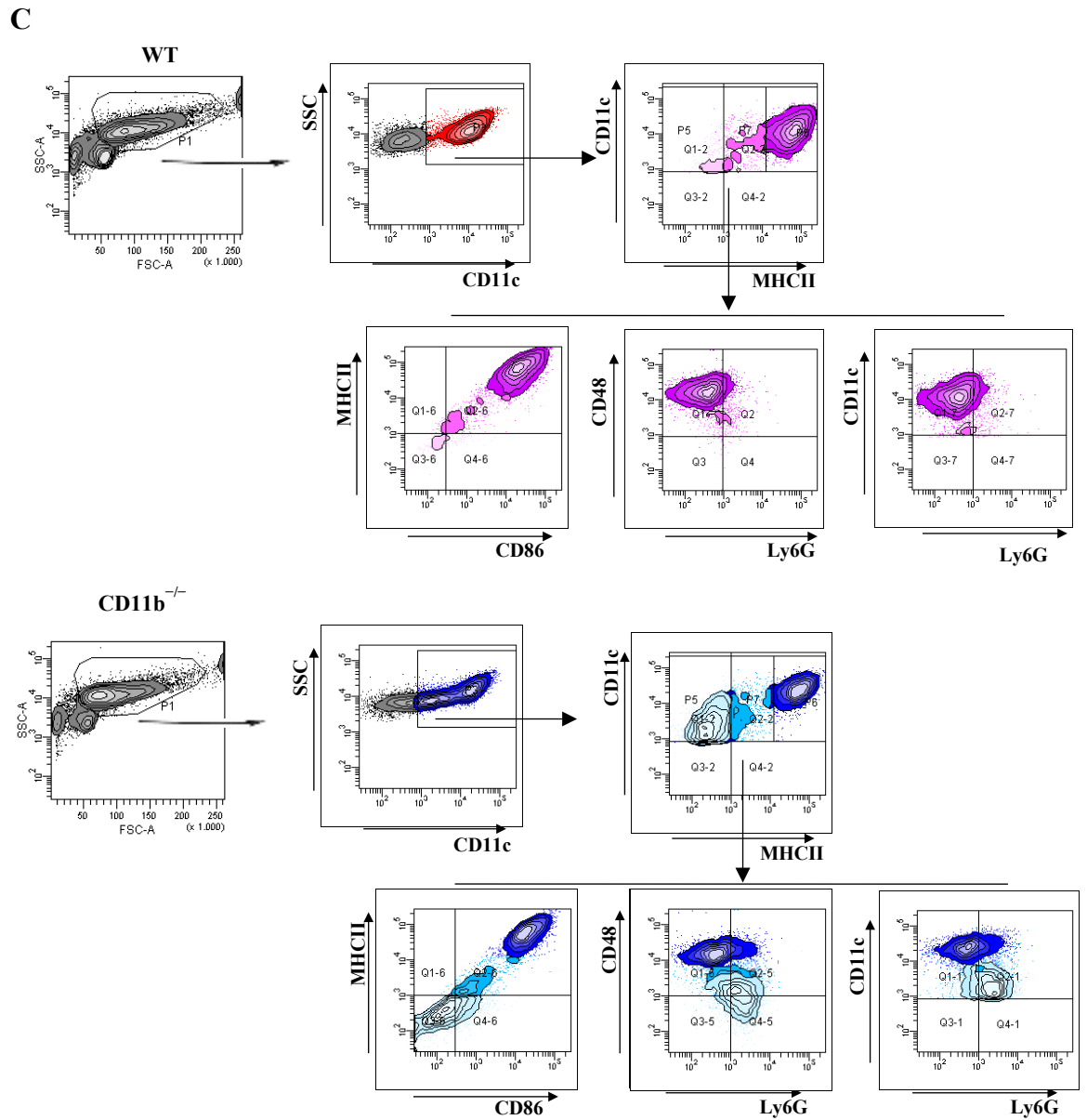
Aufgrund der LPS-Stimulierung hat sich die Reifungsfähigkeit der BMDC nur bei den WT-Kultur vergrößert. Die Ausprägung der reifen CD11c⁺MHCII^{high}CD86^{high} BMDC in der WT-Kultur nahm nach der Stimulierung signifikant zu und lag bei nahe zu 80% in der WT-Kultur, hingegen die Stimulierung der CD11b^{-/-}-BMDC führte jedoch zu keiner signifikanten Verstärkung der BMDC-Ausreifung. Der Prozentsatz der reifen BMDC lag bei der CD11b^{-/-}-

Kultur sowohl ohne als auch nach der LPS-Stimulierung auf ähnlichem Niveau – bei ca. 40-45%, was auf beeinträchtigte TLR4-Signalübertragung bei den CD11b^{-/-}-BMDC hindeutet.

Aufgrund der Genotypen abhängigen Unterschieden in der Differenzierung und Ausreifung der BMDC wurden die CD11c⁺ Zellen hinsichtlich der Expression weiterer Oberflächenmarker unterzogen (Abbildung 38).

Die Analyse der Expression der weiteren Markers auf unstimulierten BMDC zeigte Genotyp-abhängige Unterschiede: sowohl in der Expression des monozytären/lymphozytären Markers – CD48, als auch des granulozytären Markers – Ly6G. Diese Unterschiede betrafen hauptsächlich die CD11c^{low} Zellen. Die CD11b^{-/-}-Kultur beinhaltet über 22% der CD11c⁺Ly6G⁺ DC/PMN-Hybriden, die höchstwahrscheinlich auf Grund der Mac-1-Defizienz sich durch eine längere Überlebenszeit auszeichnen (Abbildung 38 A, B).

Es wurden auch weitere Genotyp-bedingte Unterschiede in der Mischkultur nach der LPS-Stimulierung gefunden. Interessanterweise obwohl die LPS-Induktion eine Beeinträchtigung der TLR4-Ligand-abhängigen Aktivierung der CD11b^{-/-}-BMDC ergeben hat, die CD11c^{low} CD11b^{-/-}-Zellen charakterisierten sich mit starker LPS-Empfindlichkeit. Infolge der LPS-Stimulierung ist auf den CD11c^{low} CD11b^{-/-}-Zellen die CD48-Expression bedeutsam gesunken und die Ly6G-Expression signifikant gestiegen. Diese Markerexpression-Veränderung hat auf die TLR4-Signalübertragung-bedingte Ausbreitung der CD11c⁺Ly6G⁺ DC/PMN-Hybriden in der CD11b^{-/-}-Kultur hingewiesen – bis auf 36 % (Abbildung 38 C, D).



D

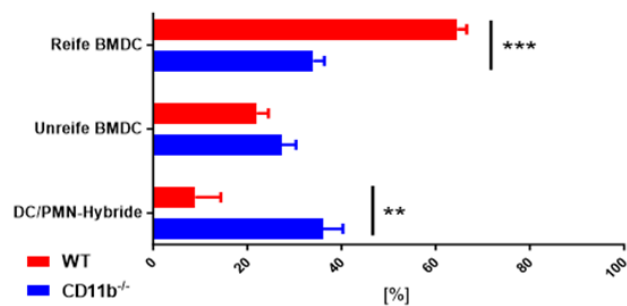


Abbildung 38. CD11b^{-/-}-BMDC-Mischkultur beinhaltet CD11c^{low}Ly6G⁺CD48^{low}-PMN-DC-Hybride, deren Prozentsatz in Folge der LPS-Stimulierung signifikant zunimmt.

CD11c⁺ Zellen der (A) unstimulierten und (B) LPS-stimulierten BMDC-Kultur wurden der Analyse von Oberflächenmarker Expression unterzogen. Dargestellt sind die repräsentativen Dot plots und Diagramme aus 4

Versuchen. Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Die statistisch signifikanten Unterschiede werden als $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,005$, und $***p \leq 0,001$ bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

2.4.3. Mikroskopische Darstellung der PMN-DC-Hybriden

Die CD11c-Expression auf der Oberfläche von CD11b^{-/-}-Granulozyten lässt sich mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie bestätigen (Abbildung 39). Die CD11c-Expression konnte sowohl bei unstimulierten als auch nach der LPS-Stimulierung in den segmentkernigen CD11b^{-/-}-Zellen, aber nicht bei WT-Zellen detektiert werden.

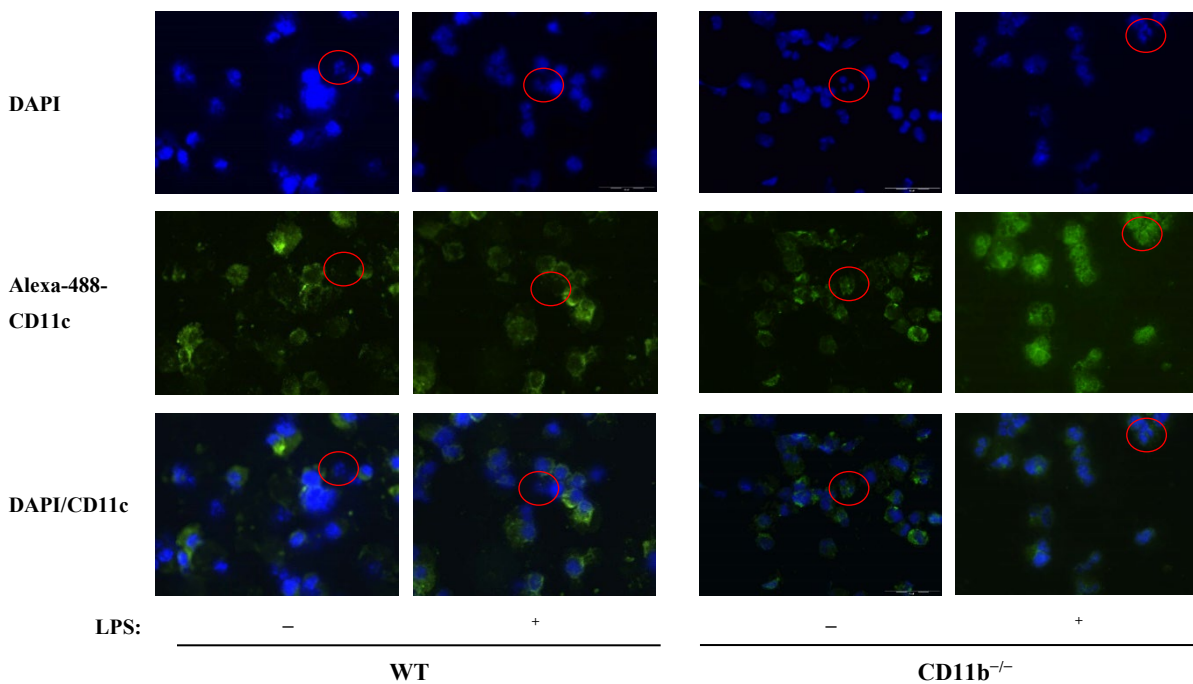


Abbildung 39. CD11c-Expression auf den CD11b^{-/-}-PMN.

Nach DAPI-Kernfärbung (blau) und CD11c-Alexa-488-Färbung (grün) wurde die zelluläre Lokalisation von CD11c mittels konfokalem Laser Scanning bestimmt. Oben: DAPI-Färbung, Mitte: von AF488-markierte CD11c-Moleküle, unten: zusammengeführt (n=1). Angekreuzt sind repräsentativen PMN.

DAPI-Färbung mit 100 µl 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI) in Dunkelkammer für t=10 min - Spülung mit destilliertem Wasser - Trocknen - Epifluoreszenzmikroskopie mit dem DAPI-Filter.

2.4.4. Zytokin-Produktion der CD11b^{-/-}-BMDC

An die Analyse der CD11b^{-/-}-BMDC anknüpfend wurde die Zytokin-Expression- der BMDC-Kultur nach der Stimulierung mit LPS bestimmt. Hierzu wurde die Konzentration von IL-1β, IL-10, IL-12, IL-23 und TNF-α in den Kulturüberständen der nicht stimulierten sowie LPS-stimulierten-BMDCs gemessen (Abbildung 40). Hierbei zeigte sich, dass CD11b^{-/-}-BMDCs mit einer höheren Ausschüttung von IL-10 auf LPS-Stimulierung reagierten als WT-BMDC. Die IL-10-Konzentration in WT-Kulturüberständen stieg von 10 pg/ml auf 210 pg/ml, während

stimulierte CD11b^{-/-}-BMDCs signifikant mehr IL-10 sekretierten (730 pg/ml). Die Analyse zeigte tendenzielle Runterregulierung der IL-12-Produktion durch stimulierten CD11b^{-/-}-BMDC im Vergleich zu WT-BMDC. Die Messung der IL-23 p19/p40-, TNF- α - und IL-1 β -Expression hatte keine Genotyp-abhängige Unterschiede nachgewiesen.

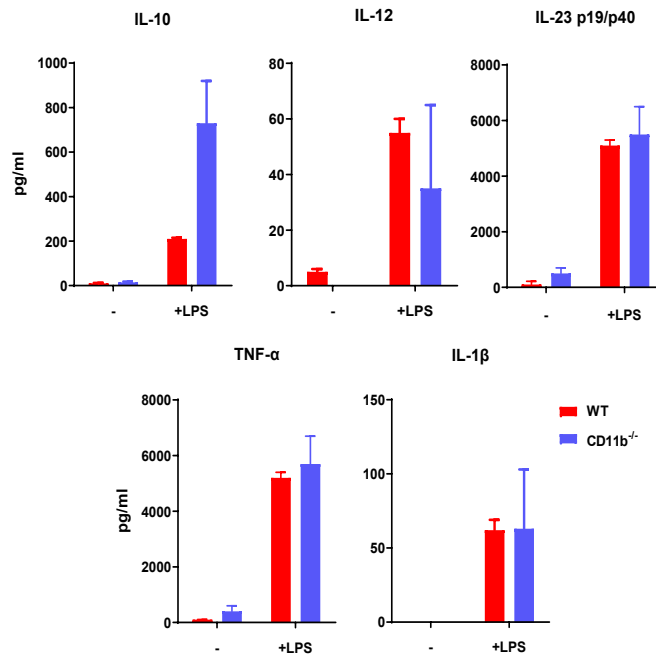


Abbildung 40. Zytokinprofil der CD11b^{-/-}-BMDC nach der TLR-Liganden-Stimulation.

Kulturüberständen der nicht stimulierten und LPS-Stimulierten BMDC wurden am Tag 7 der GM-CSF-Kultur für die Zytokinmessung gesammelt. Stimulierungszeit betrug 24 h. Mittels zytometrischen Bead-Array (CBA Inflammation; BD Pharmingen) wurde die Konzentration der IL-10, IL-12, IL-23 p23/p40, TNF- α und IL-1 β gemessen. Die Diagramme stellen die Mittelwerte mit SD dar (n = 2).

2.5. Zeitkinetik der GM-CSF-induzierten BMDC-Kultivierung

Anschließend wurde eine Zeitkinetik-Analyse der unter dem Einfluss von GM-CSF im Rahmen der 7-tägigen BM-DC-Kultur differenzierenden Zellen durchgeführt.

2.5.1. Zeitabhängige Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung von GM-CSF Knochenmarkskulturen

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit schlagen vor, dass Mac-1 eine wesentliche Bedeutung bei der Regulation der CD11c-Expression auf PMN hat und die Viabilität von PMN beeinflusst. Die PMN-Frequenzen unterschieden sich Genotyp-abhängig in allen Zeitpunkten der GM-CSF-Kultur. Das frisch isolierte erythrozytenfreie Knochenmark von CD11b^{-/-}-Mäusen beinhaltete 50% der PMN, von WT – in etwa 40% (Abbildung 41 C). Zusätzlich war der Zuwachs mit der Zeit der CD11b^{-/-}-BMDC-Fraktion im Vergleich zu WT-Kultur beeinträchtigt. Die

durchschnittliche Ausdifferenzierung der WT-BMDC nach dem BMDC-Kultur-Protokoll erfolgte nach 3 Tagen – mit der 20%-igen und nach 7 Tagen – mit der 60%-igen Ausbeute der BMDC. Aber die $CD11b^{-/-}$ -BMDC Ausdifferenzierung war stark verlangsamt und der BMDC-Prozentsatz betrug am Tag 3 weniger als 10% und am Tag 7 – nur 40% (Abbildung 41A).

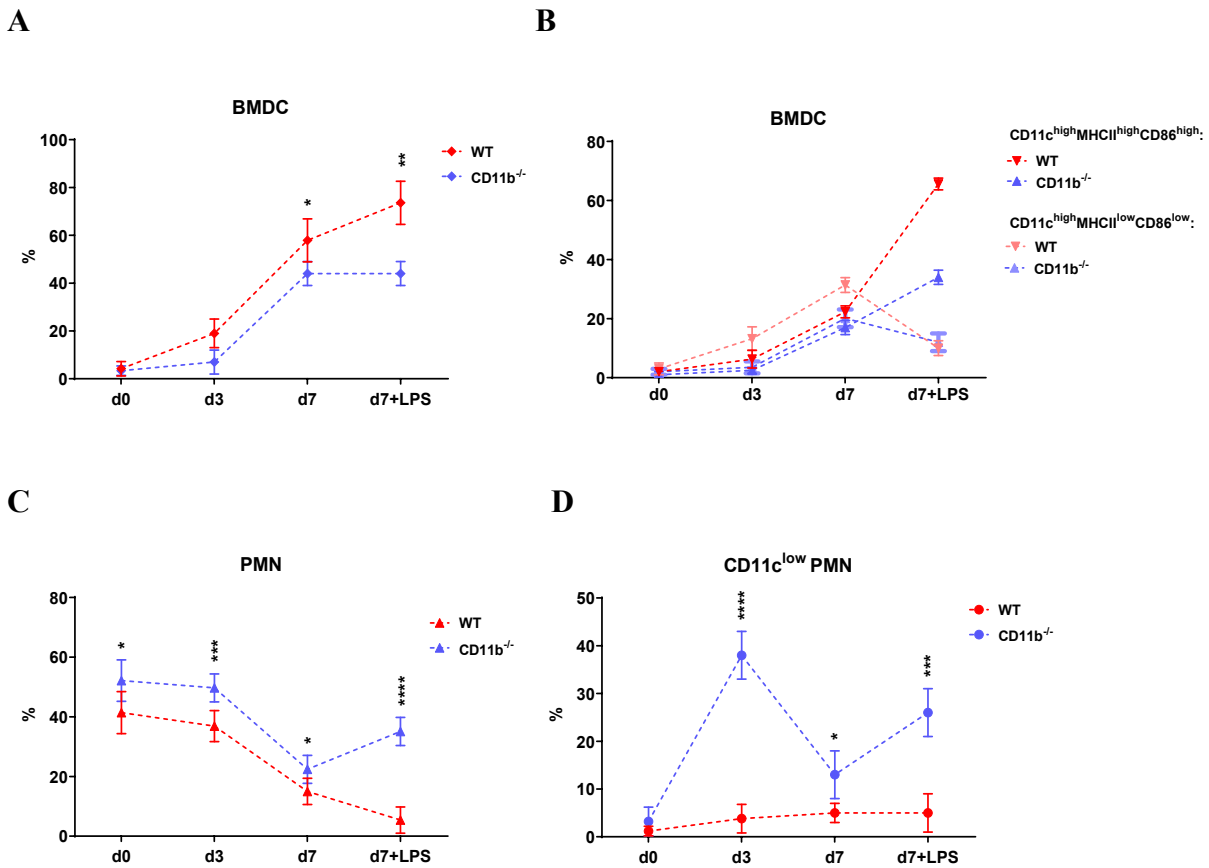


Abbildung 41. $CD11b^{-/-}$ -Knochenmarkszellen zeigen eine veränderte Zelldifferenzierung bei GM-CSF- und LPS-Stimulation *in vitro*.

Die Erythrozyten-depletierten Knochenmarkszellen am Tag 0 und die GM-CSF-induzierten Knochenmarkszellen am Tag 3 und Tag 7 \pm LPS wurden durchflusszytometrischer Analyse vorgenommen. Zellordnung: BMDC-Gesamtpopulation ($CD11c^{high}MHCII^{+}CD86^{+}$), reife BMDC ($CD11c^{high}MHCII^{high}CD86^{high}$), unreife BMDC ($CD11c^{high}MHCII^{low}CD86^{low}$), klassischen PMN ($Ly6G^{+}CD48^{-}Ly6C^{low}$) und $CD11c^{+}$ PMN ($CD11c^{low}Ly6G^{+}CD48^{-}Ly6C^{low}$). (A, B, C, D) Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD ausgedrückt ($n=4$); statistisch signifikante Unterschiede werden als $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,005$, $***p \leq 0,001$ und $****p \leq 0,0001$ bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkszellen betrachtet.

Die nähere Betrachtung der reifen und unreifen BMDC im Laufe der Kultur zeigte auch eingeschränkte Reifung der $CD11b^{-/-}$ -BMDC (Abbildung 41 B). Die Analyse zeigte zusätzlich für die $CD11b^{-/-}$ -Kultur untypische PMN-Charakteristik: Am Tag 3 beinhaltet die $CD11b^{-/-}$ -BMDC-Kultur rund 40% der PMN-DC-Hybriden (Abbildung 41 D). Jedoch sank die Frequenz der $CD11c^{+}$ PMN in Folge des weiteren Kulturverlaufs auf 15% am Tag 7. Mit der TLR4-

Anregung der CD11b^{-/-}-Kultur lag der CD11c⁺ PMN-Anteil bei 25%. Hingegen die WT-PMN sterben im Laufe der BMDC-Kultur ab und werden nach der LPS-Stimulierung noch weiter reduziert (Abbildung 41 C).

2.5.2. Genotyp-abhängige Unterschiede in der mRNA-Expression differenzierungsrelevanter Gene sowie von β 2-Integrinen

Die Quantifizierung der mRNA-Expression bestätigt eine erhöhte Expression des CD11c-Genes in CD11b^{-/-}-Zellen an Tag 3 und 7 der BMDC-Kultur. Die mRNA-Messungen zeigten für Tag 3 auch eine signifikant erhöhte Gene-Expression der Transkriptionsfaktoren c-Rel, Irf8, Nfia, sowie der Lineage-Marker CD18, Ly6C und Ly6G in CD11b^{-/-}- versus WT-Kulturen und eine niedrigere Expression von Bcl2a1, Bcl6, Id2, Nfil3 und CD48 in CD11b^{-/-}- im Vergleich zu den WT-Zellen (Abbildung 42).

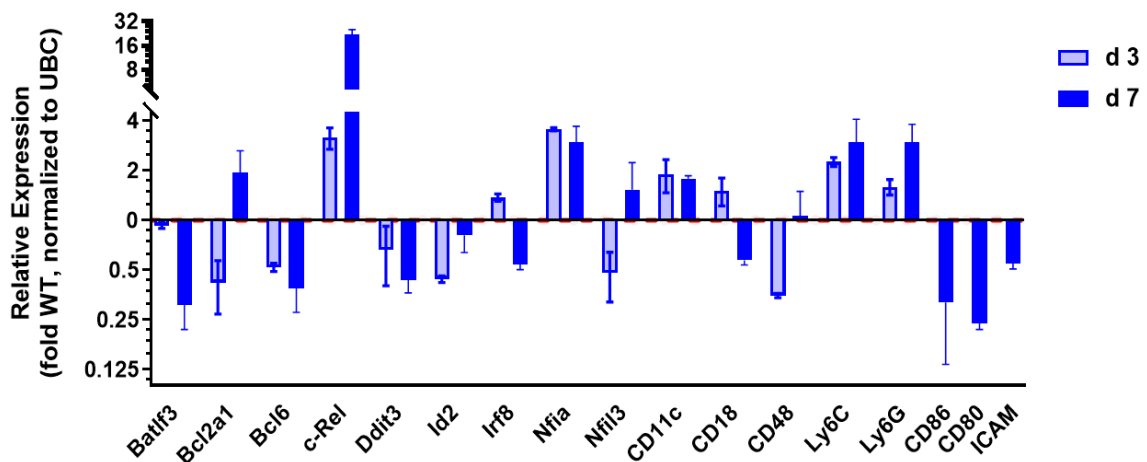


Abbildung 42. qPCR-basierte DNA-Quantifizierung weist veränderte Genexpressionsprofil der CD11b^{-/-}-Knochenmarkszellen am Tag 3 und 7 der GM-CSF-Kultur auf.

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde die relative Expression der ausgewählten mRNA in den CD11b^{-/-}-Zellen am Tag 3 und Tag 7 der BMDC-Kultur analysiert. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit SEM dar (n=2).

An Tag 7 zeigten die Ergebnisse der Quantifizierung von mRNA-Expression eine Hochregulation der Gene von Ly6C, Ly6G und die Runterregulation von CD18, CD86 und CD80 in CD11b^{-/-}-Zellen, was mit den Protein-Daten korreliert (siehe Kapitel 2.4). Zusätzlich wurden in der CD11b^{-/-}-Kultur Gene wie Batf3, Bcl6, Ddit3, Id2, Irf8 und ICAM runterreguliert, während vor allem c-Rel, aber auch Bcl2a1, Nfia und Nfil3 hochreguliert wurden.

2.6. Bedeutung von Mac-1 für Reifung und Funktion der PMN

Die durchflusszytometrische Analyse der 7-Tägigen-GM-CSF-Knochenmarkskulturen zeigte signifikante Genotyp-abhängige Unterschiede in der Markerexpression sowohl auf BMDC als auch auf PMN. Daher wurde im nächsten Schritt eine morphologische, phänotypische und funktionelle Analyse der PMN durchgeführt.

2.6.1. Phänotypische Eigenschaften der Milz- und Blut-PMN von WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen

Zuerst wurde eine durchflusszytometrische Oberflächenmarker-Analyse von PMN aus der Milz und aus dem Blut vorgenommen (Abbildung 43). Dafür wurden die Milz- und Blutzellen präpariert, Erythrozyten depletiert und mit fluoreszenz-markierten anti-Ly6G, -Ly6C, -CD48, -CD11c, -MHCII und -CD86 Antikörpern inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine signifikante CD11c-Überexpression auf den CD11b^{-/-}-PMN in der Milz im Vergleich zu WT-PMN. Es wurden aber keine weiteren Genotyp-abhängigen Unterschiede in der Oberflächenmarker-Expression auf Milz- sowie Blut-PMN gefunden.

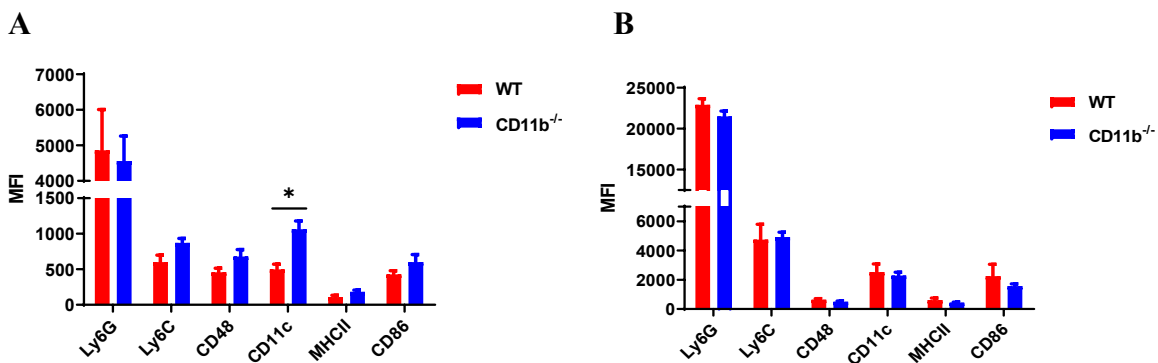


Abbildung 43. Oberflächenmarkerexpression der Milz- und Blut-PMN.

Expression verschiedener Oberflächenmarker der (A) Milz- und (B) Blut-PMN wurde mittels Durchflusszytometrischen Methoden analysiert. Diagramme stellen die Mittelwerte mit SD dar (n=3-4). Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede werden als *p≤0,05 bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkszellen betrachtet.

2.6.2. Morphologische und phänotypische Reifungsmerkmale der CD11b^{-/-}-PMN

Die WT- und CD11b^{-/-}-PMN wurden aus frisch isolierten Knochenmarkszellen aussortiert und morphologisch sowie durchflusszytometrisch analysiert. Die CD48⁻Ly6G⁺ PMN-Aufreinigung fand über negative Selektion unter der Verwendung von anti-CD48 MicroBeads und nachfolgend über positive Selektion mittels anti-Ly6G MicroBeads statt. Um die

Reifungsfähigkeiten der CD11b^{-/-}-PMN zu bestimmen, wurden die frisch isolierten Granulozyten für 2 Tage in die GM-CSF-haltige Kultur eingesetzt und Aliquote am Tag 1 über 16 h mit LPS stimuliert.

Für morphologische Untersuchungen wurden Cytospin-Präparate angefertigt, mittels Diff Quick Staining Set® (Microptic) gefärbt, fixiert und anschließend mikroskopisch ausgewertet (Abbildung 44). Die repräsentativen Cytospin-Bilder zeigten die unsegmentierte und hufeisenförmige Form des unreifen PMN-Zellkerns (obere Bilder). Die Auswirkung von GM-CSF (mittlere Reihe) als auch der Stimulierung mit LPS (untere Reihe) belegte der segmentkernige Charakter der Zellkerne. Bei diesen Analysen ließen sich die PMN von WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen morphologisch nicht unterscheiden.

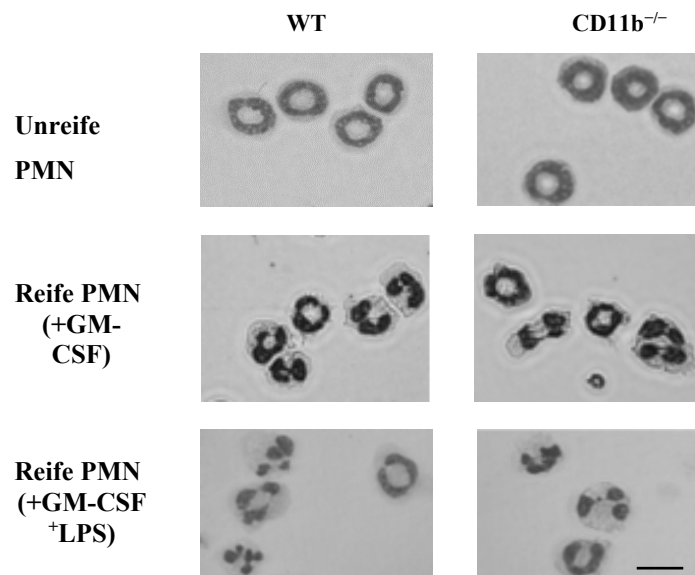


Abbildung 44. Morphologische Darstellung der PMN im Laufe der GM-CSF Kultur mit und ohne LPS-Stimulierung.

Entsprechende Zellen wurden auf den Cytospin-Objektträger und Bilder wurden bei 50-facher Vergrößerung aufgenommen. Vergrößerungsbalken: 10 µm. Dargestellt sind repräsentative Cytospin-Bilder von frisch isolierten PMN (Tag0) und im Laufe der GM-CSF-Kultur ohne (Tag2) sowie nach der LPS-Zugabe (Tag2+LPS).

In nachfolgenden Untersuchungen wurden Aliquote der Ansätze tageweise für die durchflusszytometrische Analyse mit fluoreszenzmarkierten anti-Ly6G, -Ly6C, -CD48, -CD11c, -MHCII und -CD86 Antikörpern inkubiert. Signifikante Unterschiede wurden in CD11c-Expression beobachtet (Abbildung 45, Ergänzung 3). In der Antwort auf die GM-CSF-Induktion drückten die CD11b^{-/-} Granulozyten mit der Inkubationszeit zunehmende CD11c-Expression aus. Dazu hat die LPS-Stimulierung signifikant die Menge der CD11c-Molekülen auf der Zelloberfläche von CD11b^{-/-} PMN erhöht. Des Weiteren haben die LPS-Auswirkungen

Hochregulierung der Ly6C-, Ly6G- CD48- und CD86-Expression erzeugen – sowohl auf WT- als auch auf CD11b^{-/-}-PMN.

