

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



Zelluläre und molekulare Mechanismen der angeborenen Immunität

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Steve Prüfer

geb. am 28. März 1985 in Stollberg/Erzgeb.

Mainz, 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Einleitung	3
2.1	Das Immunsystem	3
2.2	Das angeborene Immunsystem	4
2.2.1	Polymorphonukläre Leukozyten (PMN)	4
2.2.2	Monozyten/Makrophagen	7
2.2.3	Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen)	9
2.3	Hämostase und ADAMTS13	10
2.4	Die Entzündungsreaktion und ihre Auflösung	11
2.5	Pattern-Recognition Receptors (PRRs)	12
2.5.1	Toll-like Rezeptoren (TLR)	13
2.5.2	NOD-like Rezeptoren (NLR)	16
2.6	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1)	17
2.7	Pilze	19
2.7.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> (<i>A. fumigatus</i>)	20
2.8	Pilzinfektionen	20
2.8.1	Allergische Bronchopulmonare Aspergillose (ABPA) und Asthma	21
2.8.2	Aspergillom	21
2.8.3	Invasive Aspergillose (IA)	21
2.8.4	Pulmonale Pilzinfektionen und das Immunsystem	22
3	Zielsetzung	27
4	Material und Methoden	29
4.1	Chemikalien, Stimulanzen und Kits	29
4.2	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	30
4.3	Antikörper	32
4.3.1	FACS-Antikörper	32
4.3.2	Western Blot-Antikörper	33
4.3.3	ELISA-Antikörper	33
4.4	Verbrauchsmaterial	34
4.5	Geräte	34

4.6	Mausstämme	35
4.7	Zelllinie	35
4.7.1	5637	35
4.7.2	MUTZ-3	35
4.8	Zellaufreinigung	36
4.8.1	Humane PMN	36
4.8.2	Humane PBMC	36
4.8.3	Humane CD14 ⁺ Monozyten	37
4.8.4	Murine BM-PMN	37
4.9	Bestimmung der Lebendzellzahl	37
4.10	Pilzstämme und -kultivierung	38
4.11	Mausmodell für invasive Asperillose (IA)	38
4.11.1	Lungenhistologie	39
4.11.2	Analyse von Blut und BAL-Fluid	39
4.11.3	<i>in vivo</i> -Pilzkilling in der Lunge	39
4.12	<i>in vitro</i> -Pilzkilling	40
4.13	Luziferase-Reporterassays	40
4.13.1	Reportergenplasmide	41
4.14	Zellstimulation	41
4.14.1	TREM-1-Stimulation	41
4.14.2	Inhibitorstudien	41
4.14.3	Stimulation von murinen BM-PMN	42
4.15	Detektion des oxidativen Burst	42
4.16	Analyse der Ca ²⁺ -Mobilisierung	42
4.17	Analyse von Zellviabilität und Apoptose	43
4.18	Messung von Chemokinen und Zytokinen (ELISA)	43
4.19	Durchflusszytometrie (FACS)	44
4.20	SDS-PAGE und Western Blot-Analyse	44
4.20.1	Zellyse	44
4.20.2	SDS-Gel-Elektrophorese	45
4.20.3	Western Blot-Analyse	45
4.20.4	Stripping	46
4.21	Auswertung und statistische Analyse	46

5	Ergebnisse	47
5.1	Sich gegenseitig beeinflussende Signalkaskaden von TREM-1 und TLR bzw. NLR in monozytären Zellen	47
5.1.1	Die AML-Zelllinie MUTZ-3 exprimiert TREM-1 funktionell	47
5.1.2	Ligation von TREM-1 induziert die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK in monozytären Zellen	49
5.1.3	PI3K und p38-MAPK sind zentrale, regulatorische Moleküle der TREM-1-Signaltransduktion	50
5.1.4	Die Signalweiterleitung von TREM-1 ist abhängig von Ca ²⁺	53
5.1.5	Stimulation von TREM-1 in Kombination mit TLR- oder NLR-Agonisten bzw. GM-CSF induziert eine gesteigerte Produktion von IL-8	55
5.1.6	PI3K und p38-MAPK sind essentielle, regulatorische Moleküle der mittels TLR- oder NLR-Koligation gesteigerten Aktivierung von TREM-1	57
5.2	PMN sind essentiell für das Überleben von <i>A. fumigatus</i> -Infektionen	63
5.3	Der oxidative Burst ist im Gegensatz zu neutrophiler Elastase essentiell bei der Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen	65
5.3.1	Der oxidative Burst, aber nicht neutrophile Elastase, ist essentiell für das Überleben von <i>A. fumigatus</i> -Infektionen	65
5.3.2	Die Defizienz im oxidativen Burst oder neutrophiler Elastase hat keinen Einfluss auf Rekrutierung und Aktivierung von PMN bei <i>A. fumigatus</i> -Infektionen	67
5.3.3	Die Defizienz im oxidativen Burst oder neutrophiler Elastase hat keinen zusätzlichen Einfluss auf die PMN-Effektorfunktionen	69
5.3.4	Das Abtöten von <i>A. fumigatus</i> -Konidien ist abhängig von neutrophiler Elastase und dem oxidativen Burst	72
5.4	Arginin beeinflusst die Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen nicht	74
5.5	ADAMTS13 beeinflusst die Rekrutierung von PMN bei pulmonalen Pilzinfektionen	78
5.5.1	ADAMTS13-Defizienz führt zu einer erhöhten Mortalität bei Infektion mit <i>A. fumigatus</i>	78

5.5.2	ADAMTS13-Defizienz resultiert in einer reduzierten PMN-Rekrutierung bei <i>A. fumigatus</i> -Infektionen	79
5.5.3	ADAMTS13-Defizienz hat <i>in vitro</i> keinen Einfluss auf die PMN-Effektorfunktionen	81
6	Diskussion	87
6.1	Sich gegenseitig beeinflussende Signalkaskaden von TREM-1 und TLR bzw. NLR in monozytären Zellen	87
6.2	PMN sind essentiell für das Überleben von <i>A. fumigatus</i> -Infektionen . . .	91
6.3	Der oxidative Burst ist im Gegensatz zu neutrophiler Elastase essentiell bei der Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen	93
6.4	Arginin beeinflusst die Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen nicht .	95
6.5	ADAMTS13 beeinflusst die Rekrutierung von PMN bei pulmonalen Pilzinfektionen	97
7	Zusammenfassung	101
8	Abkürzungsverzeichnis	103
9	Literaturverzeichnis	107

1 Abstract (engl.)

The triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) is an important mediator of innate inflammatory responses, especially during microbial infections and sepsis. TREM-1 ligation on polymorphonuclear neutrophils (PMN) or monocytes results e.g. in the production of proinflammatory cytokines and chemokines like IL-8. Towards cellular mechanisms, TREM-1 engagement induces the activation of MAP kinases as well as rapid Ca^{2+} mobilization. In PMN the kinases phosphatidyl-inositide 3-kinase (PI3K) and p38-MAPK regulate independently from each other TREM-1 effector mechanisms. However, a detailed understanding of TREM-1 signaling pathways in monocytic versus granulocytic cells is currently missing.

In our present work, we evaluated the TREM-1 signaling hierarchy in monocytic cells and found that the acute myeloid leukemia cell line MUTZ-3 expresses TREM-1 in a natural and functional manner. We compared essential signaling molecules of the of the TREM-1, TLR and NLR cascades in MUTZ-3 cells as well as primary monocytes or PMN by Western Blot analysis. These studies confirmed the essential role of PI3K and p38-MAPK in the TREM-1 as well as the TLR or NLR cascades of monocytic cells. Importantly, PI3K and p38-MAPK signals in monocytic cells both control Ca^{2+} mobilization and are directly connected in the TREM-1 signaling hierarchy, which contrasts previous results obtained in PMN showing only a PI3K dependent Ca^{2+} mobilization and a regulation of PI3K and p38-MAPK independently from each other. Taken together, our results indicate cell type specific differences in the TREM-1 signaling cascade and contribute to an enhanced understanding of the regulation of innate inflammatory responses.

In addition, PMN are important for the control of invasive aspergillosis (IA), a major threat to immunocompromised individuals. To clear *A. fumigatus* infections, PMN employ potent oxidative and non-oxidative mechanisms, i.e. releasing intracellular granules containing antimicrobial proteins like neutrophil elastase (ELA) and inflammatory mediators.

To study the relative contribution of these mechanisms, mice with a defective NADPH oxidase (p47^{phox}^{-/-} and gp91^{phox}^{-/-}) rendering phagocytes incapable of generating measurable superoxides and ELA deficient (ELANE) mice were analyzed after intratracheal infection with *A. fumigatus*. Infected p47^{phox}^{-/-} and gp91^{phox}^{-/-} mice died within three days and had a significant higher fungal burden compared to wildtype mice determined by colony-forming units of lung homogenates. This clearly demonstrates the essential role of the oxidative

burst for fungal killing. Interestingly, in ELANE mice the survival after infection was unimpaired indicating that ELA is not essential here. Nevertheless, we detected delayed *A. fumigatus* clearance *in vivo* in ELANE mice indicating a partial contribution of ELA as a major component of azurophilic granules to fungal immunity.

Moreover, the effect of arginine deficiency on the course of IA was analyzed, as this suppresses adaptive immune responses as well as viral, bacterial and vermicular expansion. Infection of immunocompetent as well as neutropenic, arginine depleted mice did not affect survival, fungal killing, PMN recruitment or activation compared to control groups denoting no impact of arginine as well as their effector molecules arginase-1 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) on the fungal clearance in IA.

von Willebrand factor (VWF) levels as well as the activity of the metalloprotease ADAMTS13 cleaving ultra-large vWF multimers decreases in both acute and chronic inflammation. In mice, ADAMTS13 deficiency results in increased leukocyte rolling and adhesion on veins and enhanced, vWF-dependent extravasation of PMN in inflammatory models. In contrast, PMN recruitment was diminished after pulmonary infection with *A. fumigatus* resulting in increased fungal burden, lung injury as well as mortality. These findings suggest an important influence of ADAMTS13 on PMN recruitment depending on the used infection model, while the exact mechanism remains elusive.

In summary, the proposed cell type specific TREM-1 signaling, the oxidative and non-oxidative dependent and arginine independent fungal clearance as well as the influence of ADAMTS13 and vWF on PMN recruitment after *A. fumigatus* infection improve our understanding of the innate immune response and might contribute to the development of future concepts for the treatment of severe inflammatory conditions such as aspergillosis or sepsis.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Haut und Schleimhäute bilden eine physikalische Barriere, die antimikrobielle Substanzen aufweisen. Überwinden Pathogene diese, erfolgt die erste Abwehrreaktion meist durch das angeborene (nichtadaptive) Immunsystem. Dieses erkennt den Großteil der Pathogene anhand von evolutionär konservierten, redundanten Oberflächenmustern und initiiert über die Freisetzung verschiedener, löslicher Mediatoren eine Entzündungsreaktion. Merkmale dieser sind Rötung, Schwellung, Überwärmung, Schmerz und eingeschränkte Funktion der betroffenen Körperregion. Dies führt zur Rekrutierung weiterer Zellen des Immunsystems an den Entzündungsort und schließlich zur Abtötung der Erreger. Da die Spezifität und Wirkung der angeborenen Immunreaktion häufig auf essentielle Bestandteile des jeweiligen Pathogens beschränkt ist, erfolgt eine gezieltere Immunreaktion auf sich zum Teil äußerst schnell verändernde Pathogene durch das adaptive Immunsystem. Dieses erkennt spezifische Strukturen der Eindringlinge, Antigene genannt, und entwickelt anhand derer gezielte Abwehrmechanismen.

Die adaptive Immunantwort wird über B- und T-Zellen vermittelt, die über ihre Rezeptoren eine fast unbegrenzt Vielfalt an Antigenen erkennen können. Erzielt wird dies durch somatische Rekombination und Punktmutationen der B- und T-Zellrezeptoren. Dabei erkennen die Rezeptoren auf jeder einzelnen B- oder T-Zelle nur ein spezifisches Antigen. B-Zellen zirkulieren im Blut und den lymphatischen Organen. Bindet ein Antigen an den B-Zellrezeptor und wird die B-Zelle durch zusätzliche, kostimulatorische Signale aktiviert, wandert diese zu den Keimzentren in Lymphknoten und Milz. Dort differenziert sie zur Plasmazelle und sezerniert Antikörper mit der gleichen Spezifität wie der jeweilige B-Zellrezeptor. Generell weisen Antikörper variable Domänen zur Antigenerkennung und eine konstante Fc-Domäne auf. Über Anbindung an diese Fc-Domäne können Zellen des Immunsystems von Antikörpern opsonierte Erreger erkennen und zerstören, wobei die Komplementkaskade ebenfalls opsonierte Pathogene abtöten kann.

T-Zellen sind MHC-restringiert, d. h. sie erkennen nur über Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC, engl.: *major histocompatibility complex*) präsentierte Antigene. Man unterscheidet zwischen auf allen Körperzellen vorkommendem MHCI und MHCII, dass nur von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert wird. Neben auf MHC-Molekülen präsentiertem Antigen ist zur Aktivierung

von T-Zellen ein weiteres Signal notwendig. Sie müssen durch kostimulatorische Signale von APCs aktiviert werden. Dies führt anschließend zu verschiedenen Effektorfunktionen, die vom jeweiligen T-Zelltyp abhängen. So töten zytotoxische T-Zellen, die hauptsächlich MHCI-restringiert sind, z.B. Virus-infizierte Zellen ab und MHCII-restringierte T-Helferzellen unterstützen die B-Zellaktivierung und regulieren die Immunantwort durch Ausschüttung verschiedener Zytokine und Chemokine.

2.2 Das angeborene Immunsystem

In den meisten Invertebraten und Vertebraten, zu denen Säugetiere wie Maus und Mensch gehören, untergliedert sich die angeborene Immunantwort in humorale und zelluläre Bestandteile. Humorale Bestandteile sind verschiedene Plasmaproteine, die passiv im Blut bzw. der Gewebeflüssigkeit zirkulieren. Zu ihnen gehören das Komplementsystem, welches Mikroben mittels Proteasen abtötet und durch Anaphylatoxine eine Entzündungsreaktion fördern kann, und die Interleukine (IL), die als körpereigene Botenstoffe Wachstum, Reifung und Teilung von Immunzellen anregen oder vermindern können. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören Granulozyten, Monozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die im Blut zirkulieren, sowie Makrophagen, die im Körpergewebe vorkommen. Sie erkennen und töten Mikroben durch unterschiedliche Mechanismen. Phagozyten, zu denen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen sowie Dendritische Zellen gehören, erkennen eingedrungene Pathogene anhand spezieller, evolutionär konservierter Pathogenmuster (PAMP, engl.: *pathogen associated molecular pattern*) durch Rezeptoren wie den PRRs (engl.: *pattern recognition receptors*).^[1] Aktivierte Phagozyten internalisieren die erkannten Pathogene durch Rezeptor-vermittelte Phagozytose in ein Vesikel, dem Phagosom.^[2,3] Dieses tötet durch sein saures Milieu Pathogene ab. Zudem kann das Phagosom mit einem Lysosom fusionieren, welches zusätzlich antimikrobielle Enzyme und Proteine enthält.

2.2.1 Polymorphonukläre Leukozyten (PMN)

PMN, auch neutrophile Granulozyten genannt, sind kurzlebige Phagozyten, die innerhalb weniger Stunden zum Infektionsort wandern, um vor allem eingedrungene Pilze und Bakterien abzutöten.^[4] Sie besitzen einen segmentierten Zellkern sowie verschiedene intrazelluläre Granula. Beim Menschen stellen sie mit 50 bis 70 % den überwiegenden Teil der zirkulierenden Leukozyten dar, wohingegen in der Maus stammabhängig nur 10

bis 25 % der Leukozyten PMN sind.^[5] Gemeinsam mit den Basophilen und Eosinophilen bilden sie die Gruppe der Granulozyten, die durch ihr unterschiedliches Färbeverhalten mit Hämatoxylin und Eosin klassifiziert werden.

Rekrutierung von PMN bei Infektionen: Im Knochenmark bilden sich aus myeloiden Vorläuferzellen durch spezielle Wachstumsfaktoren wie G-CSF (engl.: *granulocyte colony stimulating factor*) und GM-CSF (engl.: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) PMN. Diese wandern ins Blut, wo sie zirkulieren. Anschließend werden sie in Leber, Milz und Knochenmark wieder abgebaut.^[6] Die Auswanderung von PMN korreliert dabei mit der Apoptose von PMN im Gewebe. So phagozytieren Mastzellen, Makrophagen und Dendritische Zellen apoptotische PMN und setzen dadurch IL-23 frei.^[7,8] Dieses stimuliert dann die Produktion von IL-17A durch spezielle T-Helferzellen^[9], welches wiederum die Freisetzung von G-CSF induziert.^[10]

Bei akuten Infektionen wird die Einwanderung von PMN ins Gewebe durch Endothelzellen initiiert, die lokale Entzündungsmediatoren freisetzen. Zudem führen mikrobielle Produkte wie das bakterielle fMLP (*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) auf Endothelzellen zur Hochregulation von Oberflächenmolekülen wie P- und E-Selektin.^[11–13] An diese adhären die PMN mit ihren glykosylierten Liganden wie PSGL1 (engl.: *P-selectin glycoprotein ligand 1*). Dadurch kommt es zum “Abbremsen” und “Austreten” der PMN aus der Blutzirkulation. Die PMN „rollen“ dann entlang der Gefäßwände, was durch neutrophile L-Selektine (CD62L) unterstützt wird. Durch Anbindung von Chemokinen an die Endotheloberfläche, insbesondere der ELR-CXC Chemokine wie dem humanen CXCL8 (IL-8) und dem murinen CXCL1 (KC), CXCL2 und CXCL5, erfolgt die Aktivierung der PMN. Die PMN binden dann, vermittelt durch Integrine wie CD11b, an die Endotheloberfläche und wandern anschließend ins Gewebe ein, was als Transmigration bezeichnet wird.^[14]

Effektorfunktionen von PMN: Über verschiedene intra- und extrazelluläre Mechanismen, die sich in oxidative und nicht oxidative untergliedern, töten PMN erkannte Pathogene ab. Dafür besitzen PMN drei verschiedene, intrazelluläre Granula, die sich während der Reifung im Knochenmark bilden und unterschiedlichste Proteine enthalten.^[15–17] Bei der Aktivierung werden zuerst die Inhalte der peroxidase-negativen Granula freigesetzt, zu denen die spezifischen (sekundären) und die Gelatinase- (tertiären) Granula gehören.

Beide enthalten antimikrobielle Peptide wie Lactoferrin, Lipocalin, Lysozyme und LL37 sowie die Matrix-Metalloproteasen MMP8, MMP9 und MMP25, die durch Degradierung von Zellbestandteilen wie Laminin, Kollagen, Proteoglykanen und Fibronectin zur PMN-Rekrutierung und Gewebeschädigung führen.^[15] Die Peroxidase-positiven, azurophilen (primären) Granula enthalten verschiedene antimikrobielle α -Defensine, Azurocidin, die Serprocidine Cathepsin G, neutrophile Elastase und Protease 3,^[18] das Lipopolysaccharid-bindende BPI (engl.: *bactericidal/permeability increasing protein*) und Myeloperoxidase (MPO),^[19] welches relativ harmloses H_2O_2 zu stärker antiseptischen Hypochlor-, Hypobrom- und Hypojodsäure konvertiert.^[20]

Zu den oxidativen Effektorfunktionen gehört die Generierung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROS, engl.: *reactive oxygen species*) wie H_2O_2 und Hyperoxidanionen (O_2^-), die PMN nach Aktivierung in einem Prozess synthetisieren, der als respiratorischer bzw. oxidativer Burst bezeichnet wird. Die Ausschüttung der ROS erfolgt dabei stimulusabhängig, wobei lösliche Stimuli zur extrazellulären Ausschüttung führen und phagozytierte Partikel die Freisetzung im Phagosom initiieren.^[21,22] Katalysiert wird die ROS-Generierung durch den membrangebundenen Enzymkomplex Nicotinsäureamid-

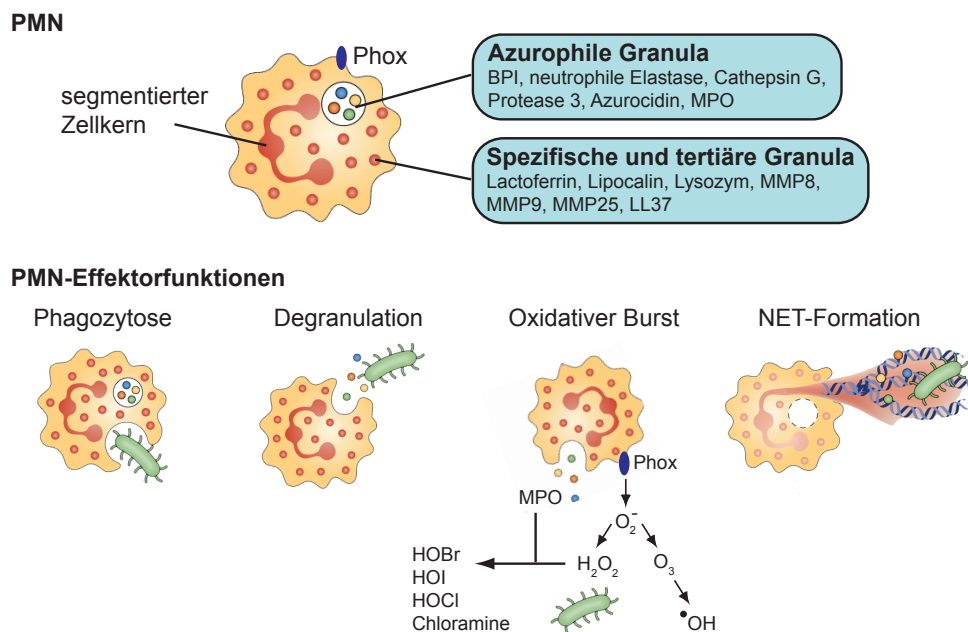


Abbildung 1: Die PMN-Effektorfunktionen. PMN besitzen einen segmentierten Zellkern und verschiedene intrazelluläre Granula. Über unterschiedlichste oxidative und nicht oxidative Mechanismen können sie erkannte Pathogene abtöten. BPI, engl.: *bactericidal/permeability increasing protein*. MPO, Myeloperoxidase. Phox, engl.: *phagocyte oxidase*. MMP, Matrix-Metalloprotease. (modifizierte Abb. aus Kolaczowska *et al.*^[14])

Adenin-Dinukleotid-Phosphat-(NADPH)-Oxidase. Dieser überträgt Elektronen von zytosolischem NADPH auf Sauerstoff, wodurch sich Hyperoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) bilden, die dann mittels Superoxiddismutase zu H_2O_2 reduziert werden.^[17,20,23] Essentiell dafür ist Flavozytochrom b_{558} , ein membranständiges Heterodimer bestehend aus einer großen β -Untereinheit $gp91^{phox}$ (phox, engl.: *phagocyte oxidase*) und der kleinen α -Untereinheit $p22^{phox}$. Das Glykoprotein $gp91^{phox}$ enthält die Elektronentransporter FAD und Häm sowie die NADPH-Bindungsdomäne.^[17] $p22^{phox}$ fungiert als Bindungsdomäne für die sich erst nach Aktivierung assoziierenden, wasserlöslichen Untereinheiten $p67^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$, $p29$ Peroxiredoxin sowie die kleinen G-Proteine Rac2 und Cdc42, die alle im unaktivierten Zustand zytosolisch vorliegen. Defekte in den genannten Untereinheiten, auch als Granulomatose (CGD, engl.: *chronic granulomatous disease*) bezeichnet, resultieren in schweren, wiederkehrenden Infektionen und Entzündungen.^[24] Ein anderer Mechanismus zur Bildung von hocheffektiven, antimikrobiellen Intermediaten läuft über induzierbare NO-Synthasen (iNOS), welche die Aminosäure *L*-Arginin in *L*-Citruillin umwandelt und dabei hoch toxische Stickstoffintermediaten wie NO^{\bullet} bildet.^[20]

Zusätzlich können PMN extrazelluläre, fibrilläre Netzwerke freisetzen, die NETs (engl.: *neutrophil extracellular traps*) genannt werden.^[25,26] Diese Netzwerke bestehen hauptsächlich aus Zellkern-DNA, an welches Histone sowie antimikrobielle Proteine aus den verschiedenen Neutrophilengranula wie neutrophile Elastase und MPO gebunden sind. Durch gezielte Ausschüttung fördern die NETs ein Abtöten der Mikroben sowie deren Phagozytose. Zudem bewirken die NETs eine Immobilisierung der Mikroben, wodurch deren Ausbreitung im Körper verhindert wird.^[27]

2.2.2 Monozyten/Makrophagen

Monozyten repräsentieren ca. 10 % der zirkulierenden Leukozyten im humanen Blut mit einer Lebensdauer von ein bis drei Tagen und sind myeloiden Ursprungs. Humane Monozyten werden anhand ihrer Expression von CD14 und CD16 klassifiziert. 80 bis 90 % der Monozytenpopulation sind klassische Monozyten ($CD14^{high} CD16^{-}$), die viel CC-Chemokinrezeptor 2 (CCR2) und wenig CX_3C -Chemokinrezeptor 1 (CX_3CR1) exprimieren.^[28,29] Die $CD16^{+}$ Monozyten exprimieren dagegen viel CX_3CR1 und wenig CCR2 und unterteilen sich weiter in nichtklassische ($CD14^{+} CD16^{high}$) und intermediäre Monozyten ($CD14^{high} CD16^{+}$).^[30] Generell besitzen die klassischen Monozyten eine höhere Phagozytose- sowie Myeloperoxidaseaktivität als die $CD16^{+}$ Monozyten. Im Gegensatz dazu

können letztere mehr IL-1 und TNF α ausschütten. In der Maus unterscheidet man zwei Subpopulationen. Inflammatorische (Ly6C^{high}) Monozyten (Ly6C⁺ CD11b⁺), die schnell an den Entzündungsort rekrutiert werden, exprimieren viel CCR2 und wenig CX₃CR1.^[31] Sie ähneln den klassischen humanen Monozyten. CX₃CR1^{high} (Ly6C^{low}) Monozyten, die den humanen CD14^{high} CD16⁺ Monozyten ähneln, exprimieren viel CX₃CR1 und dafür wenig CCR2 und Ly6C. Sie adhäreren an der luminaren Endotheloberfläche, um schnell auf Gewebeschäden und Infektionen zu reagieren.^[32,33]

Einwanderung von Monozyten ins Gewebe: CC-Chemokinligand 2 (CCL2 bzw. MCP-1, engl.: *monocyte chemotactic protein 1*) und CCL7 (MCP-3) initiieren die CCR2-vermittelte Auswanderung von Monozyten aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf.^[34] Unter „steady state“ Bedingungen „rollen“ sie entlang der Blutgefäße, wo sie adhäreren, um anschließend ähnlich wie PMN bei Infektionen (siehe Kap. 2.2.1) ins Gewebe zu transmigrieren.^[13] Dies wird beispielsweise über die Oberflächenmoleküle CD62E und CD106 vermittelt. Im Gewebe differenzieren sie abhängig vom Zytokinmilieu zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen aus. Abhängig vom infiltrierten Gewebe werden sie dann Mikrogliazellen im zentralen Nervensystem, Kupffer-Sternzellen in der Leber oder Alveolarmakrophagen in der Lunge genannt. Bei Abwesenheit von Entzündungsreaktionen sind die Monozyten in der Lage, wieder ins Knochenmark einzuwandern.

So wurde beispielsweise in einem Mausmodell mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes* gezeigt, dass CCR2-Defizienz die Infektion verschlimmert.^[35] Verantwortlich dafür ist eine verminderte Rekrutierung von Ly6C^{high} Monozyten, die zu Dendritischen Zellen ausdifferenzieren. Diese setzen TNF α , das die Phagozytoseaktivität von Makrophagen erhöht, und induzierbare NO-Synthase (iNOS) frei, welche die Bildung von antimikrobiellem NO aus der Aminosäure *L*-Arginin katalysiert.

Effektorfunktionen von Monozyten und Makrophagen: Bei Infektionen wandern Monozyten in das entzündete Gewebe ein, wo sie ausdifferenziert als Makrophagen oder Dendritische Zellen Pathogene abtöten. Zudem migrieren Monozyten bzw. Zellen monozytäre Ursprungs zu den Lymphknoten, um dort direkt oder vermittelt über Dendritische Zellen die adaptive Immunantwort einzuleiten.

Monozyten und Makrophagen erkennen Pathogene über eine Vielzahl an PRRs, wie TLRs, Scavenger-Rezeptoren, CLRs oder NOD-like-Rezeptoren (NLRs). Nach Aktivierung

initiiieren sie eine Entzündungsreaktion über die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, NO oder IL-1. Zudem setzen sie Chemokine wie CXCL8/IL-8, CCL3 oder CCL4 frei, um PMN zu rekrutieren. Aktivierte Monozyten und Makrophagen phagozytieren Pathogene und töten sie durch ähnliche Mechanismen wie die PMN ab (siehe Kap. 2.2.1).^[36,37] So besitzen Monozyten ebenfalls Peroxidase-positive Granula. Auch Monozyten und Makrophagen setzen antimikrobielle Proteine frei, die allerdings im Gegensatz zu ausgereiften PMN neu synthetisiert werden können. Zudem können sie mittels oxidativem Burst antimikrobielle Radikale generieren, wobei dieser nicht so stark ausgeprägt ist wie in PMN. Dafür produzieren Makrophagen vermehrt über iNOS toxische Stickstoffintermediate.^[2,38] Zusätzlich fungieren die freigesetzten Radikale als Signalmoleküle, welche die Expression von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen beeinflussen.^[39]

2.2.3 Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen)

NK-Zellen bilden zusammen mit B- und T-Zellen die Gruppe der Lymphozyten, die 30 bis 50 % der humanen Leukozyten im peripheren Blut darstellen.^[5] Sie gehören aufgrund der fehlenden Antigen-spezifischen Rezeptoren zur angeborenen Immunantwort und haben eine Lebensspanne von ungefähr zwei Wochen^[40]. NK-Zellen sind an der Regulation und Kontrolle von mikrobiellen Infektionen, antitumoralen Immunantworten, hämatopoetisch, allogenen Transplantatabstoßungen und Schwangerschaften beteiligt.^[41–43]

Nach ihrer Reifung im Knochenmark wandern NK-Zellen ins Gewebe ein, wobei auch von NK-Zellentwicklung in Thymus, Lymphknoten und Leber berichtet wird.^[44] Jaeger *et al.* zeigten zudem, dass ausgereifte PMN für eine adäquate Entwicklung von NK-Zellen im Knochenmark und der Peripherie essentiell sind.^[45]

NK-Zellen identifizieren Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen durch deren verminderte Expression von MHC-I-Oberflächenmolekülen über spezielle Rezeptoren wie humane KIRs (engl.: *killer cell immunoglobulin-like receptors*).^[46,47] Des Weiteren können sie von gestressten Zellen sezernierte Proteine über NKG2D-Rezeptoren und eingedrungene Pathogene über TLR-Rezeptoren erkennen.^[42] Nach erfolgter Aktivierung, welche durch von T-Zellen, Dendritischen Zellen oder Makrophagen ausgeschüttete Zytokine verstärkt wird, töten sie erkannte Tumorzellen oder infizierte Zellen durch Freisetzung von Granulaproteinen wie Perforine, Granzyme und Granulysin ab.^[41] Dabei bilden Perforine in der Zellmembran eine Pore, durch die Granzyme eindringen können.^[48] Diese Serinproteasen

induzieren dann die Apoptose der Zellen direkt oder vermittelt über Caspasen. Dagegen lysiert Granulysin Mikroben oder Tumore direkt. Aktivierte NK-Zellen setzen zudem Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) frei, um eine Infektion einzudämmen und die adaptive Immunantwort zu fördern. Außerdem werden proinflammatorische als auch immunsuppressive Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-10 ausgeschüttet und über verschiedene Chemokine weitere Immunzellen an den Entzündungsort rekrutiert.^[41,42]

2.3 Hämostase und ADAMTS13

Hämostase bezeichnet das zügige Abstoppen der Blutung nach Gefäßverletzung durch Wundverschluss, um unter anderem das Eindringen von Pathogenen zu verhindern. Dies erfolgt meist durch Thrombozyten, die im Blut zirkulieren. Kommt es zur Gefäßverletzung, tritt Blut mit dem umliegenden Bindegewebe in Kontakt. Die Thrombozyten haften dann an im Extrazellularraum vorhandene Kollagenfasern. Diese Adhäsion wird durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt, einem von Endothelzellen und Megakaryozyten gebildeten Protein. Durch diese Adhäsion, welche von Fibronectin und Laminin unterstützt wird, kommt es zur Thrombozytenaktivierung, wodurch aus den Thrombozytengranula verschiedene Gerinnungsfaktoren und chemotaktische Moleküle freigesetzt werden. Dies führt zur Verengung des beschädigten Blutgefäßes, was einen hohen Blutdurchfluss verhindert und die Rekrutierung weiterer Thrombozyten initiiert, die schließlich durch Bildung eines Thrombus das Gefäß verschließen. Nach der Hämostase kommt es zur Wundheilung, indem Fibroblasten in den Thrombus einwachsen und Bindegewebe bilden. Durch Beeinträchtigung der Hämostase kann es zu schwerwiegenden Erkrankungen kommen. So kommt es bei der Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) durch Gerinnung zum Abfall der Thrombozyten im peripheren Blut, wodurch es zu fleckenförmigen Einblutungen in der Haut kommt. Weitere Charakteristika sind Ausfälle der Motorik, Sensibilität des Bewusstseins, der Sehfähigkeit und der Sprache. Die TTP wurde 1924 von Moschcowitz erstmals beschrieben^[49] und tritt am häufigsten im Alter von 30 bis 40 Jahren auf, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer.^[50,51] Ursache für die Krankheit sind ungewöhnlich große bzw. ultralange vWF-Multimere.^[52] 1996 wurde unabhängig voneinander durch Tsai^[53] und Furlan^[54] gezeigt, dass eine Störung der Zinkmetalloprotease ADAMTS13 zur TTP führt, da ADAMTS13 den vWF in Multimere spaltet. Erfolgt diese Spaltung nicht, so entstehen Thromben aus den ultralangen vWF-Multimeren und aktivierten Thrombozyten, die zu Gefäßverschlüssen und Ischämie führen.

ADAMTS13-Defizienz kann infolge einer genetischen Prädisposition in Kombination mit einem zusätzlichen Auslöser, wie einer harmlosen Infektion, induziert werden, aber auch infolge einer Autoimmunreaktion entstehen, die zur Bildung von Antikörpern gegen ADAMTS13 führt.

Ein erhöhtes Plasmaniveau von vWF korreliert mit einigen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis^[55], viralen und bakteriellen Infektionen^[56,57], Erkrankungen der Herzkranzarterien^[58] und Schlaganfall^[59]. Zudem wurde gezeigt, dass bei akuter und chronischer Entzündung die ADAMTS13-Aktivität vermindert ist.^[60] Chauhan *et al.* beschreiben, dass in ADAMTS13-defizienten Mäusen Leukozyten verstärkt an den Venen „entlangrollen“ (siehe Kap. 2.2.1) und bei Entzündungen die Leukozytenadhäsion an Gefäßwänden erhöht ist.^[61] Zudem führte die Thioglykolat-induzierte Peritonitis oder Hautbeschädigung zu einer verminderten Einwanderung von PMN, die abhängig von vWF ist. Dass ADAMTS13-Defizienz zu größeren Herzinfarkten führt und durch Gabe von rekombinantem ADAMTS13 wieder reduziert werden kann, wurde in einem Mausmodell gezeigt.^[62] Die Verabreichung von rekombinantem ADAMTS13 führt zudem zu einer starken Reduzierung von PMN, die in das entzündete Infarktgewebe einwandern, was auf potenzielle antiinflammatorische Effekte vom ADAMTS13 hindeutet.

2.4 Die Entzündungsreaktion und ihre Auflösung

Nach Aktivierung der angeborenen Immunantwort kontrolliert diese das Wachstum und Abtöten von Mikroben. Dabei kommt es zu einigen Nebeneffekten, die zusammenfassend als Entzündung bezeichnet werden und meistens zu Gewebeschäden führen. Die dabei von toten oder beschädigten Zellen freigesetzten zytoplasmatischen und Zellkernbestandteile aktivieren gewebeständige Phagozyten wie Makrophagen und induzieren so die Rekrutierung von weiteren Phagozyten wie PMN an den Entzündungsort.^[63] Setzen die PMN dann den Inhalt ihrer intrazellulären Granula wie Cathepsin G und Azurocidin zur Pathogenbekämpfung frei, so wird gleichzeitig die Einwanderung von Monozyten eingeleitet.^[64] Durch sekretierte Proteinase 3 werden zudem Endothelzellen zur Ausschüttung von CCL2 angeregt, welches ebenfalls die Rekrutierung von Monozyten bewirkt.^[65]

Wird ein Erreger nicht vom Immunsystem beseitigt, so kann dieser sich über den Blutkreislauf im Körper verbreiten und dadurch eine systematische Entzündung verursachen. Derartige Entzündungsreaktionen werden klinisch in systemisches, inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) und Sepsis (Blutvergiftung) untergliedert und können über

einen septischen Schock zum multiplen Organversagen und Tod des Patienten führen. Zudem führen anhaltende Entzündung zu Gewebeschäden und Erkrankungen wie Arteriosklerose.^[66] Deswegen muss die Entzündungsreaktion aufgelöst und eine Wundheilung eingeleitet werden. So induziert beispielsweise die Aufnahme von apoptotischen PMN durch Makrophagen die Freisetzung von Lipoxinen wie Lipoxin A4. Dieses führt zu einer geringeren Aktivität der PMN, d. h. zu einer verminderten CD11b-Expression, ROS-Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Moleküle. Bei Monozyten und Makrophagen wird dagegen die Transmigration und Phagozytose apoptotischer PMN erhöht und die IL-8-Ausschüttung inhibiert.^[67] Des Weiteren setzen Makrophagen MMP12 frei. Dieses spaltet CXC-Chemokine, die dadurch ihre Funktion zur PMN-Rekrutierung verlieren.^[68] Durch die Ausschüttung von anti-inflammatorischem IL-10 sowie TGF β und PDGF (engl.: *platelet-derived growth factor*) wird dann die Gewebereparatur und Wundheilung initiiert.^[63]

2.5 Pattern-Recognition Receptors (PRRs)

Als PRRs werden unterschiedliche Proteine bezeichnet, die charakteristischen Pathogenmustern, die PAMPs, sowie durch Mikroben oder Stress freigesetzte Zellbestandteile erkennen. PAMPs sind spezifische Moleküle oder Strukturen, die für das Überleben oder die Funktion von Pathogenen essentiell und somit fast nicht veränderbar sind. Dazu gehören beispielsweise bakterielle Kohlenhydrate wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Mannose, bakterielle sowie virale DNA oder RNA, bakterielle Peptide, *N*-Formylmethionin und Glukane von Pilzen. Aus diesem Grund dienen sie verschiedenen Immunzellen als Auslöser einer Entzündungsreaktion.^[69]

Man unterscheidet die PRRs anhand ihrer Struktur und zellulären Lokalisierung.^[69–71] Auf der Zelloberfläche werden die für die Phagozytose wichtigen Scavenger-Rezeptoren sowie C-Typ Lektin-Rezeptoren (CTLRs) und Toll-like Rezeptoren (TLRs, siehe Kap. 2.5.1) exprimiert. Intrazellulär findet man NLRs (siehe Kap. 2.5.2) und RIG-like Rezeptoren (RLRs), der genomische RNA von Viren erkennt. Zudem gibt es noch lösliche PRRs, wie beispielsweise das Mannose-bindende Lektin (MBL), das an bestimmte bakterielle Oberflächenmoleküle bindet und dadurch deren Phagozytose einleitet.

2.5.1 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Der Name TLR stammt vom *toll*-Gen der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) ab, das ursprünglich als Gen bei der Ontogenese identifiziert wurde und zu welchem die TLRs eine hohe Sequenzhomologie aufweisen.^[72] Erst später entdeckte man die Funktion des *toll*-Gens bei der Abwehr von Pilzkrankungen in der Fruchtfliege. 1997 fanden dann Medzhitov *et al.* das erste humane *toll*-Homolog^[73], welches später als TLR4 klassifiziert wurde.

