

Altersabhängigkeit von T-Zellantworten gegen Pilze und Bakterien bei
MukoviszidosepatientInnen

Michelle Paszkier

Experimentelle Pädiatrie und Neonatologie
der Universitätsklinik Magdeburg

unter Betreuung von

Prof. Dr. Monika Brunner-Weinzierl

Dr. Katrin Vogel

07.03.2022

Zusammenfassung

Früher war die zystische Fibrose eine Krankheit ohne Behandlungsmöglichkeiten und häufig schon in der Kindheit tödlich. Jedoch überleben heutzutage die meisten Betroffenen bis ins Erwachsenenalter dank einer starken Intensivierung der Forschung und resultierender neuer Behandlungsansätze. Dies wurde durch die Entdeckung von mehr als 2000 unterschiedlichen Mutationen in dem für die Krankheit ursächlichen CFTR-Gen möglich gemacht ^[1]. Ein Umstand, der dann jedoch häufig zu Komplikationen führt und zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion beiträgt, sind chronische Infektionen mit diversen Keimen. Bei einem Blick auf die auslösenden Erreger lassen sich altersspezifische Häufungen feststellen. So zeigen sich bei jüngeren Kindern vermehrt Nachweise von *Staphylococcus aureus*, wohingegen bei älteren Kindern und Erwachsenen neben anderen vor allem gram-negative Nonfermenter dominieren ^[2]. Eine hohe Prävalenz in Jugend und jungem Erwachsenenalter weist dabei *Pseudomonas aeruginosa* auf, der in Form von chronischen, kaum eradizierbaren Infektionen häufig einen beschleunigten Verfall der Lungenfunktion zur Folge hat. Vorwiegend in älteren Patientinnen und Patienten sind auch wiederkehrende Infektionen mit Pilzen und *Mycobacterium avium* nicht selten ^{[2][3]}. Es scheint, als wären Mukoviszidosepatientinnen und -patienten anfälliger für Besiedlungen und invasivere Formen des Erregerkontakts.

Aufgrund der frühen unkontrollierbaren Reaktion des Immunsystems auf diverse einwirkende Pathogene bei Mukoviszidosepatientinnen und -patienten vermuten wir, dass diese zum Teil früh beginnenden chronischen Infektionen die zum jeweiligen Zeitpunkt altersspezifisch angelegten Besonderheiten des Immunsystems bei Betroffenen widerspiegelt. Um für diese Hypothese Anhaltspunkte zu bekommen, möchte ich in dem vorliegenden Projektvorschlag Proben von Mukoviszidosepatientinnen und -patienten - von Kleinkindern bis Erwachsenen - analysieren, gegen Krankheitssymptome und den retrospektiven Krankheitsverlauf korrelieren, aber auch mit gesunden Probanden vergleichen. Dabei richtet sich das Hauptaugenmerk auf die pathogenspezifische Reaktion von T-Zellen nach Stimulation durch Pathogen-beladene Monozyten, die sich im In-vitro-Modell nachstellen lässt. Dieses Wissen könnte dazu beitragen, die Pathogenabwehr von Mukoviszidosepatientinnen und -patienten besser zu verstehen.



Einleitung

Die zystische Fibrose ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, die ihren Ursprung in einem Gendefekt mit nachfolgendem Fehlen oder gestörter Funktion des funktionellen membranständigen cAMP-abhängigen Chloridkanals CFTR hat. Dadurch wird der Anionentransport unter anderem in Epithelzellen der Atemwege gestört, was letzten Endes in einer Viskositätserhöhung des Mukus resultiert. Dies begünstigt die Ansiedlung von Krankheitserregern und eine damit einhergehende Kombination aus chronischer Infektion und Entzündung. Durch Freisetzung von Proteasen wie der Elastase kommt es zu einer fortschreitenden Organschädigung, die nicht nur die Lunge, sondern in Form von entzündlichen Veränderungen und Folgen eines gestörten Sekretabflusses auch andere Organsysteme betreffen. Die bedeutendste Komorbidität tritt als endo- und exokrine Pankreasinsuffizienz mit nachfolgender Malabsorption und Diabetes mellitus in Erscheinung. Weiterhin kann die Krankheit durch Beeinträchtigung des Galleabflusses zu einer biliären Zirrhose der Leber, zu einer erhöhten Gefahr eines Hitzeschocks durch Affektion der Schweißdrüsen oder etwa zu einer Infertilität führen ^[4].

Eines von 3.300 Neugeborenen kommt in Deutschland mit Mukoviszidose auf die Welt ^[5]. Laut des Berichtsbandes 2020 des Deutschen Mukoviszidose-Registers lag die Lebenserwartung eines Neugeborenen in diesem Jahr bei 55 Jahren ^[6]. Einen Anteil an gesteigerter Lebenserwartung und -qualität hat die Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten, die in den letzten Jahren vor allem durch die Anwendung von CFTR-Modulatoren geprägt wurde. 2012 wurde Ivacaftor unter dem Handelsnamen Kalydeco[®] als erstes Therapeutikum seiner Art in Deutschland zugelassen. Nach einigen anderen in den nachkommenden Jahren, folgte 2020 Kaftrio[®], ein Kombinationspräparat zweier CFTR-Korrektoren und eines CFTR-Potentiators ^[7]. Obwohl sich die Überlebensdauer der Betroffenen in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert hat, bleibt die Abnahme der Lungenfunktion auf dem Boden wiederkehrender pulmonaler Infektionen mit 77% aller Todesfälle die Haupttodesursache ^[5].

Eine zentrale Rolle für den Verlauf einer Mukoviszidoseerkrankung spielt demnach die chronische Entzündung. Es gibt eindeutige Hinweise darauf, dass diese Entzündung der Atemwege, anders als bei lungengesunden Personen, in übermäßigem Maße und länger anhaltend in Relation zum Stimulus stattfindet ^[8]. Dabei zeigen Mukoviszidosepatientinnen und -patienten nicht nur eine höhere Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, sondern auch für die Besiedlung mit Hefe- und Schimmelpilzen. Diese reichen von transienten über chronische Kolonisierungen bis hin zu aktiven Infektionen ^[9].

Damit im Zusammenhang steht auch eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung von allergischen Reaktionen, insbesondere auf Aeroallergene wie *Aspergillus fumigatus*. Mit der Sensibilisierung, die bei der Besiedlung der Atemwege durch den Schimmelpilz stattfindet, werden ungewollte Reaktionen des Immunsystems ermöglicht. Erkenntnisse aus einer Studie von Bacher et al. (2019) legen nahe, dass Th17-Zellen bei Patientinnen und Patienten mit

chronischen entzündlichen Atemwegserkrankungen eine entscheidende Rolle bei der dysregulierten Immunantwort auf Pilze wie *Aspergillus fumigatus* spielen könnten. Diese basiere auf einer Verbindung zwischen protektiver Th17-Antwort auf *Candida albicans* im Gastrointestinaltrakt und entzündlichem Geschehen bei Kontakt mit aeroallergenen Pilzen, zurückzuführen auf eine bestehende Kreuzreaktivität auf *Candida albicans* [10].

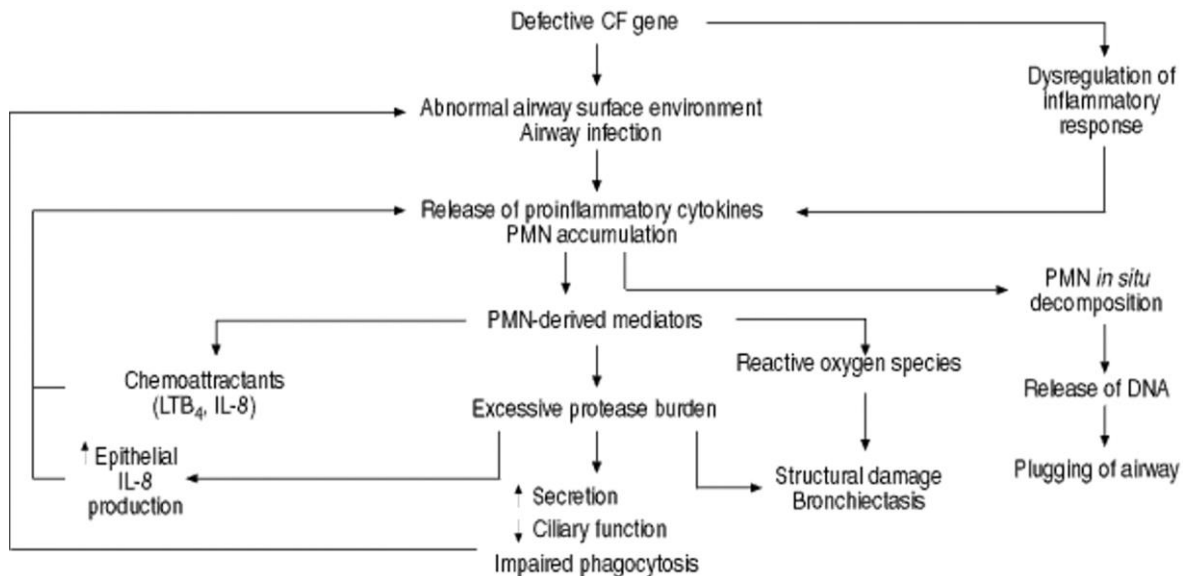


Abb.1: Reaktive Vorgänge bei einer Infektion der Lunge bei Zystischer Fibrose.

Der zugrundeliegende Defekt im CFTR- Gen führt zu einer dysregulierten Immunantwort mit Ansammlung von polymorphkernigen Leukozyten (PMNs). Diese wird durch die Sekretion chemotaktischer Stoffe dieser Zellen und durch die hohen Mengen an Elastase in der Lunge, induziert durch die IL-8-Produktion, aufrechterhalten. Durch die Freisetzung von schädlichen Mediatoren wie reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und proteolytischer Enzyme wird die Lunge in ihrer Struktur geschädigt. Auch die Phagozytose anfallender Zellreste und Abfallstoffe ist beeinträchtigt. Dies trägt zum Bestehenbleiben der Infektion und schließlich zu einem Zustand mit ständiger Infektion und Entzündung unter Abnahme der Lungenfunktion bei.

LTB₄: Leukotrien B₄, DNA: Desoxyribonukleinsäure

De Rose, V. (2002) [11]

Die zugrundeliegenden Mechanismen scheinen komplex zu sein. Ein Großteil der bisherigen Forschung zu Entzündungsmechanismen in den Atemwegen Mukoviszidoseerkrankter konzentrierte sich vor allem auf die Aktivierung dieser Entzündungsreaktion [8]. Viele Forscherinnen und Forscher richten ihre Aufmerksamkeit jedoch mehr und mehr auf deren Terminierung. Ist die Entzündung einmal aktiviert, steigt sie im Verlauf oft drastisch an und endet in einem selbsterhaltenden Kreislauf [8]. In Anbetracht dessen erscheint es sinnvoll, dass der Grund für das Anhalten dieser inflammatorischen Phase mit einer gestörten Beendigung im Zusammenhang stehen könnte.



OTTO VON GUERICKE
UNIVERSITÄT
MAGDEBURG



UNIVERSITÄTSKLINIKUM
MAGDEBURG A.Ö.R.

Im Rahmen einer Studie von Nichols et al. (2007) fanden Zytokinmessungen in der Flüssigkeit einer bronchoalveolären Lavage (BAL) statt. Diese zeigten massive Konzentrationen von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) und ihren Produkten wie der Elastase [3]. In Blut von an Mukoviszidose erkrankten Kindern wurde in einer weiteren Studie an einem humanen Stimulationsmodell mit Mycobacterium abscessus eine erhöhte Konzentration von CD40-Ligand bei gleichzeitiger Erniedrigung von IL-2 nachgewiesen, beides proinflammatorische Marker [12].

Im Kontrast dazu stehen die Konzentrationen gegenregulatorischer Faktoren wie des löslichen TNF-Rezeptors und des IL-1-Rezeptor-Antagonisten, die sich nur mäßig erhöht zeigten [3]. Dadurch entstand ein massiver Überschuss an pro-inflammatorischen Zytokinen im Vergleich zu den Inhibitoren. Dies wurde auch in einer weiteren Studie deutlich, in der diese Dysregulation zwischen Mediatoren wie IL-17 und Metaboliten des Eicosanoid-Stoffwechselweges als Vertreter der entzündungslimitierenden Stoffe gezeigt wurde [8].

Forschungsfrage

Das vorläufige Forschungsthema lautet "Altersabhängigkeit von T-Zellantworten gegen Pilze und Bakterien bei MukoviszidosepatientInnen".

Die Tatsache, dass eine Erkrankung mit Mukoviszidose zu einer erhöhten Rate an Infektionen mit bestimmten Erregergruppen wie Pseudomonas führt, wirft die Frage auf, ob mögliche Unterschiede in den Immunmechanismen zwischen Erkrankten und gesunden Probanden eine Korrelation zur Häufung dieser Infektionen darstellt.

Da T-Helferzellen eine wichtige Rolle in der Abwehr verschiedenster Erreger spielen, wird die Untersuchung der komplexen Immunantwort von CD4-T-Zellen den Schwerpunkt dieser Arbeit bilden.

Die Antikörperpanels, die bei der Detektion der Marker zur Anwendung kommen sollen, sind auf die Unterscheidung folgender Subgruppen ausgelegt:

Die Th1-Zellen dienen der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien und Viren und produzieren dazu die inflammatorischen Zytokine IFN γ , TNF α und IL-2. Dadurch wird eine Aktivierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen und schlussendlich die Vernichtung der betroffenen Zelle erreicht [13]. Wichtig ist auch ein Blick auf die jeweiligen Mastertranskriptionsfaktoren, im Fall von Th1-Zellen handelt es sich um T-bet [13], um durch deren Aktivierung Rückschlüsse auf eine spätere Sekretion der Zytokine zu ziehen.

Die Th2-Zellen wiederum sind vor allem für die Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen verantwortlich. Dazu zählen Bakterien und Helminthen. Diese produzieren beispielsweise die Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 und tragen dadurch zu einer Aktivierung von Makrophagen und der Rekrutierung von Eosinophilen bei [13] [14] [15]. Über die Sekretion von IL-4 führen sie

außerdem zu einer verstärkten Antikörperproduktion von B-Zellen ^[16]. Th2-Zellen zeichnen sich klassischerweise durch den Transkriptionsfaktor GATA-3 aus ^[13].

Die Eradikation von extrazellulären Bakterien und Pilzen, die für unser Forschungsthema von besonderer Bedeutung sind, fällt in das Aufgabenfeld der Th17-Zellen. Diese produzieren neben IL-17, das eine große Rolle bei der Mobilisierung und Neubildung von neutrophilen Granulozyten spielt ^[17], auch noch Zytokine wie IL-21, IL-22, IL-23 und TNF α ^[13]. Sie sind durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t gekennzeichnet ^[13].

Regulatorische T-Zellen stehen den anderen Typen in ihrer Funktion gegenüber. Sie unterdrücken die Aktivierung des Immunsystems und sind dadurch entscheidend für die Selbsttoleranz und die Verhinderung von Autoimmunerkrankungen ^[18]. Merkmale der regulatorischen T-Zellen sind der Oberflächenmarker CD25 (IL-2-Rezeptor- α) und der Mastertranskriptionsfaktor FoxP3 ^{[13][19]}.

Mit Blick auf diese vier Achsen wollen wir in dieser Arbeit feststellen, ob sich Veränderungen darstellen lassen, die vor dem Hintergrund der jeweiligen klinischen Situation Rückschlüsse auf eventuelle infektionsbegünstigende Mechanismen zulassen.

Wissenschaftliche Zielstellung

Auf Basis aktueller Erkenntnisse wird die Arbeit an dem Projekt von folgenden Fragestellungen bestimmt:

- 1) Unterscheiden sich die immunologischen Antworten der T-Lymphozyten gegen ausgewählte Pilze und Bakterien zwischen Gesunden und Mukoviszidosepatientinnen und -patienten verschiedener Altersgruppen?
- 2) Gibt es eine Korrelation zwischen dem Alter und der Anfälligkeit für Pilz- und Bakterieninfektionen? Korreliert diese mit der CFTR-Mutation?

Frühere Arbeiten unserer Forschungsgruppe zu dem Thema haben gezeigt, dass T-Zellreaktionen gegen Pilze altersabhängig sind ^{[20][21][22]}. Dabei zeigte sich als Reaktion auf *Candida albicans* eine hohe Zahl proliferierender T-Lymphozyten bei Neugeborenen und Kindern bis 5 Jahren, gefolgt von einem Abfall bis ins Erwachsenenalter. Bei Stimulation mit *Aspergillus fumigatus* fiel die Proliferationsrate in allen Altersgruppen gleich aus ^[20]. Im Rahmen dessen hat sich auch herausgestellt, dass *Bifidobacterium longum*, ein normalerweise nicht-humanpathogenes Bakterium und Bestandteil der natürlichen Darmflora, als Initiator einer Gegenregulation zu einer ungewollten T-Zell-Antwort fungiert ^[23]. Da bisher unbekannt ist, ob dies auch auf Mukoviszidoseerkrankte übertragbar ist, gilt es nun zu untersuchen:

- 3) Ist *Bifidobacterium longum* dazu in der Lage, regulatorische Mechanismen in Mukoviszidoseerkrankten zu induzieren?

Inwieweit diese Mechanismen eine Rolle für die Behandlung von Mukoviszidosepatientinnen und –patienten spielen könnten, ist bisher nicht bekannt. Allerdings könnten die Ergebnisse mögliche immunologische Unterschiede zu Gesunden herausstellen und damit den Blick verstärkt auf Mechanismen dieser Ebene lenken.

Methodik

Für die laufenden und geplanten Experimente werden über den Zeitraum der Studie bis Oktober 2022 Blutproben von Kindern ab dem Kleinkindalter und Erwachsenen mit Mukoviszidose gesammelt. Dieses Patientenkollektiv befindet sich zur Zeit der Studie an den Kliniken der Pädiatrie und Pneumologie der Universitätsklinik Magdeburg in Behandlung. Um die gewonnenen Erkenntnisse aus der Untersuchung dieser Proben mit denen Gesunder vergleichen zu können, werden parallel EDTA-Blutproben aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und Blutkegel (Leukocyte reduction system chambers, LRSCs) als Nebenprodukt der Thrombozytapherese aus der ansässigen Blutbank der Uniklinik Magdeburg bezogen. Bis zum Ende der Studie, planmäßig im Oktober 2022, wird kohortenübergreifend mit etwa 60 Probanden gerechnet.

Zuallererst findet bei allen Proben eine Isolation von PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) mittels Dichtegradientenzentrifugation statt. Anschließend erfolgt eine automatische magnetische Zellisolation am AutoMACS. In einem ersten Schritt wird so die Isolation der Monozyten der jeweiligen Probe aus den PBMCs erreicht. Aus der CD14-negativen Fraktion werden in einem zweiten Schritt die CD4-positiven T-Lymphozyten durch ebendieses Verfahren unter Anwendung entsprechender Sortier-Beads gewonnen.

Diese Monozyten werden über Nacht mit hitzeinaktivierten Antigenlysaten der ausgewählten Bakterien- und Pilzspezies inkubiert. Zur Anwendung kommen dabei die folgenden Pathogene:

Bakterien:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Bifidobacterium longum* (ATCC 15697)
- *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC 13883)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692)
- *Escherichia coli* (Strain K12 MG1655)
- *Mycobacterium avium* (CCUG 56331)

Pilze:

- *Aspergillus fumigatus* (MYA-4609)



- *Candida albicans* (ATCC 10231)

Am darauffolgenden Tag erfolgt ein Labelling von T-Lymphozyten mit CFSE und anschließend die Inkubation der Monozyten mit diesen Zellen. Die eingesetzte Konzentration von CFSE beträgt $2\mu\text{M}$. Die Lymphozyten für die Messung der Oberflächenmarker und Zytokine sowie Transkriptionsfaktoren sind nicht markiert worden. Der Einsatz erfolgt bei 5×10^4 Monozyten und 1×10^5 T-Zellen je Well in dem Verhältnis von 1:2.

In einem Abstand von drei beziehungsweise sechs Tagen erfolgt die Erfassung der Veränderungen der CFSE-Level jeder Probe via Durchflusszytometrie am BD FACSCanto™ Cell Analyzer, um die stattgefundenen Zellproliferation darzustellen.

Die Untersuchung der immunologischen Reaktion der T-Lymphozyten anhand einer Reihe von Oberflächenmarkern ist ebenso für den sechsten Tag nach der Inkubation mit den CD4+-Lymphozyten geplant. Auch diese findet mithilfe einer durchflusszytometrischen Messung zuvor mittels Antikörper angefarbter zellgebundener Marker am BD FACSCanto™ Cell Analyzer statt. Zudem werden an diesem Punkt des Versuches die T-Lymphozyten, die für die Messung der Zytokine und Transkriptionsfaktoren bestimmt sind, mit Ionomycin, Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) und Brefeldin A jeweils im Verhältnis 1:1000 und Monensin im Verhältnis 1:3000 restimuliert. Anschließend findet eine Fixierung und Permeabilisierung der T-Zellen mit Formaldehyd und Methanol statt. Die Proben werden fortan tiefgekühlt gelagert. Am darauffolgenden Tag werden die Proben am BD LSRI Fortessa™ auf die T-Zell-Antwort und die damit einhergehende Produktion von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren hin untersucht. Bei beiden Messungen liegt der Fokus auf Th-1, Th-2-, Th-17- und Treg-Zell-typischen intrazellulären Zytokinen und Transkriptionsfaktoren sowie entsprechenden Oberflächenmarkern zur näheren Charakterisierung dieser Immunantwort.

Mit Blick auf die Oberflächenmarker haben sich bisher insbesondere CD3, CD4, CD25, CD45, CD69, CD137 und CD71 als relevant erwiesen.

Die Messung der Zytokine und Transkriptionsfaktoren findet aktuell anhand von zwei Antikörperpanels statt. Das erste beinhaltet neben den Oberflächenmarkern CD3, CD4, CD45 und CD154 (CD40-Ligand) die Zytokine IL-2, -4, -8, und -10, TNF- α , IFN- γ und die Mastertranskriptionsfaktoren von drei der vier untersuchten Zellreihen T-Bet, GATA-3 und FoxP3 (siehe Abb.2). Dies ist in der Hinsicht interessant, als dass für Marker wie TNF- α , IL-2 und IL-8 wie zuvor erwähnt bereits Veränderungen bei Mukoviszidoseerkrankten nachgewiesen wurden. In dem zweiten finden sich CD3 und CD45 als Oberflächenmarker, zusätzlich zu dem Aktivitätsmarker CD154 (CD40-Ligand) untersuchen wir hier auch auf CD137. Außerdem analysieren wir die Proben auf IL-17A, IL-21, IL-22 und den Mastertranskriptionsfaktor der Th17-Zellreihe, ROR γ t.

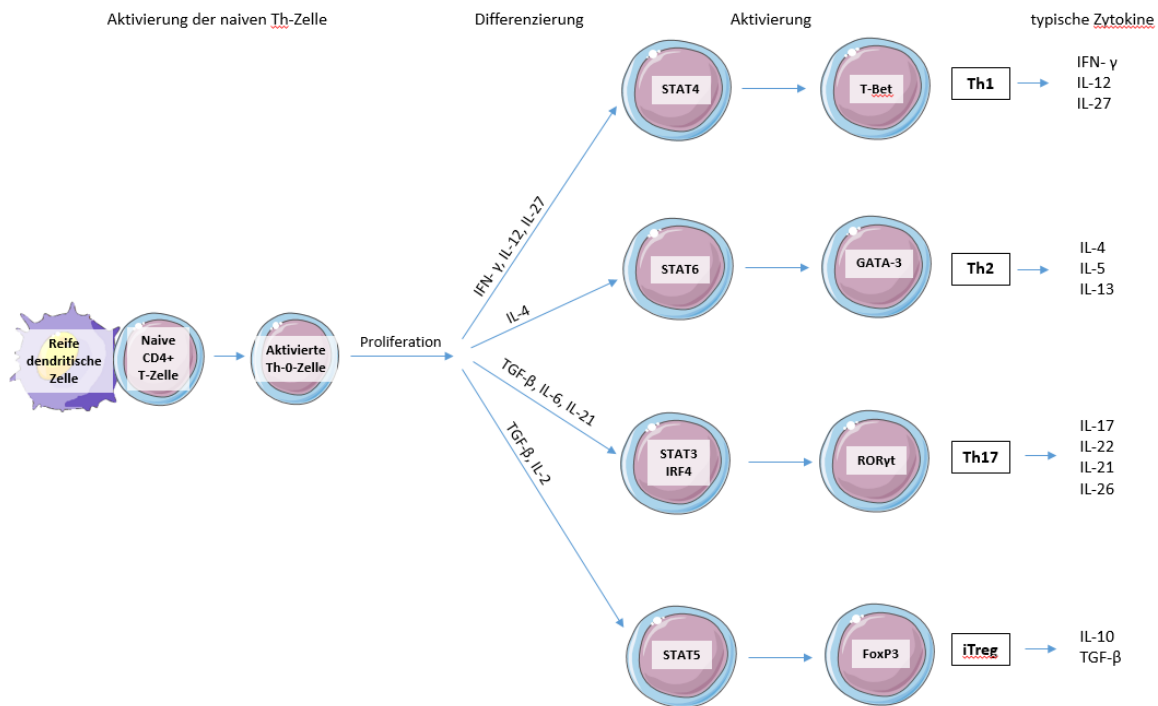


Abb.2 Differenzierung und Funktionen der Th-Effektorzellen.

Die Aktivierung von naiven Th-Zellen erfolgt durch reife dendritische Zellen. Diese werden dadurch zur Proliferation angeregt und generieren anschließend Tochterzellen. Je nach vorliegendem Zytokinmilieu differenzieren sich diese durch die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren zu unterschiedlichen Effektorzell-Subtypen, die ihrerseits wiederum zur Produktion charakteristischer Zytokine befähigt sind. (Modifiziert nach Mak et al. (2014), S. 212 [24], Symbole von Servier Medical Art)

Zusätzlich ist eine Detektion von Zytokinen in EDTA-Plasma und Kulturüberständen geplant. Dafür soll das Verfahren des LEGENDplex zur Anwendung kommen. Hierbei handelt es sich um ein auf Beads basierendes Immunoassay. Ein löslicher Analyt, in diesem Fall eine Auswahl an relevanten Zytokinen, wird dabei zwischen zwei Antikörpern eingefangen. Einer dieser Antikörper wird im Anschluss mit Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) fluoreszenzmarkiert, um in einer Messung der Fluoreszenzsignalintensitäten einen Rückschluss auf die Menge an gebundenen Zytokinen ziehen zu können [25]. Die Gewinnung von EDTA-Plasma aus EDTA-Blut geschieht mittels eines zweistufigen Zentrifugationsprozesses, bei dem der zellfreie Anteil des Vollbluts vor den zuvor beschriebenen Sortierschritten abgetrennt wird. Untersucht werden soll dieses Plasma auf Zytokine, von denen bereits gezeigt wurde, dass sie auch im Sputum zu finden sind, um dann einen Vergleich der Daten zu erstellen. Insbesondere in der Gruppe der adulten Mukoviszidoseerkrankten stehen uns dafür aktuelle Daten zu der bakteriellen Besiedlung der Atemwege der Betroffenen zur Verfügung, die anhand von Sputumproben gewonnen werden. Bei Kindern lässt sich im Normalfall auf Daten eines Rachenabstrichs zugreifen. Die dafür nötigen Analysen erfolgen durch das Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universitätsklinik.

Im Rahmen dessen findet in der weiteren Auswertung sowohl ein Vergleich zwischen verschiedenen Altersgruppen innerhalb der Kohorte der Mukoviszidoseerkrankten und der gesunden Vergleichsgruppe, als auch ein direkter Vergleich Gesunder und Erkrankter statt. Einfließen wird außerdem der mithilfe eines Fragebogens näher erörterte gesundheitliche Zustand der jeweiligen Patientin oder des jeweiligen Patienten, der anhand eigener Angaben, aktueller klinischer Parameter und Voruntersuchungen erhoben wird.

Um weitere Aussagen zum allgemeinen Gesundheitszustand der Patientinnen und Patienten treffen zu können, erfolgt nach Erhalt jeder Probe außerdem eine Bestimmung des Blutbildes und des Immunstatus aus dem Vollblut.

Vorläufige Ergebnisse

Am Anfang des Projektes standen organisatorische Vorarbeiten zur Vorbereitung auf die geplanten Experimente. Nach ausgiebiger Recherche zum typischen Erregerspektrum bei Betroffenen wurde die Auswahl geeigneter Pathogene getroffen. Nach Eintreffen und Anzucht durch das Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene erfolgte eine Hitzeinaktivierung. Zur weiteren Verwendung der Erregerlysate schlossen sich daraufhin Proteinbestimmungen an. Ebenso Teil der Anfangszeit war die Recherche zur Etablierung geeigneter Antikörperpanels. Bisher wurden alle Abläufe etabliert und diese werden seitdem bei der Durchführung der Experimente optimiert eingesetzt.

Die erhobenen Daten beziehen sich bisher hauptsächlich auf die Gruppe der adulten gesunden Personen. Anhand dieser Vergleichsproben wurden zu Anfang die Verfahren der Isolation von PBMCs und der Zellseparation mit anschließender Stimulation durch Erreger, die eine hohe Prävalenz bei Zystischer Fibrose aufweisen, eingeführt und den Gegebenheiten aller weiteren geplanten Experimente angepasst. Anschließend wurden alle diese Proben mittels Durchflusszytometrie entweder am BD FACSCanto™ oder am BD LSRFortessa™ auf die bereits näher beschriebene Auswahl an Zytokinen und Markern hin analysiert. Nach diesem Muster wurde nach der Einführung bisher mit allen Proben seit Oktober letzten Jahres verfahren.

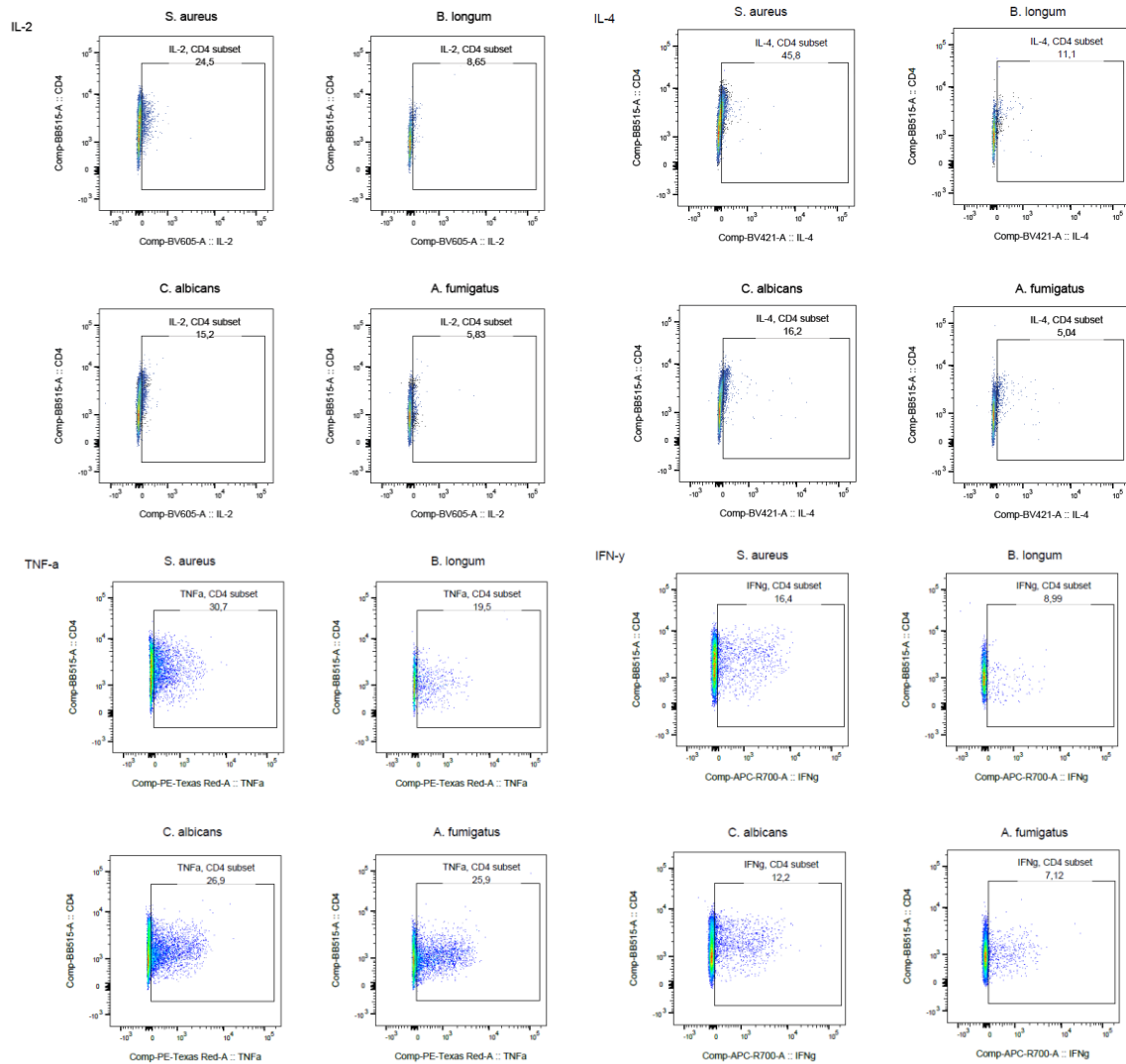


Abb.3 Ergebnisse ausgewählter Zytokinmessungen am BD LSRFortessa™ in einer Monozyten-T-Zell-Kokultur, Tag 7 nach Stimulation mit *S.aureus*, *B.longum*, *C. albicans* und *A. fumigatus*, Probe eines männlichen Probanden aus der gesunden Kontrollgruppe, erstellt mit FlowJo 10.8.0

Bei einem Blick auf die Daten der betrachteten Oberflächenmarker, die an Tag sechs nach Inkubation mit den T-Lymphozyten erfolgt, wies CD25, die Alpha-Kette des IL-2-Rezeptors, eine starke Expression auf. Dies spricht für die späte Phase einer stattfindenden Immunantwort, welche mit dem Messzeitpunkt nach sechs Tagen vereinbar zu sein scheint. Weiterhin soll das Panel bei zukünftigen Messungen durch CD71 und CD137 ergänzt werden. Die Zytokinmessungen ergaben für die bakteriellen Antigene bei adulten gesunden Probandinnen und Probanden eine Expression von IL-2 und IL-4 neben einem deutlichen Anstieg von IFN- γ . Noch deutlicher zeigte sich dieser bei TNF- α . Auch die Messung von CD40-

Ligand ergab eine starke Expression. Die mit *Staphylococcus aureus*-Antigenen stimulierte Probe reagierte dabei im Vergleich am stärksten.

Die Pilzantigene konnten in der T-Lymphozyten-Monozyten-Kokultur ebenso eine Reaktion in den genannten Achsen auslösen, allerdings in einem schwächeren Umfang verglichen mit den bakteriellen Erregern. Dazu kam hier eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t, der typisch für Zellen des Th17-Typs ist. Dies war erwartbar, diese Zellreihe zeigt sich normalerweise nach Kontakt von T-Zellen mit Pilzantigenen.

Aktuell liegen auch erste Proben von Mukoviszidosepatientinnen und -patienten im Kindes- und Erwachsenenalter vor. Die dazugehörigen Experimente sind Gegenstand der momentanen Arbeit, der sich die Analyse und der Vergleich mit der Kontrollgruppe anschließen werden.

Arbeitsplan

Die Messung einer einzelnen Blutprobe nimmt durch zwischengeschaltete Wartezeiten etwa acht Tage in Anspruch, wobei aber mehrere Proben parallel analysiert werden können.

Für den Arbeitsfluss und die angestrebte Anzahl an Proben wäre es ideal, jede Woche Blut entgegennehmen und eine Kultur ansetzen zu können. Wenn weiterhin regelmäßig neue Ergebnisse dazukämen, ließe sich unter Umständen frühzeitig abschätzen, in welche Richtung sich das Studienergebnis entwickelt.

Parallel dazu läuft bereits die Auswertung der Daten aus der Durchflusszytometrie. Zum Einsatz kommen dabei die Programme FlowJo 10.8.0 und GraphPad Prism 8 zur graphischen Darstellung und statistischen Auswertung. Die Literatursammlung erfolgt mithilfe des Programmes Citavi.

Die Rechercharbeit zu dem Studientitel verwandten Themen, den aktuellen Messungen und Ergebnissen soll das ganze Jahr über fortgeführt werden, um dann spätestens nach Abschluss der Messungen im Oktober 2022, wenn möglich aber schon früher, mit dem Verfassen der Publikation beginnen zu können. Der Veröffentlichung soll sich die Promotionsarbeit anschließen. Diese plane ich bis zum Ende meines Studiums, was voraussichtlich im Dezember 2023 sein wird, fertig verfasst zu haben.

Diskussion

Viele Aspekte, die mit der Pathogenese von Begleiterscheinungen Zystischer Fibrose assoziiert sind, befinden sich aktuell noch in der Erforschung, daher lassen sich auch für dieses Studienthema nur schwer Vorhersagen treffen. Anzunehmen wäre jedoch beispielsweise, dass sich Veränderungen in dem Verhältnis der Immunantwort einzelner T-Zellsubtypen zeigen könnten. In einer Studie von Roesch, Nichols und Chmiel (2018) wurde

eine Imbalance von Th17 und regulatorischen T-Zellen angenommen ^[8]. Unbekannt ist dabei, welchen Anteil die CFTR-Mutation und welchen beispielsweise zeitgleich persistierende Atemwegsinfektionen haben. Da Th2- und Th17-Zellen normalerweise von regulatorischen T-Lymphozyten unter Kontrolle gehalten werden ^[8], wäre es denkbar, dass sich bei diesen beiden Subtypen eventuell eine verstärkte Zytokinsekretion zeigen lassen könnte. In welche Richtung sich das Ergebnis der Studie letztendlich entwickelt, bleibt abzuwarten.

Literatur

1. De Boeck, K. (2020). Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta paediatr* 109(5), 893-899, doi: 10.1111/apa.15155.
2. Blanchard, A. C., Waters, V. J. (2019). Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin Respir Crit Care Med* 40(6), 727–736. doi: 10.1055/s-0039-1698464
3. Nichols, D., Chmiel, J., Berger, M. (2007). Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: alterations in inter- and intracellular signaling. *Clin Rev Allergy Immunol* 34(2), 146-62. doi: 10.1007/s12016-007-8039-9.
4. Elborn, J.S. (2016). Cystic fibrosis. *Lancet* 388(10059), 2519-2531. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00576-6.
5. Amboss GmbH (2021). Zystische Fibrose (Mukoviszidose, CF). o.V. Online im Internet unter https://www.amboss.com/de/wissen/Zystische_Fibrose. (17.11.2021)
6. Nährlich, L. (Hg.), Burkhart, M., Wosniok, J. (2021). Deutsches Mukoviszidose-Register: Berichtsband 2020. Bonn: Mukoviszidose e.V. & Mukoviszidose Institut gGmbH, S. 51. Online im Internet unter <https://www.muko.info/angebote/qualitaetsmanagement/register/cf-einrichtungen/berichtsband-1> (23.01.2022)
7. Gräfe, K. A. (2020). Zulassung von Kaftrio: Fortschritt für Mukoviszidose-Betroffene. In: *Pharmazeutische Zeitung*. Online im Internet unter <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/fortschritt-fuer-mukoviszidose-betroffene-119883/> (23.01.2022)
8. Roesch, E.A., Nichols, D.P., Chmiel, J.F. (2018). Inflammation in cystic fibrosis: An update. *Pediatr Pulmonol* 53(S3), 30-S50. doi: 10.1002/ppul.24129
9. Williams, C., Ranjendran, R., Ramage, G. (2016). Pathogenesis of Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Curr Fungal Infect Rep* 10(4), 163–169. doi: 10.1007/s12281-016-0268-z
10. Bacher, P. et al. (2019). Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*. *Cell* 176(6):1340-1355. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.041. Epub 2019 Feb 21.
11. De Rose, V., (2002), Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis, *European Respiratory Journal* 19: 333-340; doi: 10.1183/09031936.02.00229202
12. Nkwouano Ngongang, V. (2016). Characterization of T cell responses against mycobacteria in Cystic Fibrosis patients and in an in vitro infection model. Dissertationsschrift. Düsseldorf. Publikationsservice der Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf. Online im Internet unter <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=40347> (30.11.2021)
13. Jargosch, M. (2015) Identifikation von wichtigen Transkriptionsfaktoren bei der Differenzierung von T-Helferzellen mittels integrativer Netzwerkanalysen. Der Transkriptionsfaktor IRF8 ist ein Regulator der Th1 und Treg Differenzierung. Dissertationsschrift. Berlin.
14. Coffman, R.L., Seymour, B.W., Hudak, S., Jackson, J., and Rennick, D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245, 308-310.
15. Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35. doi:

- 10.1038/nri978.
16. Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M.C., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 245-248. doi: 10.1038/362245a0.
 17. Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19, 281-286. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.005.
 18. Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 8-27. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.
 19. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061. doi: 10.1126/science.1079490.
 20. Vogel, K., Pierau, M., Arra, A., Lampe, K., Schlueter, D., Arens, C., Brunner-Weinzierl, M.C. (2018). Developmental induction of human T-cell responses against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Scientific reports* 8, 16904
 21. Knolle, J., Pierau, M., Hebel, K., Lampe, K., Jorch, G., Kropf, S., Arens, C., Brunner-Weinzierl, M. C. (2020). Children From the Age of Three Show a Developmental Switch in T-Cell Differentiation. *Front Immunol* 11:1640. doi: 10.3389/fimmu.2020.01640
 22. Arra, A., Pech, M., Brunner-Weinzierl, M. C. (2021) Immune-checkpoint blockade of CTLA-4 (CD152) in antigen-specific human T-cell responses differs profoundly between neonates, children, and adults. *Oncoimmunology* 2021; 10(1): 1938475. doi: 10.1080/2162402X.2021.1938475.
 23. Vogel, K. et al. Bifidobacterial Trajectory shapes the Magnitude of Antimicrobial T-helper Cell Responses during Infancy and Adulthood. Unpubliziertes Manuskript. Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.
 24. Mak, T. W., Saunders, M. E., Jett, B. D. (2014), *Primer to the Immune Response* (Second edition), Academic cell, S. 212. doi:10.1016/b978-0-12-385245-8.00009-1
 25. BioLegend (2021): LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit - Custom Human Panel, S. 3, o.V.