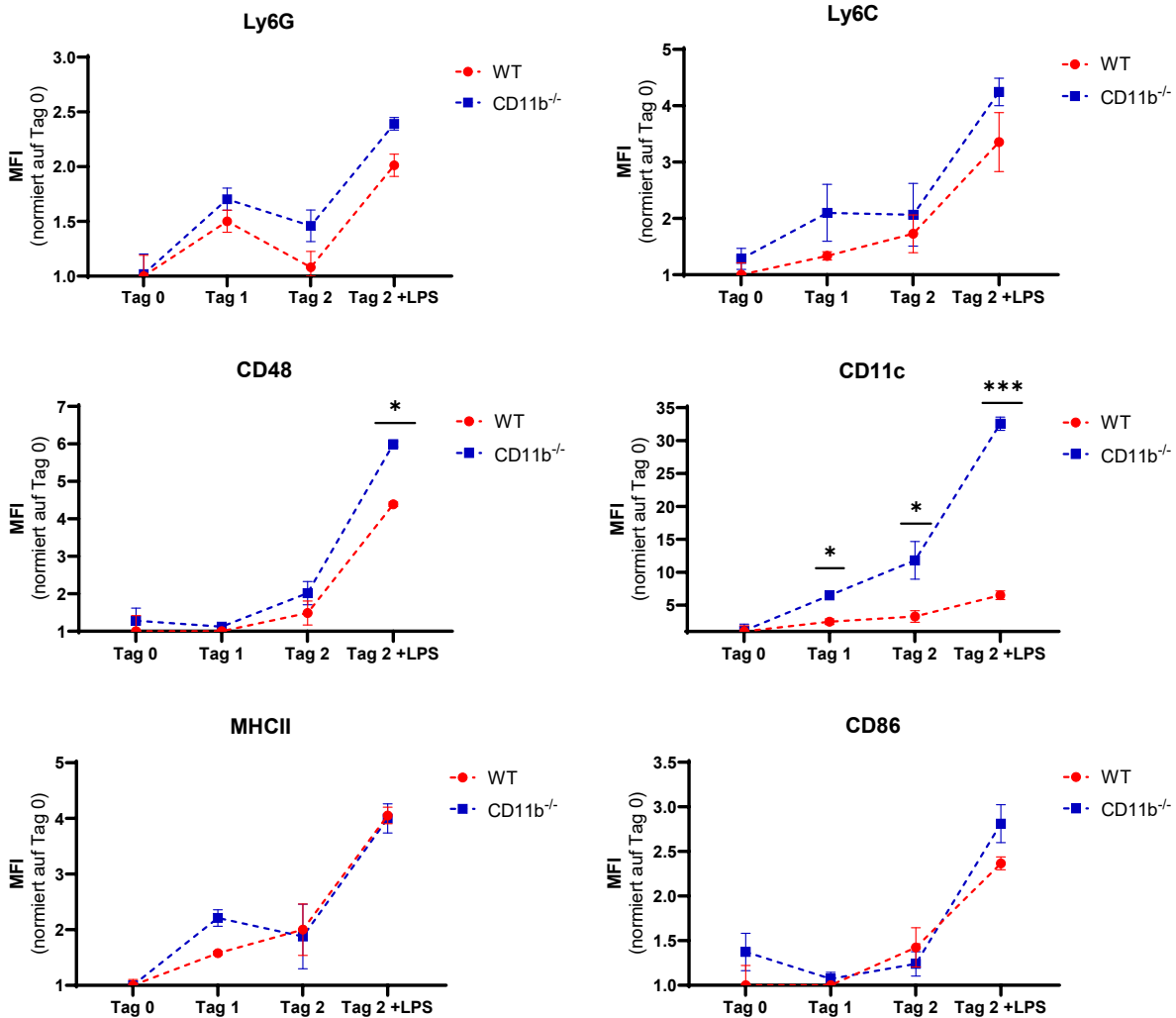


Abbildung 45. Expression von CD11c auf den CD11b^{-/-}-PMN steigt kontinuierlich im Laufe der GM-CSF-Kultur.

Auf den frisch isolierten PMN (Tag0) und im Laufe der GM-CSF-Kultur (Tag1, Tag2) sowie nach der LPS-Zugabe (Tag2+LPS) wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker mittels durchflusszytometrischen Methoden analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD dar (n=4). Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede werden als *p ≤ 0,05 und ***p ≤ 0,001 bezeichnet. Bei der Auswertung wurde die P1-Fraktion (Ausschluss von Zelltrümmern) betrachtet.

2.6.3. mRNA-Expression bei der CD11b^{-/-}-PMN nach 2 Tagen der GM-CSF-Stimulation

Demnächst wurde die Expression ausgewählter Gene, die in die PMN-Differenzierung involviert sind, auf mRNA-Ebene quantifiziert. Dafür wurden die PMN mittels anti-Ly6G MicroBeads über positive Selektion sortiert. Die Granulozyten der CD11b^{-/-}-Mäusen zeigten eine tendenziell verminderte Expression des Irf8-Genes. Das von diesem Gen kodierte Protein

ist ein Transkriptionsfaktor, der linienspezifische Gene fördert oder unterdrückt, um die Differenzierung von Zellen der lymphoiden und myeloischen Linie zu regulieren. Die Genexpression von Bcl6, Nfil3, Fraf6 und PU-1 war im Vergleich beider Mausstämmen unverändert (Abbildung 46).

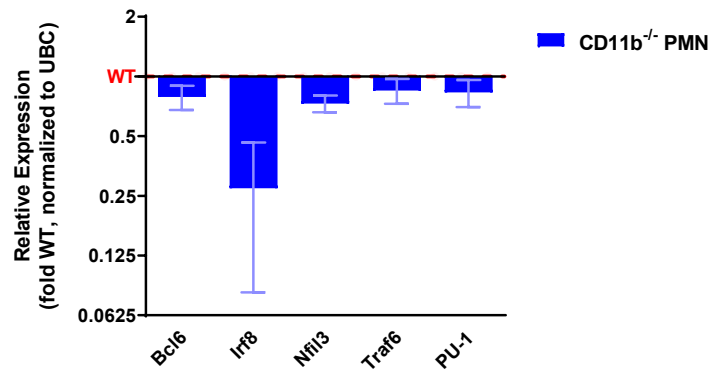


Abbildung 46. Genexpression.

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde die relative Expression der ausgewählten mRNA in den $CD11b^{-/-}$ -PMN. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit SEM dar ($n=2$).

2.6.4. Mac-1 ist für die $CD8^{+}$ T-zell-stimulatorische Aktivität unstimulierter PMN erforderlich

Angesichts der phänotypischen Unterschiede bei PMN in Folge der *Irgam*-Gendeletion, wurden ihre funktionelle Eigenschaften untersucht. Um die T-Zell-Stimulierungskapazität der $CD11b^{-/-}$ -PMN zu beurteilen, wurden unstimulierte und LPS-stimulierte $CD11b^{-/-}$ -PMN sowie -BMDC für antigenspezifische T-Zell-Proliferationsassay verwendet. Dafür wurden naive PMN aus WT- und $CD11b^{-/-}$ -Knochenmark isoliert, die Erythrozyten depletiert und die Zellen für 3 Tage mit GM-CFS kultiviert. An Tag 2 der Kultur fand die OVA-Peptid-Beladung und die LPS-Stimulierung von Aliquoten statt. Unstimulierte $CD11b^{-/-}$ -PMN zeigten im Gegensatz zu unstimulierten WT-PMN keine aktivierenden Eigenschaften der $CD8^{+}$ -T-Zell-Proliferation. Demgegenüber erlangen die $CD11b^{-/-}$ -PMN nach der LPS-Stimulierung die Fähigkeit, die Proliferation der T-Zellen zu induzieren (Abbildung 47 A). Die LPS-stimulierte $CD11b^{-/-}$ -PMN waren ähnlich aktiv wie stimulierte WT-PMN. Die $CD8^{+}$ -T-Zell-Aktivierungseigenschaften beider WT- und $CD11b^{-/-}$ -PMN waren jedoch geringer im Vergleich zu WT-BMDC. Sowohl WT-PMN als auch $CD11b^{-/-}$ -PMN konnten keine $CD4^{+}$ T-Zellen stimulieren (Abbildung 47 B, Ergänzung 4).

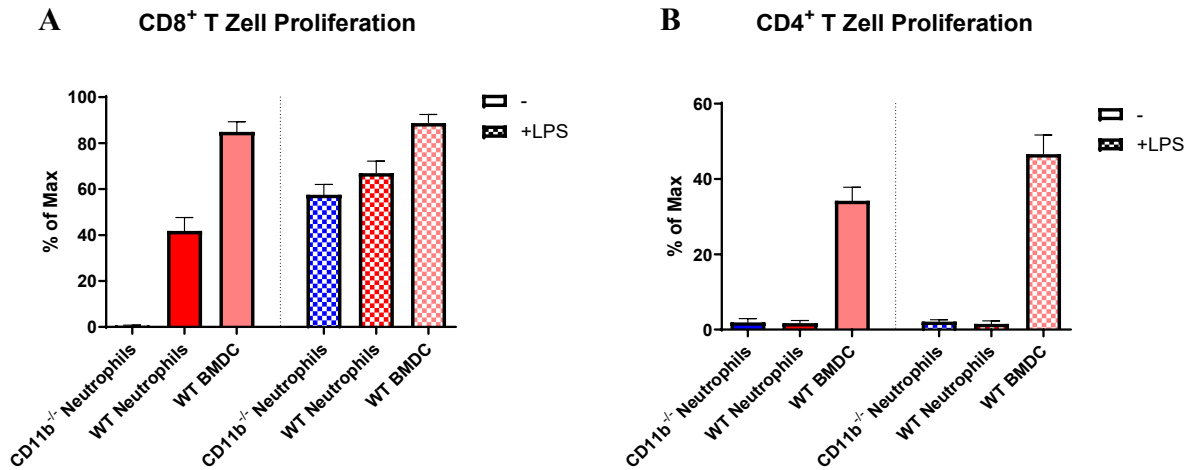


Abbildung 47. Nicht stimulierte CD11b^{-/-}-PMN weisen keine CD8⁺ T-Zellen-Stimulationsaktivität auf.

Die T-Zell-stimulatorische Aktivität von CD11b^{-/-}-PMN wurde durch die Quantifizierung der (A) CD8⁺ und (B) CD4⁺ T-Zell-Proliferation analysiert. Dafür wurden frisch isolierte Knochenmarkszellen ausgereinigt, die Erythrozyten wurden depletiert und in die GM-CSF Kultur für 3 Tage eingesetzt. An Tag 2 der Kultur fand die OVA-Peptid-Beladung und die LPS-Stimulierung von Aliquoten statt. PMN wurden am Tag 3 mittels anti-Ly6G MicroBeads (Miltenyi Biotec) aussortiert und in 96-Well-Platten in Konzentration von 5×10^3 /Well verlegt. CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen (5×10^4 /Napf) wurden zugegeben und die Ansätze bei 37 °C für 96 h kultiviert. Für die letzten 16 Stunden wurden die Zellen mit 15 μ M CFSE gefärbt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturen mit anti-anti-CD8-Pacyfic blue bzw. anti-CD4-FITC gefärbt. Anschließend wurden die Kulturen durchflusszytometrisch analysiert, CFSE-Fluoreszenzintensität wurde gemessen und somit die Proliferation der T-Zellen detektiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD (n=2) ausgedrückt. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkszellen betrachtet.

2.6.5. Natürliche Liganden von Mac-1 hemmen die CD8⁺ T-Zell-stimulatorische Kapazität der unstimulierten WT-PMN

Das obige Experiment hat die Wichtigkeit von Mac-1 für die CD8⁺ T-Zell-stimulatorische Aktivität insbesondere von unstimulierter PMN gezeigt. Zur Ergänzung dieser Ergebnisse wurden die T-Zellproliferationsstudien in Anwesenheit natürlicher Mac-1 Liganden (Fibrinogen, Thrombospondin und Vitronectin), die einen bindungsabhängigen Signaling-Effekt ausüben können, durchgeführt (Abbildung 48). Die Blockierung des Mac-1 mit Fibrinogen führte zu einer verminderten Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen. Ähnlich tendenziell reduzierte T-Zell-Proliferationsraten wurde auch bei der Verwendung von Thrombospondin und Vitronectin beobachtet.

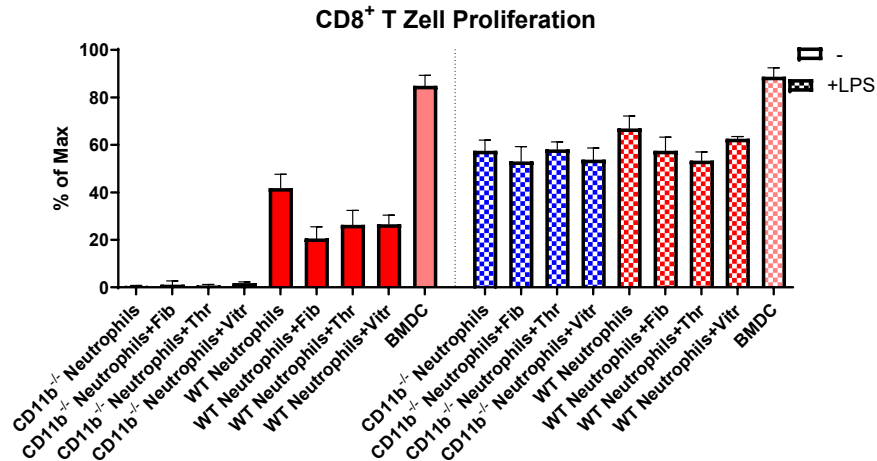


Abbildung 48. Die Auswirkungen der natürlichen Liganden von Mac-1 auf die CD8⁺ T-Zell-stimulatorische Kapazität der PMN.

Die T-Zell-stimulatorische Aktivität von CD11b^{-/-}-PMN wurde durch die Quantifizierung der (A) CD8⁺ und (B) CD4⁺ T-Zell-Proliferation analysiert. Dafür wurden frisch isolierte Knochenmarkzellen ausgereinigt, die Erythrozyten wurden depletiert und in die GM-CSF Kultur für 3 Tage eingesetzt. An Tag 2 der Kultur fand die OVA-Peptid-Beladung und die LPS-Stimulierung von Aliquoten statt. PMN wurden am Tag 3 mittels anti-Ly6G MicroBeads (Miltenyi Biotec) aussortiert. Die Kultur-96Well-Platten wurden mit 10 µl von Fibrinogen (Fib), Vitronectin (Vitr) und Thrombospondin (Thr) (30 µl/ml) für 18 h beschichtet. Demnächst wurden PMN in 96-Well-Platten in Konzentration von 5x10³/Well verlegt. CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen (5 x 10⁴/Napf) wurden zugegeben und die Ansätze bei 37 °C für 96 h kultiviert. Für die letzten 16 Stunden wurden die Zellen mit 15 µM CFSE gefärbt. Anschließend wurden die Kulturen durchflusszytometrisch analysiert, CFSE-Fluoreszenzintensität wurde gemessen und somit die Proliferation der T-Zellen detektiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD (n=2) ausgedrückt. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

2.7. Einfluss einer Mac-1-Defizienz auf die PMN-getragene Immunantwort bei invasiver pulmonaler Aspergillose im Mausmodell

Um die Bedeutung von Mac-1 für Infektions-Immunantworten von PMN zu beurteilen wurde der Krankheitsverlauf der Aspergillose – einer pulmonalen Infektion mit *Aspergillus fumigatus* – bei WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen beobachtet. Es ist bekannt, dass für die Beseitigung einer pulmonalen *A. fumigatus*-Infektion hauptsächlich PMN verantwortlich sind (Prufer et al., 2014).

2.7.1. Überlebensrate nach intratrachealer *Aspergillus fumigatus* Inokulation

Das Ziel des vorliegenden Versuches war es zu bestimmen, ob in Folge der Deletion von Mac-1 die Überlebensrate der Mäuse verändert ist. Für das Experiment wurden 4 Maus-Gruppen eingesetzt, die mit *A. fumigatus* infiziert wurden: WT- und CD11b^{-/-}-Mäuse, sowie jeweils eine entsprechende Gruppe, bei denen die PMN mit Anti-GR1-Antikörper in vivo depletiert wurden. Die Mäuse wurden intratracheal mit *A. fumigatus* (10⁷ Konidien/Maus) infiziert und über 14 Tage überwacht. Sowohl WT- als auch CD11b^{-/-}- Mäuse überstanden die

Infektion. Jedoch traten in den ersten Tagen nach der Inokulation bei $CD11b^{-/-}$ -Mäusen stärkere klinische Symptome der Lungenerkrankung als bei WT-Mäusen auf (nicht gezeigt). Eine mittels GR1-Antikörper induzierte PMN-Depletion verursachte ein verringertes Überleben der Mäuse beider Mausstämmen, was die kritische Rolle der PMN für das Überleben bei einer *A. fumigatus* Infektion bestätigte (Abbildung 49).

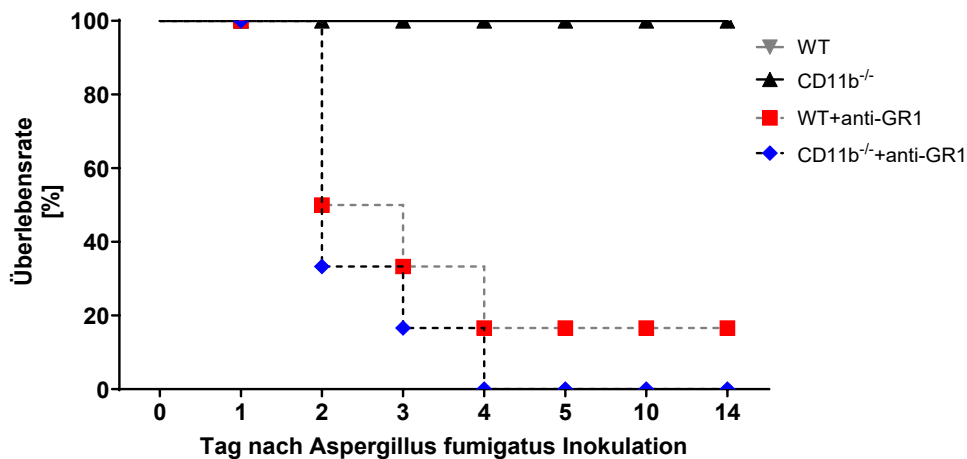


Abbildung 49. Überlebensrate.

Die Daten zeigen die kumulativen Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 7 WT- und 8 $CD11b^{-/-}$ -Mäusen pro Gruppe und jeweils 6 Mäusen pro PMN-depletierten-Gruppe.

2.7.2. CFU vom Lungenhomogenat nach 24h der intratrachealen *Aspergillus fumigatus* Inokulation

Einen Tag nach der *A. fumigatus*-Inokulation wurden die Lungen der nicht PMN-depletierten WT- und $CD11b^{-/-}$ -Mäuse präpariert und ex vivo-Versuche durchgeführt. Es wurden Paraffinschnitte der Lungen angefertigt und mit H&E sowie durch Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung) gefärbt. Zusätzlich wurden Lungenhomogenaten generiert und der Infektionsgrad durch Quantifizierung der *A. fumigatus* Koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFU) ermittelt.

Die H&E-Färbung zeigte, dass die Infiltration mit Leukozyten in Lungen der $CD11b^{-/-}$ -Mäusen deutlich schwächer war (Abbildung 50 A). Zusätzlich deutete die PAS-Färbung auf eine geringere Häufigkeit der schleimproduzierenden Zellen in den Lungen der $CD11b^{-/-}$ -Mäusen (Ergänzung 5).

Dabei wurde auch eine signifikant erhöhte Pilzbelastung der Lungen von $CD11b^{-/-}$ -Mäusen nachgewiesen (Abbildung 50 B, C). Außerdem erfolgte eine Quantifizierung der PMN in Lungenhomogenaten von WT- und $CD11b^{-/-}$ -Mäusen mittels mikroskopischer Methoden.

Jeweils 150 µl der BAL (Bronchoaleolare Lavage)-Flüssigkeit wurde für die Anfertigung der Cytospin-Präparate verwendet und die Zellkerne wurden gefärbt (Abbildung 51 A). Die Daten weisen auf eine stärkere Migration der CD11b^{-/-} PMN in die Lungen hin (Abbildung 51 A, B).

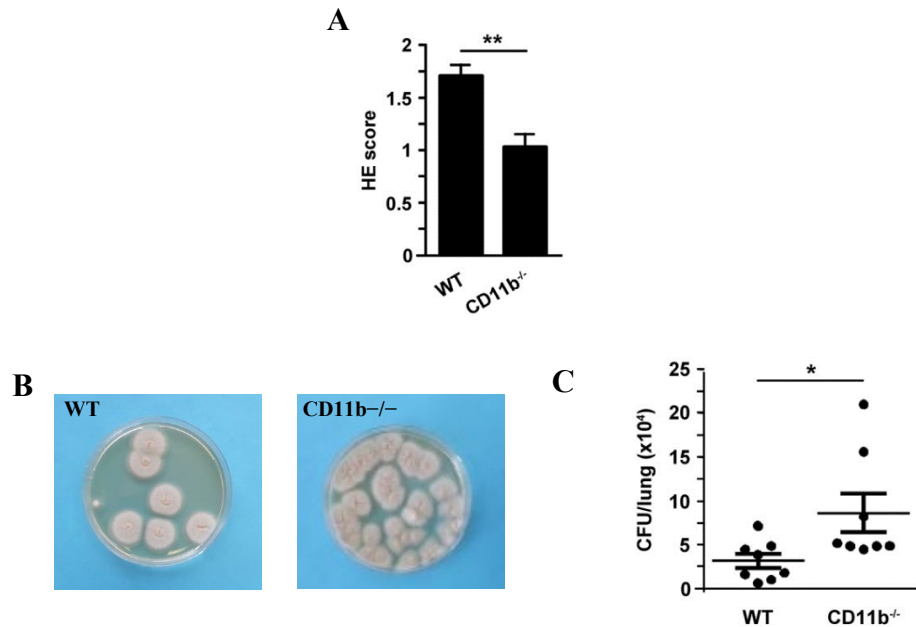


Abbildung 50. Lungenschnitte-H&E-Färbung und CFU Quantifizierung in BAL-Flüssigkeit.

24 h nach der Infektion wurden die Mäuse eingeschläfert. (A) Für die Bewertung der peribronchialen und perivaskulären Entzündung wurden die Lungen-Paraffinschnitte mit H&E gefärbt. Das Diagramm stellt die Mittelwerte mit SEM (n=8). (B) Lungenhomogenaten wurden gesammelt und 2 Tage auf Agarplatten in Reihenverdünnungen kultiviert (links), CFU wurde gezählt. Auf dem Diagramm wurden einzelnen Datenpunkte mit Mittelwert ± SEM (n=8) dargestellt (rechts). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind angegeben (*p < 0,05, **p < 0,01).

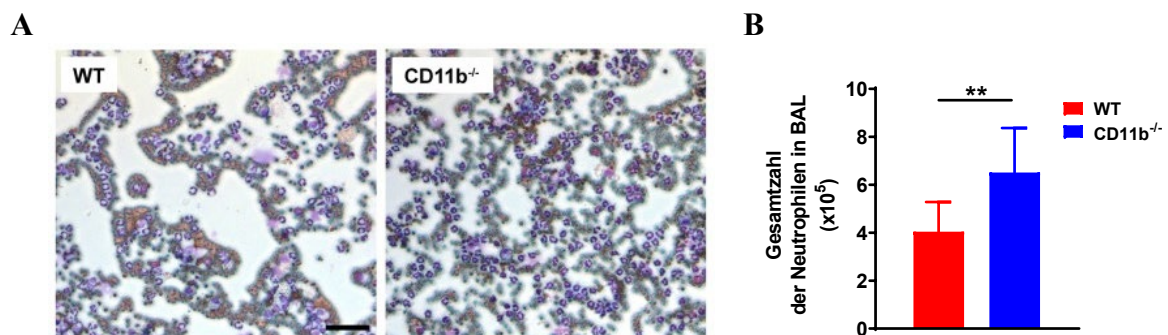


Abbildung 51. Quantifizierung von PMN in BAL-Flüssigkeit.

Cytospin-Präparate der Lungenhomogenaten wurden mit Diff Quick Staining Set® (Microoptic) gefärbt und Bilder wurden bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen (links). Vergrößerungsbalken: 50 µm. Gefärbte PMN wurden quantifiziert. Diagramm bezeichnet den Mittelwert mit SEM (n=4). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind angegeben (**p < 0,01).

2.7.3. *CD11b^{-/-}*-PMN charakterisiert eingeschränkte Phagozytose von *Aspergillus* Konidien

Die Phagozytose-Fähigkeit der PMN wurde durch Quantifizierung der internalisierten *A. fumigatus* Konidien mittels durchflusszytometrischen Methoden bestimmt. Dafür wurden PMN aus C57BL/6-Knochenmark durch magnetische Zellsortierung (MACS) unter Verwendung von an MicroBeads (Miltenyi Biotec) gekoppelten Ly6G-spezifischen Antikörpern gereinigt. Die Aufnahme der Pilz-Konidien durch *CD11b^{-/-}*-PMN war signifikant weniger effizient im Vergleich zu WT-PMN (Abbildung 52). Die phagozytische Aktivität von *CD11b^{-/-}*-PMN hinsichtlich *A. fumigatus* Konidien war im Vergleich zu WT-PMN beeinträchtigt und stimmte mit der Beobachtung einer erhöhten Lungenpilzbelastung in *CD11b^{-/-}*-Mäusen überein.

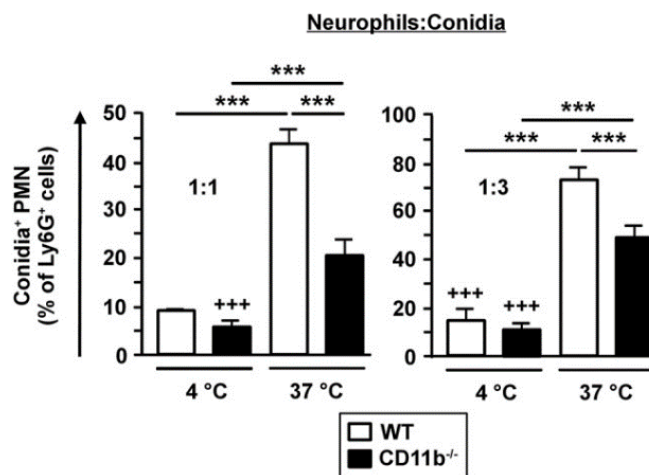


Abbildung 52. Quantitativer Nachweis der Phagozytose-Fähigkeit der PMN.

PMN wurden mit PE-fluoreszierenden *A. fumigatus* Konidien bei 4°C und bei 37°C im Verhältnis 1:1 bzw. 1:3 für 1 h ko-inkubiert. Die Daten stellen die Mittelwerte mit SEM dar (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind angegeben (***) $p < 0,001$.

2.7.4. Zytokinen- und Chemokinen-Nachweis in der BAL-Flüssigkeit der *CD11b^{-/-}*-Mäusen

Des Weiteren wurde die BAL-Flüssigkeit von Mäusen beider Mausstammen für die Analyse der Zytokin- und Chemokin-Gehalte gesammelt und unter Verwendung des zytometrischen Bead-Arrays quantifiziert. Die Analysen zeigten verglichen mit WT-Mäusen signifikant reduzierte Mengen an TNF- α , IL-1 α und IL-1 β sowie erhöhte Mengen an CCL5 in der BAL der *CD11b^{-/-}*-Mäusen (Abbildung 53).

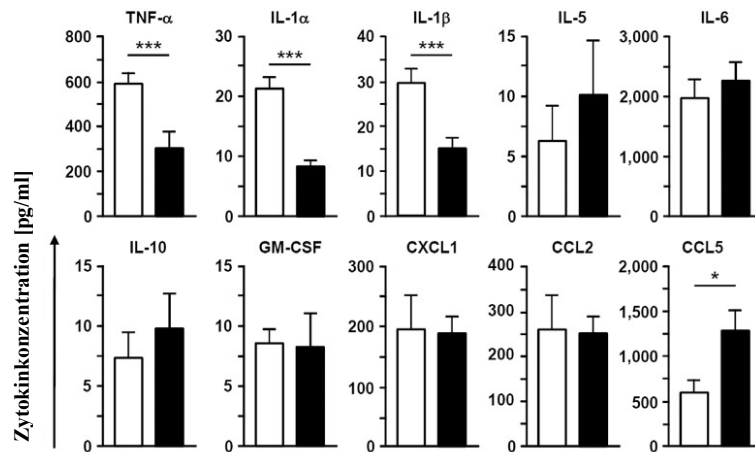


Abbildung 53. Zytokinen- und Chemokinen-Gehalt in BAL-Flüssigkeit.

Zytokinen- und Chemokinen-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit der $CD11b^{-/-}$ -Mäusen in der BAL-Flüssigkeit der WT- und $CD11b^{-/-}$ -Mäusen wurde durch zytometrisches Bead-Array (CBA Inflammation; BD Pharmingen) gemessen. Die Daten bezeichnen den Mittelwert \pm SEM von 4–8 analysierten Proben pro Gruppe. Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's *t*-Testes mit der GraphPad Prism 9.1.1 Software bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind angegeben (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

2.7.5. $CD11c^+$ PMN in $CD11b^{-/-}$ -Lungen nach 24h der intratrachealen *Aspergillus fumigatus* Inokulation

Die in Lungenhomogenaten enthaltenen PMN wurden durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei zeigte sich, dass $CD11b^{-/-}$ -PMN teilweise $CD11c$ exprimierten (Abbildung 54, Ergänzung 6).

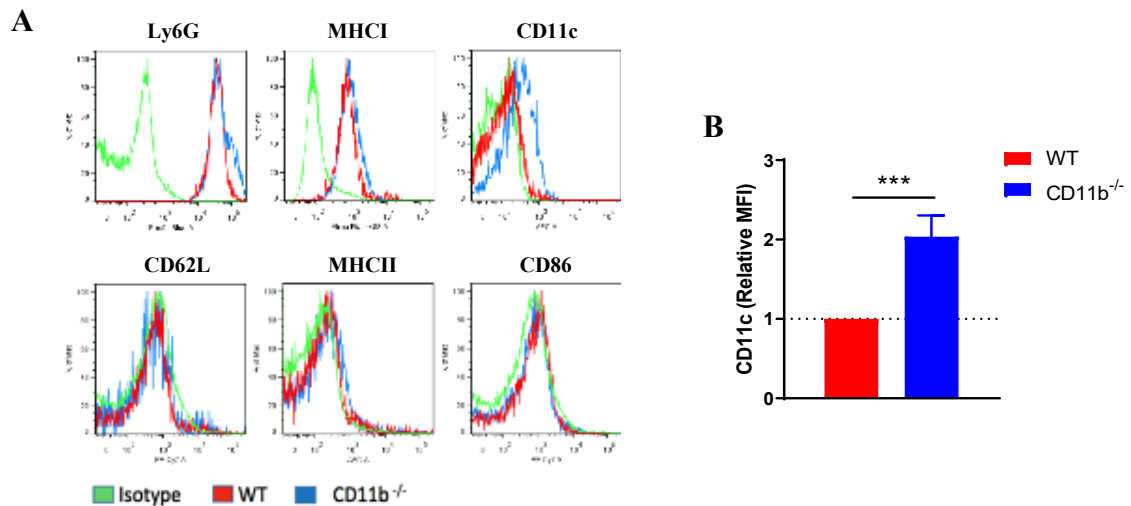
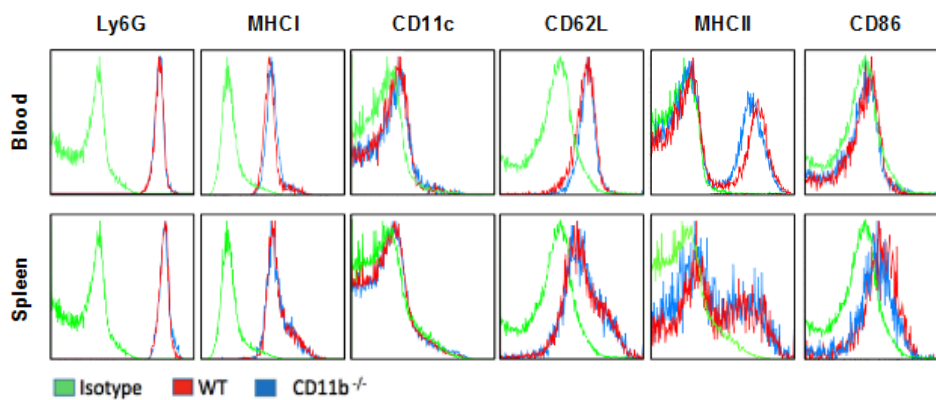
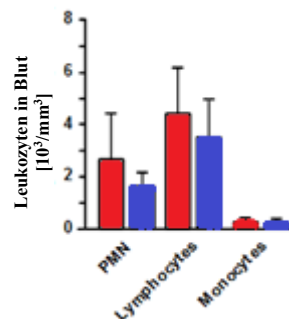


Abbildung 54. Der Immunphänotyp von PMN in BAL-Flüssigkeit.

Der Immunphänotyp von PMN in Lungenhomogenat wurde durch Durchflusszytometrie bestimmt. (A) Repräsentative Histogramme zeigen die Expression von ausgewählter Oberflächenmarkern der $Ly6G^+$ -Zellen. (B) Quantifizierung der $CD11c$ -Expression auf den $Ly6G^+$ PMN von BAL-Flüssigkeit. Das Diagramm bezeichnen die relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der $CD11c$ -Expression mit SEM ($n=8$). Statistisch signifikante Unterschied zwischen den Gruppen ist angegeben (** $p < 0,001$). Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

2.7.6. Frequenzen und Immunphänotyp von Leukozyten aus peripherem Blut und Milz von mit *A. fumigatus* infizierten WT- und *CD11b*^{-/-}-Mäusen bleibt unverändert

WT- und *CD11b*^{-/-}-Mäuse wurden intratracheal mit *A. fumigatus*, wie in 5.1.4 beschrieben. Einen Tag nach der Infektion wurden die Mäuse eingeschläfert und PMN wurden in BAL nachgewiesen. Die Leukozytenfrequenzen im Blut wurden unter Verwendung eines Hämatologie-Analysators bestimmt. Die Frequenzen an Immunzellpopulationen und die Expression von Aktivierungsmarkern in Blut und Milz wurden durch Durchflusszytometrie bestimmt. Die Analyse der Frequenzen und Immunphänotypen von Leukozyten aus peripherem Blut und Milz von mit *A. fumigatus* infizierten WT- und *CD11b*^{-/-}-Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 55).