Die TLRs sind Transmembranproteine und erkennen PAMPs über extrazelluläre, sich wiederholende, leucinreiche Motive (LRR, engl.: *leucine-rich repeats*), die sich aus etwa 24 Aminosäuren zusammensetzen und charakteristische hydrophobe Muster aufweisen. Zytoplasmatisch besitzen sie eine Toll-Interleukin-1-Rezeptor-(TIR)-Domäne, welche die intrazelluläre Signalweiterleitung ins Zellinnere über drei Sequenzmotive, Box 1, 2 und 3, vermittelt. Bisher wurden zehn TLRs für den Menschen und zwölf für die Maus identifiziert. Allen TLRs gemein ist deren Dimerisierung nach Aktivierung, wobei außer zwischen TLR2 und 1 bzw. 6 nur Homodimere gebildet werden. Je nach Lokalisierung und PAMP-Erkennung untergliedern sich die TLRs wie folgt: TLR1, 2, 4, 5, 6 und 11 befinden sich auf der Zelloberfläche und erkennen hauptsächlich mikrobielle Membranbestandteile wie Lipide, Lipoproteine und Proteine. TLR3, 7, 8 und 9 werden auf intrazellulären Vesikeln wie Endoplasmatischem Retikulum, Endosom, Lysosom oder Endolysosom exprimiert und erkennen mikrobielle Nukleinsäuren.^[70,74]

LPS, welches auf der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien vorkommt, wird beispielsweise von LPS-bindendem Protein erkannt. Dieses initiiert die Anbindung vom Oberflächenmolekül CD14, das hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird und die Sensitivität von myeloiden Zellen hinsichtlich LPS verstärkt. LPS wird dann durch TLR4 und seinem Kofaktor MD2 über einen multimeren Komplex gebunden. Dieser leitet das erhaltene Signal über die intrazelluläre Rekrutierung von TRIF (engl.: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) oder MyD 88 (engl.: *myeloid differentiation primary response gene 88*) weiter.^[75]

Der MyD88-abhängige Signalweg ist für alle TLRs bis auf TLR3 essentiell, wobei die Anbindung von MyD88 an die TIR-Domäne bei TLR1 und 4 durch TIRAP/Mal vermittelt wird.^[69,70,74,76] MyD88 interagiert dann mit der Serin/Threonin-Kinase IRAK4 (engl.: *interleukin 1 receptor-associated kinases 4*), die dann weitere IRAKs wie IRAK1 und 2 aktiviert. IRAK1 und 4 werden nach ihrer sequentiellen Phosphorylierung

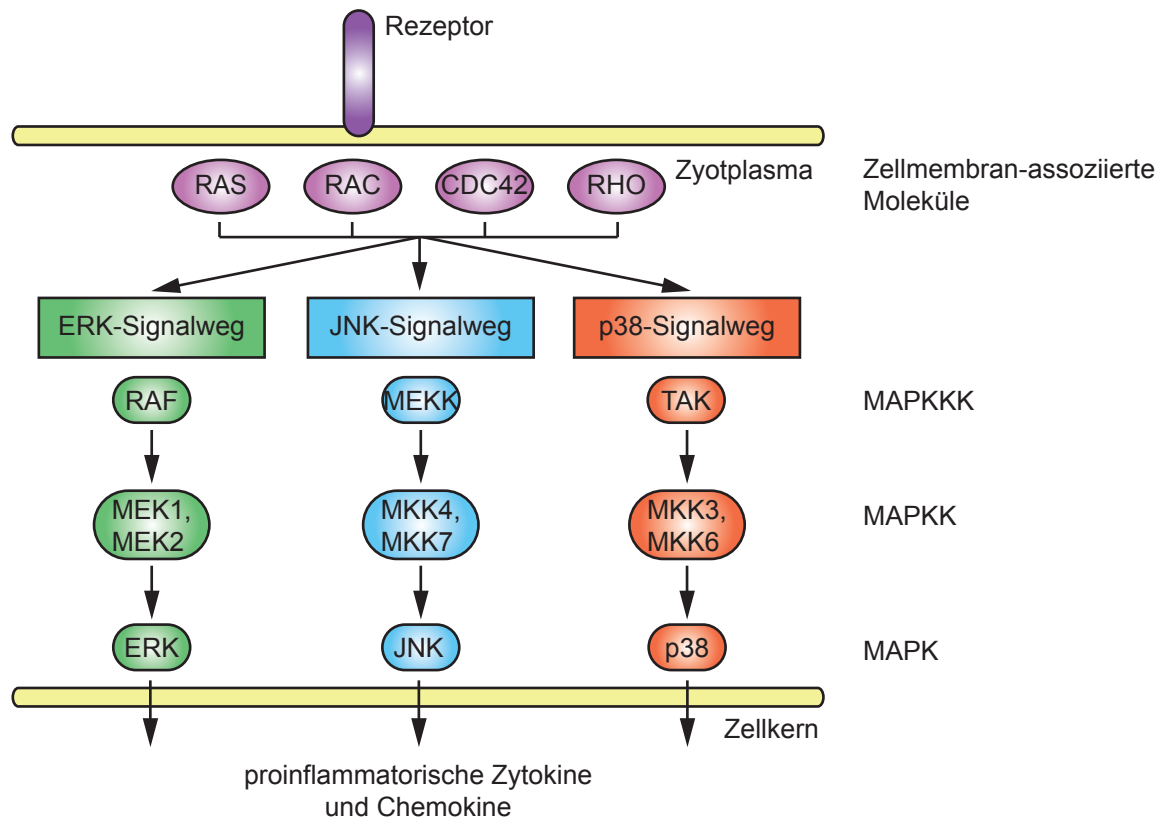


Abbildung 2: Die MAPK-Signalkaskaden. Extrazelluläre Stimuli aktivieren den MAPK-Signalweg (engl.: *mitogen-activated protein kinase*) über GTPasen wie RAS, RAC, CD42 (engl.: *cell-division cycle 42*) oder RHO (RAS-Homolog). So kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) wie RAF, MEKK (MAPK/ERK-Kinase-Kinasen) und TAK (TGF β -aktivierende Kinase). Diese phosphorylieren wiederum MAPK-Kinasen (MAPKK), welche dann die MAPK ERK (engl.: *extracellular-signal-regulated kinase*), JNK (engl.: *c-JUN NH₂-terminal kinase*) und p38-MAPK aktivieren, die dann in den Zellkern translokalisieren und die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren induzieren. (modifizierte Abb. aus Liu *et al.*^[78])

abgespalten. Dadurch können beide an TRAF6 (engl.: *TNF-receptor associated factor 6*) binden und dieses aktivieren. So kommt es zur Aktivierung von NF κ B (engl.: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) und vermittelt über TAK1 zur Aktivierung von MAPKs (engl.: *mitogen-activated protein kinase*). Die MAPK-Kaskade (siehe Abb. 2) besteht aus einer Vielzahl von Proteinkinasen, welche andere Proteine an spezifischen Serin- oder Threonin-Resten phosphorylieren.^[77,78] So aktivieren die MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKKs) die MAPK-Kinasen (MAPKKs), die wiederum die MAPKs via Phosphorylierung aktivieren und dadurch ihre nukleäre Translokation induzieren. Schlussendlich kommt es zur Transkription proinflammatorischer Gene. Zu den bekanntesten MAPKs gehören ERK1 (engl.: *extracellular regulated-signal kinase 1*) und ERK2, die Zellwachstum und Differenzierung regulieren, sowie JNK (engl.: *c-jun NH₂-terminal kinase*) und p38-MAPK, welche vor allem Entzündungen und Apoptose

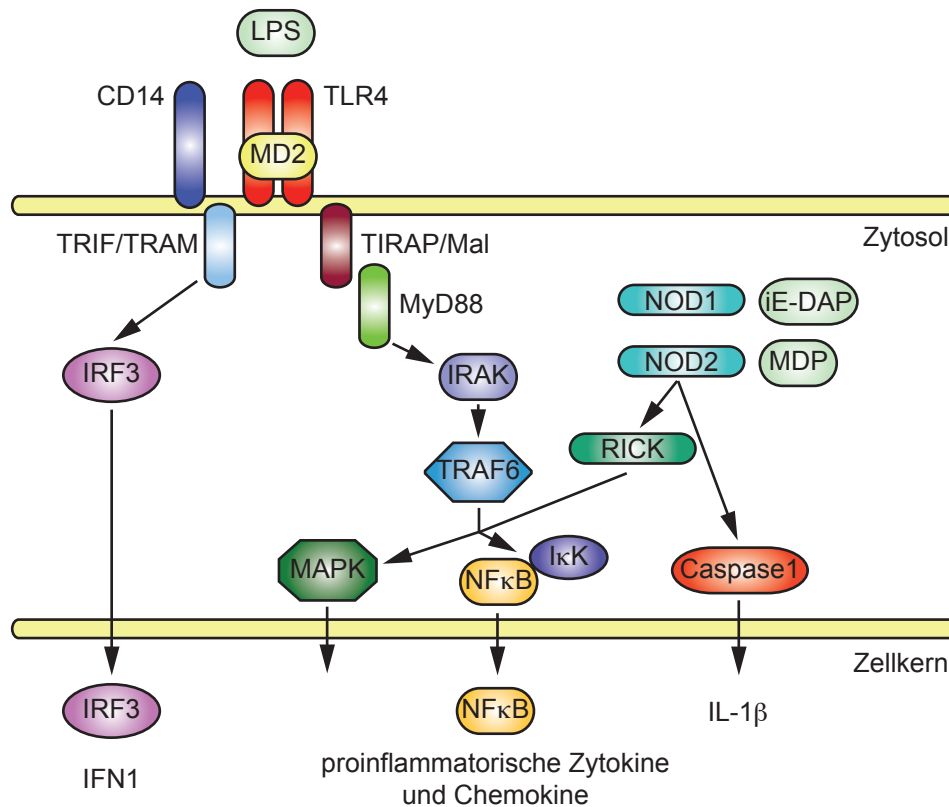


Abbildung 3: Die Signalwege von TLR4 und NOD1/2. LPS bindet an den TLR4/MD2-Komplex und aktiviert dadurch den MyD88- und den TRIF-abhängigen Signalweg. MyD88-abhängig kommt es nacheinander zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von IRAKs (engl.: *interleukin 1 receptor-associated kinases*) und TRAF6 (engl.: *TNF-receptor associated factor 6*). Schlussendlich kommt es zur Aktivierung von verschiedenen MAPKs (engl.: *mitogen-activated protein kinases*) und NFκB, wodurch unterschiedlichste proinflammatorische Zytokine und Chemokine transkribiert und freigesetzt werden. TRIF-abhängig kommt es ebenfalls zur TRAF6-Aktivierung. Zudem wird IRF3 (Interferon-regulierendem Faktor 3) aktiviert, was zur Transkription von IFN1-abhängigen Genen führt. Degradierte Peptidoglykane führen zur NOD1- bzw. NOD2-Rezeptoroligomerisierung. Dadurch kommt es zur Aktivierung von RICK (engl.: **receptor-interacting serine/threonine kinase*), woraufhin der NFκB und verschiedene MAPKs aktiviert werden. Zudem wird über die Procaspase-1 die Transkription von IL-1β initiiert. (modifizierte Abb. aus Strober *et al.*^[82])

kontrollieren. Durch verschiedene Isoformen der genannten Enzyme sowie unterschiedlichste Gerüstproteine kann die Spezifität, Dauer und Amplitude des Signalwegs exakt reguliert werden. NFκB liegt in den meisten Zellen inaktiviert als Dimer aus NFκB und IκB (Inhibitor von κB) vor. Erst durch Phosphorylierung sowie Ubiquitinylierung und dem darauf folgenden Abbau von IκB durch das Proteasom wird NFκB freigesetzt. Dieses translokalisiert dann in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription wichtiger Gene für Entzündung und Immunantwort. Dabei wird unter anderem IκB resynthetisiert, wodurch NFκB erneut inhibiert wird.^[70,74,76]

Der TRIF-abhängige Signalweg führt bei TLR4 vermittelt über TRAM zur Aktivierung

von TRIF, das über TRAF6 und TAK1 die MAPK-Kaskade und über RIP1 NF κ B aktiviert. Außerdem kommt es TRIF-vermittelt zur Phosphorylierung von Interferon-regulierendem Faktor 3 (IRF3), wodurch dieser dimerisiert. Das IRF3-Dimer transloziert anschließend in den Zellkern und führt dort zur Transkription von IFN1-abhängigen Genen.^[70,74,76]

2.5.2 NOD-like Rezeptoren (NLR)

Die beiden NOD-like Rezeptoren NOD1 und 2 gehören zur Klasse der NACHT-LRR-Rezeptoren (NLR)^[79], welche identisch zu den TLRs eine C-terminale LRR-Domäne zur Liganderkennung aufweisen. NLRs weisen zudem eine NOD-Domäne auf. Diese ermöglicht die Selbstoligomerisierung nach Aktivierung und verfügt über eine ATPase-Aktivität. N-terminal fungiert eine CARD- (engl.: *caspase recruitment domain*) oder Pyrin-Domäne zur Signalweiterleitung, wobei NOD1 eine und NOD2 zwei CARD-Domänen besitzt.

Im Gegensatz zu TLRs werden NOD1 und 2 hauptsächlich im Zytosol von Epithelzellen, Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert, wo sie degradierte Peptidoglykane erkennen, die in fast allen Bakterienzellwänden vorkommen. Dabei reagiert NOD1 auf γ -D-Glutamyl-*meso*-Diaminopimelinsäure^[80] und NOD2 auf Muramyl-dipeptid (MDP)^[81], wobei der genaue Mechanismus der Rezeptor-Ligand-Interaktion noch nicht geklärt ist.^[82] In dem von Inohara *et al.*^[83] beschriebenen Modell erfolgt nach Rezeptoroligomerisierung die Anbindung der Serin-Threonin-Kinase RICK (engl.: *receptor-interacting serine/threonine kinase*) über CARD-CARD-Wechselwirkungen, wodurch diese aktiviert wird. Dadurch wird der NF- κ B-Weg sowie der MAPK-Signalweg aktiviert (siehe Kap. 2.5.1). So erfolgt die Phosphorylierung und damit Aktivierung von p38-MAPK, ERK und JNK.^[84,85] Über die Anbindung der Procaspase-1 an NOD2 wird zudem eine Ausschüttung von proinflammatorischem IL-1 β induziert.^[82]

Mutationen vom NOD1- und NOD2-Gen führen zu verschiedenen Erkrankungen. Bei der chronischen Darmerkrankung Morbus Crohn wurde bei 10 bis 15% der erkrankten Patienten eine Mutation des NOD2-Gens gefunden, die zu verminderter NF- κ B-Aktivität nach MDP-Stimulation führt.^[79] Erfolgen Mutationen in der NOD-Domäne, kann es zu granulomatösen Entzündungen wie dem Blau-Syndrom kommen, welche durch entzündungsbedingte, knotenartige Gewebeneubildungen charakterisiert sind. Die chronischen Entzündungen beim Blau-Syndrom werden durch eine NOD2-Rezeptoroligomerisierung und NF- κ B-Aktivierung in Abwesenheit vom Stimulus MDP verursacht.^[86]

2.6 Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1)

Die TREM- und TREM-like Rezeptorfamilie gehört zur Immunoglobulinsuperfamilie und beinhaltet hauptsächlich auf myeloiden Zellen exprimierte Oberflächenmoleküle, welche die Aktivierung und Differenzierung der Zellen modulieren^[87–89]. Gemeinsam ist allen eine einzelne Immunoglobulindomäne vom V-Typ. Als erster Rezeptor der TREM-Familie wurde TREM-1 im Jahre 2000 von Bouchon *et al.* ^[90] beschrieben. TREM-1 wird hauptsächlich auf humanen PMN und CD14⁺ Monozyten exprimiert.^[90,91] In der Maus wurde eine TREM-1-Expression auf PMN, CX3CR1^{high} Monozyten und auf aus Knochenmarkszellen differenzierten Dendritischen Zellen (BMDCs, engl.: *bone marrow-derived dendritic cells*) gezeigt.^[92] TREM-2 konnte auf Mikrogliazellen, Osteoklasten, Monozyten und Dendritischen Zellen identifiziert werden und TREM-3 auf Makrophagen. Von den TLTs (engl.: *TREM-like transcripts*) wird TLT1 von Thrombozyten und TLT2 von B-Zellen, PMN und Makrophagen exprimiert.^[88]

Das 30 kDa große Glykoprotein TREM-1 ist ein wichtiger Mediator bei mikrobiellen Infektionen und Sepsis.^[93,94] So wurde eine erhöhte TREM-1-Expression bei Patienten mit bakteriellen und Pilz-Infektionen gefunden.^[93] Erst kürzlich wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass TREM-1/3 eine entscheidende Rolle bei der Transmigration von PMN in mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Lungen spielt.^[95] In Mausmodellen für septischen Schock resultierte die Blockierung der TREM-1-Signalweiterleitung in einer verminderte Letalität.^[93,96] Die Blockierung erfolgte durch Verabreichung der löslichen TREM-1-Ektodomäne, die die TREM-1-Aktivierung durch Abfangen des Liganden verhindert oder des synthetischen Peptides LP17. Dieses ist analog zu einer konservierten Struktur der TREM-1-Ektodomäne bei Mensch und Maus und verhindert die Anbindung des Liganden an TREM-1 durch kompetitive Hemmung der Ligand-Rezeptorwechselwirkungen und/oder Inhibierung die Rezeptordimerisierung.^[96–98] Der exakte Ligand für TREM-1 ist jedoch bisher unbekannt. Es gibt aber Hinweise, dass der Ligand auf Thrombozyten lokalisiert sein könnte^[99] oder auf PMN während Endotoxämie^[98]. Zudem wurde bei Versuchen mit Marburg und Ebola eine TREM-1-abhängige PMN-Aktivierung nachgewiesen, die eine TREM-1-Ligand-Expression auf Filovieren vermuten lässt.^[100] Auch wurde die Anwesenheit von TREM-1-Liganden im Serum von einigen septischen Patienten^[101,102] oder in Lysaten von nekrotischen Zellen beschrieben^[103].

Neben dem membranständigen TREM-1 wurde in bronchoalveolären Lavagen und im Serum von Patienten lösliches TREM-1 (sTREM-1) gefunden, was bei Individuen ohne Infektion

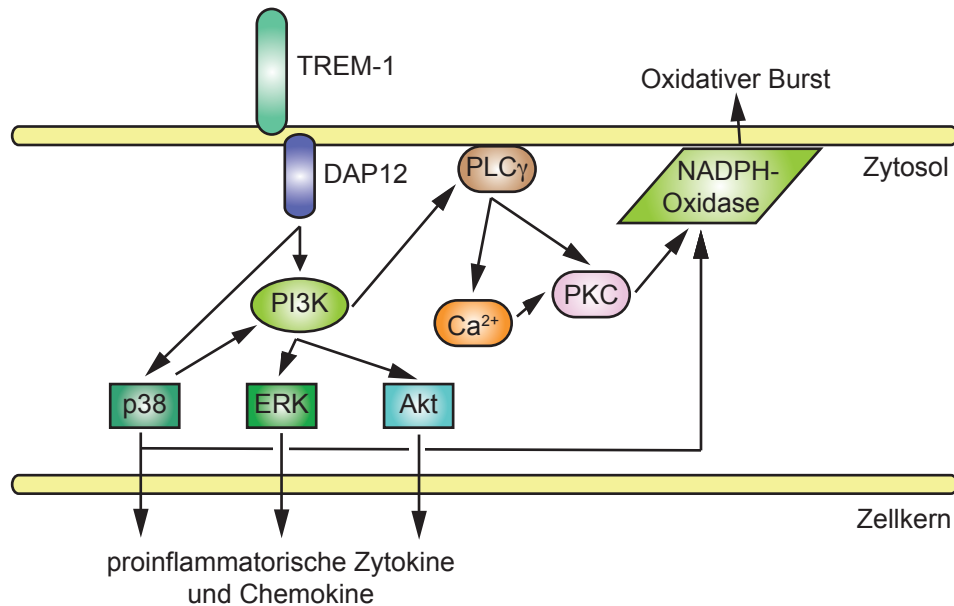


Abbildung 4: Die Signaltransduktion von TREM-1 (engl.: *triggering receptor expressed on myeloid cells 1*). Nach Rezeptordimerisierung kommt es DAP12-vermittelt zur Aktivierung von Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3K) und p38-MAPK (engl.: *p38 mitogen-activated protein kinases*). Diese initiieren die Aktivierung von ERK1/2 (engl.: *extracellular-signal-regulated kinase 1/2*) und Akt, die nach Translokation in den Zellkern verschiedene proinflammatorische Gene transkribieren. Die Aktivierung von PLC γ (Phospholipase C γ) initiiert über Ca²⁺ und PKC (Proteinkinase C) den oxidativen Burst. (modifizierte Abb. aus Haselmayer *et al.*^[109])

nicht nachweisbar ist.^[96,104,105] Somit könnte es zukünftig als guter Indikator bei der Diagnose von bakteriellen oder Pilz-Infektionen dienen. Für den Ursprung dieses sTREM-1 gibt es zwei unterschiedliche Theorien: es könnte durch Translation alternativer mRNA-Splicevarianten oder durch proteolytische Abspaltung (Shedding) von membranständigem TREM-1 entstehen.^[106,107]

Humanes TREM-1 setzt sich aus einer Ektodomäne, einer Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Teil ohne Signalmotive zusammen. An einem positiv geladenen Abschnitt der Transmembranregion assoziiert das Signaladaptermolekül DAP12, das die Signalweiterleitung ins Zellinnere über sein ITAM-Motiv (engl.: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) vermittelt.^[90] Durch Rezeptordimerisierung und -aktivierung mittels agonistischen Antikörpern wird im ITAM-Motiv von DAP12 ein Tyrosinrest von Src-Kinasen phosphoryliert, wodurch die Tyrosinkinase Syk anbinden kann. Diese phosphoryliert und aktiviert die Proteine Lat und NTAL.^[108] Dadurch werden weitere Signalmoleküle rekrutiert und aktiviert, wie beispielsweise Phospholipase C γ (PLC γ) und die MAP-Kinase ERK1/2.^[108-110] Zudem wird ein schneller Einstrom von Ca²⁺

induziert.^[90] In PMN werden zudem der Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Weg^[109,111], Janus-Kinase 2 und die Transkriptionsfaktoren Stat3 und 5 (engl.: *signal transducers and activators of transcription*) aktiviert.^[110] Von Ormsby *et al.* wurde zudem durch Verwendung einer monozytären Zelllinie, die TREM-1 und DAP12 nach Transfektion exprimierten, gezeigt, dass die Bruton-Tyrosin-Kinase (Btk) der Tec-Familie ein weiterer Regulator in der TREM-1-Signaltransduktion ist.^[112] Dies führt schließlich zur Aktivierung aller PMN-Effektorfunktionen wie dem oxidativen Burst, Phagozytose, Degranulierung und Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-8, MCP-1 oder Myeloperoxidase.^[90,113] In Monozyten kommt es zur Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle wie CD86, zur Ausschüttung der inflammatorischen Chemokinen MCP-1, MCP-3, MIP-1 α und IL-8 sowie der Zytokine TNF α und IL-6.^[90,91]

2.7 Pilze

Pilze (lat.: *fungus*) gehören zu den Eukaryoten und untergliedern sich in Einzeller, zu denen beispielsweise Hefen gehören, und Hyphen- bzw. Myzelpilze. Letztere besiedeln ein Substrat, wie z.B. den Erdboden, Holz oder organisches Gewebe, und bilden darin ein Geflecht aus mikroskopisch kleinen Fäden, den Hyphen. Diese weisen in regelmäßigen Abständen, quer zur Hyphe verlaufende Septen (Scheidewände) auf, die der Stabilität dienen und die über Poren ihr Zytoplasma austauschen können. Zudem bilden Hyphen Verzweigungen, wodurch ein stark verästeltes Netzwerk, das Myzel, entsteht. Die Vermehrung der Pilze kann geschlechtlich oder ungeschlechtlich durch Konidien (Sporen) erfolgen sowie vegetativ, d. h. durch Zellteilung.^[114,115] Konidien stellen dabei die häufigste Verbreitungsform vieler Hyphenpilze dar. Bei der asexuellen Vermehrung bilden sich vertikal vom Myzel abzweigende Stammzellen, an deren Spitze die Phialiden ausdifferenzieren. An dessen freien Enden werden kontinuierlich, kugelförmige 2 bis 3 μm große Abschnürungen gebildet, die Sporen. Die so entstehenden, langen Konidienketten, bei denen die jeweils jüngste Konidie der Phialide am Nächsten steht, können durch einen Luftstrom leicht weggeweht werden und sich so gut in der Umwelt verteilen. In dieser erfüllen Pilze unterschiedlichste Funktionen. Sie sind neben den Bakterien die wichtigsten Saprobionten, die organischen Abfall sowie abgestorbene Pflanzen und Tiere zersetzen können. Da sie auch lebendes Material besiedeln, können sie als Parasiten vor allem wirtschaftlich wichtige Nutzpflanzen schädigen.^[116–118] Zudem sind Pilze in der Lage, Pflanzenwurzeln mit ihren Hyphen zu umschlingen und dadurch die Nährstoffaufnahme der Pflanzen zu verbessern. Über diese

Art der Symbiose fördern die Pilze 80 bis 90 % des Pflanzenwachstums.^[119–121]

2.7.1 *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*)

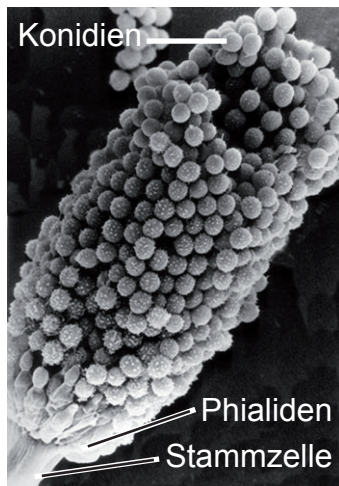


Abbildung 5: *A. fumigatus* (aus Krappmann *et al.*^[124]).

A. fumigatus ist ein weit verbreiteter, aerob lebender Saprobiont und gehört zur Gattung der Gießkannenschimmelpilze (*Aspergillus*).^[122] Durch seinen vielseitigen Metabolismus kann er auf verschiedenen, bevorzugt kohlenhydratreichen Substraten wachsen. So findet man *A. fumigatus* weit verbreitet auf verrottendem Pflanzenmaterial, im Erdreich und auf stärkehaltigen Nahrungsmitteln wie Brot und Kartoffeln.^[123] Durch die Nutzung von Salz- und Stickstoffverbindungen als Energiequellen kann er auch sehr unwirtliche Umgebungen besiedeln.^[124–126] Zusätzlich und im Gegensatz zu vielen anderen Pilzen weist *A. fumigatus* eine hohe Thermotoleranz auf, da er Temperaturen bis zu 75 °C überlebt und in der Lage ist, bei Temperaturen bis 55 °C zu wachsen.^[125,127] D. h. *A. fumigatus* kann bei der normalen Körpertemperatur von 37 °C optimal wachsen, was ihn von anderen, nicht pathogenen *Aspergillus*-Arten unterscheidet.

2.8 Pilzinfektionen

Wie bereits beschrieben (siehe Kap. 2.7), können sich Pilzsporen relativ einfach über die Luft verbreiten, wobei die Konidienkonzentration in der Luft je nach Studie zwischen 0,2 bis 15 Konidien/m³ schwankt.^[128] In einigen Bereichen wie beispielsweise Komposthaufen sind sogar über 10⁶ Konidien/m³ nachweisbar.^[129] So ist jeder Mensch täglich in Kontakt mit Pilzsporen und atmet hunderte von ihnen ein, weswegen Pilzinfektionen vor allem im respiratorischen System und auf der Haut auftreten. Normalerweise werden die Konidien vom Immunsystem erkannt und abgetötet.^[118,130] Erfolgt dies nicht, können sich extrem schwierig zu behandelnden Erkrankungen, Mykosen genannt, entwickeln, bei denen auch Hyphenwachstum beobachtbar ist.

Von den über 180 bekannten *Aspergillus*-Arten verursacht *A. fumigatus* die häufigsten humanen Erkrankungen, gefolgt von *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* und *A. terreus*.^[131] Je nach Ausmaß und Art der Infektion unterscheidet man unterschiedliche *Aspergillus*-Erkrankungen, die im Folgenden kurz skizziert werden.

2.8.1 Allergische Bronchopulmonare Aspergillose (ABPA) und Asthma

ABPA ist eine Hypersensitivität gegenüber *Aspergillus* in Patienten, die bereits an Asthma oder Zystischer Fibrose (Mukoviszidose) leiden.^[132–134] Durch bronchiale Kolonisierung dieser Patienten kommt es zu einer verstärkten Bildung spezifischer Antikörper gegen *Aspergillus*, wodurch eine starke Entzündungsreaktion induziert wird. So entstehen die zur Diagnostik der ABPA wichtigen Hauptkriterien: (1) Asthma oder Zystische Fibrose in Verbindung mit einer Schädigung der Lungenfunktion, (2) Sofortreaktion im Hauttest gegen *Aspergillus*, (3) erhöhtes IgE-Level im Blut (über 1000 ng/ml), (4) vermehrte Antikörper gegen *Aspergillus*-Antigene und (5) per Röntgenuntersuchung nachweisbare Infiltration des Thorax.^[134]

Der Kontakt mit *Aspergillus* kann in seltenen Fällen auch Asthma auslösen, d. h. es kommt zur chronischen Entzündung der Atemwege mit dauerhafter Überempfindlichkeit gegen *Aspergillus*.^[135]

2.8.2 Aspergillom

Beim Aspergillom kommt es zur *Aspergillus*-Kolonisierung von Nasennebenhöhle oder Lunge.^[136,137] Verursacht wird dies durch das Aussprossen eingeatmeter Konidien in Hohlräumen, die z.B. nach überstandenen Tuberkuloseinfektionen oder Nasennebenhöhlenentzündungen auftreten. Dadurch bildet sich ein Pilzball, der sich aus Pilzmyzelien, inflammatorischen Zellen, Fibrinschleim und abgebautem Gewebe zusammensetzt.^[136] Das Wachstum ist dabei meist nicht invasiv, d. h. die Hyphen dringen nicht in das umliegende Gewebe ein, wodurch ein Aspergillom über Jahre ohne jegliche Symptomatik auftreten kann. Die größten Komplikationen beim Aspergillom stellen Lungenblutungen durch Zerstörung angrenzender Blutgefäße dar, was letztendlich zur Diagnose führt. Letztere ist relativ einfach, da ein Lungenaspergillom gut im Röntgenbild zu erkennen ist. Außerdem weisen Aspergillompatienten hohen Konzentrationen an *Aspergillus*-Antikörpern auf.^[136,137]

2.8.3 Invasive Aspergillose (IA)

Bei der IA kommt es durch eine fehlende Immunantwort gegen eingedrungene *Aspergillus*-Konidien zum fast ungehindertem Wachstum des Pilzes.^[138] Betroffen davon sind meist die Lunge und die Nasennebenhöhlen. Bei fortschreitender Invasivität gelangen dann Hyphenfragmente in die Blutbahn und verteilen sich dadurch systemisch im

ganzen Organismus, was zu einer Sepsis führen kann. Dadurch reduzieren sich die Heilungschancen drastisch.^[138] Die fehlende Immunantwort kann durch genetische oder krankheitsbedingte Defekte von Immunzellen, wie sie beispielsweise bei CGD- oder AIDS-Patienten auftreten, oder durch eine immunsuppressive Therapie verursacht werden. So führen neuere, intensivere Chemotherapien bei verschiedenen Krebserkrankungen und der vermehrte Einsatz von Immunsuppressionsverfahren bei Autoimmunerkrankungen zu einer wachsenden Anzahl an immunsupprimierten Patienten. Verstärkt wird dies durch die steigende Anzahl an Organtransplantationen, bei der die Patienten zur Vermeidung von Transplantatabstoßungen mit Immunsuppressiva behandelt werden.^[139–141] Dies und die effizientere Behandlung von Bakterieninfektionen durch neue Antibiotika und verbesserte stationäre Behandlungen führten dazu, dass IA eine Haupttodesursache insbesondere bei Leukämitherapien und Knochenmark- sowie Organtransplantationen ist.^[137,139–141]

2.8.4 Pulmonale Pilzinfektionen und das Immunsystem

Werden *Aspergillus*-Konidien eingeatmet, so erfolgt die erste Abwehrreaktion über die geordnete Tätigkeit des mehrreihigen respiratorischen Epithels, das den größten Teil der Atemwege auskleidet. Dieses Epithel reinigt die Atemwege, indem es Schleim und darin immobilisierte Teilchen von der Lunge weg zum Rachenraum befördert, von wo aus diese dann abgehustet oder abgeräuspert werden.^[142]

Erreichen Konidien trotzdem die Lunge, treffen sie dort auf Phagozyten wie Alveolarmakrophagen, PMN und Dendritische Zellen.^[143] Diese erkennen pathogene Pilze über PRRs anhand unterschiedlicher Bestandteile der Pilzoberfläche. Die Struktur dieser Oberfläche variiert dabei je nach Morphotyp, Wachstumsstadium und Umgebung stark und untergliedern sich prinzipiell in β -Glukane, Chitine oder Mannane.^[144] Phagozyten können beispielsweise pathogene von nicht pathogenen Hefen über Galectin-3 unterscheiden, der β -(1,2)-linked Oligomannoside erkennt.^[145,146] Von zentraler Bedeutung bei der Pilzerkennung sind zudem die CLRs wie Dektin-1 und -2, Mincle, DC-SIGN, Langerin und MBL. Am besten untersucht ist Dektin-1, das nach Erkennung von β -Glukanen die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen induziert. Dafür ist die Aktivierung von Syk, CARD9 und NF κ B essentiell.^[147] So resultieren genetische Defekte von Dektin-1 oder CARD9 in einer erhöhten Pilzinfektionsrate.^[148–150] Dektin-2 bindet an sogenannte High-Mannose-Strukturen und aktiviert wie Mincle über Fc-Rezeptoren die Freisetzung von proinflammatorischen Molekülen.^[118,130] Auch über TLR2, 4 oder 9 können

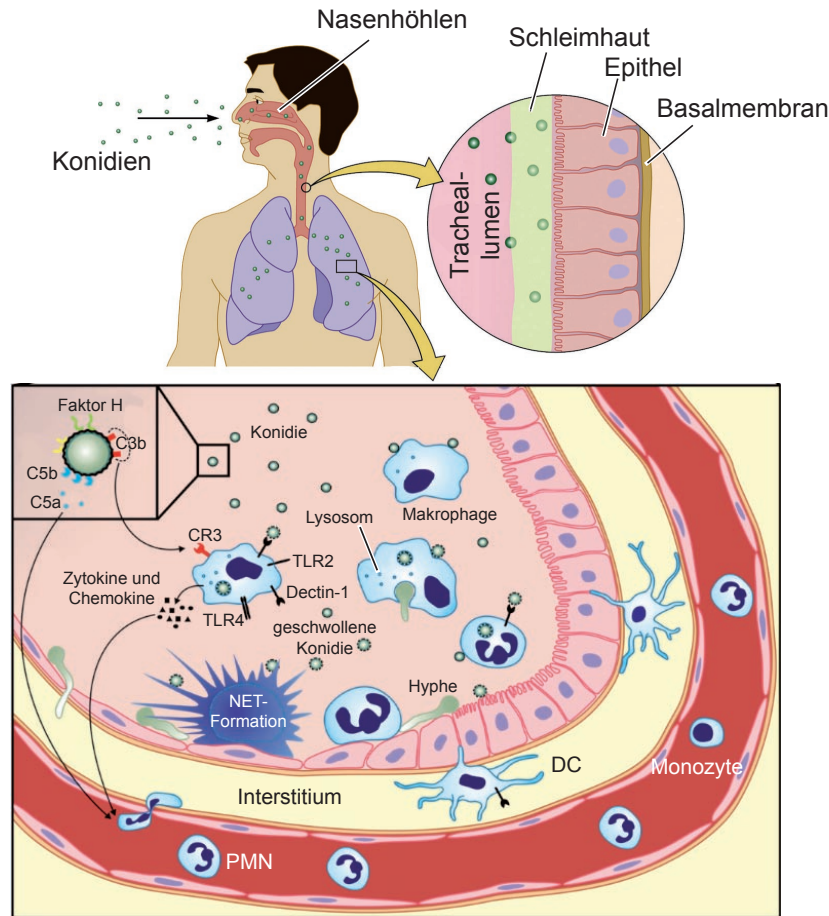


Abbildung 6: Die Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen. Eingeatmete Pilzkonidien und ausgesprossene Hyphen werden von Alveolarmakrophagen, PMN und Dendritischen Zellen (DC) über Dectin-1, TLR2 und 4 erkannt und anschließend phagozytiert. Durch Aktivierung der Komplementkaskade werden Konidien mit C3b und C5b opsoniert und das Anaphylatoxin C5a wird freigesetzt. So erkannte Pilze werden dann durch die unterschiedlichen Effektormechanismen der Phagozyten abgetötet. So wird in PMN der oxidative Burst, die Degranulation und die NET-Freisetzung induziert. Durch Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen wird zudem eine Entzündungsreaktion initiiert, wodurch weitere Immunzellen rekrutiert werden. (Abb. modifiziert aus Park *et al.*¹³⁵ und Brakhage *et al.*¹⁴³)

Phagozyten Pilzbestandteile wie Zymosan, Phospholipomannane, *O*-linked Mannane oder Pilz-DNA erkennen, wobei die exakte physiologische Rolle der einzelnen TLRs Gegenstand aktueller Forschung ist.^[130,151] Von Bellocchio *et al.* wurde gezeigt, dass das für die TLR-Signalweiterleitung wichtige Adaptermolekül MyD88 (siehe Kap. 2.5.1) essentiell bei der Abwehr von Infektionen mit *A. fumigatus* oder *Candida albicans* ist.^[152] In PMN wird die pilzabhängige Ausschüttung von ROS und Granulaproteinen über TLR2, 4 und 9 vermittelt, wobei deren Aktivierung und Intensität je nach Pilzspezies, Morphotyp und Infektionsroute variiert. Humane Studien konnten zudem eine Verbindung zwischen einem Polymorphismus in TLR4 und einer erhöhten Aspergillosisrate herstellen.^[153,154] Neben der Erkennung über

Oberflächenrezeptoren binden auch lösliche Rezeptoren an Konidien und Hyphen und leiten so deren Opsonierung ein. Die Surfactantproteine A und D unterstützen die Agglutination von Konidien und steigern deren Phagozytose und Abtötung durch PMN.^[155] Monozyten, PMN und Dendritische Zellen sekretieren Pentraxin 3 in Anwesenheit von Konidien. Dieses bindet an Galaktomannan auf *Aspergillus*-Konidien und fördert dadurch die Erkennung von Effektorzellen.^[156] Pentraxin 3 ist auch auf von PMN ausgeschütteten NETs zu finden, wo es ein nicht redundantes Molekül bei der PMN vermittelten *A. fumigatus*-Resistenz ist.^[157] *Aspergillus*-Konidien induzieren zudem die Aktivierung der Komplementkaskade. So führt die Opsonierung mit den Komplementmolekülen C3b oder C5a zur verbesserten Erkennung durch Phagozyten.^[158,159] Zudem werden Anaphylatoxine wie C5a freigesetzt, die chemoattraktive, proinflammatorische und antimikrobielle Eigenschaften aufweisen^[160]. Die Erkennung von Pilzen induziert die Aktivierung von Phagozyten, die dann über ihre unterschiedlichen Effektormechanismen die eingedrungenen Pilze bekämpfen (siehe Kap. 2.2.1 und 2.2.2). So setzen Alveolarmakrophagen und PMN ROS und reaktive Stickstoffintermediate frei.^[161,162] Genetische Störungen des oxidativen Burst, wie in CGD-Patienten, führen zur IA.^[24,163] Entsprechende Resultate wurden auch im Mausmodell mit gp91^{phox} ^[164] und p47^{phox} ^[163] defizienten Mäusen gezeigt. Viele PMN-Granulaproteine besitzen ebenfalls fungizide Wirkungen wie beispielsweise Defensive, Lysozym und Lactoferrin.^[165,166] Die Proteinase Cathepsin G und neutrophile Elastase sind für eine *A. fumigatus*-Abwehr ebenfalls unverzichtbar, wie durch intravenöse (i.v.) Infektion mit *A. fumigatus* von Cathepsin G und neutrophiler Elastase defizienten Mäusen gezeigt wurde.^[168] Neben der direkten Pilzbeseitigung rekrutieren Alveolarmakrophagen über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie G-CSF und GM-CSF^[169], humanem IL-8, murinem KC oder MIP2 α ^[170,171] weitere PMN aus dem Blut, da diese für die Beseitigung von Pilzinfektionen essentiell sind.^[172] Aktivierte Dendritische Zellen stimulieren zudem T-Zellen, wobei es insbesondere über IL-12 zur Aktivierung von T-Helferzellen kommt^[173]. Diese setzen verschiedene, proinflammatorische Zytokine frei und induzieren die Produktion von spezifischen Antikörpern.^[118]

Um die Erkennung durch das Immunsystem und somit ihre Abtötung zu unterbinden, entwickelten Pilze verschiedene Strategien.^[174] So maskiert *Candida albicans* im Hyphenstadium sein β -(1,3)-Glukan, wodurch eine Erkennung über Dektin-1 nicht mehr möglich ist. *A. fumigatus*-Konidien weisen Hydrophobine und Melanin auf, was eine Erfassung durch das Immunsystem erschwert.^[175] Durch Anbindung von inhibitorischen

Molekülen der Komplementkaskade wie Faktor H versuchen *A. fumigatus*-Konidien die Aktivierung dieser zu unterbinden.^[176] Zudem exprimieren viele Pilze CR3, über den sie die Entzündungsreaktion abmildern oder unterbinden können.^[177] Zusätzlich sekretieren Pilze Mykotoxine wie das Alkolidderivat Gliotoxin, die immunsuppressiv wirken können.^[178] Gliotoxin inhibiert beispielsweise die für den oxidativen Burst notwendige NADPH-Oxidase^[179] und vermindert die Phagozytoseaktivität von PMN^[180]. Zudem synthetisieren manche Pilze Oxidasen wie Katalasen und Superoxiddismutasen, um vor allem die zytotoxischen ROS abzubauen.^[181,182]

3 Zielsetzung

TREM-1 wird von primären PMN und Monozyten exprimiert. Ligation mit einem stimulierenden Antikörper induziert unterschiedliche Effektorfunktionen, wie den oxidativen Burst und Degranulation von PMN sowie Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und Zytokinfreisetzung von Monozyten. Haselmayer *et al.* zeigten zudem die essentielle Rolle der Kinasen PI3K und p38-MAPK bei der TREM-1-Signalweiterleitung in PMN, wobei beide unabhängig voneinander reguliert werden. Eine entsprechende Analyse in Monozyten fehlt allerdings. Deswegen wurde nach einer monozytären Zelllinie gesucht, die TREM-1 exprimiert. Dadurch sollten spenderabhängige Diskrepanzen und Artefakte von ektopischer Rezeptorexpression vermieden werden, die bei Experimenten mit primären Zellen auftreten können. Außerdem war eine vergleichende Analyse der monozytären und neutrophilen TREM-1-Signaltransduktion Ziel der vorliegenden Arbeit.

Eine Haupttodesursache bei Leukämitherapien und Knochen- sowie Organtransplantationen ist die Infektion mit *A. fumigatus* mit einer Mortalitätsrate von über 50 %. Um den Einfluss verschiedener PMN-Funktionen bei der Abwehr von *A. fumigatus*-Infektionen zu analysieren, sollte ein Mausmodell für invasive Aspergillose etabliert werden. Dabei konnte durch Verwendung der NADPH-Oxidase-defizienten $p47^{\text{phox-/-}}$ und $gp91^{\text{phox-/-}}$ Mäuse der Einfluss von oxidativen PMN-Effektorfunktionen quantifiziert werden. Die Defizienz von neutrophiler Elastase als prototypische Serinprotease der azurophilen PMN-Granula und exemplarische nicht oxidative Effektorfunktion wurde mittels ELANE Mäuse untersucht. Zudem wurde der Einfluss des Argininmetabolismus durch selektive Arginindepletion mittels Arginindeiminase und die Auswirkung von ADAMTS13-Defizienz durch ADAMTS13^{-/-} Mäuse eruiert.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien, Stimulanzen und Kits

Ammoniumperoxodisulfat (Fluka)	LPS von <i>Salmonella typhimurium</i>
anti-Maus F(ab') ₂ (dianova)	(Sigma-Aldrich)
Acrylamid (Carl Roth)	LY294002 (Cell Signaling)
Bactoagar (Difco)	MTri-DAP (InvivoGen)
BSA (Fluka)	MnCl ₂ x 4 H ₂ O (Acros)
Bromphenolblau (Carl Roth)	Methanol (Carl Roth)
CoCl ₂ x 6 H ₂ O (Carl Roth)	β-Mercaptoethanol (Gibco)
Complete Protease Inhibitor (La Roche)	Milchpulver (Carl Roth)
CHAPS (Carl Roth)	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O (Sigma Aldrich)
CuSO ₄ x 5 H ₂ O (Fluka)	Natriumcitrat (Carl Roth)
DCFH-DA (Sigma Aldrich)	Natriumorthovanadat (Sigma Aldrich)
DHR-123 (Molecular Probes, Invitrogen)	Natriumpyruvat (Serva)
DTT (Carl Roth)	NaCl (Carl Roth)
EDTA (Carl Roth)	Natriumfluorid (Signal Aldrich)
FeSO ₄ x 7 H ₂ O (Sigma Aldrich)	NaH ₂ PO ₄ (Carl Roth)
10% Formalin (Carl Roth)	NaN ₃ (Merck)
f-MLP (Sigma-Aldrich)	NH ₄ Cl (Carl Roth)
L-Glutamin (Gibco)	Pam ₃ Cys (EMC Microcollections)
GM-CSF (LABGEN/Natutec)	Penicillin (Serva)
Glukose (Merck)	PMA (Sigma-Aldrich)
Glycerol (Carl Roth)	PMSF (Sigma Aldrich)
H ₃ BO ₃ (Carl Roth)	PI (Fluka)
Harnstoff (Carl Roth)	R-848 (InvivoGen)
Heparin (Rotexmedica)	Rompun 2% (Bayer Health Care)
KCl (Carl Roth)	SB203580 (Tocris)
Ketamin (Ratiopharm)	SDS (Carl Roth)
Koenzym Q ₀ (Sigma Aldrich)	Streptomycin (Serva)
KHCO ₃ (Sigma Aldrich)	TEMED (Carl Roth)
KH ₂ PO ₄ (Carl Roth)	Thioharnstoff (Carl Roth)
LAL-Test (Pierce)	Tris (Carl Roth)

Triton X-100 (Carl Roth)	Western Lightning Chemiluminescence
Trypanblau (Carl Roth)	Detection-Kit femto (Pierce)
Tween-20 (Sigma Aldrich)	XTT (Sigma Aldrich)
Western Lightning Chemiluminescence Detection-Kit (Pierce)	ZnSO ₄ x H ₂ O (Sigma Aldrich)

4.2 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Iscove's Medium (Invitromex) wurde als Pulver bezogen, gelöst und vor Gebrauch ebenso wie PBS (engl.: *phosphate buffered saline*) und ACK-Puffer steril filtiert (0,22 µm). Das fetale Kälberserum (FCS, engl.: *fetal calf serum*, Invitromex) wurde 45 min bei 56 °C hitzeinaktiviert und vor Gebrauch 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert.

ACK-Puffer: 0,1 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat), 1 mM KHCO₃ und 150 mM NH₄Cl in destilliertem (dest.) Wasser, pH 7,3.

Aspergillus Minimalmedium (AMM): 30 g Bactoagar, 1 % (w/v) Glukose, 2 mM MgSO₄, 20 ml 50x AMM-Zusätze und 1 ml Hunters Spurenelementlösung gelöst in 1 l dest. Wasser und anschließend autoklaviert.

50x AMM-Zusätze: 297,47 g/l NaNO₃, 26,1 g/l KCl und 74,85 g/l KH₂PO₄ in dest. Wasser, pH 5,5.

EDTA-Puffer: 0,5 M EDTA in PBS, pH 7,2

ELISA-Blockpuffer: PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween-20.

FACS-Puffer: PBS mit 0,5 % BSA, 5 mM EDTA und 0,01 % NaN₃.

Harnstoff-Lysepuffer: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 5 mM DTT und 2 % CHAPS in dest. Wasser.

Hunters Spurenelementlösung (HSL): 0,22 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O in 5 ml dest. Wasser lösen (HSL1). 2,75 g ZnSO₄ x H₂O, 2,2 g H₃BO₃, 1 g MnCl₂ x 4 H₂O, 0,32 g CoCl₂ x 6 H₂O und 0,32 g CuSO₄ x 5 H₂O in 75 ml dest. Wasser lösen und mit 5 ml HSL1 vereinigen (HSL2). 1 g FeSO₄ x 7 H₂O und 10 g EDTA in 80 ml dest. Wasser lösen, pH 5,5

(goldgelbe Lösung, HSL3). HSL2 und HSL3 vereinen, pH auf 6,5 einstellen und auf 200 ml Gesamtvolumen auffüllen, wobei eine hellgrüne Lösung entsteht, die sich bei Lagerung (8 °C im Dunkeln) lila färbt.

Ketamin/Rompun: Eine Ampulle Ketamin (ca. 2 ml) wurde zu 0,8 ml Rompun 2 % gegeben. Dieser Stock wurde vor Benutzung 1:5 in PBS verdünnt.

MACS-Puffer: PBS mit 1 % FCS und 2 mM EDTA.

MUTZ-3-Medium: MEM α mit Ribo- und Deoxyribonukleosiden (Gibco) mit 20 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 100 IE/ml Penicillin und 100 μ /ml Streptomycin.

Nicoletti-Puffer: 50 mg/ml PI, 0,1 % Natriumcitrat und 0,1 % Triton X-100 in dest. Wasser.

PBS: 1,4 M NaCl und 0,1 M NaH₂PO₄ in dest. Wasser, pH 7,2.

PBST: PBS mit 0,1 % Tween 20.

PI-Lösung: 50 mg/ml PI in PBS.

RPMI-Medium: RPMI 1640 (Gibco) mit 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 100 IE/ml Penicillin und 100 μ /ml Streptomycin.

Sabouraud-4 %-Dextrose-Agarplatten: 65 g Sabouraud-4 %-Dextrose-Agar (Carl Roth) wurde in 1 l dest. Wasser gelöst, autoklaviert und dann in Petrischalen (100 x 20 mm) gegossen.