A**B**

C

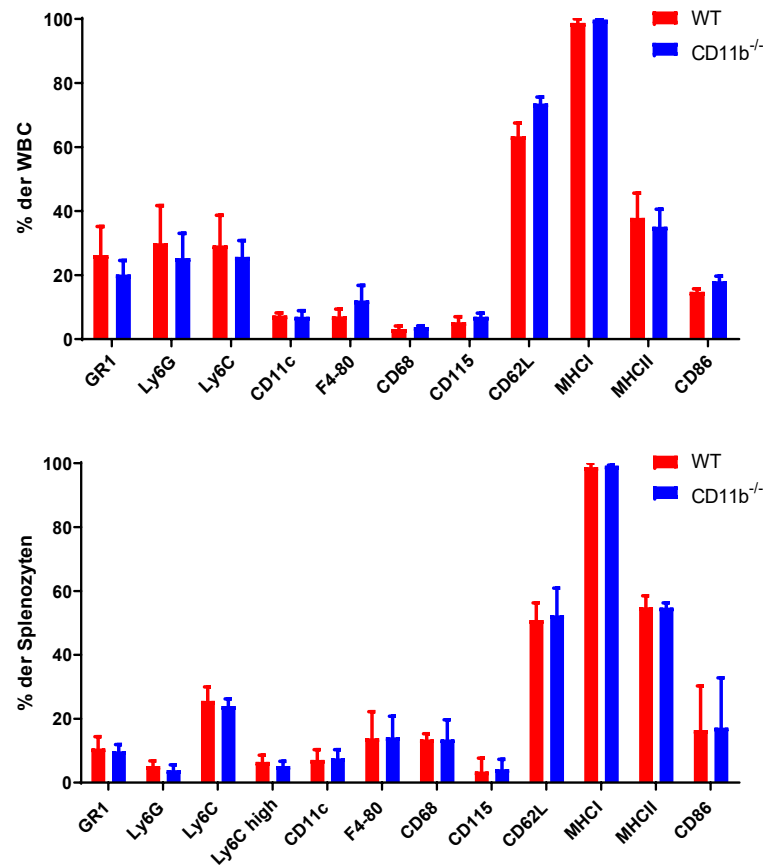


Abbildung 55. Zahlfrequenz und Markerexpression in Blut und Milz.

(A) Das Diagramm stellt Leukozytenfrequenzen in Blut von WT und CD11b^{-/-}-Mäusen. Die Daten bezeichnen den Mittelwert \pm SEM von 8 Proben/Gruppe. (B) Die Expression von Aktivierungsmarkern in Blut und Milz wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten bezeichnen den Mittelwert \pm SEM von 8 Proben/Gruppe. (C) Histogramme zeigen die Expression von Oberflächenmarkern der Ly6G⁺-Zellen und sind repräsentativ für 8 Proben/Gruppe. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

2.7.7. Gehalt der Zytokine und Chemokine im peripheren Blut von mit *A. fumigatus* infizierten WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen

Der Gehalt der Zytokine und Chemokinen im peripheren Blut von mit *A. fumigatus* infizierten WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen wurde am zweiten Tag der intratracheal *A. fumigatus*-Infektion mittels durchflusszytometrischen Methoden gemessen. Dafür wurden die Mäuse eingeschläfert und der Blutgehalt der angegebenen Mediatoren analysiert. Mit *A. fumigatus* infizierte CD11b^{-/-}-Mäuse zeigten tendenziell niedrigere Konzentration von IL-1 β im peripheren Blut auf im Vergleich zu WT-Mäusen. Die Konzentration an IL-1 α und Chemokinen war vergleichbar (Abbildung 56).

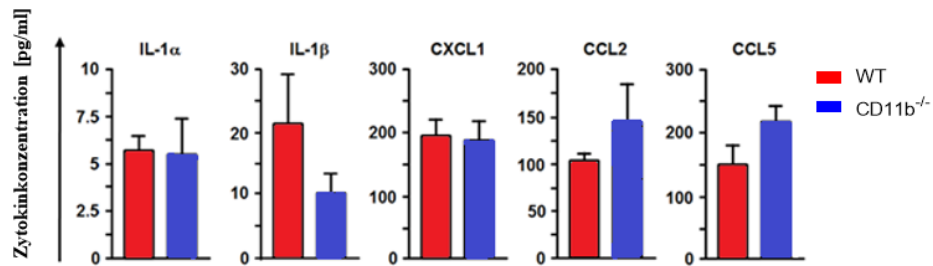


Abbildung 56. Gehalt der Zytokine und Chemokine in peripherem Blut.

Die Diagramme stellen die Zytokin- und Chemokinkonzentration im peripheren Blut von mit *A. fumigatus* infizierten WT- und CD11b^{-/-}-Mäusen dar. Mittels zytometrischen Bead-Array (CBA Inflammation; BD Pharmingen) wurde die Konzentration der IL-1 α , IL-1 β , CXCL1, CCL2 und CCL5 gemessen. Die Daten bezeichnen den Mittelwert \pm SEM von 4-8 analysierten Proben pro Gruppe.

3. Diskussion

β 2-Integrine sind Leukozyten-spezifische Oberflächenproteine, die aus einer variablen Alpha- (CD11a-d) und einer konstanten Beta- (CD18) Untereinheit bestehen und essenziell für viele immunologische Prozesse sind (Bednarczyk et al., 2020). Eine strenge Regulierung der Integrin-Aktivität ist für die normale Immunfunktion von größter Bedeutung (Kim et al., 2011). Die wesentliche Rolle von β 2-Integrin-Familienmitgliedern bei der Leukozytenfunktion kann durch den schweren Verlauf bei genetisch-bedingtem Mangel der β 2-Integrine – der sogenannten Leukozytenadhäsions-Defizienz Typ I (LAD-I) – bestätigt werden (Fagerholm et al., 2019; Harris et al., 2013). LAD-I ist ein sehr seltener primärer Immundefekt mit mangelnder Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und fehlender Migration in entzündetes Gewebe. Bei LAD-I ist die Expression von CD18 infolge einer Mutation entweder vermindert oder fehlt komplett. Die Patienten leiden an Bakterien- und Pilzinfektionen der Haut und anderer Gewebe, einschließlich einer hohen Inzidenz von Aspergillose (Kuijpers et al. 2007), einer verzögerten Wundheilung, Parodontitis, Leukozytose sowie Candidose (Fagerholm et al., 2019). Des Weiteren haben LAD-1 Patienten eine erhöhte Prädisposition für Autoimmunerkrankungen und Allergien (Franceschi et al., 2015). Forschungen an Patienten mit LAD-1 erlaubten Funktionsanalysen der β 2-Integrine, aber keine Bewertung des individuellen Beitrags jedes der vier β 2-Integrine zu den beobachteten phänotypischen Anomalien. Erst die Erzeugung transgener Mäuse, bei denen jeweils eine einzelne Alpha - Untereinheit (CD11a-d) fehlen, ermöglichte es, die Bedeutung der einzelnen β 2-Integrine für Leukozytenadhäsion und -Funktion zu analysieren (Arnaout, 2016). Die bedeutendste Rolle für viele Leukozyten-Funktionen, einschließlich interzellulärer Interaktionen und der intrazellulären Signalübertragung, wurden LFA-1 (CD11a/CD18) (Xingyuan et al., 2006) und Mac-1 (CD11b/CD18) (Podolnikova et al., 2015) zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des β 2-Integrins Mac-1 für die Differenzierung muriner myeloider Immunzellen sowie für ihre funktionalen Eigenschaften *in vitro* und am Beispiel der *Aspergillus fumigatus*-Infektion im Maus-Modell untersucht.

3.1. Bedeutung von Mac-1 für die Differenzierung, Reifung und Aktivierung myeloider Immunzellen

3.1.1. Bedeutung von Mac-1 für die DC-vermittelte T-Zell-Stimulierung

Mac-1 (CD11b/CD18) wird auf cDC2 und moDC sowie in vitro differenzierten BMDC (Liu, 2001) exprimiert und liegt unter Basalbedingungen in inaktiver Form vor (Metelitsa et al., 2002). Die Bindung eines Agonisten oder eines entsprechenden Pharmakons (z.B. Leukadherin) führt zur Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des Integrins, was zur Aktivierung führt (Varga et al., 2007). Mac-1 wurde als wichtiger Teil des regulatorischen Systems der Immunantwort bezeichnet, wobei es Leukozytenfunktionen, einschließlich Adhäsion, Migration, Phagozytose und oxidative Burst reguliert (Plow & Zhang, 1997, Ding et al., 1999, Podolnikowa et al., 2023). Viele seiner Funktionen sind aber noch nicht bekannt und werden weit geforscht.

In dieser Studie wurde die Bedeutung von Mac-1 auf DC und PMN ohne eine forcierte Aktivierung untersucht. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Mac-1 für die T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften von Milz-, Blut- und BMDC untersucht. Diese Experimente zeigten eine verminderte CD8⁺ T-Zell-Stimulierungskapazität der LPS-stimulierten Milz- und Blut-DC von CD11b^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen (Abbildung 20, Abbildung 22). Diese Ergebnisse ähneln dem Befund von Ling et al., 2014, die zeigten, dass die Abwesenheit von CD11b auf DC eine beeinträchtigte TLR4-Signalübertragung und eine schlechtere Induktion von T-Zell-Antworten verursachen kann.

Obwohl die APC-Funktion der Milz- und Blut-CD11b^{-/-}-DC stark beeinträchtigt war, zeigte sich keine Einschränkung in der TLR4-abhängigen DC-Reifung, wie die Genotyp-unabhängige Expression beziehungsweise LPS-vermittelte Aufregulation von MHCII und CD86 nahelegt (Abbildung 19, Abbildung 21). Ähnliche Ergebnisse stellten Ehrchiou et al., 2007, dar. In ihrer Studie wurde gezeigt, dass die CD11b-Defizienz keinen signifikanten Einfluss auf die Reifung der DC-Population innerhalb der drainierenden Mesenteriallymphknoten hatte, einschließlich der DC-Reifungsmarker CD40 und CD86.

Des Weiteren wurden Untersuchungen der Bedeutung von Mac-1 für die T-Zell-Aktivierungskapazität von in vitro kultivierten GM-CSF-induzierten-BMDC vorgenommen, wobei, im Gegenteil zu Milz- und Knochenmark-DC, alle BMDC Mac-1 exprimieren. Die BMDC wurden 7 Tage mit pro-inflammatorischem Zytokin GM-CSF ohne pharmakologische Aktivierung von

Mac-1 differenziert. Sowohl WT- als auch CD11b^{-/-}-BMDC aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auch ohne vorherige Stimulierung, im Gegensatz zu Milz- und Knochenmark-DC, die im unstimulierten Zustand keine oder nur eine sehr geringe T-Zell-Stimulierungskapazität zeigten (Abbildung 24, Abbildung 25, Ergänzung 1).

Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Stimulierungskapazität der BMDC beider Genotypen wurde durch die LPS-Stimulierung zusätzlich leicht erhöht und bleibt Genotyp-unabhängig.

Unter Berücksichtigung der Expression von Aktivierungsmarkern deutete die BMDC-Phänotypisierung auf eine Beeinträchtigung der CD11b^{-/-}-BMDC-Reifung sowie -Differenzierung und damit der Mac-1-abhängigen GM-CSF-Rezeptorsignalisierung hin. Sowohl die unstimulierte als auch stimulierte CD11b^{-/-}-BMDC zeigten eine signifikant reduzierte Expression von MHCII und CD86 gegenüber der WT-Population (Abbildung 23).

Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von Mac-1 auf den APC ihre T-Zellstimulationskapazität vermindert. Laut aktuellen Studien, die Liganden-spezifische Mac-1-Induzierung sowohl immunstimulierend als auch immunsuppressiv wirken kann, da es über unterschiedliche Bindungsstellen verfügt, an die sowohl agonistische als auch antagonistische Liganden binden können.

Es wurde von Varga et al., 2007 gezeigt, dass eine Mg²⁺-abhängige Mac-1-Induzierung auf BMDC zur Hemmung ihrer T-Zell-Aktivierungs-Kapazität führt. Blockierende Antikörper gegen CD18 und CD11b, aber nicht gegen CD11c konnten diesen Effekt neutralisieren, was den Beitrag der von Mg²⁺ aktivierten Form des Mac-1 bei der Reduzierung der T-Zellen-Proliferation beweist.

Wolf et al., 2018, haben gezeigt, dass die Bindung eines agonistischen Antikörpers Anti-M7 an Epitop M-7, das sich innerhalb der Mac-1 I-Domäne befindet, die Bindung eines iC3b-opsoniertes Pathogen erhöhen kann, die Phagozytose fördert und die adaptive T-Zell-Immunität verbessert, ohne Outside-in-Signalisierung zu induzieren.

Eine immunsuppressive Rolle für Mac-1 hat Podgrabinska et. al, 2009 beschrieben. Ihre Studie ergab, dass das lymphatische Endothel die Reifung und Funktion der durchfließenden DCs modulieren kann. In Abwesenheit von Pathogen-abgeleiteten Signalen hemmte die Interaktion zwischen Mac-1 auf DC und ICAM auf Endothelzellen die CD86-Expression auf DC und führte zu einer beeinträchtigten DC-induzierten T-Zell-Aktivierung in vitro (Podgrabinska et al., 2009).

Des Weiteren zeigten Ehirchiou et al. (2007) eine wichtige Rolle von Mac-1 für die Entwicklung der oraler Immuntoleranz. Es wurde berichtet, dass Mac-1 die Entwicklung einer oral induzierten Toleranz erleichtert, indem es die Th17-Differenzierung und damit IL-17-Produktion gehemmt wird (Ehirchiou et al., 2007). Die CD11b-Defizienz beeinträchtigte die Etablierung einer oralen Toleranz, ohne die Reifung von APCs, einschließlich der DC-Reifungsmarker CD40 und CD86 zu beeinflussen (Ehirchiou et al., 2007).

Aktuelle Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass Mac-1 ein wichtiger Bestandteil der Immunantwortregulation ist. Durch die Regulierung der Ligandenbindung kann die systemische Aktivierung oder Deaktivierung von Mac-1 induziert werden und damit kann eine entsprechende Immunantwort ausgelöst werden.

3.1.2. Bedeutung von Mac-1 für die Knochenmarkzellenbildung

Die Hämatopoese wird durch Zytokine und durch die Interaktion von Vorläuferzellen mit dem Knochenmarksstroma gesteuert. Der enge Kontakt zwischen Progenitorzellen und Stroma scheint durch mehrere unterschiedliche Rezeptor-Liganden-Bindungsereignisse vermittelt zu werden. Coombe et al., 1994, dokumentierten, dass auch Mac-1 für die Adhäsion hämatopoetischer Vorläuferzellen an Stroma-Zellen über die Erkennung von Stromal-Heparansulfat verantwortlich ist. Schon im frühen Stadium der Hämatopoese werden Adhäsionsmoleküle wie das Leukozyten-Adhäsions-Protein Mac-1 exprimiert (Smith, 2007), was für seine Bedeutung für die Blutzellbildung im Knochenmark sprechen könnte.

In der vorliegenden Studie wurde auch die Rolle von Mac-1 für die Knochenmarkzellen-Differentiation untersucht. Um die Bedeutung von Mac-1 auf die quantitative Zusammensetzung der hämatopoetischen Zellen im murinen Knochenmark zu beurteilen, wurden CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen hinsichtlich der Expression verschiedener Differenzierungsmarker mittels durchflusszytometrische Analyse untersucht. Die Observation weist auf eine regulatorische Bedeutung von Mac-1 auf den Monozyten-/Granulozyten-Anteil im Knochenmark hin. Durch den systemischen Knockout des ITGAM-Genes bei C57BL/6-Mäusen wurde die Frequenz der Granulozyten und Monozyten im Vergleich zu WT-Knochenmarkszellen signifikant beeinflusst (Abbildung 28). Die Expressionsanalyse des granulozytären Markers Ly6G weist auf einen erhöhten Anteil der Granulozyten von 41% in WT- gegenüber 52% in der Gesamtpopulation des Knochenmarks CD11b^{-/-}-Mäuse hin. Damit wurde eine wesentliche Bedeutung von Mac-1 für die Limitierung der PMN-Differenzierung gefunden, die durch wesentlich höheren Anteil der Ly6G⁺CD48⁻ PMN des Knochenmarks von

CD11b^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen widergespiegelt wird (Abbildung 28). Es wurde auch von Coxon et al. (1996) beschrieben, dass die Apoptose von extravasierten peritonealen PMN *in vitro* bei CD11b^{-/-}-Mäusen signifikant verzögert ist, was zeigt, dass die Apoptose der PMN über Mac-1-abhängige Mechanismen moduliert wird.

Die Aufrechterhaltung der Homöostase von PMN kann von Mac-1 gesteuert werden, dank der Vielfalt seiner Liganden. Je nach Art der Liganden kann ihre Bindung an β 2-Integrin Mac-1 entweder Überlebenssignale modulieren oder die Apoptose beschleunigen (Walzog et al., 1997). PMN-Apoptose induzierende Effekte wurden bei Bindung von Mac-1 an Heparin (in Form von Heparansulfat) (Diamond et al., 1995) sowie an Komplement-opsonierte Bakterien (Zhang et al., 2003) gefunden. Hingegen berichten Rubel et al., 2003, dass die Interaktion von Fibrinogen mit Mac-1 auf menschlichen PMN Apoptose inhibierte. Ein unterdrückender Effekt auf Neutrophil-Apoptose wurde auch bei Wechselwirkungen von Mac-1 mit ICAM-1 (Watson et al., 1997) und Plasminogen (Pluskota et al., 2008) beschrieben. Des Weiteren stellten Kebir et al., 2008, die These auf, dass die Wechselwirkungen von Myeloperoxidase (MPO) und Mac-1 die PMN-Apoptose verzögert. MPO, ein Hämprotein, das von PMN exprimiert wird, wird im Allgemeinen mit der Abtötung von Bakterien und oxidativen Gewebeschäden in Verbindung gebracht, kann aber auch an PMN binden. Die Wechselwirkung von Mac-1 mit MPO konnte die Lebensdauer menschlicher PMN verlängern (Kebir & Filep, 2013).

Jedoch wird die PMN-Homöostase nicht nur durch Apoptose der Zellen, sondern durch ein komplexes Zusammenspiel vieler Prozesse beeinflusst. Die Regulation der Granulopoese erfolgt auf Transkriptionsebene durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine) aber ebenfalls durch die Wachstumsfaktoren GM-CSF, G-CSF und SCF (Ward et al., 2000). Eine Auswirkung auf die Proliferation der Vorläuferzellen und Differentiation der PMN hat das Vorhandensein von Pathogenen (Barman & Goodridge, 2022). Die Erkennung von Pathogen-assoziierten Strukturen durch eine Vielzahl angeborener Immunrezeptoren wie den TLRs auf geweberesidenten hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen am Ort des Pathogeneintritts löst eine Kaskade von Signalereignissen aus, die zur Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen führt (Mayadas et al., 2014). Um die Bedeutung von Mac-1 für die PMN-Homöostase zu beurteilen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Daten, die in dieser Studie erfasst wurden, deuten darauf hin, dass Mac-1-Signaltransduktion ein Teil der Regulationskaskade der Granulopoese sein könnte.

Weitere durchflusszytometrische Analyse zeigte eine reduzierte CD18-Expression auf der Zelloberfläche von CD11b^{-/-}- im Vergleich zu WT-Zellen (Abbildung 26). Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Integrine LFA-1 und Integrin p150, 95 (CD11c/CD18) festgestellt. Sowohl bei der WT- als auch CD11b^{-/-}-Mäusen der Anteil der CD11a⁺ Zellen wurde bei über 95% und CD11c⁺ Zellen bis zu 5% aller Knochenmarkzellen detektiert. Die unveränderte Expression der anderen β 2-Integrinen zeigte, dass das Fehlen von CD11b durch Überexpression anderer β 2-Integrine nicht kompensiert wurde.

Zusätzlich wurde der Einfluss von Mac-1 auf die Expression von CD115, CD68, CD62L, F4/80 und MHCII auf den frisch isolierten Knochenmarkzellen untersucht. Jedoch wurden beim Vergleich der WT- und CD11b^{-/-}-myeloiden Knochenmarkzellen keine signifikanten Unterschiede in der Expression dieser Moleküle gefunden (Abbildung 27).

3.1.3. Bedeutung von Mac-1 in der GM-CSF-induzierten Knochenmarkzellendifferenzierung der myeloiden Linie

GM-CSF wurde ursprünglich aufgrund seiner Fähigkeit Granulozyten- und Makrophagenpopulationen aus Vorläuferzellen zu induzieren als koloniestimulierender Faktor beschrieben. GM-CSF vermittelt verschiedene Signale für die Zellproliferation und das Überleben hämatopoetischer Zellen (Hercus et al., 2009). Die GM-CSF Produktion im Organismus steigt bei Exposition gegenüber entzündlichen Stimuli schnell an (Cebon et al., 1994), was darauf hindeutet, dass GM-CSF eine Rolle bei Entzündungen spielt und für Induktion einer Notfall-Myelopoese wichtig ist. Mehrere Studien haben gezeigt, dass GM-CSF auch ein immunmodulatorisches Zytokin ist, das nicht nur den Phänotyp von Zellen der myeloider Abstammung beeinflusst, sondern auch die T-Zell-Aktivierung durch verschiedene myeloide Zwischenprodukte reguliert (Lotfi et al., 2019; Hamilton, 2020). (Lotfi et al., 2019; Hamilton, 2020). Durch die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in Granulozyten, Makrophagen und DC sowie durch die Modulation des Phänotyps reifer myeloider Zellen spielt GM-CSF auch außerhalb der Myelopoese eine tiefgreifende Rolle bei der Regulierung der Immunantwort (Bhattacharya et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Mac-1 auf die GM-CSF-induzierte Differenzierung von Knochenmarkzellen *in vitro* untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst an Tag 3 der GM-CSF-haltigen Kultur untersucht. Exposition zu GM-CSF führt zur Differenzierung von BMDCs aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, dient aber auch als zellulärer Überlebens-Faktor für PMN und als PMN-Aktivator. Im Laufe der BMDC-

Differenzierungskultur entsteht standardmäßig eine zunehmende Fraktion CD11c^{high} monozytärer Zellen, die MHCII und CD86 auf ihrer Oberfläche ko-exprimieren und damit als BMDC identifiziert werden. Die durchflusszytometrische Analyse verschiedener Oberflächenmarker zeigte signifikante Genotypen-abhängige Expressionsunterschiede sowohl für die Granulozyten-Marker GR1 und Ly6G als auch Ly6C, CD11c, CD18 und CD48.

BMDC-Kulturen am Tag 3 der GM-SCF-Stimulierung beider Genotypen weisen jeweils tendenziell einen ganz leichten Rückgang des prozentualen Anteils von Ly6G⁺CD48⁻ PMN, von durchschnittlich circa 41% auf 37% bei der WT-Kultur und bei der CD11b^{-/-}-Kultur von 52% auf 50% innerhalb der ersten drei Tage auf (Abbildung 29). In einem ein Mal durchgeführten Experiment der H₂O₂-bedingten Apoptose wiesen die über 3 Tage mit GM-CSF kultivierten CD11b^{-/-}-Granulozyten eine verzögerte Apoptose im Vergleich zu WT-Granulozyten auf, sowohl ohne Stimulierung als auch nach der LPS-Induktion (Ergänzung 7). Dies könnte das Konzept unterstützen, dass Unterschiede in der PMN-Frequenz in beiden Kulturen auf die Mac-1-Abwesenheit-bedingte Veränderungen im Apoptose-Prozess der polymorph-kernigen Zellen zurückzuführen sind.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Mangel an CD11b-Oberflächenexpression auch zu einer signifikanten de novo-Expression von CD11c auf CD11b^{-/-}-PMN führt. Hingegen wurden in der WT-Kultur keine CD11c⁺ Granulozyten detektiert. Trotz der de novo-Expression von CD11c zeigten alle analysierten CD11b^{-/-}-PMN eine reduzierte CD18-Expressionsdichte. Weitere Analysen zeigten eine geringere Differenzierung der CD11b^{-/-}Ly6G⁻CD48⁺ Population zu BMDC. Obwohl am Tag3 der GM-CSF-Kultur die CD11b^{-/-}-Kultur ein höherer Prozentsatz an CD11c-positiven Zellen aufwies, betrug der Prozentsatz der CD11c⁺MHCII⁺ BMDC nur 10%, während die WT-Kultur bereits etwa 20% an CD11c⁺MHCII⁺ BMDC beinhaltet (Abbildung 30). Weitere durchflusszytometrische Analysen der CD115-, CD62L-, CD54-, CD49d-, β7-, F4/80- und CD68-Markerexpression auf den myeloiden Zellen am Tag3 der BMDC-Kultur hat keine signifikante Genotyp-abhängige Unterschiede nachgewiesen (Abbildung 31).

Mit intrazellulärer-FACS-Färbung ließ sich in den CD11b^{-/-}-Zellen eine erhöhte basale Expression von CD11c und reduzierte basale Expression von CD18 nachweisen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zunahme der CD11c-Expression auf der Zelloberfläche als kompensatorischer Effekt für die fehlende CD11b-Expression zurückzuführen ist (Abbildung 32).

Zusätzlich wurde, bezogen auf die Gesamtkultur, tendenziell eine höhere Ly6G- und Ly6C-Oberflächenprotein Menge sowie eine niedrigere Oberflächenexpression von CD48 gefunden, was die vorgenannte Beeinträchtigung der Differenzierung von CD11b^{-/-}-myeloiden Zellen bestätigt.

Des Weiteren wurden die Knochenmarkzellen 4 Tage mit GM-CSF kultiviert, anschließend mittels anti-CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec) sortiert. Die CD11c⁺ Population der GM-CSF-Kulturen von Wildtyp-Knochenmarkszellen war homogen und bestand primär aus CD11c⁺MHCII⁺CD80⁺ BMDCs. Demgegenüber beinhaltete die CD11c⁺ Population der CD11b^{-/-}-Kulturen CD11c⁺MHCII⁺CD80⁺ BMDCs und CD11c⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}MHCII⁻ PMN/DC-Hybride (Abbildung 33, Abbildung 34).

3.1.4. Wechselwirkungen von WT- mit Mac-1-defizienten-KM-Zellen in GM-CSF-haltiger Kultur induzieren CD11c-Expression auf WT-Granulozyten und inhibieren die CD11c-Expression der CD11b^{-/-}-Granulozyten

Matsushima et al., 2013, zeigten, dass aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen gereinigte Gr-1^{high}CD48⁻ PMN nach 4-tägiger Kultivierung in GM-CSF unter Wechselwirkungen mit BM-Feeder Zellen CD11c auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die Entstehung von PMN-DC-Hybriden erfolgte auch ohne den Einfluss von BM-Feeder Zellen, aber erst nach 9 tägiger GM-CSF-Kultivierung (Matsushima et al., 2013). Damit wurde gezeigt, dass auch wildtypische PMN in der Lage sind, unter bestimmten Bedingungen die Expression von CD11c zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Hochregulation der CD11c-Expression auf CD11b^{-/-}-PMN infolge einer 3-tägigen GM-CSF-Inkubation beobachtet, wobei auf WT-PMN keine CD11c-Expression auftrat. Insofern war die beschleunigte Entstehung von CD11c⁺ PMN von dem Fehlen der Mac-1- Expression abhängig. Aufgrund der Möglichkeit, dass Mac-1-abhängige Zell/Zell-Interaktion die Expression von CD11c auf PMN inhibiert, stellte sich die Frage, ob die Wechselwirkungen von WT- mit CD11b^{-/-}-PMN die CD11c-Expression beeinflussen können. Dafür wurden WT- und CD11b^{-/-}-KM-Zellen zusammen in die GM-CSF-haltige-Kultur eingesetzt und nach drei Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Ca. 50% der CD11b⁺CD11c⁺ Wildtyp-Zellen waren Ly6G⁺ PMN, die im Vergleich zu CD11b^{-/-}-CD11c⁺ PMN eine sehr geringere Dichte der CD11c-Moleküle aufwiesen. Trotzdem bestätigte die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität für die WT-Population in der Wildtyp/CD11b^{-/-} Mischkultur eine höhere Konzentration an CD11c im Vergleich zu Kultur

von WT-Knochenmarkszellen ohne CD11b^{-/-} Knochenmarkszellen. Hingegen war die Frequenz der CD11b^{-/-}-CD11c⁺ PMN in der Mischkultur reduziert und, damit korrelierend, die CD11c-Expressionsdichte auf den PMN erheblich geringer als in der CD11b^{-/-}-Knochenmarkskultur. Diese Daten weisen darauf hin, dass Mac-1-Wechselwirkungen die CD11c-Expression auf PMN regulieren können (Abbildung 35, Ergänzung 2).

3.1.5. Charakteristik der CD11b^{-/-}-BMDC

Mit GM-CSF aus Knochenmarkszellen differenzierte BMDC werden häufig als Modellsystem für die Entwicklung und Funktion von DC verwendet (Nikolic et al., 2003). Unter diesen Konditionen entstehen BMDCs, die mit inflammatorischen DC in vivo gut überlappen (Na et al., 2016). Weitere Studien zeigen jedoch eine Heterogenität der BMDC-Kulturen (Helft et al., 2015). GM-CSF-induzierte BMDC-Kultur präsentieren nämlich eine Mischkultur, die standardmäßig nur bis zu 70% ausdifferenzierte BMDC bezogen auf Gesamtkultur beinhaltet. Der Rest der Zellen umfasst eine Mischung von Makrophagen und anderen, uncharakterisierten Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Mac-1 für die GM-CSF-bedingte BMDC-Ausdifferenzierung untersucht.

Nach dem in dieser Studie vorgenommenen BMDC-Isolations-Protokoll (siehe Kapitel) wurden BMDC-Mischkulturen erhalten, die standardmäßig bis zu 70% der BMDC beinhalten. In Parallelansätzen wurden die BMDC-Kulturen mit Lipopolysaccharid kultiviert, das über den TLR4-Rezeptor auf der Zelloberfläche stimulierende Signale vermitteln und die DC-Reifung induziert (Vidya et al., 2018). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz von der CD11c⁺ Zellen beider Mausstämmen, sowohl ohne als auch nach LPS-Stimulierung der BMDC-Kulturen gefunden (Abbildung 36 A). Jedoch nach der LPS-Stimulierung war der Prozentsatz der CD11c^{high} Zellen in der CD11b^{-/-}-Kultur signifikant niedriger im Vergleich zu WT-Kultur (Abbildung 36 B). Die Analyse der CD11c-Expression auf der MFI-Ebene deutete aber auf eine Überexpression dieses Proteins pro CD11c^{high} Zelle auf der CD11b^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Gegenständen (Abbildung 36 C).

Die durchflusszytometrische Zell-Phänotypisierung der BMDC-Kulturen zeigte deutlich eine eingeschränkte GM-CSF-bedingte BMDC-Ausdifferenzierung aus der CD11b^{-/-}-Vorläuferzellen. Die WT-BMDC-Kultur beinhaltete circa 60% BMDC (CD11c^{high}MHCII^{low/high}CD86^{low/high}CD48^{low/high}Ly6G⁻Ly6C^{+/-}) wobei in der CD11b^{-/-}-Kultur nur 40% der BMDC mit diesem Phänotyp präsent waren (Abbildung 38 A). Die Frequenz

sowohl der MHCII^{high}CD86^{high} als auch der MHCII^{low}CD86^{low} BMDC war in der CD11b^{-/-}-Population erniedrigt. Des Weiteren wurde in der CD11b^{-/-}-Kultur ein kleiner Anteil der CD11c⁺Ly6G⁺ Zellen gefunden (Abbildung 37).

In weiterem Schritt wurde die Bedeutung von Mac-1 auf die LPS-Stimulierungseffekte mittels durchflusszytometrische Analyse der Zellmarker überprüft. Die LPS-Stimulierung der BMDC führt über den Rezeptor TLR4 zur Aktivierung der NF-κB-Signalübertragung und MAPK-Wege, die die Hochregulation der Expression von ko-stimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche modulieren (Casals et al., 2007). In dieser Studie zeigte die durchflusszytometrische Phänotypisierung der CD11c⁺-Zellen, dass LPS-Induktion zur Hochregulation der Expression von MHCII, CD86 auf BMDC beider Mausstämme führte, indem die MHCII^{high}CD86^{high} BMDC-Fraktion signifikant zugenommen hat und die MHCII^{low}CD86^{low} BMDC-Fraktion stark reduziert wurde. In der WT-Kultur hat sich der Prozentsatz der MHCII^{high}CD86^{high} BMDC verdreifacht und in der CD11b^{-/-}-Kultur verdoppelt. Dafür die MHCII^{low}CD86^{low} BMDC-Fraktionen beider Mausstämmen verminderte sich zu 15 %. Des Weiteren die LPS-Stimulierung bewirkte signifikant WT-BMDC durch die Hochregulierung der CD48-Expression. Über signifikanter Zunahme unter entzündlichen Bedingungen der CD48-Expression auf Monozyten haben schon, 1998, Latchman et al. geschrieben. Die wichtige Rolle von CD48 wurde bei der Stabilisierung der APC-T-Zelle-Synapse gefunden; durch seine Expression auf APCs kann die T-Zell-Aktivierung verstärkt werden (McArdel et al., 2016). Jedoch im Gegensatz zu WT-BMDC, wurde in der CD11b^{-/-}-Kultur die LPS-bedingte Hochregulation der CD48-Expression signifikant beeinträchtigt. Nur ein kleiner Anteil der CD11b^{-/-}-BMDC hat die CD48-Expression hochreguliert, wobei fast alle WT-BMDC das CD48 stark exprimierten. Im Endeffekt die reife BMDC mit dem Phänotyp CD11c^{high}MHCII^{high}CD86^{high}CD48^{high}Ly6G⁻Ly6C⁻ konstituierten über 60% der WT-Kultur und unter 40 % der CD11b^{-/-}-Kultur.