SDS-Ladepuffer: Der SDS-Ladepuffer wurde als Vierfachkonzentrat (4x) angesetzt: 0,2 M Tris, 8 % SDS, 40 % Glycerol, 4 % Bromphenolblau und 0,1 M DTT in dest. Wasser, pH 6,8.

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin und 0,1 % SDS in dest. Wasser, pH 8,6.

Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris, 2 % SDS und 0,4 % β -Mercaptoethanol in dest. Wasser, pH 6,8.

TM5: Iscove's Medium mit 5 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 1 % Natriumpyruvat, 100 IE/ml Penicillin und 100 μ /ml Streptomycin.

Western Blot-Puffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin und 20 % Methanol in dest. Wasser, pH 8,3.

XTT-Lösung: 0,5 mg/ml XTT wurden in PBS durch 30 min Erwärmen auf 60 °C gelöst und steril filtriert (0,22 μ m).^[183] 5 mg/ml Koenzym Q₀ wurden in PBS gelöst, steril filtriert (0,22 μ m) und bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung der XTT-Lösung wurde frisch angesetztes XTT (0,5 mg/ml) mit dem Koenzym Q₀ (40 μ g/ml) versetzt.

4.3 Antikörper

Anti-TREM-1 (Klon 6B1) und die Isotyp-Kontrolle (Kontroll-Antikörper, Klon 4C9) wurden von Hybridomüberständen aufgereinigt.^[105] Der Anti-TREM-1 Klon 947 (IgG1) wurde entsprechend der bereits beschriebenen Standardmethoden erhalten.^[105] Die anti-TREM-1-Klone 6B1 und 9H7 sind nicht kompetitiv (Daten nicht gezeigt). Die F(ab')₂-Fragmente wurden durch ein kommerziell erhältliches Kit (Pierce, Thermo Scientific) entsprechend der Herstellerangaben generiert. Humanes IgG wurde mittels Affinitätschromatografie über eine Protein-A-Säule (Pierce, Thermo Scientific) aufgereinigt. Alle selber produzierten Antikörper wurden auf Endotoxinfreiheit (< 0,1 EU/ μ g Protein) via LAL-Test (Pierce, Thermo Scientific) untersucht.

4.3.1 FACS-Antikörper

FACS-Antikörper für humane Zellen

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Firma</i>
anti-CD11b, PB-labeled	ICRF44	Becton Dickinson
anti-CD11c, FITC-labeled	3.9	eBioscience
anit-CD34, PE-labeled	Immu133	Beckman-Coulter
anti-CD14, APC-labeled	M5E2	Beckman-Coulter
anti-CD66b, FITC-labeled	80H3	Beckman-Coulter

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Firma</i>
anti-CD80, FITC-labeled	L307.4	Becton Dickinson
anti-CD86, PE-labeled	IT2.2	Becton Dickinson
anti-HLA-DR, PE-labeled	LN3	eBioscience
anti-TREM-1, FITC-labeled	9H7	eigene Herstellung
FcR-Block	-	Miltenyi
murines IgG1, FITC-labeled	MOPC-31C	Becton Dickinson

FACS-Antikörper für murine Zellen

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Firma</i>
anti-CD11b, PB-labeled	M1/70	eBioscience
anti-CD45.2, FITC-labeled	104	eBioscience
anti-CD62L, PECy7-labeled	MEL-14	Becton Dickinson
anti-Gr-1, PE-labeled	1A8	eBioscience
FcR-Block	CD16/32	eigene Herstellung

4.3.2 Western Blot-Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Firma</i>
anti-Akt	C67E7	Cell Signaling
anti-Kaninchen-IgG, HRP-labeled	-	Cell Signaling
anti-Maus-IgG, HRP-labeled	-	Cell Signaling
anti-p38MAPK	polyklonal	Cell Signaling
anti-phospho-Akt	193H12	Cell Signaling
anti-phospho-p38MAPK	3D7	Cell Signaling

4.3.3 ELISA-Antikörper

Die Antikörper zur Quantifizierung von humanem IL-8 und TNF α wurden von R&D Systems bezogen und der Albumin-ELISA von Bethly Lab. Inc. Alle Kits wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

4.4 Verbrauchsmaterial

12- und 24-Wellplatten, steril (Greiner)
96-Well-Flach- und Rundbodenplatten, steril (Greiner)
96-Well-Maxisorflachbodenplatten, steril (Nunc)
Abdeckplatten, steril (Greiner)
Elektroporationsküvette, steril, 0,4 cm (Biorad)
FACS-Röhrchen, 0,6 und 5 ml (Greiner)
Falcon-Röhrchen, steril, 15 und 50 ml (Greiner)
MACS-Säulen, steril, LS und MS (Miltenyi)
Petrischalen, steril (Gibco)
Pipettenspitzen, steril, 0,1 - 10 μ l, 10 - 200 μ l und 100 - 1000 μ l (StarLab)
Reaktionsgefäße, steril, 0,5, 1,5 und 2 ml (Eppendorf)
Schiffchen, steril (Corning Incorporated)
Serologische Glaspipetten, steril, 5, 10 und 25 ml (Techcolor Germany)
Serologische Plastikpipetten, steril, 5, 10 und 25 ml (Greiner)
Spritzen, steril, 5 und 10 ml (BD Biosciences)
Sterilfilter, steril, 0,45 und 0,22 μ m (MillexTM-GP)
Zellsiebe, steril, 40 und 70 μ m (BD Biosciences)

4.5 Geräte

Chemidoc XRS (Biorad)
Durchflusszytometer: FACS LSRII und Canto (BD Biosciences)
Elektroporation: Genepulser II (Biorad)
ELISA-Washer: ImmunoTM Wash-12 (Nunc)
Homogenisator: PT 2100 (Polytron)
Luminometer: TD-20/20 Singletube (Turner Designs)
MACS-Zubehör: MACS-Multistand, OctoMACS und QuadroMACS (Miltenyi)
Mehrkanal-Pipetten: 10 - 100 μ l (Eppendorf), 5 - 50 μ l und 50 - 300 μ l (Thermo Scientific)
Mikroliter-Pipetten: 0,2 - 2 μ l, 0,5 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 20 - 200 μ l und 100 - 1000 μ l (Gilson)
Mikroskope: Lichtmikroskop CKX31 (Olympus)
Photometer: Spectra Fluor Plus (TECAN)
Tierbeatmungsgerät: MiniVent (Hugo Sachs)

Waagen: Feinwaage PM2000 (Mettler) und Analysenwaage AE100 (Mettler)

Zentrifugen: Laborzentrifuge Multifuge 3L-R (Hereaus), Tischzentrifuge Biofuge pico (Hereaus) und Ultrazentrifuge Centrikon T-1065 (Kontron Instruments)

4.6 Mausstämme

In den durchgeführten Versuchen wurden männliche sowie weibliche Mäuse (lat.: *Mus musculus*) des Stammes C57BL/6 oder 129/Sv/Pas verwendet. Dabei handelt es sich um Wildtypstämme, die nicht genetisch verändert sind. Außerdem wurde mit folgenden, gentechnisch veränderten Mausstämmen gearbeitet: im oxidativen Burst defiziente $p47^{\text{phox-/-}}$ ^[163] und $gp91^{\text{phox-/-}}$ ^[164] Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund (freundlicherweise bereitgestellt von P. Wenzel, Zentrum für Thrombose und Hämostase, Universitätsmedizin Mainz), neutrophile Elastase defiziente ELANE Mäuse^[168] auf 129/Sv/Pas-Hintergrund und ADAMTS13 defiziente ADAMTS13^{-/-} Mäuse^[184] auf 129/Sv/Pas-Hintergrund (freundlicherweise bereitgestellt von I. Scharrer, Zentrum für Thrombose und Hämostase, Universitätsmedizin Mainz).

4.7 Zelllinie

4.7.1 5637

Die humane Harnblasenkarzinom-Zelllinie 5637 wurde in 180 cm² Zellkulturflaschen in RPMI-Medium (Gibco) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.^[185] Die adhärennten Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (Gibco) abgelöst und mit einer Konzentration von 0,5 x 10⁶ Zellen/ml in 30 ml ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Nach spätestens weiteren 48 h wurde der Überstand gesammelt, bei 2500 rpm für 10 min abzentrifugiert und anschließend steril filtriert (0,22 µm), um 5637-Konditionsmedium zu erhalten.

4.7.2 MUTZ-3

Die humane AML Zelllinie MUTZ-3 wurde in MUTZ-3-Medium, welches zu 10 % mit 5637-Konditionsmedium (siehe Kap. 4.7.1) versetzt war, bei 37 °C und 5 % CO₂ in 12-Well-Platten kultiviert.^[186] Die Zellen wurden als Stock (5 x 10⁶ Zellen) in FCS mit 10 % DMSO bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden sie über Nacht (0,5 x 10⁶ Zellen/ml in 2 ml) kultiviert. An Tag 1 und 3 wurde das Medium gewechselt und die Zellen in einer Konzentration von 0,2 x 10⁶ Zellen/ml in 2 ml ausgesät. An Tag 6 erfolgte die

Stimulation, wie angegeben, in MUTZ-3-Medium ohne 5637-Konditionsmedium. Für die Quantifizierung der Ca^{2+} -Mobilisierung wurden die CD14^+ MUTZ-3-Zellen über CD14 Microbeads (Miltenyi) mittels MACS aufgereinigt. Es wurde eine Reinheit von über 90 % an CD14^+ Zellen im FACS ermittelt (Daten nicht gezeigt).

4.8 Zellaufreinigung

4.8.1 Humane PMN

Humane PMN wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Dazu wurde gesunden Probanden nach Einverständniserklärung maximal 20 ml heparinisiertes bzw. mit Natriumcitrat (11 mM) versetztes Blut durch einen Arzt entnommen. Das Blut wurde über Polymorphprep (Axis-Shield) geschichtet (Verhältnis 1:1) und bei 500 g für 40 min bei kleinster Beschleunigung zentrifugiert. So wurden zwei Banden erhalten. Die obere enthält PBMC und die untere die PMN. Die PMN-Bande wurden abgenommen und mit PBS gewaschen (1600 rpm, 7 min). Das erhaltene Pellet wurde zur Lyse von verbliebenen Erythrozyten in 5 ml kaltem ACK-Puffer aufgenommen. Nach 5 min wurde zentrifugiert (1800 rpm, 2 min), die PMN in TM5 resuspendiert und ausgezählt (siehe Kap. 4.9). Zur Quantifizierung der Reinheit wurde die erhaltenen Zellen hinsichtlich des humanen PMN-Markers CD66b im FACS untersucht. Im Durchschnitt ergab sich eine Reinheit von über 94 % an CD66b^+ Zellen (Daten nicht gezeigt).

4.8.2 Humane PBMC

Humane PBMC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierfür wurde gesunden Probanden nach Einverständniserklärung maximal 20 ml heparinisiertes bzw. mit Natriumcitrat (11 mM) versetztes Blut durch einen Arzt entnommen. Das Blut wurde in PBS verdünnt (Verhältnis 1:1), über Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) geschichtet (Verhältnis 1:1) und bei 400 g für 40 min bei kleinster Beschleunigung zentrifugiert. Die Bande mit den PBMC wurden abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen (100 g, 10 min), um enthaltene Thrombozyten zu entfernen. Das erhaltenen Pellet wurde zur Lyse von verbliebenen Erythrozyten in 5 ml kaltem ACK-Puffer aufgenommen. Nach 5 min wurde zentrifugiert, die PBMC in TM5 resuspendiert und die Zellen ausgezählt (siehe Kap. 4.9).

4.8.3 Humane CD14⁺ Monozyten

Die CD14⁺ Monozyten wurden aus humanen PBMC (siehe Kap. 4.8.1 und 4.8.2) durch Aufreinigung mit CD14 Microbeads (Miltenyi) mittels MACS isoliert. Dazu wurden 10⁷ PBMC in 80 µl MACS-Puffer mit 20 µl Microbeads versetzt, 15 min bei RT inkubiert und nach dem Waschen mit MACS-Puffer millimeterweise auf eine MACS-Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 3 ml MACS-Puffer wurde die MACS-Säule aus dem Magneten entfernt und die Monozyten mit einem sterilen Stempel eluiert. Die erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (1700 rpm, 4 min), in TM5 resuspendiert und danach die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Kap. 4.9). Normalerweise konnte eine Reinheit von über 92 % an CD14⁺ Zellen, quantifiziert mittels FACS-Analyse, erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

4.8.4 Murine BM-PMN

PMN wurden aus dem Knochenmark (BM-PMN, engl.: *bone marrow-polymorphonuclear leukocytes*) von Mäusen via MACS isoliert. Dazu wurden Femur und Tibia der Mäuse präpariert und das Knochenmark mittels 10 ml-Spritze mit MACS-Puffer herausgespült. Nach Resuspendierung wurde die Einzelzellsuspension über eine Zellsieb (40 µm) gegeben, abzentrifugiert (1700 rpm, 3 min) und ausgezählt (siehe Kap. 4.9). 1 x 10⁸ Zellen/ml wurden 10 min mit biotinyliertem Ly6G/C-spezifischen Antikörper (Verdünnung 1 : 1.000) inkubiert. Nach dem Waschen wurden zu 1 x 10⁸ Zellen/ml Streptavidin-Beads (Miltenyi, Verdünnung 1 : 40) für 10 min hinzugefügt. Anschließend wurde gewaschen, die Zellen erneut über ein Zellsieb (40 µm) gegeben und die erhaltene Zellsuspension millimeterweise auf eine MACS-Säulen gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 2 ml MACS-Puffer wurde die MACS-Säule aus dem Magneten entfernt und die BM-PMN mit einem sterilen Stempel eluiert. Die erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (1700 rpm, 3 min), in TM5 aufgenommen und danach die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Kap. 4.9). Die Reinheit der erhaltenen Zellen wurde mittels FACS hinsichtlich der murinen PMN-Marker Gr-1⁺ und CD11b⁺ analysiert und betrug im Durchschnitt über 94 % (Daten nicht gezeigt).

4.9 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Separation der toten Zellen erfolgte durch Anfärbung mit Trypanblau, das in tote Zellen eindringt und diese dann unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen lässt.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 10 μ l Zellsuspension mit 90 μ l Trypanblaulösung (0,05 %) versetzt und anschließend mindestens zwei Großquadrate einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Aus dem Durchschnittswert Φ , dem Verdünnungsfaktor F , dem Kammerfaktor (10^4) und dem Gesamtvolumen V in ml wurde mit der Gleichung

$$\text{Gesamtzellzahl} = \Phi \cdot F \cdot 10^4 \cdot V \quad (1)$$

die Gesamtzellzahl ermittelt.

4.10 Pilzstämme und -kultivierung

Der *A. fumigatus*-Wildtypstamm 46645 wurde freundlicherweise von M. Gunzer (Molekulare Immunologie, Universität Duisburg-Essen) bereitgestellt. Kultiviert wurden sie in *Aspergillus*-Minimalmedium (AMM) mit 1 % Glukose als Kohlenstoffquelle.^[187–189] Dafür wurden Konidien auf AMM-Agarplatten vier Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Konidien wurden dann mittels steriler Glasperlen und sterilem Wasser abgewaschen.^[142,190] Die erhaltene Sporensuspension wurde über ein Zellsieb (40 μ m) gegeben, abzentrifugiert (4500 rpm, 5 min) und in dest. Wasser aufgenommen. Diese Schritt wurde einmal wiederholt. Die Konidien wurden mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt, auf 500×10^6 /ml eingestellt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

4.11 Mausmodell für invasive Asperillose (IA)

10^7 *A. fumigatus*-Konidien wurden intratracheal (i.t.) verabreicht.^[189] Dazu wurden die Mäuse mit Ketamin/Rompun betäubt (je nach Gewicht ca. 200 μ l/25 g Maus intraperitoneal [i.p.]) und anschließend für die i.t.-Intubation an ihren Vorderzähnen auf einer Rampe fixiert. Mittels Kaltlichtquelle wurde dann in die Trachea ein 22 G Venenverweilkatheter (B. Braun AG) eingeführt. In diesen wurden 100 μ l Konidiensuspension (10^8 Konidien/ml) gegeben, die von den Mäusen innerhalb von wenigen Sekunden eingeatmet wurden. Um die Verteilung der Konidien in der Lunge zu verbessern, erfolgte eine mechanische Beatmung (250 Atemzüge/min, 300 μ l/Atemzüge) mit einem Tierbeatmungsgerät für 2 min.

Die so infizierten Tiere wurden 14 Tage zur Erstellung einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve beobachtet. Dabei wurde täglich der Infektionsgrad mittels eines murinen Graft-versus-Host-Diseasemodells^[191,192] beurteilt. Abhängig vom Grad der Erkrankung wurden ein bis zwei Scoringpunkte für folgende Kriterien vergeben: Gewichtsverlust, Körperhaltung,

Viabilität, Fell- und Hautbeschaffenheit. Mäuse mit starken Erkrankungssymptomen (über sechs Scoringpunkte) oder starkem Gewichtsverlust (über 25 % vom Anfangsgewicht) wurden mit CO₂ abgetötet und der darauffolgende Tag als Todeszeitpunkt festgelegt. Zur Depletion der PMN erhielten einige Tieren einen Tag vor Infektion 150 µg α-Gr-1 (Klon RB6-8C5) oder 500 µg α-Ly6G (Klon 1A8) i.p.

4.11.1 Lungenhistologie

Einige Tiere wurde 24 h nach Infektion getötet, um die Lunge herauszupräparieren. Nach Fixierung in 10 % Formalinlösung wurde die Lunge von der Core Facility Histologie (Universitätsmedizin Mainz) in Paraffin eingebettet und anschließend Lungenschnitte hergestellt. Diese wurden mit Hematoxylin und Eosin (H&E) angefärbt, um die Entzündungsreaktion zu beurteilen. Zur Detektion von Pilzen wurde eine Grocott-Gomori-Silberfärbung durchgeführt.^[193]

4.11.2 Analyse von Blut und BAL-Fluid

24 h nach Infektion wurden einige Mäuse abgetötet und direkt danach retroorbital geblutet. Das Blut wurde in EDTA-Puffer aufgenommen und die Erythrozyten mit 3 ml ACK-Puffer 5 min lysiert. Nach Zentrifugation (1800 rpm, 3 min) wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und entsprechend gefärbt (siehe Kap. 4.19). Die Lunge der abgetöteten Mäuse wurde zudem mit 1 ml PBS gespült, um das BAL-Fluid zu erhalten. Dieses wurde abzentrifugiert (1800 rpm, 3 min) und die BAL-Fluidüberstände für weitere Analysen bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden in FACS-Puffer resuspendiert und entsprechend gefärbt (siehe Kap. 4.19).

4.11.3 *in vivo*-Pilzkilling in der Lunge

Zur Analyse der *in vivo*-Infektion der Lunge wurden einige Mäuse 24 h nach Infektion abgetötet. Anschließend wurde die Lunge präparativ entfernt, in 1 ml kaltem PBS aufgenommen und mechanisch zerkleinert. Von den erhaltenen Lungenhomogenaten wurde die 1 : 500- und die 1 : 5000-Verdünnung auf Sabouraud-4 %-Dextroseagarplatten ausgestrichen. Nach 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die erhaltenen CFU (engl.: *colony-forming units*) ausgezählt.

4.12 *in vitro*-Pilzkilling

Das Abtöten von *A. fumigatus*-Konidien wurde mittels modifiziertem XTT-Assay analysiert.^[183] Dazu wurden 3×10^4 Konidien/ml mit 1×10^6 BM-PMN/ml oder Medium (TM5) inkubiert. Nach 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Zellen durch Zugabe von eiskaltem Wasser mit 0,1 % Tween 20 lysiert. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Konidien 20 h bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Hyphen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 140 µl XTT-Lösung versetzt. Nach ca. 2 h wurden 100 µl XTT-Lösung abgenommen und die Absorption bei 450 nm photometrisch (TECAN Reader) quantifiziert. Die Pilzviabilität wurde wie folgt berechnet

$$\text{Pilzviabilität in \%} = \frac{\text{Absorption}_{\text{A. fumigatus + PMN}} - \text{Absorption}_{\text{Hintergrund}}}{\text{Absorption}_{\text{A. fumigatus allein}} - \text{Absorption}_{\text{Hintergrund}}} \times 100. \quad (2)$$

4.13 Luziferase-Reporterassays

Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFκB und NFAT kann durch in die Zellen eingebracht Plasmide quantifiziert werden. Diese bestehen meist aus einem Minimalpromotor, der eine TATA-Box und mehrere, hintereinander liegende Bindungsstellen für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor aufweist sowie einem Luziferasegen wie z.B. aus *Photinus pyralis*. Als interne Kontrolle dient meist ein Plasmid, das eine zweite Luziferase beispielsweise aus *Renilla reniformis* unter einer konstitutiv aktiven Thymidinkinase trägt. In einem Dual-Luziferase-Reporterassay kann dann die Lumineszenz beider Luziferasen nacheinander in der gleichen Probe gemessen werden, wobei die zweite Luziferase als interner Standard dient.

MUTZ-3-Zellen wurden in MEMα mit Ribo- und Desoxyribonukleotiden (Gibco) ohne weiteren Zusätze aufgenommen (10×10^6 Zellen/400 µl). In einer 0,4 cm Elektroporationsküvette wurden 400 µl Zellsuspension mittels einer Spannung von 266 V und einer Kapazität von 950 µF elektroporiert, wobei 12,5 µg/ml Plasmid des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors und 1,25 µg/ml Kontrollplasmid (pRL-TK) eingebracht wurden. Anschließend wurden die transfizierten Zellen ($1,25 \times 10^6$ /ml) in MUTZ-Medium in einer 12-Wellplatte 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ ruhen gelassen. Die Stimulation erfolgte danach in 24-Wellplatten in MUTZ-Medium für 6 h.

Die Quantifizierung der Luziferaseaktivität erfolgte mittels Dual-Luziferase-Reporterassay

entsprechend der Herstellerangaben. Dazu wurden die Zellen nach Stimulation in 1,5 ml Eppis überführt, mit PBS gewaschen (4000 rpm, 4 min) und in 30 μ l Passive-Lysepuffer aufgenommen und danach bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Zellen aufgetaut, 30 min bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert und dann nicht lysierte Bestandteile 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Von den erhaltenen Zellextrakten wurden 10 μ l mit 50 μ l Photinussubstrat LARII versetzt und die Lumineszenz quantifiziert. Direkt danach wurden 50 μ l Stop&Glo-Substrat hinzugegeben um die *Renilla*-Lumineszenz zu detektieren. Die jeweiligen Werte der *Photinus*-Lumineszenz wurden auf die dazugehörigen Werte der *Renilla*-Lumineszenz (interner Standard) normiert und dann die Luziferaseaktivität relativ zur unstimulierten Kontrolle berechnet.

4.13.1 Reporter-genplasmide

pRL-TK (Promega)

NF- κ B-Reporter-genplasmid entsprechend Toth *et al.* ^[194]

NFAT-Reporter-genplasmid (Stratagen, NFAT cis-Reporting System)

4.14 Zellstimulation

4.14.1 TREM-1-Stimulation

Anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper bzw. deren F(ab')₂-Fragmente (jeweils 10 μ g/ml) wurden an 96-Well-Flachboden-, 12-Well- oder 24-Wellplatten zur Quervernetzung (Crosslinking) ge-coated (angehaftet). Zur Messung der Ca²⁺-Mobilisierung erfolgte das Crosslinking von murinem anti-TREM-1 oder Kontrollantikörper (jeweils 10 μ g/ml) mittels anti-Maus F(ab')₂ (20 μ g/ml). Stimuli wurden, wie angegeben, hinzugefügt. Für die Untersuchung von Monozyten wurden für die Western Blot-Analyse CD14⁺ Monozyten verwendet und für die ELISA-Messung PBMC.

4.14.2 Inhibitorstudien

Die Inhibitoren für PI3K (15 μ M LY294002) und p38-MAPK (für PMN 20 μ M, MUTZ-3-Zellen und Monozyten 60 μ M SB203580) wurden 20 min vor der Zellstimulation zu denen Zellen hinzugefügt. Alle Inhibitoren wurden sorgfältig titriert und nur nicht toxische Konzentrationen verwendet, wobei die Zellviabilität der MUTZ-3-Zellen mittels MTS-Test

(Promega), apoptotische Monozyten mittels Nicoletti-Assay und apoptotische PMN durch Anfärbung mit PI analysiert wurden (siehe Kap. 4.17).

4.14.3 Stimulation von murinen BM-PMN

BM-PMN wurden für 4 h mit den angegebenen Stimuli inkubiert. Für die Experimente mit *A. fumigatus* wurde mit 10^6 Konidien/ml oder 10^6 Konidien/ml, die für 20 h bei 37°C zu Hyphen ausgereift wurden, inkubiert.

4.15 Detektion des oxidativen Burst

Durch den oxidativen Burst kommt es zur Produktion von Sauerstoffradikalen (siehe Kap. 2.2.1). Diese können mittels DCFH-DA detektiert werden, da Sauerstoffradikale vom DCFH-DA ein Wasserstoffatom abspalten, wodurch dieses anfängt grün zu fluoreszieren.^[109] Dihydrorhodamin 123 (DHR-123) ist ebenfalls ein nichtfluoreszierendes Fluorophor zur Detektion von ROS. Bei Anwesenheit dieser wird es zu kationischem Rhodamin 123 oxidiert, das in Mitochondrien gespeichert wird und grün fluoresziert.

2×10^5 humane PMN/Well bzw. 10^5 murine BM-PMN/Well wurde in einer 96-Well-Flachbodenplatte in Anwesenheit von 3,5 bzw. 8,3 nM DCFH-DA stimuliert. Die Kinetik der freigesetzten Sauerstoffradikale wurde anhand der auftretenden Fluoreszenz von DCFH-DA im TECAN Reader für 180 min alle 5 min detektiert. Anschließend wurde die spezifische Fluoreszenz (SFI) durch Subtraktion der Fluoreszenz von unstimulierten Zellen ermittelt. Für die Detektion des oxidativen Burst mittels DHR-123 wurden 10^5 murine BM-PMN/Well in einer 96-Well-Flachbodenplatte in Anwesenheit von $2 \mu\text{M}$ DHR-123 stimuliert. Nach 30 min wurde zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben im FACS analysiert.

4.16 Analyse der Ca^{2+} -Mobilisierung

CD14^+ aufgereinigte MUTZ-3-Zellen oder Monozyten sowie PMN wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluorophor Fluo-3/AM (Molecular Probes) markiert. Dazu wurden 1×10^6 Zellen/ml für 60 min mit $2 \mu\text{M}$ Fluo-3/AM inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde der Ca^{2+} -Flux von 1×10^6 Zellen/ml im FACS für 6 min analysiert. Nach 30 sek Quantifizierung des Hintergrundsignals wurde anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper

(10 µg/ml) hinzugefügt, für 30 sek detektiert und dann über die Zugabe von anti-Maus F(ab')₂ (20 µg/ml) quervernetzt.

4.17 Analyse von Zellviabilität und Apoptose

MTS-Assay: Nach Stimulation in Ab- und Anwesenheit der Inhibitoren in 96-Wellplatten (200 µl/Well) wurden 100 µl zellfreier Überstand abgenommen und 20 µl/Well MTS-Substrat (CellTiter 96[®] AQueous-Assay, Promega) hinzugegeben. Nach 1 bis 2 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der auftretende Farbumschlag von gelb zu braun als Absorption bei 490 nm im Photometer (TECAN Reader) gemessen. Die Zellviabilität wurde dann relativ zu mit Kontroll-Antikörper stimulierten Zellen berechnet.

Nicoletti-Assay: Der Apoptosetest nach Nicoletti^[195] beruht auf der hypotonen Lyse der Zellen und anschließender Markierung intakter DNA durch PI. Letzteres interkaliert in stöchiometrischen Mengen in DNA-Doppelstränge. Bei späten Apoptosestadien kommt es zur Fragmentierung der DNA-Doppelstränge, die dann mittels PI als breiter, subdiploider Peak im FACS detektiert werden.

Die Zellen wurden in 100 ml Nicoletti-Puffer für min. 2 h bei 4 °C inkubiert und anschließend im FACS analysiert.

4.18 Messung von Chemokinen und Zytokinen (ELISA)

Mittels ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*) können lösliche Proteine und niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe quantitativ nachgewiesen werden. Die hier angewandte Technik wird auch als Sandwich-ELISA bezeichnet, da die Detektion über zwei verschiedene Antikörper erfolgt. Dabei wird der erste Antikörper (Coating-Antikörper) an eine stationäre Phase gebunden, Coating genannt. Nach Blockierung freier Bindungsstellen zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wird die zu untersuchende Probe aufgetragen. Anschließend erfolgt die Detektion über einen zweiten, biotinylierten Antikörper, der ein anderes Antigenepitop erkennt. An dessen Botin bindet im nächsten Schritt eine Meerrettichperoxidase (HRP, engl.: *horseradish peroxidase*) oder alkalische Phosphatase, die über ein passendes, chromogenes Substrat detektiert werden kann.

96-Well-Maxisorbplatten wurden über Nacht bei RT mit einem spezifischen Capture-Antikörper (100 µl/Well, Verdünnung in PBS) gecoated. Anschließend wurde dieser

abgeschüttet und 200 μ l/Well ELISA-Blockpuffer hinzugegeben. Nach 1 h wurde dreimal mit PBST gewaschen, jeweils 100 μ l verdünnter Zellüberstände (IL-8: MUTZ-3-Zellen 1 : 20, PBMC 1 : 200, PMN 1 : 10; TNF α : MUTZ-3-Zellen 1 : 2, PBMC 1 : 10) oder der entsprechende Standard aufgetragen und 2 h inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBST gewaschen und der spezifische, biotinylierte Detektionsantikörper für 2 h hinzugefügt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde für 30 min mit Streptavidin-gekoppelter HRP (Verdünnung 1 : 1.000) inkubiert, anschließend erneut dreimal mit PBST gewaschen und das gesuchte Zytokin mittels 80 μ l TMB detektiert. Die dabei auftretende Blaufärbung wurde durch Zugabe von 80 μ l 2 M H₂SO₄ abgestoppt, was zu einem Farbumschlag nach gelb führte. Die Absorption wurde mit einem Photometer (TECAN Reader) bei 450 nm gemessen. Durch die Farbintensität des Standards konnte via Regressionsgerade die genaue Konzentration an Zytokin errechnet werden.

4.19 Durchflusszytometrie (FACS)

Mittels Durchflusszytometrie (FACS, engl.: *fluorescence activated cell sorting*) können bei gleichzeitiger Mehrfachfärbung mit fluorophormarkierten, monoklonalen Antikörpern unterschiedliche Zellmarker analysiert werden.

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 1800 rpm, 2 min). Anschließend wurde mit den entsprechenden, fluorophormarkierten Antikörpern und gegebenenfalls mit Fc-Block bei 4 ° C in einer 96-Well-Rundbodenplatte inkubiert. Nach 30 min wurde zweimal gewaschen, die erhaltenen Proben in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 1 μ l PI-Lösung zur Lebend-Tot-Unterscheidung mittels FACS LSR II (Becton Dickinson) analysiert. Die Bestimmung der absoluten Zellzahl erfolgte mittels Counting-Beads (Beckman-Coulter) entsprechend den Herstellerangaben. Die erhaltenen Daten wurde mittels FlowJo-Software (V8.8.7, Tree Star Inc.) ausgewertet.

4.20 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse

4.20.1 Zelllyse

Zellen wurden in Harnstoff-Lysepuffer, der zusätzlich die Phosphataseinhibitoren Natriumfluorid (5 mM) und Natriumorthovanadat (0,5 mM) sowie die Proteaseinhibitoren PMSF (10 mM) und Complete-Protease-Inhibitorcocktail enthielt, nach Waschen mit PBS für 30 min auf Eis lysiert (10 x 10⁶ Zellen/ml). Anschließend wurden Zellkern

sowie Zellmembranbestandteile durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min von zytoplasmatischen Proteinen abgetrennt. Der Überstand (Zelllysate) wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test (Pierce, 660 nm) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Dazu wurden 10 µl Probe mit 150 µl Bradfordreagenz versetzt und dann die Absorption bei 660 nm quantifiziert. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Standardgeraden ermittelt. Die erhaltenen Zelllysate wurden bei -80 °C gelagert.

4.20.2 SDS-Gel-Elektrophorese

Mittels SDS-PAGE (engl.: *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) werden Proteine nach ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt. Durch den Zusatz von SDS, einem anionischen Tensid, werden die Proteine negativ geladen und können anschließend im elektrischen Feld wandern. Als Trennmittel dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis, in welchem längere und damit größeren Proteine langsamer wandern als kleinere.

Das SDS-Gel setzt sich aus Sammelgel, welches die „Taschen“ zum Beladen des Gels aufweist, und Trenngel, das je nach Polyacrylamidanteil bestimmte Proteingrößen sauber auftrennt, zusammen. Für die in dieser Arbeit meistens verwendeten 12 %-Trenngele wurden 3,04 ml dest. Wasser, 3,76 ml 1 M Tris pH 8, 100 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung, 3 ml Acrylamid, 20 µl TEMED und 80 µl 10 % APS (w/v) vermischt und für das Sammelgel 6,4 ml dest. Wasser, 2,4 ml 0,5 M Tris pH 6,8, 100 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung, 1 ml Acrylamid, 20 µl TEMED und 80 µl 10 % APS (w/v).

Für die SDS-Gel-Elektrophorese wurden die Zelllysate (10 µl für MUTZ-3-Zellen und 5 µg für Monozyten und PMN) mit SDS Ladepuffer (Vierfachkonzentrat) versetzt und 10 min bei 95 °C aufgekocht. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung mittels MINI PROTEAN 3 2-D Elektrophoresekammern.

4.20.3 Western Blot-Analyse

Zur Detektion verschiedener Proteine mittels Antikörpern wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, auch Western Blot genannt. Dabei erfolgt der Transfer der negativ geladenen Proteine vom SDS-PAGE auf die Membran durch einen elektrischen Fluss.

Die PVDF-Membran (0,2 µM, Merck Millipore) wurde 25 sek in Methanol aktiviert und anschließend 2 min mit Western-Blot-Puffer gewaschen. Dann wurden die Proteine vom

SDS-PAGE auf die PVDF-Membran geblottet (ca. 40 min bei 24 V und 600 mA). Danach wurde die geblottete Membran 1 h bei RT mit PBST mit 5 % (w/v) Milchpulver blockiert, dreimal mit PBST gewaschen und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler mit dem Primärantikörper in PBST mit 5 % (w/v) BSA inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST erfolgte die Inkubation mit einem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 h bei RT in PBST mit 5 % (w/v) BSA. Danach wurde zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen. Die Proteine wurden anschließend mittels ECL-Detektionssystem (Pierce) sichtbar gemacht und im Chemidoc quantifiziert. Die Auswertung der Western Blots erfolgte über Image Lab (Bio-Rad, Version 4).

4.20.4 Stripping

Um mehrere, verschiedene Proteine auf einer Membran zu detektieren, kann diese nach erfolgter Western Blot-Analyse gestrippt werden. Dabei werden die angehafteten Antikörper abgewaschen.

Zum Stripping wurde die PVDF-Membran für 30 min bei 56 min mit Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde viermal mit PBST gewaschen, erneut mit PBST mit 5 % (w/v) Milchpulver blockiert und das gewünschte Protein, wie unter Kap. 4.20.3 beschrieben, analysiert.

4.21 Auswertung und statistische Analyse

Die Auswertung erfolgte, soweit nicht anders gekennzeichnet, mit Excel (Microsoft Office 2010). Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism (Version 5) durchgeführt. Unterschiedliche Gruppen wurden beim Vergleich von zwei Gruppen per two-tailed Student's-*t*-Test analysiert. Beim Vergleich von mehreren Gruppen wurde der one-way ANOVA-Test mit Bonferroni's Posttest verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner als 0,05 gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Sich gegenseitig beeinflussende Signalkaskaden von TREM-1 und TLR bzw. NLR in monozytären Zellen

5.1.1 Die AML-Zelllinie MUTZ-3 exprimiert TREM-1 funktionell

In PMN sind die Kinasen PI3K und p38-MAPK wichtige Regulatoren der Signaltransduktion von TREM-1.^[109] Um dies in monozytären Zellen zu validieren, wurde nach einer TREM-1 exprimierenden Zelllinie gesucht. So sollten spenderabhängige Diskrepanzen vermieden werden, die bei Experimenten mit primären Zellen auftreten können. Um zudem *in vitro*-Artefakte, verursacht durch ektopische Rezeptorexpression, zu unterbinden, sollte

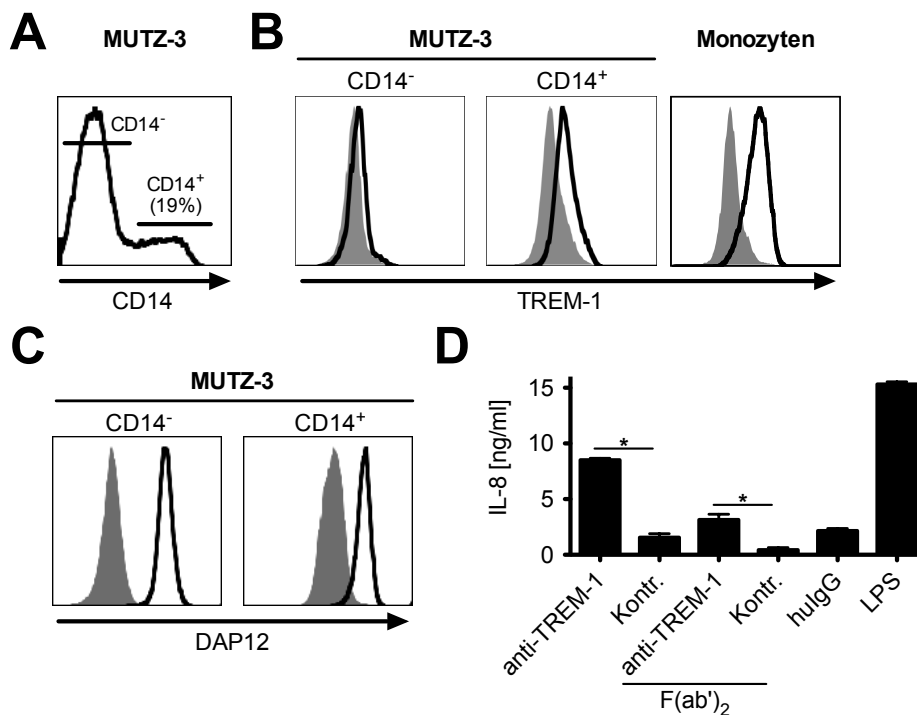


Abbildung 7: TREM-1 wird von CD14⁺ MUTZ-3 Zellen funktionell exprimiert. (A) Die Expression des Oberflächenmoleküls CD14 unterteilt MUTZ-3-Zellen in zwei Subpopulationen. (B) Die TREM-1-Expression (schwarze Linie) auf CD14⁻ und CD14⁺ MUTZ-3-Zellen oder auf CD14⁺ Monozyten wurde im Vergleich zu einer Isotypkontrolle (grau hinterlegt) analysiert. (C) Die Expression des TREM-1-Adaptermoleküls DAP12 (schwarze Linie) wurde auf CD14⁻ und CD14⁺ MUTZ-3-Zellen untersucht. Als Kontrolle diente ein Isotyp-Antikörper (grau hinterlegt). (D) MUTZ-3-Zellen ($0,5 \times 10^6$ /ml) wurden mit Plastik-coated anti-TREM-1 bzw. Kontroll-Antikörper oder deren F(ab')₂-Fragmenten, humanen IgG (jeweils 10 µg/ml) oder LPS (100 ng/ml) stimuliert. Nach 16 h wurde die Freisetzung von IL-8 mittels ELISA quantifiziert. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen Student's-*t*-Test.

die Zelllinie TREM-1 natürlicherweise exprimieren.

CD14⁺ Monozyten exprimieren TREM-1 konstitutiv.^[90] Da die monozytäre AML-Zelllinie MUTZ-3 eine CD14⁺ Population aufweist, wurde die TREM-1-Expression mittels Durchflusszytometrie (FACS, engl.: *fluorescence activated cell sorting*) untersucht. Konsistent mit den Literaturdaten untergliederten sich die MUTZ-3-Zellen in drei verschiedene Subpopulationen, die sich hinsichtlich der Oberflächenmoleküle CD14 und CD34 unterscheiden^[186,196]. Dabei sind CD14⁻ CD34⁺ Zellen proliferierend und CD14⁻ CD34⁻ sowie CD14⁺ CD34⁻ MUTZ-3-Zellen nicht proliferierend. Durch Gating auf die CD14⁺ MUTZ-3-Population (siehe Abb. 7 A) konnte auf dieser eine TREM-1-Expression im Vergleich zur Isotypkontrolle nachgewiesen werden, die nicht auf CD14⁻ Zellen detektierbar war (siehe Abb. 7 B). Gegenüber der TREM-1-Expression auf primären Monozyten war diese aber eher schwach. Für eine funktionierende Signaltransduktion über TREM-1 ist das assoziierte Adaptermoleküle DAP12 essentiell.^[90] Aus diesem Grund wurde die Expression dieses Moleküls in MUTZ-3-Zellen untersucht (siehe Abb. 7 C). Als wichtige Bedingung für weitere Studien und im Gegensatz zur Expression von TREM-1 und CD14 wurde DAP12 in CD14⁻ sowie CD14⁺ MUTZ-3-Zellen detektiert.

In Monozyten induziert die TREM-1-Ligation eine Vielzahl von Effektormechanismen. Unter anderem kommt es zur Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren wie IL-8 und TNF α .^[90,91] Um die Funktionalität von TREM-1 auf MUTZ-3-Zellen zu überprüfen, wurden diese mit einem murinen TREM-1-Antikörper (anti-TREM-1) inkubiert. Damit dieser stimulierend wirkt, muss er durch Anhaftung (Coating) an die Oberfläche der Plastikplatten (Wells), in denen die Zellen stimuliert werden, oder über ein anti-Maus F(ab)₂ quervernetzt (crosslinked) werden. Nach TREM-1-Stimulation wurde dann die Ausschüttung von IL-8 und TNF α mittels ELISA (engl.: *enzyme linked immunosorbent assay*) quantifiziert. Als Kontrolle diente ein Isotyp-Antikörper, welcher ein irrelevantes Antigen erkennt, und nicht stimulierend wirkt (Kontroll-Antikörper) sowie der TLR4-Agonist LPS. Wie in Abb. 7 D gezeigt, wurde eine TREM-1-spezifische Freisetzung von IL-8 detektiert, verglichen mit dem Kontroll-Antikörper, die ungefähr das Niveau der LPS-Stimulation erreichte. Es konnte jedoch keine TREM-1-induzierte Ausschüttung von TNF α in MUTZ-3-Zellen gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Da die MUTZ-3-Zellen den IgG-Rezeptor CD64 exprimieren und darüber stimuliert werden könnten, wurde überprüft, ob die induzierte IL-8-Ausschüttung durch eine Fc-Rezeptor abhängige Aktivierung erfolgte. Dazu wurden F(ab')₂-Fragmente der beiden verwendeten Antikörper

erzeugt und anschließend die Zellen mit diesen stimuliert (siehe Abb. 7 D). Es konnte erneut eine TREM-1-abhängige IL-8-Ausschüttung quantifiziert werden.

Da CD14⁺ MUTZ-3-Zellen TREM-1 sowie das für die TREM-1-Signalweiterleitung essentielle Adaptermolekül DAP12 aufweisen und der Rezeptor funktionell ist, wurde im Folgenden die Signaltransduktion von TREM-1 in MUTZ-3-Zellen detailliert untersucht.

5.1.2 Ligation von TREM-1 induziert die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK in monozytären Zellen

Die Ligation von TREM-1 führt in PMN und Monozyten zur Phosphorylierung von ERK1/2 und PLC γ .^[90,109,110] In PMN sind zudem die Kinase PI3K und die MAP-Kinase p38-MAPK von zentraler Bedeutung.^[109,110] Aus diesem Grund wurde in MUTZ-3-Zellen die Phosphorylierung von Akt, das ein direkt nachgeschaltetes Signalmolekül von PI3K im PI3K/Akt-Signalweg ist, und p38-MAPK nach TREM-1-Aktivierung analysiert. Dazu wurden MUTZ-3-Zellen mit anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper stimuliert und die zeitabhängige Phosphorylierung der jeweiligen Signalmoleküle durch eine Western Blot-Analyse untersucht.