In der CD11b^{-/-}-Kultur wurde nicht nur die LPS-bedingte Runterregulation der CD48-Expression gefunden, sondern auch unerwartete Zunahme der Ly6G⁺ Fraktion der CD11c⁺ Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Defizienz an CD11b^{-/-} zu dem veränderten Effekt der LPS-Stimulierung auf die BMDC-Kultur führt. In der WT-Kultur wurde LPS-bedingte Reifung der BMDC beobachtet, wobei die LPS-Zugabe in die CD11b^{-/-}-Kultur hat auch die Ausdifferenzierung von DC/PMN-Hybriden ausgelöst, die sowohl die DC-Marker-Expression CD11c und Neutrophilen-Marker-Expression Ly6G aufwiesen und in großem Teil auf Ihrer

Oberfläche auch CD48 exprimierten (Abbildung 38 B). Die CD11c-Expression auf der Oberfläche von CD11b^{-/-}-Granulozyten wurde auch mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie bestätigt (Abbildung 39).

Die in dieser Studie gezeigte veränderte LPS-Signalübertragung bei der CD11b^{-/-}-Zellen kann daran liegen, dass Mac-1 als LPS-Rezeptor dienen kann. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass für humane Makrophagen eine Bindung von LPS auf der Oberfläche Gram-negativen Bakterien wie auch von LPS-beschichteten Erythrozyten an β 2-Integrine festgestellt wurde (Wright & Jong, 1986). Perera et al., 2001, beweisen auch, dass für die Expression eines vollständigen Repertoires an LPS-induzierbaren Genen (einschließlich COX-2, IL-12p35 und IL-12p40) durch niedrige LPS-Konzentrationen Mac-1, CD14 und TLR4 koordiniert zusammenwirken müssen. Des Weiteren ist Mac-1 auch für die optimale Aktivierung von MAPK- und NF- κ B-Genen essenziell; in CD11b/CD18-defizienten Makrophagen wurde diese fehlreguliert (Perera et al., 2001). Die Bestimmung der Zytokinsekretion der LPS-stimulierten CD11b^{-/-}-BMDC-Kultur zeigte tendenziell reduzierte IL-12-Produktion sowie eine signifikant erhöhte Ausschüttung von IL-10 im Vergleich zu WT-BMDC. Die Zytokine IL-23 p19/p40, TNF- α und IL-1 β zeigten keine signifikant Genotyp-abhängigen Unterschiede (Abbildung 40).

Darüber hinaus war die CD11b^{-/-}-Kultur durch eine wesentlich höhere Frequenz an CD11c^{low}-Zellen charakterisiert, die zum großen Teil einen granulozytären Ly6G⁺CD48⁻ Phänotyp aufwiesen. Des Weiteren beinhaltete die WT-Mischkultur lediglich CD11c^{low} Zellen monozytärer Herkunft (CD11c^{low}Ly6C⁺Ly6G⁻MHCII⁻CD86⁻) und Granulozyten, die keine CD11c-Expression aufwiesen. Demgegenüber enthielt die CD11b^{-/-}-BMDC-Kultur zwei morphologisch und phänotypisch unterschiedliche CD11c⁺-Populationen: CD11c^{high} BMDC sowie CD11c^{low} Granulozyten. Diese Ergebnisse zeigten CD11b^{-/-}-bedingte Veränderung der GM-CSF-Signalübertragung, was in der Zellbestandzahl und Charakter der nicht-BMDC-Zellen beider Mausstämme gespiegelt wird (Abbildung 41 A).

Nach der LPS-Stimulierung hat die Frequenz der Granulozyten in CD11b^{-/-}-Mischkulturen zugenommen. Die CD11c^{low/-}-Fraktion der LPS-stimulierten CD11b^{-/-}-Mischkultur umfasste vorwiegend granulozytäre CD11c^{low}CD48⁻Ly6G⁺Ly6C⁺MHCII⁻CD86⁻ Zellen und zum kleinen Teil CD11c^{low/-}Ly6C⁺Ly6G⁻CD48⁻MHCII⁻CD86⁻ Monozyten. Stattdessen beinhaltete die non-BMDC-Fraktion der WT-Kulturen primär CD11c⁻Ly6C⁺Ly6G⁻CD48⁻MHCII⁻CD86⁻ Monozyten und nur einen kleinen Prozentsatz an Granulozyten (Abbildung 41 B).

Die durchflusszytometrische Analyse der Expression von Granulozyten- und Monozyten-Marker in 3 verschiedenen Zeitpunkten: am Tag 0, Tag3, Tag 7 \pm LPS der Knochenmarkzellenzüchtung hat eine wesentliche Bedeutung von Mac-1 für die GM-CSF-bedingte DC-Differenzierung und deren LPS-induzierte Stimulierung ergeben (Abbildung 41). Die Abwesenheit des β 2-Integrins Mac-1 auf den Vorläuferzellen beeinträchtigte deren Ausdifferenzierung zu CD11c^{high}MHCII⁺ BMDC. Stattdessen zeigten GM-CSF-Differenzierungskulturen von CD11b^{-/-} Knochenmarkszellen zu allen untersuchten Zeitpunkten eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Frequenz an PMN. Zusätzlich induzierte die Behandlung der BMDC-Mischkulturen mit LPS eine signifikante Zunahme der PMN-Fraktion in der CD11b^{-/-}-BMDC-Mischkultur. Demgegenüber führte die LPS-Stimulierung von WT-BMDC-Kulturen zu einer signifikant verstärkten Frequenz an CD11c^{high} Zellen und Reifung der BMDC.

Im Laufe der GM-CSF-Kultur sowie nach zusätzlicher LPS-induktion der Knochenmarkszellen wurde die Expression der β 2-Integrine: CD11b/CD18, CD11a/CD18 und CD11c/CD18 im Rahmen der Reifung von WT-Zellen hochreguliert. Sowohl die Frequenz der Integrin-exprimierenden Zellen als auch die Dichte dieser Moleküle auf den Zellen nahm zu, was eine essentielle Rolle der β 2-Integrine für ihre Funktion impliziert. Die Expression von LFA-1 blieb in den CD11b^{-/-} Kulturen unverändert.

Um mögliche Auswirkungen einer Mac-1 Defizienz für die DC-Differenzierung auf der Genexpressionsebene zu untersuchen, wurden QPCR-Analysen an Tag 3 und 7 von GM-CSF-Kulturen durchgeführt (Abbildung 42). Die Quantifizierung der relativen Genexpression in den CD11b^{-/-}-Knochenmarkszellen zeigte eine tendenzielle Reduktion der Expression des BCL-6-Gens sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 der GM-CSF-Kultur in vitro. Der BCL-6-Proteinspiegel wird bei der Entwicklung, Reifung und Aktivierung von Maus-cDC dynamisch hoch- und runterreguliert (Zhang et al., 2014). Bcl6 wird von cDC-Vorläufern zum Überleben benötigt (Ohtsuka et al., 2011), wobei eine hohe BCL6-Genexpression mit erhöhter Proliferation aber verminderter MHCII- und CD86-Expression korreliert (Niu et al, 2003). Ohtsuka et al., 2011 zeigten auch verminderte Aktivierung der BCL-6^{-/-}-DC auf der Zytokin-Produktion-Ebene, indem sie weniger IL-12 produzierten als WT-DC. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine erniedrigte BCL-6-Expression mit einer verminderten DC-Proliferation sowie einer tendenziell erniedrigten IL-12 Produktion korreliert.

Das Genexpressionsprofil von GM-CSF-vermittelt differenzierten Knochenmarkzellen (d3, d7) hat auch signifikante c-Rel Hochregulation bei CD11b^{-/-}-Mäusen erwiesen. Jedoch obwohl sowohl die BCL-6-Gen-Runterregulation als auch die Hochregulation des c-Rel-Untereinheit des Kernfaktors-kappaB (NF-kB)-Genes die Expression der kostimulatorischen Molekülen induzieren können, das Auftreten beider Stimulierenden Wegen nicht ausreichend für die beeinträchtigte Expression der CD80 und CD86- Genen bei der CD11b^{-/-}-BMDC war. c-Rel, das auch als wichtiger Regulator der Entzündungsreaktion in reifen Granulozyten und Monozyten beschrieben worden ist (Friedman, 2007), wurde als wichtig für die Regulation der angeborenen Immunantwort via Makrophagen und dendritischen Zellen beschrieben, da es eine kritische Rolle bei der IL-12 β -Gentranskription und damit für die Th1-Immunität hat (Chen et al., 2018). Des Weiteren BCL-6 kann für die Modulation der Apoptose von Gewebe-PMN wichtig sein, jedoch wurde ein entsprechender Effekt nicht für periphere Blut- oder Knochenmark-PMN beobachtet (Zhu et al., 2019).

Die hämatopoetische Zelldifferenzierung wird in hohen Maßen von dem Transkriptionsfaktor Irf8 gesteuert, der wesentlich für die Entwicklung von Monozyten und dendritischen Zellen (DCs) ist, während er auf neutrophile Differenzierung hemmend wirkt (Murakami et al., 2021). Erhobene Irf8-Expression in der CD11b^{-/-}-Knochenmarkzellen am Tag3 der GM-CSF-Kultur und die im Vergleich zu den WT-Ansätzen tendenziell erniedrigte Irf8-Expression am Tag7 sowie die Tatsache, dass die Irf8-Transkription unter Kontrolle von GM-CSF über STAT5 runterreguliert wird (Onai & Manz, 2008), lässt vermuten, dass Mac-1-Defizienz eine veränderte GM-CSF-Signalübertragung hervorrufen kann. Diese Beobachtung, zusammen mit vorherigen Erkenntnissen, die eine beeinträchtigte BMDC-Differentiation zeigten, weist auf Genotyp-abhängige differente GM-CSF-Differenzierungseffizienzen hin.

Auf dem Grund, dass NFI-A (TF Nuclear Factor I-A) die monozytäre Differenzierung von HPCs unterdrücken kann und dass die Abnahme der NFI-A-Spiegel für die Aktivierung von differenzierungsspezifischen Genen wie M-CSFR wichtig ist (Rosa et al., 2007), könnten die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Genotyp-abhängigen Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung auch durch eine verminderte NFI-A-Transkription erklärt werden. Diese Möglichkeit werden dadurch bestätigt, dass NFI-A als negativer Transkriptionsregulator der G-CSFR-Expression dient, der eine entscheidende Rolle bei der Produktion und Funktion von Granulozyten spielt (Ward, 2007; Starnes et al., 2009).

Das anti-apoptotische Protein A1 der Bcl-2-Familie reguliert das Überleben, die Differenzierung und Reifung von PMN über PI3K- und JAK/STAT-Signalübertragung (Vier et al., 2016). Bcl-2A1 wird in primären PMN hochreguliert und kann das Überleben von PMN verstärken.

Die Ergebnisse der DNA-Quantifizierung verstärken die Vermutung, dass Mac-1 sowohl an der Knochenmarkzellen-Differenzierung als auch -Reifung beteiligt ist.

3.1.6. Bedeutung von Mac-1 für die GM-CSF-induzierte Ausreifung der PMN

Die Granulopoese findet im Knochenmark statt, wobei die myeloiden Vorläuferzellen (CMP-Common myeloid precursors) über GMP (Granulocytes and macrophage precursors) und nachfolgend GP (Granulocytes precursors) zur Proliferation und Differenzierung von PMN angeregt werden. Die Granulozyten des Knochenmarks werden grundsätzlich durch unreife Band-PMN repräsentiert (Abbildung 44 A). Erst nach dem Priming von PMN durch die Bindung von Aktivierungssignalen an Membranrezeptoren in entzündetem Gewebe oder durch bakterielle Produkte wie LPS oder Zytokine/Chemokine werden die PMN aktiviert. Dabei ist auch das hämatopoetische Zytokine Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) für die Aktivierung der Granulozyten verantwortlich (Mann, 2006). In der vorliegenden Arbeit zeigten Band-PMN schon nach 2 Tage der GM-CSF-Kultur sowohl ohne als auch nach der LPS-Induktion segmentierte-Form (Abbildung 44 B, C). Die Abwesenheit von Mac-1 auf den CD11b^{-/-}-PMN hatte keinen Einfluss auf die Morphologie der reifen und stimulierten PMN.

Reife PMN werden kontinuierlich in den Blutkreislauf freigesetzt, wo sie stundenlang zirkulieren können, um dann nach einem Stimulus in Gewebe einzuwandern und ihre Funktionen auszuüben (De Bondt et al., 2020). Unter physiologischen Bedingungen sind die meisten PMN patrouillierende Zellen und zirkulieren im Ruhezustand durch den Körper, um die Freisetzung ihres toxischen, intrazellulären Inhalts zu vermeiden. Unter pathologischen Zuständen können PMN ihren Phänotyp verändern. Ursprünglich wurden die im Blut zirkulierenden PMN als terminal differenzierte Zellen definiert, jedoch zeigte eine Vielzahl der Studien, dass PMN noch unter unterschiedlichen Subpopulationen N1 (Eruslanov et al., 2014) und N2 das Knochenmark verlassen (Wu et al., 2014). Diese polarisierten tumorassoziierten PMN (N1- und N2-TANs) wurden nur in Tumor-Mausmodellen beschrieben und die Natur und

Funktion von TANs in der Tumormikroumgebung, insbesondere bei menschlichen Tumoren, ist noch weitgehend unbekannt (Rosales C, 2018).

Des Weiteren können während entzündlicher Zustände die in Kapitel 3.1.4. erwähnten PMN-DC-Hybride (PMN-DCs) entstehen (Matsushima et al., 2013). Diese PMN-DCs weisen Eigenschaften sowohl von PMN als auch von dendritischen Zellen auf und haben APC-Funktionen. Bei 9-tägiger Kultivierung in Gegenwart von GM-CSF findet eine Ausdifferenzierung humaner und muriner PMN statt, die die Oberflächenexpression von CD11c, MHCII and kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86, CXCR2 und 7/4 umfasst (Matsushima et al., 2013). Die PMN/DC-Hybridzellen präsentierten effizient OVA-Peptide sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺T-Zellen (Takashima et al., 2015). Die Differenzierung von PMN-DCs wurde auch von Fites et al., 2018, in präklinischen Mausmodellen für Pilzinfektionen wie Aspergillose und Candidiasis beobachtet. Unter Verwendung von Reporterstämmen mit Lebensfähigkeit von Pilzen zeigte sich die Kapazität von PMN-DCs Pilzzellen zu binden und diese effizienter als kanonische PMN abzutöten. PMN-DCs zeigten im Vergleich zu kanonischen PMN eine höhere Expression von Mustererkennungsrezeptoren, eine stärkere Phagozytose und eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. PMN-DCs zeigten ebenfalls eine ausgeprägte NET-ose (Fites et al., 2018). Sowohl in vitro als auch in vivo konnten unreife sowie reife Maus-PMN Hybride bilden. Diese APC-ähnlichen PMN wurden nicht nur in Mausmodellen gefunden, sondern auch in humane Patientenproben nachgewiesen, z.B. in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis und dem Blut von Patienten mit Wegener-Granulomatose (De Bondt et al., 2020).

Zur Herkunft der Hybridpopulation haben Geng et al., 2013, gezeigt, dass sie aus unreifen Bandzellen stammen können, die entweder zu reifen polymorphkernigen Zellen fortschreiten oder zu PMN-DC-Hybriden transdifferenzieren. Diese PMN-DC-Hybride stammen von transdifferenzierten PMN nach Extravasation an entzündlichen Stellen. Bezüglich des erforderlichen Stimulus zum Erwerb von Antigen-präsentierenden Fähigkeiten von murinen PMN haben Radsak et al., 2000, über die Expression von MHC II und ko-stimulatorischen Molekülen nach ko-Kultivierung von PMN mit T-Zellen und Antigenen berichtet. Darüber hinaus haben Abi Abdallah et al., 2011, die Notwendigkeit eines zell-zellabhängigen Kontakts zwischen T-Zellen und PMN betont, da die Trennung durch ein Transwell-System die T-Zell-induzierte Expression von MHCII auf PMN aufhob. Diese PMN sind dann in der Lage,

Antigene über MHCII zu präsentieren und die Differenzierung von T-Helfer-(Th)1- und Th17-Zellen *in vitro* zu stimulieren.

In vorliegender Arbeit wurden die PMN bis auf 2-Tage mit GM-CSF induziert. WT-PMN wiesen keine DC-Charakteristik auf. Jedoch wurde bei den CD11b^{-/-}-PMN Granulozyten eine Hochregulation von CD11c in der Reaktion auf die GM-CSF- Behandlung gefunden. Eine zusätzliche TLR4-Stimulierung mit LPS erhöhte weiterhin signifikant die CD11c-Dichte auf den Zellen sowie die Expression von MHCII, CD86, Ly6G, Ly6C und CD48 (Abbildung 45, Ergänzung 3).

Die splenische CD11b^{-/-}-PMN charakterisierte auch eine signifikante CD11c-Überexpression im Vergleich zu WT-PMN (Abbildung 43 A). Jedoch es wurden keine weiteren Genotyp-abhängigen Unterschiede in der Oberflächenmarker-Expression sowohl auf Milz- sowie auf Blut-PMN gefunden (Abbildung 43 B).

3.1.7. Bedeutung von Mac-1 für die T-Zell-Stimulierungs-Kapazität der PMN

Die Transdifferenzierung von PMN zu PMN-DC-Hybriden zeigt, dass PMN effizient sowohl an angeborenen als auch an adaptiven Immunantworten teilnehmen können (Matsushima et al., 2013). *In vivo* ist eine entzündliche Mikroumgebung der Stimulus notwendig, um PMN dazu zu bringen, die APC-ähnliche Fähigkeit zu erwerben. PMN können dadurch direkt die T-Zell-Aktivierung fördern (Fauschou et al., 2003; Yang et al., 2000). Ergebnisse von Tvinnereim et al., 2004, legen nahe, dass PMN sowohl sekretierte als auch nicht-sekretierte bakterielle Antigene für die Kreuzpräsentation gegenüber dem adaptiven Immunsystem bereitstellen können.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von Mac-1 für die PMN-induzierte Aktivierung von CD8⁺ T- und CD4⁺ T-Zellen zu beurteilen. In Übereinstimmung mit der phänotypischen Analyse, die das Fehlen von MHCII auf den untersuchten PMN anzeigte, wurde keine Aktivierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen festgestellt. Es ist aber bekannt, dass PMN aufgrund der kontinuierlichen MHCI-Molekül Expression auf ihrer Zelloberfläche starke CD8⁺T-Zellen-Aktivierungseigenschaften zeigen, deren Effizienz nach der Exposition der PMN gegenüber LPS steigt. Mittels T-Zell-Proliferations-Assays wurde die APC-Funktion der PMN untersucht (Abbildung 47). Im unstimulierten Zustand konnte CD8⁺ T-Zell-Proliferation

nur durch WT-PMN induziert werden. Jedoch induzierte LPS-Stimulation auch CD8⁺ bei CD11b^{-/-}-PMN T-Zellen-Aktivierungseigenschaften.

Ergänzend wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Mac-1 auf PMN mit natürlichen Liganden einen hemmenden Effekt auf deren CD8⁺ T-Zell-Aktivierungskapazität hatte (Abbildung 48). Eine wesentlich verminderte CD8⁺ T-Zell-Proliferationsrate wurde durch die Aktivierung des PMN-Mac-1 mit Fibrinogen aber auch mit Thrombospondin oder Vitronectin verursacht. Die Ergebnisse legen nahe, dass in der Abwesenheit von mikrobiellen Komponenten für die CD8⁺T-Zell Aktivierung durch PMN-Mac-1-Wechselwirkungen erforderlich sind. Die LPS-Stimulierung moduliert jedoch die effektive Neutrophil-T-Zell-Synapsenbildung in Mac-1-unabhängige Weise.

Granulozyten der CD11b^{-/-}-Mäusen zeigten eine verminderte Expression des Irf8-Genes (Abbildung 46, , Ergänzung 4). Die Tatsache, dass die Irf8-Transkription unter Kontrolle von GM-CSF runterreguliert wird (Onai & Manz, 2008) zeigt zusammen mit den Daten dieser Arbeit, dass Mac-1 für die GM-CSF-Signalübertragung regulierend wirken kann.

3.2.Die Rolle von Mac-1 in Aspergillose

Das β 2-Integrin Mac-1 ist als multifunktionaler Oberflächenrezeptoren von Leukozyten für die transendotheliale Leukozyten-Migration an die Infektionsstelle und für die antifungale Aktivität der myeloider Zellen essenziell (O'Brien et al., 2016). Viele antimikrobielle Leukozyten-Funktionen, die durch α M β 2-Integrin-Signaltransduktion gesteuert werden, bilden die Grundlage für Immunantworten gegen *Aspergillus fumigatus* (Boyle et al., 2011).

Pilzkrankheiten haben sich insbesondere bei immungeschwächten Personen als wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität erwiesen, was ein größeres Interesse am Verständnis der Mechanismen der Wirtsresistenz gegen diese Pathogene hervorruft. Folglich hat unser Wissen über die angeborenen und adaptiven Komponenten, die die Mechanismen der antimykotischen Immunität zugrunde liegen, in den letzten Jahrzehnten enorm zugenommen. Aus diesen Studien ging hervor, dass phagozytische Zellen für den Schutz unerlässlich sind und dass Defekte in diesen Zellen die Fähigkeit des Wirts beeinträchtigen, einer Pilzinfektion zu widerstehen. Es wurden die Funktionen von phagozytotisch aktiven Zellen in der angeborenen antimykotischen Immunität behandelt, zusammen mit ausgewählten Beispielen der Strategien, die von Pilzpathogenen verwendet werden, um diese Abwehrmechanismen zu konterkarieren (Brown, 2011).

Aspergillus fumigatus ist ein häufiger saprophytischer Pilz in der Umwelt, der als die Hauptursache der lebensbedrohlichen invasiven pulmonale Aspergillose (IPA) gilt (Kwon-Chung & Sugui, 2013). Die Infektion wird durch die Inhalation von Konidien eingeleitet, die von gesunden Personen normalerweise schnell beseitigt werden, jedoch bei immungeschwächten Personen eine invasive Erkrankung verursachen können, die in hohem Maße mit einer relevanten Morbidität und Mortalität assoziiert ist (Hayes & Denning, 2013).

Die Immunantwort gegen inhalierte Konidien des *Aspergillus fumigatus* fängt mit der Erkennung einer Infektion durch Lungenepithelzellen und gewebsresidente angeborene Zellen an, einschließlich Alveolarmakrophagen und dendritischer Zellen, die mittels der Produktion entzündlicher Signale wie Chemoattraktoren und Zytokinen eine schnelle Rekrutierung von PMN fördern (Espinnosa et al., 2016; Harvat et al., 1991). Nachdem die PMN das Aktivierungssignal erfassen, extravasieren sie aus Blutgefäßen und wandern in die Richtung der Infektionsstelle, um die Krankheitserreger zu bekämpfen (de Oliveira et al., 2017). PMN sind die erste Verteidigungslinie der angeborenen Wirtsabwehr gegen *A. fumigatus*, indem sie auswachsende *A. fumigatus* Konidien und -Hyphen abtöten (Post et al., 2007). Zur zweiten Verteidigungslinie gehören Monozyten, pDCs, Mastzellen, Eosinophile und NK-Zellen, die Formation der CD4⁺-T-Zellen hervorrufen können (Espinnosa et al., 2016) (Abbildung 57). Jedoch PMN sind von entscheidender Bedeutung bei Beseitigung von *A. fumigatus*, was sich in der Tatsache zeigt, dass Neutropenie ein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung der IPA ist (Post et al., 2007).

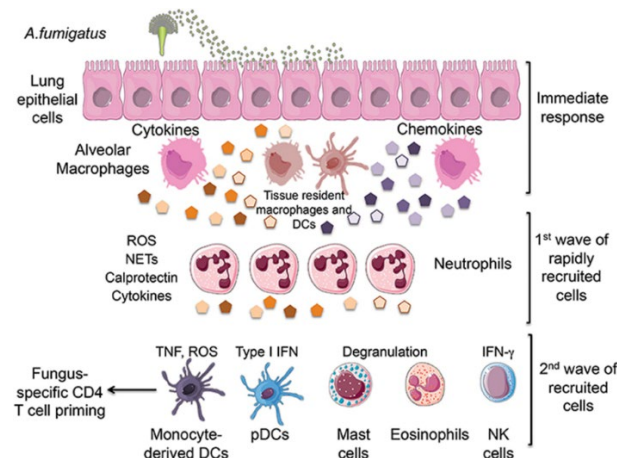


Abbildung 57. Erste Erkennung einer *A. fumigatus*-Infektion durch Lungenepithelzellen und gewebsresidente angeborene Zellen erfolgt in erster Linie in Neutrophil-Rekrutierung (nach Espinnosa et al., 2016).

Viele PMN-Eigenschaften wie Adhäsion, Migration der PMN aus dem Blutkreislauf zu Infektionsstellen und Phagozytose werden von $\beta 2$ -Integrinen gesteuert. Die Migration der PMN ist ein kaskadenförmiger Prozess, der "Rolling" entlang des Endothels, feste Adhäsion, Extravasation durch das Endothel und chemotaktische Migration umfasst (Nathan, 2006; Teng et al., 2017). Die beiden $\beta 2$ -Integrine Mac-1 und LFA-1 sind an der festen Adhäsion der PMN an das Endothel beteiligt, indem sie an die auf den aktivierten Endothelzellen vorhandenen Liganden ICAM-1 und ICAM-2 binden können (Liew & Kubes, 2019). Das Durchqueren der Wände von extrakapillaren Venolen in die Blutgefäße ist jedoch von der Mac-1-ICAM-Wechselwirkungen bestimmt (Chavakis, 2012).

Mac-1 ist ein vorherrschendes $\beta 2$ -Integrin auf PMN und an der Adhäsion und Migration von PMN sowie der Beseitigung von Krankheitserregern direkt (Phagozytose kompletionierter Pathogene) und indirekt durch die Regulation vieler Neutrophil-Funktionen beteiligt (Shao et al., 2020; van Spruiel et al., 2001; Kolonics et al., 2020). Menschliche PMN verwenden verschiedene Mechanismen, um *Aspergillus fumigatus* Konidien und Hyphen abzutöten. Für die Hyphenschädigung ist die Bindung von Antikörper an Fc γ -Rezeptoren notwendig. Diese Signaltransduktion aktiviert das NADPH-Oxidase-System, indem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit einem Chloridanion (Cl^-) durch MPO in die hochgiftige hypochlorige Säure (HOCl) umgewandelt wird, die *Aspergillus*-Hyphen abtötet. Während Konidien durch Phagozytose von PMN beseitigt werden, die von Mac-1 (CR3) und PI3K-Signalgebung und von Lactoferrin-vermittelter Sequestration von Eisen abhängt (Bonnert et al., 2006; Gazendam et al., 2016).

Auf die wesentliche Bedeutung von $\beta 2$ -Integrinen für die Immunabwehr gegen *A. fumigatus* weist die Tatsache hin, dass Aspergillose stark mit einer seltenen autosomal-rezessiven Mutation des CD18-Genes, dem Leukozytenadhäsions-Mangel Typ I, kurz LAD-I, assoziiert ist (Bunting et al., 2002; Hogg et al., 2002; MacPherson et al., 2013). Eine verringerte oder blockierte Expression von $\beta 2$ -Integrinen verursacht immunologische und klinische Anomalien, die mit defekten adhäsionsabhängigen Prozessen einschließlich Chemotaxis, Phagozytose und homotypischer Aggregation sowie mit eingeschränkter Signalübertragung verbunden sind (Vaillant & Ahmad, 2020; Kuijpers et al., 1997). Aufgrund der eingeschränkten Leukozytenmigration und -funktion leiden LAD-I-Patienten an wiederkehrenden Infektionen wie Aspergillose. Trotz des klinischen Einsatzes wirksamer Antimykotika zur Prophylaxe und Behandlung der invasiven Pilzkrankheit ist IPA weiterhin ein hoch relevantes

Gesundheitsproblem in der täglichen klinischen Versorgung in Bezug auf Morbidität, Mortalität und diagnostische Herausforderungen (Cornely et al., 2009).

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die Rolle von CD11b für die frühe angeborene Immunantwort während einer inhalativen Infektion mit *A. fumigatus*, deren Beseitigung anfänglich hauptsächlich durch PMN vermittelt wird (Yang et al., 2017). Zur Beurteilung der Bedeutung von Mac-1 bei der IPA, wurden CD11b^{-/-}-und WT-Mäuse intratracheal mit lebenden *Aspergillus fumigatus* Konidien infiziert.

Obwohl Lilly et al., 2014, berichten, dass in der frühen Infektionsphase die Ausbreitung von *A. fumigatus* neben PMN auch von Eosinophilen kontrolliert werden kann, waren in dieser Arbeit Eosinophile in den Lungen sowohl der WT- als auch der CD11b^{-/-}-Mäusen nicht nachweisbar.

3.2.1. Mac-1 beeinflusst Neutrophil-Abwehrmechanismen gegen *Aspergillus fumigatus*: Infektionsgrad erhoben, Mortalität nicht beeinträchtigt

Die Analyse im Aspergillose-Model zeigte, dass Mac-1 trotz seiner ausgeprägten immunologischen Funktionen für die langfristige Kontrolle von IPA bei CD11b^{-/-}-Mäusen keine kritische Funktion hatte, da das Überleben von mit *A. fumigatus* infizierten CD11b^{-/-}-Mäusen nach IPA-Induktion nicht beeinträchtigt war (Abbildung 49).

Jedoch zeigten nach den ersten 24 Stunden die Lungen der CD11b^{-/-}-Mäusen niedrigere Bronchialentzündung (Abbildung 50 A) und eine geringere Häufigkeit der schleimproduzierenden Zellen, die eine vor Pathogenen schützende Schleimschicht bilden können (Ergänzung 5). Dabei entstand eine erhöhte Pilzbelastung in den Lungen von CD11b^{-/-}-Mäusen (Abbildung 50 B, C), obwohl die CD11b^{-/-}-PMN in PMN-Infiltration in die Lungen deutlich größer war (Abbildung 51). Diese Beobachtung steht auch im Einklang mit dem Befund, dass Mac-1 in menschlichen PMN erforderlich ist, um *A. fumigatus* Konidien durch phagozytische Aufnahme abzutöten (Gazendam et al., 2016). Konidien-Mac-1-Wechselwirkungen lösen einen PI3K-abhängigen, nicht-oxidativen intrazellulären Abtötungsmechanismus aus. Demgegenüber ist die Zerstörung von *Aspergillus*-Hyphen nicht von Mac-1 abhängig. Die Hyphenerkennung erfordert vielmehr eine Antikörper-Opsonisierung und nachfolgende Signalgebung über Syk, PI3K und Proteinkinase C, um die Produktion toxischer reaktiver Sauerstoffmetaboliten durch die NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase auszulösen (Abbildung 58). Die unbeeinträchtigte Überlebensrate der CD11b^{-/-}-Mäusen

unterstützt die Theorie, dass Mac-1 als Ko-Rezeptor für FcγR-vermittelte Phagozytose fungiert. Eine effektive *A. fumigatus* Hyphen-Zerstörung scheint entscheidend für das Überlebens der Wirt sein.

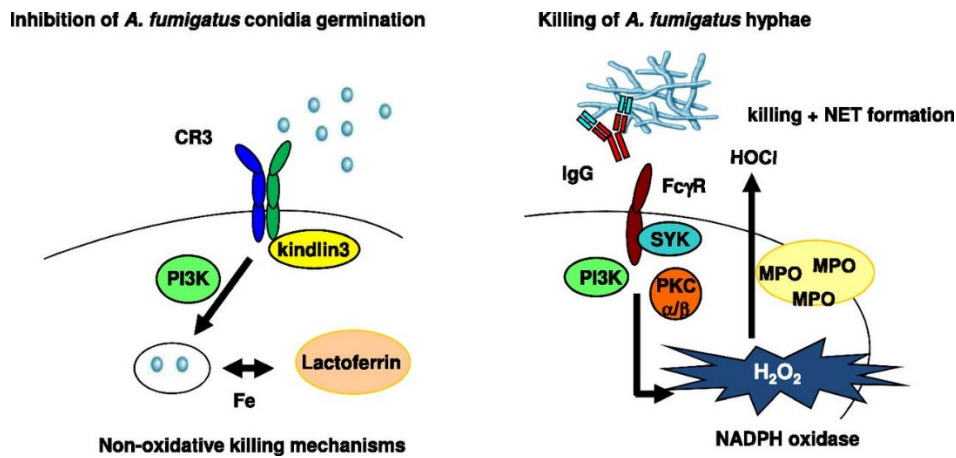


Abbildung 58. Erste Erkennung einer *A. fumigatus*-Infektion durch Lungenepithelzellen und gewebsresidente (nach Gazendam et al., 2016).

3.2.2. *Mac-1-Defizienz beschränkt zytotoxische Funktionen der PMN, womit erhöhte Einstrom von PMN in die mit Aspergillose-infizierten Lungen verbunden ist*

In der ersten Phase der IPA spielen neutrophile Granulozyten die dominante Rolle für die effektive Immunabwehr. Deren Funktion wird stark durch Mac-1 reguliert. Trotzdem wurde in dieser Studie auch keine reduzierte Migration von CD11b^{-/-}-PMN erkannt. Hingegen war die gemessene Anzahl der PMN nach 24 Stunden der *A. fumigatus* Konidien Inokulation in der BALF deutlich höher als bei den WT-Proben (Abbildung 51). Dieser Befund war unerwartet, da berichtet wurde, dass β2-Integrine notwendig sind, um eine feste Adhäsion von PMN zum Gefäßendothel zu vermitteln und dies als Voraussetzung für PMN Migration in den extravaskulären Raum gilt (Langer & Chavakis, 2009). Jedoch wurde auch, vergleichbar mit unseren Erkenntnissen, eine erhöhte Migration von transendothelialen CD11b^{-/-}-PMN im Thioglykollat-induzierter Peritonitis nachgewiesen (Coxon et al., 1996). Widersprüchliche Berichte über die Bedeutung von Beta2-Integrinen bei der Migration haben auch Mizgerd et al., 1999, berichtet. In ihrer Studie hat sich herausgestellt, dass der Bedarf an β2-Integrinen für die PMN-Infiltration von der Art des Erregers abhängt. Bei der PMN-Migration kann nicht nur Mac-1 sondern auch LFA-1 teilnehmen. Ding et al., 1999, haben in ihrer Studie mit LFA-1-defizienten Mäuse berichtet, dass für die transendotheliale Migration von PMN Granulozyten nicht Mac-1, sondern LFA-1 eine vorherrschende Rolle spielt. Dies könnte die Beobachtung

der vorliegenden Arbeit erklären, dass Mac-1-Expression für die PMN-Migration in die Lungen der *Aspergillus fumigatus*-infizierten Mäusen nicht erforderlich ist.

3.2.3. PMN-Phagozytose der *A. fumigatus* Konidien beeinträchtigt bei Mac-1-defizienten Mäusen

Die Hauptfunktion der PMN ist es, eindringende Konidien durch Phagozytose zu zerstören (Richardson et al., 1995). PMN sind äußerst effiziente Phagozyten, die Pathogene über Komplementrezeptoren und Fc γ -Rezeptoren aufnehmen können (Segal et al., 1980). Komplementrezeptor 3 (Mac-1) vermittelt beim Erkennen von *A. fumigatus* Konidien (Gazendam et al., 2016) kann aber auch die Phagozytose auslösen, wegen seiner Regulationspotenz die Signalwegen zu beeinflussen, die an der Genexpression und der Umlagerung des Zytoskeletts beteiligt sind (Ostrowski et al., 2016).

Die wesentliche Bedeutung von Mac-1 für die Konidien-Beseitigung durch PMN wurde hier mittels Analyse des BALFs bestätigt. Die beobachtete gestörte Phagozytoseaktivität der CD11b^{-/-} im Vergleich zu WT-PMN gegenüber den opsonierten *A. fumigatus* Konidien stimmt mit der zuvor erwähnten erhöhten Lungenpilzbelastung überein (Kapitel 2.7.2.) sowie mit den Erkenntnissen von Gazendam et al., 2016, dass Mac-1 in menschlichen PMN für die effektive Beseitigung von *A. fumigatus* Konidien erforderlich ist (Abbildung 52).

3.2.4. Die BAL-Flüssigkeit von mit *A. fumigatus* infizierten CD11b^{-/-}-Mäusen enthält geringere Mengen an proinflammatorischen Zytokinen

PMN werden durch verschiedene Gefahrensignale und bei Kontakt mit Krankheitserreger aktiviert und tragen zur Entzündungsreaktion auch durch die Sekretion einer Vielzahl von angeborenen proinflammatorischen Zytokinen bei (Yang et al., 2017). PMN verursachen keine Schäden, wenn sie im Blutkreislauf vorhanden sind. Nachdem PMN mit Pathogenen konfrontiert werden und an Endothel, Epithel oder Proteine der extrazellulären Matrix im Interstitium anhaften, tritt eine Freisetzung von zytotoxischen Mitteln auf. Die Adhärenz von PMN an Endothel wird hauptsächlich durch β 2-Integrine auf seiner Oberfläche vermittelt und führt zur Aktivierung des I κ B/NF- κ B-Signalwegs (Kim et al., 2004). β 2-Integrin Mac-1 (CD11b/CD18)- Kreuzvernetzung induziert die NF- κ B-Aktivierung und führt zur Aktivierung der proinflammatorischen Effekte bei PMN, indem proinflammatorische Zytokine wie TNF- α de novo produziert werden (Kettritz R et al., 2004). Neben der Tatsache, dass Mac-1 der Hauptrezeptor für die Phagozytose der komplementopsonierten Pathogene ist, könnte die

abgeschwächte I κ B/NF- κ B-abhängige PMN-Aktivierung als die Ursache der vorher erwähnten reduzierten Aktivität von CD11b^{-/-} PMN zur Phagozytose von *A. fumigatus* Konidien (Kapitel 2.7.3.) gesehen werden. Damit kann auch die gestörte Induktion eines entzündlichen Milieus in Lungen von mit *A. fumigatus* infizierten CD11b^{-/-}-Mäusen zusammenhängen. Tatsächlich enthielt BALF von *A. fumigatus*-infizierten CD11b^{-/-}-Mäusen weniger angeborene proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 α , IL-1 β und TNF- α (Abbildung 53), was auch mit der abgeschwächten zellulären Entzündung in der Lunge übereinstimmte. Eine beeinträchtigte Effektorfunktion der PMN konnte eine Erhöhung der Anzahl rekrutierter PMN verursachen. Trotz der verstärkten PMN-Infiltration wurde eine erhöhte Lungenpilzbelastung im Vergleich zu WT-Mäusen beobachtet.

BALF aus infizierten CD11b^{-/-}-Mäusen enthielt höhere Spiegel des Chemokins CCL5 (Abbildung 53), von dem bekannt ist, dass es mit den Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3, CCR5 und CCR11 wechselwirkt und dadurch PMN attrahiert (Hartl et al., 2006). CCL5 wird früh im Zuge einer inhalativen Entzündung durch verschiedene aktivierte Zelltypen gebildet, einschließlich Atemwegsepithelzellen (Propst et al., 2000), glatte Muskelzellen der Atemwege (Teran et al., 1999) und Lungenfibroblasten (Pype et al., 1999). Darüber hinaus wurde berichtet, dass *A. fumigatus* CCL5-Produktion in Thrombozyten induziert (Rodland et al., 2010), während PMN CCL5 produzieren, wenn sie mit *Toxoplasma gondii* inkubiert werden (Bennouna et al., 2003). Daher sind weitere Studien erforderlich, um aufzuklären, welche Zelltypen für eine erhöhte CCL5-Produktion in der Lunge von *A. fumigatus* infizierten CD11b^{-/-}-Mäusen verantwortlich sind. Murine PMN exprimieren die CCL5-bindenden Rezeptoren CCR1 und CCR3 (Reichel et al., 2012). Deswegen könnten erhöhte CCL5-Spiegel in der Lunge von infizierter CD11b^{-/-}-Mäuse zu einer erhöhten PMN-Infiltration beitragen. Neben seiner leukozytenanziehenden Wirkung trägt CCL5 nachweislich zu Persistenz von *A. fumigatus*-induziertem chronischem allergischem Asthma bei Mäusen bei (Schuh et al., 2002). Interessanterweise war in diesem murinen Asthmodell bei CCR5^{-/-}-Mäusen die Überempfindlichkeit der Atemwege (AHR) beeinträchtigt. Darüber hinaus war eine verminderte AHR mit einer abgeschwächten peribronchiale T-Zell- und Eosinophileninfiltration verbunden.

3.2.5. Modulation der PMN-Apoptose

Mac-1 ist nicht nur an der Migration der Leukozyten und der Phagozytose von Krankheitserregern durch myeloide Zellen einschließlich PMN beteiligt, sondern reguliert auch

PMN-Apoptose. Coxon et al., 1996, berichteten, dass CD11b^{-/-} PMN aus dem Peritoneum nach Injektion von Thioglykolat durch eine geringere Apoptoserate als ihre WT-Gegenstücke charakterisiert waren. Jedoch wurde der Beitrag der Mac-1-Signalgebung zur Apoptose von aktivierten PMN kontrovers diskutiert. Zhang et al. berichtete, dass die Apoptose von PMN nach der Phagozytose von Krankheitserregern von aktivem Mac-1 gefördert wird, indem das β 2-Integrin die Produktion von Apoptose-induzierenden Molekülen wie reaktiven Sauerstoffspezies und TNF- α modulieren kann. Schon Walzog et al., 1997, haben über eine Regulation der PMN-Apoptose durch Cross-Talk von β 2-Integrinen und TNF- α berichtet, wobei die Aggregation von Mac-1 durch Antikörperquervernetzung eine fördernde Rolle spielte. Im Gegensatz dazu haben Yan et al., 2004, gezeigt, dass eine Antikörper-vermittelte Blockade von β 2-Integrinen auf humanen PMN nach ihrer Aktivierung durch TNF- α oder mikrobielle Reize die Apoptose erhöhte. Hingegen verzögerte die transendotheliale Migration von PMN (Watson et al., 1997) sowie die Signaltransduktion nach Bindung von Mac-1 an ICAM-1, Fibrinogen und Plasminogen die Apoptose von PMN und verlängerte damit deren Lebensdauer (Whitlock et al., 2000; Pluskota et al., 2008; Kebir & Filep 2013). Die Vernetzung von aktiviertem Mac-1 mit Anti- Mac-1-Antikörper (Fab-Fragmente) oder Aggregation von Mac-1 in PMN signalisiert Überlebenssignale (Whitlock et al., 2000). Das Überleben von PMN wird also durch Mac-1-relevantes Outside-In-Signaling moduliert (Kebir & Filep 2013). Weitere Studien sind notwendig, um die genaue Rolle von Mac-1 auf die Lebensfähigkeit von PMN bei IPA zu erkennen.

3.2.6. Mac-1 an PMN kann zur Aktivierung infiltrierender DCs beitragen

Diese Studie konzentrierte sich auf die Rolle von CD11b während der frühen innate Immun-Reaktionen auf eine inhalative Infektion mit *A. fumigatus*, die hauptsächlich durch PMN vermittelt werden. Jedoch können PMN auch die zweite Verteidigungslinie der Immunabwehr gegen *A. fumigatus* modulieren, da sie nachweislich bei IPA durch DC-SIGN-abhängige Zell-Zell-Kontakte mit DC diese aktivieren und letztere dann in die Lunge und mediastinalen Lymphknoten infiltrieren (Park et al., 2012). Dieser C-Typ Lektinrezeptor wird von DC und Makrophagen exprimiert und vermittelt die phagozytische Aufnahme von *A. fumigatus* Konidien (Serrano-Gomez et al., 2004). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass DC und PMN über DC-SIGN und Mac-1 interagieren können (van Gisbergen et al., 2005). Daher kann Mac-1 auf PMN bei Lungeninfektionen zur Aktivierung von DCs beitragen. Bei IPA produzieren aktivierte DC IL-12 und IL-23, die Th1 (Gafa et al., 2006) und Th17 (Werener et

al., 2011) T-Zell-Antworten induzieren. Außerdem können DC die Abwehrmechanismen der PMN mittels IL-23 stimulieren, indem von DC-sekretierte IL-23 die IL-17-Produktion der PMNs induziert und über ROS-Produktion zur Pilzenabtötung durch PMN beiträgt (Taylor et al., 2014; Gazendam et al., 2016). Darüber hinaus stellen infiltrierende Eosinophile eine weitere Quelle für IL-23 und IL-17 dar (Guerra et al., 2017).

3.2.7. *Mac-1-abhängige zytotoxischen Funktionen der PMN gegen *A. fumigatus**

Degranulation und ROS

Mac-1 beeinflusst viele zytotoxischen Reaktionen von PMN, wie den oxidativen Burst (ROS) und Granula-Degranulation als Reaktion auf die Bindung von iC3b-opsonisierte Bakterien und Hefen (Schuman & Weiss, 2005). Entscheidend für die Stimulierung der zytotoxischen Reaktionen ist die Bindung von β -Glucan an die Lektinseite in CD11b (α M) (Xia et al., 2002). Zhou & Brown (1994) postulierten die Kooperation von Fc-Rezeptoren und Komplementrezeptoren bei der Erzeugung eines oxidativen Ausbruchs, wobei zwischen CR3 und Fc γ RIII eine direkte physikalische Wechselwirkung besteht.

EV (Extrazelluläre Vesikel)

Es wurde gezeigt, dass die Bildung antibakterieller EVs von der Stimulation des Mac-1-Integrinkomplexes abhängt (Kolonics et al., 2020). Die Mac-1/CR3-Aktivierung beeinflusst sowohl die Anzahl, die Beladungsdichte als auch die antibakterielle Kapazität der produzierten Vesikel (Lőrincz et al., 2019). In PMN ist das β 2-Integrin Mac-1 an der Apoptoseinduktion durch Outside-Inside-Signaling beteiligt (Coxon et al., 1996). Die Bindung von Mac-1 an seine Liganden ICAM-1, Fibrinogen oder MPO unterdrückt die Apoptose, während Mac-1-vermittelte Phagozytose von Bakterien apoptotischen Zelltod hervorruft (Kebir et al., 2008).

3.2.8. *Charakterisierung der BALF-, Milz- und Blutzellen*

Die Charakterisierung der BALF-PMN umfasste auch eine morphologische Analyse der Zellen, die keine Genotyp-abhängige Unterschiede aufwiesen (Kapitel 2.7.2.), sowie eine Analyse ihrer Zelloberflächenmarker-Expression (Abbildung 54, Ergänzung 6). Aus der BAL isolierte Ly6G⁺ PMN exprimierten MHCI auf vergleichbarem Niveau in beiden Gruppen. Interessanterweise wurden die CD11b^{-/-}-Ly6G⁺ PMN in der BAL mit einer mäßig starken Expression des Maus-DC-Markers CD11c charakterisiert, was auf die *A. fumigatus* bedingte DC-PMN-Hybriden-

Entstehung hindeutet. Eine infektionsinduzierte de novo-Expression von CD11c wurde für PMN in verschiedenen Mausmodellen für Infektionskrankheiten berichtet und ist mit einer erhöhten Expression von MHCII, CD86 und CD62L assoziiert (Geng et al., 2013). Eine Transdifferenzierung von PMN zu PMN-DC-Hybriden wurde auch von Fites et al., 2018, in präklinischen Mausmodellen für Pilzinfektionen wie Aspergillose und Candidiasis beobachtet.

Außer an der Infektionsstelle wiesen PMN beider Genotypen keine CD11c-Expression auf. Weder auf Milz- noch Blut-PMN wurde CD11c exprimiert. Ly6G⁺ PMN in peripherem Blut und in der Milz zeigten MHCI- sowie mäßige CD62L-Expression. Ein Bruchteil der Milz Ly6G⁺ PMN exprimierte MHCII und CD86, im Gegensatz zu Ly6G⁺ PMN im Blut (Abbildung 55).

Mit *A. fumigatus* infizierte CD11b^{-/-}-Mäuse zeigten tendenziell erniedrigte Konzentration von IL-1 β im peripheren Blut auf im Vergleich zu WT-Mäusen. Die Konzentration an IL-1 α sowie CXCL1, CCL2 und CCL5 war vergleichbar (Abbildung 56).

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Labor- und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1. Labor- und Verbrauchsmaterial

Material	Modell	Hersteller
Zellsieb Cell Strainer: Ø 40 µm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	Sarstedt AG, Nümbrecht	Sarstedt AG, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	Dassel Schleicher & Schuell	Dassel Schleicher & Schuell
Zellsieb	Ø 70 µm	VWR, USA
Pipettenspitzen	0,1–10 µl	Carl Roth, Karlsruhe
	10–200 µl	
	100–1000 µl	
Objektträger	76 x 26 cm Mattrand	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Plastikpipetten	Cellstar 5, 10, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen	15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugen	Biofuge primo (für 1,5 und 2,5 ml Reaktionsgefäße)	Haraeus, Hanau
Zentrifugen	Multifuge 1 L-R	Haraeus, Hanau
Wasserdeionisierungsanlage	(300xg= 1.200 UpM)	ELGA, Bucks, Großbritannien
	Purelab Classic DI	

FACS-Röhrchen	Falcon 5 ml Röhrchen; # 352008	Becton Dickinson, USA
Zentrifuge	Cytospin 3	Shandon, Frankfurt
Petrischalen	60 mm (no 628161)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen	94 mm (no 633161)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kulturplatten	Cellstar Gewebekulturplatte, 6-Loch, Flachboden, non-treated	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Kulturplatten	Cellstar Gewebekulturplatte, 6-Loch Flachboden,	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
MACS-Säulen mit Stempel	Cellstar Gewebekulturplatte, 96-Loch, Flachboden	Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach
	MS-Säule	
MACS-Säulen mit Stempel	LS-Säule	Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach
Pilz-Anzucht-Fertigplatten	Sabouraud-4% Glucose-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR- Platten	Thermo- Fast® 96, 0,2 ml	ABgene, Hamburg
Reaktionsgefäße (“Safe-Lock”)	0,5 ml; 1 ml; 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

4.1.2. Laborgeräte

Tabelle 2. Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Wasserbad	GFL Typ 1012	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Vortexer	Vortex Genie 2TM	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Thermocycler	MJ Research PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research, Massachusetts, USA
Thermocycler	7900 HT Fast RealTime PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler	DNA Thermocycler 480	PerkinElmer, Zaventem, Belgien
Sterilwerkbank	HeraeusLamin Air®HB 2448	Heraeus, Hanau
Pipettierhilfe	pipetus®A-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettierhilfe	Pipetboy	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Mehrkanalpipette	m300: 12 Kanal 30–300 µl	Biohit, Rosbach
Mehrkanalpipette	8 Kanal 30–300 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer	FACS LSR II	BD, Heidelberg, Deutschland
Analysenwaage	Mettler HS4	Mettler, Gießen
Autoklav	V-150	Systec GmbH, Wetterberg
Brutschrank	CB 150, CB 210	Binder, Tutlingen
Spectrophotometer	Nano Drop 2000C	ThermoFisher Scientific, Deutschland

MACS-Separator	QuadroMACS OctoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop	CK2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	CH2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop mit CCD-Kamera	BX40	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop mit CCD-Kamera	BX50WI	Olympus, Hamburg, Deutschland
Hämatologie-Analysators	Scil	Animal Care Company, Guernee, IL
Tierbeatmungsgeräts	MiniVent	Hugo Sachs, MarchHugstetten, Deutschland

4.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3. Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
³ H-Thymidin (³ HTdR)	Perkin Elmer, Wellesley, USA
BSA (Rinderserumalbumin)	PAA, Pasching, Österreich
Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Molecular Probes, Eugene, USA
CpG 1826	Sigma-Aldrich
Diff-Quick-Färbeset	Medion Diagnostics GmbH, Düdingen, Schweiz
DMEM w/o pyruvate	Merck, Darmstadt, Germany
DPBS	Gibco, Carlsbad, UK
Dulbecco's phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich

Ethanol 96%ig, (C ₂ H ₅ OH; vergällt)	Martin und Werner Mundo OHG, Mainz-Kostheim
Ethyl diamintetraessigsäure, Na ₂ -Salz x 2 H ₂ O (EDTA)	Roth, Karlsruhe
FACS Clean Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Germany
FACS Flow Sheath fluid	BD Pharmingen, Heidelberg, Germany
FACS Rinse Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Germany
FCS (Fetal calf serum)	PAN Systems GmbH, Nürnberg
Ficoll 400	Sigma.-Aldrich
GM-CSF	R&D, Wiesbaden, Germany
IMEM (Iscove's modified dulbecco's medium)	Sigma-Aldrich
Isopropanol (2-Propanol) C ₃ H ₈ O	Hedinger, Stuttgart
L-Glutamin	Gibco, Life Technologies, Germany
LPS	Sigma-Aldrich
Ovalbumin	Sigma-Aldrich
Trypanblau solution	Sigma-Aldrich
Tween®-20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Wasser, pyrogenfrei, steril	Aqua B. Braun, Melsungen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Merck KGaA, Darmstadt
EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)	Lonza; Basel, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

4.1.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 4. Puffer und Lösungen

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Komplettmedium für Zellkultur	500 ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium 5% FCS 100U/mL Penicillin/Streptomycin 2mM Glutamine 50µM β-mercaptoethanol 10ng/mL GM-CSF
Waschmedium für Zellkultur	500 ml Eagle's Minimum Essential Medium 2% FCS 100U/mL Penicillin/Streptomycin 2mM Glutamine 50µM β-mercaptoethanol
FACS-Medium	500ml PBS 2% FCS 100U/mL Penicillin/Streptomycin 2mM EDTA
FACS-Fixierungslösung	500ml PBS 0,7% PFA
MACS-Puffer	500ml PBS 2% FCS 2 mM EDTA

4.1.5. Antikörper für die FACS-Analyse

Tabelle 5. Antikörper für die FACS-Analyse

Antikörper	Markierung	Hersteller
CD11a	PE-Cy7	eBioscience
CD11b (M1/70)	PE-Cy7 PE	BioLegend BD Pharmingen™
CD11c (N418)	PE-Cy7 APC	eBioscience eBioscience
CD18	APC PE	BD Pharmingen™ BioLegend
CD3e (145-2C11)	PE-Cy5	eBioscience
CD4 (RM4-5)	Pacific blue	BD Pharmingen™
CD40 (1C10)	APC	eBioscience
CD48	APC	BioLegend
CD62L	PE-Cy7	Caltag Laboratories, Hamburg
CD68 (FA-11)	FITC PE	BioLegend BioLegend
CD80	PE	eBioscience
CD86	PE PE-Cy7	BD Pharmingen™ BD Pharmingen™
CD8a (53-6.7)	Pacific blue	BioLegend
CD103	PE	BioLegend
CD115	PE-Cy7	eBioscience
F4/80	Pacific blue	BioLegend
GR1 (RB6-8C5)	PE	eBioscience

	APC	BioLegend
Ly6-C (AL-21)	APC FITC	Becton Dickinson BD Pharmingen™
Ly6-G (1A8)	Pacifik blue eFluor 450	BioLegend eBioscience
MHCI (28-14-8)	FITC	eBioscience
MHCII (M5/114.15.2)	APC FITC	eBioscience eBioscience

4.2. Methoden für die Beurteilung der Rolle des $\beta 2$ -Integrins Mac-1 in der Differenzierung myeloider Zellen

4.2.1. Tiere

Für die vorliegenden Experimente wurden weibliche C57BL/6J-Mäuse [B6.129S4-Itgamtm1Myd/J; (Coxon at al., 1996)], transgene CD11b^{-/-}-Mäuse sowie OT-I- und OT-II-Mäuse (Tabelle 6) im Alter von 6–16 Wochen verwendet. Die genetisch veränderten Tiere waren auf dem C57BL/6J Hintergrund. Die Tiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz gezüchtet. Alle Versuchstiere wurden unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free) gehalten und nach spezifischen Hygienemaßnahmen von Pathogenen ferngehalten. Die transgene OT-I-Mäuse wurden für Gewinnung der CD8⁺ T-Zellen verwendet, die im Zusammenhang mit H-2Kb das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) erkennen. Von transgenen OT-II-Mäuse wurden CD4⁺ T-Zellen isoliert, die im Zusammenhang mit H-2 I-Ab und I-Ad das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉-spezifischen T-Zell-Rezeptor exprimieren. Die Durchführung der Experimente erfolgte nach den Richtlinien der Tierversuchsordnung und des Deutschen Tierschutzgesetzes. Alle Tier-Experimente wurden in gemäß den institutionellen Richtlinien durchgeführt und durch die zuständige nationale Behörde (Nationales Ermittlungsamt Rheinland-Pfalz, Zulassungs-ID: AZ 23 177-07 / G11-1-034) genehmigt.

Tabelle 6. Mäusestämme

Mausstamm	Quelle
C57BL/6J	Zentrale Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz
OT-I (C57BL/6J)	Zentrale Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz
OT-II (C57BL/6J)	Zentrale Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz
CD11b ^{-/-} (B6.129S4-ITGAM<TM1MYD>/J)	Zentrale Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz

4.2.2. Präparation der Zellen

Zur Gewinnung der Zellen wurden 6-8 Wochen alten C57BL/6- und CD11b^{-/-}-Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Unter sterilen Bedingungen wurde das Blut, die Milz, beziehungsweise beide Hinterläufen der Maus entnommen und zur Zellsuspension in einer Konzentration von 2×10^6 /ml der Kulturmedium präpariert. Die Zahlbestimmung der lebenden Zellen fand mittels der Trypanblau-Färbung in einer Neubauerkammer statt.

4.2.2.1. Präparation von Knochenmarkzellen

Die Femura und Tibiae wurden nach Entfernung sämtlichen Muskel- und Bindegewebes durch einminütiges Waschen in 70 % Ethanol gereinigt und anschließend in PBS gewaschen. Das Knochenmark wurde mittels einer 10 ml Spritze und Kanüle mit Waschmedium herausgespült. Knochenmarkgewebe wurden mit Hilfe eines Spritzkolbens durch ein 70 µm-Nylonsieb gereibt und mit 10 ml Waschmedium abgespült. Die Zellsuspension wurde 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und zur Erythrozytenlyse in 1 ml Gey's Lyse Puffer resuspendiert. Nach der 60 sekundigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Knochenmarkzellen zwei Mal mit 20 ml Waschmedium abgespült, 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und in Kulturmedium aufgelöst. Die enthaltenen Zellen wurden direkt für experimentalen Maßnahmen genommen oder in GM-CSF-haltigem Kulturmedium für 1, 2, 3 beziehungsweise 7 Tage kultiviert.

4.2.2.2. Präparation von Milzzellen

Zur Gewinnung der Milzzellen, wurde sie mit Hilfe eines Spritzkolbens durch ein Nyloonsieb (Durchmesser 70 μm) gereibt und mit 10 ml Waschmedium abgespült. Die Zellsuspension wurde 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und zur Erythrozytenlyse in 1 ml Gey's Lyse Puffer resuspendiert. Nach der 60 sekundige Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Milzzellen zwei Mal mit 20 ml Waschmedium abgespült, 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und in Kulturmedium aufgelöst. Die enthaltenen Zellen wurden direkt für die experimentalen Maßnahmen verwendet.

4.2.2.3. Präparation von peripheren Blutzellen

Das periphere Blut wurde sofort nach der Gewinnung in 5 ml Gey's Lyse Puffer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Erythrozytenlyse wurden die Blutzellen zwei Mal mit 20 ml Waschmedium gewaschen, 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und im Kulturmedium aufgelöst. Die enthaltenen Zellen wurden direkt nach der Präparation für Experimente verwendet.

4.2.3. BMDC-Generierung und MACS-assozierte Zellisolation

4.2.3.1. Generierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark (BMDC)

Für die BMDC-Kultur der Knochenmarkzellen der C57BL/6- und CD11b^{-/-}-Mäusen wurde IMDM-Medium mit 5% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 50 mM β -Mercaptoethanol und 10 ng rekombinantes murinen GM-CSF pro ml verwendet. Hitzeinaktivierung des FCS erfolgte durch Erhitzen auf 56°C im Wasserbad für 30 Minuten.

Die frisch präparierte Knochenmarkzellen wurden in einer Konzentration von $2 \times 10^6/10\text{ml}$ im Kulturmedium in 10 cm Petrischalen eingesetzt. Die Knochenmark-abgeleitete dendritischen Zellen (BMDC) wurden 7 Tage im Brutschrank bei 37°C mit 10% CO₂ in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre angezüchtet. Jede drei Tage wurde das Kulturmedium mit 5 ml frischen Mediums ergänzt. Am 7-ten Tag wurden die nicht adhärenente Zellen geerntet, gewaschen und alsbald für Experimente verwendet. Die Reinheit und Reifung der BMDC-Spiegel wurde durch Durchflusszytometrie analysiert, basierend auf der Expression von CD11c und MHC-II.

4.2.3.2. Isolation der Zellen über Magnet assoziierte Zellsortierung (MACS)

Die MACS® (Magnetic-activated cell sorting) ist eine Technik, die über ein magnetisches Verfahren Isolation verschiedener Zellsubpopulationen entsprechend ihrer spezifischen Oberflächenantigenen ermöglicht. Zunächst werden die Zielzellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern markiert, die an magnetische Mikrokügelchen konjugiert sind. Dann wird die Zellsuspension auf eine MACS-Säule geladen, die im Magnetfeld eines MACS-Separators platziert ist. Die Antigen-positive Zellen bleiben in der Säule erhalten. Nach dem Entfernen aus dem Magnetfeld können die magnetisch markierten positiven Zellen von der Säule eluiert werden. Daher werden die positiven und negativen Zellen getrennt gesammelt.

In dieser Studie wurden mittels Magnet-assoziierte Zellsortierung naive DC des Knochenmarks, Milz sowie Blut gewonnen aber auch BMDC und PMN. Zusätzlich wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen isoliert. Alle Verfahren wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.2.3.2.1. Isolation der DC

Mittels anti-CD11c MicroBeads wurden DC über Positiv-Selektion aus der Milzsuspension, aus der Blutsuspension beziehungsweise aus dem erythrozytenfreien Knochenmarksuspension isoliert. Die Reinheit und Differenzierungsgrad wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der CD11c- und MHC-II-Expression bestimmt.

4.2.3.2.2. Isolation der PMN

Für in vitro Experimente wurden die polymorphkernige Knochenmarkzellen zuerst über Negativ-Selektion mittels anti-CD48 und demnächst über Positiv-Selektion mittels anti-Ly6G MicroBeads aus der erythrozytenfreien Knochenmarksuspension isoliert. Zur Gewinnung reifer PMN wurden die frisch isolierte Ly6G⁺CD48⁻-Knochenmarkzellen im GM-CSF-haltigem Kulturmedium über 2 Tage bei der für BMDC-Kultur-Bedingungen (s. Kapitel 5.4.1) angezüchtet. Die Reinheit der Ly6G⁺CD48⁻ PMN wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die Zellen wurden sowohl am Tag 0 als auch am Tag 1 und 2 der Kultur gesammelt und für die Analyse der PMN Granulozyten verwendet.

4.2.3.2.3. Isolation der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen

CD8⁺ und CD4⁺ naive T-Zellen wurden entsprechend aus Milzen von OT-I oder OT-II unter Verwendung von anti-CD8 oder anti-CD4 MicroBeads über Positiv-Selektion gewonnen.

4.2.4. Peptid-Beladung und Stimulation der Zellen

Stimulierung der Zellen erfolgte durch OVA-Peptidbeladung und LPS-Zugabe. Dafür wurden die Zellen sowohl für drei Stunden mit 100 ng/ml OVA-Peptid (257-264) SIINFEKL oder 100 ng/ml OVA-Peptid (323-339) inkubiert als auch zusätzlich über Nacht mit 100 ng/ml LPS. Demnächst wurden die Zell-kulturen mit dem Waschmedium zwei Mal gewaschen und in einer Konzentration von $2 \times 10^5/10\text{ml}$ im Test-Medium für die Verwendung in vorliegenden Experimenten gelöst.

4.2.5. Funktionsanalyse der Zellen

4.2.5.1. Antigen-spezifische CD8⁺ und CD4⁺ T-Zell-Aktivierung

Aus dem Grund, dass BMDC zu der Gruppe von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) gehören, wurden die für Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen verwendet. Außerdem wurden PMN aufgrund ihrer MHCI-Expression für die Stimulierungsaktivität getestet. Dabei wurde die Funktion von CD11b-Molekül (Mac-1) auf Stimmulierungskapazität untersucht.

4.2.5.2. In vitro T-Zell-Proliferation

[³H]dT-Methode

Für die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung wurden die CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mit BMDC oder PMN kultiviert. Die T-Zellen wurden mit 15 μM CFSE gefärbt, zwei Mal gewaschen und in einer Konzentration von $5 \times 10^5/10\text{ ml}$ im Test-Medium gelöst. BMDC und PMN wurden dafür zuerst mit den Peptiden beladen und teilweise stimuliert (3.2.) Die Kultur fand in 96-Well-Platten bei 37°C für 96 h statt. Um einen besseren Überblick auf die Rolle von Mac-1 zu erlangen, die Kokultur wurde auch in der Anwesenheit von Mac-1-Liganden: Fibrinogen, Thrombospondin und Vitronectin durchgeführt. Die T-Zellen Proliferation wurde mittels FACS analysiert. Dazu wurden die Zellen mit anti-CD4-Pacyfic blue oder anti-CD8-Pacyfic blue gefärbt.