Wie in Abb. 8 A dargestellt, führte die TREM-1-Stimulation in MUTZ-3-Zellen zu einer Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK, die nach ca. 10 min startete. Die Inkubation mit dem Kontroll-Antikörper resultierte dagegen nur in einer leichten Hintergrundaktivierung. Dies beweist, dass die beiden Signalmoleküle Akt und p38-MAPK an der TREM-1

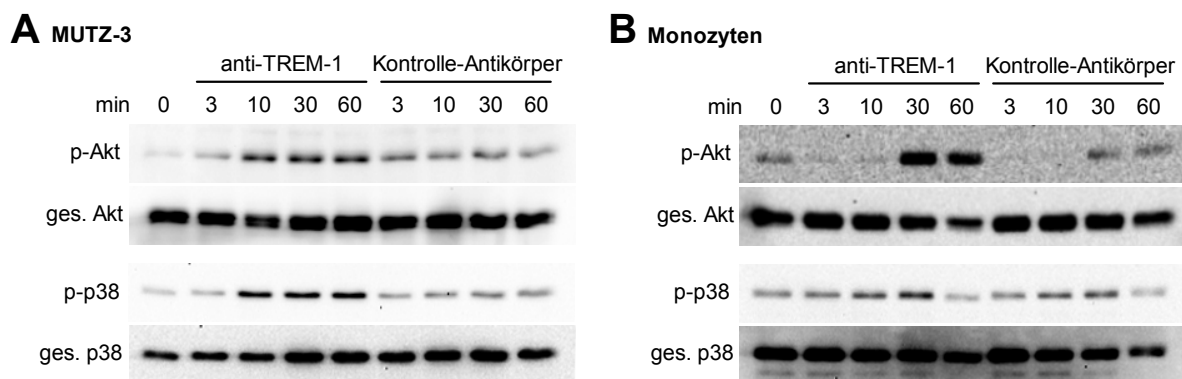


Abbildung 8: Die TREM-1-Stimulation führt zur Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK in monozytären Zellen. MUTZ-3-Zellen (A) oder CD14⁺ Monozyten (B, jeweils 1 x 10⁶/ml) wurden mit Plastik-coated anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper (jeweils 10 μ g/ml) stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Proteine über ein 12 % SDS-Gel separiert. Anschließend erfolgte die Analyse von phosphorylierten (p-) und gesamten Akt (ges.) oder p38-MAPK mittels Western Blot. Gezeigt ist ein repräsentatives, von drei unabhängigen Experimenten.

induzierten Signaltransduktion in MUTZ-3-Zellen beteiligt sind. Um die erhaltenen Daten mit der Aktivierung von Akt und p38-MAPK in primären Monozyten zu vergleichen, wurden diese analog zu den MUTZ-3-Zellen stimuliert (siehe Abb. 8B). Dabei konnte in Monozyten ein ähnliches Aktivierungsmuster von Akt und p38-MAPK, wie in MUTZ-3-Zellen, nachgewiesen werden. So war eine Phosphorylierung von p38-MAPK nach 10 min detektierbar. Nur die Aktivierung von Akt begann im Gegensatz zu MUTZ-3-Zellen erst nach 30 min. Dies beweist, dass PI3K und p38-MAPK essentielle Moleküle für die TREM-1-Signalweiterleitung in monozytären Zellen sind. Zudem ist deren Aktivierungsmuster in MUTZ-3-Zellen und primären Monozyten fast identisch. Als Ladekontrolle diente die Detektion vom gesamten Akt und p38-MAPK, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten für die beiden monozytären Zellen ergaben.

5.1.3 PI3K und p38-MAPK sind zentrale, regulatorische Moleküle der TREM-1-Signaltransduktion

In PMN induziert die Ligation von TREM-1 die Aktivierung von zwei unterschiedlichen Signalwegen, die entweder von PI3K oder p38-MAPK abhängig sind.^[109] Da die exakten Signalwege von PI3K und p38-MAPK nach TREM-1-Aktivierung in monozytären Zellen noch nicht hinreichend untersucht sind, erfolgte dies in MUTZ-3-Zellen und primären Monozyten. Dazu wurden die Zellen mit anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper in An- und Abwesenheit der Inhibitoren für PI3K oder p38-MAPK stimuliert und nach 3 und 30 min die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK quantifiziert.

In monozytären Zellen und PMN wurde eine TREM-1-abhängige Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK im Vergleich zum Kontroll-Antikörper detektiert (siehe Abb. 9A bis C). Erwartungsgemäß war in MUTZ-3-Zellen keine Aktivierung von Akt bei Anwesenheit des PI3K-Inhibitors nachweisbar (siehe Abb. 9A). Überraschenderweise war außerdem bei Inhibierung von PI3K fast keine Phosphorylierung von p38-MAPK nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass PI3K neben Akt auch die Aktivierung von p38-MAPK in MUTZ-3-Zellen beeinflusst. Da umgekehrt der p38-MAPK-Inhibitor auch die Akt-Phosphorylierung reduzierte, kann auf eine bidirektionale Verbindung beider Kinasen geschlossen werden. Abb. 9B zeigt, dass in Monozyten ebenfalls keine Aktivierung von Akt nach Inhibierung von PI3K nachweisbar war. Im Gegensatz zu MUTZ-3-Zellen wurde jedoch die Phosphorylierung von p38-MAPK durch den PI3K-Inhibitor nicht vermindert, sondern nach 30 min sogar noch verstärkt, verglichen mit dem Phosphorylierungsmuster bei Stimulation

mit anti-TREM-1. Dies weist auf eine kompensatorische Aktivierung vom p38-MAPK-Signalweg hin. Übereinstimmend mit den Resultaten in MUTZ-3-Zellen konnte nach p38-MAPK-Inhibierung in Monozyten keine Aktivierung von Akt quantifiziert werden. Dadurch ergibt sich für die TREM-1-Signalkaskade in monozytären Zellen folgendes: die Aktivierung von p38-MAPK muss vor der Akt-Phosphorylierung erfolgen.

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten wurde in PMN durch TREM-1-Stimulation die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK induziert (siehe Abb. 9 C).^[109,110] Dabei reduzierte der PI3K-Inhibitor die Akt-Phosphorylierung aber nicht die p38-MAPK-Aktivität. Zudem konnte in Übereinstimmung mit Haselmayer *et al.*^[109] kein Einfluss des p38-MAPK-Inhibitors auf die Akt-Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 unterbindet nicht die Phosphorylierung von p38-MAPK, sondern verhindert die nachgeschalteten Signale.^[197] Deswegen hatte der Inhibitor keinen Einfluss auf die p38-MAPK-Phosphorylierung in primären Monozyten und PMN

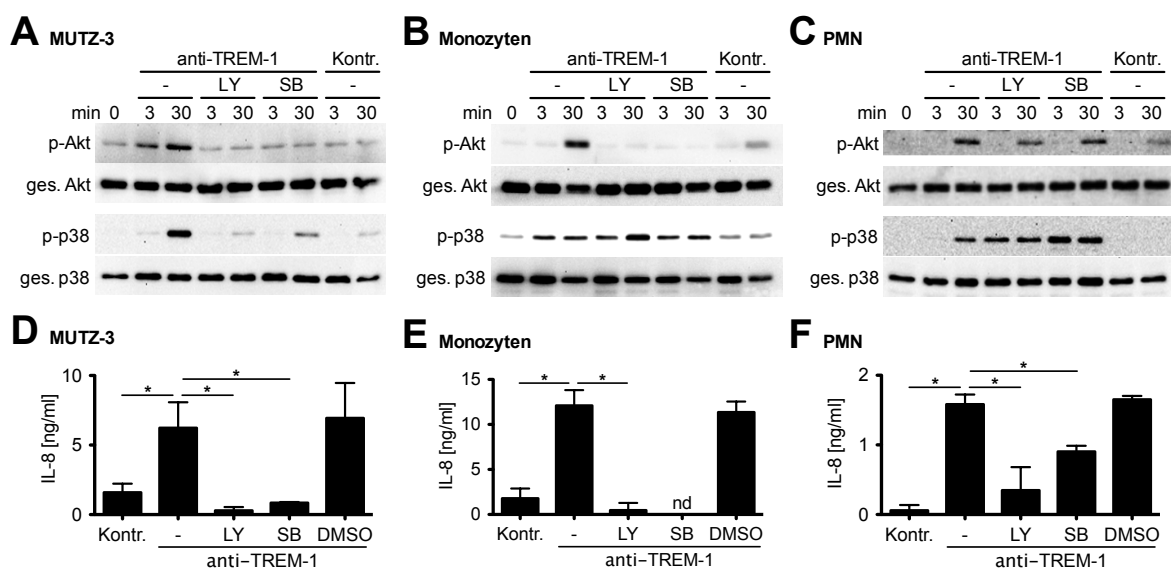


Abbildung 9: PI3K und p38-MAPK regulieren die TREM-1-induzierte Aktivierung von Akt in monozytären Zellen. MUTZ-3-Zellen (A, C), Monozyten (B, E) oder PMN (C, F) wurden mit Plastik-coated anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper (jeweils 10 µg/ml) in Ab- oder Anwesenheit vom PI3K-Inhibitor (LY294002, LY) oder p38-MAPK-Inhibitor (SB203580, SB) stimuliert. (A - C) Die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK wurde auf MUTZ-3-Zellen (A), Monozyten (B) oder PMN (C, jeweils 1×10^6 /ml) nach 3 und 30 min analysiert. Gezeigt sind die repräsentativen Resultate von zwei (A, B) oder einem (C) Versuch. (D - F) Die Ausschüttung von IL-8 wurde nach 16 h für MUTZ-3-Zellen (D, $0,5 \times 10^6$ /ml) oder nach 8 h für Monozyten (E) und PMN (F, jeweils 1×10^6 /ml) mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die kumulierten Werte (D) oder eine repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten plus SD. nd, nicht detektierbar. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

und induzierte nur eine leichte Verminderung der p38-MAPK-Phosphorylierung in MUTZ-3-Zellen (siehe Abb. 9 A - C).

Zur Analyse der biologischen Relevanz von PI3K und p38-MAPK im TREM-1-Signalweg wurde der Einfluss beider Kinasen auf die durch TREM-1 induzierte Ausschüttung von IL-8 analysiert. Dazu wurden MUTZ-3-Zellen, Monozyten und PMN mit anti-TREM-1 oder Kontrollantikörper in Ab- und Anwesenheit der spezifischen Inhibitoren für PI3K und p38-MAPK stimuliert. Wie in Abb. 9 D - F dargestellt, kam es in MUTZ-3-Zellen, Monozyten und PMN zu einer TREM-1-spezifischen IL-8-Freisetzung, verglichen mit dem Kontroll-Antikörper. Die Anwesenheit der Inhibitoren für PI3K oder p38-MAPK führte zu einer signifikanten Reduzierung der TREM-1-induzierten IL-8-Produktion in allen Zellen, was die biologische Relevanz von PI3K und p38-MAPK in der TREM-1-Signalkaskade belegt. Da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Stimulation mit anti-TREM-1 und anti-TREM-1 plus DMSO ergaben, konnten Effekte des Lösungsmittels DMSO, in welchem beide Inhibitoren gelöst waren, auf die IL-8-Freisetzung ausgeschlossen werden. Um toxische Nebeneffekte der Inhibitoren, die ebenfalls eine reduzierte Ausschüttung von IL-8 verursachen können, auszuschließen, wurde die Zellviabilität von MUTZ-3-Zellen, Monozyten und PMN nach Inkubation mit den Inhibitoren ermittelt (siehe Abb. 10). Es

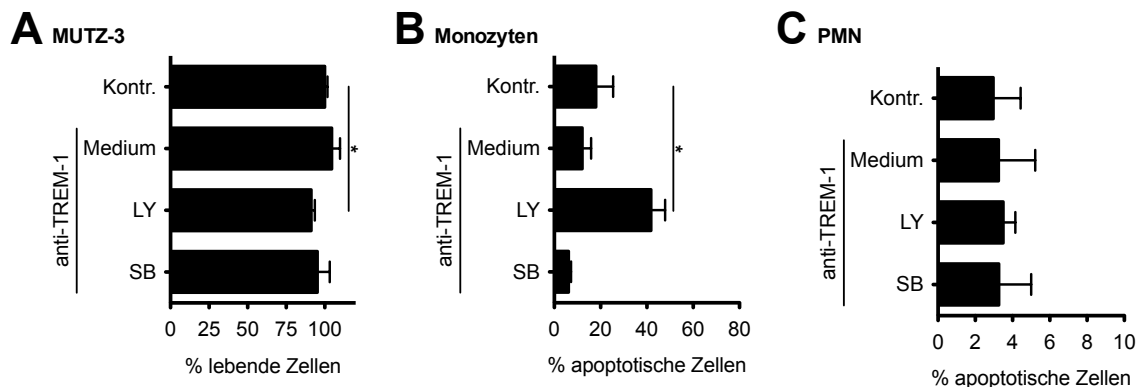


Abbildung 10: Nur der Inhibitor für PI3K besitzt leicht toxische Nebenwirkungen auf monozytäre Zellen. Die Zellviabilität von MUTZ-3-Zellen (A), Monozyten (B) oder PMN (C) wurden nach Stimulation mit Plastik-coated anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper (jeweils 10 µg/ml) in Ab- oder Anwesenheit vom PI3K-Inhibitor (LY294002, LY) oder p38-MAPK-Inhibitor (SB203580, SB) untersucht. (A) Die Viabilität von MUTZ-3-Zellen wurde nach 16 h mittels MTS-Assay relativ zu den mit Kontroll-Antikörper behandelten Zellen analysiert. (B) Der Anteil apoptotischer Monozyten wurde mittels Nicoletti-Assay nach 8 h im FACS bestimmt. (C) Der Anteil an apoptotischen PMN wurde nach 8 h mit PI im FACS gemessen. Dargestellt sind die kumulierten Werte (A) oder ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängigen Experimenten plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

ergaben sich nur leicht toxische Effekte des PI3K-Inhibitors auf monozytären Zellen.

5.1.4 Die Signalweiterleitung von TREM-1 ist abhängig von Ca^{2+}

Da die Ligation von TREM-1 zu einer schnellen Freisetzung von Ca^{2+} in Monozyten und PMN führt^[90,109], wurde dies in MUTZ-3-Zellen anhand des Ca^{2+} -sensitiven Fluorophores FLUO3-AM gemessen. Als Vergleich wurde außerdem der Ca^{2+} -Flux von Monozyten und PMN analysiert. Zur Stimulation von TREM-1 wurde anti-TREM-1 über ein anti-Maus F(ab')_2 quervernetzt.

Für MUTZ-3-Zellen war kein Ca^{2+} -Signal quantifizierbar (Daten nicht gezeigt). Erst durch Aufreinigung der TREM-1 exprimierenden CD14^+ MUTZ-3-Subpopulation konnte ein TREM-1-spezifisches Ca^{2+} -Signal detektiert werden (siehe Abb. 11), was ebenfalls in Monozyten und PMN nachweisbar war.^[90,109] Wurde anstelle von anti-TREM-1 der Kontroll-Antikörper hinzugegeben und quervernetzt, war kein signifikanter Ca^{2+} -Flux mehr nachweisbar.

Da in monozytären Zellen und PMN die Kinasen PI3K und p38-MAPK zentrale

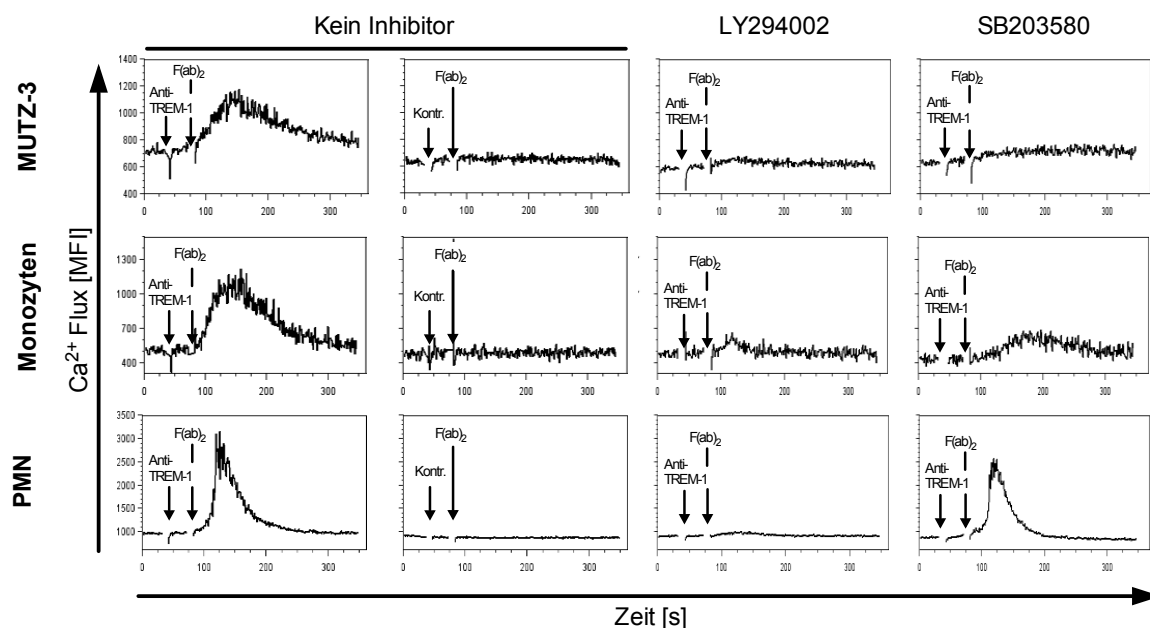


Abbildung 11: Die Stimulation von TREM-1 induziert eine PI3K und p38-MAPK abhängige Ca^{2+} -Mobilisierung in monozytären Zellen. CD14^+ aufgereinigte MUTZ-3-Zellen (oberes Panel), Monozyten (mittleres Panel) oder PMN (unteres Panel, jeweils $1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluorophor FLUO3-AM markiert. Anti-TREM-1 bzw. Kontroll-Antikörper (jeweils $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) und anti-Maus F(ab)_2 wurden, wie gekennzeichnet, hinzugefügt und die Ca^{2+} -Mobilisierung in Ab- und Anwesenheit der Inhibitoren für PI3K (LY294002) oder p38-MAPK (SB203580) über die Zeit im FACS quantifiziert. Gezeigt ist ein repräsentativer, von drei unabhängigen Versuchen.

Regulatoren der TREM-1-Signalkaskade sind (siehe Kap. 5.1.3), wurde ihr Einfluss auf die Freisetzung von Ca^{2+} untersucht. Hierfür wurde der Ca^{2+} -Flux nach TREM-1-Ligation in Anwesenheit der bereits verwendeten Inhibitoren für PI3K und p38-MAPK gemessen. In MUTZ-3-Zellen und Monozyten konnte kein signifikantes Ca^{2+} -Signal nach Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK gemessen werden (siehe Abb. 11). In PMN wurde erwartungsgemäß^[109] keine Ca^{2+} -Mobilisierung nach PI3K-Inhibierung detektiert. Dagegen führte die Inhibierung von p38-MAPK in PMN zu keiner Reduzierung des TREM-1 induzierten Ca^{2+} -Signals.^[109] Dies zeigt, dass die Ca^{2+} -Mobilisierung nach TREM-1-Aktivierung in monozytären Zellen von PI3K und p38-MAPK abhängt, wohingegen diese in PMN^[109] nur von PI3K abhängt.

Zytosolisches Ca^{2+} bildet mit Calmodulin einen Komplex, der die Phosphatase Calcineurin bindet. Dadurch wird letztere aktiviert und dephosphoryliert das Kernlokalisierungssignal vom Transkriptionsfaktor NFAT, der im inaktiven Zustand phosphoryliert im Zytosol vorliegt. Nach seiner Aktivierung translokalisiert NFAT in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription proinflammatorischer Gene. Um die Aktivierung von NFAT als ein Downstreamsignal von Ca^{2+} zu analysieren, wurde ein Reportergenkonstrukt in MUTZ-3-Zellen eingebracht, durch welches die NFAT-Aktivität mittels Luziferase quantifizierbar

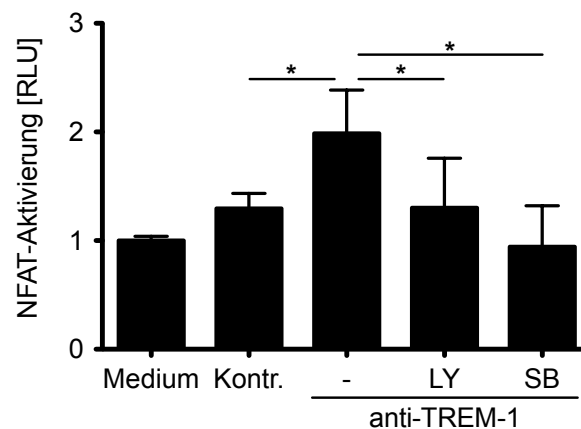


Abbildung 12: Die Stimulation von TREM-1 induziert eine PI3K und p38-MAPK abhängige Aktivierung vom Transkriptionsfaktor NFAT in MUTZ-3-Zellen. Das Reportergenkonstrukt für NFAT wurden mittels Elektroporation in MUTZ-3-Zellen eingebracht. Anschließend wurden die Zellen (0.5×10^6 /ml) mit Plastik-coated anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper (jeweils $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) in Ab- und Anwesenheit der Inhibitoren für PI3K (LY294002, LY) oder p38-MAPK (SB203580, SB) inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und mittels Dual-Luziferase-Reporterassay analysiert. Gezeigt sind die kumulierten Daten von drei unabhängigen Versuchen, jeweils normiert auf die unbehandelte Kontrolle (Medium) als RLU (engl.: *relative luciferase units*) plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

ist. Anschließend wurden die Zellen mit anti-TREM-1 oder Kontrollantikörper stimuliert. Wie in Abb. 12 gezeigt, konnte eine TREM-1-spezifische Aktivierung von NFAT detektiert werden.

Da die Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK zur reduzierten TREM-1-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisierung in MUTZ-3-Zellen führte (siehe Abb. 11), wurde der Effekt beider Kinasen auf NFAT überprüft. Dazu wurden mit dem Reportergenkonstrukt für NFAT transfizierte MUTZ-3-Zellen mit anti-TREM-1 in Anwesenheit der Inhibitoren für PI3K und p38-MAPK stimuliert (siehe Abb. 12). Beide Kinase-Inhibitoren verminderten die TREM-1-abhängige NFAT-Aktivierung. Dies beweist, dass PI3K und p38-MAPK für die Freisetzung von Ca^{2+} und dessen nachgeschaltete NFAT-Transkription essentiell sind.

5.1.5 Stimulation von TREM-1 in Kombination mit TLR- oder NLR-Agonisten bzw. GM-CSF induziert eine gesteigerte Produktion von IL-8

Für Monozyten und PMN sind Synergieeffekte für die simultane Stimulation von TREM-1 und diversen TLR oder NLR bekannt.^[90,91,109,198] Dies führt beispielsweise in Monozyten zur gesteigerten Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen wie IL-8 und $\text{TNF}\alpha$. Zudem kommt es zur Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen wie CD11b, CD11c, CD80, CD86 oder HLA-DR. Aus diesem Grund wurde in MUTZ-3-Zellen nach Synergieeffekten bei gleichzeitiger Stimulation mit anti-TREM-1 und den Agonisten für TLR2 (Pam₃Cys), TLR4 (LPS), TLR7/8 (R-848) oder NLR (M-TriDAP) sowie GM-CSF gesucht.

In MUTZ-3-Zellen konnte nur eine TREM-1 spezifische Ausschüttung von IL-8, verglichen mit dem Kontroll-Antikörper, quantifiziert werden (siehe Abb. 7 D und 13 A), jedoch keine Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ (siehe Abb. 13 B). Bei zusätzlicher Stimulation mit den genannten TLR-Agonisten wurden konzentrationsabhängige, kooperative Effekte für die IL-8-Produktion detektiert (siehe Abb. 13 A). Durch den NLR-Agonisten kam es ebenfalls zu einer erhöhten IL-8-Produktion, die jedoch nicht signifikant gegenüber der Stimulation von TREM-1 war. Überraschenderweise war die Freisetzung von IL-8 auch bei Anwesenheit von GM-CSF erhöht. Bei Stimulation von TREM-1 und TLR2, TLR4 oder TLR7/8 wurden zudem synergistische Effekte für die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ detektiert (siehe Abb. 13 B). GM-CSF und der NLR-Agonist induzierten hingegen keine $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung. Neben dem Zytokin- und Chemokinprofil wurden auch die kostimulatorischen Moleküle nach kombinierter Stimulation von TREM-1 und TLR, NLR oder GM-CSF auf CD14⁺ MUTZ-

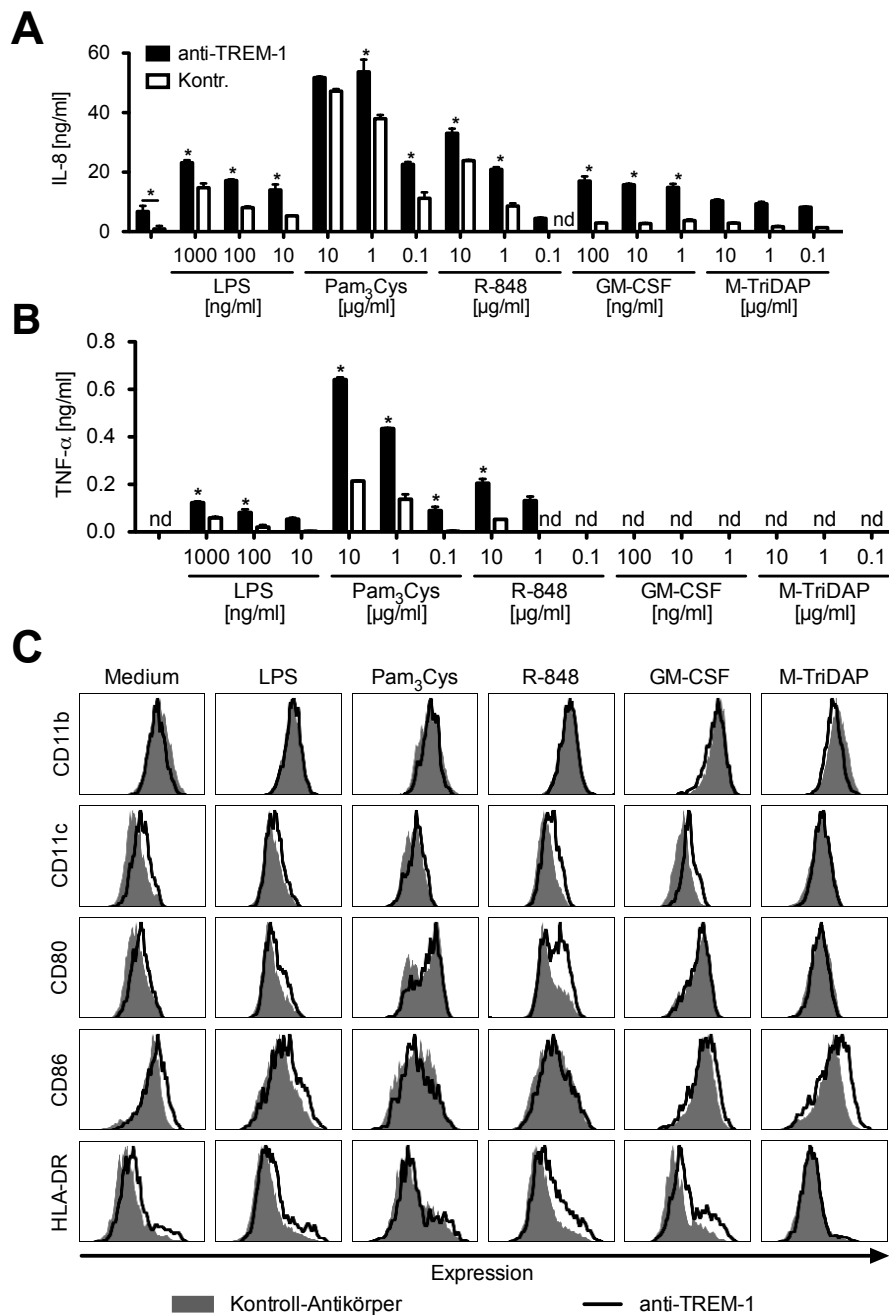


Abbildung 13: Die gleichzeitige Stimulation von TREM-1 mit TLR- bzw. NLR-Agonisten oder GM-CSF induziert eine erhöhte IL-8-Produktion in MUTZ-3-Zellen. MUTZ-3-Zellen (0.5×10^6 /ml) wurden mit Plastik-coated anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper (jeweils $10 \mu\text{g/ml}$) in Kombination mit Agonisten für TLR4 (LPS), TLR2 (Pam₃Cys), TLR7/8 (R-848) oder NLR1/2 (M-TriDAP) bzw. GM-CSF stimuliert. (A, B) Die Ausschüttung von IL-8 (A) und TNF α (B) wurde nach 16 h mittels ELISA quantifiziert. (C) Nach 16 h Inkubation Ab- und Anwesenheit von LPS (100 ng/ml), Pam₃Cys ($1 \mu\text{g/ml}$), R-848 ($1 \mu\text{g/ml}$), GM-CSF (10 ng/ml) oder M-TriDAP ($10 \mu\text{g/ml}$) wurde die Expression von CD11b, CD11c, CD80, CD86 und HLA-DR auf CD14⁺ MUTZ-3-Zellen im FACS untersucht. Gezeigt ist ein repräsentativer, von zwei (C) oder drei (A, B) unabhängigen Versuchen plus SD. nd, nicht detektierbar. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen sowie einen signifikanten Unterschied zu anti-TREM-1 behandelten Zellen, berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

3-Zellen analysiert (siehe Abb. 13 C). Für die Expression von CD11b, CD11c, CD80, CD86 und HLA-DR konnten keine Unterschiede für die TREM-1-Stimulation im Vergleich zum Kontroll-Antikörper detektiert werden. Auch in Kombination mit den TLR2-, TLR4-, TLR7/8- oder NLR-Agonisten oder GM-CSF ergaben sich keine signifikanten, TREM-1 spezifischen Effekte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass MUTZ-3-Zellen ähnliche kooperative bzw. synergistische Effekte bei der Zytokin- und Chemokinfreisetzung nach Stimulation von TREM-1 und TLR bzw. NLR wie Monozyten^[90,91,198] zeigen, wobei die Stimulation von TREM-1 allein keine Freisetzung von TNF α in MUTZ-3-Zellen induziert. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle wird im Gegensatz zu Monozyten^[90,91] in MUTZ-3-Zellen durch TREM-1-Stimulation nicht beeinflusst.

5.1.6 PI3K und p38-MAPK sind essentielle, regulatorische Moleküle der mittels TLR- oder NLR-Koligation gesteigerten Aktivierung von TREM-1

PI3K und p38-MAPK sind essentielle Regulatoren der TREM-1-Signalkaskade (siehe Kap. 5.1.3).^[109] Zudem steigert die Koligation von TLR oder NLR die Aktivierung von TREM-1 (siehe Kap. 5.1.5).^[90,91,109,198] Aus diesem Grund wurde der Einfluss von PI3K und p38-MAPK auf die durch TLR und NLR gesteigerte Aktivierung von TREM-1 untersucht. MUTZ-3-Zellen oder Monozyten wurden dazu mit anti-TREM-1 und den Agonisten für TLR4 (LPS) oder NLR (M-TriDAP) in Ab- und Anwesenheit der Inhibitoren für PI3K oder p38-MAPK stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK sowie die Zytokin- und Chemokinfreisetzung analysiert.

Wie in Abb. 14 A dargestellt, induzierte die Stimulation von TREM-1 eine Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK in MUTZ-3-Zellen, die durch zusätzliche TLR4-Stimulation verstärkt wurde. Bei kombinierter Stimulation von TREM-1 und TLR4 war in MUTZ-3-Zellen nach Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK keine Phosphorylierung von Akt nachweisbar (siehe Abb. 14 A). Im Gegensatz dazu und im Kontrast zu den erhaltenen Daten für die TREM-1-Stimulation allein (siehe Kap. 5.1.3) wurde vom PI3K-Inhibitor die Phosphorylierung von p38-MAPK nicht signifikant beeinflusst. Dies bedeutet, dass sich die Signalwege bei Koligation von TREM-1 und TLR4 von denen der TREM-1-Stimulation unterscheiden. Durch Koligation von TREM-1 und TLR4 in MUTZ-3-Zellen kam es zu kooperativen Effekten bei der Freisetzung von IL-8 und TNF α (siehe Kap. 5.1.5 und 14 C und F). Durch den PI3K- oder p38-MAPK-Inhibitor wurde die IL-8-Freisetzung vermindert

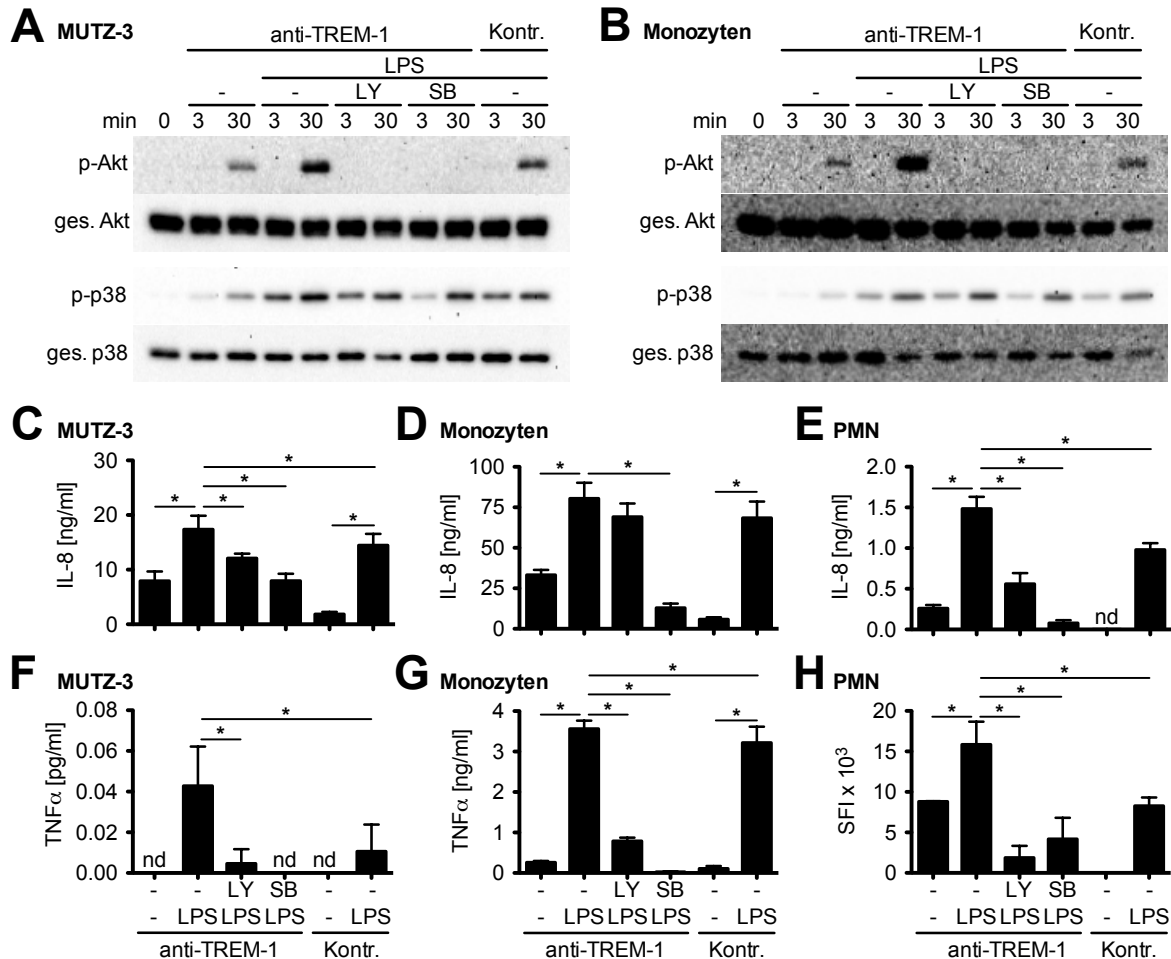


Abbildung 14: PI3K und p38-MAPK sind wichtige regulatorische Moleküle der durch Koligation mit TLR4 gesteigerten TREM-1-Aktivierung. MUTZ-3-Zellen (A, C, F), CD14 Monozyten (B, D, G) oder PMN (E, H) wurden mit Plastik-coated anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper (jeweils 10 µg/ml) in Ab- oder Anwesenheit vom TLR4-Agonisten LPS (100 ng/ml), dem PI3K-Inhibitor LY294002 (LY) oder dem p38-MAPK-Inhibitor SB203580 (SB) stimuliert. (A, B) Die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK wurde auf MUTZ-3-Zellen oder Monozyten (1×10^6 /ml) nach 3 und 30 min analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives, von zwei unabhängigen Experimenten. (C - G) Die Ausschüttung von IL-8 (C - E) und TNFα (F, G) wurde nach 16 h für MUTZ-3-Zellen (C, F, jeweils $0,5 \times 10^6$ /ml) oder nach 8 h für PBMC (D, G) und PMN (E, jeweils 1×10^6 /ml) mittels ELISA quantifiziert. (H) Der oxidative Burst von PMN (1×10^6 /ml) wurde mit DCFH-DA nach 90 min bestimmt. Dargestellt sind die kumulierten Werte (C, F) oder ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten plus SD. nd, nicht detektierbar. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

und die TNF α -Ausschüttung fast komplett unterdrückt, was eindeutig belegt, dass beide Kinasen für den Synergieeffekt von TREM-1 und TLR4 wichtig sind. Im Gegensatz zur Stimulation von TREM-1 war die Freisetzung von IL-8 jedoch nicht vollständig inhibiert. Dies legt den Schluss nahe, dass noch andere Signalwege bei kombinierter Stimulation von TREM-1 und TLR4 aktiviert werden müssen.

Beim Vergleich der erhaltenen MUTZ-3-Daten mit denen für primäre Monozyten (siehe Abb. 14 B, D und G) zeigten sich prinzipielle Ähnlichkeiten. Die Kologation von TREM-1 und TLR4 verstärkte die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK und die Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK verminderte die Phosphorylierung von Akt, aber nicht die von p38-MAPK (siehe Abb. 14 B). Zudem reduzierten beide Inhibitoren die TLR4-gesteigerte Ausschüttung von IL-8 und TNF α nach TREM-1-Aktivierung (siehe Abb. 14 D und G). In PMN kann die TREM-1 induzierte Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK sowie der oxidative Burst durch TLR4-Stimulation gesteigert werden. Die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK erfolgt dabei unabhängig voneinander.^[109] Durch Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK wird zudem der oxidative Burst vermindert (siehe Abb. 14 H).^[109] Wie in den monozytären Zellen führte die Kostimulation von TREM-1 und LPS zu einer gesteigerten IL-8-Freisetzung (siehe Abb. 14 E). Es konnte jedoch kein TNF α detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK verminderte wie in monozytären Zellen die IL-8-Ausschüttung.

Die Stimulation mit LPS induziert unter anderem die Translokation vom Transkriptionsfaktor NF κ B in den Zellkern, wodurch unterschiedliche inflammatorische Mediatoren transkribiert werden.^[70,74] Um den Einfluss von TREM-1 und TLR4 auf die Aktivierung von NF κ B zu analysieren, wurde in MUTZ-3-Zellen ein Reportergenkonstrukt für NF κ B eingebracht, über das anschließend die NF κ B-Aktivität via Lumineszenz quantifiziert werden kann. Anschließend wurden die transient transfizierten MUTZ-3-Zellen mit anti-TREM-1 bzw. Kontroll-Antikörper in Ab- und Anwesenheit von LPS stimuliert und die NF κ B-Aktivität quantifiziert.

Wie in Abb. 15 A gezeigt, induziert die Stimulation mit LPS die Transkription von NF κ B. Zudem führte die Stimulation von TREM-1 allein zu einer NF κ B-Aktivierung, verglichen mit dem Kontroll-Antikörper. Diese wurde durch Kologation von TLR4 noch gesteigert. Da bei TREM-1-Stimulation über Ca²⁺ der Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert wird (siehe Kap. 5.1.4), wurde die NFAT-Aktivierung nach Stimulation von TREM-1 und TLR4 untersucht (siehe Abb. 15 B). Die TREM-1-spezifische Aktivierung von NFAT konnte

überraschenderweise durch Kologation mit TLR4 gesteigert werden, was auf synergistische Effekte zwischen TREM-1 und TLR4 hinweist. Die TLR4-Stimulation allein hatte keinen Einfluss auf die NFAT-Aktivierung.

Abb. 16 A zeigt, dass in MUTZ-3-Zellen die Stimulation von TREM-1 oder NLR die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK induziert. Bei Kologation konnten nur kooperative Effekte für die p38-MAPK-Phosphorylierung detektiert werden, jedoch nicht für die Akt-Phosphorylierung. Dabei führte die Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK zur verminderten Akt- und p38-MAPK-Phosphorylierung. Bei Kologation von NLR und TREM-1 wurde zudem eine erhöhte IL-8-Ausschüttung detektiert (siehe Abb. 16 C). Eine Freisetzung von TNF α , wie für Monozyten beschrieben^[198], wurde nicht gefunden (Daten nicht gezeigt). Die IL-8-Freisetzung wurde durch PI3K- oder p38-MAPK-Inhibierung verhindert, was belegt, dass beide Kinasen bei der NLR-gesteigerten TREM-1-Aktivierung wichtige Regulatoren sind.

Die bei Kologation von NLR und TREM-1 detektierten Effekte in MUTZ-3-Zellen waren in Monozyten noch eindeutiger zu sehen. So induzierte die Stimulation von TREM-1 in Monozyten die Akt- und p38-MAPK-Phosphorylierung und die Kologation mit NLR führte zur verstärkten p38-MAPK-Phosphorylierung (siehe Abb. 16 B). Bei gleichzeitiger Stimulation von TREM-1 und NLR wurde die Phosphorylierung von Akt durch Inhibierung

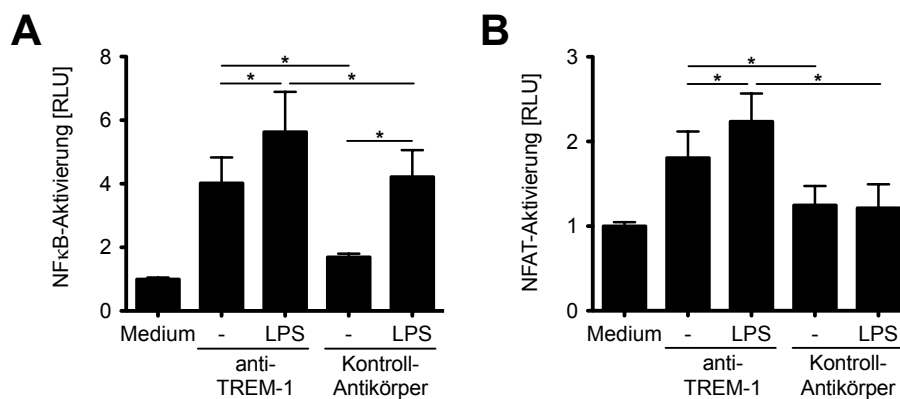


Abbildung 15: Die TREM-1-abhängige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und NFAT wird durch Kostimulation von TLR4 gesteigert. Die Reportergenkonstrukte für NF κ B (A) oder NFAT (B) wurden mittels Elektroporation in MUTZ-3-Zellen eingebracht. Anschließend wurden die Zellen (0.5×10^6 /ml) mit Plastik-coated anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper (jeweils $10 \mu\text{g/ml}$) in Ab- und Anwesenheit vom TLR4-Agonisten LPS (100 ng/ml) inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und mittels Dual-Luziferase-Reporterassay analysiert. Gezeigt sind die kumulierten Daten von drei unabhängigen Versuchen, jeweils normiert auf die unbehandelte Kontrolle (Medium) als RLU (engl.: *relative luciferase units*) plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

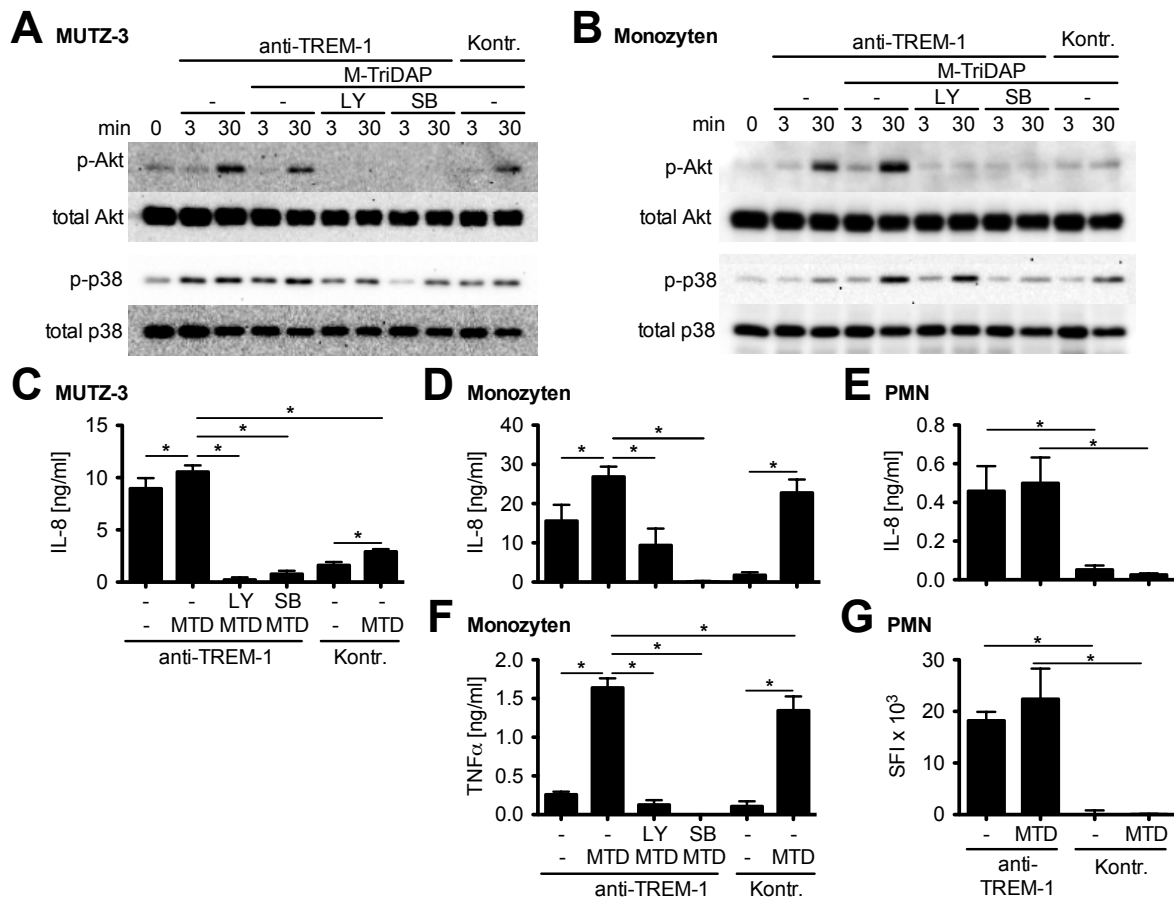


Abbildung 16: PI3K und p38-MAPK sind wichtige regulatorische Moleküle der durch NLR gesteigerten TREM-1-Aktivierung. MUTZ-3-Zellen (A, C), Monozyten (B, D, F) oder PMN (E, G) wurden mit an Plastik gecoatetem anti-TREM-1 oder Kontroll-Antikörper (jeweils 10 μ g/ml) in Ab- oder Anwesenheit vom NLR-Agonisten M-TriDAP (MTD, 10 μ g/ml) und den Inhibitoren für PI3K (LY294002, LY) oder p38-MAPK (SB203580, SB) stimuliert. (A, B) Die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK wurde auf MUTZ-3-Zellen (A) oder Monozyten (B, jeweils 1 \times 10⁶/ml) nach 3 und 30 min analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives, von zwei unabhängigen Experimenten. (C - F) Die Ausschüttung von IL-8 (C - E) und TNF α (F) wurde nach 16 h für MUTZ-3-Zellen (C, 0,5 \times 10⁶/ml) oder nach 8 h für Monozyten (D, F) und PMN (E, jeweils 1 \times 10⁶/ml) mittels ELISA quantifiziert. (F) Der oxidative Burst von PMN (1 \times 10⁶/ml) wurde mit DCFH-DA nach 90 min bestimmt. Dargestellt sind die kumulierten Werte (C) oder eine repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

von PI3K oder p38-MAPK verhindert. Im Gegensatz zu MUTZ-3-Zellen wurde jedoch das p38-MAPK-Signal nicht vom PI3K-Inhibitor beeinflusst. Übereinstimmend mit den MUTZ-3-Daten induzierte die Kolligation von TREM-1 und NLR eine gesteigerte IL-8-Freisetzung (siehe Abb. 16 D und F). Monozyten schütteten zudem noch verstärkt $\text{TNF}\alpha$ aus. Die Freisetzung von IL-8 und $\text{TNF}\alpha$ wurde durch Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK vermindert. Es wurden somit ähnliche Resultate in MUTZ-3-Zellen und Monozyten erhalten und die beiden Kinasen PI3K und p38-MAPK sind ebenfalls wichtige Regulatoren bei der synergistischen Stimulation von TREM-1 und NLR.