CFSE-Methode

Für die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung wurden die CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mit DC kultiviert. Die T-Zellen wurden in einer Konzentration von $5 \times 10^5/10\text{ml}$ im Test-Medium gelöst. Milz-DC und BMDC wurden mit den Peptiden beladen und teilweise stimuliert (3.2.) Die Kultur fand in 96' Well-Platten bei 37°C für 72 h statt. Für die letzte 16 h wurden die Zellen mit 0,25 µCi [³H]-Thymidin pro Welle gepulst. Im Anschluss wurden die Zellen auf Glasfaserfilter geerntet (Tomtec Harvester 96 Mach II Cell Harvester with AutoTrap 24) und die Einbauraten (counts per minute [cpm]) in einem Flüssigszintillationszähler (Beta-counter) gemessen.

4.2.6. Charakterisierung der Zellen

4.2.6.1. Durchflusszytometrische Analyse

Die analytische Durchflusszytometrie (FACS) ermöglicht den Einblick in die quantitative Zusammensetzung ausgewählter intra- sowie extrazellulärer Marker der Zellen, die hindurch entsprechenden fluoreszierend markierten Antikörper erkannt werden können. Die zu analysierenden Zellen für Oberflächenmarker Expression wurden mit FACS-Medium gewaschen und jeweils 100 µL der Zellsuspension in einer Konzentration von $1 \times 10^7/\text{ml}$ in die FACS-Röhrchen übertragen. Um die unspezifische Bindung zu vermeiden, wurden die freien Fc-Rezeptoren auf den Zellen mit 10 µl (2,6 µg/ml) Anti-FcγRII/III-Antikörper (Klon 2.4.G2) abgesättigt und für 15 min in RT inkubiert. Demnächst wurden die Zellen mit 10 µl einer Mischung aus mehreren fluoreszierend markierten Primärantikörpern (0.5-10 µg/ml Endkonz., abhängig vom Antikörper) gegen die zu analysierenden Oberflächenmoleküle für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Medium gewaschen und mit 0,7% PFA fixiert. Für die intrazelluläre FACS-Färbung. Die Intrazelluläre Färbung erfordert ein anfänglicher zusätzlicher Schritt, der das Eindringen von Antikörper in die Zellinnere ermöglicht, nämlich Permeabilisierung der Zellen, die durch frisch angesetzter Perm-Lösung vorgenommen wurde. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte durch die Messung am BD FACS LSR II.

4.2.6.2. Anfertigung der Cytospin-Präparaten

Für die morphologische Analyse wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert, mit Diff Quick Staining Set® (Microptic) gefärbt und unter dem Mikroskop mit 20- und 40-Fache Vergrößerung untersucht. Dazu wurden 100 µL der Zellsuspension in einer Konzentration von $5 \times 10^5/\text{ml}$ in PBS auf die Cytospin-Kammer aufgetragen und für 5 min bei 500 rpm

zentrifugiert. Folgend den Anweisungen des Herstellers wurden die Präparate in Fixierungs-Lösung (Triarylmethanfarbstoffe in Methanol) getaucht und mit Diff Quik-Lösung I (Xanthenfarbstoff) und anschließend in Diff Quik-Lösung II (Thiazinfarbstoff) gefärbt. Die Präparate wurden kurz mit destilliertem Wasser abgespült und einige Stunden an der Luft getrocknet. Daraufhin wurde ein Tropfen Entellan® Schnell-Eindeckmittel aufgetragen und das Präparat mit einem Deckglas versehen. Die Morphologie der Zellen wurde mikroskopisch analysiert.

4.2.6.3. Zytokin-Messung

Die Menge der von BMDC produzierten Zytokinen wurde in BMDC-Zellkulturüberständen und in der Überständen der ko-Kulturen von BMDC und CD4⁺ T-Zellen sowie CD8⁺ T Zellen unter Verwendung eines zytometrischen Bead-Arrays (CBA Inflammation; BD Pharmingen).

4.2.6.4. Annexin-V-Apoptose-Nachweis

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, wird schon in der frühen Phase mit dem Verlust der natürlichen Membranasymmetrie charakterisiert, indem die normalerweise im zytosolseitigen Membranschicht lokalisierte Phospholipid Phosphatidylserin (PS) an die äußere Membranschicht transportiert wird. Exposition des PS auf der Äußere tritt schon in der frühen Phase der Apoptose und wird andauernd bis zur finalen Phase des Zelltodes auf der Oberfläche präsentiert.

Annexin-V besitzt Fähigkeit, an Phosphatidylserin (PS) zu binden, und wird häufig zum Nachweis apoptotischer Zellen verwendet (van Engeland et al., 1998). Apoptotische Zellen wurden mit dem fluoreszenz-markierten Annexin-V erfasst und mittels Durchflusszytometrie visualisiert.

4.2.6.5. Quantitative PCR (qPCR)

Eine Quantitative-PCR-Analyse bietet die Gelegenheit zur Analyse der Expression der ausgewählter Gene auf mRNA-Ebene. Diese PCR (polymerase chain reaction) basierte Methode ermöglicht die Echtzeit-Überwachung der Amplifikation der Ziel-DNA, nachdem sie von RNA revers transkribiert wurde, durch den Nachweis eines unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffs (SYBRgreen), der in die doppelsträngige DNA interkaliert und mit fortschreitender Reaktion zunimmt.

Für die mRNA-Aufreinigung aus BM-PMN (Tag 3) und BMDC (Tag 7) wurden die Zellen von der Petrischale geerntet und jeweils 1×10^6 der Zellen in das 1 ml Eppendorfgefäß und für 10 min bei 300 g abzentrifugiert. Das Medium wurde abdekantiert und 350 µl Lyse-Puffer (miRNeasy® Mini Kit, Qiagen) zugegeben. Die mRNA aus den Zellen wurde mittels des miRNeasy® Mini Kit (Qiagen) isoliert und aufgereinigt. Die cDNA wurde mittels iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) aus der mRNA synthetisiert, wobei der Thermocycler in der Tabelle beschriebenes Programm durchlief.

umgekehrte Transkriptase	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	25	42	85	4
Zeit [min]	5	30	5	∞

Um die quantitative PCR vorzugehen wurde cDNA auf 200 ng/µl eingestellt. Der qPCR-MIX wurde nach folgendem Reaktion Setup in die 96-Well-PCR-Platte eingesetzt:

Reaktionsansatz:
1 µL cDNA (200 ng/µl)
10 µL Eva-Green Master Mix (1x)
7,5 µL dH ₂ O
1,5 µL Primers (1pmol/µl)

Das qPCR-Programm wurde mithilfe eines quantitativen Thermocycler unter folgendem Temperaturprogramm gelaufen, wobei die Schritte 2 und 3 50 Mal wiederholt wurden.

qPCR	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Schritt 6	Schritt 7
Temperatur [°C]	95	95	60	95	60	95	60
Zeit [s]	120	5	30	30	30	15	60

4.3. Methoden für die Untersuchung der Bedeutung des β 2-Integrins Mac-1 für PMN Funktion bei der invasiven pulmonalen Aspergillose

4.3.1. *Aspergillus fumigatus* Inokulation

Die männliche 8-16 Wochen alte WT- und CD11b^{-/-}-Mäuse wurden in drei Gruppen, Test-Gruppe, Survival-Gruppe und Kontroll-Gruppe, aufgeteilt. Die Tiere der Kontroll-Gruppe wurden PMN depletiert. Dafür wurden die Mäuse 24 h vor dem Experiment intraperitoneal mit 150 μ g anti-GR1 (clone RB6-8C5) injiziert. Um eine invasive pulmonale Aspergillose zu provozieren, wurden alle Tiere anästhesiert und mit $1 \cdot 10^7/100 \mu$ L *Aspergillus*-Konidien intratracheal inokuliert, indem die Pilzsuspension durch den in die Luftröhre eingeführten 22G Venenverweilkatheter verabreicht. Die Test-Gruppe war 24h nach der Inokulation für Organen-Analyse geopfert. Die Survival-Gruppe und die Kontroll-Gruppe wurden fürs Überlebens Assay zugewiesen. Um die Dispersion in der Lunge zu verbessern, wurden Mäuse mechanisch beatmet mit 250 Atemzügen/min, 300 μ l/Atemzug für 2 min unter Verwendung eines Tierbeatmungsgeräts (MiniVent, Hugo Sachs, MarchHugstetten, Deutschland) wie von Prufer at al., 2014) beschrieben.

Tiere	Tag -1	Tag 0
Test-Gruppe	---	<i>Aspergillus fumigatus</i> Inokulation
Survival-Gruppe	---	<i>Aspergillus fumigatus</i> Inokulation
Kontroll-Gruppe	150 μ g anti-GR1 Injektion	<i>Aspergillus fumigatus</i> Inokulation

4.3.2. Organentnahme und -analyse

24 h nach der *Aspergillus*-Inokulation wurden die Mäuse mittels CO₂ getötet. Die Lungen, Milzen, periphere Blut und bronchoalveoläre Lavage wurden entnommen und analysiert.

4.3.2.1. Bronchoalveoläre Lavage

Die Trachea/ Luftröhre wurde durchgeschnitten und die Lungen wurden mit 1000 μ L PBS zwei Mal gespült. Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde entnommen und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels zytometrischen Bead-Array (CBA Inflammation; BD Pharmingen) für Zytokinkonzentration gemessen. Der Zellpellet wurde für FACS-Analyse und Cytospin-Präparate verwendet.

4.3.2.2. Milz und periphere Blut

Die Zellen von der Milz und peripheren Blut wurden wie beschrieben (Kapitel 3.2.) gewonnen und für FACS-Analyse verwendet.

4.3.2.3. Lungen

24 Stunden nach der Infektion wurden einige Mäuse getötet und die Lungen wurden entfernt. Die linke Lunge wurde homogenisiert und für CFU-Test (Colony Formings Unit) verwendet. Die rechte Lunge wurde mit Roti®-Histofix 4,5% fixiert und histologisch untersucht.

4.3.3. Histopathologische Analyse

Die Maus-Lungen wurden über die Luftröhre mit 10 % Formalin gefüllt. Zur Beurteilung von Entzündungsreaktionen wurden Paraffin eingebettete Blöcke hergestellt und die 5 µm Schnitte wurden genommen und mit H&E gefärbt. H&E-gefärbte Gewebeschnitte wurden mikroskopisch für die peri-bronchiale, perivaskuläre und Gewebeentzündung analysiert, mit einem BX40 Mikroskop mit CCD-Kamera.

4.3.4. In-vivo-Pilzclearance

Um die In-vivo-Tötung von Pilzen in Lungen zu beurteilen, wurden die Lungen mechanisch homogenisiert und Verdünnungsreihen auf die Sabouraud-4% Glucose-Agar aufplattiert. Nach 24 und 48 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden koloniebildende Einheiten (CFU) gezählt.

4.3.5. Cytospin-Analyse

Zum Nachweis von lungeninfiltrierendem PMN wurde 150 µl BALF auf den Objektträger übertragen und mit dem Cytospin (3.500 rpm) für 5 min abzentrifugiert, luftgetrocknet, mit dem Diff Quick Staining Set gefärbt und fixiert (s. Kapitel 6.2.6.2). PMN wurden basierend auf Kern-Charakteristik identifiziert.

4.3.6. Zytokin- und Chemokinkonzentration-Detektion

Die Mengen an Zytokinen und Chemokinen in BAL- und Blutproben wurden durch zytometrisches Bead-Array unter Verwendung der Maus-CBA-Flex-Sets gemäß den Anweisungen des Herstellers (BD Bioscience, San Jose, CA) quantifiziert.

4.4.Statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden mittels der GraphPad Prism 9.1 Software statistisch ausgewertet und als grafische Darstellung visualisiert. Die statistische Signifikanz von zwei verschiedenen Parametern wurde mit dem ungepaarten Students-t-Test bestimmt und beim Vergleich mehr als zwei Gruppen wurde von Einweg-ANOVA verwendet. Die statistisch signifikante Unterschiede werden als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ bezeichnet.

Literaturverzeichnis

- Aarts, C., Hiemstra, I. H., Tool, A., van den Berg, T. K., Mul, E., van Bruggen, R., & Kuijpers, T. W. (2019). Neutrophils as Suppressors of T Cell Proliferation: Does Age Matter?. *Frontiers in immunology*, 10, 2144. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02144>
- Abi Abdallah, D. S., Egan, C. E., Butcher, B. A., & Denkers, E. Y. (2011). Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *International immunology*, 23(5), 317–326. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxr007>
- Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:339-362. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132554
- Adema GJ. Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunol Lett.* 2009;122(2):128-130. doi:10.1016/j.imlet.2008.11.017
- Ai, Z, Udalova, IA. Transcriptional regulation of neutrophil differentiation and function during inflammation. *J Leukoc Biol.* 2020; 107: 419– 430. doi.org/10.1002/JLB.1RU1219-504RR
- Ákos M. Lőrincz, Balázs Bartos, Dávid Szombath, Viktória Szeifert, Csaba I. Timár, Lilla Turiák, Role of Mac-1 integrin in generation of extracellular vesicles with antibacterial capacity from neutrophilic granulocytes Received 31 Oct 2018, Accepted 19 Nov 2019, Published online: 09 Dec 2019 <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1698889>
- Allen LA, Aderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in Macrophages. *J Exp Med.* 1996;184(2):627-637. doi:10.1084/jem.184.2.627
- Anderson, L. R., Owens, T. W., & Naylor, M. J. (2014). Structural and mechanical functions of integrins. *Biophysical Reviews*, 6(2), 203-213. link.springer.com/article/10.1007/s12551-013-0124-0
- Anderson, M. E., & Siahaan, T. J. (2003). Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides*, 24(3), 487-501.

- Arnaout MA. Biology and structure of leukocyte β 2 integrins and their role in inflammation. *F1000Res.* 2016;5:F1000 Faculty Rev-2433. Published 2016 Oct 4. doi:10.12688/f1000research.9415.1
- Asselin-Paturel C, Trinchieri G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med.* 2005;202(4):461-465. doi:10.1084/jem.20051395
- Avellino R, Havermans M, Erpelinck C, et al. An autonomous CEBPA enhancer specific for myeloid-lineage priming and neutrophilic differentiation. *Blood.* 2016;127(24):2991-3003. doi:10.1182/blood-2016-01-695759
- Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol.* 2009;21(5):489-498. doi:10.1093/intimm/dxp021
- Azzouz L, Cherry A, Riedl M, et al. Relative antibacterial functions of complement and NETs: NETs trap and complement effectively kills bacteria. *Mol Immunol.* 2018;97:71-81. doi:10.1016/j.molimm.2018.02.019
- Baker, V.S., Imade, G.E., Molta, N.B. et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age. *Malar J* 7, 41 (2008). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-41>
- Balkow S, Heinz S, Schmidbauer P, et al. LFA-1 activity state on dendritic cells regulates contact duration with T cells and promotes T-cell priming. *Blood.* 2010;116(11):1885-1894. doi:10.1182/blood-2009-05-224428
- Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767
- Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe.* 2014;15(5):526-536. doi:10.1016/j.chom.2014.04.011
- Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood.* 2002;100(3):854-861. doi:10.1182/blood.v100.3.854
- Behrens, E. M., Sriram, U., Shivers, D. K., Gallucci, M., Ma, Z., Finkel, T. H., & Gallucci, S. (2007). Complement receptor 3 ligation of dendritic cells suppresses their stimulatory

- capacity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 178(10), 6268–6279. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6268>
- Benedicto A, Marquez J, Herrero A, Olaso E, Kolaczowska E, Arteta B. Decreased expression of the $\beta 2$ integrin on tumor cells is associated with a reduction in liver metastasis of colorectal cancer in mice. *BMC Cancer*. 2017;17(1):827. Published 2017 Dec 6. doi:10.1186/s12885-017-3823-2
- Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol*. (2003) 171:6052–8. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6052
- Bhardwaj N. Processing and presentation of antigens by dendritic cells: implications for vaccines. *Trends Mol Med*. 2001;7(9):388-394. doi:10.1016/s1471-4914(01)02101-3
- Bhattacharya P, Thiruppathi M, Elshabrawy HA, Alharshawi K, Kumar P, Prabhakar BS. GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity. *Cytokine*. 2015;75(2):261-271. doi:10.1016/j.cyto.2015.05.030
- Bixel MG, Li H, Petri B, Khandoga AG, Khandoga A, Zarbock A et al. CD99 and CD99L2 act at the same site as, but independently of PECAM-1 during leukocyte diapedesis. *Blood* 2010;116:1172–84
- Blumenreich MS. The White Blood Cell and Differential Count. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 153. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK261/>
- Bodey B, Bodey B Jr, Kaiser HE. Dendritic type, accessory cells within the mammalian thymic microenvironment. Antigen presentation in the dendritic neuro-endocrine-immune cellular network. *In Vivo*. 1997;11(4):351-370.
- Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S33-40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017. Epub 2010 Jan 12. PMID: 20061006.
- Bonnett CR, Cornish EJ, Harmsen AG, Burritt JB. Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infect Immun*. 2006;74(12):6528-6539. doi:10.1128/IAI.00909-06

- Boyle KB, Gyori D, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Taylor PR, Mocsai A, Stephens LR, Hawkins PT. Class IA Phosphoinositide 3-Kinase {beta} and {delta} Regulate Neutrophil Oxidase Activation in Response to *Aspergillus fumigatus* Hyphae. *J Immunol.* 2011;186:2978–2989.
- Brakebusch C., Fässler R., The integrin–actin connection, an eternal love affair. *EMBO J* (2003); 22:2324-2333 doi.org/10.1093/emboj/cdg245
- Brandum EP, Jørgensen AS, Rosenkilde MM, Hjortø GM. Dendritic Cells and CCR7 Expression: An Important Factor for Autoimmune Diseases, Chronic Inflammation, and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22(15):8340. <https://doi.org/10.3390/ijms2215834>
- Brasel K, McKenna HJ, Charrier K, Morrissey PJ, Williams DE, Lyman SD. Flt3 ligand synergizes with granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice. *Blood.* 1997;90(9):3781-3788.
- Briesewitz R, Kern A, Marcantonio EE. Assembly and function of integrin receptors is dependent on opposing alpha and beta cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell.* 1995 Aug;6(8):997-1010. doi: 10.1091/mbc.6.8.997. PMID: 7579714; PMCID: PMC301258.
- Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:1-21. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101229
- C Edward Rose Jr, Joanne A Lannigan, Paul Kim, James J Lee, Shu Man Fu and Sun-sang J Sung. Murine lung eosinophil activation and chemokine production in allergic airway inflammation. *Cellular & Molecular Immunology* (2010) 7, 361–374; doi:10.1038/cmi.2010.31
- C. A. Lowell and T. N. Mayadas, “Overview: studying integrins in vivo,” *Methods in Molecular*, vol. 757, pp. 369–397, 2012.
- Cambi A, van Helden SFG, Figdor CG. Roles for Integrins and Associated Proteins in the Haematopoietic System. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin*

(TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6618/>

Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Mar 1;3(3):a004994. doi: 10.1101/cshperspect.a004994. PMID: 21421922; PMCID: PMC3039929.

Carl G. Gahmberg, Susanna C. Fagerholm, Susanna M. Nurmi, Triantafyllos Chavakis, Silvia Marchesan, Mikaela Grönholm, Regulation of integrin activity and signalling, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* Volume 1790, Issue 6, June 2009, Pages 431-444 doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.007

Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Oct;15(5):547-56. doi: 10.1016/j.ceb.2003.08.003. PMID: 14519389.

Casals, C., Barrachina, M., Serra, M., Lloberas, J., & Celada, A. (2007). Lipopolysaccharide up-regulates MHC class II expression on dendritic cells through an AP-1 enhancer without affecting the levels of CIITA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(10), 6307–6315.

Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980. PMID: 20176265; PMCID: PMC2923430.

Chen, Y., Sharma, S., Assis, P. A., Jiang, Z., Elling, R., Olive, A. J., Hang, S., Bernier, J., Huh, J. R., Sasseti, C. M., Knipe, D. M., Gazzinelli, R. T., & Fitzgerald, K. A. (2018). CNBP controls IL-12 gene transcription and Th1 immunity. *The Journal of experimental medicine*, 215(12), 3136–3150. <https://doi.org/10.1084/jem.20181031>

Chirumbolo S, Björklund G, Sboarina A, Vella A. The role of basophils as innate immune regulatory cells in allergy and immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(4):815-831. doi:10.1080/21645515.2017.1417711

Chouhan B, Denesyuk A, Heino J, Johnson MS, Denessiouk K. Conservation of the human integrin-type beta-propeller domain in bacteria. *PLoS One.* 2011;6(10):e25069. doi:10.1371/journal.pone.0025069

- Christos Golias, Anna Batistatou, Georgios Bablekos, Alexandros Charalabopoulos, Dimitrios Peschos, Panagiotis Mitsopoulos & Konstantinos Charalabopoulos (2011) Physiology and Pathophysiology of Selectins, Integrins, and IgSf Cell Adhesion Molecules Focusing on Inflammation. A Paradigm Model on Infectious Endocarditis, *Cell Communication & Adhesion*, 18:3, 19-32, DOI: 10.3109/15419061.2011.606381
- Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3-20. doi:10.1111/imm.12888
- Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* (2007) 204(8):1757–64. doi:10.1084/jem.20070590
- Cornely OA, Bohme A, Buchheidt D, Einsele H, Heinz WJ, Karthaus M, et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. Recommendations of the Infectious diseases working party of the German Society for haematology and oncology. *Haematologica* (2009) 94:113–22. doi: 10.3324/haematol.11665
- Cowland JB, Borregaard N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol*. 1999;66(6):989-995. doi:10.1002/jlb.66.6.989
- Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010;9(10):804-20
- Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, et al. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. 1996;5(6):653-666. doi:10.1016/s1074-7613(00)80278-2
- Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsman BA, Rock KL. The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu Rev Immunol*. 2017;35:149-176. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055254

- Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J*. 2014;33(10):1104-1116. doi:10.1002/embj.201488027
- Danen EH, Sonnenberg A. Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol*. 2003;201(4):632-641. doi:10.1002/path.1472
- Danen EHJ. Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6259/
- De Bondt M, Hellings N, Opdenakker G, Struyf S. Neutrophils: Underestimated Players in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis (MS). *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4558. Published 2020 Jun 26. doi:10.3390/ijms21124558
- De Filippo K, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N. Neutrophil chemokines KC and Macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue Macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J Immunol*. 2008;180(6):4308-4315. doi:10.4049/jimmunol.180.6.4308
- de Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):378-391. doi:10.1038/nri.2016.49
- Diamond M. S., Alon R., Parkos C. A., Quinn M. T., Springer T. A. (1995). Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1. *J. Cell Biol.* 130, 1473–1481. doi:10.1083/jcb.130.6.1473
- Díaz-Godínez C, Carrero JC. The state of art of neutrophil extracellular traps in protozoan and helminthic infections. *Biosci Rep*. 2019;39(1):BSR20180916. Published 2019 Jan 11. doi:10.1042/BSR20180916
- Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, et al. : Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol*. 1999;163(9):5029–38. doi:10.1111/imr.12454
- Dorward DA, Lucas CD, Chapman GB, Haslett C, Dhaliwal K, Rossi AG. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function

- during acute inflammation. *Am J Pathol.* 2015;185(5):1172-1184. doi:10.1016/j.ajpath.2015.01.020
- Downey GP, Chan CK, Trudel S, Grinstein S. Actin assembly in electropermeabilized neutrophils: role of intracellular calcium. *J Cell Biol.* 1990;110(6):1975-1982. doi:10.1083/jcb.110.6.1975
- Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010 Jan;20(1):34-50. doi: 10.1038/cr.2009.139. Epub 2009 Dec 15. PMID: 20010915.
- Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where?. *J Leukoc Biol.* 2013;94(4):657-670. doi:10.1189/jlb.1012544
- Dupuy AG, Caron E. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. *J Cell Sci.* 2008;121(11):1773-1783. doi:10.1242/jcs.018036
- Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2423-2431. doi:10.1172/JCI41649
- Ehreichiou D, Xiong Y, Xu G, Chen W, Shi Y, Zhang L. CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *J Exp Med.* 2007;204(7):1519-1524. doi:10.1084/jem.20062292
- El Kebir D, Filep JG. Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through $\beta 2$ Integrins. *Front Immunol.* 2013;4:60. Published 2013 Mar 6. doi:10.3389/fimmu.2013.00060
- El Kebir D, József L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ Res.* 2008;103(4):352-359. doi:10.1161/01.RES.0000326772.76822.7a
- Embgenbroich M, Burgdorf S. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol.* 2018;9:1643. Published 2018 Jul 16. doi:10.3389/fimmu.2018.01643

- Engelhardt, B. and Wolburg, H. (2004), Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?. *Eur. J. Immunol.*, 34: 2955-2963. <https://doi.org/10.1002/eji.200425327>
- Eruslanov, E. B., Bhojnagarwala, P. S., Quatromoni, J. G., Stephen, T. L., Ranganathan, A., Deshpande, C., ... & Singhal, S. (2014). Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *The Journal of clinical investigation*, 124(12), 5466-5480.)
- Espinosa V, Rivera A. First Line of Defense: Innate Cell-Mediated Control of Pulmonary Aspergillosis. *Front Microbiol.* 2016;7:272. Published 2016 Mar 3. doi:10.3389/fmicb.2016.00272
- Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, Hogg N. Integrins in immunity. *J Cell Sci.* 2009 Jan 15;122(Pt 2):215-25. doi: 10.1242/jcs.019117. PMID: 19118214.
- Fang, J., Muto, T., Kleppe, M., Bolanos, L. C., Hueneman, K. M., Walker, C. S., ... & Starczynowski, D. T. (2018). TRAF6 mediates basal activation of NF- κ B necessary for hematopoietic stem cell homeostasis. *Cell reports*, 22(5), 1250-1262.
- Faridi MH, Khan SQ, Zhao W, Lee HW, Altintas MM, Zhang K, et al. CD11b activation suppresses TLR-dependent inflammation and autoimmunity in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* (2017) 127:1271–83. doi: 10.1172/JCI8844209778200
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1317-1327. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.008
- Fites JS, Gui M, Kernien JF, et al. An unappreciated role for neutrophil-DC hybrids in immunity to invasive fungal infections. *PLoS Pathog.* 2018;14(5):e1007073. Published 2018 May 21. doi:10.1371/journal.ppat.1007073
- Frick C, Odermatt A, Zen K, Mandell KJ, Edens H, Portmann R, Mazzucchelli L, Jaye DL, Parkos CA. Interaction of ICAM-1 with beta 2-integrin CD11c/CD18: characterization of a peptide ligand that mimics a putative binding site on domain D4 of ICAM-1. *Eur J Immunol.* 2005 Dec;35(12):3610-21. doi: 10.1002/eji.200425914. PMID: 16252253.

- Friedman A. D. (2007). Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*, 26(47), 6816–6828. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210764>
- Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(3):638-650. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.034
- Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(1):3-8. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0297
- Gafa V, Lande R, Gagliardi MC, Severa M, Giacomini E, Remoli ME, et al. Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. *Infect Immun*. (2006) 74:1480–9. doi: 10.1128/IAI.74.3.1480-1489.2006
- Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(6):431-444. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.007
- Gasson JC. Molecular physiology of granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1991;77(6):1131-1145.
- Gazendam RP, van de Geer A, Roos D, van den Berg TK, Kuijpers TW. How neutrophils kill fungi. *Immunol Rev*. 2016;273(1):299-311. doi:10.1111/imr.12454
- Gazendam RP, van Hamme JL, Tool AT, et al. Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *J Immunol*. 2016;196(3):1272-1283. doi:10.4049/jimmunol.1501811
- Geng S, Matsushima H, Okamoto T, Yao Y, Lu R, Page K, et al. Emergence, origin, and function of neutrophil-dendritic cell hybrids in experimentally induced inflammatory lesions in mice. *Blood* (2013) 121:1690–700. doi: 10.1182/blood-2012-07-445197
- Giacalone, 2019 Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for Homeostasis and Disease

- Giuseppe A. Ramirez, Mona-Rita Yacoub, Marco Ripa, Daniele Mannina, Adriana Cariddi, Nicoletta Saporiti, Fabio Ciceri, Antonella Castagna, Giselda Colombo , and Lorenzo Dagna. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *BioMed Research International* (2018), Article ID 9095275, doi:10.1155/2018/9095275
- Goddard DS, Yamanaka K, Kupper TS, Jones DA. Activation of neutrophils in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Dec 1;11(23):8243-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1434. PMID: 16322281.
- Goldberg GL, Cornish AL, Murphy J, et al. G-CSF and Neutrophils Are Nonredundant Mediators of Murine Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *Am J Pathol.* 2016;186(1):172-184. doi:10.1016/j.ajpath.2015.09.008
- Graf B, Bushnell T, Miller J. LFA-1-mediated T cell costimulation through increased localization of TCR/class II complexes to the central supramolecular activation cluster and exclusion of CD45 from the immunological synapse. *J Immunol.* 2007;179(3):1616-1624. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1616
- Graham IL, Gresham HD, Brown EJ. An immobile subset of plasma membrane CD11b/CD18 (Mac-1) is involved in phagocytosis of targets recognized by multiple receptors. *J Immunol.* 1989; 142:2352-2358.
- Granot T, Senda T, Carpenter DJ, et al. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity.* 2017;46(3):504-515. doi:10.1016/j.immuni.2017.02.019
- Guerra ES, Lee CK, Specht CA, Yadav B, Huang H, Akalin A, et al. Central role of IL-23 and IL-17 producing eosinophils as immunomodulatory effector cells in acute pulmonary aspergillosis and allergic asthma. *PLoS Pathog.* (2017) 13:e1006175. doi: 10.1371/journal.ppat.1006175
- Guilliams M, Dutertre CA, Scott CL, et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity.* 2016;45(3):669-684. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.015

- Guimarães-Costa AB, 2012, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Wardini AB, Pinto-Da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A microbicidal mechanism beyond cell death. *Journal of Parasitology Research*. 2012;2012:929743.
- Gunzer M, Schäfer A, Borgmann S, et al. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity*. 2000;13(3):323-332. doi:10.1016/s1074-7613(00)00032-7
- Gupta, S., Chit, JY., Feng, C. et al. An Alternative Phosphorylation Switch in Integrin $\beta 2$ (CD18) Tail for Dok1 Binding. *Sci Rep* 5, 11630 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep11630>
- Häger M, Cowland JB, Borregaard N (University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark). Neutrophil granules in health and disease (Review). *J Intern Med* 2010; 268:25–34.
- Halle, S., Halle, O., & Forster, R. (2017). Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends Immunol*, 38(6), 432-443. doi:10.1016/j.it.2017.04.002
- Hamilton J. A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology*, 8(7), 533–544. <https://doi.org/10.1038/nri2356>
- Hamilton JA. GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways. *Front Immunol*. 2019;10:2055. Published 2019 Sep 4. doi:10.3389/fimmu.2019.02055
- Hamilton J. A. (2020). GM-CSF in inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 217(1), e20190945. <https://doi.org/10.1084/jem.20190945>
- Hamilton und Anderson, 2004; Kingston et al, 2009): z Jackson, J. T., Hu, Y., Liu, R., Masson, F., D'Amico, A., Carotta, S., Xin, A., Camilleri, M. J., Mount, A. M., Kallies, A., Wu, L., Smyth, G. K., Nutt, S. L., & Belz, G. T. (2011). Id2 expression delineates differential checkpoints in the genetic program of CD8 α^+ and CD103 $^+$ dendritic cell lineages. *The EMBO journal*, 30(13), 2690–2704. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.163>
- Hamilton, J. A., & Anderson, G. P. (2004). Mini Review GM-CSF Biology. *Growth factors*, 22(4), 225-231.

- Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol* (2010) 11:734–4210.1038/ni.1908
- Harris ES, Weyrich AS, Zimmerman GA. Lessons from rare maladies: leukocyte adhesion deficiency syndromes. *Curr Opin Hematol.* (2013) 20:16–25. doi: 10.1097/MOH.0b013e32835a0091
- Hartl D, Buckland KF, Hogaboam CM. Chemokines in allergic aspergillosis – from animal models to human lung diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* (2006) 5:219–28. doi: 10.2174/187152806779010972
- Harvath L. Neutrophil chemotactic factors. *EXS.* 1991;59:35-52. doi: 10.1007/978-3-0348-7494-6_3. PMID: 1655519.
- Hasegawa H and Matsumoto T (2018) Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo. *Front. Immunol.* 9:350. doi.org/10.3389/fimmu.2018.00350
- Hawkins HK, Heffelfinger SC, Anderson DC. Leukocyte adhesion deficiency: clinical and postmortem observations. *Pediatr Pathol.* (1992) 12:119–30. doi: 10.3109/15513819209023288
- Hayashi H, Nakahama K, Sato T, et al. The role of Mac-1 (CD11b/CD18) in osteoclast differentiation induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *FEBS Lett.* 2008;582(21-22):3243-3248. doi:10.1016/j.febslet.2008.08.023
- Hayes GE, Denning DW. Frequency, diagnosis and management of fungal respiratory infections. *Curr Opin Pulm Med.* 2013;19(3):259-265. doi:10.1097/MCP.0b013e32835f1ad1
- Heath, W., Carbone, F. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1, 126–134 (2001). <https://doi.org/10.1038/35100512>
- Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B. U., Goubau, D., & Reis e Sousa, C. (2015). GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*, 42(6), 1197–1211. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.018>

- Houghton AN, Guevara-Patiño JA. Immune recognition of self in immunity against cancer. *J Clin Invest.* 2004 Aug;114(4):468-71. doi: 10.1172/JCI22685.
- Hufford MM, Richardson G, Zhou H, et al. Influenza-infected neutrophils within the infected lungs act as antigen presenting cells for anti-viral CD8(+) T cells. *PLoS One.* 2012;7(10):e46581. doi:10.1371/journal.pone.0046581
- Humphries M. J. (2000). Integrin structure. *Biochemical Society transactions*, 28(4), 311–339.
- Humphries, M. J., Symonds, E. J., & Mould, A. P. (2003). Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Current opinion in structural biology*, 13(2), 236–243. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(03\)00035-6](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(03)00035-6)
- Huppa, J., Davis, M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3, 973–983 (2003). <https://doi.org/10.1038/nri1245>
- Hyun YM, Lefort CT, Kim M. Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Immunol Res.* 2009;45(2-3):195-208. doi:10.1007/s12026-009-8101-1
- IRF-8 extinguishes neutrophil production and promotes dendritic cell lineage commitment in both myeloid and lymphoid mouse progenitors PubMed CentralBecker, Amy M.; Michael, Drew G.; Satpathy, Ansuman T.; Sciammas, Roger; Singh, Harinder
- Jackson, J. T., Hu, Y., Liu, R., Masson, F., D'Amico, A., Carotta, S., Xin, A., Camilleri, M. J., Mount, A. M., Kallies, A., Wu, L., Smyth, G. K., Nutt, S. L., & Belz, G. T. (2011). Id2 expression delineates differential checkpoints in the genetic program of CD8 α^+ and CD103 $^+$ dendritic cell lineages. *The EMBO journal*, 30(13), 2690–2704. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.163>
- Jeon JH, Ahn KB, Kim SK, Im J, Yun CH, Han SH. Bacterial flagellin induces IL-6 expression in human basophils. *Mol Immunol.* 2015;65(1):168-176. doi:10.1016/j.molimm.2015.01.022
- Jesmond Dalli, Trinidad Montero-Melendez, Lucy V Norling, Xiaoke Yin, Charles Hinds, Dorian Haskard, Manuel Mayr, Mauro Perretti Heterogeneity in Neutrophil Microparticles Reveals Distinct Proteome and Functional Properties *Molecular & Cellular Proteomics* August 1, 2013, First published on May 8, 2013, 12 (8) 2205-2219; DOI: 10.1074/mcp.M113.028589

- Joanna Kopeć-Szłęczak The role of basophils in the light of recent research *J. Transf. Med.* 2016; 9: 45–53
- Justiz Vaillant AA, Ahmad F. Leukocyte Adhesion Deficiency. [Updated 2020 Jul 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539770/>
- Justiz Vaillant AA, Ahmad F. Leukocyte Adhesion Deficiency. [Updated 2020 Jul 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539770/>
- Kaisho T, Akira S. Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med.* 2003;3(4):373-385. doi:10.2174/1566524033479726
- Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* 2012;189(6):2689-2695. doi:10.4049/jimmunol.1201719
- Kaufman HL, Ruby CE, Hughes T, Slingluff CL Jr. Current status of granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer.* 2014;2:11. Published 2014 May 13. doi:10.1186/2051-1426-2-11
- Keller CW, Freigang S, Lünemann JD. Reciprocal Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer T Cells: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front Immunol.* 2017;8:570. Published 2017 May 24. doi:10.3389/fimmu.2017.00570
- Kettritz R, Choi M, Rolle S, Wellner M, Luft FC. Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor-kappaB in human neutrophils. *J Biol Chem.* (2004) 279:2657–65 doi: 10.1074/jbc.M3
- Kim C, Ye F, Ginsberg MH. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:321-345. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104104
- Kim CH, Lee KH, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, et al. Aggregation of beta2 integrins activates human neutrophils through the IkappaB/NF-kappaB pathway. *J Leukoc Biol.* (2004) 75:286–92. doi: 10.1189/jlb.0103038

- King, I. L., Kroenke, M. A., & Segal, B. M. (2010). GM-CSF–dependent, CD103⁺ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *Journal of Experimental Medicine*, 207(5), 953-961.
- Kobayashi SD, DeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009;1(3):309-333. doi:10.1002/wsbm.32
- Kolonics F, Szeifert V, Timár CI, Ligeti E, Lőrincz ÁM. The Functional Heterogeneity of Neutrophil-Derived Extracellular Vesicles Reflects the Status of the Parent Cell. *Cells*. 2020;9(12):2718. Published 2020 Dec 18. doi:10.3390/cells9122718)
- Kondělková K, Vokurková D, Krejsek J, Borská L, Fiala Z, Ctírad A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2010;53(2):73-77. doi:10.14712/18059694.2016.63
- Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. (2015) Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog* 11(3): e1004651. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>
- Kubach J, Becker C, Schmitt E, et al. Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance. *Int J Hematol*. 2005;81(3):197-203. doi:10.1532/IJH97.04165
- Kuijpers TW, Van Lier RA, Hamann D, et al. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest*. 1997;100(7):1725-1733. doi:10.1172/JCI119697
- Kuijpers T.W, van Bruggen R, Kamerbeek N, et al. Natural history and early diagnosis of LAD-1/variant syndrome. *Blood* . 2007;109(8):3529–3537
- Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?. *PLoS Pathog*. 2013;9(12):e1003743. doi:10.1371/journal.ppat.1003743
- Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2006;2(3):98-108. doi:10.1186/1710-1492-2-3-98

- Langer HF, Chavakis, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med.* (2009) 13:1211–20. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00811.x
- Latchman, Y., McKay, P. F., & Reiser, H. (1998). Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(11), 5809–5812
- Lawand M, Abramova A, Manceau V, Springer S, van Endert P. TAP-dependent and -independent peptide import into dendritic cell phagosomes. *J Immunol* (2016) 197:3454–63. doi:10.4049/jimmunol.1501925
- Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2018;82(1):e00057-17. Published 2018 Feb 7. doi:10.1128/MMBR.00057-17
- Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA, Liddington RC. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation?. *Structure.* 1995;3(12):1333-1340. doi:10.1016/s0969-2126(01)00271-4
- Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1299-1306. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.014
- Legate KR, Fässler R. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci.* 2009 Jan 15;122(Pt 2):187-98. doi: 10.1242/jcs.041624. PMID: 19118211.
- Leliefeld PHC, Pillay J, Vrisekoop N, et al. Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Adv.* 2018;2(11):1344-1355. doi:10.1182/bloodadvances.2017015578
- LFA-1 and Mac-1 Define Characteristically Different Intraluminal Crawling and Emigration Patterns for Monocytes and Neutrophils In Situ *The Journal of Immunology* December 1, 2010, 185 (11) 7057-7066; DOI: 10.4049/jimmunol.1001638
- Li Pan, Yuan Zhao, Zhijie Yuan and Guixin Qin* Research advances on structure and biological functions of integrins *SpringerPlus* (2016) 5:1094 DOI 10.1186/s40064-016-2502-0
- Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1223-1248. doi:10.1152/physrev.00012.2018

- Ling GS, Bennett J, Woollard KJ, et al. Integrin CD11b positively regulates TLR4-induced signalling pathways in dendritic cells but not in macrophages. *Nat Commun.* 2014;5:3039. doi:10.1038/ncomms4039
- Lilly LM, Scopel M, Nelson MP, Burg AR, Dunaway CW, Steele, C. Eosinophil deficiency compromises lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* (2014) 82:1315–25. doi: 10.1128/IAI.01172-13
- Lishko VK, Yakubenko VP, Ugarova TP, Podolnikova NP. Leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18, α M β 2, CR3) acts as a functional receptor for platelet factor 4. *J Biol Chem.* 2018;293(18):6869-6882. doi:10.1074/jbc.RA117.000515
- Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell.* 2001;106(3):259-262. doi:10.1016/s0092-8674(01)00456-1
- Lotfi, N., Thome, R., Rezaei, N., Zhang, G. X., Rezaei, A., Rostami, A., & Esmacil, N. (2019). Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. *Frontiers in immunology*, 10, 1265. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01265>
- Lu H., Smith C.W., Perrard J., Bullard D., Tang L., Entman M.L., Beaudet A.L., Ballantyne C.M. LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1 deficient mice. *J Clin Invest.* 1997;99:1340–1350
- Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:925135. doi:10.1155/2012/925135
- Luscinskas, F. W., Ma, S., Nusrat, A., Parkos, C. A. and Shaw, S. K., Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Semin. Immunol.* 2002. 14: 105– 113.
- Macpherson, M. et al. “Leukocyte Beta2-Integrins; Genes and Disease.” *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy* 4 (2013): 1-6. DOI:10.4172/2157-7412.1000154
- Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuijpers TW. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004;11(2):143-153. doi:10.1038/sj.cdd.4401320
- Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol.* 2010;108:111-165. doi:10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5

- Manali Mukherjee, Paige Lacy and Shigeharu Ueki. Eosinophil Extracellular Traps and Inflammatory Pathologies–Untangling the Web! *Front. Immunol.* (2018) 9:2763; doi:10.3389/fimmu.2018.02763
- Mann A, Niekisch K, SchirMacher P, Blessing M. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor is essential for normal wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2006;11(1):87-92. doi:10.1038/sj.jidsymp.5650013
- Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity.* 2019;50(4):778-795. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.012
- Manz, M. G., & Boettcher, S. (2014). Emergency granulopoiesis. *Nature reviews. Immunology,* 14(5), 302–314. <https://doi.org/10.1038/nri3660>
- Mao Y, Finnemann SC. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Small GTPases.* 2015;6(2):89-99. doi:10.4161/21541248.2014.989785
- Marey MA, Yousef MS, Kowsar R, Hambruch N, Shimizu T, Pfarrer C, Miyamoto A. Local immune system in oviduct physiology and pathophysiology: attack or tolerance? *Domest Anim Endocrinol.* 2016 Jul;56 Suppl:S204-11. doi: 10.1016/j.domaniend.2016.02.005. PMID: 27345318.
- Martinon-Ego C, Berthier R. Les cellules dendritiques: chefs d'orchestre de la réponse immunitaire [Dendritic cells: orchestration of the immune response]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2000;58(5):541-556.
- Matsushima H, Geng S, Lu R, et al. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood.* 2013;121(10):1677-1689. doi:10.1182/blood-2012-07-445189
- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164023
- Mayadas, T. N., & Cullere, X. (2005). Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends in immunology,* 26(7), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.05.002>
- Rosales C. (2018). Neutrophil: A Cell with

- Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?. *Frontiers in physiology*, 9, 113. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- McArdel, S. L., Terhorst, C. & Sharpe, A. H. (2016). Rolle von CD48 bei der Regulierung von Immunität und Toleranz. *Klinische Immunologie (Orlando, Florida)*, 164, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.01.008>
- McCormick A, Heesemann L, Wagener J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* 2010;12(12-13):928-936. doi:10.1016/j.micinf.2010.06.009
- Medraño-Fernandez I, Reyes R, Olazabal I, et al. RIAM (Rap1-interacting adaptor molecule) regulates complement-dependent phagocytosis. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(13):2395-2410. doi:10.1007/s00018-013-1268-6
- Mehta HM, Malandra M, Corey SJ. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. *J Immunol.* 2015;195(4):1341-1349. doi:10.4049/jimmunol.1500861
- Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res.* 2013 Sep;1(3):145-9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0102. PMID: 24777676.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563-604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950
- Merad, M., & Manz, M. G. (2009). Dendritic cell homeostasis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 113(15), 3418-3427.
- Metcalf D, Begley CG, Williamson DJ, Nice EC, De Lamarter J, Mermod JJ, Thatcher D, Schmidt A. Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF. *Exp Hematol.* 1987;15:1–9.
- Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood.* 2008;111(2):485-491. doi:10.1182/blood-2007-03-079681
- Metcalf D. Regulatory mechanisms controlling hematopoiesis: principles and problems. *Stem Cells.* 1998;16 Suppl 1:3-11. doi:10.1002/stem.5530160804

- Metelitsa LS, Gillies SD, Super M, Shimada H, Reynolds CP, Seeger RC. Antidisialoganglioside/granulocyte Macrophage-colony-stimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on FcγRII (CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis. *Blood*. 2002;99(11):4166-4173. doi:10.1182/blood.v99.11.4166
- Mezu-Ndubuisi OJ, Maheshwari A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatr Res*. 2020 Oct 7. doi: 10.1038/s41390-020-01177-9. Epub ahead of print. PMID: 33027803.
- Minns D, Smith KJ, Hardisty G, Rossi AG, Gwyer Findlay E. The Outcome of Neutrophil-T Cell Contact Differs Depending on Activation Status of Both Cell Types. *Front Immunol*. 2021;12:633486. Published 2021 Mar 30. doi:10.3389/fimmu.2021.633486
- Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther*. 2015;147:123-135. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.008
- Mizgerd JP, Horwitz BH, Quillen HC, Scott ML, Doerschuk CM. Effects of CD18 deficiency on the emigration of murine neutrophils during pneumonia. *J Immunol*. (1999) 163:995–9
- Mobberley-Schuman PS, Weiss AA. Influence of CR3 (CD11b/CD18) expression on phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun*. 2005;73(11):7317-7323. doi:10.1128/IAI.73.11.7317-7323.2005
- Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(2):240-273. doi:10.1128/CMR.00046-08
- Morgan J, Saleem M, Ng R, Armstrong C, Wong SS, Caulton SG, Fickling A, Williams HEL, Munday AD, López JA, Searle MS, Emsley J. Structural basis of the leukocyte integrin Mac-1 I-domain interactions with the platelet glycoprotein Ib. *Blood Adv*. 2019 May 14;3(9):1450-1459. doi: 10.1182/bloodadvances.2018027011. PMID: 31053572; PMCID: PMC6517656.

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-2357
- Mukherjee M, Lacy P, Ueki S. Eosinophil Extracellular Traps and Inflammatory Pathologies-Untangling the Web!. *Front Immunol.* 2018;9:2763. Published 2018 Nov 26. doi:10.3389/fimmu.2018.02763
- Muller WA. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol.* 2013;50(1):7-22. doi:10.1177/0300985812469883
- Murakami, K., Sasaki, H., Nishiyama, A., Kurotaki, D., Kawase, W., Ban, T., Nakabayashi, J., Kanzaki, S., Sekita, Y., Nakajima, H., Ozato, K., Kimura, T., & Tamura, T. (2021). A RUNX-CBF β -driven enhancer directs the Irf8 dose-dependent lineage choice between DCs and monocytes. *Nature immunology*, 22(3), 301–311. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00871-y>
- Murphy K, Weaver C. Die Entwicklung der B- und T-Lymphocyten. *Janeway Immunologie.* 2018;377-440. Published 2018 Apr 23. doi:10.1007/978-3-662-56004-4_8
- Na YR, Jung D, Gu GJ, Seok SH. GM-CSF Grown Bone Marrow Derived Cells Are Composed of Phenotypically Different Dendritic Cells and Macrophages. *Mol Cells.* 2016;39(10):734-741. doi:10.14348/molcells.2016.0160
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006 Mar;6(3):173-82. doi: 10.1038/nri1785. PMID: 16498448.
- Nathan K, Yee, Jessica A. Hamerman β 2 integrins inhibit TLR responses by regulating NF- κ B pathway and p38 MAPK activation *Eur J Immunol.* 2013 Mar; 43(3): 10.1002/eji.201242550 PMID: PMC3809911
- N'Diaye EN, Darzacq X, Astarie-Dequeker C, Daffé M, Calafat J, Maridonneau-Parini I. Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *J Immunol.* 1998;161(9):4983-4991.

- Neelamegham S, Taylor AD, Burns AR, Smith CW, Simon SI, et al. Hydrodynamic shear shows distinct roles for LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood* (1998) 92:1626–38.
- Ng D, Gommerman JL. The Regulation of Immune Responses by DC Derived Type I IFN. *Front Immunol.* 2013;4:94. Published 2013 Apr 22. doi:10.3389/fimmu.2013.00094
- Niu, H., Cattoretti, G., & Dalla-Favera, R. (2003). BCL6 controls the expression of the B7-1/CD80 costimulatory receptor in germinal center B cells. *The Journal of experimental medicine*, 198(2), 211–221. <https://doi.org/10.1084/jem.20021395>
- Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2011 Aug;90(2):271-84. doi: 10.1189/jlb.0810457. Epub 2011 Apr 19. PMID: 21504950.
- O'Brien XM, Reichner JS. Neutrophil Integrins and Matrix Ligands and NET Release. *Front Immunol.* 2016;7:363. Published 2016 Sep 19. doi:10.3389/fimmu.2016.00363
- Ohms M, Möller S, Laskay T. An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro. *Front Immunol.* 2020;11:532. doi:10.3389/fimmu.2020.00532
- Ohtsuka, H., Sakamoto, A., Pan, J., Inage, S., Horigome, S., Ichii, H., Arima, M., Hatano, M., Okada, S., & Tokuhiya, T. (2011). Bcl6 is required for the development of mouse CD4⁺ and CD8α⁺ dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(1), 255–263. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903714>
- Onai, N., & Manz, M. G. (2008). The STATs on dendritic cell development. *Immunity*, 28(4), 490–492. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.006>
- Ostrowski PP, Grinstein S, Freeman SA. Diffusion Barriers, Mechanical Forces, and the Biophysics of Phagocytosis. *Dev Cell.* 2016;38(2):135-146. doi:10.1016/j.devcel.2016.06.023
- Panopoulos AD, Bartos D, Zhang L, Watowich SS. Control of myeloid-specific integrin alpha Mbeta 2 (CD11b/CD18) expression by cytokines is regulated by Stat3-dependent activation of PU.1. *J Biol Chem.* 2002;277(21):19001-19007. doi:10.1074/jbc.M112271200

- Park SJ, Burdick MD, Mehrad, B. Neutrophils mediate maturation and efflux of lung dendritic cells in response to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *Infect Immun.* (2012) 80:1759–65. doi: 10.1128/IAI.00097-12
- Peake J, Suzuki K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. *Exerc Immunol Rev.* 2004;10:129-141.
- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 2006;203:2569–75. 38 Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol* 2004;5:393–400.
- Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;82(3):296-309. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.06.004
- Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, et al. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010;116(4):625-627. doi:10.1182/blood-2010-01-259028
- Perera, P. Y., Mayadas, T. N., Takeuchi, O., Akira, S., Zaks-Zilberman, M., Goyert, S. M., & Vogel, S. N. (2001). CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 166(1), 574–581. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.574>
- Pluskota E., Soloviev D. A., Szpak D., Weber C., Plow E. F. (2008). Neutrophil apoptosis: selective regulation by different ligands of integrin $\alpha\text{M}\beta 2$. *J. Immunol.* 181, 3609–3619
- Podgrabinska S, Kamalu O, Mayer L, Shimaoka M, Snoeck H, Randolph GJ, Skobe M. Inflamed lymphatic endothelium suppresses dendritic cell maturation and function via Mac-1/ICAM-1-dependent mechanism. *J Immunol.* 2009 Aug 1;183(3):1767-79. doi: 10.4049/jimmunol.0802167. Epub 2009 Jul 8. PMID: 19587009; PMCID: PMC4410990.

- Podolnikova NP, Kushchayeva YS, Wu Y, Faust J, Ugarova TP. The Role of Integrins α M β 2 (Mac-1, CD11b/CD18) and α D β 2 (CD11d/CD18) in Macrophage Fusion. *Am J Pathol.* 2016;186(8):2105-2116. doi:10.1016/j.ajpath.2016.04.001
- Podolnikova NP, Podolnikov AV, Haas TA, Lishko VK, Ugarova TP. Ligand recognition specificity of leukocyte integrin α M β 2 (Mac-1, CD11b/CD18) and its functional consequences. *Biochemistry.* 2015 Feb 17;54(6):1408-20. doi: 10.1021/bi5013782. Epub 2015 Feb 5. PMID: 25613106; PMCID: PMC4532391.
- Post MJ, Lass-Floerl C, Gastl G, Nachbaur D. Invasive fungal infections in allogeneic and autologous stem cell transplant recipients: a single-center study of 166 transplanted patients. *Transpl Infect Dis.* (2007) 9:189–95. 10.1111/j.1399-3062.2007.00219.x
- Propst SM, Denson R, Rothstein E, Estell K, Schwiebert LM. Proinflammatory and Th2-derived cytokines modulate CD40-mediated expression of inflammatory mediators in airway epithelia: implications for the role of epithelial CD40 in airway inflammation. *J Immunol.* (2000) 165:2214–21. doi: 10.4049/jimmunol.165.4.2214
- Prufer S, Weber M, Stein P, Bosmann M, Stassen M, Kreft A, et al. Oxidative burst and neutrophil elastase contribute to clearance of *Aspergillus fumigatus* pneumonia in mice. *Immunobiology* (2014) 219:87–96. doi: 10.1016/j.imbio.2013.08.010
- Prufer S, Weber M, Stein P, Bosmann M, Stassen M, Kreft A, et al. Oxidative burst and neutrophil elastase contribute to clearance of *Aspergillus fumigatus* pneumonia in mice. *Immunobiology* (2014) 219:87–96. doi: 10.1016/j.imbio.2013.08.010
- Pype JL, Dupont LJ, Menten P, Van Coillie E, Opdenakker G, Van Damme J, et al. Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (1999) 21:528–36. doi: 10.1165/ajrcmb.21.4.3660
- Rabb H. The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney. *Kidney Int.* 2002 Jun;61(6):1935-46. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00378.x. PMID: 12028434.

- Rachel Evans, Irene Patzak, Lena Svensson, Katia De Filippo, Kristian Jones, Alison McDowall, Nancy Hogg Integrins in immunity *Journal of Cell Science* 2009 122: 215-225; doi: 10.1242/jcs.019117
- Radice E, Bellone G, Miranda V. Enhancement of the Immunostimulatory Functions of Ex Vivo-Generated Dendritic Cells from Early-Stage Colon Cancer Patients by Consecutive Exposure to Low Doses of Sequential-Kinetic-Activated IL-4 and IL-12. A Preliminary Study. *Transl Oncol.* 2015;8(4):327-338. doi:10.1016/j.tranon.2015.06.005
- Radsak, M., Iking-Konert, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., & Hänsch, G. M. (2000). Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*, 101(4), 521-530.
- Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9095275. Published 2018 Jan 28. doi:10.1155/2018/9095275
- Ravin KA, Loy M. The Eosinophil in Infection. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;50(2):214-227. doi:10.1007/s12016-015-8525-4
- Reichel CA, Pühr-Westerheide D, Zuchtriegel G, Uhl B, Berberich N, Zahler S, et al. C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms. *Blood* (2012) 120:880–90. doi: 10.1182/blood-2012-01-402164
- Reichel CA, Pühr-Westerheide D, Zuchtriegel G, Uhl B, Berberich N, Zahler S, et al. C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms. *Blood* (2012) 120:880–90. doi: 10.1182/blood-2012-01-402164
- Rijneveld AW, de Vos AF, Florquin S, Verbeek JS, van der Poll T. CD11b limits bacterial outgrowth and dissemination during murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* (2005) 191:1755–60. doi: 10.1086/429633

- Robb, L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26, 6715–6723 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210756>
- Rodland EK, Ueland T, Pedersen TM, Halvorsen B, Muller F, Aukrust P, et al. Activation of platelets by *Aspergillus fumigatus* and potential role of platelets in the immunopathogenesis of Aspergillosis. *Infect Immun.* (2010) 78:1269–75. doi: 10.1128/IAI.01091-09
- Rognoni E, Ruppert R, Fässler R. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *J Cell Sci.* 2016 Jan 1;129(1):17-27. doi: 10.1242/jcs.161190. PMID: 26729028.
- Ronen Sumagin, Hen Prizant, Elena Lomakina, Richard E. Waugh, Ingrid H. Sarelius
- Rosa, A., Ballarino, M., Sorrentino, A., Sthandier, O., De Angelis, F. G., Marchioni, M., Masella, B., Guarini, A., Fatica, A., Peschle, C., & Bozzoni, I. (2007). The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), 19849–19854. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706963104>
- Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?. *Front Physiol.* 2018;9:113. doi:10.3389/fphys.2018.00113
- Rose CE Jr, Lannigan JA, Kim P, Lee JJ, Fu SM, Sung SS. Murine lung eosinophil activation and chemokine production in allergic airway inflammation. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(5):361-374. doi:10.1038/cmi.2010.31
- Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(2):105-117. doi:10.1038/nri2024
- Rubel C, Gómez S, Fernández GC, Isturiz MA, Caamaño J, Palermo MS. Fibrinogen-CD11b/CD18 interaction activates the NF-kappa B pathway and delays apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol.* 2003;33(5):1429-1438. doi:10.1002/eji.200323512
- Sanchali Kasbekar, Juan Bueren, Adrian J Thrasher, Donald B Kohn, Julian Sevilla, Jonathan D Schwartz, Elena Almarza; Leukocyte Adhesion Deficiency-I (LAD-I): A

- Comprehensive Review of Published Cases. *Blood* 2017; 130 (Supplement 1): 4821. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.4821.4821
- Schittenhelm L, Hilkens CM, Morrison VL. beta2 integrins as regulators of dendritic cell, monocyte, and Macrophage function. *Front Immunol.* (2017) 8:1866. doi: 10.3389/fimmu.2017.01866
- Schuh JM, Blease K, Hogaboam CM. The role of CC chemokine receptor 5 (CCR5) and RANTES/CCL5 during chronic fungal asthma in mice. *FASEB J.* (2002) 16:228–30. doi: 10.1096/fj.01-0528fje
- Schwartz MA. Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(12):a005066. doi:10.1101/cshperspect.a005066
- Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, et al. Role of beta 2 integrins and ICAM-1 in lung injury following ischemia-reperfusion of rat hind limbs. *The American Journal of Pathology.* 1993 Aug;143(2):464-472.
- Segal AW, Dorling J, Coade S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and morphological studies. J Cell Biol.* 1980;85(1):42-59. doi:10.1083/jcb.85.1.42
- Seillet, C., Jackson, J. T., Markey, K. A., Brady, H. J., Hill, G. R., Macdonald, K. P., Nutt, S. L., & Belz, G. T. (2013). CD8 α^+ DCs can be induced in the absence of transcription factors Id2, Nfil3, and Batf3. *Blood*, 121(9), 1574–1583. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-445650>
- Sekheri M, Othman A, Filep JG. β 2 Integrin Regulation of Neutrophil Functional Plasticity and Fate in the Resolution of Inflammation. *Front Immunol.* 2021;12:660760. Published 2021 Mar 30. doi:10.3389/fimmu.2021.660760
- Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen Biomater.* 2017;4(1):55-68. doi:10.1093/rb/rbw041
- Semrich M, Smith A, Feterowski C, et al. Importance of integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. *J Exp Med.* 2005;201(12):1987-1998. doi:10.1084/jem.20041850

- Serrano-Gomez D, Dominguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbi AL. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol.* (2004) 173:5635–43. doi: 10.4049/jimmunol.173.9.5635
- Shao S, Fang H, Li Q, Wang G. Extracellular vesicles in Inflammatory Skin Disorders: from Pathophysiology to Treatment. *Theranostics.* 2020;10(22):9937-9955. Published 2020 Aug 7. doi:10.7150/thno.45488
- Shaw JM, Al-Shamkhani A, Boxer LA, et al. Characterization of four CD18 mutants in leucocyte adhesion deficient (LAD) patients with differential capacities to support expression and function of the CD11/CD18 integrins LFA-1, Mac-1 and p150,95. *Clin Exp Immunol.* 2001;126(2):311-318. doi:10.1046/j.1365-2249.2001.01661.x
- Sheen JH, Strainic MG, Liu J, et al. TLR-Induced Murine Dendritic Cell (DC) Activation Requires DC-Intrinsic Complement. *J Immunol.* 2017;199(1):278-291. doi:10.4049/jimmunol.1700339
- Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol.* 2014;5:448.. doi:10.3389/fimmu.2014.00448
- Shi, Y., Liu, C. H., Roberts, A. I., Das, J., Xu, G., Ren, G., Zhang, Y., Zhang, L., Yuan, Z. R., Tan, H. S., Das, G., & Devadas, S. (2006). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell research*, 16(2), 126–133.
- Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2002;31:485-516. doi: 10.1146/annurev.biophys.31.101101.140922. Epub 2001 Oct 25. PMID: 11988479.
- Shimizu K, Libby P, Shubiki R, et al. Leukocyte integrin Mac-1 promotes acute cardiac allograft rejection. *Circulation.* 2008 Apr;117(15):1997-2008. DOI: 10.1161/circulationaha.107.724310. PMID: 18378617; PMCID: PMC2495049.

- Shishido SN, Varahan S, Yuan K, Li X, Fleming SD. Humoral innate immune response and disease. *Clin Immunol*. 2012 Aug;144(2):142-58. doi: 10.1016/j.clim.2012.06.002. Epub 2012 Jun 18. PMID: 22771788; PMCID: PMC3576926.
- Shopova IA, Belyaev I, Dasari P, et al. Human Neutrophils Produce Antifungal Extracellular Vesicles against *Aspergillus fumigatus*. *mBio*. 2020;11(2):e00596-20. Published 2020 Apr 14. doi:10.1128/mBio.00596-20
- Shutong Xu, Jianchuan Wang, Jia-Huai Wang, Timothy A. Springer How integrins recognize complement iC3b *Proceedings of the National Academy of Sciences* Mar 2017, 114 (13) 3403-3408; DOI: 10.1073/pnas.1620881114
- Sichien, D., Lambrecht, B., Guilliams, M. et al. Development of conventional dendritic cells: from common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal Immunol* 10, 831–844 (2017). <https://doi.org/10.1038/mi.2017.8>
- Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2015;8(3):125-158. doi:10.1007/s12307-014-0147-5
- Siracusa et al., (2011). Mark C. Siracusa,^{1,2} Michael R. Comeau,³ and David Artis^{1,2,4} New insights into basophil biology: initiators, regulators and effectors of type 2 inflammation *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jan; 1217: 166–177. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05918.x
- Sisirak V, Vey N, Vanbervliet B, et al. CCR6/CCR10-mediated plasmacytoid dendritic cell recruitment to inflamed epithelia after instruction in lymphoid tissues. *Blood*. 2011;118(19):5130-5140. doi:10.1182/blood-2010-07-295626
- Skoberne, M., Somersan, S., Almodovar, W., Truong, T., Petrova, K., Henson, P. M., & Bhardwaj, N. (2006). The apoptotic-cell receptor CR3, but not alpha5beta1, is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function. *Blood*, 108(3), 947–955. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4812>
- Smith C. Wayne, 3. Adhesion molecules and receptors, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 121 (20): 375-379. doi.org/10.1016/j.jaci.2007.07.030.

- Smith, 2019 : Minns, D, Smith, KJ & Findlay, EG 2019, 'Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents' Mediators of Inflammation, vol. 2019, pp. 1-15. DOI: 10.1155/2019/8968943
- Soehnlein O, Kai-Larsen Y, Frithiof R, et al. Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine Macrophages. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3491-3502. doi:10.1172/JCI35740
- Sohn, J. H., Bora, P. S., Suk, H. J., Molina, H., Kaplan, H. J., & Bora, N. S. (2003). Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nature medicine*, 9(2), 206–212. <https://doi.org/10.1038/nm814>
- Sokol CL, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol.* 2009;10(7):713-720. doi:10.1038/ni.1738
- Spörri R, Joller N, Hilbi H, Oxenius A. A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol.* 2008;181(10):7121-7130. doi:10.4049/jimmunol.181.10.7121
- Starnes, L. M., Sorrentino, A., Pelosi, E., Ballarino, M., Morsilli, O., Biffoni, M., Santoro, S., Felli, N., Castelli, G., De Marchis, M. L., Mastroberardino, G., Gabbianelli, M., Fatica, A., Bozzoni, I., Nervi, C., & Peschle, C. (2009). NFI-A directs the fate of hematopoietic progenitors to the erythroid or granulocytic lineage and controls beta-globin and G-CSF receptor expression. *Blood*, 114(9), 1753–1763. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-196196>
- Stegelmeier AA, van Vloten JP, Mould RC, et al. Myeloid Cells during Viral Infections and Inflammation. *Viruses.* 2019;11(2):168. Published 2019 Feb 19. doi:10.3390/v11020168
- Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997;159(10):4772-4780.
- Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med.* 2001;68(3):160-166.