Um die erhaltenen Daten der NLR-TREM-1-Kostimulation für monozytäre Zellen in PMN zu validieren, wurden letztere wie die monozytären Zellen stimuliert. Durch Kolligation konnte jedoch weder die Ausschüttung von IL-8 (siehe Abb. 16 E) noch der oxidative Burst (siehe Abb. 16 G) gesteigert werden. Auch ergaben sich keine Effekte durch Stimulation von NLR.

Zusammenfassend beweisen diese Daten, dass PI3K und p38-MAPK zentrale Regulatoren der TREM-1-Signalkaskade sowohl in monozytären Zellen als auch in PMN sind und beide Kinasen die durch TLR- oder NLR-Kolligation gesteigerte TREM-1-Aktivierung steuern. In der exakten Signalhierarchie ergaben sich aber Unterschiede zwischen monozytären und granulozytären Zellen. In MUTZ-3-Zellen und Monozyten erfolgt die Aktivierung von p38-MAPK vor der Akt-Phosphorylierung, wohingegen in PMN PI3K und p38-MAPK unabhängig voneinander aktiviert werden. Außerdem ist die TREM-1-abhängige Ca^{2+} -Mobilisierung in PMN nur von PI3K abhängig und in monozytären Zellen von PI3K und p38-MAPK.

5.2 PMN sind essentiell für das Überleben von *A. fumigatus*-Infektionen

Um den Einfluss der PMN sowie ihrer Effektorfunktionen bei der Abwehr von *A. fumigatus* Infektionen zu analysieren, wurde ein Mausmodell für invasive Aspergillose (IA) etabliert. Da immunkompetente Mäuse normalerweise eingedrungene *A. fumigatus*-Konidien abtöten können^[158,189,199,200], dienten als Kontrolle Wildtypmäuse, bei denen die PMN durch Verabreichung eines Antikörpers depletiert wurden. Hierfür werden in der Literatur folgende monoklonale Antikörper verwendet: anti-Gr-1 (Klon RB6-8C5) und anti-Ly6G (Klon 1A8).^[45,172,201] Dabei depletiert der anti-Gr-1 im Gegensatz zu anti-Ly6G neben PMN auch andere Gr-1 positive Zellen, wie Gr-1-exprimierende Monozyten.^[202]

Die Verabreichung der Antikörper führte über vier Tage zur effektiven Depletion der PMN im Blut, die im FACS als CD11b^{high} Gr-1⁺ Population charakterisiert werden können (siehe Abb. 17 A). Da die behandelten Mäuse keine PMN mehr aufwiesen, werden sie im Folgenden als neutropen bezeichnet.

Um das Mausmodell für IA zu validieren, wurden Wildtypmäuse und neutropene Mäuse mit *A. fumigatus* infiziert. Wildtypmäuse zeigten zwar klinische Symptome für eine Erkrankung, überlebten aber alle die Infektion (siehe Abb. 17 B). Die Neutropenie von

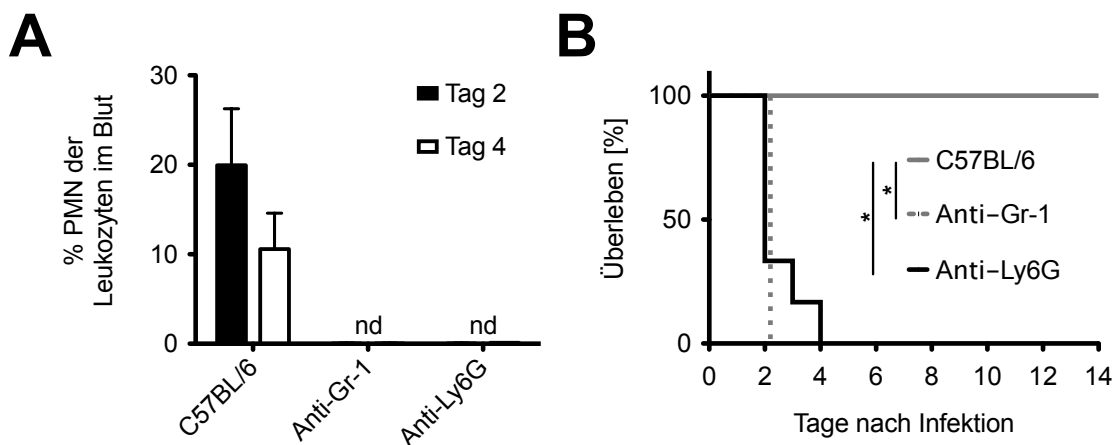


Abbildung 17: *A. fumigatus*-Infektionen sind nicht letal für Wildtypmäuse, aber letal für PMN-depletierte Mäuse. Den Mäusen wurden anti-Gr-1 (150 μ g, Klon RB6-8C5) oder anti-Ly6G (500 μ g, Klon 1A8) i.p. verabreicht. (A) Der PMN-Anteil (CD11b^{high}Gr-1⁺) der Leukozyten (CD45⁺) wurde im Blut an Tag zwei und vier nach Antikörpergabe im FACS quantifiziert. (B) Mäuse wurden 24 h nach Antikörpergabe i.t. mit 10^7 *A. fumigatus*-Konidien infiziert und das Überleben 14 Tage beobachtet. Gezeigt sind die kumulierten Daten von zwei unabhängigen Versuchen (C57BL/6 n = 7, C57BL/6 + anti-Gr-1 bzw. anti-Ly6G n = 6). (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet mit dem Mantel-Cox-Test.

Mäusen resultierte dagegen in einer 100 % Mortalität innerhalb von vier Tagen, was zeigt, wie essentiell PMN bei der Abwehr von Pilzerkrankungen sind. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Verlauf und Kinetik zwischen der PMN-Depletion mit anti-Gr-1 und anti-Ly6G. Deswegen wurden in allen nachfolgenden Experimenten die PMN mit anti-Gr-1 depletiert.

5.3 Der oxidative Burst ist im Gegensatz zu neutrophiler Elastase essentiell bei der Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen

5.3.1 Der oxidative Burst, aber nicht neutrophile Elastase, ist essentiell für das Überleben von *A. fumigatus*-Infektionen

Um die Relevanz von oxidativen sowie nicht oxidativen PMN-Effektorfunktionen bei IA zu analysieren, wurden $p47^{\text{phox-/-}}$, $gp91^{\text{phox-/-}}$ und neutrophile Elastase-defiziente ELANE Mäuse mit *A. fumigatus* infiziert. In $p47^{\text{phox-/-}}$ bzw. $gp91^{\text{phox-/-}}$ Mäusen fehlt die zytosolische $p47^{\text{phox}}$ bzw. membranständige $gp91^{\text{phox}}$ Untereinheit des NADPH-Oxidase-Komplexes, weswegen die Zellen in diesen Mäusen keinen oxidativen Burst induzieren können. Die neutrophile Elastase ist ein wichtiger Bestandteil von PMN ausgeschütteten NETs, welche unter anderem wichtig für die Pilzabwehr sind.^[203]

Wie in Abb. 18 A dargestellt, war die Infektion mit *A. fumigatus* für Wildtypmäuse nicht letal. Neutropene Mäuse starben dagegen alle innerhalb von drei Tagen. Infizierte $p47^{\text{phox-/-}}$ und $gp91^{\text{phox-/-}}$ Mäuse wiesen eine 100 % Mortalität innerhalb von vier Tagen auf, wobei die Kinetik in etwa derer, neutropener Mäuse entsprach. Die Infektion von ELANE Mäusen resultierte in klinischen Symptomen einer Erkrankung, die Mäuse starben jedoch nicht (siehe Abb. 18 B).

Zum Nachweis der Invasivität der Pilzinfektion sowie der Pneumonie wurden Lungenschnitte 24 h nach Infektion angefertigt (siehe Abb. 18 C). Durch die Färbung mit H&E konnten Hyperämie und starke Infiltration von Zellen in allen infizierten Mäusen nachgewiesen werden, welche alle Anzeichen für eine akute Pneumonie darstellen. Um invasiv wachsende *A. fumigatus*-Hyphen zu quantifizieren, wurde eine Grocott-Färbung durchgeführt. In allen infizierten Mäusen konnten Pilze nachgewiesen werden. Dabei war die Invasivität des Pilzes in den $p47^{\text{phox-/-}}$ und $gp91^{\text{phox-/-}}$ Mäusen im Vergleich zu neutropenen Mäusen höher.

Ob eine verminderte Infektionskontrolle die gezeigten Unterschiede im Überleben verursacht, wurde durch Analyse von Lungenhomogenaten überprüft. Dafür wurden diese in Verdünnungsreihen auf Sabouraud-Dextrose-Agarplatten ausgestrichen und die Anzahl vitaler Pilze in der Lunge anhand von CFUs (engl.: *colony-forming units*) quantifiziert. Im Wildtypstamm C57BL/6 wurde eine signifikant höhere Pilzbelastung im Vergleich zum Wildtypstamm 129/Sv/Pas gemessen (siehe Abb. 19), was auf stammspezifische

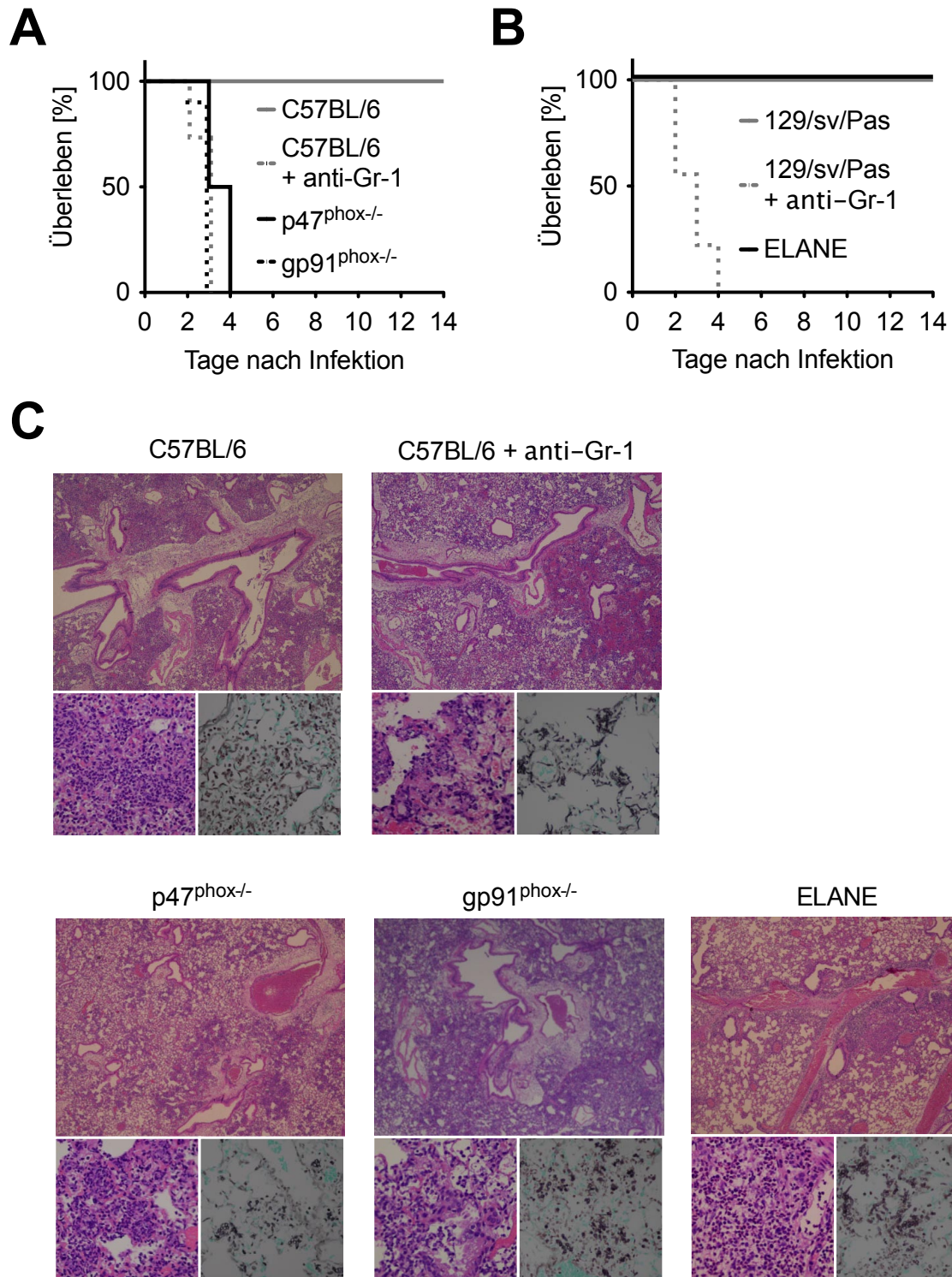


Abbildung 18: *A. fumigatus*-Infektionen sind letal für p47^{phox}^{-/-} und gp91^{phox}^{-/-} Mäuse, aber nicht für ELA-defiziente (ELANE) Mäuse. Die Mäuse wurden i.t. mit 10⁷ *A. fumigatus*-Konidien infiziert, wobei ein Tag vorher anti-Gr-1 (150 µg i.p.) verabreicht wurde. (A, B) Das Überleben der Mäuse wurde 14 Tage beobachtet. Gezeigt sind die kumulierten Ergebnisse von zwei (p47^{phox}^{-/-}, gp91^{phox}^{-/-} und 129/Sv/Pas n = 10, 129/Sv/Pas + anti-Gr-1 n = 9, ELANE n = 8) oder vier unabhängigen Experimenten (C57BL/6 n = 13, C57BL/6 + anti-Gr-1 n = 15). (C) 24 h nach Infektion wurden die Lungen präparativ entfernt und Paraffinschnitte von der Core Facility Histologie (Universitätsmedizin Mainz) angefertigt und angefärbt (H&E-Färbung: 40x Vergrößerung, linkes Inlay mit 200x Vergrößerung; Grocott-Färbung: rechtes Inlay mit 200x Vergrößerung).

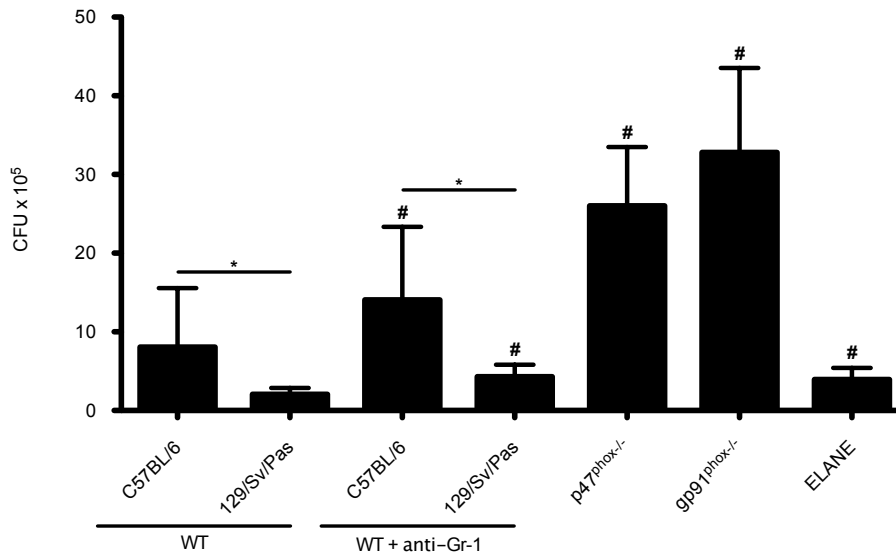


Abbildung 19: p47^{phox-/-}, gp91^{phox-/-} und ELANE Mäuse weisen nach Infektion mit *A. fumigatus* ein erhöhtes Pilzwachstum in der Lunge auf. Mäuse wurden i.t. mit 10^7 *A. fumigatus*-Konidien infiziert, wobei ein Tag vorher anti-Gr-1 (150 μ g i.p.) verabreicht wurde. 24 h später wurden Lungenhomogenate ausgestrichen, um mittels CFUs (engl.: *colony-forming units*) die Pilzbelastung zu quantifizieren. Gezeigt sind die kumulierten Ergebnisse von zwei (p47^{phox-/-} n = 6), drei (129/Sv/Pas n = 7, 129/Sv/Pas + anti-Gr-1 n = 8, ELANE n = 7) oder vier unabhängigen Versuchen (C57BL/6 n = 8, C57BL/6 + anti-Gr-1 n = 10, gp91^{phox-/-} n = 12) plus SD. (*, #) zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), wie gekennzeichnet (*), oder zur Wildtypkontrolle (#), berechnet durch einen two-tailed Student's-*t*-Test.

Unterschiede beim Abtöten von *A. fumigatus* hinweist. Die Depletion der PMN bei beiden Wildtypstämmen resultierte in einer ca. doppelt so hohen Pilzlast, verglichen mit dem Wildtyp. In p47^{phox-/-} und gp91^{phox-/-} Mäusen war die Pilzbelastung sogar noch höher als in neutropenen Mäusen, sie entsprach ungefähr dem Drei- bis Vierfachen vom Wildtyp. Dies belegt die wichtige Rolle des NADPH-Oxidase-Komplexes beim Abtöten von eingedrungenen Pilzen. In ELANE Mäusen wurde eine doppelt so hohe Pilzmenge im Vergleich zur Wildtypkontrolle detektiert, die in etwa derer, neutropener Mäuse entsprach. Dies beweist, dass die neutrophile Elastase ebenfalls eine wichtige Komponente der Pilzabwehr darstellt.

5.3.2 Die Defizienz im oxidativen Burst oder neutrophiler Elastase hat keinen Einfluss auf Rekrutierung und Aktivierung von PMN bei *A. fumigatus*-Infektionen

Die Rekrutierung und Aktivierung der PMN ist für die Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen essentiell.^[158,172,189,199–201] Aus diesem Grund wurde die Einwanderung

und der Phänotyp der PMN im Blut und in der Lunge 24 h nach Infektion analysiert. Im Blut von *A. fumigatus*-infizierten Mäusen konnte eine erhöhte Anzahl an PMN im Vergleich zu Kontrollmäusen detektiert werden, denen anstatt Konidien Wasser verabreicht wurde (siehe Abb. 20 A). Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen infizierten $p47^{\text{phox-/-}}$, $gp91^{\text{phox-/-}}$, ELANE und Wildtypmäusen. Zur Qualifikation des PMN-Aktivierungsstatus wurden die Oberflächenmarker CD11b und CD62L analysiert. CD11b ist ein Degranulationsmarker, der bei PMN-Aktivierung hoch reguliert wird, und das Selektin CD62L ist ein Adhäsionsmolekül, welches konstitutiv hoch exprimiert wird

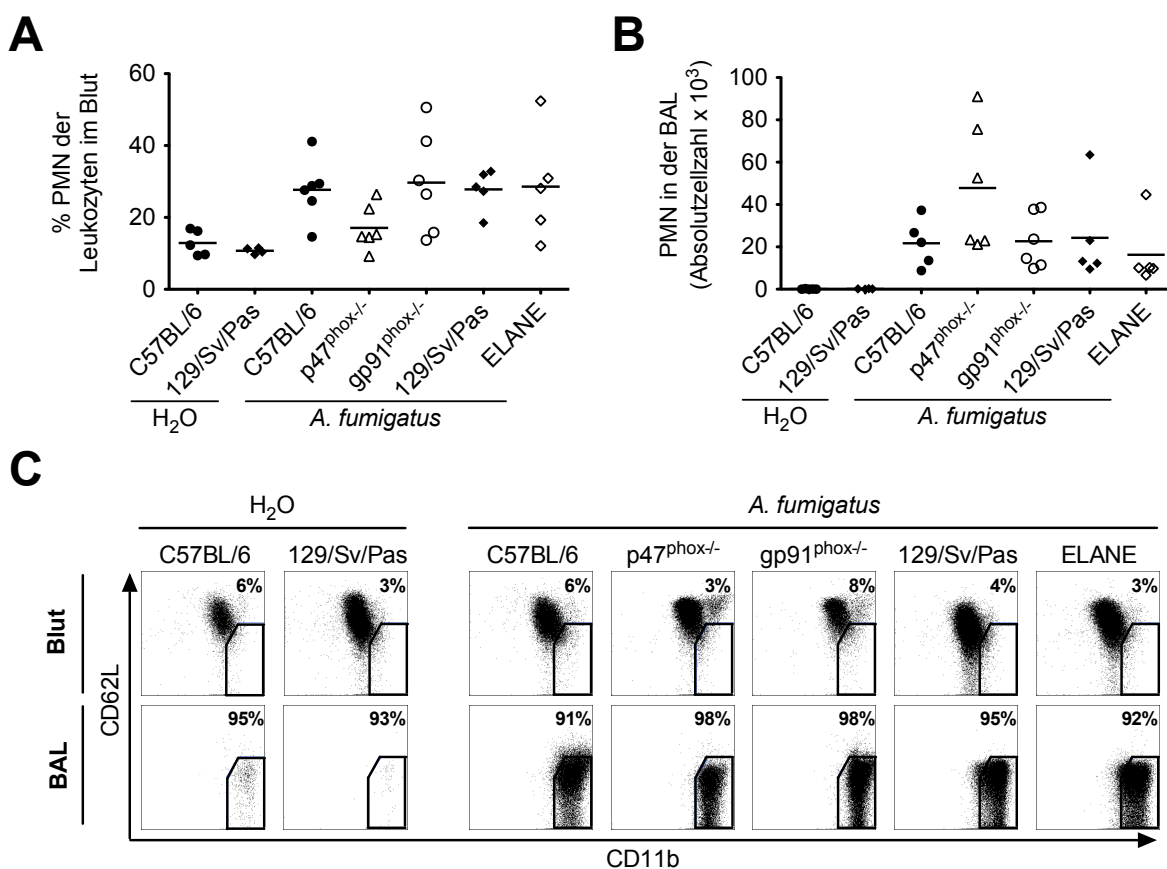


Abbildung 20: *A. fumigatus*-Infektion von $p47^{\text{phox-/-}}$, $gp91^{\text{phox-/-}}$ und ELANE Mäuse resultiert in normaler Rekrutierung und Aktivierung von PMN in die Lunge. Mäuse wurden mit 10^7 *A. fumigatus*-Konidien oder Wasser i.t. infiziert. 24 h später wurde das Blut und die BAL mittels FACS analysiert. (A, B) Der prozentuale Anteil der PMN ($\text{CD11b}^{\text{high}} \text{Gr-1}^+$) im Blut (A) und die PMN-Gesamtzahl in der BAL (B) wurde quantifiziert. (C) Zudem wurde das Shedding von CD62L und die Regulierung vom Degranulationsmarker CD11b auf PMN (Gr-1^+) analysiert. Gezeigt sind die kumulierten Werte plus SD (A, B) oder ein repräsentatives Ergebnis von zwei (Wasser-behandelte C57BL/6 $n = 5$ und 129/Sv/Pas $n = 4$; *A. fumigatus*-behandelte $p47^{\text{phox-/-}}$ und $gp91^{\text{phox-/-}}$ $n = 6$, 129/Sv/Pas und ELANE $n = 5$) oder drei unabhängigen Versuchen (*A. fumigatus*-behandelte C57BL/6 [Blut] $n = 6$ bzw. [BAL] $n = 5$). Ein one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest ergab keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen *A. fumigatus*-behandelten Mäusen.

und bei PMN-Aktivierung durch enzymatisches Shedding abgetrennt wird. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Blut für CD11b und CD62L zwischen PMN von infizierten p47^{phox}^{-/-}, gp91^{phox}^{-/-}, ELANE und Wildtypmäusen detektiert werden (siehe Abb. 20 C).

Das Einatmen von *A. fumigatus*-Konidien induziert eine schnelle Einwanderung von PMN in die Lunge.^[204–206] Um dies nachzuweisen, wurde die Anzahl der PMN in der Lunge mittels bronchoalveoläre Lavage (BAL) 24 h nach Infektion quantifiziert. In allen infizierten Tieren kam es zu einer starken Einwanderung von PMN im Vergleich zu mit Wasser behandelten Mäusen (siehe Abb. 20 B), wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten p47^{phox}^{-/-}, gp91^{phox}^{-/-}, ELANE und Wildtypmäusen beobachtet wurden. Vergleicht man den Aktivierungsstatus der PMN in Blut und BAL, so ist eine starke Hochregulierung von CD11b und ein fast vollständiger Verlust der CD62L-Expression der BAL-PMN ersichtlich. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen p47^{phox}^{-/-}, gp91^{phox}^{-/-}, ELANE und Wildtypmäusen. D. h. p47^{phox}^{-/-}, gp91^{phox}^{-/-} und ELANE Mäuse weisen keine Defekte hinsichtlich Rekrutierung und Aktivierung von PMN nach Infektion mit *A. fumigatus* auf.

5.3.3 Die Defizienz im oxidativen Burst oder neutrophiler Elastase hat keinen zusätzlichen Einfluss auf die PMN-Effektorfunktionen

Um einen generellen Defekt der PMN und ihrer Effektormechanismen in den verwendeten Mausstämmen auszuschließen, wurden aus dem Knochenmark isolierte PMN mit dem Phorbolster PMA, der über Anbindung an die Proteinkinase C aktiviert, und dem Formylpeptid-Rezeptor-Agonisten WKYMVm *in vitro* stimuliert. Anschließend wurde der oxidative Burst, Phagozytose, Degranulation und CD62L-Shedding analysiert.

In den PMN aus ELANE und Wildtypmäusen induzierte die Stimulation mit PMA und WKYMVm den oxidativen Burst (siehe Abb. 21 A und B), der erwartungsgemäß in PMN aus p47^{phox}^{-/-} und gp91^{phox}^{-/-} Mäusen^[163–165] nicht ausgelöst wurde. Die Stimulation mit PMA oder WKYMVm führte in allen PMN zu einer erhöhten Phagozytose von PE-markierten Polystyrolpartikeln sowie zur Hochregulierung vom Degranulationsmarker CD11b und zum Shedding von CD62L, wobei keine Unterschiede zwischen p47^{phox}^{-/-}, gp91^{phox}^{-/-}, ELANE und Wildtypmäuse gemessen wurden (siehe Abb. 21 C und D). Nur Stimulation mit PMA resultierte in einer verminderten Hochregulierung von CD11b bei PMN aus p47^{phox}^{-/-} und gp91^{phox}^{-/-} Mäusen verglichen mit dem Wildtyp.

Um einen Defekt anderer Signalwege bei der Erkennung von Pilzen in p47^{phox}^{-/-}, gp91^{phox}^{-/-}

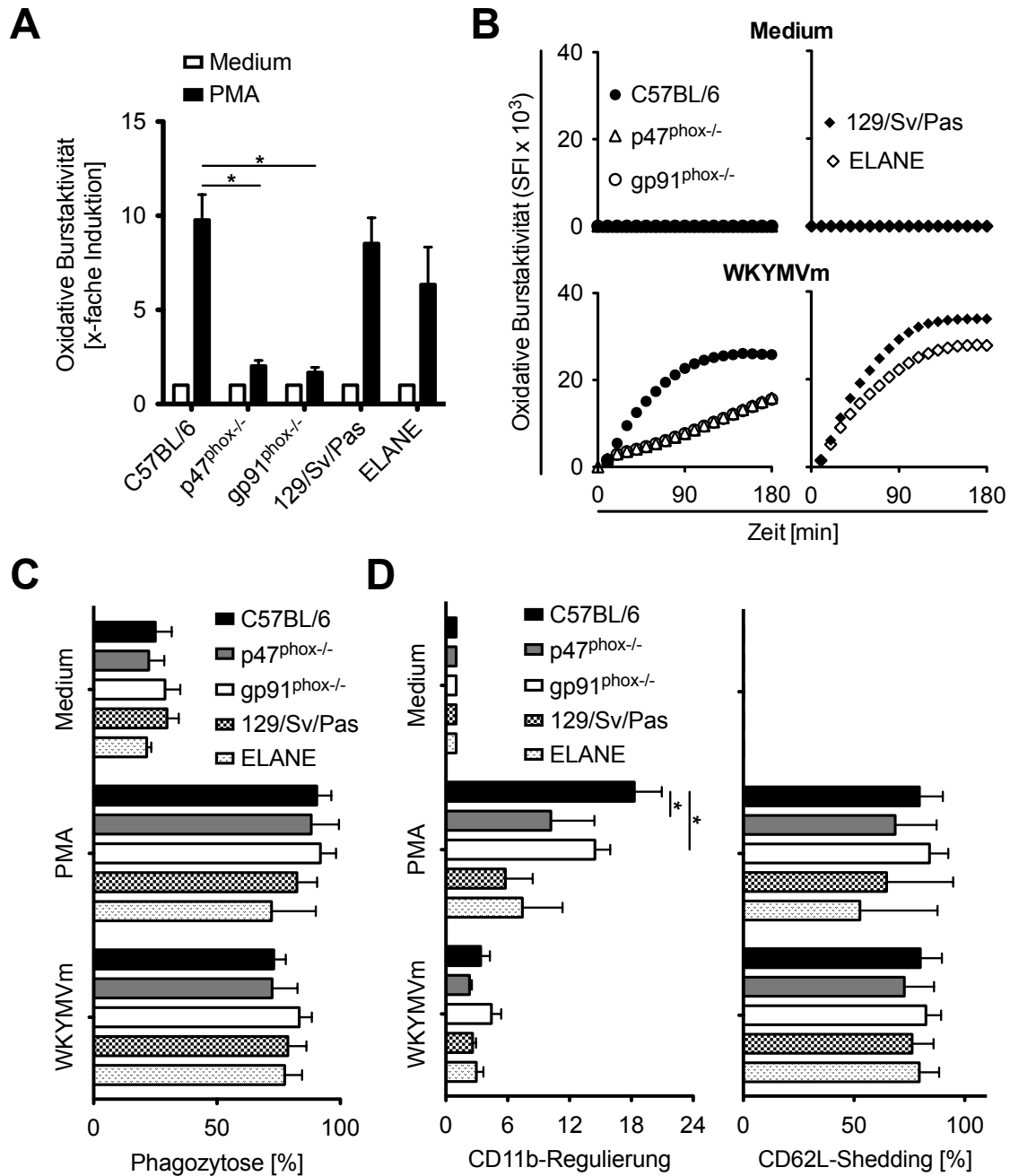


Abbildung 21: PMN aus p47^{phox-/-}, gp91^{phox-/-} und ELANE Mäusen zeigen keine Dysfunktion in ihrer Aktivierung. PMN aus dem Knochenmark (10⁶/ml) wurde mit PMA (50 ng/ml) oder WKYMVm (8 µg/ml) stimuliert. (A) Der oxidative Burst wurde mittels DHR in An- und Abwesenheit von PMA nach 30 min gemessen. Gezeigt sind die kumulierten Resultate von zwei unabhängigen Versuchen gemessen in Duplikaten plus SD (n = 2). (B) Der oxidative Burst wurde mit DCFH-DA in An- und Abwesenheit von WKYMVm über die Zeit gemessen. Gezeigt sind die kumulierten Resultate von drei unabhängigen Versuchen, gemessen in Duplikaten (C57BL/6, p47^{phox-/-}, gp91^{phox-/-} und 129/Sv/Pas n = 5, ELANE n = 7). (C) Die Phagozytose von PE-markierten Polystyrolpartikeln wurde nach 4 h im FACS quantifiziert. (D) Das Shedding von CD62L und die Regulierung von CD11b relativ zu unbehandelten PMN (Gr-1⁺) wurde im FACS nach 4 h analysiert. Gezeigt sind die kumulierten Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen (C57BL/6, p47^{phox-/-}, gp91^{phox-/-} und 129/Sv/Pas n = 5, ELANE n = 6) plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied (p < 0,05), berechnet durch einen two-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

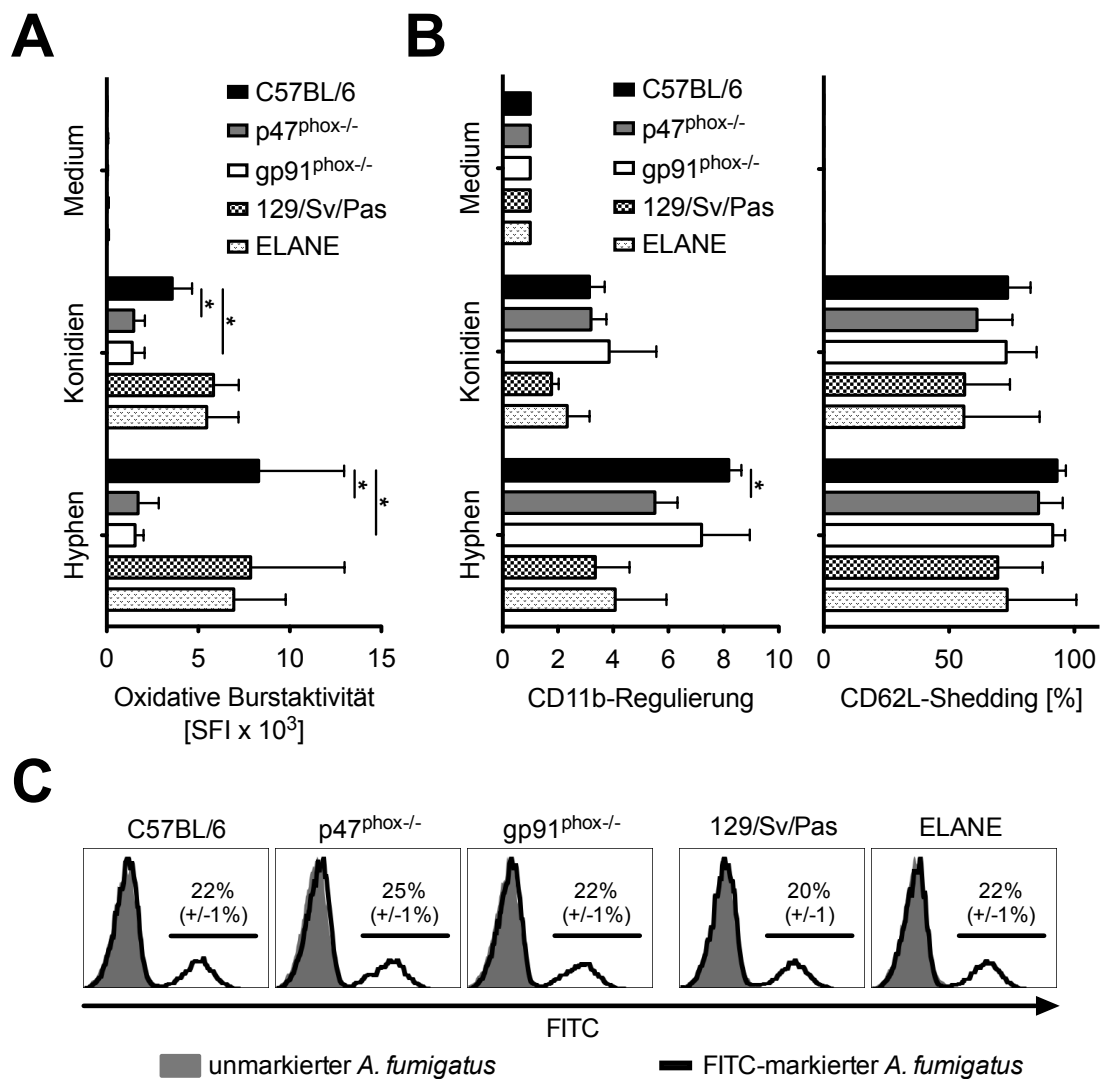


Abbildung 22: PMN von p47^{phox}^{-/-}, gp91^{phox}^{-/-} und ELANE Mäusen zeigen keinen Defekt in Phagozytose von Konidien oder Aktivierung nach Kontakt mit *A. fumigatus*. PMN aus dem Knochenmark (10^6 /ml) wurden mit *A. fumigatus*-Konidien oder Hyphen stimuliert. (A) Die oxidative Burstaktivität wurde mittels DCFH-DA nach 90 min quantifiziert. Gezeigt sind die kumulierten Resultate von drei unabhängigen Versuchen, gemessen in Duplikaten (C57BL/6, p47^{phox}^{-/-}, gp^{phox}^{-/-} und 129/Sv/Pas n = 5, ELANE n = 7) plus SD. (B) Nach 4 h Inkubation wurden das Shedding von CD62L und die Regulierung von CD11b auf PMN (Gr-1⁺) relativ zu unbehandelten Zellen im FACS gemessen. Abgebildet sind die kumulierten Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (C57BL/6, p47^{phox}^{-/-} und gp91^{phox}^{-/-} n = 5, 129/Sv/Pas n = 7, ELANE n = 8). (C) Die Phagozytose von FITC-markierten *A. fumigatus*-Konidien wurde nach 1 h im FACS gemessen. Die Aufnahme von unmarkierten Konidien diente als Negativkontrolle. Gezeigt ist ein repräsentativer, von zwei unabhängigen Versuchen, gemessen in Triplikaten plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen two-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

und ELANE PMN zu eruieren, wurden diese *in vitro* mit *A. fumigatus*-Konidien und Hyphen stimuliert und die verschiedenen PMN-Effektormechanismen analysiert. Wie in Abb. 22 A dargestellt, induzierten *A. fumigatus*-Konidien und Hyphen den oxidativen Burst in PMN aus ELANE und Wildtypmäusen. In PMN aus $p47^{\text{phox-/-}}$ und $gp91^{\text{phox-/-}}$ -Mäusen wurde dieser, wie zu erwarten war^[163-165], nicht ausgelöst. Stimulation mit Konidien oder Hyphen führte zur Hochregulierung von CD11b und zum Shedding von CD62L in allen PMN (siehe Abb. 22 B). Nur bei $p47^{\text{phox-/-}}$ PMN wurde eine leicht verminderte CD11b-Hochregulierung nach Hyphenkontakt im Vergleich zum Wildtyp gemessen. Die Inkubation von PMN mit FITC-markierten *A. fumigatus*-Konidien führte zur Phagozytose dieser, wie in Abb. 22 C ersichtlich. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen PMN aus $p47^{\text{phox-/-}}$, $gp91^{\text{phox-/-}}$, ELANE und Wildtypmäusen.

Summa summarum konnten keine Defekte der PMN-Effektormechanismen in $p47^{\text{phox-/-}}$, $gp91^{\text{phox-/-}}$ und ELANE Mäusen nachgewiesen werden, bis auf die erwartete Dysfunktion des oxidativen Burst in $p47^{\text{phox-/-}}$ und $gp91^{\text{phox-/-}}$ PMN. Eine Ausnahme stellte dabei die leicht verminderte Degranulierung nach PMA-Stimulation in $p47^{\text{phox-/-}}$ und $gp91^{\text{phox-/-}}$ PMN und nach Stimulation mit Hyphen in $p47^{\text{phox-/-}}$ PMN dar.

5.3.4 Das Abtöten von *A. fumigatus*-Konidien ist abhängig von neutrophiler Elastase und dem oxidativen Burst

Um den direkten Einfluss von PMN aus $p47^{\text{phox-/-}}$, $gp91^{\text{phox-/-}}$ und ELANE Mäusen auf das Abtöten von Pilzen zu analysieren, wurden PMN mit *A. fumigatus*-Konidien 4 h inkubiert und anschließend die Pilzviabilität im Vergleich zu unbehandelten Konidien mittels kolorimetrischen XTT-Test quantifiziert.^[183] Wie in Abb. 23 zu sehen, führte die Inkubation mit Wildtyp-PMN zum Abtöten der Konidien. Im Gegensatz dazu kam es zu keiner signifikanten Reduzierung der Pilzviabilität bei Inkubation mit PMN aus $p47^{\text{phox-/-}}$, $gp91^{\text{phox-/-}}$ und ELANE Mäusen. Dies zeigt, dass oxidative als auch nicht oxidative Effektorfunktionen essentiell für das Abtöten von Pilzen sind.

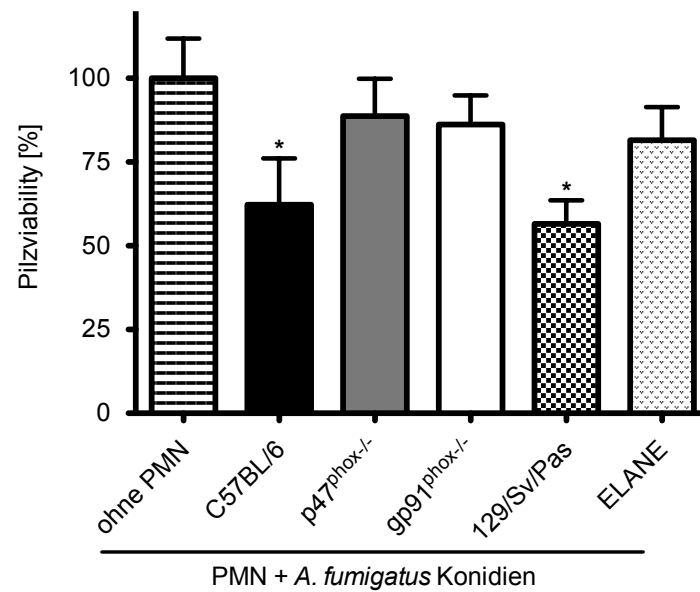


Abbildung 23: PMN aus p47^{phox}^{-/-}, gp91^{phox}^{-/-} und ELANE Mäusen zeigen ein reduziertes Abtöten von *A. fumigatus*-Konidien. Das Abtöten von *A. fumigatus*-Konidien durch aus dem Knochenmark isolierte PMN (10⁶/ml) wurde *in vitro* mittels kolorimetrischem XTT-Assay gemessen. Nach 4 h Inkubation wurden die PMN lysiert und die Konidien über Nacht ausgekeimt. Die Viabilität der resultierenden Hyphen wurde relativ zu unbehandelten Hyphen quantifiziert. Gezeigt ist ein repräsentatives Resultat von drei unabhängigen Versuchen, gemessen in Triplikaten plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zu unbehandelten Konidien, berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

5.4 Arginin beeinflusst die Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen nicht

Der Argininmetabolismus ist für viele immunologische Funktionen essenziell.^[207,208] So wird in Leukozyten *L*-Arginin durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) zu zytotoxischem, antimikrobiellen NO metabolisiert.^[209] Zudem können PMN durch Sekretion von Arginase-1, die *L*-Arginin zu *L*-Ornithin und Harnstoff abbaut, die Immunantwort modulieren.^[208] Zur Depletion von Arginin wurde eine Arginindeiminase (ADI) verwendet, die *L*-Arginin zu *L*-Citrullin konvertiert. Um die Halbwertszeit der ADI im Blut zu verlängern, war diese mit PEG (20.000 MW) gekoppelt (ADI-PEG).^[210] Um die Funktionalität der ADI-PEG zu testen, wurde Mäusen ADI-PEG i.p. verabreicht und dann der *L*-Argininingehalt im Plasma gemessen (siehe Abb. 24). Als Maß für das durch ADI-PEG umgewandelte *L*-Arginin wurde zudem das *L*-Citrullinlevel im Plasma quantifiziert. An Tag eins und vier nach Applikation war *L*-Arginin im Blut fast nicht nachweisbar (siehe Abb. 24 A). Zudem konnte nach einem Tag ein erhöhter *L*-Citrullingehalt im Blut verglichen mit unbehandelten Mäusen bestimmt werden, welcher nach vier Tagen nochmals anstieg (siehe Abb. 24 B). Dies zeigt, dass die Behandlung mit ADI-PEG Arginin selektiv depletiert.

Um den Einfluss von *L*-Arginin bei der Pilzabwehr zu untersuchen, wurden mit ADI-PEG behandelte Mäuse mit *A. fumigatus*-Konidien infiziert. Für Wildtypmäuse war die Infektion nicht letal, wohingegen neutropene Mäuse (anti-Gr-1) innerhalb von vier Tagen starben (siehe Abb. 25 A). Es konnten jedoch keine Unterschiede im Überleben zwischen ADI-PEG-behandelten und Wildmäusen oder zwischen ADI-PEG-behandelten, neutropenen

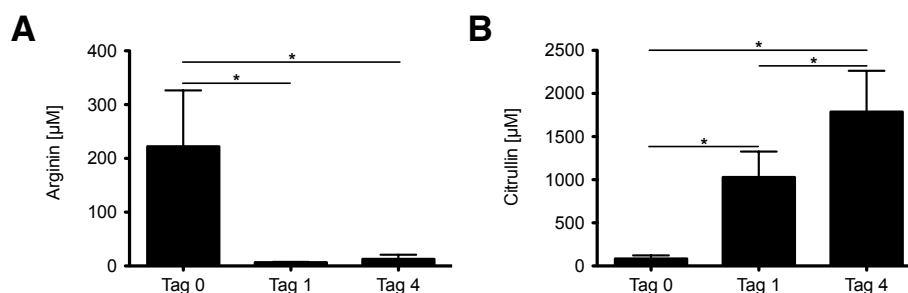


Abbildung 24: Die Verabreichung von ADI-PEG führt zur effektiven Depletion von Arginin im Blut. DI-PEG (5 IU) wurden i.p. injiziert. (A, B) Der Arginin- (A) und Citrullin-Gehalt (B) im Mausplasma wurde von der Arbeitsgruppe Closs (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz) mittels Kationenaustausch-HPLC und anschließender Quantifizierung durch einen automatischen Aminosäureanalysator bestimmt. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

und neutropenen Mäusen beobachtet werden. Zusätzlich wurde 24 h nach Infektion die Anzahl vitaler Pilze in der Lunge quantifiziert. Neutropene Mäuse wiesen eine doppelt so hohe Pilzbelastung im Vergleich zu Wildtypmäusen auf (siehe Abb. 25 B). Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen ADI-PEG-behandelten und unbehandelten Tieren, was darauf hinweist, dass die Depletion von *L*-Arginin die Beseitigung von pulmonalen *A. fumigatus*-Infektionen nicht beeinflusst. Zur Kontrolle der *L*-Arginin-Depletion wurde zusätzlich in

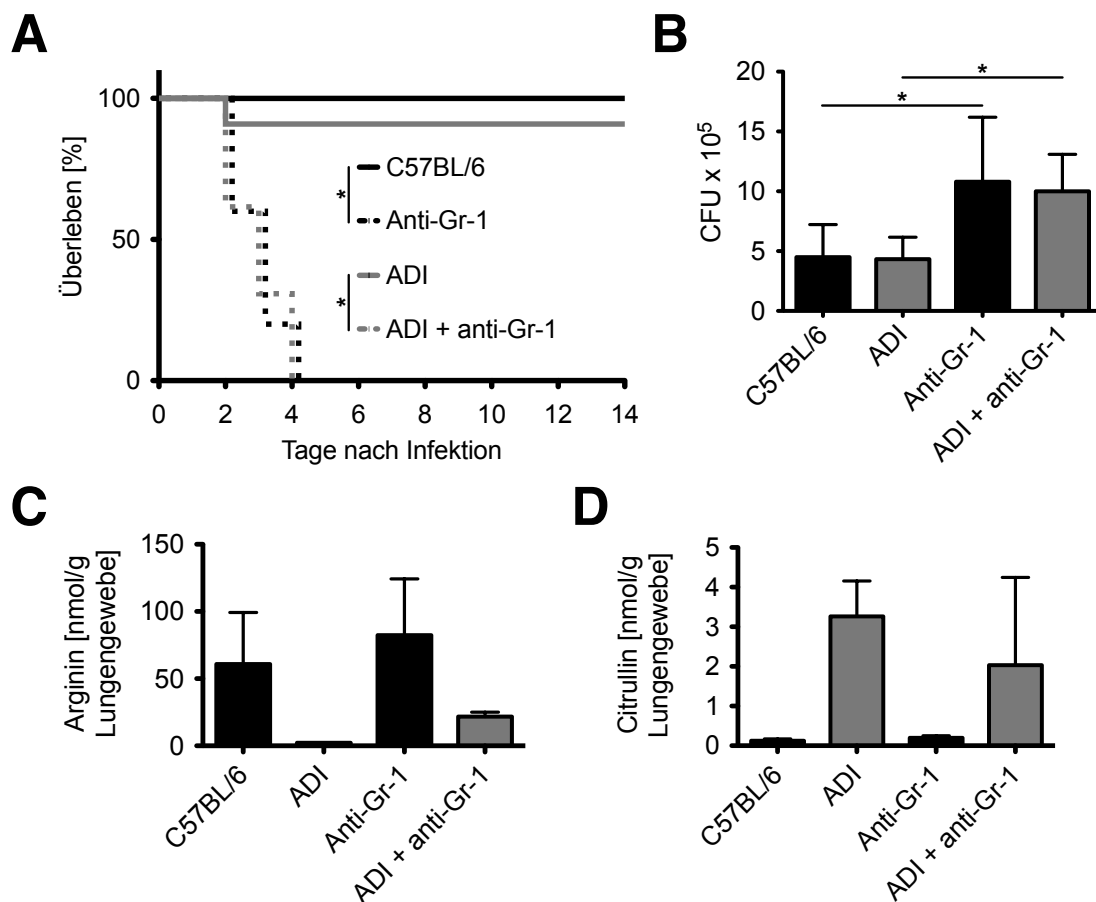


Abbildung 25: Die Depletion von Arginin hat keinen Einfluss auf die Beseitigung von *A. fumigatus*-Infektionen der Lunge. 24 h vor i.t. Infektion mit 10^7 *A. fumigatus*-Konidien wurden 5 IU ADI-PEG (ADI) i.p. bzw. anti-Gr-1 (150 μ g) verabreicht. (A) Das Überleben der Mäuse wurde 14 Tage beobachtet. Gezeigt sind die kumulierten Daten von zwei unabhängigen Versuchen (C57BL/6 und anti-Gr-1 $n = 10$, ADI $n = 11$ und ADI + anti-Gr-1 $n = 12$). (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet mit dem Mantel-Cox-Test. (B) 24 h nach Infektion wurden Lungenhomogenate ausgestrichen, um mittels CFU (engl.: *colony-forming units*) die Pilzbelastung zu quantifizieren. Gezeigt sind die kumulierten Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen (C57BL/6 $n = 4$, anti-Gr-1 und ADI + anti-Gr-1 $n = 5$, ADI $n = 6$). (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest. (C, D) Nach 24 h wurde die Lunge von der Arbeitsgruppe Closs (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz) hinsichtlich Arginin- (C) und Citrullin-Gehalt (D) analysiert.

den infizierten Lungen die *L*-Arginin- und *L*-Citruillinkonzentration bestimmt (siehe Abb. 25C und D). In den ADI-PEG behandelten Mäusen wurde eine reduzierte *L*-Arginin- und eine erhöhte *L*-Citruillinkonzentration, verglichen mit unbehandelten Mäusen, detektiert, was die selektive Depletion von Arginin durch ADI-PEG in der Peripherie belegt.

Die Rekrutierung und Aktivierung von PMN wurde im Blut und der BAL 24 h nach *A. fumigatus*-Infektion analysiert, um den Einfluss der *L*-Arginindepletion auf diese zu eruieren. Wie in Abb. 26 A und B ersichtlich, ergaben sich keine Unterschiede zwischen ADI-PEG-behandelten und unbehandelten Tieren hinsichtlich PMN-Anteil im Blut und PMN-Anzahl

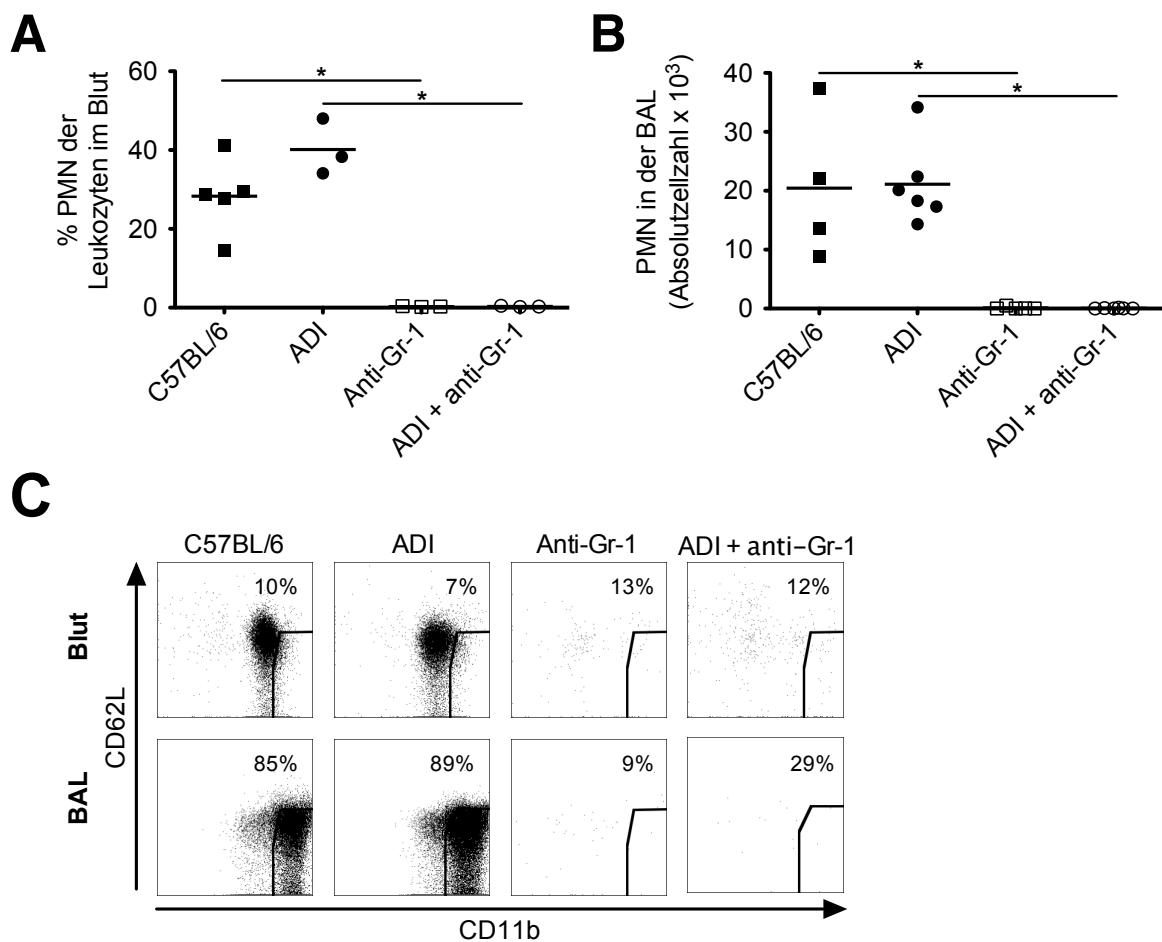


Abbildung 26: Die Depletion von ADI-PEG hat keinen Einfluss auf Rekrutierung und Aktivierung von PMN nach *A. fumigatus*-Infektion. ADI-PEG (5 IU i.p.) bzw. anti-Gr-1 (150 µg) wurden 24 h vor Infektion mit 10^7 *A. fumigatus*-Konidien injiziert. 24 h nach Infektion wurde das Blut und die BAL analysiert im FACS analysiert. (A, B) Der prozentuale Anteil der PMN (CD11b^{high} Gr-1⁺) im Blut (A) und die PMN-Gesamtzahl in der BAL (B) wurde quantifiziert. (C) Das Shedding von CD62L und Regulierung von CD11b auf PMN (Gr-1⁺) wurde analysiert. Gezeigt sind die kumulierten Werte von einem Experiment (A: C57BL/6 n = 4, ADI, anti-Gr-1 und ADI + anti-Gr-1 n = 3) oder von zwei unabhängigen Versuchen (B: C57BL/6 n = 5, ADI, anti-Gr-1 und ADI + anti-Gr-1 n = 6). (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

in der BAL, wobei in neutropenen Mäusen (anti-Gr-1) keine PMN nachweisbar waren. Für die PMN-Aktivierungsmarker CD11b und CD62L ergaben sich keine Unterschiede im Blut (siehe Abb. 26 C). Es wurde in den PMN der BAL eine Hochregulierung von CD11b und ein Shedding von CD62L, verglichen mit dem Blut, ermittelt (siehe Abb. 26 C). Es ergaben sich jedoch keine Unterschiede zwischen ADI-PEG-behandelten und unbehandelten Mäusen.

Die erhaltenen Daten beweisen, dass eine Depletion von *L*-Arginin die Rekrutierung und Aktivierung von PMN sowie die Beseitigung von pulmonalen *A. fumigatus*-Infektionen bei Mäusen nicht beeinflusst.

5.5 ADAMTS13 beeinflusst die Rekrutierung von PMN bei pulmonalen Pilzinfektionen

5.5.1 ADAMTS13-Defizienz führt zu einer erhöhten Mortalität bei Infektion mit *A. fumigatus*

Die Protease ADAMTS13 spaltet den vWF^[211], welcher die Quervernetzung und das Anhaften von Blutplättchen an beschädigten Gefäßwänden steuert.^[51] Durch einen Knock-out von ADAMTS13 (ADAMTS13^{-/-}) in Mäusen kommt es zu einem erhöhten „Rollen“ und einer gesteigerten Adhäsion von Leukozyten an den Gefäßwänden.^[61] Zudem kommt es zu einer verbesserten PMN-Rekrutierung bei Thioglykollat-induzierter Peritonitis.^[61] Um den Einfluss von ADAMTS13 bei IA zu analysieren, wurden ADAMTS13^{-/-} Mäuse mit *A. fumigatus*-Konidien infiziert. Infizierte Wildtypmäuse zeigten klinische Erkrankungssymptome, starben jedoch nicht (siehe Abb. 27 A). Neutropene Mäuse (anti-Gr-1) wiesen eine 100%ige Mortalitätsrate innerhalb von vier Tagen auf. Von den infizierten ADAMTS13^{-/-} Mäusen starben insgesamt 24%, und zwar im Zeitraum von zwei bis vier Tagen nach Infektion. Um zu überprüfen, ob die erhaltenen Unterschiede im Überleben durch eine verminderte Pilzkontrolle verursacht werden, wurde 24 h nach Infektion die Pilzbelastung von Lungenhomogenaten mittels CFU bestimmt. Wie in Abb. 27 B zu sehen, wurde in den Lungen von ADAMTS13^{-/-} Mäusen eine ca. doppelt so hohe Pilzbelastung als in Wildtypmäusen ermittelt. Zudem wurde die Albuminkonzentration als Maß für Lungenschädigung quantifiziert (siehe Abb. 27 C), wobei ein signifikanter Anstieg von Albumin in *A. fumigatus*-infizierten Wildtypmäusen, verglichen mit Wasser behandelten Kontrolltieren, detektiert wurde. In Übereinstimmung mit der gesteigerten Pilzmenge in ADAMTS13^{-/-} Mäusen wurde eine ca. doppelt so hohe Konzentration an Albumin in der BAL als in Wildtyptieren quantifiziert. Dies deutet darauf hin, dass ADAMTS13 bzw. der vWF essentiell für die Abwehr und Beseitigung von Pilzinfektionen ist.

24 h nach Infektion wurden Lungenschnitte angefertigt (siehe Abb. 27 D). Durch die H&E-Färbung konnte eine Infiltration von Zellen sowie Hyperämie in allen *A. fumigatus*-infizierten Mäusen nachgewiesen werden, was auf eine akute Pneumonie hinweist. Dabei ist die Einwanderung von inflammatorischen Zellen in den ADAMTS13^{-/-} Mäusen wesentlich stärker ausgeprägt als bei den Wildtypkontrollen, was auf eine stärkere Entzündungsreaktion hindeutet.

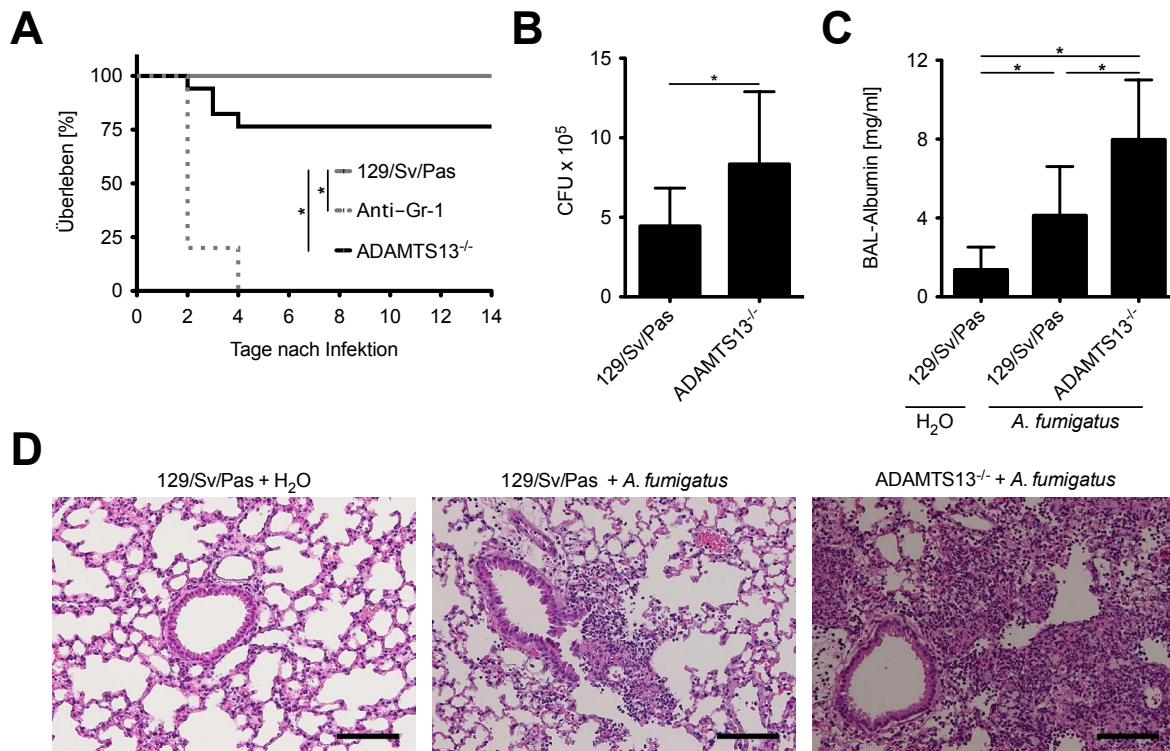


Abbildung 27: Die Infektion von ADAMTS13^{-/-} Mäusen mit *A. fumigatus* führt zu erhöhter Mortalität und erhöhtem Pilzwachstum in der Lunge. Mäuse wurden i.t. mit 10^7 *A. fumigatus*-Konidien infiziert. (A) Das Überleben wurde 14 Tage beobachtet. Gezeigt sind die kumulierten Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen (129/Sv/Pas n = 15, 129/Sv/Pas + anti-Gr-1 n = 10, ADAMTS13^{-/-} n = 17). (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet mit dem Mantel-Cox-Test. (B) 24 h nach Infektion wurden Lungenhomogenate ausgestrichen, um mittels CFU (engl.: *colony-forming units*) die Pilzbelastung zu quantifizieren. Gezeigt sind die kumulierten Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen (129/Sv/Pas n = 10, ADAMTS13^{-/-} n = 11) plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet mittels Student's-t-Test. (C) Die Albuminkonzentration in der BAL wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion quantifiziert. Dargestellt sind die kumulierten Werte von zwei (Wasser-behandelte 129/Sv/Pas n = 10), drei (*A. fumigatus*-behandelte ADAMTS13^{-/-} n = 11) oder vier unabhängigen Versuchen (*A. fumigatus*-behandelte 129/Sv/Pas n = 13) plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), berechnet mittels one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest. (D) 24 h nach Infektion wurde die Lunge präparativ entfernt und Paraffinschnitte von der Core Facility Histologie (Universitätsmedizin Mainz) angefertigt und angefärbt (H&E-Färbung). Skalierungsbalken, 100 μ m.

5.5.2 ADAMTS13-Defizienz resultiert in einer reduzierten PMN-Rekrutierung bei *A. fumigatus*-Infektionen

Um zu überprüfen, ob die zur Pilzabwehr essentiell notwendige PMN-Einwanderung^[158,172,189,199-201] in ADAMTS13^{-/-} gestört ist, wurden Blut und BAL 24 h nach Infektion analysiert. Im Blut von *A. fumigatus*-infizierten Wildtyp- sowie ADAMTS13^{-/-} Mäusen wurde eine erhöhte Anzahl an PMN, im Vergleich zu mit Wasser behandelten Kontrollmäusen, detektiert (siehe Abb. 28 A). Für die PMN-

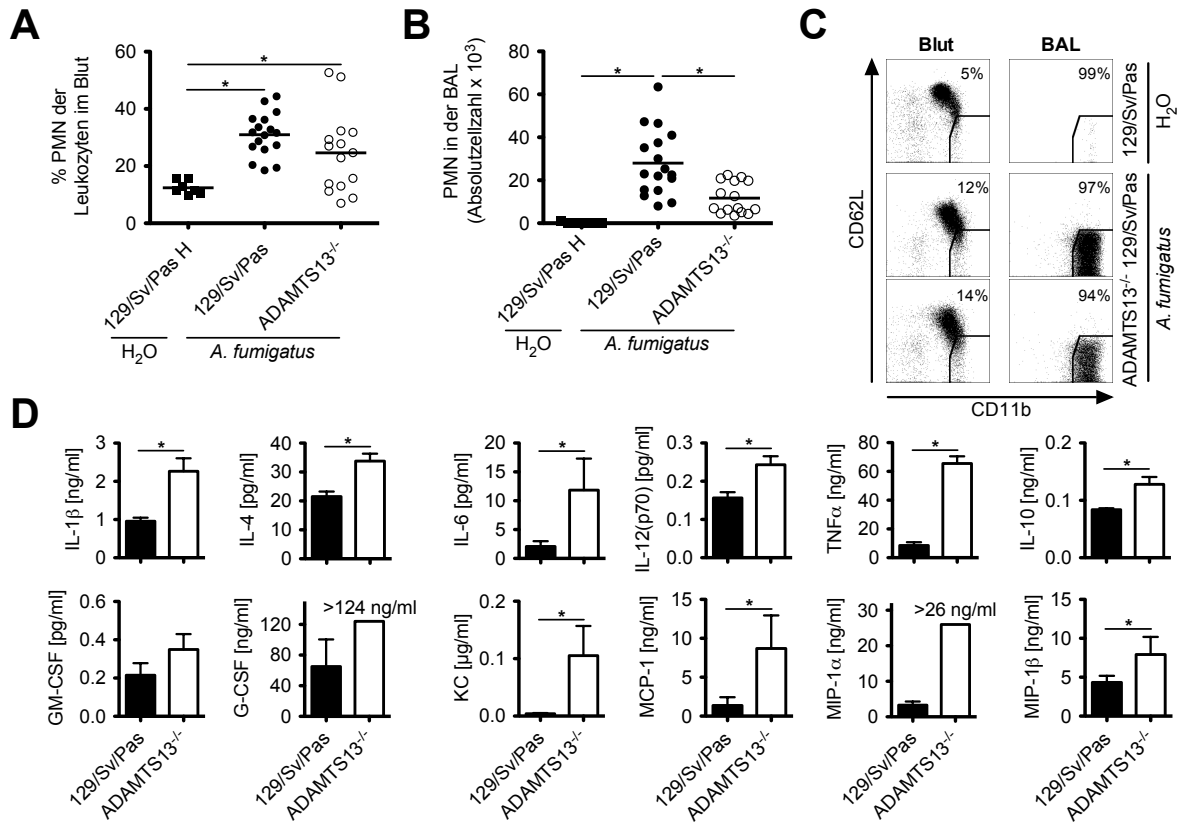


Abbildung 28: Die PMN-Rekrutierung nach *A. fumigatus*-Infektion ist in ADAMTS13^{-/-} Mäusen vermindert. Mäuse wurden mit 10⁷ *A. fumigatus*-Konidien i.t. infiziert oder mit Wasser. 24 h später wurde das Blut und die BAL analysiert. (A, B) Der prozentuale Anteil der PMN (CD11b^{high} Gr-1⁺) im Blut (A) und die PMN-Gesamtzahl in der BAL (B) wurde im FACS quantifiziert. (C) Das Shedding von CD62L und die Regulierung von CD11b auf PMN (Gr-1⁺) wurde im FACS analysiert. Gezeigt sind die kumulativen (A, B) oder ein repräsentatives Ergebnis von drei (Wasser-behandelte 129/Sv/Pas n = 7) oder vier unabhängigen Versuchen (*A. fumigatus*-behandelte 129/Sv/Pas n = 17; ADAMTS13^{-/-} n = 16) plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied (p < 0,05), berechnet mittels one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest. (D) Verschiedene BAL-Zytokine und Chemokine wurden von der Arbeitsgruppe Bosmann (Universitätsmedizin Mainz, Zentrum für Thrombose und Hämostase) mittels Bioplex gemessen (129/Sv/Pas n = 3, ADAMTS13^{-/-} n = 4). (*) zeigt einen signifikanten Unterschied (p < 0,05), berechnet mittels Student's-t-Test.

Aktivierungsmarker CD11b und CD62L wurden keine Unterschiede zwischen infizierten ADAMTS13^{-/-} und Wildtypmäusen detektiert. Wie in Abb. 28 B ersichtlich, induzierte die Infektion von Wildtypmäusen im Vergleich zur Wasserkontrolle eine starke Einwanderung von PMN. Unerwarteterweise wurde in infizierten ADAMTS13^{-/-} Mäusen eine signifikant niedrigere PMN-Anzahl als im Wildtyp nachgewiesen, was die verminderte Pilzkontrolle (Abb. 27 B) erklärt. Für den PMN-Aktivierungsstatus ergaben sich keine Unterschiede in der BAL (siehe Abb. 28 C). Vergleicht man den Aktivierungszustand von PMN in Blut und BAL, so wurde eine Hochregulierung von CD11b und Shedding von CD62L in der

BAL nachgewiesen.

Da verschiedene Zytokine und Chemokine zur PMN-Rekrutierung und Aktivierung notwendig sind, wurde die Lungenlavage hinsichtlich wichtiger inflammatorischer Mediatoren untersucht. Wie in Abb. 28 D gezeigt, wurde in den ADAMTS13^{-/-} Mäusen ein erhöhtes Level an proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6 und IL-12, sowie an antiinflammatorischen IL-10 detektiert. Des Weiteren wurde ein deutlich erhöhtes Niveau der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , KC/CXCL1 und MCP-1 in den ADAMTS13^{-/-} Mäusen gemessen, welche alle für die PMN-Rekrutierung notwendig sind. Von den Zytokinen, die die Auswanderung von Neutrophilen und Monozyten aus dem Knochenmark ins Blut bewirken, war nur G-CSF in den infizierten ADAMTS13^{-/-} Mäusen erhöht, jedoch nicht GM-CSF. Somit konnte eine gestörte Chemokinausschüttung als Ursache für die verminderte PMN-Rekrutierung und eine gesenkte Entzündungsreaktion für die reduzierte Pilzbeseitigung in der Lunge ausgeschlossen werden.

5.5.3 ADAMTS13-Defizienz hat *in vitro* keinen Einfluss auf die PMN-Effektorfunktionen

Um einen generellen Defekt der PMN und ihrer Effektormechanismen in ADAMTS13^{-/-} Mäusen auszuschließen, wurden aus dem Knochenmark isolierte PMN mit dem TLR Agonisten LPS, dem Phorbolester PMA und dem Formylpeptid-Rezeptor-Agonisten WKYMVm *in vitro* stimuliert und anschließend verschiedene PMN-Effektormechanismen wie oxidativer Burst, Phagozytose, Degranulation und CD62L-Shedding analysiert.

Wie in Abb. 29 A und B gezeigt, führte die Stimulation mit LPS, PMA und WKYMVm zu einer erhöhten Phagozytose von PE-markierten Polystyrolpartikeln sowie zur Hochregulation von CD11b und zum Shedding von CD62L, wobei sich keine Unterschiede zwischen PMN aus ADAMTS13^{-/-} und Wildtypmäusen ergaben. Die Stimulation mit WKYMVm induzierte einen gleich starken oxidativen Burst in ADAMTS13^{-/-} und Wildtyp-PMN (siehe Abb. 29 C), wohingegen kein signifikantes Signal für PMA und LPS messbar war (Daten nicht gezeigt). Da PMN kurzlebige Zellen sind, die konstitutiv in Apoptose gehen, wurde nach 24 h der Anteil an apoptotischen PMN gemessen (siehe Abb. 21 D). Als Kontrolle dienten der Translationshemmer Cycloheximid^[212], der die Proteinbiosynthese unterbindet und so zur Apoptose der PMN führte und die Stimulation mit GM-CSF^[213], was erwartungsgemäß die Apoptose von PMN verhinderte. Es konnten keine Unterschiede in der Apoptose zwischen PMN aus ADAMTS13^{-/-} und Wildtypmäusen ermittelt werden

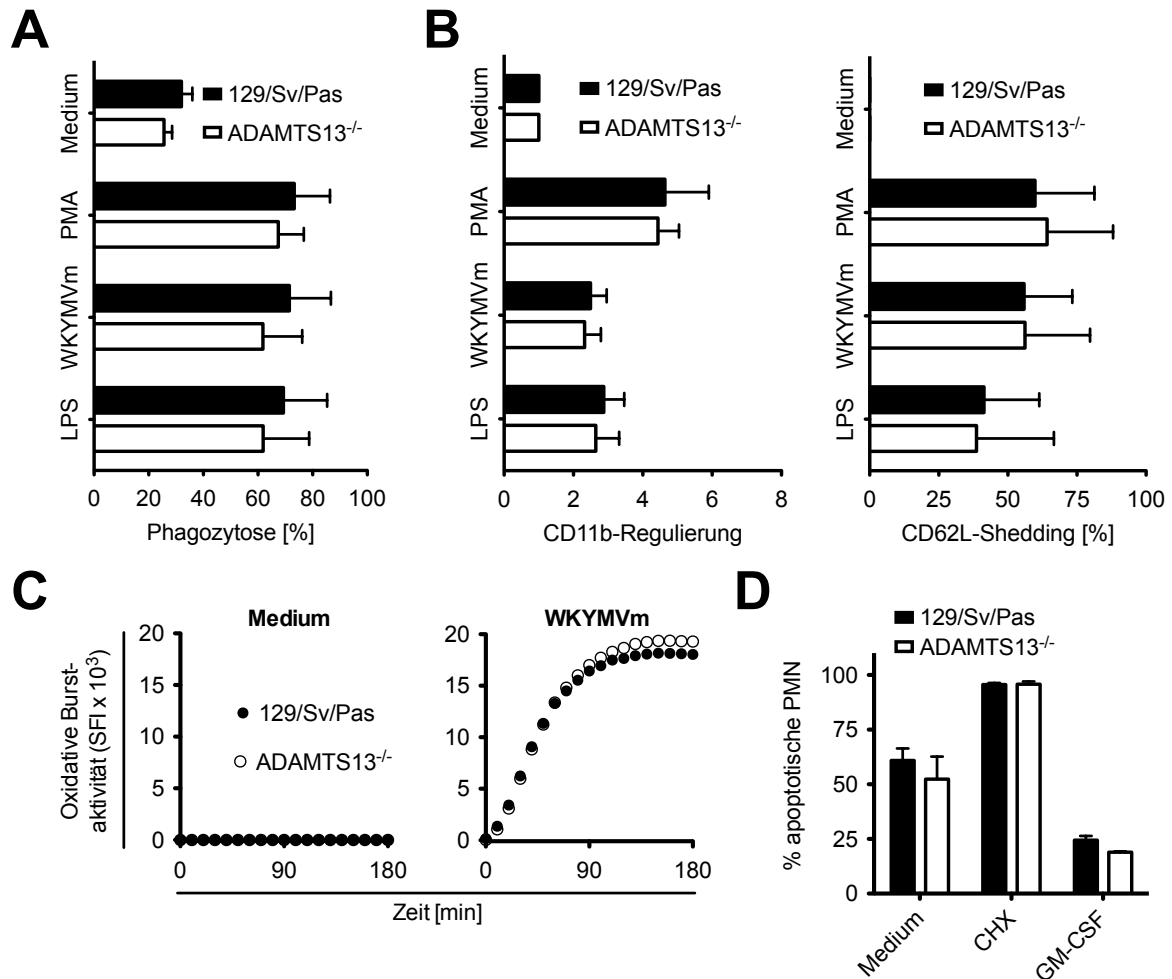


Abbildung 29: PMN aus ADAMTS13^{-/-} Mäusen zeigen keine Dysfunktion in ihrer Aktivierung. Aus dem Knochenmark isolierte PMN (10⁶/ml) wurden mit GM-CSF (50 ng/ml), LPS (100 µg/ml), PMA (50 ng/ml), Cycloheximid (CHX, 10 µg/ml) oder WKYMVm (8 µg/ml) stimuliert. (A) Die Phagozytose von PE-markierten Polystyrolkugeln wurde nach 4 h im FACS gemessen. (B) Das Shedding von CD62L und die Regulierung von CD11b relativ zu unbehandelten PMN wurde im FACS nach 4 h analysiert. (C) Der oxidative Burst wurde mittels DCFH-DA in An- und Abwesenheit von WKYMVm über die Zeit gemessen. (D) Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde nach 24 h mittels Nicoletti-Assay im FACS bestimmt. Gezeigt sind die kumulierten Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen (129/Sv/Pas und ADAMTS13^{-/-} n = 5) plus SD. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (p < 0,05) zwischen PMN aus 129/Sv/Pas und ADAMTS13^{-/-} Mäusen, berechnet durch einen two-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

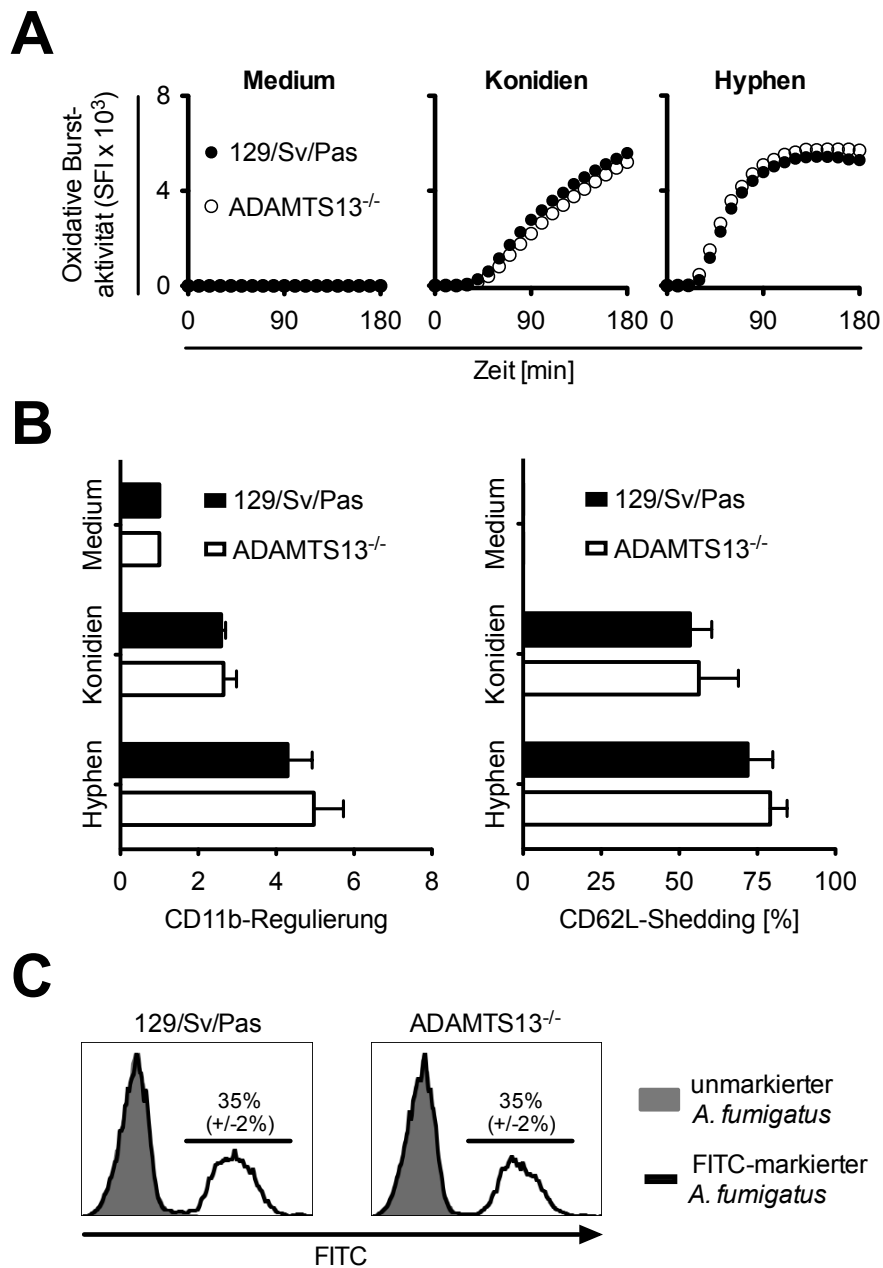


Abbildung 30: PMN von ADAMTS13^{-/-} Mäusen zeigen keinen Defekt in Phagozytose von Konidien oder Aktivierung nach Kontakt mit *A. fumigatus*. PMN aus dem Knochenmark (10⁶/ml) wurden mit *A. fumigatus*-Konidien oder Hyphen stimuliert. (A) Die oxidative Burstaktivität wurde mittels DCFH-DA über die Zeit quantifiziert. (B) Nach 4 h Inkubation wurde das Shedding von CD62L und die Regulierung von CD11b auf PMN (Gr-1⁺) relativ zu unbehandelten Zellen im FACS gemessen. (C) Die Phagozytose von FITC-markierten *A. fumigatus*-Konidien wurde nach 1 h im FACS gemessen. Die Aufnahme von unmarkierten Konidien diente als Negativkontrolle. Abgebildet sind die kumulierten (A, B) oder ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen (129/Sv/Pas und ADAMTS13^{-/-} n = 5) plus SD. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (p < 0,05) zwischen PMN aus 129/Sv/Pas und ADAMTS13^{-/-} Mäusen, berechnet durch einen two-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

(siehe Abb. 21 A).

Um Defekte anderer Signalwege bei Pilzinfektionen in ADAMTS13^{-/-} PMN zu eruieren, wurden diese *in vitro* mit *A. fumigatus*-Konidien und Hyphen stimuliert und anschließend die unterschiedlichen PMN-Effektormechanismen analysiert. *A. fumigatus*-Konidien und Hyphen induzierten in PMN aus ADAMTS13^{-/-} und Wildtypmäusen einen oxidativen Burst, der in etwa gleich stark ausgeprägt war (siehe Abb. 30 A). Wie in Abb. 30 B dargestellt, führte die Stimulation mit Konidien oder Hyphen zur Hochregulation von CD11b und zum Shedding von CD62L. Die Inkubation mit FITC-markierten *A. fumigatus*-Konidien führte zur Phagozytose dieser durch PMN (siehe Abb. 30 C). Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen PMN aus ADAMTS13^{-/-} und Wildtypmäusen.

Da ADAMTS13^{-/-} Mäuse eine erhöhte Pilzbelastung der Lunge nach Infektion mit *A. fumigatus in vivo* zeigten (siehe Abb. 27 B), wurden das Abtöten von Konidien und Hyphen *in vitro* analysiert, um PMN-Defekte beim Abtöten dieser zu eruieren. Wie in Abb. 31 dargestellt, führte die Inkubation von Konidien oder Hyphen mit PMN zum Abtöten dieser. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen PMN aus ADAMTS13^{-/-} und Wildtypmäusen quantifiziert, was Defekte von PMN aus ADAMTS13^{-/-} Mäusen beim

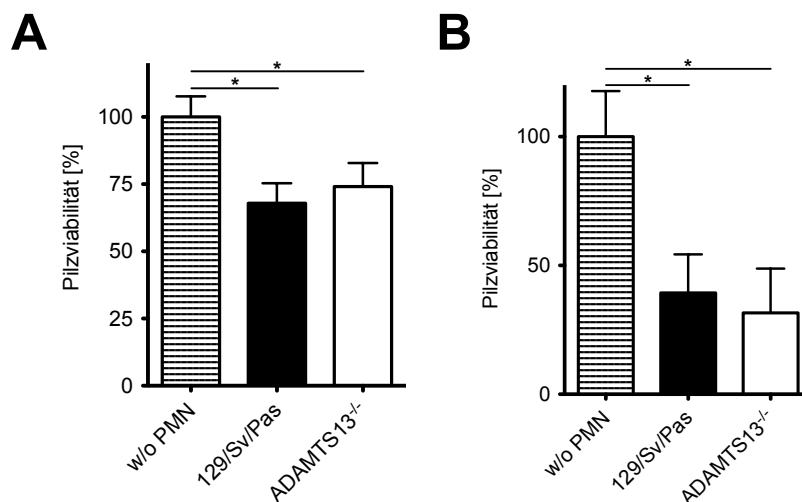


Abbildung 31: PMN von ADAMTS13^{-/-} Mäusen zeigen kein reduziertes Abtöten von *A. fumigatus*-Konidien oder Hyphen. Aus dem Knochenmark isolierte PMN (10⁶/ml) wurden mit *A. fumigatus*-Konidien oder Hyphen 4 h inkubiert. Nach Lyse der PMN wurde die Pilzviabilität mittels kolorimetrischem XTT-Assay quantifiziert. (A) Die Hyphenviabilität wurde relativ zu unbehandelten Hyphen gemessen. (B) Die Konidien wurden 16 h bei 37 °C kultiviert, um Hyphen auszubilden. Anschließend wurde die Viabilität relativ zu einer unbehandelten Kontrolle quantifiziert. Gezeigt ist ein repräsentatives Resultat von zwei unabhängigen Versuchen, gemessen in Triplikaten (129/Sv/Pas und ADAMTS13^{-/-} n = 3) plus SD. (*) zeigt einen signifikanten Unterschied (p < 0,05), berechnet durch einen one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest.

Abtöten von *A. fumigatus* ausschließt.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass PMN aus ADAMTS13^{-/-} Mäusen keine Defekte aufweisen. Somit verursacht die verminderte PMN-Rekrutierung nach pulmonaler Infektion mit *A. fumigatus* das verminderte Abtöten der Pilze. Damit einhergehend kommt es zu einer erhöhten Schädigung der Lunge und einer gesteigerten Mortalität in ADAMTS13-defizienten Mäusen.

6 Diskussion

6.1 Sich gegenseitig beeinflussende Signalkaskaden von TREM-1 und TLR bzw. NLR in monozytären Zellen

Humane PMN und Monozyten exprimieren den Oberflächenrezeptor TREM-1^[90], der inflammatorische Signale bei Entzündungsreaktionen potenziert^[93,96,104]. Der natürliche Ligand wurde aber bisher nicht identifiziert. Unterschiedliche Studien haben verschiedene Signalmoleküle der TREM-1-abhängigen Signaltransduktion in PMN oder Monozyten analysiert.^[90,108–110] Von Haselmayer *et al.* wurden die Kinase PI3K und die MAPK-Kinase p38-MAPK als zentrale Regulatoren der TREM-1-Signaltransduktion in PMN identifiziert, die unabhängig voneinander reguliert werden.^[109] Da eine entsprechende Analyse in monozytären Zellen fehlt, sollte diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Um spenderabhängige Varianzen zu minimieren, wurde nach einer TREM-1-exprimierenden, monozytären Zelllinie gesucht. So wurde auf der akuten myeloischen Leukämie-(AML)-Zelllinie MUTZ-3 eine schwache TREM-1-Expression detektiert, wobei diese nur auf der nicht proliferierenden, CD14⁺ Subpopulation^[196] nachweisbar war (siehe Abb. 7). Übereinstimmend ist eine TREM-1-Expression auf humanen CD14⁺ Monozyten^[90], ausgereiften, myeloiden Zellen^[106] und AML-Blasten beschrieben. Des Weiteren wurde in allen MUTZ-3-Zellen das für die Signaltransduktion essentielle Adaptermolekül DAP12^[90] detektiert.

Um die Funktionalität des TREM-1-Rezeptors zu überprüfen, wurden MUTZ-3-Zellen mit einem agonistischen anti-TREM-1-Antikörper stimuliert. In Monozyten und PMN führt dies zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen wie TNF α und IL-8.^[90,91,113] In MUTZ-3-Zellen wurde eine TREM-1-abhängige IL-8-Freisetzung detektiert (siehe Abb. 7), aber keine TNF α -Ausschüttung. Erst durch Koligation mit TLR bzw. NLR war TNF α nachweisbar (siehe Abb. 13). Diese Koligation resultiert in Monozyten und PMN in einer synergistischen Aktivierung verschiedener Effektorfunktionen.^[90,91,113,198] In Monozyten kommt es beispielsweise zur gesteigerten Ausschüttung von IL-8 und TNF α .^[90,91,198] Entsprechende, kooperative Effekte für die Freisetzung von IL-8 und TNF α ergaben sich ebenfalls in MUTZ-3-Zellen. Summa summarum lässt die TREM-1-abhängige Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen auf eine intakte TREM-1-Signaltransduktion schließen. Des Weiteren bewirkt die Aktivierung von TREM-1 in

Monozyten die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD11c, CD86 oder HLA-DR.^[90] Dies wurde in MUTZ-3-Zellen jedoch nicht beobachtet, was auf eine unterschiedliche Regulation der kostimulatorischen Moleküle in Kurzzeitkulturen hindeutet, obwohl sich MUTZ-3-Zellen zytokinabhängig zu unterschiedlichen Immunzellen wie Dendritischen Zellen oder Osteoklasten ausdifferenzieren lassen^[186,196,214,215].

Zur *in vitro*-Analyse von TREM-1 wird in der Literatur häufig die humane Zelllinie U937 verwendet.^[106,108,112] In dieser ist allerdings eine Induktion der TREM-1-Expression und dessen Adaptermolekül DAP12 durch Stimulation mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und TGFβ₁^[106] oder Transfektion^[108,112] notwendig. Dagegen sind durch die Verwendung der Zelllinie MUTZ-3, die ohne zusätzliche Induktion oder Behandlung TREM-1 funktional exprimiert, vor allem unkontrollierbare Artefakte, bedingt durch ektopische Rezeptorexpression, vermeidbar.

Um die MUTZ-3-Zelllinie als Modellsystem zur Analyse der TREM-1-Signaltransduktion zu etablieren, wurden die beiden essentiellen Signalmoleküle PI3K und p38-MAPK im Vergleich zu Monozyten und PMN untersucht. Die Ligation von TREM-1 führte in MUTZ-3-Zellen und Monozyten zur Phosphorylierung von Akt, einem direkten Downstreamsignal im PI3K/Akt-Signalweg, und p38-MAPK (siehe Abb. 9), wie bereits für PMN und Monozyten beschrieben.^[90,109,110] Gegenteilig zu bekannten Resultaten aus PMN^[109] ergaben sich keine Unterschiede in der Kinetik der Phosphorylierung von Akt, verglichen mit p38-MAPK, was auf eine unterschiedliche Signaltransduktion von PMN im Vergleich zu monozytären Zellen hinweist. Außerdem wurden durch pharmakologische Inhibierung von PI3K und p38-MAPK diese Signalmoleküle als wichtige Regulatoren der TREM-1 vermittelten Ausschüttung von IL-8 in MUTZ-3-Zellen und Monozyten identifiziert (siehe Abb. 9). Analoge und der Literatur entsprechende Resultate wurden für PMN erhalten.^[109,110] Anschließend wurde durch Analyse der Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK in Anwesenheit der genannten Inhibitoren die exakte Hierarchie der Signalweiterleitung in MUTZ-3-Zellen, Monozyten und PMN untersucht (siehe Abb. 9). In MUTZ-3-Zellen deuten die Resultate auf eine gegenseitige Regulierung von Akt und p38-MAPK hin. In Monozyten führte die Inhibierung von PI3K zu einer stärkeren Phosphorylierung von p38-MAPK, was auf gegenseitige, kompensatorische Funktionen hinweist. Aufgrund dieser Ergebnisse muss die Phosphorylierung von PI3K vor der p38-MAPK-Aktivierung in monozytären Zellen stattfinden. Dagegen erfolgte die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK unabhängig voneinander, wie bereits von Haselmayer *et al.* gezeigt^[109]. Dies

belegt eindeutig eine unterschiedliche Signaltransduktion von TREM-1 in monozytären versus granulozytären Zellen. Bestätigt wird diese Annahme durch die unterschiedlichen Resultate für die Signalweiterleitung bei Koligation von TREM-1 mit TLR oder NLR in monozytären und granulozytären Zellen. So führte die Koligation von TREM-1 und TLR4 in monozytären Zellen zu einer verstärkten Phosphorylierung von Akt, die bei p38-MAPK-Inhibierung vollständig unterdrückt wurde (siehe Abb. 14). In PMN beeinflusst der p38-MAPK-Inhibitor diese jedoch nicht.^[109] Übereinstimmend mit der TREM-1-abhängigen Zytokin- und Chemokinfreisetzung war diese bei Koligation mit TLR bzw. NLR ebenfalls von PI3K und p38-MAPK abhängig, was deren zentrale Bedeutung in der intrazellulären Signaltransduktion beweist. Allerdings wurde bei Koligation in MUTZ-3-Zellen, Monozyten und PMN bei Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK vor allem die Ausschüttung von IL-8 nicht vollständig unterdrückt, was auf weitere Signalwege bei kombinierter Stimulation hinweist. Ob die genannten Unterschiede der Signalhierarchie auch in anderen TREM-1-exprimierenden Zellen wie für die Psoriasispathogenität wichtige inflammatorische, myeloide Dendritische Zellen^[216] quantifizierbar sind, muss in weiteren Experimenten detaillierter analysiert werden.

Normalerweise erfolgt die Aktivierung von Akt nach der Phosphorylierung von PI3K im PI3K/Akt-Signalweg.^[217,218] Es gibt aber Hinweise darauf, dass p38-MAPK ebenfalls die Akt-Phosphorylierung und damit Aktivierung induzieren kann^[219]. So aktivieren endogene oder exogene Moleküle wie fMLP über p38-MAPK, exogene Chemokine oder Leukotrine wie IL-8 und MIP-2 dagegen über den PI3K/Akt-Signalweg die Migration von PMN.^[220] Bei Anwesenheit beider Stimuli inhibiert die p38-MAPK-abhängige Migration die PI3K-Aktivierung, wobei die Signalintegration und -prävalenz über PTEN (engl.: *Phosphatase and Tensin homolog*) erfolgt.^[221] Auch die TGF β_1 -abhängige Migration von Monozyten ist abhängig von der kombinierten Aktivierung von PI3K und p38-MAPK.^[222] Um die genauen Mechanismen zu identifizieren und zu validieren, ob p38-MAPK nach TREM-1-Ligation direkt Akt phosphoryliert oder andere Mechanismen die Interaktion vom p38-MAPK-Signalweg mit PI3K/Akt steuern, sind weitere Untersuchungen notwendig. Neben der Phosphorylierung von verschiedenen Signalmolekülen induziert die Aktivierung von TREM-1 in Monozyten und PMN eine Freisetzung von Ca²⁺^[90,109], die ebenfalls in MUTZ-3-Zellen nachweisbar war (siehe Abb. 11). Im Gegensatz zu PMN, wo die Ca²⁺-Mobilisierung nur von PI3K und nicht von p38-MAPK abhängig ist^[109], wurde das Ca²⁺-Signal bei pharmakologischer Inhibierung von PI3K oder p38-MAPK in MUTZ-

3-Zellen und Monozyten fast komplett unterdrückt. Dies bestätigt die Hypothese, dass sich die Hierarchie der Signaltransduktion in monozytären und granulozytären Zellen unterscheidet.

Im Gegensatz zu primären Zellen lassen sich MUTZ-3-Zellen ohne starke Aktivierung mittels Elektroporation transfizieren, weswegen unter anderem die Analyse des Ca^{2+} -abhängigen Transkriptionsfaktors NFAT mittels Luziferase-Reporterassay möglich war (siehe Abb. 12). Es wurde eine TREM-1-abhängige Aktivierung von NFAT detektiert, die entsprechend der Ca^{2+} -Mobilisierung von PI3K und p38-MAPK abhängig war. Dies belegt die wichtige Rolle von Ca^{2+} bei der TREM-1-Signaltransduktion. In PMN führt die gleichzeitige Stimulation von TREM-1 und TLR4 zur gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung.^[109] Übereinstimmend war in MUTZ-3-Zellen bei Koligation eine erhöhte NFAT-Transkription nachweisbar (siehe Abb. 15). Die Stimulation von TLR4 allein führte zu keiner Aktivierung von NFAT. Kongruent ist das Ca^{2+} -Signal in PMN und Monozyten ebenfalls TLR4-unabhängig.^[223,224] Dies stimmt mit der klassischen Sichtweise überein, in welcher die TLR4-Stimulation mittels LPS nicht zur NFAT-Aktivierung führt.^[225] Neuere Studien zeigen jedoch, dass LPS eine CD14-abhängige NFAT-Translokation induzieren kann^[226]. Dies wurde allerdings nicht beobachtet. Die Stimulation von TLR4 führt zudem zur Translokation des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ in den Zellkern^[70,74], weswegen die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ in MUTZ-3-Zellen mittels Luziferase-Reporterassay überprüft und wie in Abb. 15 gezeigt, nachgewiesen wurde. Dabei resultierte die Stimulation von TREM-1 alleine in einer $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung, die bei Koligation mit TLR4 anstieg. Dazu identisch führt die TREM-1-Stimulation in PMN zur Phosphorylierung und Aktivierung von RelA (p65), einer Untereinheit von $\text{NF}\kappa\text{B}$.^[110]

Ein genereller Nachteil von Studien mit pharmakologischen Inhibitoren sind unerwünschte Nebeneffekte, die schwierig zu kontrollieren und deren Auswirkungen schwer abschätzbar sind. Die Verwendung der transfizierbaren Zelllinie MUTZ-3 hat deswegen den Vorteil, dass essentielle Signalmoleküle von TREM-1 durch verschiedene Knock-down-Strategien wie mit RNAi oder shRNA gezielt ausgeschaltet werden können. Die Etablierung dieser Methoden und Überprüfung der erhaltenen und beschriebenen Resultate war im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht möglich, sollte aber zum besseren und detaillierteren Verständnis der TREM-1-Signaltransduktion beitragen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit die monozytäre AML Zelllinie MUTZ-3 als ein geeignetes Modellsystem zur Charakterisierung von TREM-1-abhängigen

Signalwegen in monozytären Zellen etabliert. Übereinstimmend mit bisherigen Daten sind die Signalmoleküle PI3K und p38-MAPK wichtige Regulatoren der TREM-1-Signaltransduktion in MUTZ-3-Zellen, Monozyten und PMN. Durch den Vergleich der TREM-1-abhängigen Signalweiterleitung in monozytären und granulozytären Zellen konnten einige Unterschiede in der exakten Signalhierarchie detektiert werden. So erfolgt die Phosphorylierung von PI3K und p38-MAPK in PMN unabhängig voneinander, wohingegen beide Kinasen in monozytären Zellen abhängig voneinander reguliert werden. Zudem ist die Ca^{2+} -Mobilisierung in PMN nur von PI3K abhängig und in monozytären Zellen von PI3K und p38-MAPK. Diese Resultate verbessern unser Verständnis, wie Entzündungsreaktionen der angeborenen Immunität reguliert werden, und tragen damit zur Entwicklung von Behandlungsmethoden, wie beispielsweise gegen schwere Entzündungsreaktion bei Sepsis oder Psoriasis, bei.

6.2 PMN sind essentiell für das Überleben von *A. fumigatus*-Infektionen

Eingeatmete Konidien treffen in der Lunge auf Phagozyten wie Alveolarmakrophagen, PMN und Dendritische Zelle und werden in gesunden Individuen von diesen erkannt und beseitigt (siehe Kap. 2.8.4). Die PMN mit ihren unterschiedlichen Effektorfunktionen sind dabei von zentraler Bedeutung.^[170,172,201,227] Da der exakte Einfluss verschiedener PMN-Effektorfunktionen bei der Abwehr von *A. fumigatus*-Infektionen nicht detailliert geklärt ist^[118,130,142], sollte ein Mausmodell für invasive Aspergillose (IA) etabliert und anschließend die Bedeutung von oxidativen und nicht oxidativen PMN-Effektormechanismen während einer IA analysiert werden.

Betäubte Mäuse wurden dazu, wie von Hasenberg *et al.* ausführlich beschrieben^[189], mit der in der Literatur gängigen Dosis von 10^7 *A. fumigatus*-Konidien^[158,172] i.t. infiziert. Anschließend wurde nachbeatmet, um eine optimale Verteilung der Pilzkonidien in der Lunge zu erreichen. Die Infektion von immunkompetenten Wildtypmäusen mit *A. fumigatus*-Konidien war, wie zu erwarten^[158,189,199,200], nicht letal (siehe Kap. 17). Dagegen weisen neutropene oder immunsupprimierte Tiere eine hohe Mortalitätsrate auf. In den durchgeführten Versuchen wurden die PMN durch Verabreichung eines monoklonalen Antikörpers 24 h vor Infektion depletiert, wobei zwei verschiedene Klone verwendet wurden: anti-Gr-1 (Klon RB6-8C5) oder anti-Ly6G (Klon 1A8). Beide führten zu einer

anhaltenden Neutropenie, wobei der anti-Gr-1 im Gegensatz zum anti-Ly6G noch weitere, Gr-1-positive Zellen wie z.B. Gr-1⁺ Monozyten und Makrophagen depletiert.^[202] Depletion mit anti-Gr-1 oder anti-Ly6G verursachte eine 100 % ige Mortalitätsrate bei Infektion mit *A. fumigatus* mit ähnlichen Kinetiken. Dadurch wurde ein signifikanter Einfluss von Zellpopulationen, die durch Verwendung des anti-Gr-1 mit entfernt werden, ausgeschlossen. Zudem belegen diese Resultate die bekannte, essentielle Rolle der PMN bei der Abwehr und Bekämpfung von Pilzinfektionen^[158,189,199,200], wobei selbst eine PMN-Depletion 3 h nach Infektion eine massive IA verursacht.^[172] Des Weiteren sind Alveolarmakrophagen, die 90 % der Leukozyten in der BAL gesunder Mäuse darstellen, sowie Dendritische Zellen für die Abwehr von Pilzinfektionen wichtig.^[130,148–152] Unter anderem regulieren diese über die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen die PMN-Einwanderung.^[200,228] Alveolarmakrophagen können außerdem über ihre verschiedenen Effektormechanismen (siehe Kap. 2.2.2) bis zu 90% der Konidien, abhängig von deren Sprossungsgrad, abtöten.^[229] Deren Depletion ist allerdings nicht letal für Mäuse.^[172] Dies entspricht den erhaltenen Resultaten, da die zusätzliche Depletion von Gr-1⁺ Monozyten und Makrophagen keinen Einfluss auf den Verlauf der IA hatte.

Als Infektionsroute wurde die i.t. Applikation gewählt, da die Mäuse so unter reproduzierbaren Bedingungen mit einer geringen Varianz und exakt definierter Dosis infiziert werden können.^[230–232] Dies hat den Vorteil gegenüber der intranasalen Infektion, dass Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Atemfrequenzen und Lungenvolumina sowie eine Aufnahme der Pilzkonidien in den Nasennebenraum und Magendarmtrakt vermieden werden. Neben diesen Infektionsarten besteht noch die Möglichkeit, i.v. oder über ein Aerosol zu infizieren. Dabei verliert die i.v.-Infektion zunehmend an Bedeutung^[233], da diese Infektionsart unphysiologisch ist. Die Infektion über ein Aerosol, welche die „normale“ humane IA-Infektionsroute sehr gut imitiert^[231], hat den Nachteil, dass sie zu einer diffusen Bronchopneumonie führt, wobei die exakte, inokulierte Dosis nicht genau gesteuert werden kann und stark von der Tröpfchengröße abhängt^[234]. Zudem überleben nicht alle Pathogene diese Infektionsart, sodass für die Etablierung dieser Methode weitere Forschung und Validierung notwendig ist.^[231,232]

Resümierend wurde ein Mausmodell für IA erfolgreich etabliert und die wichtige Rolle der PMN bei der Abwehr von Pilzinfektionen bestätigt.

6.3 Der oxidative Burst ist im Gegensatz zu neutrophiler Elastase essentiell bei der Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen

Um den Einfluss von oxidativen PMN-Effektorfunktionen bei der Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen zu eruieren, wurden die beiden NADPH-Oxidase-defizienten Mausstämme p47^{phox-/-} und gp91^{phox-/-} i.t. mit *A. fumigatus*-Konidien infiziert. Neutrophile Elastase (ELA) ist eine prototypische Serinprotease der azurophilen Granula und mittels ELA-defizienter ELANE Mäuse wurde die Bedeutung nicht oxidativer PMN-Effektormechanismen bei IA untersucht.

Die Infektion von p47^{phox-/-} oder gp91^{phox-/-} Mäusen resultierte in einer 100 % igen Mortalität (siehe Abb. 18). Dass der Infektionsverlauf dem neutropener Mäuse entsprach, beweist die essentielle Notwendigkeit der NADPH-Oxidase und somit des von ihr gesteuerten oxidativen Burst bei der Abwehr von Pilzinfektionen, wie bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt^[162-164,235]. Übereinstimmend mit der Mortalitätsrate und der Literatur^[162,164,205] wurde in der Lunge von infizierten p47^{phox-/-} und gp91^{phox-/-} Mäusen eine höhere Pilzbelastung in als im Wildtyp detektiert, was erneut auf die wichtige Funktion der NADPH-Oxidase beim Abtöten von Pilzkonidien hinweist und durch zusätzliche *in vitro* Experimente bestätigt wurde (siehe Abb. 23). In den p47^{phox-/-} und gp91^{phox-/-} Mäusen war die Pilzbelastung *in vivo* sogar höher als bei den neutropenen Mäusen, was auf weitere wichtige Funktionen der NADPH-Oxidase neben dem direkten, PMN-abhängigen Abtöten von Pilzen hindeutet. So phagozytieren Alveolarmakrophagen, deren NADPH-Oxidase-Aktivität mittels pharmakologischer Inhibitoren blockiert war, *A. fumigatus*-Konidien, können diese jedoch nicht abtöten, genauso wie Alveolarmakrophagen aus p47^{phox-/-} Mäusen.^[161] Im Gegensatz dazu inhibieren Alveolarmakrophagen aus gp91^{phox-/-} und Wildtypmäusen die Auskeimung von Pilzsporen gleichstark.^[162,205,236] Anhand eines anderen, transgenen Mausstammes wurde zudem gezeigt, dass die NADPH-Oxidase in Makrophagen ein zentraler Regulator für die Kontrolle von Pilzinfektionen ist.^[237] So war die Infektion von Mäusen mit globaler NADPH-Oxidase-Defizienz, d. h. in PMN, Monozyten und Makrophagen, letal, wohingegen die Infektion von NADPH-Oxidase-Defizienz nur in PMN nicht letal war. Bei letzterem Mausstamm ist allerdings eine Restaktivität der NADPH-Oxidase in den PMN detektierbar.^[238] Aufgrund dieser verschiedenen Resultate ist der genaue Einfluss der NADPH-Oxidase und dem damit verbundenen oxidative

Burst in Makrophagen und PMN vor allem *in vivo* noch nicht endgültig geklärt. Da im Gegensatz zu neutropenen Mäusen die Infektion von Mäusen, deren Monozyten und Makrophagen depletiert wurden, nicht letal verläuft^[158,172,199,200], ist der Einfluss des PMN-abhängigen oxidativen Burst wahrscheinlich essentieller. Neben dem direkten Abtöten von Pathogenen regulieren von der NADPH-Oxidase freigesetzte Radikale die Entzündungsreaktion. So führt eine Zymosan- oder LPS-induzierte Lungenschädigung in p47^{phox}^{-/-} und gp91^{phox}^{-/-} Mäusen zu einer erhöhten NF- κ B-Aktivierung, verstärkten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und verminderten Aktivität des redoxsensitiven, antiinflammatorischen Regulators Nrf2 (engl.: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*).^[239] Mittels H&E-Färbung infizierter Lungen von p47^{phox}^{-/-} und gp91^{phox}^{-/-} Mäusen wurde zwar eine Pneumonie nachgewiesen, eine erhöhte Entzündung konnte jedoch nicht detektiert werden (siehe Abb. 18).

Im Gegensatz zum oxidativen Burst ist ELA nicht essentiell für das Überleben von Pilzinfektionen, da die Infektion von ELANE Mäusen nicht letal war (siehe Abb. 18). Allerdings wurde in ELANE Mäusen eine erhöhte Pilzbelastung der Lunge detektiert (siehe Abb. 19), was die wichtige Funktion von ELA bei der Pilzabwehr beweist. Dies konnte zusätzlich durch ein vermindertes Abtöten von *A. fumigatus*-Konidien *in vitro* belegt werden (siehe Abb. 23) und stimmt mit den Beobachtungen von Tkalcevic *et al.*^[168] überein. Diese wiesen in ELANE, Cathepsin G sowie Cathepsin G und ELA defizienten Mäusen nach i.v.-Infektion mit *A. fumigatus* eine erhöhte Mortalität nach. Die Diskrepanz zu den in Abb. 18 gezeigten Überlebenskurven der ELANE Mäuse basiert vermutlich auf den unterschiedlichen Infektionsarten, wobei die in der vorliegenden Arbeit verwendete i.t.-Infektionsroute physiologischer ist (siehe Kap. 6.2). Andererseits erreicht die i.v. Applikation eine viel höhere Invasivität als die i.t. Infektion. Des Weiteren sind kompensatorische Effekte durch andere Serinproteinasen wie Proteinase 3 oder Cathepsin G nicht auszuschließen, da in den durchgeführten Experimenten nur ELA-defiziente Mäuse infiziert wurden. Dagegen spricht aber, dass die oropharyngale Infektion von ELA und Cathepsin G-defizienten Mäusen nicht letal ist.^[235] Außerdem konnten in diesen und Dipeptidylpeptidase I (DPPI)-defizienten Mäusen nach drei Tagen keine Unterschiede in der Pilzbelastung der Lunge im Vergleich zu Wildtypmäusen nachgewiesen werden,^[235] wobei das Enzym DPPI die lysosomale Aktivität von Proteinase 3, ELA und Cathepsin 3 steuert^[240]. Dies unterstützt die Hypothese, dass Serinproteinasen wie z.B. ELA für das Überleben einer IA nicht essentiell sind. ELA ist auch an der NET-Bildung beteiligt.^[241] NETs können *A. fumigatus*-

Konidien zwar nicht abtöten, aber deren Auskeimung behindern.^[242] *In vitro* ist dies abhängig von dem Chelator Calprotectin.^[242] Auch die Depletion von Eisen durch von PMN ausgeschüttetes Lactoferrin inhibiert das Wachstum von *A. fumigatus in vitro*.^[166] Die exakte Bedeutung von anderen, nicht oxidativen PMN-Effektormechanismen bei der Abwehr von Pilzinfektionen *in vivo* muss aber weiter untersucht werden.

In der Literatur werden stammspezifischen Unterschiede für den Verlauf der IA beschrieben, die jedoch meist auf unterschiedlichen Kinetiken nach Immunsuppression mit Cyclophosphamid und/oder Kortison basieren, da die Infektion von immunkompetenten Wildtypmäusen nicht letal ist.^[158,201,243,244] In den verwendeten Mausstämmen C57BL/6 und 129/Sv/Pas wurden jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der Kinetik der Überlebenskurven detektiert. Auch war die Rekrutierung und Aktivierung von PMN nach Infektion ähnlich. Es ergaben sich allerdings stammspezifische Unterschiede beim Abtöten der *A. fumigatus*-Konidien *in vivo*. So wies der Wildtypstamm 129/Sv/Pas in der Lunge eine geringere Pilzbelastung als der Wildtypstamm C57BL/6 auf, was auf ein besseres bzw. schnelleres Abtöten der Pilzsporen hinweist.

Zusammenfassend zeigen diese Resultate die wichtige Funktion von oxidativen wie auch nicht oxidativen PMN-Effektormechanismen bei der Abwehr von Pilzinfektionen durch Abtöten der Konidien. Dabei ist die NADPH-Oxidase und der damit verbundene oxidative Burst essentiell und nicht redundant. Die neutrophile Elastase als prototypische Serinprotease und wichtiger Bestandteil der NET-Formation ist dagegen nicht essentiell für das Überleben einer IA.

6.4 Arginin beeinflusst die Beseitigung von pulmonalen Pilzinfektionen nicht

Die Depletion von *L*-Arginin führt einerseits zu einer verminderten Zellteilung und andererseits zu inhibiertem Wachstum von Parasiten und Viren *in vitro*.^[208] *In vivo* gibt es zwei Enzyme, die *L*-Arginin als Substrat nutzen und deren Aktivität sich durch ihre Substratkonkurrenz gegenseitig beeinflusst. Arginase-1 wandelt die Aminosäure *L*-Arginin zu Harnstoff und *L*-Ornithin um und iNOS metabolisiert sie zu NO und *L*-Citrullin.^[207,245] So ist die Umwandlung von *L*-Arginin zu NO und anderen, reaktiven Stickstoffintermediaten der primäre, zytotoxische Mechanismus von Makrophagen bei der Beseitigung von Viren, Bakterien und Würmern.^[246] Außerdem können PMN über

Arginase-1, die in der azurophilen Granula gespeichert ist,^[247] die adaptive Immunantwort modulieren, da eine *L*-Arginin-Defizienz die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen supprimiert.^[248] Bei Entzündungen und Krebserkrankungen kommt es zudem zur Expansion von antiinflammatorischen CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{low} Zellen, den MDSCs (engl.: *myeloid-derived suppressor cells*). Diese weisen ebenfalls Arginase-1 und iNOS auf und sind eine heterogene Population von frühen, myeloiden Vorläuferzellen und unreifen myeloiden Zellen wie Makrophagen, PMN und Dendritischen Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien.^[249] Inwieweit eine *L*-Arginin-Defizienz eine Infektion mit *A. fumigatus* beeinflusst, wurde mit dem in Kap. 5.2 beschriebenen, murinen Modell für IA eruiert.

Die i.p. Verabreichung einer PEG-gekoppelten Arginindeiminase (ADI-PEG) führte zur erwarteten, selektiven Depletion von *L*-Arginin (siehe Abb. 24 und 25).^[210] Infektion von *L*-Arginin-defizienten und neutropenen, *L*-Arginin-defizienten Mäusen ergab keine Unterschiede im Überleben und im Pilzbefall der Lunge zu den entsprechenden Kontrolltieren (siehe Abb. 25). Die Depletion von *L*-Arginin beeinflusste zudem weder die Rekrutierung noch die Aktivierung von PMN (siehe Abb. 26). Dies legt den Schluss nahe, dass *L*-Arginin und somit auch iNOS und Arginase-1 für die Beseitigung von pulmonalen *A. fumigatus*-Infektionen nicht essentiell sind. Übereinstimmend hat NO keinen Einfluss auf die Beseitigung von *A. fumigatus*-Konidien durch humane sowie murine Alveolarmakrophagen.^[250] Im Gegensatz dazu weist Arginase-1 eine protektive Funktion bei Infektion mit Fadenwürmern auf, da die pharmakologische Inhibierung von Arginase-1 ein vermindertes Abtöten der Würmer *Heligmosomoides polygyrus* oder *Nippostrongylus brasiliensis* induziert.^[251,252] Des Weiteren führt die TLR-Stimulation zur Hochregulation von Arginase-1 in Makrophagen, wobei dies auch durch mykobakterielle Infektionen sowie Chitin, einem Zellwandbestandteil von Pilzen und Würmern, verursacht wird.^[253,254] Eine gezielte Entfernung der Arginase-1 in PMN, Monozyten und Makrophagen führt zu einer geringeren Pathogenbelastung nach Infektionen mit dem Protozoon *Toxoplasma gondii* oder *Mycobacterium tuberculosis*-Bakterien.^[253] Damit einhergehend wurde eine durch die Arginase-1-Defizienz verursachte, erhöhte NO-Produktion detektiert. Dagegen hat die selektive Arginase-1-Defizienz keinen Einfluss auf die Viabilität bei mit LPS- oder *Streptococcus pneumoniae*-induzierten Sepsismodellen. Dies deutet darauf hin, dass für das intrazelluläre Abtöten von Erregern wie *Toxoplasma gondii* Arginase-1 notwendig ist, allerdings nicht zur Kontrolle von extrazellulären Erregern wie *Streptococcus*

pneumoniae.^[253] Diese Hypothese passt zu den erhaltenen Daten der pulmonalen *A. fumigatus*-Infektion. In einem murinen Colitis-Modell mit dem Bakterium *Citrobacter rodentium* führte die Verabreichung von *L*-Arginin an Wildtyp- und iNOS-defiziente Mäuse zu einer schwächeren Entzündung im Darm, wohingegen die pharmakologische Inhibierung von Arginase-1 die Entzündung verschlimmerte.^[255] Somit hat Arginase-1 bei Colitis eine protektive Funktion. Im Gegensatz dazu begünstigt die Arginase-1-Aktivität über Inhibierung der NO-Produktion Infektionen mit dem Parasiten *Trypanosoma brucei*.^[256] Inwieweit eine Inhibierung von Arginase-1 oder iNOS den Verlauf der IA beeinflusst, konnte über die *L*-Arginindepletion nicht geklärt werden. Da jedoch kein Einfluss von *L*-Arginin ermittelt wurde, ist dies eher unwahrscheinlich. Einige Pathogene exprimieren zudem enzymatisch aktive Arginase, um *L*-Arginin zu metabolisieren und dadurch die Bildung antimikrobieller Stickstoffintermediate zu unterbinden.^[257,258] Da die *L*-Arginin-Defizienz keinen Einfluss auf die IA und die PMN-Effektorfunktionen hatte, sollte dies beim Abtöten von Pilzen keine Rolle spielen.

Zusammenfassend lassen die erhaltenen Daten darauf schließen, dass *L*-Arginin und somit vermutlich auch die beiden Enzyme Arginase-1 und iNOS zur Kontrolle von Pilzinfektionen nicht essentiell sind.

6.5 ADAMTS13 beeinflusst die Rekrutierung von PMN bei pulmonalen Pilzinfektionen

Eine Störung der Zinkmetalloprotease ADAMTS13, die normalerweise den vWF in Multimere spaltet^[211], führt zur Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) (siehe Kap. 2.3).^[49,52-54] Dabei steuert der vWF die Quervernetzung und das Anhaften von Blutplättchen an beschädigten Gefäßwänden.^[51] Außerdem zeigten Chauhan *et al.* in ADAMTS13-defizienten (ADAMTS13^{-/-}) Mäusen ein erhöhtes „Rollen“ und eine gesteigerte Adhäsion von Leukozyten an Gefäßwänden.^[61] Bei Thioglykollat-induzierter Peritonitis oder Hautbeschädigung war zudem eine verbesserte PMN-Rekrutierung nachweisbar. Ob die ADAMTS13-Defizienz ebenfalls pulmonale Pilzinfektionen beeinflusst, wurde in dem bereits beschriebenen Mausmodell für IA (siehe in Kap. 5.2) analysiert.

Im Gegensatz zur oben genannten, gesteigerten PMN-Rekrutierung^[61], führte die pulmonale Infektion mit *A. fumigatus*-Konidien zu einer signifikant reduzierten Einwanderung von PMN (siehe Abb. 28). Dies verursachte ein vermindertes Abtöten der Pilzkonidien

in vivo einhergehend mit einer verstärkten Schädigung der Lunge und einer erhöhten Mortalität der ADAMTS13^{-/-} Mäuse (siehe Abb. 27). Da sich *in vitro* in PMN aus ADAMTS13^{-/-} Mäusen keine generellen oder pilzabhängigen Defekte von unterschiedlichen PMN-Effektormechanismen wie oxidativer Burst, Phagozytose, Degranulation, CD62L-Shedding oder dem Abtöten von Konidien oder Hyphen ergaben (siehe Abb. 29 bis 31), muss die verminderte PMN-Rekrutierung die erhöhte Mortalitätsrate verursachen. Die gegensätzlichen Ergebnisse für die PMN-Rekrutierung könnten auf unterschiedlichen Stammhintergründen der ADAMTS13^{-/-} Mäuse beruhen. So war dieser bei den durchgeführten Experimenten 129/Sv/Pas und bei Chauhan *et al.* C57BL/6J^[61]. Wie in Abb. 19 gezeigt und in Kap. 6.3 diskutiert, gibt es stammspezifische Effekte beim Abtöten von *A. fumigatus in vivo*. Allerdings wurden keine stammspezifischen Effekte bei der Einwanderung von PMN detektiert (siehe Abb. 20), was dies als Ursache für die detektierten Unterschiede eher ausschließt. Demgegenüber kann die ADAMTS13-Defizienz auf unterschiedlichen Stammhintergründen verschiedene Auswirkungen haben. So beeinflusst die ADAMTS13-Defizienz auf einem nicht definierten Stammhintergrund weder das Überleben noch die Thrombozytopenie in einem murinen Sepsismodell^[259], was sich von den erhaltenen Daten bei pulmonalen Pilzinfektionen unterscheidet. Auch die Überexpression von ADAMTS13 führt zu keiner Veränderung der Mortalität im murinen Sepsismodell, wohingegen die Überlebensrate bei vWF-defizienten Mäusen höher ist.^[259] In einem Mausmodell für Herzinfarkte wiesen ADAMTS13^{-/-} Mäuse auf C57BL/6J-Hintergrund größere Myokardinfarkte auf und die Verabreichung von rekombinantem ADAMTS13 bei Wildtypmäusen führte zu kleineren Myokardinfarkten.^[62] Verursacht wird dies durch eine geringere Anzahl an eingewanderten PMN, was auf potenzielle antiinflammatorische Effekte von ADAMTS13 hinweist. Analog war in einem murinen Schlaganfallmodell in ADAMTS13^{-/-} Mäusen die Infarktgröße vermindert und die Behandlung von Wildtypmäusen mit hohen Dosen an rekombinantem ADAMTS13 reduzierte das Infarktvolumen.^[252] Dabei ergaben sich allerdings keine Unterschiede hinsichtlich der PMN-Rekrutierung. Diese unterschiedlichen Resultate bei verschiedenen Krankheits- und Infektionsmodellen deutet darauf hin, dass ADAMTS13, je nach Erkrankung, die PMN-Rekrutierung unterschiedlich beeinflusst. Der exakte Mechanismus und ob die verschiedenen Stammhintergründe die Resultate im Mausmodell beeinflussen, ist bisher ungeklärt.

Bei viralen und bakteriellen Infektionen wurde ein erhöhtes Plasmalevel an vWF

nachgewiesen.^[56,57] So sind schon in frühen Sepsisstadien erhöhte vWF-Konzentrationen messbar^[260], einhergehend mit einer reduzierten ADAMTS13-Aktivität^[261-263]. Dies korreliert mit erhöhter Mortalität und Organversagen.^[261-263] Ob die ADAMTS13-Defizienz und die damit verbundenen, ultralangen vWF-Multimere dies über eine erhöhte Thrombenbildung verursachen, ist noch nicht abschließend geklärt. So weisen ADAMTS13^{-/-} Mäuse zwar einen prothrombotischen Status auf, es wird dadurch allerdings noch keine TTP ausgelöst.^[264] Erkennbar ist dies beispielsweise an einer starken Verminderung der Thrombozytenanzahl. Infektion mit *A. fumigatus* induziert aber keine solchen Effekte in ADAMTS13^{-/-} Mäusen (Daten nicht gezeigt)^[265]. Dies deutet darauf hin, dass ein Pilzbefall der ADAMTS13^{-/-} Mäuse als Auslöser für eine TTP ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend führt die ADAMTS13-Defizienz zu einer verminderten PMN-Rekrutierung nach pulmonaler *A. fumigatus*-Infektion. Dies verursacht ein vermindertes Abtöten der Pilze, einhergehend mit einer erhöhten Schädigung der Lunge und einer gesteigerten Mortalitätsrate. Die Analyse der genauen Ursache für die verminderte Einwanderung der PMN muss in weiteren Experimenten eruiert werden.

7 Zusammenfassung

Die myeloide Zelllinie MUTZ-3 konnte als geeignetes Modellsystem zur Charakterisierung der TREM-1-Signaltransduktion etabliert werden, da diese TREM-1 und dessen essentielles Adaptermolekül DAP12 funktional exprimiert. Übereinstimmend mit bisherigen Daten wurden die Kinasen PI3K und p38-MAPK als wichtige Regulatoren in der Signalweiterleitung nach TREM-1-Aktivierung identifiziert, wobei sich einige Unterschiede in der exakten Signalhierarchie zwischen monozytären und granulozytären Zellen ergaben. So erfolgt die Aktivierung von PI3K und p38-MAPK in PMN unabhängig voneinander. In monozytären Zellen findet die Aktivierung von p38-MAPK vor der Akt-Phosphorylierung statt und ist hierfür notwendig. Zudem ist die Ca^{2+} -Mobilisierung in PMN nur von PI3K abhängig und in monozytären Zellen von PI3K und p38-MAPK. Bei der durch TLR- oder NLR-Koligation gesteigerten TREM-1-Aktivierung sind PI3K und p38-MAPK ebenfalls zentrale Regulatoren. Es ergaben sich ebenfalls Unterschiede in der exakten TREM-1-Signaltransduktion.

Ein Mausmodell für invasive Aspergillose wurde erfolgreich etabliert, wobei die essentielle Rolle der PMN bei der Abwehr von Pilzinfektionen durch deren Depletion mit unterschiedlichen Antikörpern belegt wurde. Für das Abtöten von *A. fumigatus*-Konidien sind oxidative und nicht oxidative PMN-Effektormechanismen notwendig. Dabei konnte die essentielle Rolle der oxidativen PMN-Effektorfunktionen anhand NADPH-Oxidase-defizienter $\text{p47}^{\text{phox-/-}}$ und $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$ Mäuse für das Überleben von Pilzinfektionen gezeigt werden. Dagegen war die Infektion von neutrophiler Elastase-defizienter ELANE Mäuse nicht letal. Dies deutet darauf hin, dass die neutrophile Elastase als prototypische Serinprotease und wichtiger Bestandteil der NET-Formation nicht essentiell für das Überleben einer invasiven Aspergillose ist oder durch andere, nicht oxidative Effektormechanismen kompensiert werden kann. Keinen Einfluss auf eine invasive Aspergillose hatte die Depletion von Arginin mittels Arginindeiminase, da hiervon weder das Überleben der Mäuse noch das Abtöten der Pilzkonidien beeinflusst wurde. Es konnte zudem keine Veränderung in der Einwanderung und Aktivierung von PMN nach Infektion quantifiziert werden. Dagegen resultiert die Defizienz in ADAMTS13 ($\text{ADAMTS13}^{\text{-/-}}$ Mäuse) in einer verminderten Rekrutierung von PMN bei Pilzinfektionen, einhergehend mit einer erhöhten Mortalität, einem verminderten Abtöten von *A. fumigatus*-Konidien und einer erhöhter Schädigung der Lunge. Da *in vitro* keine generellen oder

pilzspezifischen Defekte der PMN quantifiziert werden konnten, muss ADAMTS13 die Einwanderung der PMN beeinflussen. Normalerweise spaltet die Protease ADAMTS13 den von-Willebrand-Faktor, der die Quervernetzung und das Anhaften von Blutplättchen an beschädigte Gefäßwände steuert. Ob und wie ADAMTS13 oder der von-Willebrand-Faktor die verminderte PMN-Einwanderung bei Pilzinfektionen verursacht, muss weiter untersucht werden.

Zusammenfassend verbessern die erhaltenen Daten für eine zellspezifische TREM-1-Signaltransduktion, ein von oxidativen und nicht oxidativen PMN-Effektorfunktionen abhängiges sowie Arginin-unabhängiges Abtöten vom Pilz *A. fumigatus* als auch der Einfluss von ADAMTS13 und von-Willebrand-Faktor bei der Rekrutierung von PMN nach *A. fumigatus*-Infektion unser Verständnis der angeborenen Immunität. Diese Erkenntnisse dienen der zukünftigen Entwicklung von Therapien zur Behandlung von schweren Entzündungsreaktionen wie Aspergillose und Sepsis.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	antigenpräsentierende Zelle (engl.: <i>antigen-presenting cell</i>)
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	engl.: <i>bovines serum albumin</i>
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CHX	Cycloheximid
Cy7	Cyan-Farbstoff
DCFH-DA	2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat
dest.	destilliert
DHR-123	Dihydrorhodamin 123
DPPI	Dipeptidylpeptidase I
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	engl.: <i>extracellular regulated-signal kinase</i>
f-MLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FACS	Durchflusszytometer (engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyant
G-CSF	engl.: <i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	engl.: <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunden
HPLC	engl.: <i>high-performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
I κ B	Inhibitor von NF κ B
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRAK	engl.: <i>interleukin 1 receptor-associated kinase</i>
IRF3	Interferon regulierender Faktor 3
JNK	engl.: <i>c-jun NH₂-terminal kinase</i>
Kap.	Kapitel
KIR	engl.: <i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
LAL	engl.: <i>limulus amoebocyte lysate</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	leucinreiche Motive (engl.: <i>leucine-rich repeat</i>)
MACS	engl.: <i>magnetic associated cell sorting</i>
MAPK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MDP	Muramyldipeptid
MDSC	engl.: <i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloprotease
MTD	M-TriDAP
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoliumsalz
MyD88	engl.: <i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NET	engl.: <i>neutrophil extracellular trap</i>
NF κ B	engl.: <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzellen
NLR	engl.: <i>NOD-like receptor</i>
NOD	engl.: <i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
Nrf2	engl.: <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Pam ₃ Cys	Palmitoyl-3-Cystein-Serin-(Lysin) ₄
PDGF	engl.: <i>platelet-derived growth factor</i>

PAMP	Pathogen-assoziierte, molekulare Muster (engl.: <i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
Per-CP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	polymorphkernige, neutrophile Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	mustererkennende Rezeptoren (engl.: <i>pattern recognition receptors</i>)
RIG	engl.: <i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RLR	engl.: <i>RIG-I-like receptor</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
STAT	engl.: <i>signal transducers and activators of transcription</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIR	Toll-Interleukin 1-Rezeptor
TIRAP	engl.: <i>TIR-domain containing adaptor protein</i>
TLR	engl.: <i>Toll-like receptor</i>
TLT	engl.: <i>TREM-like transcript</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	engl.: <i>TNF-receptor associated factor 6</i>
TRAM	engl.: <i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TREM-1	engl.: <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i>
TRIF	engl.: <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
z.B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

- [1] D.M. Underhill und H.S. Goodridge: Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 492–502.
- [2] R.S. Flannagan, V. Jaumouillé und S. Grinstein: The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* **2012**, *7*, 61–98.
- [3] I. Jutras und M. Desjardins: Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 511–527.
- [4] J. Pillay, I. den Braber, N. Vrisekoop, L.M. Kwast, R.J. de Boer, J.A.M. Borghans, K. Tesselaar und L. Koenderman: In vivo labeling with $2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **2010**, *116*, 625–627.
- [5] J. Mestas und C.C. Hughes: Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2731–2738.
- [6] C.D. Sadik, N.D. Kim und A.D. Luster: Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* **2011**, *32*, 452–460.
- [7] M.A. Stark, Y. Huo, T.L. Burcin, M.A. Morris, T.S. Olson und K. Ley: Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* **2005**, *22*, 285–294.
- [8] S. von Vietinghoff und K. Ley: IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 865–873.
- [9] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka und V.K. Kuchroo: IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 485–517.
- [10] P. Schwarzenberger, W. Huang, P. Ye, P. Oliver, M. Manuel, Z. Zhang, G. Bagby, S. Nelson und J.K. Kolls: Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 4783–4789.
- [11] E.C. Butcher: Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **1991**, *67*, 1033–1036.
- [12] K. Ley: The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine* **2003**, *9*, 263–268.
- [13] K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky und S. Nourshargh: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 678–689.
- [14] E. Kolaczowska und P. Kubers: Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 159–175.

- [15] M. Faurschou und N. Borregaard: Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* **2003**, *5*, 1317–1327.
- [16] O. Soehnlein, C. Weber und L. Lindbom: Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 538–546.
- [17] A.W. Segal: How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23*, 197–223.
- [18] D. Campanelli, P.A. Detmers, C.F. Nathan und J.E. Gabay: Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 904–915.
- [19] S.J. Klebanoff: Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *77*, 598–625.
- [20] L. Fialkow, Y. Wang und G.P. Downey: Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 153–164.
- [21] L.-A.H. Allen, B.R. Beecher, J.T. Lynch, O.V. Rohner und L.M. Wittine: Helicobacter pylori disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 3658–3667.
- [22] F.R. DeLeo, L.A. Allen, M. Apicella und W.M. Nauseef: NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 6732–6740.
- [23] P.V. Vignais: The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1428–1459.
- [24] D.B. Kuhns, W.G. Alvord, T. Heller, J.J. Feld, K.M. Pike, B.E. Marciano, G. Uzel, S.S. DeRavin, D.A.L. Priel, B.P. Soule, K.A. Zarembler, H.L. Malech, S.M. Holland und J.I. Gallin: Residual NADPH Oxidase and Survival in Chronic Granulomatous Disease. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 2600–2610.
- [25] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch und A. Zychlinsky: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532–1535.
- [26] B.G. Yipp, B. Petri, D. Salina, C.N. Jenne, B.N.V. Scott, L.D. Zbytniuk, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H.C. Meijndert, S.E. Malawista, A. de Boisleury Chevance, K. Zhang, J. Conly und P. Kubes: Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1386–1393.
- [27] V. Papayannopoulos und A. Zychlinsky: NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 513–521.
- [28] L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart, P.J.M. Leenen, Y.-J. Liu, G. MacPherson, G.J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S.

- Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J.M. Austyn und M.B. Lutz: Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **2010**, *116*, 74.
- [29] C. Auffray, M.H. Sieweke und F. Geissmann: Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 669–692.
- [30] E. Grage-Griebenow, H.D. Flad und M. Ernst: Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *69*, 11–20.
- [31] T. Kurihara, G. Warr, J. Loy und R. Bravo: Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 1757–1762.
- [32] C. Auffray, D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau und F. Geissmann: Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **2007**, *317*, 666–670.
- [33] F. Geissmann, S. Jung und D.R. Littman: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **2003**, *19*, 71–82.
- [34] C.-L. Tsou, W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A.M. Aslanian, S.P. Weisberg, M. Mack und I.F. Charo: Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 902–909.
- [35] N.V. Serbina, T.P. Salazar-Mather, C.A. Biron, W.A. Kuziel und E.G. Pamer: TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity* **2003**, *19*, 59–70.
- [36] D.C. Dale, L. Boxer und W.C. Liles: The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* **2008**, *112*, 935–945.
- [37] C. Kantari, M. Pederzoli-Ribeil und V. Witko-Sarsat: The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib. Microbiol.* **2008**, *15*, 118–146.
- [38] R.S. Flannagan, G. Cosío und S. Grinstein: Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 355–366.
- [39] S. Yamamoto, S. Shimizu, S. Kiyonaka, N. Takahashi, T. Wajima, Y. Hara, T. Negoro, T. Hiroi, Y. Kiuchi, T. Okada, S. Kaneko, I. Lange, A. Fleig, R. Penner, M. Nishi, H. Takeshima und Y. Mori: TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 738–747.
- [40] Y. Zhang, D.L. Wallace, C.M. de Lara, H. Ghattas, B. Asquith, A. Worth, G.E. Griffin, G.P. Taylor, D.F. Tough, P.C.L. Beverley und D.C. Macallan: In vivo kinetics of human

- natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* **2007**, *121*, 258–265.
- [41] E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer und S. Ugolini: Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 503–510.
- [42] E. Vivier, D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, W.M. Yokoyama und S. Ugolini: Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **2011**, *331*, 44–49.
- [43] M.T. Orr und L.L. Lanier: Natural killer cell education and tolerance. *Cell* **2010**, *142*, 847–856.
- [44] J.C. Sun und L.L. Lanier: NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 645–657.
- [45] B.N. Jaeger, J. Donadieu, C. Cognet, C. Bernat, D. Ordonez-Rueda, V. Barlogis, N. Mahlaoui, A. Fenis, E. Narni-Mancinelli, B. Beaupain, C. Bellanne-Chantelot, M. Bajenoff, B. Malissen, M. Malissen, E. Vivier und S. Ugolini: Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 565–580.
- [46] M.J. Smyth, Y. Hayakawa, K. Takeda und H. Yagita: New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 850–861.
- [47] S.-H. Lee, T. Miyagi und C.A. Biron: Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol.* **2007**, *28*, 252–259.
- [48] M.J. Smyth, E. Cretney, J.M. Kelly, J.A. Westwood, S.E.A. Street, H. Yagita, K. Takeda, S.L.H. van Dommelen, M.A. Degli-Esposti und Y. Hayakawa: Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 501–510.
- [49] E. Moschcowitz: Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries. *Proc. NY Pathol. Soc.* **1924**, *24*, 21–24.
- [50] H.-M. Tsai: Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Mol. Med.* **2002**, *80*, 639–647.
- [51] J.E. Sadler: Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **2008**, *112*, 11–18.
- [52] J.L. Moake, J.J. Byrnes, J.H. Troll, C.K. Rudy, S.L. Hong, M.J. Weinstein und N.M. Colanino: Effects of fresh-frozen plasma and its cryosupernatant fraction on von Willebrand factor multimeric forms in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **1985**, *65*, 1232–1236.

- [53] H.M. Tsai: Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* **1996**, *87*, 4235–4244.
- [54] M. Furlan, R. Robles und B. Lämmle: Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* **1996**, *87*, 4223–4234.
- [55] A. McEntegart, H.A. Capell, D. Creran, A. Rumley, M. Woodward und G.D. Lowe: Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **2001**, *40*, 640–644.
- [56] V. Tzavara, P.G. Vlachoyiannopoulos, T. Kordosis, D. Galaris, A. Travlou, U. Dafni und H.M. Moutsopoulos: Evidence for non-adaptive immune response in HIV infection. *Eur. J. Clin. Invest.* **1997**, *27*, 846–849.
- [57] S. Kayal, J.P. Jaïs, N. Aguni, J. Chaudière und J. Labrousse: Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, *157*, 776–784.
- [58] A. Jager, P.J. Kostense, H.G. Ruhé, R.J. Heine, G. Nijpels, J.M. Dekker, L.M. Bouter und C.D.A. Stehouwer: Microalbuminuria and Peripheral Arterial Disease Are Independent Predictors of Cardiovascular and All-Cause Mortality, Especially Among Hypertensive Subjects: Five-year Follow-up of the Hoorn Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **1999**, *19*, 617–624.
- [59] T.N. Bongers, M.P.M. de Maat, M.-L.P.J. van Goor, V. Bhagwanbali, H.H.D.M. van Vliet, E.B. Gómez García, D.W.J. Dippel und F.W.G. Leebeek: High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. *Stroke* **2006**, *37*, 2672–2677.
- [60] U.M. Vischer: von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 1186–1193.
- [61] A.K. Chauhan, J. Kisucka, A. Brill, M.T. Walsh, F. Scheiflinger und D.D. Wagner: ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 2065–2074.
- [62] S.F. De Meyer, A.S. Savchenko, M.S. Haas, D. Schatzberg, M.C. Carroll, A. Schiviz, B. Dietrich, H. Rottensteiner, F. Scheiflinger und D.D. Wagner: Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* **2012**, *120*, 5217–5223.
- [63] O. Soehnlein und L. Lindbom: Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 427–439.

- [64] O. Chertov, H. Ueda, L.L. Xu, K. Tani, W.J. Murphy, J.M. Wang, O.M.Z. Howard, T.J. Sayers und J.J. Oppenheim: Identification of Human Neutrophil-derived Cathepsin G and Azurocidin/CAP37 as Chemoattractants for Mononuclear Cells and Neutrophils. *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 739–747.
- [65] M.E. Taekema-Roelvink, C. Kooten, S.V. Kooij, E. Heemskerk und M.R. Daha: Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2001**, *12*, 932–940.
- [66] P. Libby: Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2012**, *32*, 2045–2051.
- [67] N. Chiang: The Lipoxin Receptor ALX: Potent Ligand-Specific and Stereoselective Actions in Vivo. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 463–487.
- [68] R.A. Dean, J.H. Cox, C.L. Bellac, A. Doucet, A.E. Starr und C.M. Overall: Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* **2008**, *112*, 3455–3464.
- [69] O. Takeuchi und S. Akira: Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **2010**, *140*, 805–820.
- [70] T. Kawai und S. Akira: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 373–384.
- [71] M.S. Lee und Y.-J. Kim: Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 447–480.
- [72] K.V. Anderson und C. Nüsslein-Volhard: Information for the dorsal–ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* **1984**, *311*, 223–227.
- [73] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt und C.A. Janeway: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **1997**, *388*, 394–397.
- [74] T. Kawai und S. Akira: TLR signaling. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 816–825.
- [75] C.E. Bryant, D.R. Spring, M. Gangloff und N.J. Gay: The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 8–14.
- [76] T. Kaisho und S. Akira: Toll-like receptor function and signaling. **2006**, *117*, 979–987.
- [77] J.S.C. Arthur und S.C. Ley: Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 679–692.

- [78] Y. Liu, E.G. Shepherd und L.D. Nelin: MAPK phosphatases—regulating the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 202–212.
- [79] N. Inohara und G. Nuñez: NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 371–382.
- [80] S.E. Girardin, I.G. Boneca, L.A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M.-K. Taha, A. Labigne und U. Zathringer: Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science Signaling* **2003**, *300*, 1584.
- [81] S.E. Girardin, I.G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D.J. Philpott und P.J. Sansonetti: Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8869–8872.
- [82] W. Strober, P.J. Murray, A. Kitani und T. Watanabe: Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 9–20.
- [83] Inohara, Chamaillard, C. McDonald und G. Nuñez: NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 355–383.
- [84] K.S. Kobayashi, M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nuñez und R.A. Flavell: Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **2005**, *307*, 731–734.
- [85] S.E. Girardin, R. Tournebise, M. Mavris, A.-L. Page, X. Li, G.R. Stark, J. Bertin, P.S. DiStefano, M. Yaniv, P.J. Sansonetti und D.J. Philpott: CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 736–742.
- [86] N. Kanazawa, I. Okafuji, N. Kambe, R. Nishikomori, M. Nakata-Hizume, S. Nagai, A. Fuji, T. Yuasa, A. Manki, Y. Sakurai, M. Nakajima, H. Kobayashi, I. Fujiwara, H. Tsutsumi, A. Utani, C. Nishigori, T. Heike, T. Nakahata und Y. Miyachi: Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood* **2005**, *105*, 1195–1197.
- [87] J.W. Ford und D.W. McVicar: TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **2009**, *21*, 38–46.
- [88] O. Sharif und S. Knapp: From expression to signaling: Roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology* **2008**, *213*, 701–713.
- [89] M. Colonna: TREMs in the immune system and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 445–453.
- [90] A. Bouchon, J. Dietrich und M. Colonna: Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J.*

- Immunol.* **2000**, *164*, 4991–4995.
- [91] J.R. Bleharski, V. Kiessler, C. Buonsanti, P.A. Sieling, S. Stenger, M. Colonna und R.L. Modlin: A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 3812–3818.
- [92] K. Zanzinger, C. Schellack, N. Nausch und A. Cerwenka: Regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression on mouse inflammatory monocytes. *Immunology* **2009**, *128*, 185–195.
- [93] A. Bouchon, F. Facchetti, M.A. Weigand und M. Colonna: TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* **2001**, *410*, 1103–1107.
- [94] C. Nathan und A. Ding: TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 530–532.
- [95] J. Klesney-Tait, K. Keck, X. Li, S. Gilfillan, K. Otero, S. Baruah, D.K. Meyerholz, S.M. Varga, C.J. Knudson, T.O. Moninger, J. Moreland, J. Zabner und M. Colonna: Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 138–149.
- [96] S. Gibot: A Soluble Form of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Modulates the Inflammatory Response in Murine Sepsis. *J. Exp. Med.* **2004**, *200*, 1419–1426.
- [97] S. Gibot, C. Alauzet, F. Massin, N. Sennoune, G.C. Faure, M.-C. Béné, A. Lozniewski, P.-E. Bollaert und B. Lévy: Modulation of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 pathway during pneumonia in rats. *J. Infect. Dis.* **2006**, *194*, 975–983.
- [98] S. Gibot, C. Buonsanti, F. Massin, M. Romano, M.-N. Kolopp-Sarda, F. Benigni, G.C. Faure, M.-C. Béné, P. Panina-Bordignon, N. Passini und B. Lévy: Modulation of the triggering receptor expressed on the myeloid cell type 1 pathway in murine septic shock. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 2823–2830.
- [99] P. Haselmayer, L. Grosse-Hovest, P. von Landenberg, H. Schild und M.P. Radsak: TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* **2007**, *110*, 1029–1035.
- [100] M. Mohamadzadeh, S.S. Coberley, G.G. Olinger, W.V. Kalina, G. Ruthel, C.L. Fuller, D.L. Swenson, W.D. Pratt, D.B. Kuhns und A.L. Schmaljohn: Activation of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 on Human Neutrophils by Marburg and Ebola Viruses. *Journal of Virology* **2006**, *80*, 7235–7244.

- [101] I. Wong-Baeza, N. Gonzalez-Roldan, E. Ferat-Osorio, N. Esquivel-Callejas, R. Aduna-Vicente, L. Arriaga-Pizano, H. Astudillo-de la Vega, M.A. Villasis-Keever, R. Torres-Gonzalez, I. Estrada-Garcia, C. Lopez-Macias und A. Isibasi: Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients. *Clin. Exp. Immunol.* **2006**, *145*, 448–455.
- [102] S. Gibot und A. Cravoisy: Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a marker of microbial infection. *Clin. Med. Res.* **2004**, *2*, 181–187.
- [103] R. El Mezayen, M. El Gazzar, M.C. Seeds, C.E. McCall, S.C. Dreskin und M.R. Nicolls: Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunology Letters* **2007**, *111*, 36–44.
- [104] S. Knapp, S. Gibot, A. de Vos, H.H. Versteeg, M. Colonna und T. van der Poll: Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 7131–7134.
- [105] M.P. Radsak, C. Taube, P. Haselmayer, S. Tenzer, H.R. Salih, R. Wiewrodt, R. Buhl und H. Schild: Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is released in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Dev. Immunol.* **2007**, *2007*, 1–7.
- [106] M.-C. Gingras, H. Lapillonne und J.F. Margolin: TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol. Immunol.* **2002**, *38*, 817–824.
- [107] V. Gómez-Piña, A. Soares-Schanoski, A. Rodríguez-Rojas, C. del Fresno, F. García, M.T. Vallejo-Cremades, I. Fernández-Ruiz, F. Arnalich, P. Fuentes-Prior und E. López-Collazo: Metalloproteinases Shed TREM-1 Ectodomain from Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 4065–4073.
- [108] A.S. Tessarz, S. Weiler, K. Zanzinger, P. Angelisová, V. Horejsí und A. Cerwenka: Non-T cell activation linker (NTAL) negatively regulates TREM-1/DAP12-induced inflammatory cytokine production in myeloid cells. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 1991–1999.
- [109] P. Haselmayer, M. Daniel, C. Tertilt, H.R. Salih, M. Stassen, H. ouml rg Schild und M.P. Radsak: Signaling Pathways of the TREM-1- and TLR4-Mediated Neutrophil Oxidative Burst. *J. Innate. Immun.* **2009**, *1*, 582–591.
- [110] C.F. Fortin, O. Lesur und T. Fulop: Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *International Immunology* **2006**, *19*, 41–50.

- [111] K. Dower, D.K. Ellis, K. Saraf, S.A. Jelinsky und L.-L. Lin: Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 3520–3534.
- [112] T. Ormsby, E. Schlecker, J. Ferdin, A.S. Tessarz, P. Angelisova, A.D. Koprulu, M. Borte, K. Warnatz, I. Schulze, W. Ellmeier, V. Horejsi und A. Cerwenka: Btk is a positive regulator in the TREM-1/DAP12 signaling pathway. *Blood* **2011**, *118*, 936–945.
- [113] M.P. Radsak, H.R. Salih, H.-G. Rammensee und H. Schild: Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 4956–4963.
- [114] C.M. O’Gorman, H.T. Fuller und P.S. Dyer: Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **2009**, *457*, 471–474.
- [115] A.C. Leeder, J. Palma-Guerrero und N.L. Glass: The social network: deciphering fungal language. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 440–451.
- [116] S.A. Atanda, J.A. Aina, S.A. Agoda, O.E. Usanga und P.O. Pessu: Mycotoxin management in agriculture: a review. *J. Anim. Sci. Adv.* **2012**, *2*, 250–260.
- [117] D.A. Jones und D. Takemoto: Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **2004**, *16*, 48–62.
- [118] L. Romani: Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 275–288.
- [119] N.M. Crawford: Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* **1995**, *7*, 859–868.
- [120] M.J. Harrison: Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal symbioses. *Journal of Experimental Botany* **1999**, *50*, 1013–1022.
- [121] M. Miransari: Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant. Biol.* **2010**, *12*, 563–569.
- [122] R.A. Samson: The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. *Contrib. Microbiol.* **1999**, *2*, 5–20.
- [123] D.S. Askew: *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Current Opinion in Microbiology* **2008**, *11*, 331–337.
- [124] S. Krappmann: Tools to study molecular mechanisms of *Aspergillus* pathogenicity. *Trends Microbiol.* **2006**, *14*, 356–364.
- [125] J.C. Rhodes: *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. *Med. Mycol.* **2006**, *44*, 77–81.

- [126] T.M. Hohl und M. Feldmesser: *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic Cell* **2007**, *6*, 1953–1963.
- [127] R. Araujo und A.G. Calves Rodrigues: Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 4335–4337.
- [128] M.F. VandenBergh, P.E. Verweij und A. Voss: Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1999**, *34*, 221–227.
- [129] C.S. Clark, R. Rylander und L. Larsson: Levels of gram-negative bacteria, *Aspergillus fumigatus*, dust, and endotoxin at compost plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *45*, 1501–1505.
- [130] G.D. Brown: Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **2011**, *29*, 1–21.
- [131] H.C. Gugnani: Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front. Biosci.* **2003**, *8*, 346–357.
- [132] R. Agarwal, A. Chakrabarti, A. Shah, D. Gupta, J.F. Meis, R. Guleria, R. Moss, D.W. Denning und A. complicating asthma I. working group: Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy* **2013**, *43*, 850–873.
- [133] P.A. Shah und C. Panjabi: Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Review of a Disease with a Worldwide Distribution. *Journal of Asthma* **2002**, *39*, 273–289.
- [134] A.P. Knutsen, R.K. Bush, J.G. Demain, D.W. Denning, A. Dixit, A. Fairs, P.A. Greenberger, B. Kariuki, H. Kita, V.P. Kurup, R.B. Moss, R.M. Niven, C.H. Pashley, R.G. Slavin, H.M. Vijay und A.J. Wardlaw: Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. **2012**, *129*, 280–91.
- [135] S.J. Park und B. Mehrad: Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clinical Microbiology Reviews* **2009**, *22*, 535–551.
- [136] B. Passlick: Aspergilloma of the lung. *Pneumologie* **2009**, *6*, 312–315.
- [137] D.W. Denning: Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *26*, 781–803.
- [138] J.-P. Latgé: *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 310–350.
- [139] O.A. Cornely: *Aspergillus* to *Zygomycetes*: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive fungal infections. *Infection* **2008**, *36*, 296–313.

- [140] G. Bodey, B. Bueltmann, W. Duguid, D. Gibbs, H. Hanak, M. Hotchi, G. Mall, P. Martino, F. Meunier und S. Milliken: Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1992**, *11*, 99–109.
- [141] O.A. Cornely, A. Bohme, D. Buchheidt, H. Einsele, W.J. Heinz, M. Karthaus, S.W. Krause, W. Kruger, G. Maschmeyer, O. Penack, J. Ritter, M. Ruhnke, M. Sandherr, M. Sieniawski, J.J. Vehreschild, H.H. Wolf und A.J. Ullmann: 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*, 113–122.
- [142] M. Hasenberg, J. Behnsen, S. Krappmann, A. Brakhage und M. Gunzer: Phagocyte responses towards *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical Microbiology* **2011**, *301*, 436–444.
- [143] A.A. Brakhage, S. Bruns, A. Thywissen, P.F. Zipfel und J. Behnsen: Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* **2010**, *13*, 409–415.
- [144] J.-P. Latgé: Tasting the fungal cell wall. *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 863–872.
- [145] L. Kohatsu, D.K. Hsu, A.G. Jegalian, F.-T. Liu und L.G. Baum: Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 4718–4726.
- [146] C. Fradin, D. Poulain und T. Jouault: beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 4391–4398.
- [147] T.B.H. Geijtenbeek und S.I. Gringhuis: Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 465–479.
- [148] B. Ferwerda, G. Ferwerda, T.S. Plantinga, J.A. Willment, A.B. van Sriel, H. Venselaar, C.C. Elbers, M.D. Johnson, A. Cambi, C. Huysamen, L. Jacobs, T. Jansen, K. Verheijen, L. Masthoff, S.A. Morré, G. Vriend, D.L. Williams, J.R. Perfect, L.A.B. Joosten, C. Wijmenga, J.W.M. van der Meer, G.J. Adema, B.J. Kullberg, G.D. Brown und M.G. Netea: Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1760–1767.
- [149] P.R. Taylor, S.V. Tsoni, J.A. Willment, K.M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon und G.D. Brown: Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 31–38.
- [150] E.-O. Glocker, A. Hennigs, M. Nabavi, A.A. Schäffer, C. Woellner, U. Salzer, D. Pfeifer, H. Veelken, K. Warnatz, F. Tahami, S. Jamal, A. Manguiat, N. Rezaei, A.A. Amirzargar,

- A. Plebani, N. Hanneschläger, O. Gross, J. Ruland und B. Grimbacher: A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1727–1735.
- [151] F.L. van de Veerdonk, B.J. Kullberg, J.W. van der Meer, N.A. Gow und M.G. Netea: Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology* **2008**, *11*, 305–312.
- [152] S. Bellocchio, C. Montagnoli, S. Bozza, R. Gaziano, G. Rossi, S.S. Mambula, A. Vecchi, A. Mantovani, S.M. Levitz und L. Romani: The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 3059–3069.
- [153] P.-Y. Bochud, J.W. Chien, K.A. Marr, W.M. Leisenring, A. Upton, M. Janer, S.D. Rodrigues, S. Li, J.A. Hansen, L.P. Zhao, A. Aderem und M. Boeckh: Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1766–1777.
- [154] A. Carvalho, A.C. Pasqualotto, L. Pitzurra, L. Romani, D.W. Denning und F. Rodrigues: Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J. Infect. Dis.* **2008**, *197*, 618–621.
- [155] T. Madan, P. Eggleton, U. Kishore, P. Strong, S.S. Aggrawal, P.U. Sarma und K.B. Reid: Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 3171–3179.
- [156] C. Garlanda, E. Hirsch, S. Bozza, A. Salustri, M. De Acetis, R. Nota, A. Maccagno, F. Riva, B. Bottazzi, G. Peri, A. Doni, L. Vago, M. Botto, R. De Santis, P. Carminati, G. Siracusa, F. Altruda, A. Vecchi, L. Romani und A. Mantovani: Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* **2002**, *420*, 182–186.
- [157] S. Jaillon, G. Peri, Y. Delneste, I. Fremaux, A. Doni, F. Moalli, C. Garlanda, L. Romani, H. Gascan, S. Bellocchio, S. Bozza, M.A. Cassatella, P. Jeannin und A. Mantovani: The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 793–804.
- [158] E.V. Svirshchetskaya, M.A. Shevchenko, D. Huet, F. Femenia, J.P. Latge, P. Boireau und N.P. Berkova: Susceptibility of mice to invasive aspergillosis correlates with delayed cell influx into the lungs. *International Journal of Immunogenetics* **2009**, *36*, 289–299.

- [159] C. Dumestre-Pérard, B. Lamy, D. Aldebert, C. Lemaire-Vieille, R. Grillot, J.-P. Brion, J. Gagnon und J.-Y. Cesbron: Aspergillus conidia activate the complement by the mannan-binding lectin C2 bypass mechanism. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 7100–7105.
- [160] P.F. Zipfel und C. Skerka: Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 729–740.
- [161] B.B. Philippe, O.O. Ibrahim-Granet, M.C.M.C. Prévost, M.A.M.A. Gougerot-Pocidaló, M.M.S. Perez, A.A. Van der Meeren und J.P.J.P. Latgé: Killing of Aspergillus fumigatus by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 3034–3042.
- [162] D.E. Morgenstern, M.A. Gifford, L.L. Li, C.M. Doerschuk und M.C. Dinauer: Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to Aspergillus fumigatus. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 207–218.
- [163] S.H. Jackson, J.I. Gallin und S.M. Holland: The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 751–758.
- [164] J.D. Pollock, D.A. Williams, M.A. Gifford, L.L. Li, X. Du, J. Fisherman, S.H. Orkin, C.M. Doerschuk und M.C. Dinauer: Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat. Genet.* **1995**, *9*, 202–209.
- [165] E.P. Reeves, H. Lu, H.L. Jacobs, C.G.M. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E.O. Potma, A. Warley, J. Roes und A.W. Segal: Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **2002**, *416*, 291–297.
- [166] K.A. Zarembek, J.A. Sugui, Y.C. Chang, K.J. Kwon-Chung und J.I. Gallin: Human polymorphonuclear leukocytes inhibit Aspergillus fumigatus conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. **2007**, *178*, 6367–6373.
- [167] D. Lopera, B.H. Aristizabal, A. Restrepo, L.E. Cano und A. González: Lysozyme plays a dual role against the dimorphic fungus Paracoccidioides brasiliensis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2008**, *50*, 169–175.
- [168] J. Tkalcevic, M. Novelli, M. Phylactides, J.P. Iredale, A.W. Segal und J. Roes: Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* **2000**, *12*, 201–210.
- [169] A. Polak-Wyss: Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) on Cryptococcus and Aspergillus infections in normal and immunosuppressed mice. *Mycoses* **1991**, *34*, 205–215.

- [170] B. Mehrad, R.M. Strieter, T.A. Moore, W.C. Tsai, S.A. Lira und T.J. Standiford: CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 6086–6094.
- [171] B. Mehrad, M. Wiekowski, B.E. Morrison, S.-C. Chen, E.C. Coronel, D.J. Manfra und S.A. Lira: Transient lung-specific expression of the chemokine KC improves outcome in invasive aspergillosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2002**, *166*, 1263–1268.
- [172] M.M. Mircescu, L. Lipuma, N. van Rooijen, E.G. Pamer und T.M. Hohl: Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 647–656.
- [173] S. Bozza, R. Gaziano, A. Spreca, A. Bacci, C. Montagnoli, P. di Francesco und L. Romani: Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 1362–1371.
- [174] C.A. Rappleye und W.E. Goldman: Fungal stealth technology. *Trends Immunol.* **2008**, *29*, 18–24.
- [175] V. Aimanianda, J. Bayry, S. Bozza, O. Kniemeyer, K. Perruccio, S.R. Elluru, C. Clavaud, S. Paris, A.A. Brakhage, S.V. Kaveri, L. Romani und J.-P. Latgé: Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* **2009**, *460*, 1117–1121.
- [176] G. Vogl, I. Lesiak, D.B. Jensen, S. Perkhofer, R. Eck, C. Speth, C. Lass-Flörl, P.F. Zipfel, A.M. Blom, M.P. Dierich und R. Würzner: Immune evasion by acquisition of complement inhibitors: The mould *Aspergillus* binds both factor H and C4b binding protein. *Mol. Immunol.* **2008**, *45*, 1485–1493.
- [177] T.T. Brandhorst, M. Wüthrich, B. Finkel-Jimenez, T. Warner und B.S. Klein: Exploiting type 3 complement receptor for TNF-alpha suppression, immune evasion, and progressive pulmonary fungal infection. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 7444–7453.
- [178] K. Kamei und A. Watanabe: *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Medical Mycology* **2005**, *43*, 95–99.
- [179] S. Nishida, L.S. Yoshida, T. Shimoyama, H. Nuno, T. Kobayashi und S. Tsunawaki: Fungal Metabolite Gliotoxin Targets Flavocytochrome b558 in the Activation of the Human Neutrophil NADPH Oxidase. *Infect. Immun.* **2004**, *73*, 235–244.
- [180] C. Coméra, K. André, J. Laffitte, X. Collet, P. Galtier und I. Maridonneau-Parini: Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils. *Microbes and Infection* **2007**, *9*, 47–54.

- [181] S. Paris, D. Wysong, J.P. Debeaupuis, K. Shibuya, B. Philippe, R.D. Diamond und J.P. Latge: Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 3551–3562.
- [182] M.D. Holdom, R.J. Hay und A.J. Hamilton: The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 3326–3332.
- [183] T. Meshulam, S.M. Levitz, L. Christin und R.D. Diamond: A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *J. Infect. Dis.* **1995**, *172*, 1153–1156.
- [184] D.G. Motto, A.K. Chauhan, G. Zhu, J. Homeister, C.B. Lamb, K.C. Desch, W. Zhang, H.-M. Tsai, D.D. Wagner und D. Ginsburg: Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2752–2761.
- [185] H. Quentmeier, M. Zaborski und H.G. Drexler: The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines. *Leuk. Res.* **1997**, *21*, 343–350.
- [186] H. Quentmeier, A. Duschl, Z.B. Hu, B. Schnarr, M. Zaborski und H.G. Drexler: MUTZ-3, a monocytic model cell line for interleukin-4 and lipopolysaccharide studies. *Immunology* **1996**, *89*, 606–612.
- [187] J. Behnsen, P. Narang, M. Hasenberg, F. Gunzer, U. Bilitewski, N. Klippel, M. Rohde, M. Brock, A.A. Brakhage und M. Gunzer: Environmental Dimensionality Controls the Interaction of Phagocytes with the Pathogenic Fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **2007**, *3*, 138–151.
- [188] A.A. Brakhage und J. Van den Brulle: Use of reporter genes to identify recessive trans-acting mutations specifically involved in the regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 2781–2788.
- [189] M. Hasenberg, A. Köhler, S. Bonifatius, A. Jeron und M. Gunzer: Direct Observation of Phagocytosis and NET-formation by Neutrophils in Infected Lungs using 2-photon Microscopy. *JoVE* **2011**, *52*, 2659.
- [190] B. Jahn, A. Koch, A. Schmidt, G. Wanner, H. Gehringer, S. Bhakdi und A.A. Brakhage: Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 5110–5117.
- [191] M. Weber, C. Lupp, P. Stein, A. Kreft, T. Bopp, T.C. Wehler, E. Schmitt, H. Schild und M.P. Radsak: Mechanisms of cyclic nucleotide phosphodiesterases in modulating T cell

- responses in murine graft-versus-host disease. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 58110.
- [192] V. Rowe, T. Banovic, K.P. MacDonald, R. Kuns, A.L. Don, E.S. Morris, A.C. Burman, H.M. Bofinger, A.D. Clouston und G.R. Hill: Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **2006**, *108*, 2485–2492.
- [193] R.G. Grogott: A stain for fungi in tissue sections and smears, using Gomori's methenamine-silver nitrate technique. *Amer. J. clin. Path.* **1955**, *25*, 975–979.
- [194] C.R. Toth, R.F. Hostutler, A.S. Baldwin und T.P. Bender: Members of the nuclear factor kappa B family transactivate the murine c-myb gene. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 7661–7671.
- [195] C. Riccardi und I. Nicoletti: Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1458–1461.
- [196] S.J.A.M. Santegoets, A.J. Masterson, P.C. van der Sluis, S.M. Lougheed, D.M. Fluitsma, A.J.M. van den Eertwegh, H.M. Pinedo, R.J. Scheper und T.D. de Gruijl: A CD34+ human cell line model of myeloid dendritic cell differentiation: evidence for a CD14+CD11b+ Langerhans cell precursor. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *80*, 1337–1344.
- [197] P.R. Young, M.M. McLaughlin, S. Kumar, S. Kassis, M.L. Doyle, D. McNulty, T.F. Gallagher, S. Fisher, P.C. McDonnell, S.A. Carr, M.J. Huddleston, G. Seibel, T.G. Porter, G.P. Livi, J.L. Adams und J.C. Lee: Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12116–12121.
- [198] M.G. Netea, T. Azam, G. Ferwerda, S.E. Girardin, S.-H. Kim und C.A. Dinarello: Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *80*, 1454–1461.
- [199] M. Dubourdeau, R. Athman, V. Balloy, M. Huerre, M. Chignard, D.J. Philpott, J.-P. Latgé und O. Ibrahim-Granet: *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 3994–4001.
- [200] M. Duong, N. Ouellet, M. Simard, Y. Bergeron, M. Olivier und M.G. Bergeron: Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *J. Infect. Dis.* **1998**, *178*, 1472–1482.
- [201] S.D. Stephens-Romero, A.J. Mednick und M. Feldmesser: The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 114–125.

- [202] J.M. Daley, A.A. Thomay, M.D. Connolly, J.S. Reichner und J.E. Albina: Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *83*, 64–70.
- [203] A.S. Byrd, X.M. O'Brien, C.M. Johnson, L.M. Lavigne und J.S. Reichner: An Extracellular Matrix-Based Mechanism of Rapid Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Candida albicans*. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 4136–4148.
- [204] S. Dillon, S. Agrawal, K. Banerjee, J. Letterio, T.L. Denning, K. Oswald-Richter, D.J. Kasprovicz, K. Kellar, J. Pare, T. van Dyke, S. Ziegler, D. Unutmaz und B. Pulendran: Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 916–928.
- [205] C.R. Bonnett, E.J. Cornish, A.G. Harmsen und J.B. Burritt: Early Neutrophil Recruitment and Aggregation in the Murine Lung Inhibit Germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 6528–6539.
- [206] S. Bruns, O. Kniemeyer, M. Hasenberg, V. Aimanianda, S. Nietzsche, A. Thywissen, A. Jeron, J.-P. Latgé, A.A. Brakhage und M. Gunzer: Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog* **2010**, *6*, 1000873.
- [207] V. Bronte und P. Zanovello: Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 641–654.
- [208] M. Munder: Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal of Pharmacology* **2009**, *158*, 638–651.
- [209] C. Bogdan: Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 907–916.
- [210] F.W. Holtsberg, C.M. Ensor, M.R. Steiner, J.S. Bomalaski und M.A. Clark: Poly (ethylene glycol)(PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties. *Journal of Controlled Release* **2002**, *80*, 259–271.
- [211] J.-f. Dong, J.L. Moake, L. Nolasco, A. Bernardo, W. Arceneaux, C.N. Shrimpton, A.J. Schade, L.V. McIntire, K. Fujikawa und J.A. López: ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* **2002**, *100*, 4033–4039.
- [212] M.K. Whyte, J. Savill, L.C. Meagher, A. Lee und C. Haslett: Coupling of neutrophil apoptosis to recognition by macrophages: coordinated acceleration by protein synthesis inhibitors. *J. Leukoc. Biol.* **1997**, *62*, 195–202.

- [213] B. Dibbert, M. Weber, W.H. Nikolaizik, P. Vogt, M.H. Schöni, K. Blaser und H.U. Simon: Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 13330–13335.
- [214] A.J. Masterson: MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood* **2002**, *100*, 701–703.
- [215] E. Ciraci, D. Barisani, A. Parafioriti, G. Formisano, G. Arancia, G. Bottazzo und A.C. Berardi: CD34 human hematopoietic progenitor cell line, MUTZ-3, differentiates into functional osteoclasts. *Experimental Hematology* **2007**, *35*, 967–977.
- [216] L.A. Hyder, J. Gonzalez, J.L. Harden, L.M. Johnson-Huang, L.C. Zaba, K.C. Pierson, N.J. Eungdamrong, T. Lentini, N. Gulati, J. Fuentes-Duculan, M. Suárez-Fariñas und M.A. Lowes: TREM-1 as a Potential Therapeutic Target in Psoriasis. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 1742–1751.
- [217] B.M. Burgering und P.J. Coffey: Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **1995**, *376*, 599–602.
- [218] T.F. Franke: PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* **2008**, *27*, 6473–6488.
- [219] M.J. Rane: p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 Activation Functions as 3-Phosphoinositide-dependent Kinase-2 for Akt in Human Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *276*, 3517–3523.
- [220] B. Heit: An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J. Cell Biol.* **2002**, *159*, 91–102.
- [221] B. Heit, S.M. Robbins, C.M. Downey, Z. Guan, P. Colarusso, B.J. Miller, F.R. Jirik und P. Kubers: PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 743–752.
- [222] S. Olieslagers, E. Pardali, V. Tchaikovski, P. ten Dijke und J. Waltenberger: TGF-1/ALK5-induced monocyte migration involves PI3K and p38 pathways and is not negatively affected by diabetes mellitus. *Cardiovascular Research* **2011**, *91*, 510–518.
- [223] D.A. Rodeberg und G.F. Babcock: Role of calcium during lipopolysaccharide stimulation of neutrophils. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 2812–2816.
- [224] A. Asea, S.K. Kraeft, E.A. Kurt-Jones, M.A. Stevenson, L.B. Chen, R.W. Finberg, G.C. Koo und S.K. Calderwood: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 435–442.

- [225] A. Rao, C. Luo und P.G. Hogan: Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15*, 707–747.
- [226] I. Zanoni, R. Ostuni, G. Capuano, M. Collini, M. Caccia, A.E. Ronchi, M. Rocchetti, F. Mingozzi, M. Foti, G. Chirico, B. Costa, A. Zaza, P. Ricciardi-Castagnoli und F. Granucci: CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* **2009**, *460*, 264–268.
- [227] S.E. Evans, M.J. Tuvim, J. Zhang, D.T. Larson, C.D. García, S. Pro, K.R. Coombes und B.F. Dickey: Host lung gene expression patterns predict infectious etiology in a mouse model of pneumonia. *Respir. Res.* **2010**, *11*, 101.
- [228] V. Balloy, M. Huerre, J.P. Latge und M. Chignard: Differences in Patterns of Infection and Inflammation for Corticosteroid Treatment and Chemotherapy in Experimental Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Infect. Immun.* **2004**, *73*, 494–503.
- [229] A. Schaffner, H. Douglas, A.I. Braude und C.E. Davis: Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infect. Immun.* **1983**, *42*, 1109–1115.
- [230] J.-P. Latgé: The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 382–389.
- [231] I.A.J.M. Bakker-Woudenberg: Experimental models of pulmonary infection. *Journal of Microbiological Methods* **2003**, *54*, 295–313.
- [232] T.F. Patterson: The future of animal models of invasive aspergillosis. *Med. Mycol.* **2005**, *43*, 115–119.
- [233] K. Shibuya, S. Naoe und H. Yamaguchi: Animal models of *A. fumigatus* infections. *Contrib. Microbiol.* **1999**, *2*, 130–138.
- [234] E.J. Ruijgrok, A.G. Vulto und E.W.M. van Etten: Aerosol Delivery of Amphotericin B Desoxycholate (Fungizone) and Liposomal Amphotericin B (AmBisome): Aerosol Characteristics and In-vivo Amphotericin B Deposition in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2000**, *52*, 919–291.
- [235] R.R. Vethanayagam, N.G. Almyroudis, M.J. Grimm, D.C. Lewandowski, C.T.N. Pham, T.S. Blackwell, R. Petraitiene, V. Petraitis, T.J. Walsh, C.F. Urban und B.H. Segal: Role of NADPH oxidase versus neutrophil proteases in antimicrobial host defense. *PLoS ONE* **2011**, *6*, 28149.
- [236] E.J. Cornish, B.J. Hurtgen, K. McInnerney, N.L. Burritt, R.M. Taylor, J.N. Jarvis, S.Y. Wang und J.B. Burritt: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-independent resistance to *Aspergillus fumigatus* in alveolar macrophages. **2008**, *180*, 6854–6867.

- [237] M.J. Grimm, R.R. Vethanayagam, N.G. Almyroudis, C.G. Dennis, A.N.H. Khan, A.C. D’Auria, K.L. Singel, B.A. Davidson, P.R. Knight, T.S. Blackwell, T.M. Hohl, M.K. Mansour, J.M. Vyas, M. Rohm, C.F. Urban, T. Kelkka, R. Holmdahl und B.H. Segal: Monocyte- and Macrophage-Targeted NADPH Oxidase Mediates Antifungal Host Defense and Regulation of Acute Inflammation in Mice. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 4175–4184.
- [238] A. Pizzolla, M. Hultqvist, B. Nilson, M.J. Grimm, T. Eneljung, I.-M. Jonsson, M. Verdrengh, T. Kelkka, I. Gjertsson, B.H. Segal und R. Holmdahl: Reactive oxygen species produced by the NADPH oxidase 2 complex in monocytes protect mice from bacterial infections. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 5003–5011.
- [239] B.H. Segal, W. Han, J.J. Bushey, M. Joo, Z. Bhatti, J. Feminella, C.G. Dennis, R.R. Vethanayagam, F.E. Yull, M. Capitano, P.K. Wallace, H. Minderman, J.W. Christman, M.B. Sporn, J. Chan, D.C. Vinh, S.M. Holland, L.R. Romani, S.L. Gaffen, M.L. Freeman und T.S. Blackwell: NADPH oxidase limits innate immune responses in the lungs in mice. *PLoS ONE* **2010**, *5*, 9631.
- [240] A.M. Adkison, S.Z. Raptis, D.G. Kelley und C.T.N. Pham: Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 363–371.
- [241] V. Papayannopoulos, K.D. Metzler, A. Hakkim und A. Zychlinsky: Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **2010**, *191*, 677–691.
- [242] A. McCormick, L. Heesemann, J. Wagener, V. Marcos, J. Loeffler, J. Heesemann und F. Ebel: NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection* **2010**, *12*, 928–936.
- [243] A.K. Zaas, G. Liao, J.W. Chien, C. Weinberg, D. Shore, S.S. Giles, K.A. Marr, J. Usuka, L.H. Burch, L. Perera, J.R. Perfect, G. Peltz und D.A. Schwartz: Plasminogen alleles influence susceptibility to invasive aspergillosis. *PLoS Genet.* **2008**, *4*, 1000101.
- [244] D.M. Dixon, A. Polak und T.J. Walsh: Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect. Immun.* **1989**, *57*, 1452–1456.
- [245] P.C. Rodríguez und A.C. Ochoa: Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* **2008**, *222*, 180–191.
- [246] J. MacMicking, Q.-w. Xie und C. Nathan: NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15*, 323–350.

- [247] S.J. Galli, N. Borregaard und T.A. Wynn: Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 1035–1044.
- [248] J. Pillay, V.M. Kamp, E. van Hoffen, T. Visser, T. Tak, J.-W. Lammers, L.H. Ulfman, L.P. Leenen, P. Pickkers und L. Koenderman: A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 327–336.
- [249] D.I. Gabrilovich und S. Nagaraj: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 162–174.
- [250] E. Michaliszyn, S. S  n  chal, P. Martel und L. de Repentigny: Lack of involvement of nitric oxide in killing of *Aspergillus fumigatus* conidia by pulmonary alveolar macrophages. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 2075–2078.
- [251] R.M. Anthony, J.F. Urban, F. Alem, H.A. Hamed, C.T. Rozo, J.-L. Boucher, N. van Rooijen und W.C. Gause: Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 955–960.
- [252] A. Zhao, J.F. Urban, R.M. Anthony, R. Sun, J. Stiltz, N. van Rooijen, T.A. Wynn, W.C. Gause und T. Shea-Donohue: Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 217–225.
- [253] K.C. El Kasmi, J.E. Qualls, J.T. Pesce, A.M. Smith, R.W. Thompson, M. Henao-Tamayo, R.J. Basaraba, T. K  nig, U. Schleicher, M.-S. Koo, G. Kaplan, K.A. Fitzgerald, E.I. Tuomanen, I.M. Orme, T.-D. Kanneganti, C. Bogdan, T.A. Wynn und P.J. Murray: Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1399–1406.
- [254] T.A. Reese, H.-E. Liang, A.M. Tager, A.D. Luster, N. van Rooijen, D. Voehringer und R.M. Locksley: Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* **2007**, *447*, 92–96.
- [255] A.P. Gobert, Y. Cheng, M. Akhtar, B.D. Mersey, D.R. Blumberg, R.K. Cross, R. Chaturvedi, C.B. Drachenberg, J.-L. Boucher, A. Hacker, R.A. Casero und K.T. Wilson: Protective Role of Arginase in a Mouse Model of Colitis. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 2109–2117.
- [256] S. Duleu, P. Vincendeau, P. Courtois, S. Semballa, I. Lagroye, S. Daulou  de, J.-L. Boucher, K.T. Wilson, B. Veyret und A.P. Gobert: Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 6298–6303.

- [257] D.J. McGee, J. Zabaleta, R.J. Viator, T.L. Testerman, A.C. Ochoa und G.L. Mendz: Purification and characterization of *Helicobacter pylori* arginase, RocF: unique features among the arginase superfamily. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1952–1962.
- [258] R.J. Viator, R.F. Rest, E. Hildebrandt und D.J. McGee: Characterization of *Bacillus anthracis* arginase: effects of pH, temperature, and cell viability on metal preference. *BMC Biochem.* **2008**, *9*, 15.
- [259] N. Lerolle, C. Dunois-Lardé, I. Badirou, D.G. Motto, G. Hill, P. Bruneval, J.-L. Diehl, C.V. Denis und D. Baruch: von Willebrand factor is a major determinant of ADAMTS-13 decrease during mouse sepsis induced by cecum ligation and puncture. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7*, 843–850.
- [260] D.B. Rubin, J.P. Wiener-Kronish, J.F. Murray, D.R. Green, J. Turner, J.M. Luce, A.B. Montgomery, J.D. Marks und M.A. Matthay: Elevated von Willebrand factor antigen is an early plasma predictor of acute lung injury in nonpulmonary sepsis syndrome. *J. Clin. Invest.* **1990**, *86*, 474–480.
- [261] K. Martin, D. Borgel, N. Lerolle, H.B. Feys, L. Trinquart, K. Vanhoorelbeke, H. Deckmyn, P. Legendre, J.-L. Diehl und D. Baruch: Decreased ADAMTS-13 (A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats) is associated with a poor prognosis in sepsis-induced organ failure. *Crit. Care Med.* **2007**, *35*, 2375–2382.
- [262] T. Ono, J. Mimuro, S. Madoiwa, K. Soejima, Y. Kashiwakura, A. Ishiwata, K. Takano, T. Ohmori und Y. Sakata: Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood* **2006**, *107*, 528–534.
- [263] J.A. Kremer Hovinga, S. Zeerleder, P. Kessler, T. Romani de Wit, J.A. van Mourik, C.E. Hack, H. ten Cate, P.H. Reitsma, W.A. Wuillemin und B. Lämmle: ADAMTS-13, von Willebrand factor and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 2284–2290.
- [264] F. Banno: Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **2006**, *107*, 3161–3166.
- [265] K. Alber: *Untersuchungen zu verschiedenen Triggerfaktoren der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) in Mäusen.* (Dissertation, noch nicht eingereicht).