- Steinman, R. M., Kaplan, G., Witmer, M. D., & Cohn, Z. A. (1979). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*, 149(1), 1-16.
- Stephan A, Fabri M. The NET, the trap and the pathogen: neutrophil extracellular traps in cutaneous immunity. *Exp Dermatol*. 2015;24(3):161-166. doi:10.1111/exd.12599
- Stockfelt M, Christenson K, Andersson A, et al. Increased CD11b and Decreased CD62L in Blood and Airway Neutrophils from Long-Term Smokers with and without COPD [published correction appears in *J Innate Immun*. 2021;13(2):127]. *J Innate Immun*. 2020;12(6):480-489. doi:10.1159/000509715
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S73-S80. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.017
- Streuli CH. Integrins as architects of cell behavior. *Mol Biol Cell*. 2016;27(19):2885-2888. doi:10.1091/mbc.E15-06-0369
- Sullivan DP, Muller WA. Neutrophil and monocyte recruitment by PECAM, CD99, and other molecules via the LBRC. *Semin Immunopathol*. 2014;36(2):193-209. doi:10.1007/s00281-013-0412-6
- Sun Z, Costell M, Fässler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol*. 2019 Jan;21(1):25-31. doi: 10.1038/s41556-018-0234-9. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30602766.
- Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol*. 2007;8(5):215. doi:10.1186/gb-2007-8-5-215
- Takano T, Azuma N, Satoh M, et al. Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by Macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Arch Virol*. 2009;154(5):775-781. doi:10.1007/s00705-009-0371-3
- Takashima A, Yao Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J Leukoc Biol*. 2015;98(4):489-496. doi:10.1189/jlb.1MR1014-502R

- Tan SM. The leucocyte $\beta 2$ (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Biosci Rep.* 2012 Jun;32(3):241-69. doi: 10.1042/BSR20110101. PMID: 22458844.
- Taylor PR, Roy S, Leal SM Jr, Sun Y, Howell SJ, Cobb BA, et al. Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR γ and dectin-2. *Nat Immunol.* (2014) 15:143–51. doi: 10.1038/ni.2797
- Teng TS, Ji AL, Ji XY, Li YZ. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *J Immunol Res.* 2017;2017:9671604. doi:10.1155/2017/9671604
- Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, Valencia EL, Nakajima T, Hirai K, et al. Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respr Cell Mol Biol.* (1999) 20:777–86. doi: 10.1165/ajrcmb.20.4.3508
- Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, Valencia EL, Nakajima T, Hirai K, et al. Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respr Cell Mol Biol.* (1999) 20:777–86. doi: 10.1165/ajrcmb.20.4.3508
- Teschner, D., Cholaszczyńska, A., Ries, F., Beckert, H., Theobald, M., Grabbe, S., Radsak, M., & Bros, M. (2019). CD11b Regulates Fungal Outgrowth but Not Neutrophil Recruitment in a Mouse Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Frontiers in immunology*, 10, 123. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00123>
- The Journal of Immunology January 1, 2001, 166 (1) 574-581; DOI: 10.4049/jimmunol.166.1.574:
- Thomas CJ, Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* 2013;34(7):317-328. doi:10.1016/j.it.2013.02.008
- Tiberio L, Del Prete A, Schioppa T, Sozio F, Bosisio D, Sozzani S. Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(4):346-352. doi:10.1038/s41423-018-0005-3

- Toney, L. M., Cattoretti, G., Graf, J. A., Merghoub, T., Pandolfi, P. P., Dalla-Favera, R., Ye, B. H., & Dent, A. L. (2000). BCL-6 regulates chemokine gene transcription in macrophages. *Nature immunology*, 1(3), 214–220. <https://doi.org/10.1038/79749>
- Tough DF. Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(2):257-264. doi:10.1080/1042819031000149368
- Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24-32. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.016. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19932920; PMCID: PMC2832725.
- Tvinnereim AR, Hamilton SE, Harty JT. Neutrophil involvement in cross-priming CD8⁺ T cell responses to bacterial antigens. *J Immunol*. 2004;173(3):1994-2002. doi:10.4049/jimmunol.173.3.1994
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000639. doi:10.1371/journal.ppat.1000639
- Urban CF, Nett JE. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;89:47-57. doi:10.1016/j.semcdb.2018.03.020
- Uzman A (2003) Molecular biology of the cell (4th ed.). In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (eds) *Biochemistry and molecular biology education*, vol 31, pp 212–214. doi.org/10.1002/bmb.2003.494031049999
- van der Vijver E, Maddalena A, Sanal Ö, et al. Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency (first update). *Blood Cells Mol Dis*. 2012;48(1):53-61. doi:10.1016/j.bcmed.2011.10.004
- Van der Flier, A., Sonnenberg, A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305, 285–298 (2001). <https://doi.org/10.1007/s004410100417>
- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19980101)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r)

- van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med.* 2005;201(8):1281-1292. doi:10.1084/jem.20041276
- van Kessel KP, Bestebroer J, van Strijp JA. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol.* 2014;5:467. Published 2014 Sep 26. doi:10.3389/fimmu.2014.00467
- van Spriël AB, Leusen JH, van Egmond M, Dijkman HB, Assmann KJ, Mayadas TN, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood* (2001) 97:2478–86. doi: 10.1182/blood.v97.8.2478
- Varga G, Balkow S, Wild MK, Stadtbaeumer A, Krummen M, Rothoef T, Higuchi T, Beissert S, Wethmar K, Scharffetter-Kochanek K, Vestweber D, Grabbe S. Active Mac-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation. *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):661-9. doi: 10.1182/blood-2005-12-023044. Epub 2006 Sep 26. PMID: 17003381.
- Varga G, Nippe N, Balkow S, et al. LFA-1 contributes to signal I of T-cell activation and to the production of T(h)1 cytokines. *J Invest Dermatol.* 2010;130(4):1005-1012. doi:10.1038/jid.2009.398
- Vestweber D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev* 2007;218:178–96.
- Vidya, M. K., Kumar, V. G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., & Bhatta, R. (2018). Tolllike receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int*
- Vier, J., Groth, M., Sochalska, M., & Kirschnek, S. (2016). The anti-apoptotic Bcl-2 family protein A1/Bfl-1 regulates neutrophil survival and homeostasis and is controlled via PI3K and JAK/STAT signaling. *Cell death & disease*, 7(2), e2103. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.23>
- Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan IC. Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol.* 2016;34:335-368. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055605

- Vorup-Jensen T, Jensen RK. Structural Immunology of Complement Receptors 3 and 4. *Front Immunol.* 2018;9:2716. Published 2018 Nov 26. doi:10.3389/fimmu.2018.02716
- Wacker, B. K., Alford, S. K., Scott, E. A., Thakur, M. D., Longmore, G. D., & Elbert, D. L. (2008). Endothelial cell migration on RGD-peptide-containing PEG hydrogels in the presence of sphingosine 1-phosphate. *Biophysical Journal*, 94(1), 273-285. [ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2134859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2134859)
- Wallace PK, Howell AL, Fanger MW. Role of Fcγ receptors in cancer and infectious disease. *J Leukoc Biol.* 1994;55:816-826.
- Walzog B, Jeblonski F, Zakrzewicz A, Gaehtgens P. Beta2 integrins (CD11/CD18) promote apoptosis of human neutrophils. *FASEB J.* 1997;11(13):1177-1186. doi:10.1096/fasebj.11.13.9367353
- Wang X, Qiu L, Li Z, Wang XY, Yi H. Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2018;9:2456. Published 2018 Nov 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02456
- Ward A. C. (2007). The role of the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) in disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12, 608–618. <https://doi.org/10.2741/2086>
- Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok AA, Touw IP, Friedman AD. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia* (2000) 14:973–90. doi: 10.1038/sj.leu.2401808
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H.L. et al. An introduction to immunology and immunopathology. *All Asth Clin Immun* 7, S1 (2011). <https://doi.org/10.1186/1710-1492-7-S1-S1>
- Watson R. W. G., Rotstein O. D., Nathens A. B., Parodo J., Marshall J. C. (1997). Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *J. Immunol.* 158, 945–953
- Weisbart RH, Kwan L, Golde DW, Gasson JC. Human GM-CSF primes neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to the major physiological chemoattractants. *Blood.* 1987;69(1):18-21.

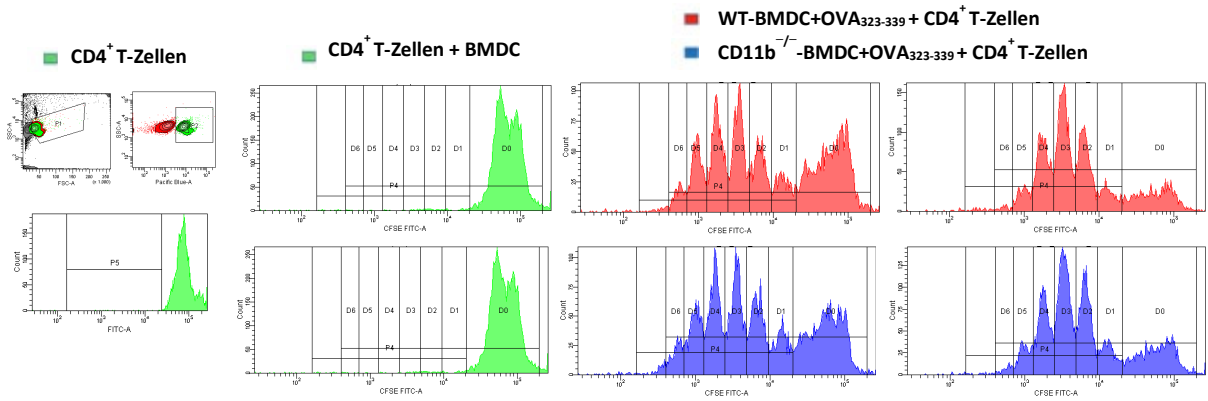
- Wells, James A., and Abraham M. de Vos. "Hematopoietic receptor complexes." *Annual review of biochemistry* 65.1 (1996): 609-634.
- Werner JL, Gessner MA, Lilly LM, Nelson MP, Metz AE, Horn D, et al. Neutrophils produce interleukin 17A (IL-17A) in a dectin-1- and IL-23- dependent manner during invasive fungal infection. *Infect Immun.* (2011) 79:3966–77. doi: 10.1128/IAI.05493-11
Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org 9 February 2019 | Volume 10 | Article 123
- Whitlock B. B., Gardai S., Fadok V., Bratton D., Henson P. M. (2000). Differential roles for $\alpha(M)\beta(2)$ integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of Akt and ERK survival mechanisms. *J. Cell Biol.* 151, 1305–1320. doi:10.1083/jcb.151.6.1305
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B. et al. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest* 80, 617–653 (2000).
<https://doi.org/10.1038/labinvest.3780067>
- Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:2522-2545. Published 2009 Jan 1. doi:10.2741/3395
- Wolf, D., Anto-Michel, N., Blankenbach, H. et al. A ligand-specific blockade of the integrin Mac-1 selectively targets pathologic inflammation while maintaining protective host-defense. *Nat Commun* 9, 525 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02896-8>
- Wright, S. D., & Jong, M. T. (1986). Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine*, 164(6), 1876–1888. <https://doi.org/10.1084/jem.164.6.1876>
- Wright, S. D., Detmers, P. A., Aida, Y., Adamowski, R., Anderson, D. C., Chad, Z., Kabbash, L. G., & Pabst, M. J. (1990). CD18-deficient cells respond to lipopolysaccharide in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 144(7), 2566–2571
- Xia, Y., G. Borland, J. Huang, I. F. Mizukami, H. R. Petty, R. F. Todd III, and G. D. Ross. 2002. Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *J. Immunol.* 169:6417-6426.

- Xia Y, Borland G, Huang J, et al. Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *J Immunol.* 2002;169(11):6417-6426. doi:10.4049/jimmunol.169.11.6417
- Xiao T, Takagi J, Collier BS, Wang JH, Springer TA Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature.* 2004 Nov 4; 432(7013):59-67.
- Xie C, Zhu J, Chen X, Mi L, Nishida N, Springer TA Structure of an integrin with an alpha domain, complement receptor type 4. *EMBO J.* 2010 Feb 3; 29(3):666-79.
- Xingyuan M, Wenyun Z, Tianwen W. Leukocyte function-associated antigen-1: structure, function and application prospects. *Protein Pept Lett.* 2006;13(4):397-400. doi:10.2174/092986606775974429
- Xiong J-P, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1642–54
- Xu X, Håkansson L. Degranulation of primary and secondary granules in adherent human neutrophils. *Scand J Immunol.* 2002;55(2):178-188. doi:10.1046/j.1365-3083.2002.01041.x
- Y.A. Kadry, D.A. Calderwood Chapter 22: structural and signaling functions of integrins
- Yakubenko VP, Belevych N, Mishchuk D, et al. : The role of integrin α D β 2 (CD11d/CD18) in monocyte/macrophage migration. *Exp Cell Res.* 2008;314(14):2569–78. doi:10.1016/j.yexcr.2008.05.016
- Yakubenko VP, Lishko VK, Lam SC, Ugarova TP. A molecular basis for integrin alphaMbeta 2 ligand binding promiscuity. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48635-48642. doi:10.1074/jbc.M208877200
- Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2000;68(1):9-14.
- Yang F, Feng C, Zhang X, Lu J, Zhao Y. The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections. *Inflammation.* 2017;40(1):311-323. doi:10.1007/s10753-016-0458-4

- Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs)–Formation and implications. *Acta Biochimica Polonica*. 2013;60:277–284
- Zawrotniak M, Kozik A, Rapala-Kozik M. Chapter 1. Neutrophil extracellular traps in infectious human diseases. In: Khajh M, editor. *Role of neutrophils in disease pathogenesis*, vol. 2017. London: InTech. p. 1–25. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68443>.
- Zhang CC, Lodish HF. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(4):307-311. doi:10.1097/MOH.0b013e3283007db5
- Zhang H, Rodriguez S, Wang L, et al. Sepsis Induces Hematopoietic Stem Cell Exhaustion and Myelosuppression through Distinct Contributions of TRIF and MYD88. *Stem Cell Reports*. 2016;6(6):940-956. doi:10.1016/j.stemcr.2016.05.002
- Zhang K, Chen J. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr*. 2012;6(1):20-29. doi:10.4161/cam.18702
- Zhang, L. The α M β 2 integrin and its role in neutrophil function. *Cell Res* 9, 171–178 (1999). <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290015>
- Zhang, T. T., Liu, D., Calabro, S., Eisenbarth, S. C., Cattoretti, G., & Haberman, A. M. (2014). Dynamic expression of BCL6 in murine conventional dendritic cells during in vivo development and activation. *PloS one*, 9(6), e101208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101208>
- Zhang, Y., Hu, N. & Dong, F. Gfi1-Mediated Repression of c-Fos, Egr-1 and Egr-2, and Inhibition of ERK1/2 Signaling Contribute to the Role of Gfi1 in Granulopoiesis. *Sci Rep* 9, 737 (2019). doi.org/10.1038/s41598-018-37402-z
- Zhao JL, Baltimore D. Regulation of stress-induced hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(4):286-292. doi:10.1097/MOH.000000000000149
- Zhou MJ, Brown EJ. CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol*. 1994;125(6):1407-1416. doi:10.1083/jcb.125.6.1407

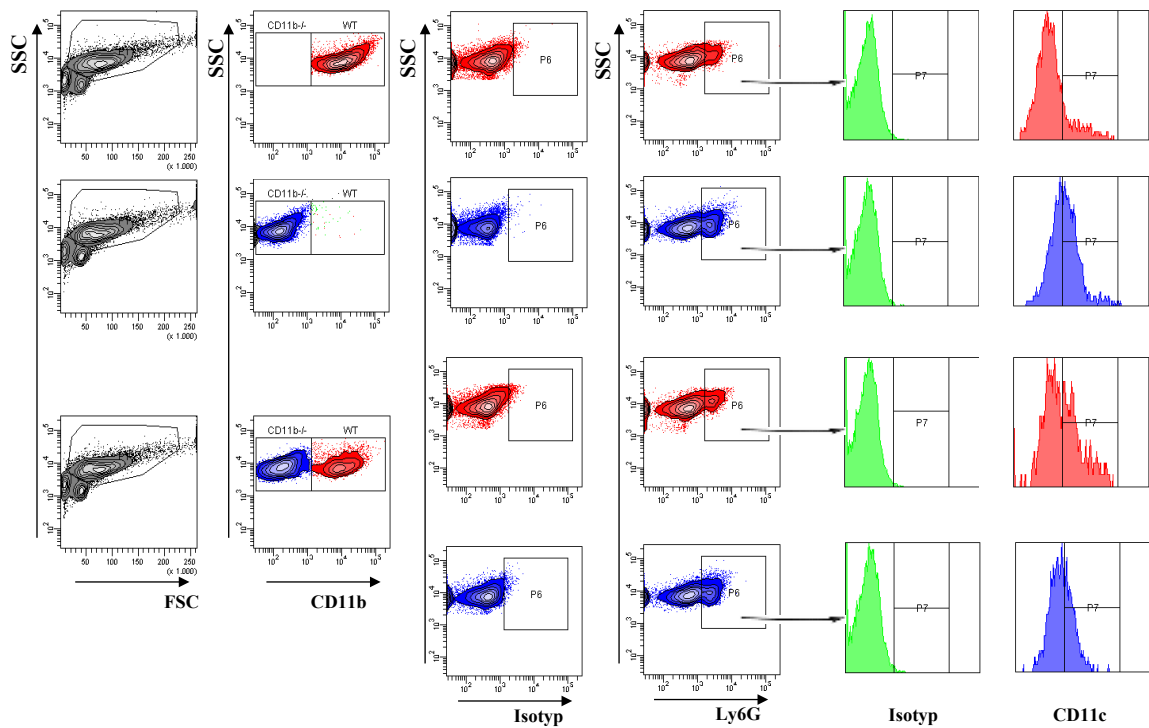
- Zhu, B., Zhang, R., Li, C., Jiang, L., Xiang, M., Ye, Z., Kita, H., Melnick, A. M., Dent, A. L., & Sun, J. (2019). BCL6 modulates tissue neutrophil survival and exacerbates pulmonary inflammation following influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(24), 11888–11893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902310116>
- Zhu, J., Luo, B. H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N., & Springer, T. A. (2008). Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell*, 32(6), 849-861. doi:10.1016/j.molcel.2008.11.018

Anhang



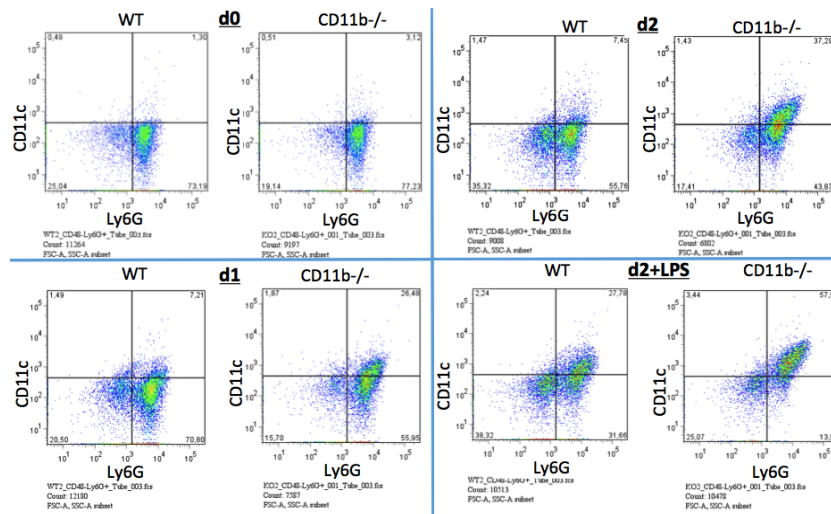
Ergänzung 1. Gating-Strategie für die Analyse des BMDC-T-Zellen-Proliferationsassays (OT-II).

Die T-Zell-stimulatorische Aktivität von $CD11b^{-/-}$ -BMDCs wurde durch die Quantifizierung der $CD4^{+}$ T-Zell-Proliferation analysiert. $CD11b^{-/-}$ -BMDCs wurden drei Stunden lang mit 100 ng/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen und dann in Parallelansätzen über Nacht mit 100 ng/ml LPS stimuliert. In 96-Napf-Platten wurden in seriellen Verdünnungen unstimulierte und stimulierte DCs ($0,625 \times 10^3$ – 5×10^3 /Napf) in Triplikaten ausgesetzt. $CD4^{+}$ T-Zellen (5×10^4 /Napf) wurden zugegeben und die Ansätze bei 37 °C für 96 h kultiviert. Für die letzten 16 Stunden wurden die Zellen mit 15 μ M CFSE gefärbt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturen mit anti-CD4-Pacfic blue gefärbt. Anschließend wurden die Kulturen durchflusszytometrisch analysiert, CFSE-Fluoreszenzintensität wurde gemessen und somit die Proliferation der T-Zellen detektiert.



Ergänzung 2. Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse der Wechselwirkungen von WT- mit $Mac-1^{-/-}$ -KM-Zellen in GM-CSF-haltigen Kultur.

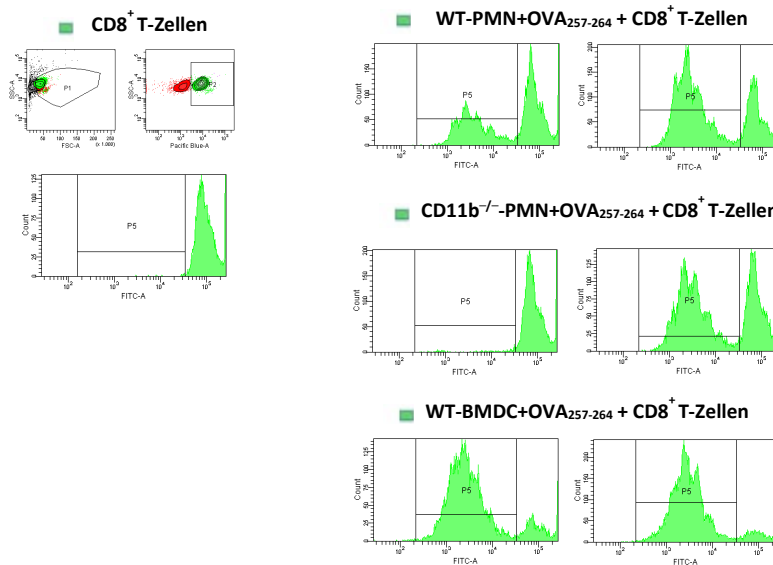
Für die Analyse der Wechselwirkungen von WT- mit $Mac-1^{-/-}$ -KM-Zellen in GM-CSF-haltigen Kultur wurde die Expression von Ly6G und CD11c mittels durchflusszytometrischen Methoden analysiert. Linkes Feld: Ausschluss von Zelltrümmern; folgend: Gating auf WT- und $CD11b^{-/-}$ -Zellen; Gating auf $Ly6G^{+}$ Zellen (PMN-Linienmarker) mit der Isotypkontrolle; Gating auf $CD11c^{+}$ Zellen (DC-Linienmarker) mit der Isotypkontrolle.



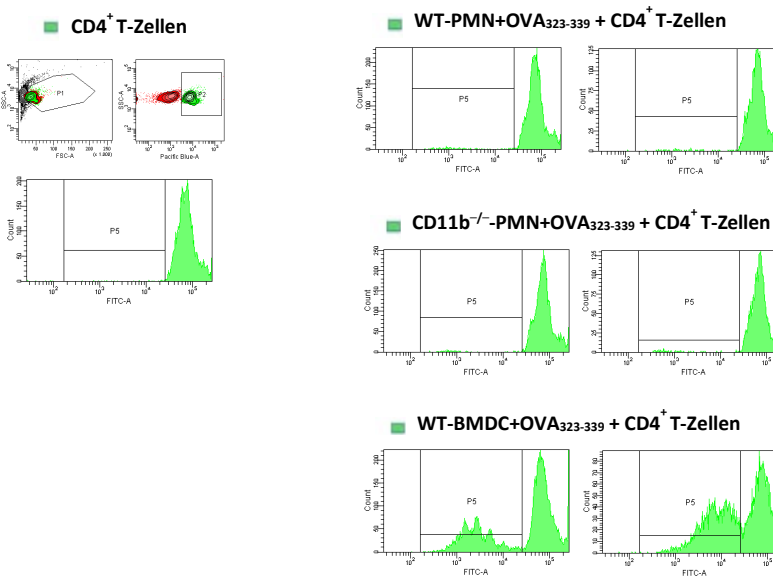
Ergänzung 3. Gating-Strategie für die DC-PMN-Hybriden-Analyse mittels Durchflusszytometrie.

Auf den frisch isolierten PMN (Tag0) und im Laufe der GM-CSF-Kultur (Tag1, Tag2) sowie nach der LPS-Zugabe (Tag2+LPS) wurde die Expression von Ly6G und CD11c mittels durchflusszytometrischen Methoden analysiert. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.

A

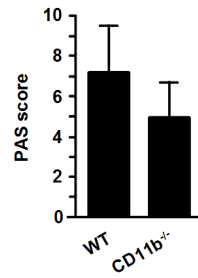


B



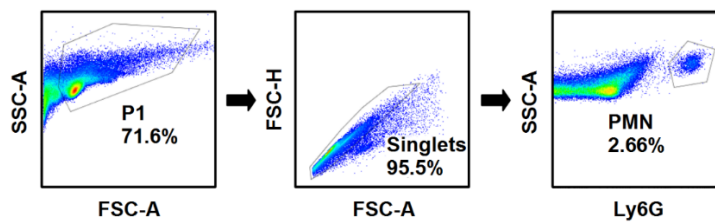
Ergänzung 4. Gating-Strategie für die Analyse des PMN-T-Zellen-Proliferationsassays (OT-I und OT-II).

Die T-Zell-stimulatorische Aktivität von CD11b^{-/-}-PMN wurde durch die Quantifizierung der (A) CD8⁺ und (B) CD4⁺ T-Zell-Proliferation analysiert. Dafür wurden frisch isolierte Knochenmarkzellen ausgereinigt, die Erythrozyten wurden depletiert und in die GM-CSF Kultur für 3 Tage eingesetzt. An Tag 2 der Kultur fand die OVA-Peptid-Beladung und die LPS-Stimulierung von Aliquoten statt. PMN wurden am Tag 3 mittels anti-Ly6G MicroBeads (Miltenyi Biotec) aussortiert und in 96 Well-Platten in Konzentration von 5x10³/Well verlegt. CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen (5 x 10⁴/Napf) wurden zugegeben und die Ansätze bei 37 °C für 96 h kultiviert. Für die letzten 16 Stunden wurden die Zellen mit 15 μM CFSE gefärbt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturen mit anti-CD4-Pacific blue bzw. mit anti-CD8-Pacific blue gefärbt. Anschließend wurden die Kulturen durchflusszytometrisch analysiert, CFSE-Fluoreszenzintensität wurde gemessen und somit die Proliferation der T-Zellen detektiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD (n=2) ausgedrückt. Bei der Auswertung wurde die P1 Subpopulation (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen betrachtet.



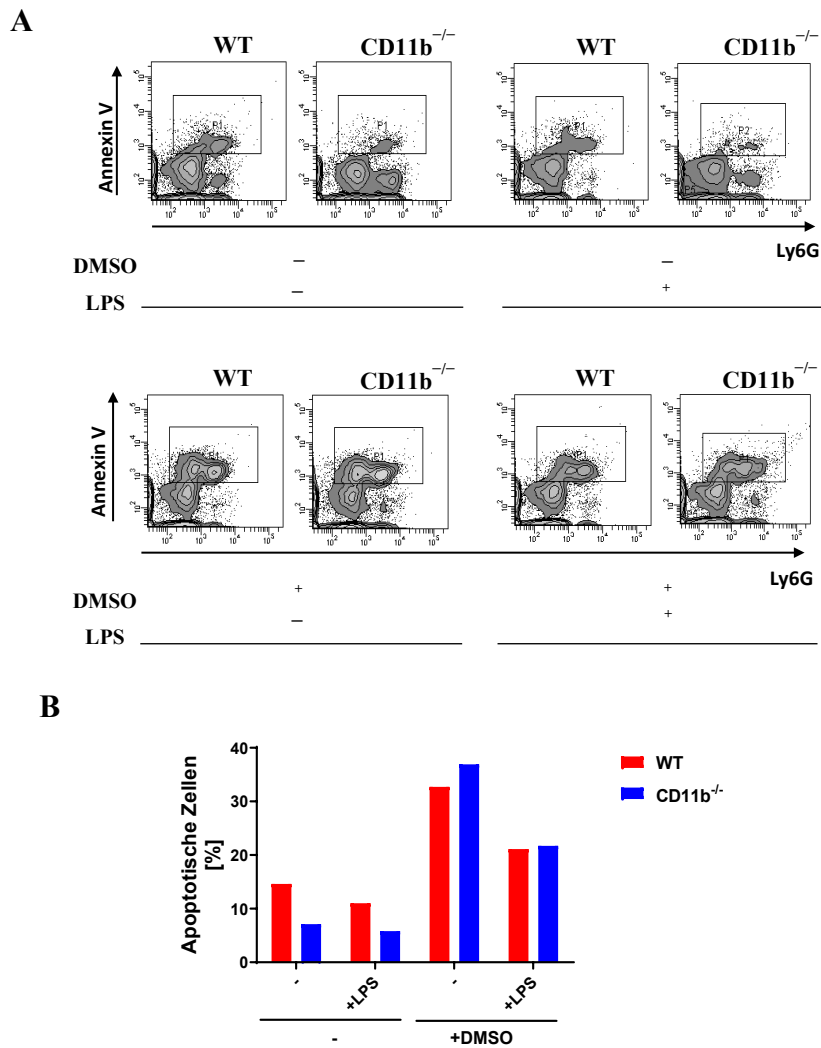
Ergänzung 5. Die Lungen von mit *A. fumigatus* infizierten *CD11b*^{-/-}-Mäusen weisen eine geringere Häufigkeit schleimproduzierender Zellen auf.

WT- und *CD11b*^{-/-}-Mäuse wurden i.t mit *A. fumigatus* infiziert und am folgenden Tag eingeschlüpfert. Paraffinschnitte von präparierten Lungenschnitten wurden mittels Periodischer Säure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung) gefärbt und die Anzahl schleimproduzierender Zellen pro mm Basalmembran bestimmt. Die Daten geben den Mittelwert ± SEM von 8 pro Gruppe analysierten Proben an.



Ergänzung 6. Gating-Strategie für die PMN-Analyse mittels Durchflusszytometrie.

Linkes Feld: Ausschluss von Zelltrümmern. Mittleres Feld: Ausschluss von Zelldoublets. Rechtes Feld: Gating auf Ly6G⁺-Zellen (PMN-Linienmarker).



Ergänzung 7. Apoptose der BMC am Tag3 der BMDC-Kultur.

Durchflusszytometrische Analyse der Annexin V-Expression erfolgte zur Beurteilung apoptotischer Tendenzen der CD11b^{-/-}-BMC am Tag 3 der BMDC-Kultur. Es wurden nicht stimulierte Zellen und Zellen nach der LPS-Stimulierung getestet. Zur Kontrolle wurde DMSO-Provokation durchgeführt. (A) Dargestellte Dot plots und (B) Balkendiagramm präsentieren die P1 Subpopulationen (Ausschluss von Zelltrümmern) der Erythrozyten-depletierten Knochenmarkzellen (n=1).

Danksagung

Ich möchte meinen Betreuern meinen aufrichtigen Dank aussprechen, für die kontinuierliche Unterstützung meiner Doktorarbeit und der damit verbundenen Forschung, für Ihre Geduld, Ihr Verständnis und Ihr immenses Wissen. Vielen Dank für Ihre Anleitung während der gesamten Forschungszeit, für alle Kommentare und hilfsbereite Betreuung.

Ich danke meinen Laborkollegen für die anregenden Diskussionen, für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und für all den Spaß, den wir zusammen hatten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann, Pawel Cholaszczyński, und meiner Mutter, Barbara Kałuża, für die liebevolle Unterstützung und Ermutigung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Ich bedanke mich auch an meinen Sohn, Jakub Cholaszczyński, und an meine Tochter, Natalia Cholaszczyńska, für all die Lächeln, die mich weitergebracht haben.

Vielen Dank an meine ganze Familie und meine Freunde für alle gute Wörter und Zusprüche. Ihr alle habt mir Kraft und Mut zur Vollendung meiner Dissertation gegeben.

Danke!

Veröffentlichungen

CD11b Regulates Fungal Outgrowth but Not Neutrophil Recruitment in a Mouse Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis Teschner, D., **Cholaszczyńska, A.**, Ries, F., Beckert, H., Theobald, M., Grabbe, S., Radsak, M., & Bros, M. (2019). *Frontiers in immunology*, 10, 123. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00123>

The phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast augments the Th17-promoting capability of dendritic cells by enhancing IL-23 production and impairs their T cell stimulatory activity due to elevated IL-10 Bros, M., Montermann, E., **Cholaszczyńska, A.**, & Reske-Kunz, A. B. (2016). *International immunopharmacology*, 35, 174–184.

Konferenzen-Teilnahme

September 2014- 44. Jahresversammlung der German Society for Immunology (DGfI), Bonn

Poster Presentation: "The phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast augments the Th17-promoting capability of dendritic cells by enhancing IL-23 production, and impairs their T cell stimulatory activity due to elevated IL-10"

Oktober 2014- 11. Jahresversammlung der Association for Cancer Immunotherapy

Uni-Mainz

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: ANNA CHOLASZCZYŃSKA
Geburtsdatum: 28.07.1984
Geburtsort: Wrocław (Polen)
Adresse: Nebeniusstraße 20, 60386 Frankfurt
Email: a.cholaszczynska@gmail.com

Bildungsweg:

Dezember 2025 Doktor rer. nat. Biologie
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
10.2003 – 07. 2011 Magister-Ingenieurin der Biotechnologie
Technische Universität Wrocław/Polen

Auszeichnungen:

10.2010 – 07.2011 Stipendium der Technischen Universität Wrocław/Polen

Beruflicher Werdegang:

09.2022 – 03.2023 Laborantin Bioanalysis Labor Cellular- and Bioassays
im Bereich Preclinical Research
Biotest AG, Landsteinerstraße 5, 63303 Dreieich
03.2014 – 10.2016 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Forschungsgruppe
an der Hautklinik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
03.2012 – 03.2014 Biologisch-Technische Assistentin in der Forschungsgruppe
an der Hautklinik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz