

AUS DER KLINIK FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
DIREKTOR: PROF. DR. MED. EGBERT HERTING

**Einfluss von Medikamenten in der Therapie der
Cystischen Fibrose auf die Aktivität von Chitotriosidase
in humanen Neutrophilen Granulozyten**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -
vorgelegt von
Christiane Schultheiß
aus Bad Windsheim
Lübeck 2015

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Matthias Kopp

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. B. Schaaf

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.04.2016

Promotionskommission der Sektion Medizin

Für Luise und Heinrich Schultheiß

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	08
1.1 Cystische Fibrose	08
1.1.1 Prävalenz, Symptome und Verlauf	08
1.2 Allergische Bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)	09
1.2.1 Prävalenz, Symptome, Verlauf	09
1.2.2 Therapie	10
1.3 Aspergillen als Pathogen bei ABPA	10
1.3.1 Aufbau	10
1.3.2 Vorkommen	11
1.3.3 Pathogenese	11
1.4 Neutrophile Granulozyten als Teil der angeborenen Immunität	12
1.4.1 Lebensdauer, Vorkommen	12
1.4.2 Stimulierbarkeit	12
1.4.3 Antifungale Mechanismen	13
1.4.3.1 Chitinasen	13
1.4.3.2 NETs	14
1.4.4 Einfluss der CF Pharmakotherapie auf Neutrophile Granulozyten	15
1.5 Hypothese und Fragestellung	16
2. Methoden	18
2.1 Probanden und Patienten	18
2.1.1 Rekrutierung und Probengewinnung	18
2.1.2 Daten zum Probanden- und Patientenkollektiv	19
2.1.3 Votum der Ethikkommission	19

2.2 Zellkultur	19
2.2.1 Isolation von Neutrophilen Granulozyten: Percoll-Dichtegradienten- zentrifugation.....	19
2.2.2 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer.....	21
2.2.3 May-Grünwald-Giemsa-Färbung eines Ausstrichpräparates.....	21
2.2.4 Bestimmung von Reinheit, Vitalität und Aktivierungsgrad.....	22
2.2.5 Kultivierung der Zellen.....	24
2.2.6 Stimulation mit PMA.....	25
2.2.7 Ernte der Überstände.....	25
2.3 Aktivitätsmessungen	25
2.4 Antikörper-Färbung zur Visualisierung von CHIT-1 und DNA	26
2.5 Statistische Analysen	26
3. Ergebnisse	<u>27</u>
3.1 Etablierung des methodischen Vorgehens	27
3.1.1 Zellkulturdauer.....	27
3.1.2 Vergleich von gerinnungshemmenden Medien.....	28
3.1.3 PMA-Stimulation.....	29
3.1.4 Weitere Stimulanzen.....	29
3.1.5 Aktivitätsmessung.....	30
3.2 CHIT-1 Aktivität	34
3.2.1 Stimulierbarkeit bei CF Patienten und Nicht-CF.....	34
3.2.2 Nicht-Sekretierer.....	38
3.2.3 Einfluss von Pharmaka bei CF und Nicht-CF.....	40
3.1.3.1 Prednisolon.....	40
3.1.3.2 Salbutamol.....	43
3.1.3.3 Azithromycin.....	44
3.1.3.4 RhDNase.....	44

3.3 Färbung und Visualisierung von CHIT-1 und DNA.....	47
<u>4. Diskussion</u>	<u>50</u>
4.1 Schaffung bestmöglicher Versuchs- und Messbedingungen.....	50
4.1.1 Verminderung der Voraktivierung Neutrophiler.....	51
4.1.2 Möglichkeiten der Stimulation.....	51
4.1.3 Aktivitätsmessungen.....	52
4.2 CHIT-1 Aktivität bei stimulierten und unstimulierten Neutrophilen.....	53
4.3 Einfluss der CF-Medikation auf CHIT-1 Aktivität Neutrophiler.....	55
4.3.1 Kein Effekt von Prednisolon, Salbutamol, Azithromycin.....	56
4.3.2 Steigerung von CHIT-1 Aktivität durch RhDNase.....	59
4.3.3 Überlegungen zur lokalen CHIT-1 Konzentration.....	60
4.4 Limitationen der Arbeit und mögliche Fehlerquellen.....	62
4.5 Ausblick: Zukünftig möglicherweise Einschränkungen in der Verwendung von RhDNasen.....	63
<u>5. Zusammenfassung und Ausblick</u>	<u>64</u>
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	<u>65</u>
<u>7. Anhang</u>	<u>71</u>
7.1. Abkürzungen.....	71
7.2. Materialliste.....	72
7.3 Fragebogen für Nicht-CF Probanden.....	76
7.4 Aufklärung und Einverständniserklärung für Probanden und Patienten.....	77

7.5 Votum der Ethikkommission..... 80

8. Danksagungen 81

9. Lebenslauf 82

1. Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

1.1.1 Prävalenz, Symptome und Verlauf

Die Cystische Fibrose (CF, Synonym: Mukoviszidose) ist eine Stoffwechselerkrankung, die durch eine monogenetische Mutation auf Chromosom 7 verursacht wird. Das betroffene Protein, im angloamerikanischen Sprachraum als "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator" (CFTR) bezeichnet, funktioniert als Chloridkanal der Zellmembran. Die häufigste pathologische genetische Variante ist die Deletion F508del (früher: Δ F508), bei der die Aminosäure Phenylalanin an Position 508 im Protein fehlt.

Im Europäischen Raum tritt die CF mit einer Prävalenz von 0,737/10000 auf. (Farrell, 2008) Heterozygote Träger der autosomal-rezessiv vererbten Mutation finden sich mit einer Frequenz von 1/20-25.

Die Symptome der Erkrankung betreffen nahezu alle Organsysteme, wobei meist respiratorische und gastrointestinale Beschwerden im Vordergrund stehen. Persistierender Husten, Giemen, rekurrende Infektionen der Lunge und des gesamten Respirationstraktes sind häufig und führen in letzter Konsequenz zu respiratorischer Insuffizienz und Rechtsherzversagen. Symptome des Verdauungstraktes sind Maldigestion, exogene und im Krankheitsverlauf dann auch endogene Pankreasinsuffizienz, Diarrhoe, Mangelernährung, Untergewicht und Leberinsuffizienz. Meist ist die Fertilität, vor allem bei männlichen Patienten eingeschränkt.

Die Prognose von Patienten mit CF ist – je nach Schwere der Erkrankung und Fortschreiten der Symptome – unterschiedlich.

Die Lebenserwartung der Patienten ist in den letzten Jahrzehnten enorm gestiegen. Der weitere Anstieg verlangsamt sich zwar aktuell, aber dennoch wird durch Verbesserung der Therapie eine weitere Verlängerung des Überlebens erreicht. Die mittlere Lebenserwartung in Deutschland und England liegt mittlerweile bei über 40 Jahren. (Elborn *et al.*, 1991)

Trotz dieser Erfolge gibt es bislang keine kurative Therapie für CF. Die einzige Ausnahme stellt das seit 2012 zugelassene Medikament Ivacaftor dar, ein Potentiator der Chloridkanalfunktion bei Patienten mit der Mutation G551D. (Ramsey *et al.*, 2011) Allerdings weisen in Europa nur ca. 3% der CF Patienten eine Mutation G551D auf. Somit sind die therapeutischen Strategien bei der Mehrzahl der Patienten symptomatisch und haben ein langsames Fortschreiten bzw. das Verhindern von Komplikationen zum Ziel.

Neben der Pharmakotherapie gibt es eine Vielzahl von Therapiemöglichkeiten: Physiotherapie und autogenes Training erleichtern das Abhusten zähen Schleimes aus der Lunge, hochkalorische Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Vitaminen und Spurenelementen helfen Gewichtsverlust und Mangelernährung zu verhindern. In fortgeschrittenen Stadien ist eine Lungentransplantation oft die letzte Therapieoption. Pharmakologisch werden Medikamente mit verschiedenen Wirkmechanismen bei der CF eingesetzt. Zu den wichtigsten zählen Corticosteroide, β -Sympathomimetika, Antibiotika und DNasen.

Bei Patienten mit CF können zahlreiche Komplikationen auftreten. Das Verdauungssystem betreffend entwickeln viele Patienten im Jugendalter bzw. jungen Erwachsenenalter einen Diabetes mellitus aufgrund der endokrinen Pankreasinsuffizienz. Es kann zu einer Obstruktion der Gallewege mit sekundärer Leberfibrose kommen oder ein Distales Intestinales Obstruktionssyndrom (DIOS) bzw. ein Rektumprolaps auftreten. (Littlewood, 1992) Respiratorische Komplikationen sind erweiterte und beschädigte Lungenareale, rezidivierende Pneumonien, chronischer Husten, Hämoptysen, Bronchiektasen und schließlich eine respiratorische Partial- oder Globalinsuffizienz. Desweiteren gehören Pilzinfektionen zu den Hauptkomplikationen der Atemwege bei Patienten mit CF. Meist handelt es sich um *Aspergillus*-Spezies. Zwei klinische Situationen müssen dabei unterschieden werden: Die *Aspergillus* Kolonisation (AC) und die Allergische Bronchopulmonale Aspergillose (ABPA).

1.2 Allergische Bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)

1.2.1 Prävalenz, Symptome, Verlauf

Dass eine *Aspergillus*-Besiedelung und –Infektion bei Patienten mit CF zu den häufigen Komplikationen zählen, zeigen folgende Zahlen zur Prävalenz: AC kommt mit einer Prävalenz von 12-25% bei CF Patienten vor, während die ABPA, in der europäischen CF Population mit einer Prävalenz von 7,8% (2,1%-13,6%) auftritt. (Jubin *et al.*, 2010; Mastella *et al.*, 2000) Die ABPA, eine Hypersensitivitätsreaktion auf *Aspergillus fumigatus*, wird neben CF Patienten seltener auch als Komplikation bei Patienten mit Asthma bronchiale gefunden. Entwickeln Patienten mit CF zusätzlich eine ABPA, so hat dies negative Konsequenzen für die Patienten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich die Lungenfunktion von Patienten mit ABPA schneller verschlechtert als bei Patienten ohne zusätzliche ABPA. (Kraemer *et al.*, 2006)

Die Symptome der ABPA ähneln denen der CF, was zu einer erschwerten Diagnosestellung und einer Vielzahl von diagnostischen Standards führt. Typische Manifestationen können sein: pulmonale Infiltrate, Bronchiektasen und produktiver Husten. (Greenberger, 2003; Safirstein *et al.*, 1973) Systemische Symptome können in Form von Gewichtsverlust und Fieber auftreten. (Prasad *et al.*, 2009) Eine frühzeitige Diagnose und Therapie sind notwendig, um eine schwerwiegende pulmonale Beeinträchtigung zu verhindern. (Greenberger, 2003)

Jubin *et al.* zeigte in einer Studie mit 85 Kindern den möglichen Zusammenhang zwischen CF Pharmakotherapie und AC/ABPA durch retrospektive Analyse der medizinischen Daten. In dieser Studie war eine Langzeittherapie mit Azithromycin als einzige der gemessenen Variablen, unabhängig mit AC assoziiert. Signifikant mit ABPA assoziiert war ein BMI unterhalb der dritten Perzentile und Kinder mit ABPA wiesen eine signifikant längere kumulative Dauer der Therapie mit RhDNasen auf. Desweiteren war die Assoziation von ABPA mit der Sensibilisierung auf *Candida* oder *Alternaria* signifikant. (Jubin *et al.*, 2010)

1.2.2 Therapie

Die pharmakologische Therapie der ABPA basiert auf zwei Hauptprinzipien: systemische Corticosteroide und antifungale Medikation. (Stevens *et al.*, 2003) Therapeutisches Ziel der Corticosteroid-Behandlung ist die Entzündungshemmung mit einer Verminderung der immunologischen Aktivität, während antifungale Medikation wie z.B. Itraconazol auf die Reduktion der fungalen Antigene abzielt. (Vlahakis und Aksamit, 2001)

1.3 Aspergillen als Pathogen bei ABPA

1.3.1 Aufbau

Aspergillus ist eine Gattung, die mehrere hundert Schimmelpilze umfasst. Eine wichtige Rolle in der Pathogenese beim Menschen spielen *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus fumigatus*. (Denning, 1998; Hedayati *et al.*, 2007; Perfect *et al.*, 2001) *Aspergillen* wachsen auf sich zersetzendem organischen Material und ihre zahlreichen Sporen, auch Konidien genannt, werden aerogen verbreitet. Aus Konidien entwickeln sich Hyphen, die fadenförmigen Zellen der Pilze. Entwickeln sich die Hyphen weiter zu einem Geflecht, so spricht man von einem Myzel. (Sugui *et al.*, 2008; Vinck *et al.*, 2005)

Die Zellwände der Aspergillen sind hauptsächlich aus Chitin aufgebaut, das ein Hauptbestandteil der Zellwand pathogener Pilze ist. (Gorzelanny *et al.*, 2010) Chitin ist ein Biopolymer, das aus Bausteinen von N-acetyl-D-glucosamin besteht, die über eine β -1,4-glycosidische Bindung verknüpft sind, (Abbildung 1). Es ist ein in der Natur häufig vorkommendes Biopolymer und wird im Exoskelett von Schalentieren, sowie in der Zellwand von Insekten und Pilzen gefunden. (Tharanathan und Kittur, 2003)

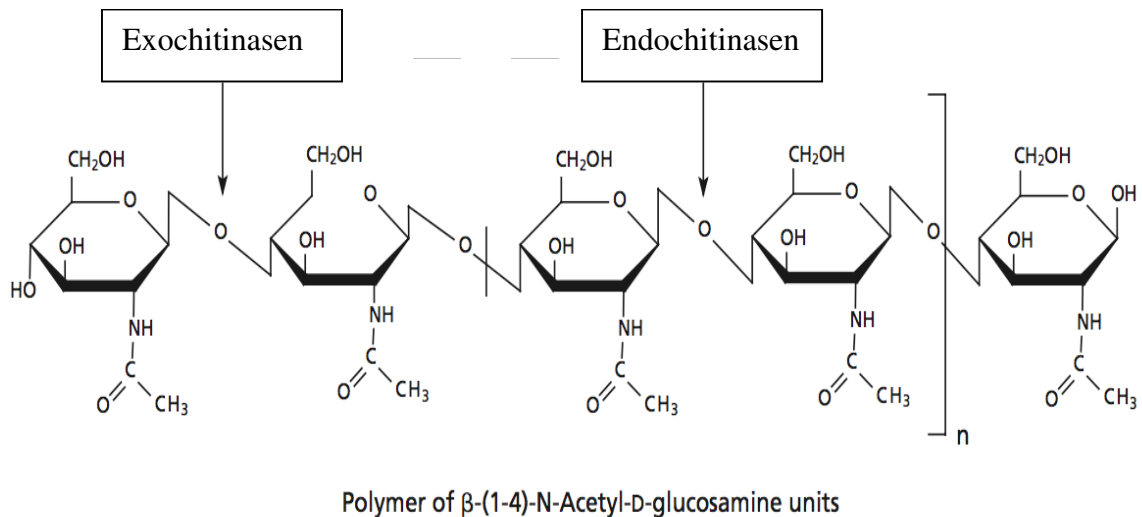


Abb. 1: Schema eines Chitin-Polymers. N-acetyl-D-glucosamin Einheiten sind über eine β -1,4-glycosidische Bindung verknüpft. Zusätzlich markiert sind die Angriffspunkte für Exo- und Endochitinasen. (Abbildung aus: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/life-science/biochemicals/migrationbiochemicals1/Chitinase_chitin.Par.0001.Image.600.gif, aufgerufen am 02.09.2012, adaptiert durch die Autorin)

1.3.2 Vorkommen

Aspergillen kommen ubiquitär vor. Dadurch werden ständig Konidien von uns eingeatmet. Gesunde Individuen mit einem funktionsfähigen Immunsystem können trotz dieser permanenten Konfrontation mit den saprophytischen Aspergillen die Verbreitung und das Wachstum der Pilze verhindern, während immunsupprimierte Patienten in Gefahr sind, eine Aspergillus-Kolonisation und damit verschiedene pathologische Krankheitsbilder zu entwickeln. (Geiser *et al.*, 2007)

1.3.3 Pathogenese

Die Immunabwehr von Aspergillen wird vom angeborenen Immunsystem dominiert. Nach Erreichen der Lungenalveolen werden eingeatmete Konidien zunächst mit ortsständigen alveolären Makrophagen konfrontiert und die Rekrutierung und Aggregation von

Neutrophilen, die ebenfalls zur ersten Verteidigungslinie bei der Pilzabwehr zählen, wird in Gang gesetzt. (Balloy und Chignard, 2009; Brakhage, 2005; Philippe *et al.*, 2003) Während Makrophagen vor allem Konidien dezimieren, verhindert die Rekrutierung Neutrophiler die Sporenkeimung der Aspergillus Konidien. (Bonnett *et al.*, 2006) Neutrophile können auch Hyphen von Aspergillen angreifen und abtöten, die für die Phagozytose der Makrophagen zu groß sind. (Balloy und Chignard, 2009; Brakhage, 2005; Rex *et al.*, 1990; Urban *et al.*, 2006) Nach Aggregation der polymorphonukleären Leukozyten um die Pilzhyphe wird diese durch die Abgabe von reaktiven Sauerstoffspezies und durch die Degranulation antimikrobieller Peptide beschädigt. (Levitz und Farrell, 1990; Levitz *et al.*, 1986) Neben den zellulären Komponenten der angeborenen Immunabwehr spielen auch diese Mechanismen mit löslichen antimikrobiellen Proteinen bei der Aspergillus Abwehr eine entscheidende Rolle. (Madan *et al.*, 2001; Travis *et al.*, 1999; Wright, 2005)

1.4 Neutrophile Granulozyten als Teil der angeborenen Immunität

1.4.1 Lebensdauer, Vorkommen

Neutrophile Granulozyten sind ein essenzieller Teil des angeborenen Immunsystems und sie machen den größten Teil der Leukozyten im peripheren Blut aus. Die durchschnittliche *in vivo* Lebenszeit von Neutrophilen wird mit 5,4 Tagen angegeben. (Pillay *et al.*, 2010) Bei Entzündungsprozessen migrieren Neutrophile schnell an den Entzündungsherd. Durch Chemotaxis geleitet, migrieren sie durch Blutgefäße und interstitielles Gewebe. Interleukin-8 (IL-8), Komplementfaktor 5a, N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und Leukotrien B4 (LTB4) sind Beispiele für chemotaktische Faktoren mit Wirkung auf Neutrophile.

1.4.2 Stimulierbarkeit

Physiologisch werden Neutrophile von Pathogenen, wie beispielsweise bakteriellen oder fungalen Proteinen stimuliert. *In vitro* können verschiedene Proteine zur Stimulation benutzt werden, mit deren Hilfe physiologische Prozesse simuliert werden – z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan, Zymosan oder Muramyl-dipeptide. (van Eijk *et al.*, 2007) Alle genannten Proteine sind Bestandteile von bakteriellen oder fungalen Strukturen. LPS wird für *in vitro* Studien des angeborenen Immunsystems verwendet und zählt zu den Pathogen assoziierten molekularen Mustern (PAMP) (Gao *et al.*, 2010). Eine

weitere Substanz für die *in vitro* Stimulation von Neutrophilen ist Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA), das im Vergleich zu LPS kein physiologischer Stimulus ist und sich durch sein hohes Stimulationspotential auszeichnet. PMA aktiviert phospholipid-abhängig Proteinkinase C, die normalerweise durch Diacylglycerol aktiviert wird. (Castagna *et al.*, 1982)

1.4.3 Antifungale Mechanismen

Nach Stimulation gibt es drei Hauptmechanismen, mit denen Neutrophile Pathogene bekämpfen: Phagozytose, Degranulation und die Bildung von neutrophilen extrazellulären Fallen (neutrophil extracellular traps = NETs). (Papayannopoulos und Zychlinsky, 2009)

1.4.3.1 Chitinasen

In Neutrophilen werden verschiedene Vesikel und Granula gefunden: die primären (auch peroxidase-positive, azurophile oder unspezifische) Granula, die sekundären (auch peroxidase-negative, spezifische) Granula, die tertiären Granula sowie die sekretorischen Vesikel. In diesen Granula und Vesikeln sind antimikrobielle Proteine enthalten, wie beispielsweise Lysozym, Kollagenasen, Elastasen, Myeloperoxidasen, Lactoferrin, Plasminogenaktivatoren, Cathepsine, Gelatinasen, Defensine. (Borregaard *et al.*, 1993) Ebenfalls zu den Enzymen mit antimikrobieller Aktivität gehören die Chitinasen, die in den spezifischen Granula der Neutrophilen gefunden werden können und bei Aktivierung freigesetzt werden. (van Eijk *et al.*, 2005) Abbildung 2 zeigt schematisch einen Neutrophilen mit seinen unterschiedlichen Granula und Vesikeln.

Chitinasen haben die Fähigkeit, Chitinmoleküle zu hydrolysieren und werden in Endo- und Exochitinasen unterteilt. Während Exochitinasen nur endständige Chitinmoleküle eines Polymers abspalten können, haben Endochitinasen die Fähigkeit, an jeder beliebigen Stelle im Molekül zu schneiden (siehe Abbildung 1). Beim Menschen wurden bisher mehrere Chitinasen und chitinase-ähnliche Proteine entdeckt. Die bisher am besten untersuchten sind die saure mamilläre Chitinase (acidic mammalian chitinase = AMC) und Chitotriosidase (CHIT-1).

CHIT-1 ist eine Endoglucosaminidase, die Chitin-Polymere degradiert. (Aguilera *et al.*, 2003) Sie spielt eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen. (Malaguarnera, 2006) Es sind zwei Isoformen von CHIT-1 bekannt: eine 50 Kilodalton (kDa) Isoform und eine 39kDa Isoform, die durch proteolytische Prozession der erstgenannten entsteht. CHIT-1 ist die

primär aktive Chitinase in der Lunge. (Seibold *et al.*, 2008) Im Blutkreislauf wurde bisher nur die 50kDa Isoform gefunden. Bei etwa 5% der Bevölkerung wird ein genetischer Polymorphismus in Form einer 24 Basenpaare (bp) -Insertion gefunden, der die Produktion der aktiven Enzymform inhibiert. Dies ist nach bisherigem Stand der Forschung ohne Konsequenzen für die Betroffenen. (Boot *et al.*, 1998a)

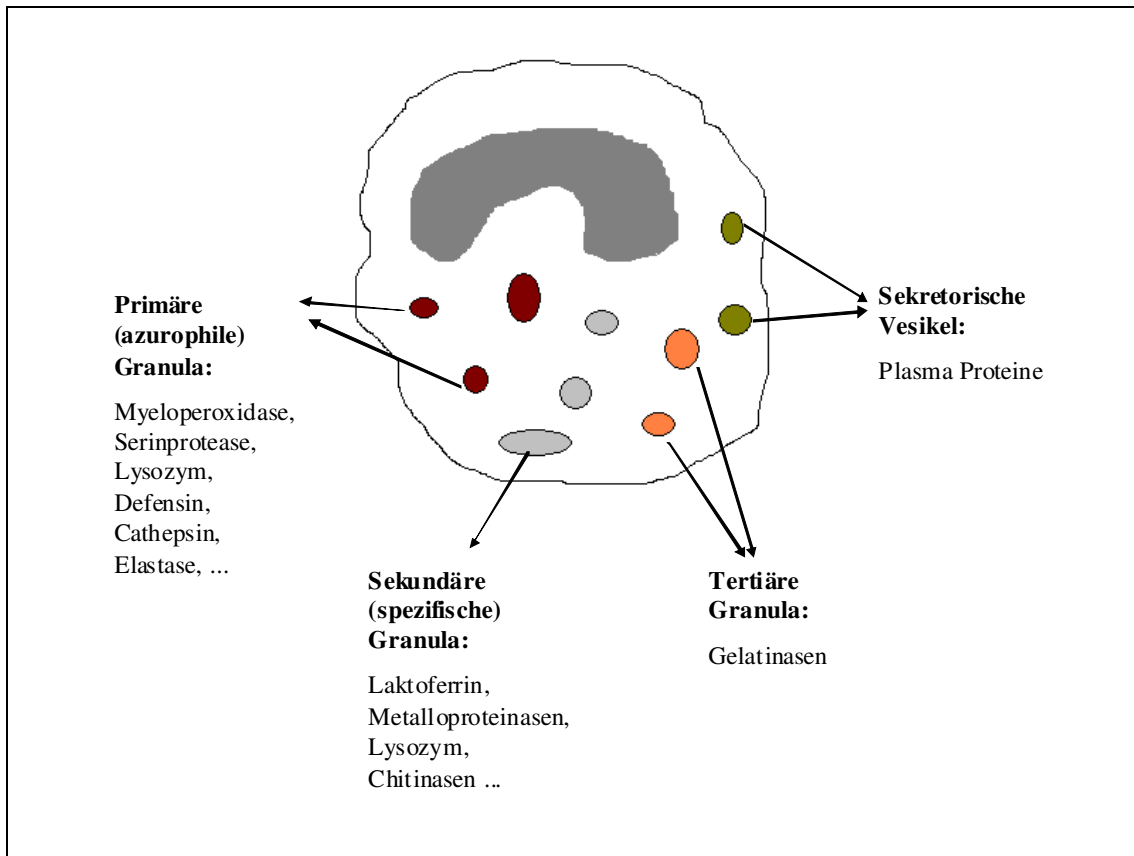


Abb. 2: Schema eines Neutrophilen mit Darstellung der unterschiedlichen Granula und Vesikel

1.4.3.2 NETs

Neutrophile Granulozyten können mit Hilfe von reaktiven Sauerstoffspezies DNA-Fäden produzieren, die mit antimikrobiellen Proteinen ausgestattet sind. Die DNA-Fäden werden nach extrazellulär abgegeben, um Pathogene zu bekämpfen und werden als neutrophile extrazelluläre Fallen (englisch „traps“ – NETs) bezeichnet. (Kaynar und Shapiro, 2010; Marcos *et al.*, 2010; Papayannopoulos und Zychlinsky, 2009) Die Produktion von NETs, ein finaler Verteidigungsakt zugrunde gehender Neutrophiler, wird als NETosis bezeichnet und unterscheidet sich von Apoptose und Nekrose. (Brinkmann *et al.*, 2004; Steinberg und Grinstein, 2007)

NETs ermöglichen die Bildung von Mikrokompartimenten mit einer hohen Dichte antimikrobieller Proteine am Ort eines pathologischen Prozesses. Einige der Faktoren, die in NETs gefunden werden können sind Myeloperoxidase (MPO), Serinproteasen, Laktoferrin, neutrophile Elastase, Tryptase, Cathelicidin und andere. (Papayannopoulos und Zychlinsky, 2009) Desweiteren scheint die Freisetzung von Histonen eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr durch NETs zu spielen, die als effektive antimikrobielle Substanzen bekannt sind. (Hirsch, 1958) NETs tragen über verschiedene Aspekte zur Abwehr bei. Erstens schaffen sie eine physische Barriere und somit eine Eindämmung der Mikroben. Zweitens können in diesem mikrolokalen Kompartiment antimikrobielle Proteine durch eine minimierte Diffusion konzentriert werden. Drittens wird der negative Effekt von antimikrobiellen Proteinen auf den abwehrenden Organismus reduziert. Durch die lokal hohe Konzentration werden schädigende Effekte auf umgebendes organismus-eigenes Gewebe reduziert. Viertens kann der Entzündungsprozess moduliert werden. (Papayannopoulos und Zychlinsky, 2009)

1.4.4 Einfluss der CF Pharmakotherapie auf Neutrophile Granulozyten

Da Neutrophile eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem und bei der Abwehr von Aspergillen spielen, ist es wichtig den Einfluss der CF Pharmakotherapie auf die Funktion der Neutrophilen zu verstehen.

Es ist bekannt, dass Glucocorticoide in immunmodulatorische Mechanismen eingreifen, und daher zu den antiinflammatorischen Medikamenten gehören. Ein Mechanismus könnte die Inhibition der Arachidonsäure-Freisetzung durch Entzündungszellen sein, die über einen Antagonismus von Phospholipase A₂ vermittelt wird. (Hong und Levine, 1976) Außerdem beeinflussen sie weitere Prozesse beim inflammatorischen Geschehen. Sie üben inhibitorische Effekte auf die Chemotaxis durch indirekte und direkte Unterdrückung von Zytokinen aus, die Gewebeeinfiltration von Entzündungszellen wird inhibiert. Vermutlich haben sie auch einen indirekten Einfluss auf vaskuläre Adhäsionsmoleküle. (Schleimer, 1990) Interessanterweise konnte andererseits gezeigt werden, dass eine Glucocorticoid – Behandlung die *in vitro* Apoptose von humanen Neutrophilen hemmt, so dass die Auflösung des Entzündungsprozesses und die Reparation des Gewebes verlangsamt sein könnten. (Cox, 1995)

Von Makrolid-Antibiotika ist bekannt, dass sie zahlreiche Mechanismen von Neutrophilen beeinflussen können, beispielsweise Chemotaxis, oxidativen Burst und Phagozytose. (Labro *et al.*, 1993) Sie können die neutrophile Rekrutierung hemmen und zu reduzierter

Infiltration im Bereich der Atemwege führen, als auch zu niedrigerem Level der chemotaktischen Faktoren IL-8 und LTB₄. (Tsai *et al.*, 2004; Verleden *et al.*, 2006) Kadir *et al.* zeigten eine Abnahme der fungiziden Kapazität in *in vitro* Studien mit Clarithromycin, einem Makrolid-Antibiotikum. (Kadir *et al.*, 2000)

Für β_2 -adrenerge Agonisten, wie dem am häufigsten verordneten Salbutamol, wurde festgestellt, dass sie neben der weithin bekannten bronchodilatierenden Funktion auch durch einen antiinflammatorischen Effekt zur Verbesserung der Lungenfunktion beitragen. (Bosmann *et al.*, 2012) Transmitter des cholinergen autonomen Nervensystems tragen wahrscheinlich durch die Unterdrückung proinflammatorischer Mediatoren zur antiinflammatorischen Kapazität bei. (Tracey, 2009)

Der direkte Einfluss von rekombinanten humanen DNasen (rhDNasen) auf Neutrophile ist noch nicht ausführlich bekannt. Die neutrophile Inflammation in CF Patienten kann durch Behandlung mit RhDNase positiv beeinflusst werden. (Paul *et al.*, 2004) Mukus von CF Patienten hat gewöhnlich eine hohe Viskosität, die vor allem durch einen hohen DNA-Gehalt von Neutrophilen bedingt wird. (Chmiel *et al.*, 2002)

Die mukolytischen Eigenschaften von RhDNasen helfen somit die Folgen der neutrophilen Entzündung zu bewältigen. Die Belastung von Sputum und Plasma von CF Patienten mit neutrophiler Elastase kann durch die Verabreichung von RhDNase signifikant reduziert werden, wobei dieser Effekt wahrscheinlich zurückzuführen ist auf die von Neutrophilen freigesetzte mukusgebundene Elastase. (Bosmann *et al.*, 2012; Flierl *et al.*, 2007) Nach dem Kenntnisstand der Autorin ist ein detaillierterer Interaktionsmechanismus von RhDNasen und Neutrophilen nicht bekannt.

1.5 Hypothese und Fragestellung

Hintergrund dieser Arbeit sind die Beobachtungen von Jubin *et al.*, die bei Kindern mit ABPA bzw. *Aspergillus fumigatus* Besiedelung als Risikofaktoren eine Langzeittherapie mit Azithromycin und – im Vergleich zur nicht-betroffenen Patientengruppe – eine längere kumulative Dauer der Therapie mit RhDNasen beobachtet haben. Diese Befunde haben zu der Annahme geführt, dass Medikamente im Rahmen der CF Therapie die Funktion neutrophiler Granulozyten beeinflussen und damit die Anfälligkeit für Pilzinfektionen bei CF Patienten erhöhen.

Dabei stellen wir folgende Hypothese auf: Azithromycin und RhDNase beeinflussen die Aktivität von Chitinasen aus Neutrophilen Granulozyten und deren NETs.

Konkret sollten daher folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Verändern isolierte Neutrophile unter dem Stimulus mit PMA ihre Chitinase-Aktivität?
2. Verändert die Vorinkubation mit Azithromycin, RhDNase, Glucocorticoid oder β -Sympathomimetikum die Chitinase-Aktivität?
3. Unterscheiden sich Neutrophile von Gesunden und CF Patienten in ihrer Chitinase-Aktivität?
4. Können synergistische Effekte von Chitinasen und NETs beobachtet werden?

Diese Arbeit soll damit helfen die medikamentöse CF Therapie in Hinblick auf eine Gefährdung durch Pilzinfektionen kritisch zu hinterfragen. Die Zielsetzung für den klinischen Alltag besteht darin, sinnvolle Wege zu definieren, um zukünftig die CF Therapie so zu gestalten, dass Pilzinfektionen als unerwünschte Nebenwirkung minimiert werden können.

2. Methoden

2.1 Probanden und Patienten

2.1.1 Rekrutierung und Probengewinnung

Zur Probengewinnung wurden von Januar bis November 2011 Blutspender der Transfusionsmedizin Lübeck um die Freigabe ihres Buffy Coats gebeten. Die Probanden wurden schriftlich und mündlich über die Studie aufgeklärt und erhielten einen Fragebogen mit Angaben zu Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, Medikamenteneinnahme, Asthma, Allergien, Rauchen, chronischen Erkrankungen und letztem Luftwegsinfekt. (siehe Fragebogen im Anhang Seite 76.) Die Erhebung dieser Daten beruht auf Eigenangabe der Probanden. Zudem wurde durch Temperaturmessung sichergestellt, dass keine Erhöhung der Körpertemperatur vorlag. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren:

- Zeichen eines akuten Infektes
- Akute entzündliche Erkrankung
- Immunsuppressive Therapie

Zur Gewinnung der Blutproben von Patienten mit CF wurden stationär behandelte Patienten mit CF an der Universitätsklinik Lübeck und Kiel, sowie Patienten mit CF aus der Erwachsenenambulanz der Universitätsklinik Kiel rekrutiert. Sie erhielten eine ausführliche schriftliche und mündliche Aufklärung über die Studie. (siehe Aufklärung und Einverständniserklärung im Anhang Seite 77ff.) Neben der Blutentnahme wurde der letzte Arztbrief der Patienten herangezogen, um Angaben über die aktuelle Medikation, Komorbiditäten und die mikrobiologischen Befunde aus dem Sputum zu erhalten.

Einziges Ausschlusskriterium für Patienten mit einer gesicherten Diagnose einer CF (erhöhte Chlordikonzentration im Schweiß > 100 mmol/l und/oder genetischer Nachweis einer CF) war eine aktive ABPA.

Proben von Nicht-CF Probanden erhielten wir als Buffy Coat zeitnah nach Auftrennung der Blutkonserven in die Einzelbestandteile. Das Volumen des Buffy Coats betrug ca. 50ml und wurde nach Erhalt in 9ml Lithium-Heparin Röhrchen abgefüllt, für mindestens 10 Minuten inkubiert und wie in 2.2.1 beschrieben weiter verarbeitet.

Blutproben von CF Patienten wurden direkt in 9ml Lithium-Heparin Röhrchen steril aus einer Armvene abgenommen. Insgesamt wurden 50ml Blut abgenommen. Die weitere Verarbeitung erfolgte schnellstmöglich mit einer maximalen Transportzeit zwischen Blutentnahme und erstem Arbeitsschritt im Labor von 4 Stunden.

2.1.2 Daten zum Probanden- und Patientenkollektiv

Wir sammelten Proben von 19 CF Patienten (14 männlich, 5 weiblich) und 21 Nicht-CF Blutspendern (16 männlich, 5 weiblich). Die Patienten waren zwischen 16 und 40 Jahre alt, mit einem Durchschnittsalter von 26,74 (+/-3,35) Jahren. Alle erhielten Medikamente im Rahmen der CF Therapie (n=12 Corticosteroide, n=16 β -Sympathomimetika, n=7 Azithromycin, n=11 RhDNase, n=10 andere Antibiotika) und weitere Medikamente, z.B. zur Blutdrucksenkung.

Nicht-CF Blutspender waren zwischen 21 und 66 Jahre alt, im Mittel 38,14 (+/-12,35) Jahre alt. N=8 nahmen regelmäßig Medikamente ein (n=4 blutdrucksenkende Medikamente, n=2 hormonelle Empfängnisverhütung, n=1 Schmerzmedikament, n=1 Protonenpumpeninhibitor, n=1 selektiver Serotoninwiederaufnahmehemmer, n=1 Schilddrüsenhormonpräparat).

2.1.3 Votum der Ethikkommission

Für die vorliegende Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor (Aktenzeichen 11-044). Es wurden keine berufsrechtlichen oder berufsethischen Bedenken geäußert und eine Durchführung der Studie somit ermöglicht (siehe Votum der Ethikkommission im Anhang Seite 80).

2.2 Zellkultur

2.2.1 Isolation von Neutrophilen Granulozyten: Percoll Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Materialien für die im Folgenden beschriebenen Methoden sind unter 2.6 vollständig aufgeführt.

Zur Gewinnung von Neutrophilen Granulozyten wurde das Prinzip der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Percoll ist ein Dichtegradientenmedium, das die Separation von Zellen, Viruspartikeln und subzellulären Partikeln ermöglicht. Die Suspension enthält Siliziumpartikel eines Durchmessers von 15-30nm, die mit Polyvinylpyrrolidone (PVP) beschichtet sind. Bei Zentrifugation bilden die unterschiedlich großen Partikel einen Gradienten. Aufgrund seiner Eigenschaften ist Percoll weder toxisch für die Zellen, noch ist eine vorzeitige Aktivierung zu befürchten.

Für die Isolation von Neutrophilen Granulozyten wurde das finale Trennmedium nach folgendem Rezept hergestellt:

10xPBS steril	2ml
1xPBS	2ml
Percoll	12,04ml
H ₂ O steril	3,86ml
1N HCl	100µl
Finale Dichte: 1,082 g/cm ³ ; pH 7,4	

Das fertig gemischte Percoll-Trennmedium wurde mit der Funktion „short“ für wenige Sekunden zentrifugiert, um Blasen oder randständige Flüssigkeitstropfen zu eliminieren.

Die Verarbeitung der Lithium-Heparin Röhrcchen erfolgte für beide Probengruppen auf die gleiche Weise.

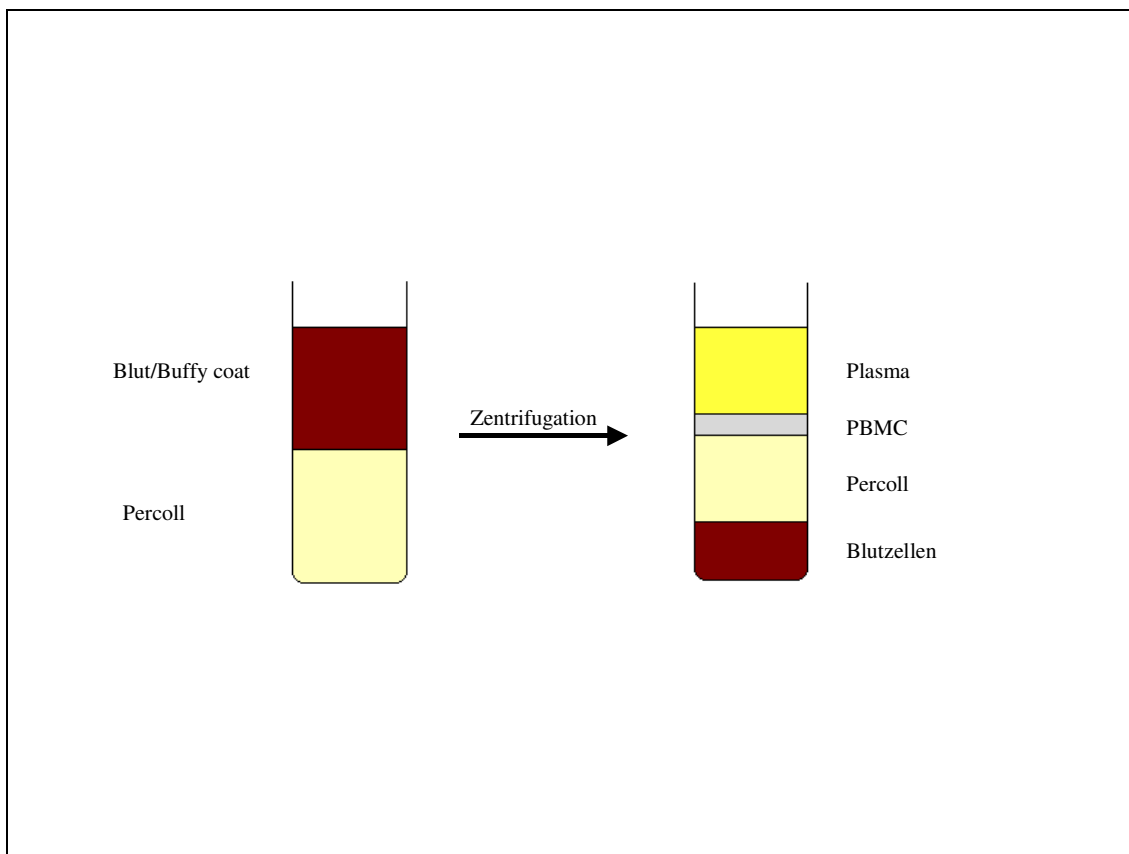


Abb. 3: Schema der Schichtung vor und nach Zentrifugation

Das Blut bzw. der Buffy Coat wurde auf das Percoll-Trennmedium aufgeschichtet, anschließend erfolgte die Zentrifugation zur Ausbildung des Dichtegradienten und Auftrennung der Zellfraktionen bei folgenden Einstellungen: 8°C, 400rcf, 30min, acceleration 5, brake 0. Abbildung 3 zeigt ein Schema der unterschiedlichen Schichten im Röhrcchen vor und nach der Zentrifugation. Der Überstand aus Plasma, mononukleärer

Zellschicht und Percoll wurde abgesaugt und die in den Röhren verbliebene rote Phase durch mehrfaches Schwenken resuspendiert. Es erfolgten zwei bis drei Lyseschritte mit dem Ziel die verbliebenen Erythrozyten aus dem Ansatz zu entfernen. Die Lysen wurden folgendermaßen durchgeführt: Das Röhren mit gut resuspendierter Zelllösung (Zellpellets in 1ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert) wurde mit Aqua bidest bis zur 40ml Markierung aufgefüllt, verschlossen und gut geschwenkt, um eine vollständige Durchmischung zu erreichen. Nach 45 Sekunden erfolgte die Zugabe von 10xPBS in der 0,11-fachen Menge des Aqua bidests. Das Röhren wurde erneut verschlossen und gut geschwenkt. Die Zentrifugation erfolgte bei folgenden Einstellungen: 8°C, 300rcf, 10 min, acceleration und brake normal (9). Der Überstand wurde abgesaugt ohne dabei das Zellpellet aufzuwirbeln. Nach zwei, maximal drei Lyseschritten war ein makroskopisch sauberes Pellet isoliert. Eventuell vorhandene rote Reste von Erythrozyten konnten vorsichtig mit PBS abgewaschen werden. Die Resuspension erfolgte in 1ml Kulturmedium nach Roswell Park Memorial Institute (RPMI) mit 0,5% BSA.

2.2.2 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellkonzentration beziehungsweise der absoluten Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Hierbei wurden die Trägerstege der Zählkammer kurz angehaucht und das Deckgläschen aufgedrückt, bis die regenbogenfarbenen Newtonschen Ringe zu sehen waren. Die für die Zählung verwendete Zellsuspension wurde als 100-er Verdünnung mit PBS hergestellt. 10µl der Flüssigkeit wurden von seitlich an die spaltförmige Öffnung zwischen Deckglas und Trägerplatte pipettiert und durch Kapillarkräfte unter das Deckglas gezogen. Die Auszählung der 16 zentralen Felder erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung. Die Konzentration wurde folgendermaßen berechnet: Die gefundene Anzahl mit Faktor 10^4 für die Zählkammer und Faktor 10^2 für die Verdünnung multipliziert ergibt die Konzentration der Zellen in 1ml.

2.2.3 May-Grünwald-Giemsa-Färbung eines Ausstrichpräparates

Zur dauerhaften Probenkonservierung wurde ein Ausstrichpräparat mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung gefärbt und anschließend mit einem Deckglas eingedeckt. 10µl Zellsuspension wurden auf einen Objektträger aufgebracht, ausgestrichen und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Färbung mit folgenden Schritten: 30 Minuten Inkubation in 100% May-Grünwald-Lösung, 5 Minuten Inkubation in 5%Giemsa-Lösung (in aqua bidest), kurzzeitiges Eintauchen in zwei Gefäße mit Leitungswasser, Eintauchen

in aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100% Ethanol), zuletzt Eintauchen in Xylol. Anschließend wurde ein großer Tropfen Entellan auf den Objektträger gegeben und das Deckglas aufgebracht.

2.2.4 Bestimmung von Zellreinheit, –vitalität und Aktivierungsgrad mittels Mikroskopie

Für die Bestimmung der Zellreinheit und Vitalität der Zellen wurde 10µl Zellsuspension mit 20µl PBS und 1µl Propidium-Iodid (PI) gemischt. 10µl der Suspension wurden auf einen Superfrost Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas bedeckt. Der Objektträger wurde mit dem Deckglas nach unten in den Metallrahmen des EVOS Mikroskops eingespannt. Die Zellen wurden in 20x Vergrößerung eingestellt und eine Aufnahme gemacht. Ohne den Objektträger zu bewegen wurde die Fluoreszenzbox aufgesetzt und der Kanal für grün fluoreszierende Proteine (GFP) wurde eingestellt. Nach Aufnahme eines Bildes erfolgte die gleiche Prozedur mit dem Kanal für rot fluoreszierende Proteine (RFP). Nach Überlagerung der Bilder und Einstellung unterschiedlicher Kontraste war es möglich unterschiedliche Zelltypen zu identifizieren. Durch PI angefärbt, leuchteten Zellen mit poröser Zellmembran deutlich rot und wurden als tote Zellen klassifiziert. Um Eosinophile von Neutrophilen zu unterscheiden, wurde die Autofluoreszenz der Eosinophilen herangezogen. (Weil und Chused, 1981) Mindestens 100 Zellen wurden so klassifiziert als 1=Neutrophiler, 2=toter Neutrophiler oder 3=Eosinophiler, wie es in der Abbildung 4 zu sehen ist. Folgende Formeln wurden zur Berechnung verwendet:

Reinheit = (%Neutros + %Neutros tot)

Vitalität = $1 - (\% \text{Neutros tot} / (\% \text{Neutros} + \% \text{Neutros tot}))$

Proben mit mindestens 95% lebenden Neutrophilen wurden akzeptiert und für die weiteren Versuche verwendet.

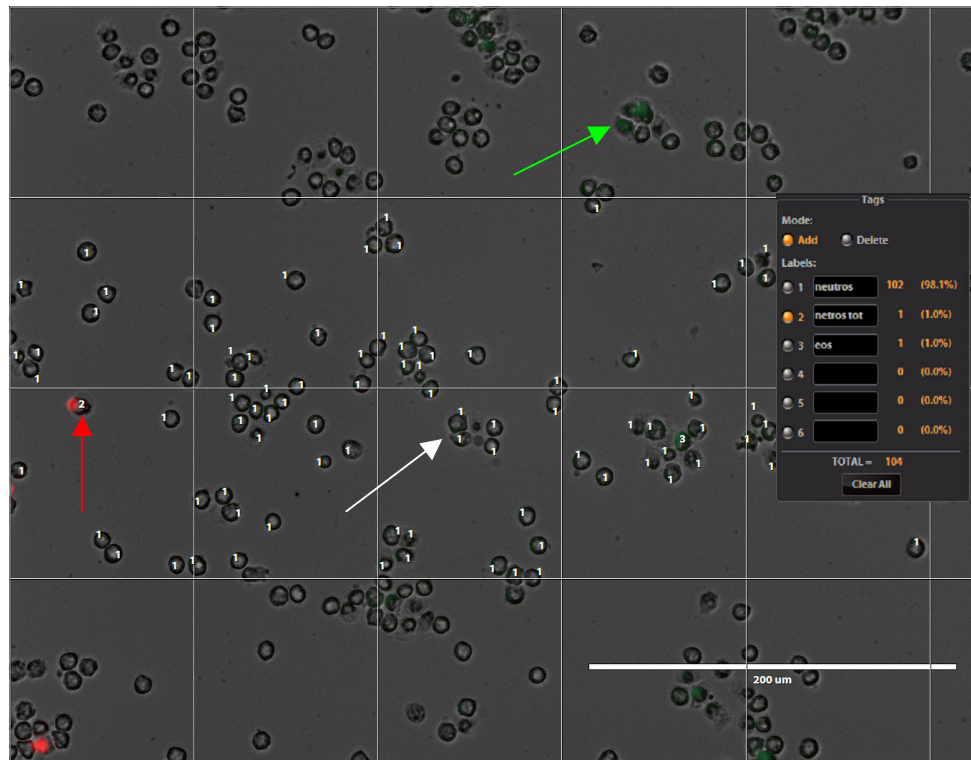


Abb. 4: Bestimmung des Anteils von lebenden Neutrophilen (weißer Pfeil), toten Zellen (roter Pfeil) und Eosinophilen (hellgrüner Pfeil) unter dem EVOS-Mikroskop. Tote Zellen leuchten rot durch die Anfärbung mit PI. Eosinophile fluoreszieren hellgrün.

Da vereinzelt eine hohe Voraktivierung der Neutrophilen beobachtet wurde, führten wir zusätzlich eine Bestimmung des Aktivierungsgrades mithilfe eines gegen das Oberflächenmerkmal CD62L gerichteten Antikörpers durch. Hierfür wurden 10 μ l Zellsuspension mit 20 μ l PBS und 10 μ l eines gegen das Oberflächenmerkmal 62 gerichteten Antikörpers (CD62L-AK) gemischt. Nach mindestens 10-minütiger Inkubationszeit wurden auch hier 10 μ l der Suspension auf einem Objektträger unter dem Mikroskop betrachtet. Verwendet wurde der GFP-Kanal mit der Fluoreszenzbox. Eine gleichmäßige grüne Fluoreszenz wurde als Hinweis auf fehlende (vorzeitige) Aktivierung gewertet. Ein Beispiel ist in Abbildung 5 zu sehen.

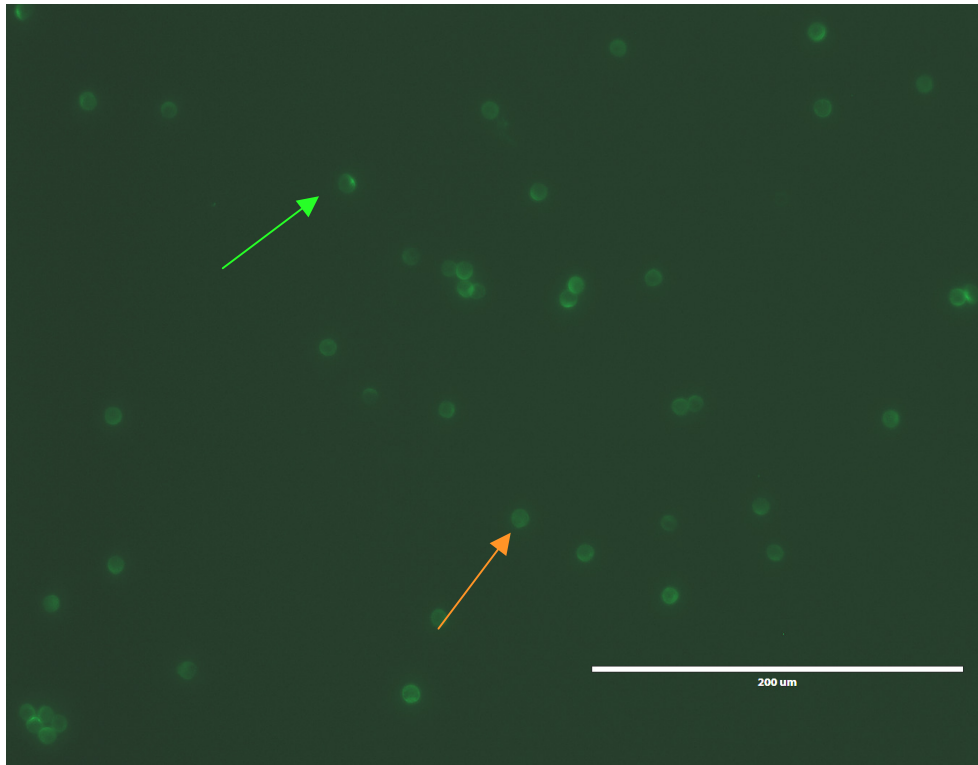


Abb. 5: Darstellung des Aktivierungsgrad der Zellen mittels CD62L-AK. Gleichmäßige Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes zeigt Zellen in nicht aktiviertem Zustand (orangener Pfeil). Ungleichmäßige Anfärbung, z.B. Polarisierung des Farbstoffes zeigt einen erhöhten Aktivierungsgrad (hellgrüner Pfeil).

2.2.5 Kultivierung der Zellen

Für die Kultivierung der Zellen erfolgte die Vorlage von Medium mit Medikament in den Vertiefungen einer 96-well Platte. Verwendet wurden die Medikamente Prednisolon, Salbutamol, Azithromycin, RhDNase. Die Endkonzentrationen in 200µl Zellkultur waren:

Prednisolon 10^{-6} M (10^{-7} M, 10^{-8} M)

Salbutamol 10^{-6} M (10^{-8} M, 10^{-10} M)

Azithromycin $127,39 \cdot 10^{-6}$ M (10^{-7} M, 10^{-8} M)

RhDNase (Pulmozyme®) $0,108 \cdot 10^{-6}$ M (10^{-7} M, 10^{-8} M)

Die verwendeten Konzentrationen ergeben sich aus in der Literatur gefundenen Konzentrationen bei entsprechender Therapie, wie weiter unten in dieser Arbeit ausführlich beschrieben und referenziert wird. Die Werte mit Kommastellen bei Azithromycin und RhDNase ergeben sich aus der Umrechnung von gefundenen Angaben in µg/ml zu M. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass der Wert für RhDNase die bestmögliche Annäherung darstellt. Die Umrechnung enthält möglicherweise eine Ungenauigkeit, da die exakte molekulare Masse für das Präparat nicht vorliegt. Gerechnet wurde mit dem Molekulargewicht von 37kDa. (Shak *et al.*, 1990) Die in Klammern

angegebenen Verdünnungsstufen wurden lediglich bei Nicht-CF Probanden getestet. Hierdurch sollte gezeigt werden, bis in welche Konzentrationsbereiche mögliche Effekte nachweisbar sind, beispielsweise beim Abbau oder Ausschleichen eines Medikamentes.

Als Kulturmedium diente RPMI-Medium mit 0,5% BSA. Die Zellkonzentration pro Vertiefung der Kulturplatte betrug 4×10^6 . Nach Zugabe der Zellen erfolgte eine einstündige Vorinkubation in dem mit Medikamenten versetzten Kulturmedium bei 37°C und 5% CO_2 .

2.2.6 Stimulation mit PMA

Nach der Vorinkubation erfolgte die Stimulation der Zellen mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 10nM. Die Inkubationszeit von 3 Stunden erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 .

2.2.7 Ernte der Überstände

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten bei 500rcf für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände mit einer Mehrkanalpipette abgenommen und auf eine neue Platte übertragen. Die Zellpellets wurden nach einmaliger Waschung in PBS resuspendiert und ebenfalls konserviert. Der Konservierung des Materials erfolgte bei -20°C .

2.3 Aktivitätsmessungen

Die Aktivität von CHIT-1 wurde in zellfreiem Überstand aus stimulierten Neutrophilen mithilfe von Fluoreszenz gemessen. Als Substrat wurde 4-methyl umbiliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotrioside hydrat (MU-TACT) in der Konzentration 0,2mg/ml gelöst in einem Puffer mit pH 4,4 verwendet. (Pufferkomponenten: 0,2M Na_2HPO_4 ; 0,1M Citronensäure). Das Prinzip der Messung beruht auf der Freisetzung von 4-Methylumbelliferon durch chitinolytische Hydrolyse. Dieses Produkt dient als Fluoreszenzindikator und kann bereits in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. 90 μl Substratlösung wurde mit 10 μl der Probe in Flachboden-Platten mit 96 Wells inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 . Als Kontrolle diente Chitinase von *Trichoderma viride* in der Konzentration 2×10^{-3} mg/ml. Als Standardreihe wurden Verdünnungen von 4-Methylumbelliferon in Puffer pH 4,4 verwendet (1 μM ; 0,1 μM ; 0,01 μM ; 0,001 μM). Nach der Inkubationszeit wurden 200 μl Stopp-Lösung (Natriumcarbonat 41,67mg/ml) in jede Vertiefung zugegeben. Die Messung

erfolgte anschließend mit Top-optic Technik bei 360nm und Referenzwellenlänge 450nm. Die Aktivitäten wurden als nmol/ml* h berechnet.

2.4 Antikörper-Färbung zur Visualisierung von CHIT-1 und DNA

Zur Darstellung der Verteilung von CHIT-1 und der Ausbreitung der NETs erfolgte eine Färbung von CHIT-1 und DNA mittels Antikörpern. Hierzu wurden Neutrophile, die wie oben beschrieben isoliert wurden, in Chamber Slides zu 50.000 pro Well in Kultur gebracht und mit PMA 10nm stimuliert. Nach 2,5h Inkubationszeit wurden die Mediumüberstände der Neutrophilen abgenommen und 200µl gefilterte PBS-Tween Mischung (0,1%Tween) in jedes Well pipettiert. Nach 5 Minuten wurden die Überstände erneut abgenommen und der selbige Waschschrift noch einmal wiederholt. Als nächstes wurde in jedes Well 200µl Glutaraldehyd-PBS (Glutaraldehyd 3,5%) gegeben und 20 Minuten inkubiert. Erneut wurden die Überstände abgenommen und der oben beschriebene Waschschrift mit PBS-Tween zweimal wiederholt. Als Detektionsantikörper wurde Chitotriosidase C18 in einer Verdünnung von 1:250 in PBS und einem Volumen von 100µl verwendet. Die mit Parafilm verschlossene Zellkulturplatte wurde so über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Überstände abgenommen und es erfolgten drei Waschschriffe mit PBS-Tween. Als Sekundärantikörper verwendeten wir donkey anti-goat IgG-PE (in PBS 1:500) und Hoechst 33342 (in PBS 1:500). 100µl der Sekundärantikörper wurden auf die Zellen pipettiert und für 1h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und drei Waschschriffe mit PBS-Tween folgten.

Die Kammern wurden von den Objektträgern genommen und Vecta shield auf die Proben der Objektträger gegeben. Nach Auflage des Deckglases galt es weitere 15 Minuten zu warten, bevor die mikroskopische Begutachtung erfolgen konnte.

2.5 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit one-way ANOVA durchgeführt. Für nicht-parametrische unabhängige Stichproben wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest verwendet. Analysen wurden mit Graph Pad Prism Software (Version 4.03, Stand 21. Januar 2005, San Diego, CA, USA) und Microsoft Excel (Version 5.1.2600, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Graphen wurden mit Graph Pad Prism Software erstellt. Ab einem Wert von $p < 0,05$ wurden die Daten als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des methodischen Vorgehens

Eine erste Versuchsreihe beschäftigte sich mit der Exploration der bestmöglichen Bedingungen für den Versuchsaufbau und die Bedingungen für die CHIT-1 Messung. In diesem Abschnitt der Methodenetablierung werden Ergebnisse teilweise als optische Dichte (OD) angegeben. Im Weiteren, bei Analyse der Patientendaten werden ausschließlich Aktivitätswerte gezeigt. Die Umrechnung von OD zur Aktivität erfolgte zunächst als Unit/ml mit

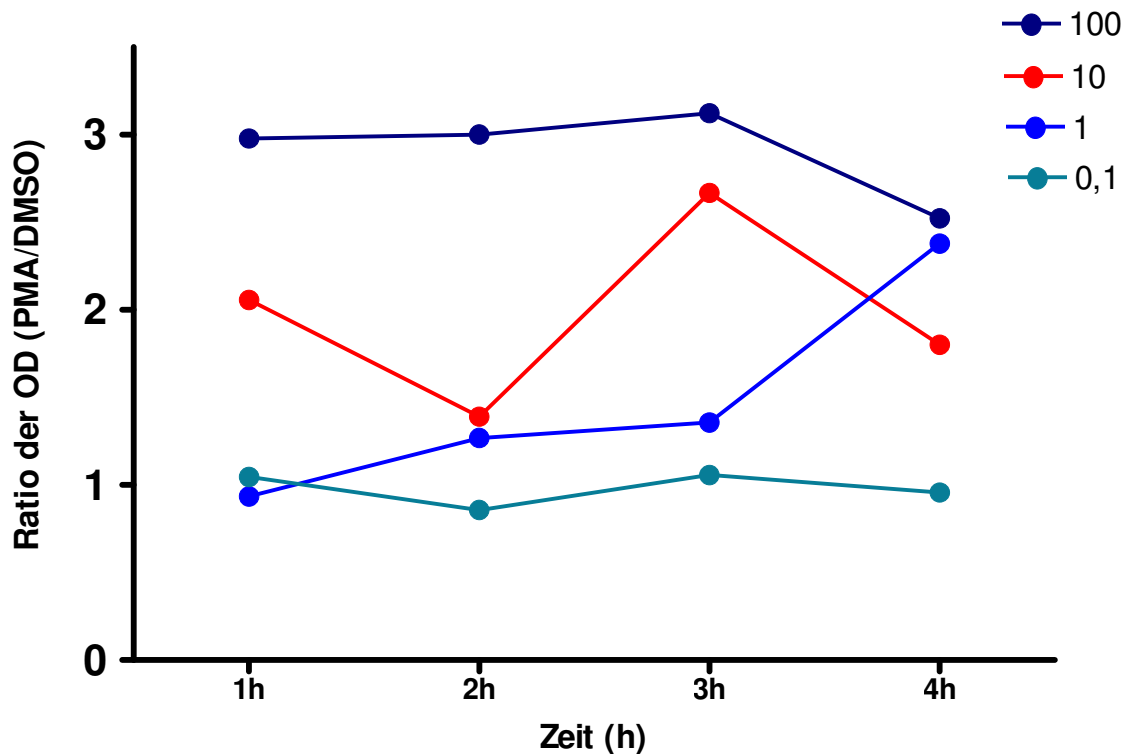
1 Unit= $1\mu\text{mol}/\text{min}: (\text{OD Messwert}-\text{OD blank})\times 0.05\times 0.3\times \text{Verdünnung}/((\text{OD Standard}-\text{OD blank})\times \text{Inkubationszeit}\times \text{Probenvolumen}/1000)$.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit den in der Literatur gefundenen Werten erfolgte die Umrechnung in $\text{nmol}/\text{ml}^*\text{h}$.

3.1.1 Zellkulturdauer

Um die optimale Stimulationsdauer für Neutrophile in der Zellkultur zu ermitteln, unternahmen wir Versuche mit unterschiedlichen Inkubationszeiten im Brutschrank. Das Erstellen einer Zeitachse mit Ratios der OD über DMSO unter verschieden starker PMA-Stimulation zeigt die Dynamik nach 1, 2, 3 und 4 Stunden (Graphik 1). Unsere Vorversuche mit unterschiedlichen Zellzahlen werden hier nicht aufgezeigt. In Anlehnung an die Literatur verwendeten wir 4Mio Zellen pro Kultur. (van Eijk *et al.*, 2007)

Deutlich zu sehen ist ein fehlender Anstieg bei einer PMA-Konzentration von 0,1nM. Am anderen Ende der getesteten Skala, bei 100nM zeigt sich eine anhaltend hohe Aktivität, bei längerer Kulturdauer (4h) ist sogar ein Rückgang der Aktivität zu verzeichnen, der möglicherweise durch autolytische Effekte aufgrund der starken Stimulation zustande kommt. Im Bereich von 1 und 10nM zeigen sich die deutlichsten zeitabhängigen Effekte. Während bei 1nM erst nach 4h die Aktivität deutlich ansteigt, ist bei 10nM bereits nach 3h Zellkultur eine für unsere Versuche ausreichende Aktivitätssteigerung zu beobachten. Wir entschieden uns also konzentrationsabhängig für eine Zellkulturdauer unter PMA Stimulation von 3h.



Graphik 1:
Zeitachse der Ratio der OD ($\lambda=405\text{nm}$) von PMA/DMSO ($n=1$). Jeweils 4Mio Neutrophile wurden mit 100/10/1/0,1 nM PMA für 1/2/3/4 Stunden stimuliert.

3.1.2 Vergleich von gerinnungshemmenden Medien

Wir testeten Blutentnahmeröhrchen mit verschiedenen Zusätzen für die Isolation der Neutrophilen. Blut von Nicht-CF Probanden wurde mit folgenden drei Substanzen zur Gerinnungshemmung getestet: Citrat, EDTA und Lithium-Heparin. Tabelle 1 zeigt die unstimulierten CHIT-1 Werte für die unterschiedlichen Zusätze. Bei mit Citrat-Lösung versetzten Blutproben zeigen Neutrophile einen fast 1,5fach höheren Basalwert von CHIT-1 in unstimuliertem Zustand (OD 0,1076) als die in Lithium-Heparin gelösten Zellen (OD 0,0735). Für Zellen in EDTA liegt der Wert im Vergleich zu Heparin sogar um den Faktor 1,5 höher (OD 0,1230). Da wir eine möglichst geringe Voraktivierung bei unstimulierten Zellen wünschten, um Effekte der Stimulation und der Medikamente deutlich machen zu können, wurden für alle weiteren Versuche in Lithium-Heparin inkubierte Blutzellen verwendet. Die Inkubation erfolgte jeweils vom Abnahmezeitpunkt bis zum Start der Isolation bei Blutproben (maximal 4h) und mindestens 10 Minuten bei Buffy Coat.

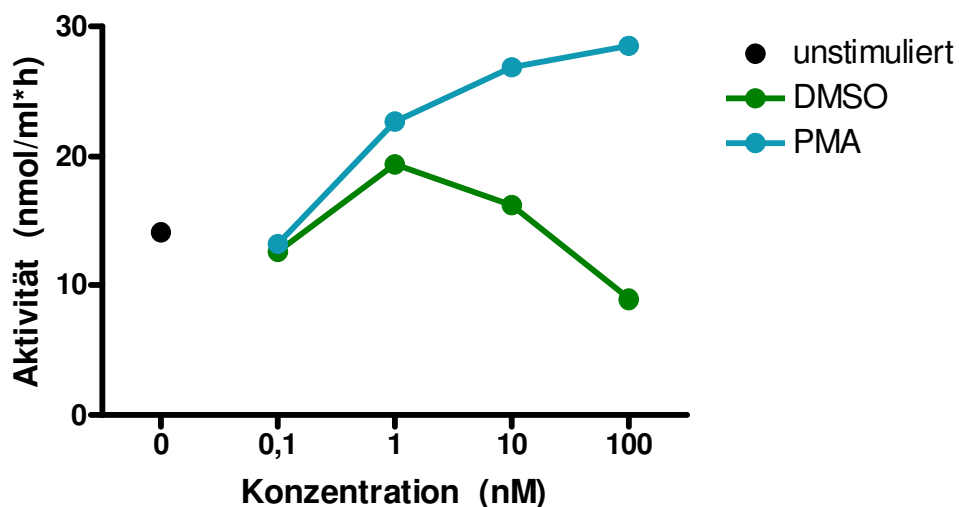
Inkubationsmedium	Citrat	EDTA	Li-Heparin
Optische Dichte	0.1076	0.1230	0.0735

Tab. 1:

Optische Dichte (OD, $\lambda=405\text{nm}$) von CHIT-1 aus unstimulierten Neutrophilen von Nicht-CF Probanden ($n=1$). Die Blutproben wurden in unterschiedlichen gerinnungshemmenden Medien inkubiert (Citrat, EDTA, Li-Heparin). Die Aktivitätsmessung erfolgte mit 4-Nitrophenyl β -D-N,N''-triacetylchitotriose.

3.1.3 PMA-Stimulation

Da wir es als wünschenswert erachteten durch die Stimulation einen deutlichen Aktivitätsunterschied im Vergleich zur Kontrolle zu generieren, begannen wir Stimulationsversuche mit einem bekannten starken Stimulus für Neutrophile: PMA. Wir testeten unterschiedliche Konzentrationen von PMA, wie in Graphik 2 gezeigt. Die Dosis von 10nM PMA wurde ausgewählt, da sie sich dem Maximum der Aktivität durch PMA-Stimulation annähert bei gleichzeitig deutlicher Unterscheidung zur entsprechenden Kontrolle. Auf eine höhere Dosis des Stimulanz wurde verzichtet, um die Reagibilität der Zellen bei Einwirken weiterer Faktoren – wie z.B. der Medikamente – zu erhalten.



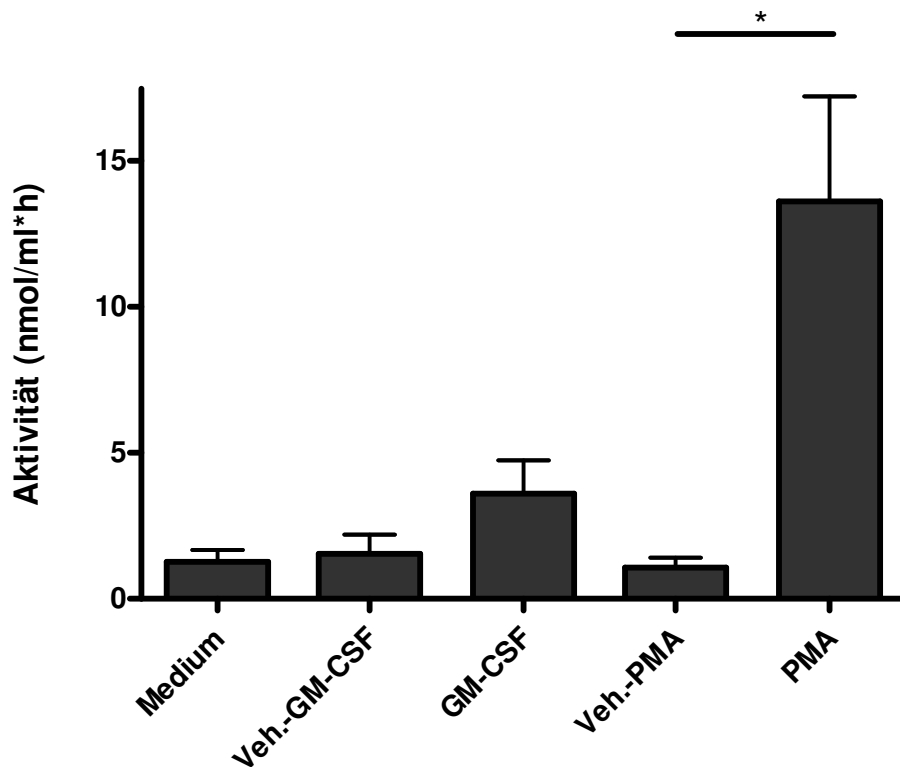
Graphik 2:

Aktivitätsmessung CHIT-1 in $\text{nmol/ml}^*\text{h}$ (y-Achse) mit 4-Nitrophenyl β -D-N,N''-triacetylchitotriose aus Zellkulturüberständen nach Stimulation mit PMA bzw. DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen und unstimulierten Zellen (x-Achse). Zellen in Zellkultur für 4h, Inkubation bei Aktivitätsmessung für 24h, $n=1$.

3.1.4 Weitere Stimulanzen

Da PMA als unphysiologischer Stimulus gilt, testeten wir weitere potentielle Stimulanzen. Hier erwähnt werden sollen Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor

(GM-CSF) und Interleukin 8 (IL-8). Während wir für IL-8 keine Effekte auf die CHIT-1 Aktivität ausmachen konnten (Testung von 1/10/100ng/ml; Ergebnisse nicht dargestellt), bestand bei GM-CSF (0,4µg/ml) ein Anstieg der Aktivität. Dieser ist im Vergleich zur Stimulation mit PMA allerdings deutlich geringer und ist statistisch nicht signifikant. Graphik 3 zeigt einen Vergleich von GM-CSF und PMA. Für weitere Versuche wurden GM-CSF und IL-8 nicht mehr verwendet.



Graphik 3:

Vergleich der CHIT-1-Aktivität (y-Achse) unter GM-CSF und PMA in Zellkulturüberständen aus Neutrophilen von CF Patienten (n=4) nach drei Stunden Zellkultur. Medium=Zellen ohne weitere Zusätze im Medium. Veh.-PMA=Zellen mit Vehikel von PMA (DMSO). PMA=Zellen mit 10nM PMA Stimulation. GM-CSF=Zellen mit 0,4µg/ml GM-CSF-Stimulation. Veh.-GM-CSF=Zellen mit Vehikel von GM-CSF (PBS+0,1%BSA) * p<0,05.

3.1.5 Aktivitätsmessung

Um die Aktivität der CHIT-1 von Neutrophilen abzubilden, wurden zwei Messprinzipien angewandt. Zunächst erfolgte die Messung mit einem kolometrischen Substrat.

Kolometrische Messung

Die kolometrische Aktivitätsmessung basiert auf enzymatischer Hydrolyse eines Substrates durch Chitinasen. Es können – je nach zu testender Chitinase-Aktivität (Endochitinase-/Exochitinaseaktivität) – verschiedene Substrate eingesetzt werden. Für die Messung der endochitinyolytischen CHIT-1 Aktivität verwendeten wir 4-Nitrophenyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose. Die enzymatische Hydrolyse des Substrates setzt p-Nitrophenol frei. Durch Zugabe der basischen Stopp-Substanz wird p-Nitrophenol zu p-Nitrophenolat, welches bereits optisch durch seine gelbe Farbe imponiert. Dieses kann kolometrisch bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen und somit quantifiziert werden, wie in Abbildung 6 zu sehen ist. (Duo-Chuan *et al.*, 2005) Wir verwendeten für die Messung eine Pufferlösung mit pH 4,4, was dem pH-Optimum der CHIT-1 nahe kommt. (Seibold *et al.*, 2008)

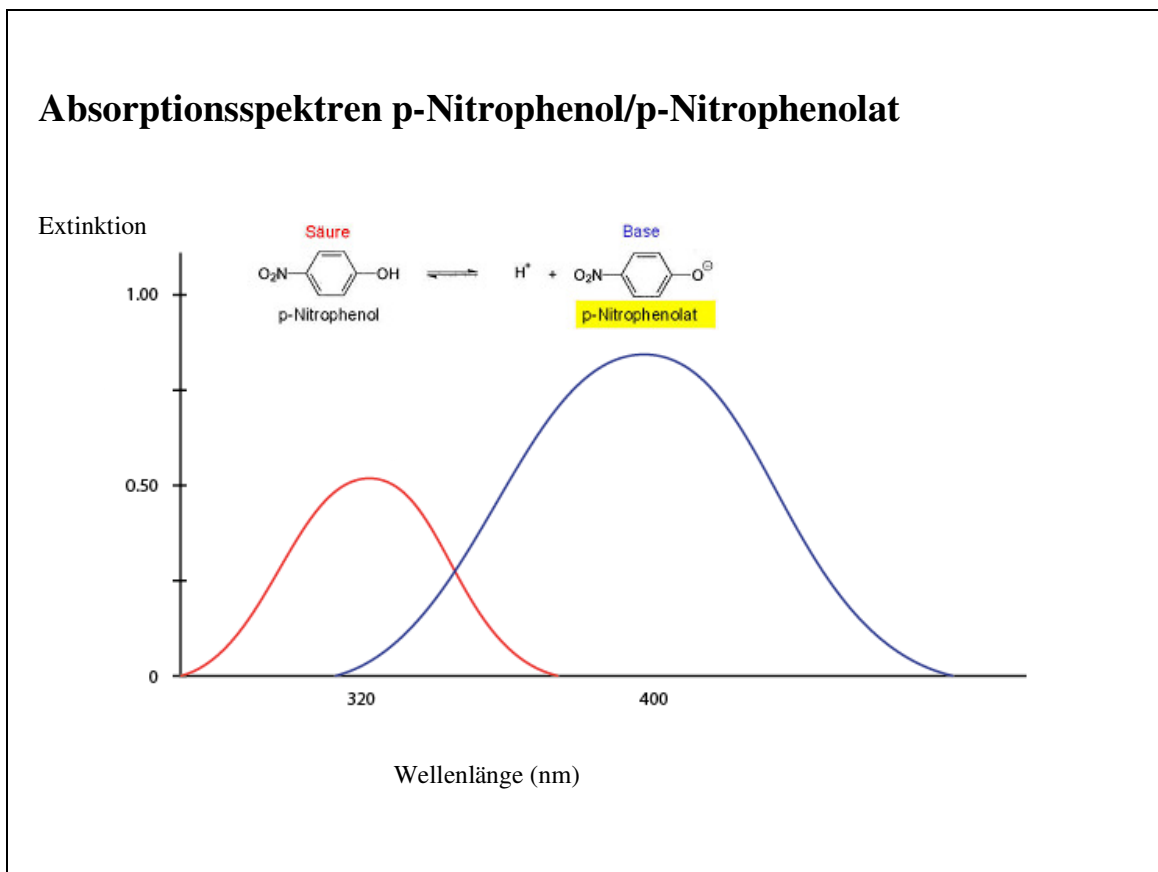
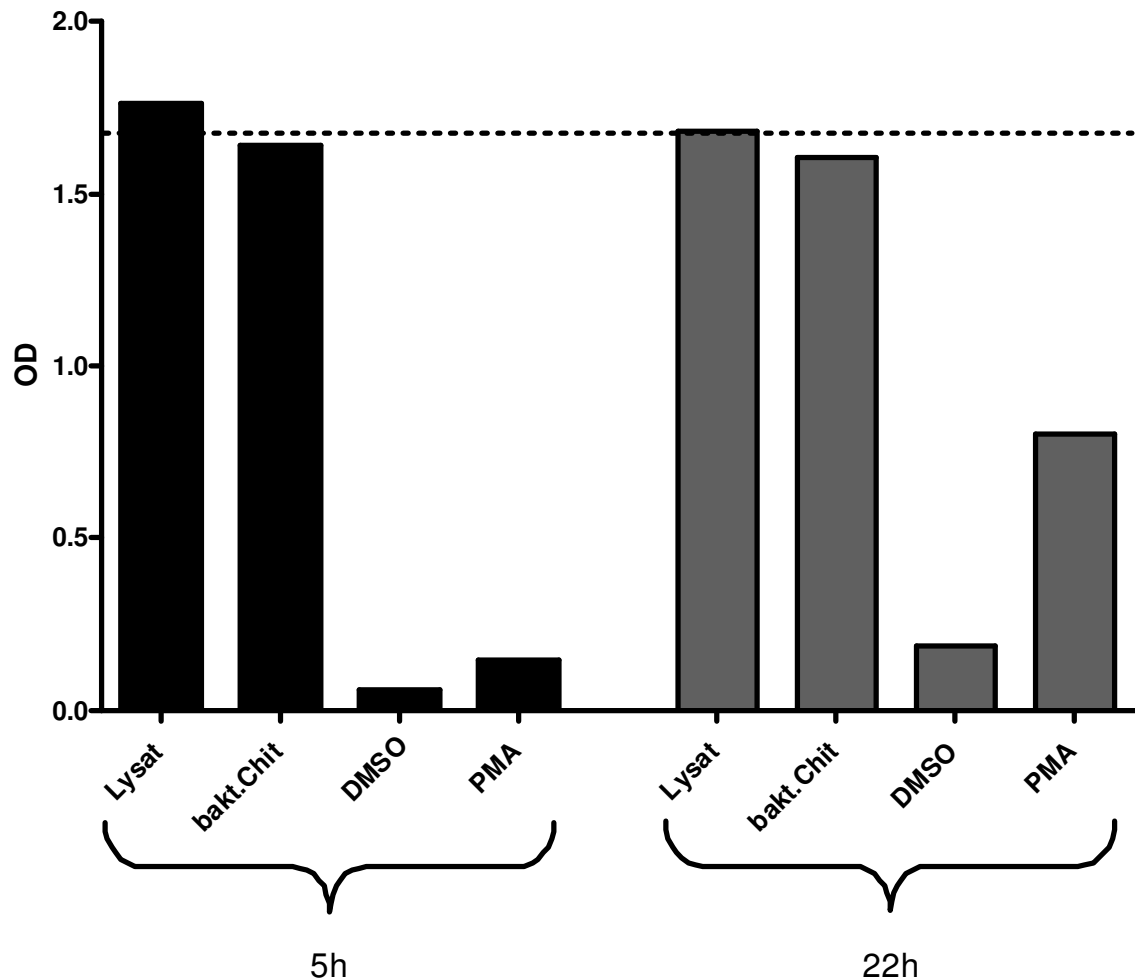


Abb. 6: Zusammenhang zwischen p-Nitrophenol und p-Nitrophenolat sowie Absorptionsspektren der Substanzen. Bei basischem pH wird p-Nitrophenol zu p-Nitrophenolat. Letzteres hat sein Absorptionsmaximum bei 405nm. (Abbildung aus http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_

Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry; aufgerufen am 15.03.2012, adaptiert durch die Autorin)

Zunächst wurde die optimale Dauer der Inkubation während der Aktivitätsmessung ermittelt. Graphik 4 zeigt die Messung verschiedener Proben mit unterschiedlicher CHIT-1 Aktivität zu jeweils zwei Zeitpunkten: nach 5 und nach 22 Stunden Inkubation mit der Substratlösung. Sowohl die bakterielle Chitinase als auch das humane Enzym aus Zelllysat zeigen zu beiden Zeitpunkten ähnlich hohe Werte. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um ein Maximum handelt, das durch die Substratlimitation erreicht wird. Sowohl nach 5h als auch nach 22h liegt der gemessene OD Wert für PMA im optimalen Bereich zwischen 0,1 und 1,0. Wir untersuchten daher die signal-to-noise-ratio, wie Tabelle 2 zeigt. Hierbei wird deutlich, dass nach 22h der Effekt der im Überstand vorhandenen Chitinasen deutlicher dargestellt werden kann als nach 5h. Als optimale Zeitdauer wurde somit die Inkubationszeit von mindesten 22h festgelegt, wir wählten 24h.



Graphik 4:

Aktivitätsmessung mit Proben aus einer 4-stündigen Zellkultur. Die Inkubation für die Aktivitätsmessung betrug 5 h (schwarze Balken) bzw. 22h (graue Balken). Als Proben verwendet wurde Lysat aus einem Zellpellet, Überstand aus einer Kultur mit PMA 100nM Stimulation, entsprechender Überstand mit DMSO, eine bakterielle Chitinase, n=1. Auf der y-Achse aufgetragen ist die Optische Dichte (OD, $\lambda=405\text{nm}$). Gestrichelte Linie=Mittelwert aus Lysat- und bakt.Chit.-Werten.

Messzeitpunkt	5h	22h
Signal/noise	2,49	4,29

Tabelle 2:

Signal-to-noise-ratio nach 5h und 22h Inkubation. Signal=OD bei Aktivitätsmessung aus Überstand mit PMA, noise=OD bei Aktivitätsmessung aus Überstand mit DMSO

Eine so lange Inkubationszeit bei der angewandten Aktivitätsmessung beinhaltet viele potentielle Störfaktoren. Wir befürchteten, dass die lange Inkubationszeit zu einer Verzerrung der Werte führen könnte und versuchten eine Verkürzung der Inkubationszeit

zu erreichen, um den möglichen Einfluss von Fehlerquellen zu minimieren. Wir testeten ein anderes Messprinzip unter Einsatz eines Fluoreszenzsubstrates.

Fluoreszenzmessung

Das Fluoreszenzsubstrat 4-methyl umbelliferyl β -d-N,N',N''-triacetylchitotrioside hydrate kann verwendet werden, um endochitinolytische Aktivität nachzuweisen. (Tronsmo und Harman, 1993) Aus dem Substrat wird bei Hydrolyse 4-Methylumbelliferon freigesetzt, das bis zu einer Konzentration von 10^{-10} M detektiert werden kann. Aufgrund der hohen Sensitivität verkürzten wir die Inkubationszeit mit dem Fluoreszenzsubstrat auf 30 Minuten. Die Messung erfolgte bei 360nm mit Referenzwellenlänge 450nm.

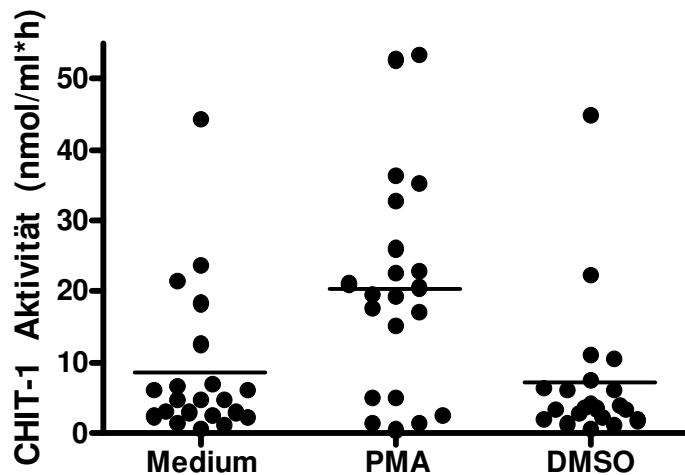
3.2 CHIT-1 Aktivität

3.2.1 Stimulierbarkeit bei CF und Nicht-CF

Nach Festlegung dieser Versuchs- und Messbedingungen, wurden zahlreiche Stimulationen mit PMA 10nM in Zellkulturen von Patienten und Probanden durchgeführt. Die Möglichkeit einer Stimulation zur CHIT-1 Sekretion mit PMA kann bereits aus Graphik 2 abgeleitet werden.

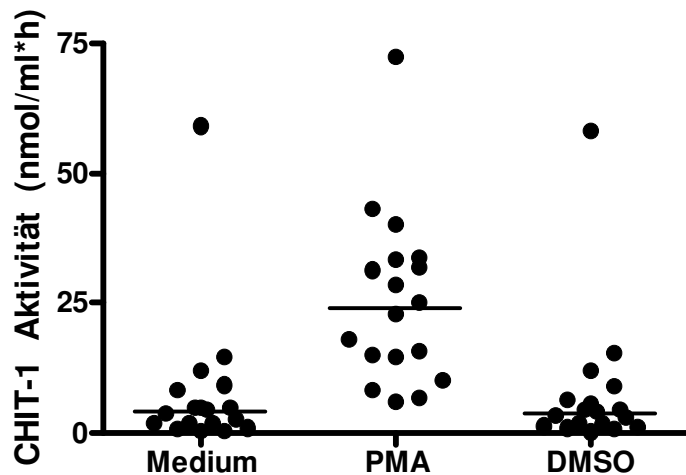
Die Daten für Basiswerte von CHIT-1 (Zellen in unstimulierter Zellkultur), PMA-stimulierter CHIT-1 Aktivität (Zellen in Zellkultur mit PMA 10nM stimuliert) und die Zellen mit DMSO-Zusatz als Kontrolle zu PMA wurden mit dem Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posttest analysiert, soweit nicht anders beschrieben. Es wurden die Rohdaten den statistischen Tests unterzogen.

Für Nicht-CF Probanden ergibt die Analyse ein p von 0,0086, also ist das Kriterium von $p < 0,05$ für statistische Signifikanz erfüllt. Eine Annäherung an eine Gaußverteilung besteht und die Dunn's Posttest Analysen zeigen, dass sich Medium vs. PMA sowie DMSO vs. PMA signifikant unterscheiden ($p < 0,05$), während Medium vs. DMSO keinen signifikanten Unterschied aufweist. Graphik 5 zeigt die Verteilung der Einzelwerte.



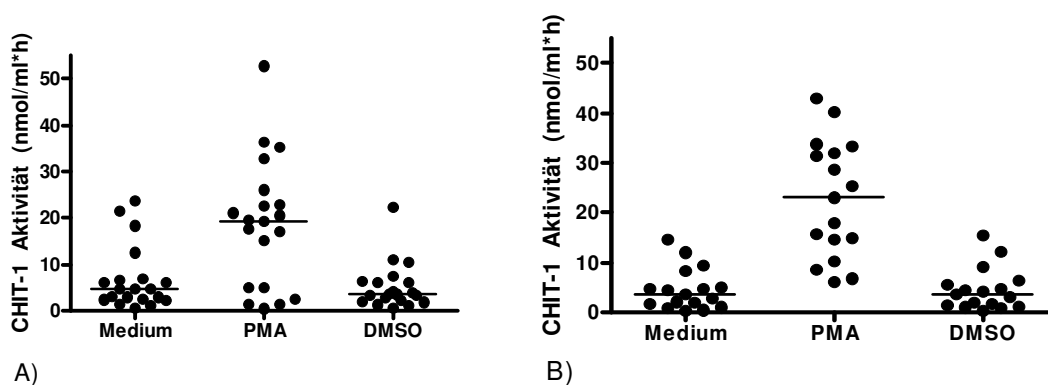
Graphik 5: Analyse der PMA-Stimulation bei Nicht-CF Probanden (n=21). Verteilung der Einzelwerte der durch Fluoreszenzmessung ermittelten CHIT-1 Aktivität in nmol/ml*h bei Zellen in Kulturmedium ohne weitere Zusätze („Medium“), Zellen nach 10nM PMA-Stimulation („PMA“) und Zellen nach Zugabe von DMSO („DMSO“) als Kontrolle für PMA. Jeder dargestellte Wert entspricht einer Zellkultur mit 4×10^{-6} Neutrophilen nach 3h Zellkultur. Horizontale Linie entspricht Mittelwert. Berücksichtigung aller Werte (inklusive „Outlier“).

Wir unternahmen die gleiche Stimulation mit Neutrophilen von CF Patienten, wo sich noch größere Unterschiede zeigten. Graphik 6 stellt die Daten für CF Patienten dar. Der Kruskal-Wallis Test ergibt einen p-Wert von 0,0001 und wiederum ist ein signifikanter Unterschied bei der Analyse von Medium vs. PMA sowie DMSO vs. PMA. In beiden Fällen ist $p < 0,001$, während DMSO und Medium keinen statistisch nachweisbaren Unterschied zeigen.



Graphik 6: Analyse der PMA-Stimulation bei CF Patienten (n=18). Verteilung der Einzelwerte der durch Fluoreszenzmessung ermittelten CHIT-1 Aktivität in nmol/ml^{*}h bei Zellen in Kulturmedium ohne weitere Zusätze („Medium“), Zellen nach 10nM PMA-Stimulation („PMA“) und Zellen nach Zugabe von DMSO („DMSO“) als Kontrolle für PMA. Jeder dargestellte Wert entspricht einer Zellkultur mit 4×10^{-6} Neutrophilen nach 3h Zellkultur. Horizontale Linie entspricht Median. Berücksichtigung aller Werte (inklusive „Outlier“).

Augrund einiger augenscheinlich außergewöhnlich hohen Werte wendeten wir den Grubbs-Outlier-Test an (extreme student deviate test, $\alpha=5\%$ für $Z >$ kritischer Wert nach Grubbs mit $Z=(\text{Mittelwert-Wert})/\text{Standardabweichung}$). Hierbei konnte in beiden Gruppen ein Wert als Ausreißer identifiziert werden.



Graphik 7: Analyse der PMA-Stimulation bei Nicht-CF Probanden (A), n=20 und CF Patienten (B), n=17. Verteilung der Einzelwerte der durch Fluoreszenzmessung ermittelten CHIT-1 Aktivität in nmol/ml^{*}h bei Zellen in Kulturmedium ohne weitere Zusätze („Medium“), Zellen nach 10nM PMA-Stimulation („PMA“) und Zellen nach Zugabe von DMSO („DMSO“) als Kontrolle für PMA. Jeder dargestellte Wert entspricht einer

Zellkultur mit 4×10^6 Neutrophilen nach 3h Zellkultur. Horizontale Linie entspricht Median. Ausschluss der als „Outlier“ identifizierten Werte.

In Graphik 7 sind Nicht-CF und CF Probanden nach Ausschluss der Ausreißer-Werte gegenübergestellt. Hier ist zu erkennen, dass die Streubreite bei Nicht-CF Probanden größer ist als bei CF Patienten. Die Werte in den unstimulierten Zellkulturen verteilen sich bei Nicht-CF zwischen $0,54 \text{ nmol/ml}^* \text{ h}$ und $23,63 \text{ nmol/ml}^* \text{ h}$ mit einem Mittelwert von $6,79 (+/-2,98) \text{ nmol/ml}^* \text{ h}$. CF Patienten weisen einen Mittelwert von $4,62 (+/-1,99) \text{ nmol/ml}^* \text{ h}$, wobei sich die Werte zwischen $0,34$ und $14,71 \text{ nmol/ml}^* \text{ h}$ verteilen. Ähnlich verhält es sich bei den Werten der PMA-Stimulation: Bei Nicht-CF finden sich höhere und niedrigere Werte als bei CF, die Streubreite ist größer. Werden die CHIT-1 Aktivitäten der CF Patienten mit den Nicht-CF Probanden verglichen, so stellt sich der Unterschied sowohl im unstimulierten als auch nach PMA-Stimulation nicht signifikant dar.

Nicht-CF (n=20)		CF (n=17)	
Grundaktivität	PMA-Stimulation	Grundaktivität	PMA-Stimulation
4,68	17,59	0,34	8,48
6,10	26,05	2,71	25,30
23,63	36,35	5,12	33,33
1,46	1,42	9,31	28,56
4,83	4,97	4,54	14,66
0,54	0,50	4,83	43,07
21,43	32,70	14,71	31,94
1,19	1,33	8,28	40,27
2,42	22,86	12,01	33,77
6,23	35,19	1,05	6,80
2,96	22,72	0,86	10,29
7,02	19,64	3,69	31,40
2,35	19,22	1,82	23,02
6,67	52,72	0,46	6,09
2,43	2,56	4,82	18,05
18,35	21,11	1,89	15,78
4,82	5,06	2,11	14,99
12,56	17,22		
2,96	15,15		
3,20	20,56		
Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
6,79	18,75	4,62	22,69

Tabelle 3:

Vergleich der Grundaktivitäten mit Werten nach PMA-Stimulation von CHIT-1 in Überständen aus Zellkulturen mit Neutrophilen bei Nicht-CF und CF. Jeder dargestellte Wert entspricht einer Zellkultur mit 4×10^6 Neutrophilen nach 3h Zellkultur. Aktivitäten in $\text{nmol/ml}^* \text{ h}$. Zusätzlich ist der Mittelwert jeder Spalte berechnet und angegeben.

Des Weiteren ist der Anstieg, von der im Medium gemessenen Grundaktivität zur PMA Stimulation unterschiedlich stark, wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist. Bei Nicht-CF liegt der Anstieg im Bereich des 2,5fachen, von im Mittel 6,79 nmol/ml^{*h} auf 18,78 nmol/ml^{*h}. Bei den CF Patienten ist dagegen fast eine Verfünffachung (von im Mittel 4,62 nmol/ml^{*h} auf 22,69 nmol/ml^{*h}) der Aktivität aufgetreten.

3.2.2 Nicht-Sekretierer

Um weitere eventuell auffällige Werte ausklammern zu können, untersuchten wir die gesammelten Proben auf das Vorliegen von Nicht-Sekretierern. Insgesamt 40 Proben von Nicht-CF Probanden untersuchten wir auf ihre Fähigkeit CHIT-1 zu sekretieren. Hiervon konnten wir 5 als Nicht-Sekretierer nach den im Folgenden genannten Kriterien identifizieren. Dargestellt sind die Werte in Tabelle 4. Dies entspricht 12,5% unserer Population und liegt damit deutlich höher als der Wert von 6%, der in der Literatur gefunden werden kann. (Masoud *et al.*, 2002)

Nicht-Sekretierer (n=5)	
unstimuliert	PMA-Stimulation
739	717
3888	4007
2126	2085
687	770
1230	1187

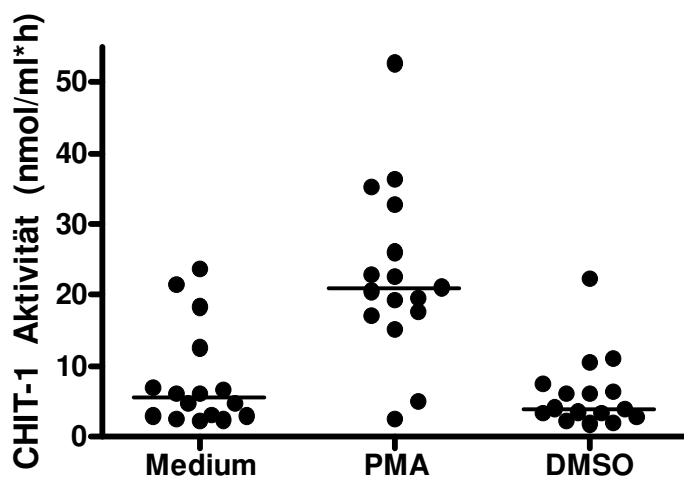
Tabelle 4:

OD-Werte ($\lambda=360\text{nm}$) der Nicht-Sekretierer in unstimulierten und PMA-stimulierten Zellkulturen. Jeder dargestellte Wert entspricht einer Zellkultur mit 4×10^6 Neutrophilen nach 3h Zellkultur.

Als Nicht-Sekretierer klassifiziert wurden Probanden, deren Proben unter Stimulation mit PMA keinen Anstieg der CHIT-1-Sekretion bei bereits sehr niedrigem Basislevel in der unstimulierten Zellkultur zeigten. Die Umrechnung in Aktivitätswerte war hierfür nicht zwingend notwendig, auch ein fehlender oder nur marginaler Anstieg der OD-Werte bei Vergleich von Medium-Wert zu PMA-Wert wurde als Kriterium für die Klassifikation zum Nicht-Sekretierer gewertet. Trotz der niedrigen Fallzahl von n=5 Nicht-Sekretierern unternahmen wir eine genauere Betrachtung der Merkmale von Nicht-Sekretierern im Vergleich zu den normalen Sekretierern. Deskriptiv lässt sich feststellen, dass Nicht-Sekretierer in 40% der Fälle weiblich und 60% der Fälle männlich waren (Sekretierer

28,57% weiblich, 71,43% männlich), das durchschnittliche Alter lag bei 33,0 (+/-10,68) Jahren (Sekretierer 42,23 (+/-4,06) Jahre), 60% der Nicht-Sekretierer nahmen Medikamente ein (Sekretierer 34,29%), vorwiegend antihypertensive Medikamente. Unter den Nicht-Sekretierern befand sich kein Asthmatiker (Sekretierer 5,72%), Allergien bzw. Unverträglichkeiten traten bei 60% auf (Sekretierer 20%), Rauchen wurde von 40% der Nicht-Sekretierer angegeben (Sekretierer 40%). Keiner der Nicht-Sekretierer gab an, an einer nicht näher bezeichneten chronischen Erkrankung zu leiden (Sekretierer 11,43%). Der BMI unterschied sich leicht in beiden Gruppen: 24,9 (+/-3,39) kg/m² bei den Nicht-Sekretierern und 27,89 (+/-1,79) kg/m² bei den Sekretierern.

In der folgenden Graphik 8 ist erneut die Aktivität bei Nicht-CF angegeben, wobei sowohl als Ausreißer als auch als Nicht-Sekretierer identifizierte Proben ausgeschlossen wurden. Im Vergleich zur Graphik 7, die Nicht-Sekretierer miteinschließt, fällt besonders auf, dass nach Ausschluss der Nicht-Sekretierer der Wert der PMA-Stimulation mit 23,08 (+/-5,95)nmol/ml^{*}h höher ausfällt (im Vergleich: vor Ausschluss der Nicht-Sekretierer 18,75 (+/-6,05)nmol/ml^{*}h). Die Signifikanz der Unterschiede tritt hier noch deutlicher hervor (p<0,0002) und die Werte nähern sich einer Gauß-Verteilung an.



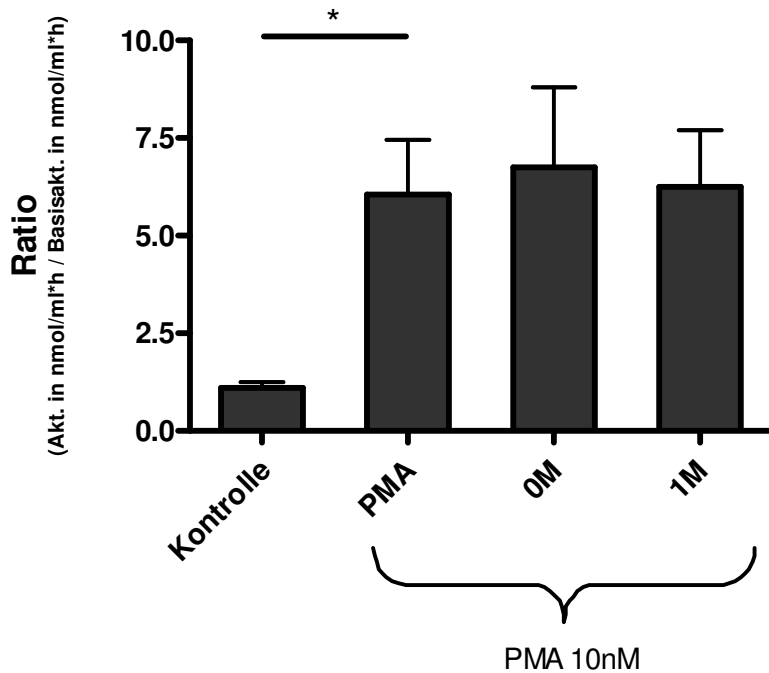
Graphik 8: Analyse der PMA-Stimulation bei Nicht-CF Probanden. Verteilung der Einzelwerte der durch Fluoreszenzmessung ermittelten CHIT-1 Aktivität in nmol/ml/h bei Zellen in Kulturmedium ohne weitere Zusätze („Medium“), Zellen nach 10nM PMA-Stimulation („PMA“) und Zellen nach Zugabe von DMSO („DMSO“) als Kontrolle für PMA. Jeder dargestellte Wert entspricht einer Zellkultur mit 4×10^{-6} Neutrophilen nach 3h Zellkultur. Horizontale Linie entspricht Median. Ausschluss der als „Outlier“ und als Nicht-Sekretierer identifizierten Werte.

3.1.3 Einfluss von Pharmaka bei CF und Nicht-CF

Da wir uns im Besonderen für den Einfluss von wichtigen bei CF eingesetzten Pharmaka auf die CHIT-1 interessierten, legten wir Zellkulturen mit Zusatz von Prednisolon, Salbutamol, Azithromycin und RhDNasen an. In den Überständen wurde nach Stimulation die CHIT-1 Aktivität gemessen.

3.1.3.1 Prednisolon

Auch die Analysen der CHIT-1 Aktivitätswerte unter Einfluss von Medikamenten erfolgten mittels one-way ANOVA. Im Folgenden sind die Graphen für Prednisolon, Salbutamol und Azithromycin dargestellt. Bei allen Versuchsreihen lässt sich eine signifikante Steigerung der CHIT-1 Aktivität durch die Stimulation mit PMA erreichen. Die unstimulierten Zellkulturen bzw. die Kontrollproben zeigen nur ein Drittel bis ein Viertel der Aktivität im Vergleich zu den PMA-stimulierten Proben. Für die Medikamente Prednisolon, Salbutamol und Azithromycin lässt sich kein Unterschied in der Aktivität der CHIT-1 in stimulierten Zellkulturen im Vergleich zur Kontrolle ohne medikamentösen Wirkstoff aufzeigen. D.h. zwischen den Proben mit Medikamentenspiegel und den zugehörigen Kontrollen (Vehikel zum jeweiligen Medikament) lässt sich kein nennenswerter Unterschied darstellen. Die Aktivitätswerte befinden sich alle in der Größenordnung der ausschließlich mit PMA stimulierten Proben. Die verwendeten Medikamentenkonzentrationen entsprechen der bestmöglichen Annäherung an Spiegel im Plasma oder Sputum, wie sie zum Beispiel bei der CF Therapie mit dem entsprechenden Medikament gemessen werden können. Für Prednisolon wählten wir in Annäherung an Plasmalevel bei systemischer Therapie 10^{-6} M. (Berghouse *et al.*, 1982) Bei Salbutamol handelt es sich ebenfalls um die Konzentration 10^{-6} M, wie es in einer *in vitro*- und *in vivo*-Studie nachgewiesen werden konnte. (Perkins *et al.*, 2007) Für Azithromycin entschlossen wir uns die Konzentration von $127,39 \cdot 10^{-6}$ (=100 μ g/ml) zu verwenden, die etwa doppelt so hoch ist wie die Sputumkonzentration bei CF Patienten unter oraler Medikation. (Wilms *et al.*, 2006)

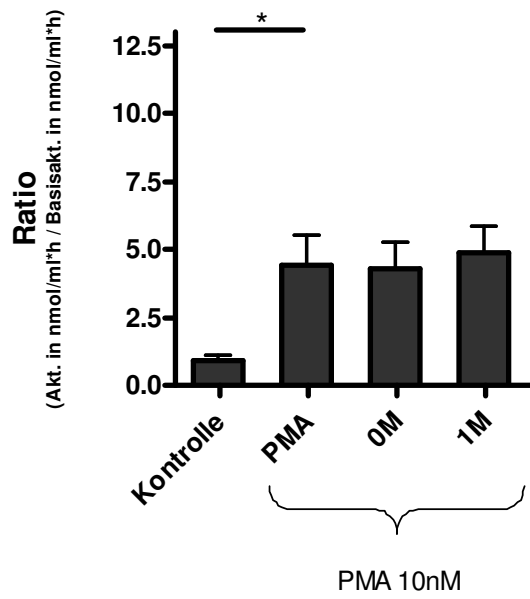


Graphik 8:

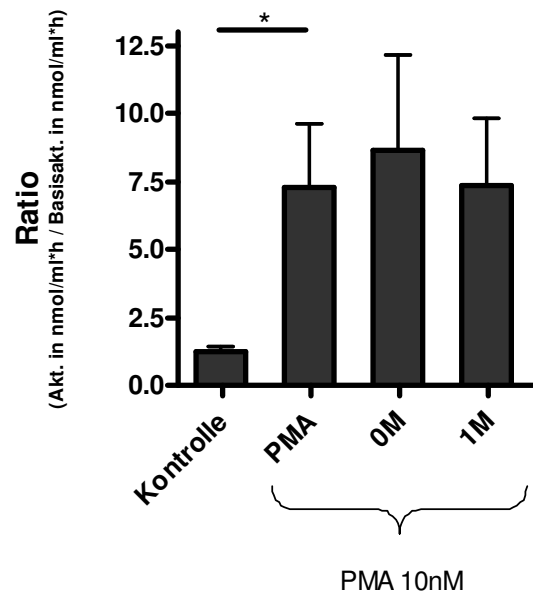
Ratio der CHIT-1-Aktivität in Zellkulturüberständen aus Neutrophilen von Nicht-CF und CF Patienten (n=16) nach drei Stunden Zellkultur mit Prednisolon.

y-Achse Ratio als Aktivität in nmol/ml^{*}h über Basisaktivität in nmol/ml^{*}h.

Kontrolle=Zellen ohne Medikament, mit Vehikel von PMA (DMSO). PMA=Zellen ohne Medikament, mit 10nM PMA Stimulation. 0M=Zellen mit Vehikel von Prednisolon, PMA Stimulation. 1M=Zellen mit Prednisolon, PMA Stimulation. Wirkstoffkonzentrationen auf x-Achse als Vielfache von 10⁻⁶. * p<0,05.



A)

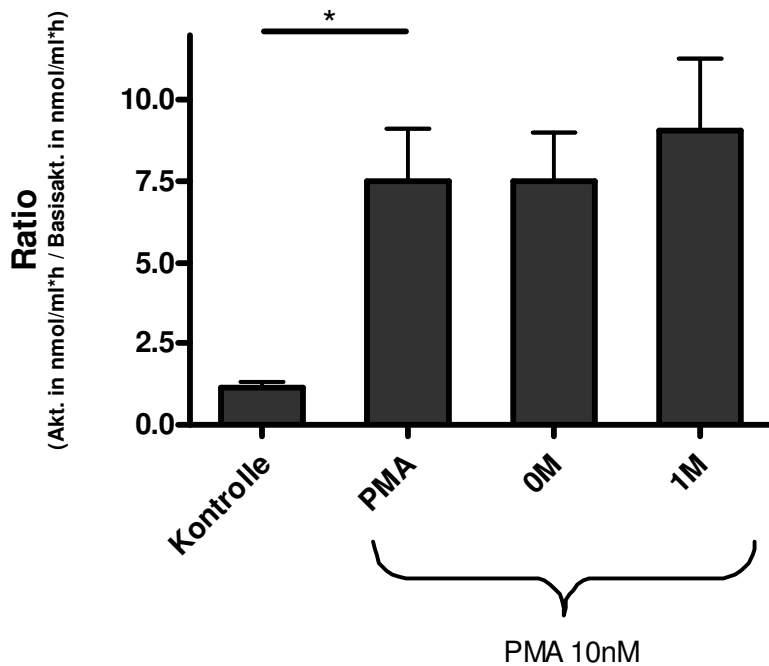


B)

Graphik 9:

Gleiche Darstellung mit Ausdifferenzierung zwischen Nicht-CF (A, n=7) und CF (B, n=9) in zwei getrennten Graphen. Für Salbutamol und Azithromycin werden diese Daten in der Arbeit nicht dargestellt.

3.1.3.2 Salbutamol



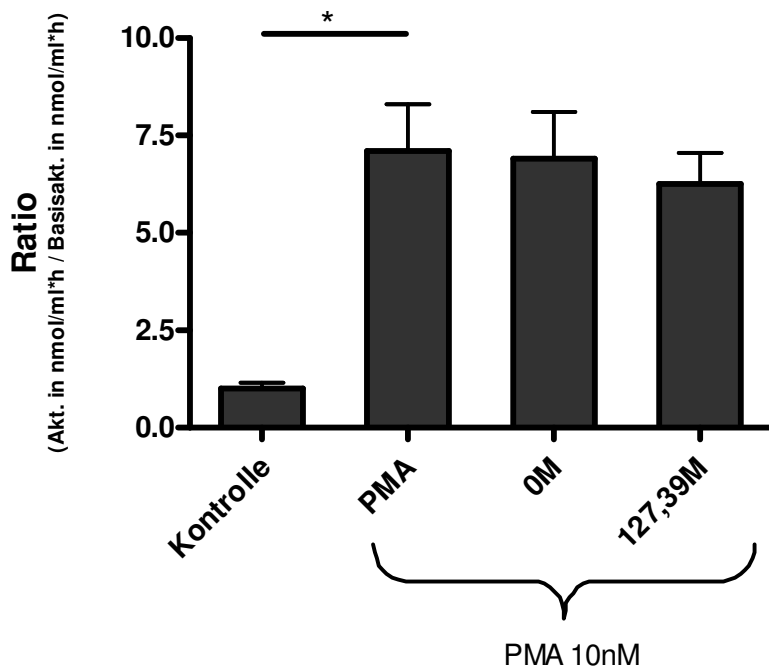
Graphik 10:

Ratio der CHIT-1-Aktivität in Zellkulturüberständen aus Neutrophilen von Nicht-CF und CF Patienten (n=14) nach drei Stunden Zellkultur mit Salbutamol.

y-Achse Ratio als Aktivität in $\text{nmol/ml}^* \text{h}$ über Basisaktivität in $\text{nmol/ml}^* \text{h}$.

Kontrolle=Zellen ohne Medikament, mit Vehikel von PMA (DMSO). PMA=Zellen ohne Medikament, mit 10nM PMA Stimulation. 0M=Zellen mit Vehikel von Salbutamol, PMA Stimulation. 1M=Zellen mit Salbutamol, PMA Stimulation. Wirkstoffkonzentrationen auf x-Achse als Vielfache von 10^{-6} . * $p < 0,05$.

3.1.3.3 Azithromycin



Graphik 11:

Ratio der CHIT-1 Aktivität in Zellkulturüberständen aus Neutrophilen von Nicht-CF und CF Patienten (n=21) nach drei Stunden Zellkultur mit Azithromycin.

y-Achse Ratio als Aktivität in $\text{nmol/ml}^*\text{h}$ über Basisaktivität in $\text{nmol/ml}^*\text{h}$.

Kontrolle=Zellen ohne Medikament, mit Vehikel von PMA (DMSO). PMA=Zellen ohne Medikament, mit 10nM PMA Stimulation. 0M=Zellen mit Vehikel von Azithromycin, PMA Stimulation. 127,39M=Zellen mit Azithromycin, PMA Stimulation.

Wirkstoffkonzentrationen auf x-Achse als Vielfache von 10^{-6} . * $p < 0,05$.

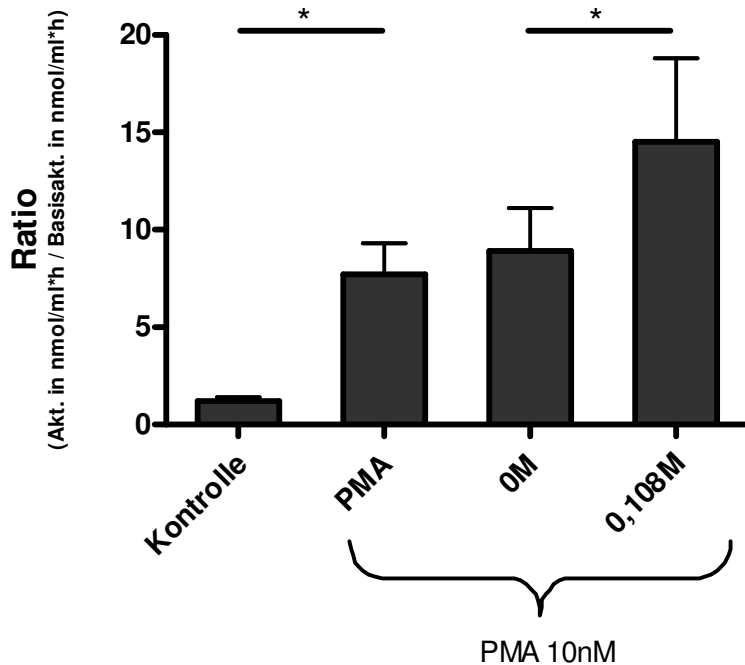
Tendenziell liegen die Aktivitätswerte bei CF Patienten niedriger als bei Nicht-CF Probanden. Dieser Trend zu niedrigeren Werten bei CF Patienten ist statistisch nicht signifikant.

3.1.3.4 RhDNase

Die Ergebnisse, die die Versuche mit RhDNase liefern, unterscheiden sich von denen der vorher genannten Medikamente. Die verwendete Wirkstoffkonzentration von RhDNase, entspricht in etwa dem im Sputum von CF Patienten messbaren Pegel 15 Minuten nach Inhalation mit 2,5mg des Medikaments. (Wilms *et al.*, 2006) In der Zellkultur verwendeten wir die Konzentration $4\mu\text{g/ml}$, entsprechend $0,108\text{M}$.

Auch hier kann mit PMA ein signifikanter Anstieg der CHIT-1 Aktivität beobachtet werden. Im Unterschied zu Prednisolon, Salbutamol und Azithromycin zeigen sich aber

auch Effekte bei den Proben mit RhDNase. Die Aktivität von CHIT-1 ist bei RhDNase im Vergleich zum Vehikel, also wirkstofffreien Proben, erhöht. Dieser Trend lässt sich mit one-way ANOVA Analysen und Newman-Keuls post-test als signifikant bestätigen.

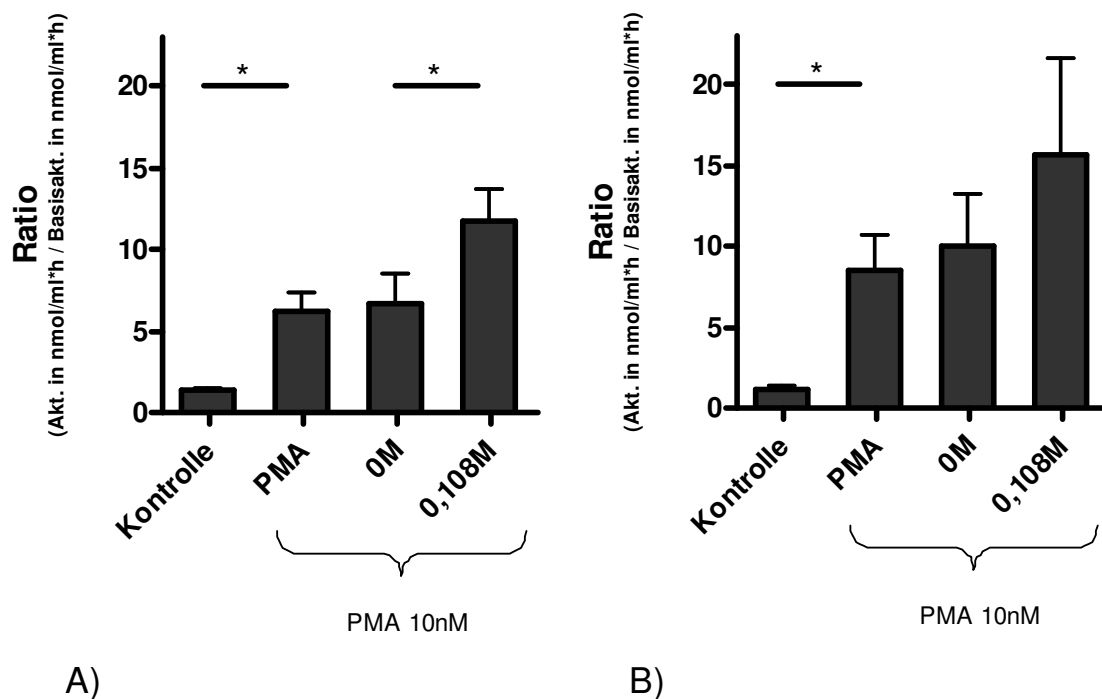


Graphik 12:

Ratio der CHIT-1 Aktivität in Zellkulturüberständen aus Neutrophilen von Nicht-CF und CF Patienten (n=15) nach drei Stunden Zellkultur mit RhDNase.

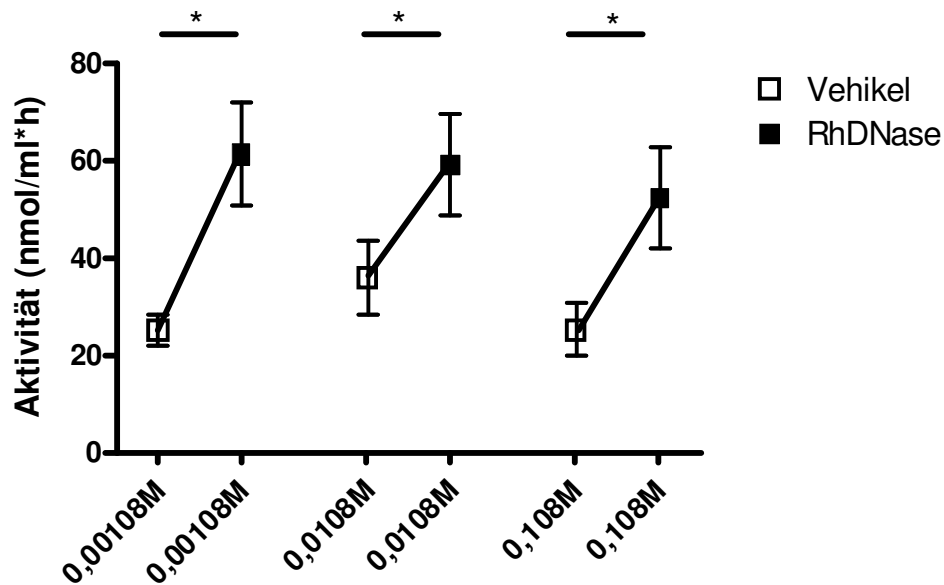
y-Achse Ratio als Aktivität in nmol/ml^{*}h über Basisaktivität in nmol/ml^{*}h.

Kontrolle=Zellen ohne Medikament, mit Vehikel von PMA (DMSO). PMA=Zellen ohne Medikament, mit 10nM PMA Stimulation. 0M=Zellen mit Vehikel von RhDNase, PMA Stimulation. 0.108M=Zellen mit RhDNase, PMA Stimulation. Wirkstoffkonzentrationen auf x-Achse als Vielfache von 10⁻⁶. * p<0,05.



Graphik 13: Gleiche Darstellung mit Ausdifferenzierung zwischen Nicht-CF (A, n=5) und CF (B, n=10) in zwei getrennten Graphen.

Um den Aktivitätsanstieg unter RhDNasen zu bestätigen und um weitere Erkenntnisse über den Einfluss auf die CHIT-1 zu gewinnen, führten wir eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen von RhDNase durch. Graphik 14 zeigt die Ergebnisse mit RhDNase in der oben bereits vorgestellten Konzentration von $0,108 \cdot 10^{-6} \text{M}$, sowie einer 10- und 100-fachen Verdünnung ($0,108 \cdot 10^{-7} \text{M}$ bzw. $0,108 \cdot 10^{-8} \text{M}$). Bei allen Konzentrationsstufen ist eine signifikante Erhöhung der CHIT-1 Aktivität aufzeigbar.



Graphik 14: CHIT-1-Aktivität (y-Achse) in Zellkulturüberständen aus Neutrophilen von Nicht-CF Probanden (n=5) nach drei Stunden Zellkultur. Schwarze Kästchen=Zellen mit Pulmozyme in angegebenen Konzentrationen, PMA Stimulation. Weiße Kästchen=Vehikel zu Pulmozyme. Wirkstoffkonzentrationen auf x-Achse als Vielfache von 10^{-6} M. * $p < 0,05$. Die experimentellen Kontrollen in Form von Zellen ohne Zusätze, Zellen mit DMSO und Zellen mit PMA ohne Medikament wurden mitgeführt, aber in der Graphik nicht dargestellt.

3.3 Färbung und Visualisierung von CHIT-1 und DNA

Um noch mehr Aussagen über das Zusammenspiel von CHIT-1, NETs und RhDNase machen zu können, wurden weitere Versuche unternommen. Zur Lokalisation von CHIT-1 und der DNA-Strukturen wurden Antikörperfärbungen vorgenommen, die eine Visualisierung und somit Lokalisierung ermöglichen.

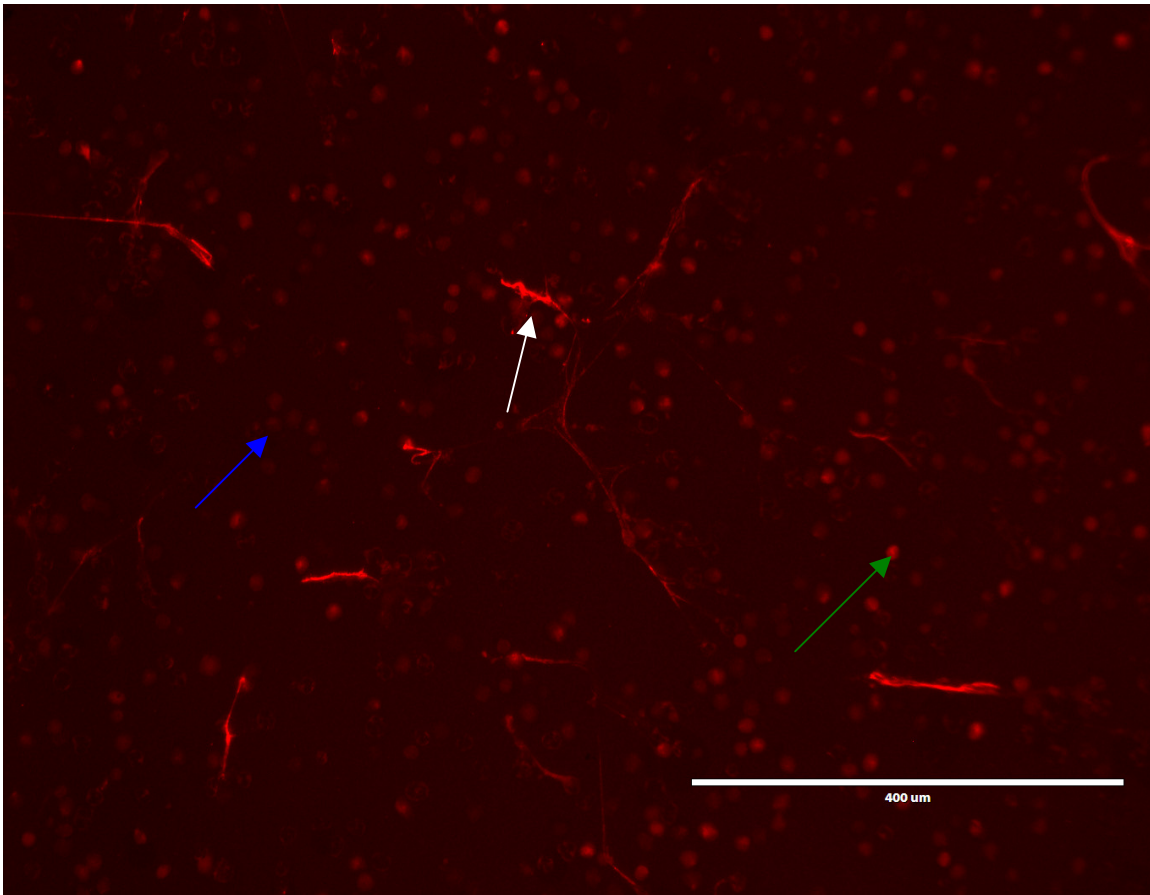


Abb. 7: Darstellung von CHIT-1 (rot) mittels Antikörper-Färbung. Zu sehen sind Zellen mit geringer CHIT-1 Konzentration (blauer Pfeil), mit hoher CHIT-1 Konzentration (grüner Pfeil) und extrazelluläre Strukturen mit hoher CHIT-1 Konzentration (weißer Pfeil).

Abbildung 7 zeigt die Fluoreszenzvisualisierung von CHIT-1. Es können unterschiedlich intensiv angefärbte Zellen erkannt werden, deren Farbintensität auf unterschiedlichen Gehalt an CHIT-1 schließen lässt. Einige Zellen sind nur blass angefärbt, andere leuchten intensiv rot. Neben den runden, zellulären Strukturen sind extrazelluläre Bereiche mit hoher CHIT-1 Konzentration zu sehen. Die länglichen, fädigen Strukturen verteilen sich über alle Bereiche der Abbildung.

Im selben Versuch wurde eine Darstellung der DNA durch Anfärbung mit Hoechst 33342 vorgenommen. Abbildung 8 zeigt eine Überlagerung der beiden Färbungen.

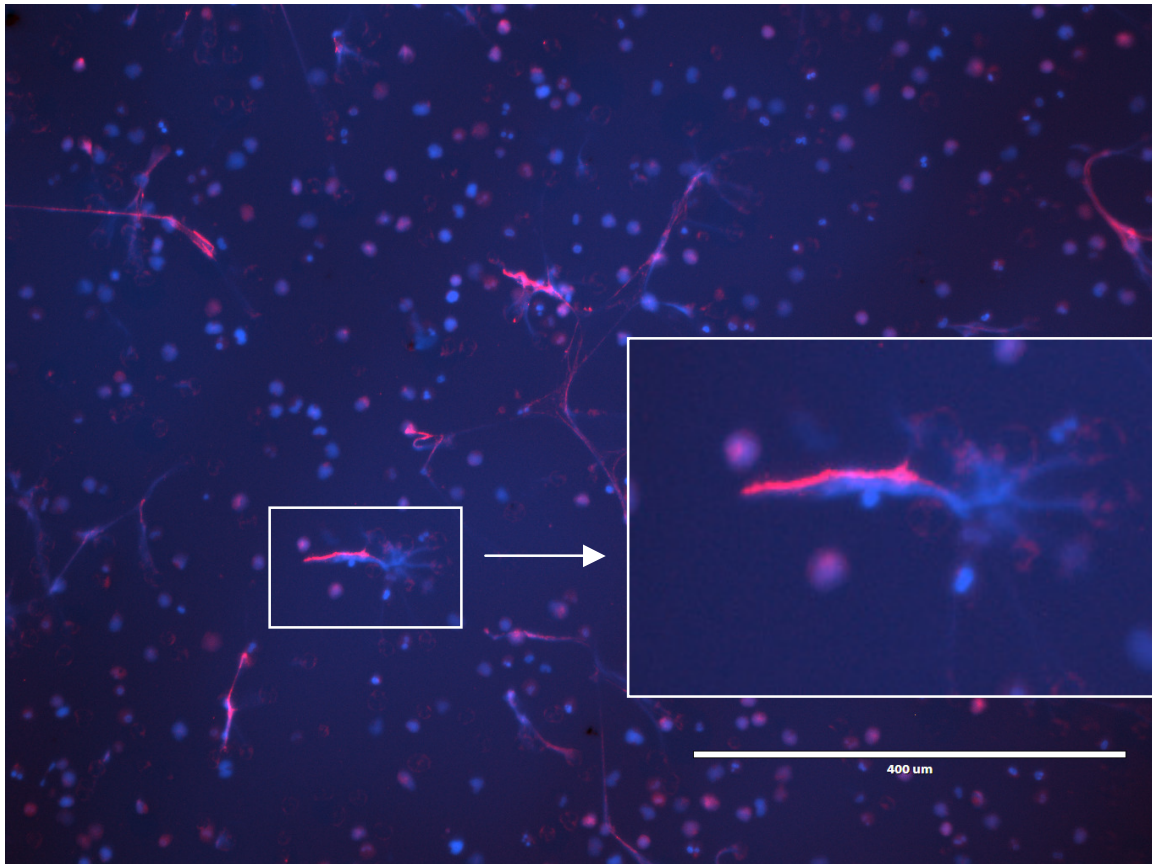


Abb. 8: Darstellung von CHIT-1 (rot) und DNA (blau) mittels Antikörper-Färbung, Vergrößerung eines Bildausschnittes. Hervorgehoben ist ein extrazellulärer Bereich mit hoher CHIT-1 Konzentration (rot) und hoher DNA-Konzentration (blau). Die Bereiche überlagern sich.

Es ist deutlich zu sehen, dass extrazelluläre Bereiche mit hoher CHIT-1 Konzentration und hoher DNA-Konzentration kolokalisiert sind.

4. Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren die Beobachtungen aus einer klinischen Studie, die als Risikofaktoren für die Entwicklung einer ABPA bzw. einer *Aspergillus fumigatus*-Besiedelung eine medikamentöse Therapie mit Azithromycin bzw. RhDNasen identifiziert haben. (Jubin *et al.*, 2010) Dabei wollten wir die Hypothese überprüfen, ob Azithromycin und RhDNase die Aktivität von Chitinasen aus Neutrophilen Granulozyten und deren NETs beeinflussen. Wir konnten dabei zeigen, dass eine erhöhte CHIT-1 Aktivität sowohl bei CF als auch bei Nicht-CF durch den unphysiologischen Stimulus PMA nachweisbar ist. Es gelang uns dabei, fünf Probanden als Nicht-Sekretierer zu klassifizieren. Unter Wirkstoffeinfluss zeigte sich kein Effekt bei Prednisolon, Azithromycin und Salbutamol auf die CHIT-1-Aktivität. Durch RhDNasen erreichten wir eine konzentrationsunabhängige Steigerung der gemessenen CHIT-1 Aktivität. Bildmorphologisch gelang uns die Visualisierung von CHIT-1 und DNA, wo sich eine Kolo-kalisierung zeigte.

Bei dem Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von typischer bei CF angewandter Medikation auf Neutrophile genauer zu untersuchen, standen vor allem antifungale Mechanismen, im Besonderen das Enzym CHIT-1 im Zentrum. Drei Schritte, die im Folgenden genauer diskutiert werden, wurden unternommen, um diesen Sachverhalt genauer aufzuschlüsseln.

- 1.) Schaffung idealer Versuchs- und Messbedingungen
- 2.) CHIT-1 Sekretion Neutrophiler ohne Einfluss von Medikamenten
- 3.) CHIT-1 Sekretion Neutrophiler unter Einfluss von CF Medikamenten

4.1 Schaffung bestmöglicher Versuchs- und Messbedingungen

Um die Fragestellung dieser Arbeit zu beantworten, musste als Voraussetzung für die Generierung aussagekräftiger Ergebnisse ein zuverlässiger Versuchsaufbau etabliert werden. Die Überlegungen zur Dauer der Zellkultur, die in Graphik 1 dargestellt wurden, basieren auf den Eigenschaften Neutrophiler. Die Lebensdauer Neutrophiler ist begrenzt, in der Zirkulation überleben sie bis zu 5,4 Tage. (Simon und Kim, 2010) Da die Neutrophilen in dem von uns verwendeten Probanden- bzw. Patientenmaterial ihrer physiologischen Umgebung entzogen sind, müssen wir von einer eher verkürzten Überlebenszeit ausgehen. Außerdem befinden sich unterschiedlich alte Neutrophile in den Materialien, so dass wir eine möglichst kurze Inkubationszeit wählten, um Effekte, die durch das Absterben von Neutrophilen entstehen, zu minimieren. Verschiedene Faktoren,

wie z.B. die Zelldichte oder die extrazelluläre Proteinkonzentration, haben Einfluss auf die neutrophile Apoptose in Zellkulturen. (Hannah *et al.*, 1998) Um die Einflüsse, die durch die unphysiologische Umgebung und apoptotische Zellen entstehen möglichst niedrig zu halten, wurde eine kurze Kulturdauer gewählt, die trotzdem ausreichend lange sein musste, um eine Reaktion der Zellen zu ermöglichen und gut detektierbar abzubilden.

4.1.1 Verminderung der Voraktivierung Neutrophiler

Neben der Lebensdauer war eine zweite Eigenschaft Neutrophiler bei der Versuchsplanung von entscheidender Bedeutung: Die Stimulierbarkeit der Zellen. Hierbei hatten wir verschiedene Ansprüche an die Versuche.

Erstens wünschten wir eine möglichst geringe Voraktivierung der Zellen. Wie in Tabelle 1 aufgezeigt, konnten wir bei Einwirkung von Lithium-Heparin eine deutlich niedrigere basale CHIT-1 Aktivität nachweisen als beim Zusatz von Citrat oder EDTA als gerinnungshemmende Medien. Zwei Ansätze sind denkbar, um diesen Unterschied zu erklären: Entweder Citrat und EDTA erhöhen die Aktivität der Neutrophilen und führen somit zu einer teilweisen vorzeitigen Aktivierung. Alternativ könnte auch Heparin die Basislevel durch eine hemmende Wirkung auf CHIT-1 erniedrigen. Da gezeigt werden konnte, dass Heparin die Freisetzung von Elastase aus Neutrophilen hemmt, ist die letztere Erklärung als wahrscheinlicher anzunehmen. (Brown *et al.*, 2003) Da niedrige CHIT-1 Basislevel wünschenswert waren, entschieden wir uns für Heparin bei allen weiteren Versuchen.

4.1.2 Möglichkeiten der Stimulation

Um den Unterschied von stimulierten zu unstimulierten Zellen deutlich herauszuarbeiten, testeten wir verschiedene Konzentrationen von PMA, das einen starken Stimulus Neutrophiler darstellt. (Hu *et al.*, 2011) Dargestellt ist dies in Graphik 2, aus der ersichtlich wird, dass die CHIT-1 Aktivität konzentrationsabhängig mit PMA gesteigert werden kann. Wir entschieden uns gegen die höchste getestete Dosis von 100nM, obwohl hierbei die größte Aktivität messbar war. Neben einem möglichst großen Unterschied von Stimulanz zu Vehikel war es unser Anliegen, die Modulationsfähigkeit mit der Stimulation zu erhalten. Die Stimulation sollte so gewählt werden, dass deutliche Effekte messbar sind, eine Modifikation durch weitere Faktoren aber möglich bleiben soll. Wird die Maximaldosis gewählt, so ist die Stimulation möglicherweise so stark, dass eine Modulation z.B. durch zugesetzte Medikamente nicht mehr sichtbar wird. Die Dosis von

PMA 10nM erfüllte am ehesten diese Kriterien und wurde für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Des Weiteren strebten wir den Einsatz eines physiologischen Stimulus an, zu denen PMA nicht zählt, da es in der Physiologie und Pathogenese beim Menschen keine bisher bekannte Rolle spielt. Hierfür testeten wir GM-CSF und IL-8 in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt ist GM-CSF in der höchsten getesteten Konzentration in Graphik 3. Sowohl für GM-CSF als auch für IL-8 konnte mehrfach gezeigt werden, dass sie Effekte auf Neutrophile ausüben, wie Chemotaxis, Phagozytose und Degranulation. (Fossati *et al.*, 1998; Gomez-Cambronero *et al.*, 2003; Kunkel *et al.*, 1991) Trotzdem konnten wir keine signifikanten Unterschiede in der CHIT-1 Sekretion bei Zugabe von GM-CSF oder IL-8 feststellen. Denkbar ist, dass die Tendenz zur Steigerung der Aktivität, die bei GM-CSF sichtbar ist, durch eine höhere Fallzahl besser herausgearbeitet werden hätte können. Möglich ist auch, dass die Effekte, die IL-8 und GM-CSF ausüben, sich nicht auf die CHIT-1 beziehen. CHIT-1 ist in den spezifischen Vesikeln der Neutrophilen gespeichert. Der Effekt von GM-CSF auf die Degranulation der spezifischen Vesikel wurde von Kaufman *et al.* untersucht. (Kaufman *et al.*, 1989) Er kommt zu dem Schluss, dass GM-CSF allein nur einen geringen Einfluss hat, während die Kombination mit anderen chemotaktischen Faktoren zu deutlicheren Effekten führt. Wir testeten ausschließlich GM-CSF allein. Ähnliches könnte für die postulierten Effekte von IL-8 auf die Degranulation spezifischer Vesikel gelten.

4.1.3 Aktivitätsmessungen

Zur Messung der CHIT-1 Aktivität entschieden wir uns die oben beschriebene kolometrische Messung aufgrund zu hoher Störanfälligkeit nicht durchzuführen. Die Kinetik der CHIT-1 (siehe Graphik 4, Tabelle 2) verlangte eine Inkubationszeit von 24 h, um mit der kolometrischen Messung eine ausreichende Detektierbarkeit gewährleisten zu können. Eine lange Inkubationszeit enthält mehrere potentielle Fehlerquellen. Beispielsweise könnten ein höherer Spontanzerfall oder die größere Gefahr von Verunreinigungen eine Rolle spielen. Zur Minimierung des Einflusses dieser Störfaktoren entschieden wir uns für eine andere Messmethode, die eine deutlich kürzere Inkubationszeit ermöglicht, da sie eine höhere Sensitivität aufweist und somit kleinere Mengen des verstoffwechselten Substrates anzeigen kann. Wir verwendeten die beschriebene fluoreszenzoptische Messung, die auch in der Literatur zur CHIT-1 Messung beschrieben ist. (van Eijk *et al.*, 2007)

4.2 CHIT-1 Aktivität bei stimulierten und unstimulierten Neutrophilen

Diese Überlegungen und Vorarbeiten zum Versuchsaufbau lieferten bereits erste Erkenntnisse über CHIT-1. Bevor das Verhalten des Enzyms unter Einfluss von Medikamenten diskutiert werden kann, sollen hier noch einige weitere Überlegungen zum Verhalten unter Bedingungen ohne Wirkstoffzusatz erfolgen.

Die Graphiken 5 und 6 zeigen, dass sowohl bei Nicht-CF als auch bei CF Patienten CHIT-1 mittels PMA zu einer signifikanten Aktivitätserhöhung stimuliert werden kann. Unterschiede zwischen Probanden- und Patientenproben zeigen sich z.B. bei Höhe des Anstiegs der CHIT-1 unter Stimulation, der bei CF Patienten deutlich größer ausfällt. Bei den Unterschieden, die zwischen CF und Nicht-CF auffallen, muss erwähnt werden, dass wir die Neutrophilen in unterschiedlichem Material zur Verfügung gestellt bekamen. Nicht-CF Proben wurden uns als Buffy Coat von der Transfusionsmedizin bereitgestellt. Die Zellen hatten bei Erhalt schon erste Verarbeitungsschritte erfahren, z.B. die Abtrennung von Plasmabestandteilen und Erythrozyten mittels Zentrifugation, sowie den Zusatz von gerinnungshemmenden Substanzen. Alle CF Proben gewannen wir als Vollblut durch Punktion einer peripheren Vene am Arm. Aufgrund dieser unterschiedlichen Beschaffung der Zellen war auch die Inkubationszeit in Lithium-Heparin unterschiedlich. Proben von CF Patienten wurden vom Zeitpunkt der Blutentnahme bis zum Beginn der Zellisolation in Lithium-Heparin inkubiert, was bis zu 4 Stunden dauern konnte. Nicht CF Proben wurden deutlich kürzer inkubiert, meist zwischen 10 und 20 Minuten. Ebenfalls unterschiedlich ist der Zeitraum der Probenentnahme und Versuchsdurchführung. Durch standardisierte Versuchsbedingungen wurde versucht, den Einfluss äußerlicher Faktoren, wie zum Beispiel Raumtemperatur möglichst gering zu halten. Aus organisatorischen Gründen war eine Angleichung der präanalytischen Bedingungen jedoch nicht möglich. Daher müssen die beobachteten Unterschiede zwischen CF-Patienten und Kontrollen in der Höhe des Anstiegs der CHIT-1 unter Stimulation mit Vorsicht interpretiert werden.

Die Varianz der Werte ist in beiden Gruppen hoch, besonders hoch jedoch bei den Nicht-CF Probanden. Ein Erklärungsansatz könnten hohe interindividuelle Unterschiede in der CHIT-1 Aktivität sein. Es ist bekannt, dass einige Enzyme beim Menschen teils extrem hohe interindividuelle Varianzen aufweisen. (Eaton *et al.*, 1995; Oesch *et al.*, 1980; Toide *et al.*, 2002) Wir widmeten uns mit weiteren Überlegungen der Varianz und begannen zunächst den außergewöhnlich hohen Werten mehr Aufmerksamkeit zu schenken. Mittels des Outlier Tests konnten wir bei Nicht-CF und bei CF Patienten jeweils eine Probe als

Ausreißer identifizieren (Graphik 7). Besonders auffällig ist die bereits sehr hohe Voraktivierung ohne PMA Stimulation, die diese Proben auszeichnet. Einerseits könnte dies durch das Individuum bedingt sein, indem es intraindividuell zu einer Aktivierung der antifungalen Mechanismen kam oder das Individuum durchgängig hohe Werte aufweist. Andererseits wäre denkbar, dass durch ein methodisches Problem, z.B. eine Verunreinigung die Neutrophilen-Aktivität deutlich angestiegen ist. Um Proben mit einer Voraktivierung frühzeitig zu identifizieren bzw. gegebenenfalls auszuschließen, führten wir zusätzlich die Messung des gegen CD62L gerichteten Antikörpers ein. Im Fluoreszenzkanal konnte so der Aktivierungsgrad einer Probe noch vor Beginn der Stimulationsversuche eingeschätzt werden.

Auch die auffällig niedrigen Aktivitätswerte von CHIT-1 fanden gesonderte Beachtung. Wie einleitend schon erwähnt, gibt es Nicht-Sekretierer für CHIT-1, die keine oder nur eine sehr geringe messbare CHIT-1 Aktivität aufweisen. Wir untersuchten also unsere Proben unter der Fragestellung, ob sich Nicht-Sekretierer unter den Getesteten befinden. Um einen Probanden als Nicht-Sekretierer zu klassifizieren, setzten wir voraus, dass sich durch PMA kein Anstieg oder ein Anstieg von weniger als 15% der CHIT-1 provozieren lässt. Insgesamt 5 Nicht-CF Probanden wurden als Nicht-Sekretierer eingruppiert, während wir bei den CF Patienten keinen Nicht-Sekretierer fanden. Einen Ausschluss der Nicht-Sekretierer zeigt Graphik 8. Zwar unternahmen wir eine genauere Betrachtung der Merkmale der Nicht-Sekretierer im Vergleich zu den Sekretierern (Geschlecht, Alter, BMI, Medikamenteneinnahme, Atemwegserkrankungen, Allergien, chronische Erkrankungen, Raucherstatus), jedoch sind diese Daten aufgrund der sehr geringen Fallzahl nur eingeschränkt verwendbar und lediglich deskriptiv dargestellt. Uns sind aus der Literatur keine Untersuchungen bekannt, in denen ähnliche Merkmale bei CHIT-1 Nicht-Sekretierern betrachtet wurden. In unserer Nicht-CF Population befindet sich ein Anteil von 12,5% Nicht-Sekretierern. Dieser Wert liegt mehr als doppelt so hoch wie der allgemein angenommene Prozentsatz von 6%. (Boot *et al.*, 1998b) Denkbar wäre als Erklärung hierfür eine möglicherweise geographisch unterschiedliche Verteilung bzw. regionale Segregation der Nicht-Sekretierer. Andererseits entspricht unsere Studienpopulation keinem Querschnitt der Allgemeinbevölkerung, ersichtlich beispielsweise an einem deutlich höheren Anteil männlicher Probanden. Ein methodisches Problem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, da für jeden Probanden nur eine Stimulationsreihe mit PMA vorliegt. Es kann aber als sehr unwahrscheinlich angesehen werden, da keine weiteren Faktoren hierfür sprechen.

Für im Bereich der Patientenversorgung tätige Ärzte stellt sich an dieser Stelle die Frage, inwiefern ein Nicht-Sekretierer-Status mit einer erhöhten Anfälligkeit für Pilzbefall und/oder ABPA einhergeht. In der Literatur finden wir die Vermutung, dass der beschriebene CHIT-1 Ausfall zu einer erhöhten Anfälligkeit für Pilzinfektionen führen könnte. (Masoud *et al.*, 2002) Es konnte allerdings nicht bestätigt werden, dass ein CHIT-1 Polymorphismus als pathologisch eingestuft werden kann. So konnte kein Zusammenhang zwischen CHIT-1 Polymorphismus und Asthma bronchiale aufgezeigt werden; für einen CHIT-1 Polymorphismus wurde eine Assoziation mit Langlebigkeit aufgedeckt. (Bierbaum *et al.*, 2006; Malaguarnera *et al.*, 2010)

Es gibt Daten, die der CHIT-1 eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Chitin-enthaltenden Pathogenen zuschreiben. Die niedrige Heterozygoten- und Homozygoteninzidenz in afrikanischen Individuen bei gleichzeitig hohem Aufkommen von parasitären Erkrankungen stützt diese These. Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangte eine Studie aus Indien, die einen Zusammenhang von fehlender CHIT-1 Plasmaaktivität und erhöhter Anfälligkeit für *Wucheria bancrofti* Infektionen herstellte. (Choi *et al.*, 2001; Malaguarnera, 2006) . Andererseits konnte eine kürzlich publizierte Studie zeigen, dass in der peruanisch indigenen Bevölkerung trotz hoher Chitin-Exposition eine hohe Prävalenz der Chitotriosidase-Defizienz vorliegt. (Manno *et al.*, 2014) Diese unterschiedlichen Ergebnisse zeigen, dass es weiterhin viele Unklarheiten bezüglich der Rolle der Chitotriosidase gibt bzw. lässt das Vorliegen von redundanten Mechanismen bei der chitinolytischen Funktion vermuten.

Da es keine eindeutigen Indizien dafür gibt, warum einige CF Patienten eine ABPA entwickeln und andere nicht, stellt sich die Frage, ob die CF Patienten, die mit einer CHIT-1 Defizienz leben, leichter anfällig für Pilzbefall sind. In unserem Patientenkollektiv befand sich ein Patient mit akuter ABPA-Exazerbation, bei dem die Blutentnahme für die Studie noch vor Beginn seiner systemischen Steroid-Therapie erfolgte. Interessanterweise konnten wir bei dieser Probe extrem hohe CHIT-1 Aktivitätswerte finden, was gegen eine Assoziation von CHIT-1 Defizienz und Anfälligkeit für ABPA spricht. Um diese Frage weiter zu klären, ist die Untersuchung weiterer Fälle notwendig.

4.3 Einfluss der CF-Medikation auf CHIT-1 Aktivität Neutrophiler

Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse über die CHIT-1 Stimulierbarkeit, voraktivierte Proben und Nicht-Sekretierer begannen wir uns der Fragestellung des Einflusses der CF-

Medikation auf die CHIT-1 Aktivität Neutrophiler durch Versuche mit Medikamenten in Neutrophilen-Kulturen anzunähern.

Die untersuchten Medikamente haben unterschiedliche Darreichungsformen und Wirkmechanismen zugrunde liegen. Corticosteroide werden oral oder als Inhalationslösung verabreicht und dienen in erster Linie der Bekämpfung der Entzündungsreaktion. Die inhalativen β -Sympathomimetika weiten die Atemwege und erleichtern so die Sauerstoffaufnahme. Antibiotika werden sowohl oral als auch in Form einer wiederkehrenden intravenösen Therapie verordnet. Besonders häufig kommen in der CF Therapie Makrolid-Antibiotika, allen voran Azithromycin zum Einsatz. Zusätzlich zu seinem antibakteriellen Effekt konnte für Azithromycin auch eine antiinflammatorische Wirkung gezeigt werden. (Labro *et al.*, 1993) RhDNasen werden ausschließlich inhalativ verabreicht. Ihr Wirkmechanismus beruht auf der Zerkleinerung von DNA und einer damit verbundenen Erleichterung der Schleim-Expektoration.

4.3.1 Kein Effekt von Prednisolon, Salbutamol, Azithromycin

Einfluss von Prednisolon auf Neutrophile

Wie die Graphen 8-11 zeigen, konnten wir keinen Einfluss von Prednisolon, Salbutamol und Azithromycin auf die CHIT-1 Aktivität der Neutrophilen finden. Auch wenn auf den ersten Blick die Graphiken 9A und 9B den Eindruck entstehen lassen, dass CF-Patienten unter PMA und Prednisolon eine höhere CHIT-1 Aktivität als Nicht-CF Probanden aufweisen, ist diese Annahme irreführend und der Darstellung als Ratios geschuldet. CF-Patienten haben trotz höherer Ratio-Werte eine kleinerer CHIT-1 Aktivität, wenn die Absolutwerte betrachtet werden. Die hohe Ratio kommt durch die niedrige Basalexpression zustande. Dies ist auch aus Graphik 7 und Tabelle 3 ersichtlich. Mögliche Gründe für den Unterschied in der Basalexpression zwischen CF und Nicht-CF wurden bereits weiter oben genannt.

Es gibt zahlreiche Studien, die Effekte von Glucocorticoiden, zu denen Prednisolon zählt, auf Neutrophile aufzeigen. Hierzu gehören eine Erniedrigung der Adhärenz (Clark *et al.*, 1979; Ebert und Barclay, 1952; MacGregor *et al.*, 1974), der Chemotaxis und der antibakteriellen Aktivität. (Olds *et al.*, 1974) Es muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass in vielen der *in vitro* Studien Corticosteroid-Konzentrationen verwendet werden, die höher sind, als die, die üblicherweise *in vivo* erreicht werden. (Ebert und Barclay, 1952; MacGregor *et al.*, 1974; Olds *et al.*, 1974) Daher stellt sich die Frage, ob möglicherweise der Einfluss von Prednisolon auf Neutrophile geringer als bisher

angenommen ist. Dass zumindest einige Zelltypen bei CF Patienten weniger sensitiv für eine Regulation durch Corticosteroide sind, konnten andere Arbeiten zeigen. (Ben-Ami *et al.*, 2010) Was die Neutrophilen Granulozyten angeht, konnte bei nicht übermäßig erhöhter Medikamentenkonzentration in *in vitro* Studien wenig oder kein Effekt von Corticosteroiden auf die neutrophile Migration gezeigt werden. (Majeski und Alexander, 1976; Mowat und Baum, 1971) Bei Clark zeigt sich nur wenig Effekt auf die *in vitro* neutrophile Chemotaxis durch Prednisolon. (Clark *et al.*, 1979)

Mit unseren Versuchen konnten wir keine Effekte von Prednisolon auf die CHIT-1 Aktivität im Überstand aus Neutrophilen-Kulturen nachweisen. Die von uns verwendete Konzentration kann als klinisch relevant angesehen werden, da sie einem Wert entspricht, der bei systemischer Therapie mit Prednisolon im Plasma gemessen werden kann. (Berghouse *et al.*, 1982) Da eine systemische Corticosteroid-Therapie bei Patienten mit CF eher in Ausnahmefällen verabreicht wird (Diagnose einer akuten ABPA), ist davon auszugehen, dass unter der häufigeren inhalativen Therapie geringere Konzentrationen von Prednisolon im Organismus verbleiben. Somit ist kaum anzunehmen, dass die von uns gewählte Konzentration als zu niedrig einzuschätzen ist.

Da gezeigt werden konnte, dass inhalative Corticosteroide die neutrophile Apoptose hemmen (Zhang *et al.*, 2001), könnte vermutet werden, dass die Neutrophilen durch die Anwendung von Prednisolon länger in den Atemwegen und somit auch im Lungengewebe von CF Patienten verbleiben. Abschließend bleibt weiterhin zu klären, welche Rolle Corticosteroide genau spielen, wenn es um Neutrophile geht und welchen Effekt sie auf die Funktion der Zellen ausüben.

Einfluss von Salbutamol auf Neutrophile

Unsere Daten zeigen ebenfalls keinen Effekt von Salbutamol auf die CHIT-1 Aktivität von Neutrophilen. Wie einleitend erwähnt, wurde ein antiinflammatorischer Effekt von Salbutamol nachgewiesen. (Bosmann *et al.*, 2012) Da Neutrophile die primäre Entzündungsreaktion maßgeblich mitbestimmen, wäre ein Effekt auf Neutrophile bzw. deren CHIT-1 Aktivität denkbar gewesen. Interessant ist der Unterschied bei der Verwendung von Salbutamol *in vitro* und *in vivo*, den Perkins beschrieben hat. Während er *in vitro* bei physiologischen Salbutamol Konzentrationen keinen Effekt auf die neutrophile Chemotaxis, Funktionsfähigkeit und Apoptose feststellen konnte, konnte er *in vivo* einen Anstieg der zirkulierenden Neutrophilen aufzeigen. Auch *in vivo* blieb allerdings ein Effekt auf die Aktivierung der Neutrophilen und auf die alveolären Neutrophilen aus. (Perkins *et*

al., 2007) Eine Inhibierung der neutrophilen Degranulation sowie der TNF α Freisetzung konnte ebenfalls in einer *in vivo* Studie gezeigt werden. (Maris *et al.*, 2005) Dass wir keinen messbaren Effekt von Salbutamol auf die CHIT-1 zeigen konnten, reiht sich an die Ergebnisse von Perkins, da wir ausschließlich *in vitro* testeten. Wir verwendeten Neutrophile aus peripherem Blut bzw. Blutbestandteilen, die keine spezifische Differenzierung zu lungenständigen Neutrophilen erfahren hatten. Möglicherweise ist dieser Schritt aber wichtig, um eine Reaktion der Neutrophilen aufzuzeigen. Andererseits könnte die Tatsache, dass die Neutrophilen erst nach mehreren Aufbereitungsschritten in der Zellkulturplatte der Salbutamol-Dosis ausgesetzt werden dazu führen, dass sich das Verhalten der Zellen ändert und unphysiologisch hohe Dosen notwendig wären, um einen Effekt aufzuzeigen.

Einfluss von Azithromycin auf Neutrophile

Zahlreiche Interaktionen von Azithromycin auf Neutrophile sind bereits bekannt. Eine Eigenschaft von Makrolid-Antibiotika ist die intrazelluläre Akkumulation in PMNs, also auch Neutrophilen. (Gladue *et al.*, 1989) Es ist folglich naheliegend, dass verschiedene zelluläre Funktionen durch Makrolid-Antibiotika modifiziert werden.

Beobachtet werden konnte eine initiale neutrophile Degranulation, die sich auf die azurophilen Granula bezog. (Culić *et al.*, 2002) CHIT-1 ist allerdings nicht in azurophilen, sondern in spezifischen Granula lokalisiert. (van Eijk *et al.*, 2005) Desweiteren inhibieren Makrolid-Antibiotika die Chemotaxis von Neutrophilen, sie reduzieren die Produktion chemotaktischer Faktoren wie IL-8 und LTB₄. (Tamaoki *et al.*, 2004; Verleden *et al.*, 2006) Ohne den genauen Mechanismus zu untersuchen, konnte die Studie von Jubin eine Langzeittherapie mit Azithromycin als Risikofaktor für eine Kolonisation mit *Aspergillus* identifizieren. (Jubin *et al.*, 2010)

Wir konnten mit unserem Versuchsaufbau keinen Effekt von Azithromycin auf Neutrophile nachweisen. Dies könnte daran liegen, dass die Dauer der Azithromycin Exposition einen entscheidenden Einfluss hat. (Levert *et al.*, 1998) In unserer Studie setzten wir die Neutrophilen einer einmaligen Dosis Azithromycin aus. Die Effekte einer Langzeittherapie mit resultierender Akkumulation des Medikaments können hiermit nicht ausreichend beurteilt werden. Viele CF Patienten werden im Laufe ihrer Krankheitsgeschichte ein- oder mehrmals mit Azithromycin behandelt. Auch in unserem Kollektiv unterlagen mehrere Patienten zum Zeitpunkt der Studie einer Therapie mit Azithromycin und es ist wahrscheinlich, dass auch ein Großteil der anderen Patienten

bereits Behandlungsphasen mit dem Antibiotikum hinter sich hat. Tendenziell sahen wir in unseren Daten bei CF Patienten niedrigere Level von CHIT-1. Ob dies durch einen Langzeiteinfluss von Azithromycin mitverursacht sein könnte, muss weiter untersucht werden.

4.3.2 Steigerung von CHIT-1 Aktivität durch RhDNase

Die Beobachtung eines signifikanten Anstiegs der CHIT-1 Aktivität unter Einwirkung von RhDNasen, wie Graphiken 12 und 13 zeigen, wirft die Frage auf, wodurch diese Erhöhung zustande kommt. Hierbei ist es hilfreich, sich zunächst den Wirkmechanismus von DNasen zu vergegenwärtigen. Hauptaufgabe von DNasen ist die Spaltung und Zersetzung von DNA. Die bereits beschriebenen NETs sind DNA-basierte extrazelluläre Strukturen, (Brinkmann *et al.*, 2004) und können folglich von DNasen degradiert werden. Dies konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden (Brinkmann *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2012) und könnte Teil eines endogenen Regulationsmechanismus sein, der dafür sorgt, dass bei Neutrophilen-Aktivierung die NET-Produktion nicht überschießt und körpereigenes Gewebe angreift. Der Endonuclease DNase I, die in verschiedenen Körperflüssigkeiten gefunden werden kann, wird unter anderem diese Aufgabe zugesprochen. Noch interessanter ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit, dass Bakterien DNasen produzieren, die NETs angreifen, um somit einem Teil der gegen sie gerichteten Immunabwehr zu entgehen. (Beiter *et al.*, 2006; Buchanan *et al.*, 2006) Da NETs zahlreiche antimikrobielle Substanzen enthalten (Papayannopoulos und Zychlinsky, 2009), liegt die Vermutung nahe, dass auch CHIT-1 in relevanter Menge in NETs gefunden werden kann, die dann möglicherweise durch RhDNase freigesetzt werden kann. Um diesen Sachverhalt zu klären, erfolgten weitere Schritte: Zunächst eine Visualisierung von DNA in einer Kultur mit stimulierten Neutrophilen, dann eine Visualisierung von CHIT-1. Die Überlagerung der Bilder zeigt eine Kolo-kalisation von DNA und CHIT-1, zu sehen in Abbildungen 7 und 8.

Folglich gibt es neben der sekretierten CHIT-1, noch CHIT-1, die in NETs enthalten ist. Diese NETs gebundene CHIT-1 bleibt normalerweise bei Stimulation in den NETs enthalten. Werden die NETs allerdings durch DNasen zerstört, wird auch das zusätzliche Enzym frei. Im Überstand ist also mehr Enzymaktivität nachweisbar, die Messung ergibt höhere Werte.

Im Rahmen der getesteten Verdünnungsstufen von RhDNase (Graphik 14) konnten wir keine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes sehen. Möglicherweise lässt dies auf einen

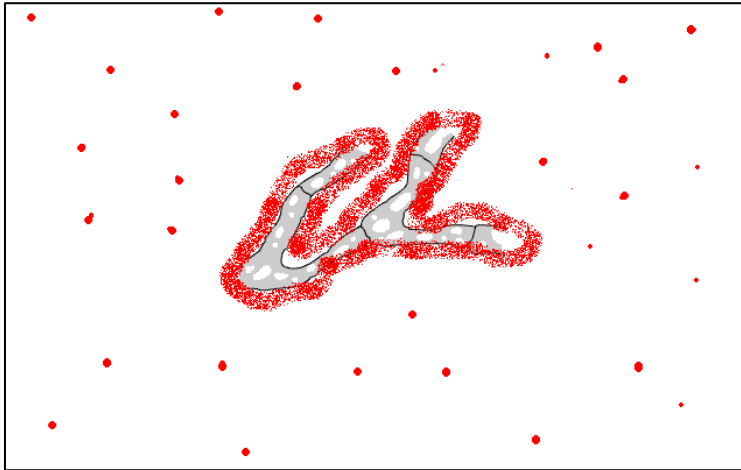
starken Effekt von RhDNase schließen bzw. waren die gewählten Konzentrationsstufen immer noch ausreichend hoch, um die Wirkung abzubilden.

4.3.3 Überlegungen zur lokalen CHIT-1 Konzentration

Interessant erscheint es nun, die Frage zu klären, wie eine möglicherweise reduzierte antifungale Kapazität erklärt werden kann, wie sie laut der Studie von Jubin bei Gabe von RhDNasen beobachtet worden ist.

Hierzu sind einige Überlegungen zur lokalen CHIT-1 Konzentration hilfreich. Betrachten wir das Mikrokompartiment der Pilzhyphe bei intakten NETs: Wie einleitend aufgezeigt, ist eine Funktion der NETs eine Kompartimentierung zu schaffen und somit extrem hohe Konzentrationen der antimikrobiellen Enzyme zu erreichen. (Papayannopoulos und Zychlinsky, 2009) Sind die NETs intakt, so können hohe Konzentrationen von CHIT-1 und anderen antimikrobiellen Proteinen in größtmöglicher räumlicher Nähe zur Pilzhyphe wirken. In der Umgebung wirksam ist der Anteil der CHIT-1, der von aktivierten Neutrophilen sekretiert wurde, also Neutrophile, die nicht den Schritt der finalen NETs-Produktion begangen haben. Im Überstand messbar ist lediglich dieser Anteil der CHIT-1. Wird nun RhDNase dazu gegeben, so werden die NETs-Strukturen degradiert, da sie auf DNA basieren. In den NETs enthaltene CHIT-1 wird in die Umgebung freigesetzt. Im Überstand messbar ist also neben der sekretierten CHIT-1 zusätzlich der Enzymanteil, der in den NETs enthalten war.

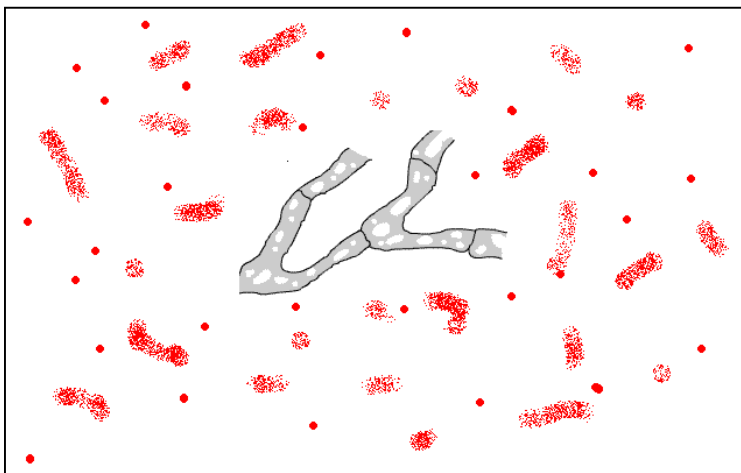
Betrachten wir in diesem Szenario allerdings das Mikrokompartiment der Pilzhyphe, so fehlt hier die lokale NETs-gebundene antimikrobielle Aktivität. Das Mikrokompartiment ist zerstört, es erfolgt keine Konzentration der antifungalen Stoffe. Möglicherweise reicht die Konzentration der Umgebungs-CHIT-1 allerdings nicht aus, um das weitere Wachstum der Pilzhyphe zu verhindern und es kommt somit leichter zu Ausbreitung und Wachstum des Pilzes. Graphisch dargestellt ist dieser Sachverhalt in den Graphiken 15 und 16.



Graphik 15: Pilzhyphe (grau) umgeben von NETs gebundener CHIT-1 (rot). In der Umgebung befindet sich sekretierte CHIT-1 (rote Punkte).

Die lokale CHIT-1-Konzentration um die Hyphe ist sehr hoch.

Bei Zugabe von DNasen entsteht folgendes Szenario:



Graphik 16: Freisetzung der NETs gebundenen CHIT-1.

Die Umgebungs-Konzentration steigt, während die lokale Konzentration um die Hyphe sinkt.

Nur am Rande soll darauf hingewiesen werden, dass die CHIT-1 Aktivität vermutlich auch bei anderen pulmonalen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Es ist bekannt, dass die CHIT-1 Aktivität bei allergischem Asthma erhöht ist und somit möglicherweise zum fibrotischen Umbau der Atemwege beiträgt. (Gavala *et al.*, 2013) In gleicher Studie von Gavala *et al.* korrelierte die CHIT-1 Aktivität positiv mit der Zahl der Neutrophilen in der bronchoalveolären Lavage nach Stimulation. Möglicherweise könnte sich zukünftig die CHIT-1 Aktivität im Sputum oder der bronchoalveolären Lavage als Marker für eine neutrophile Inflammation eignen. Interessanterweise wurden 2013 aber auch Daten publiziert, die postulieren, dass CHIT-1 als Biomarker für die Erholung nach einer akuten Lungenschädigung dient. (Cho *et al.*, 2013)

Weiteren Studien bleibt vorbehalten, diesen potentiellen klinischen Nutzen zu verifizieren.

4.4 Limitationen der Arbeit und mögliche Fehlerquellen

Im Folgenden sollen mögliche Limitationen und Fehlerquellen der vorliegenden Studie diskutiert werden.

Alle Daten wurden aus Zellkulturen und Aktivitätsmessungen von Neutrophilen generiert, die aus dem peripheren Blut gewonnen worden sind. Neutrophile, die in pulmonale Prozesse involviert sind, nehmen normalerweise nicht mehr an der Zirkulation teil, sondern sind aus dem Blutgefäßsystem ins Gewebe emigriert, um dort für spezifischere Aufgaben zur Verfügung zu stehen. Der damit verbundene Differenzierungsprozess ist ein wichtiger Schritt und hat Einfluss auf Verhalten und Reagibilität der Neutrophilen. Pulmonale Neutrophile unterscheiden sich z.B. durch verminderte Verformbarkeit, erhöhte Expression und Aktivierung von oberflächlichen Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen und erhöhter Freisetzung löslicher Mediatoren. (Brown *et al.*, 1995; Doerschuk, 2001) Es ist nicht auszuschließen, dass Neutrophile, die keine Gewebemigration und weitere Differenzierung erfahren haben, anders reagieren als gewebeständige Zellen. Neutrophile aus anderem Material als Blut zu gewinnen ist meist schwierig und aufwändig. Wir entschieden uns deshalb trotz möglicher Einschränkungen mit der von uns gewählten Herangehensweise die Problemstellung näher zu beleuchten.

Ebenfalls unberücksichtigt durch die vorliegende Arbeit bleiben Kombinationen von CF Medikamenten. Praktisch jeder therapierte CF Patient unterliegt einer Therapie mit mehreren Medikamenten, nicht selten werden zwei, manchmal sogar drei oder alle vier der hier getesteten Medikamente gleichzeitig neben weiteren Therapeutika eingenommen. Möglicherweise wird durch die Kombination der Medikamente ein anderer oder synergistischer Effekt auf Neutrophile beobachtet. Ein nächster Schritt könnte die Erprobung von Medikamenten-Kombinationen in ähnlichem Versuchsaufbau sein.

Daneben gibt es weitere Versuche, die helfen könnten, die vorliegenden Daten zu erhärten. Als logischer nächster Schritt müssten funktionelle Assays angeschlossen werden. Versuche mit Aspergillus Kulturen, deren Wachstumsverhalten unter β -Salbutamol, Prednisolon, Azithromycin und RhdNase getestet wird, wären ein Beispiel hierfür. Alle durchgeführten und weiteren vorgeschlagenen Versuche sind ausschließlich *in vitro* Studien. Diese Annäherung an die physiologischen und pathologischen Verhältnisse gehört zu den gängigen Arbeitstechniken. Trotzdem soll hier noch einmal betont werden, dass es

sich lediglich um eine Annäherung handelt. Die tatsächlichen *in vivo* Verhältnisse zu beurteilen bleibt zukünftigen Projekten überlassen.

4.5 Ausblick: Zukünftig möglicherweise Einschränkungen in der Verwendung von RhDNasen

Zuletzt soll diskutiert werden, welche Relevanz und Konsequenzen die Daten der vorliegenden Arbeit für CF Patienten in Zukunft haben könnten. Es soll betont werden, dass dies lediglich ein Ausblick auf eine mögliche Bedeutung ist, die wissenschaftliche Erhärtung dieser Schlussfolgerungen aber noch weitere Daten braucht.

Die bei Jubin gezeigte Assoziation von RhDNase Therapie mit ABPA und die von uns dargestellten Mechanismen von CHIT-1 und Neutrophilen könnten bedeuten, dass RhDNasen die antifungale Kapazität von Neutrophilen stören und somit zu einer erhöhten Anfälligkeit für Vorfälle mit Pilzen (im Wesentlichen AC und ABPA) führen könnten. Dies könnte also eine bisher noch nicht beschriebene Nebenwirkung von RhDNasen sein, die mit weiteren Versuchen bestätigt werden müsste. In diesem Fall müsste der Einsatz von RhDNasen neu überdacht werden und kritischer geschehen. Denkbar wäre es zum Beispiel, dass Patienten mit Risiko oder bereits ausgebrochener ABPA eine Therapie mit RhDNasen vorenthalten wird bzw. bei Einsatz von RhDNasen gleichzeitig Maßnahmen zur Pilzabwehr getroffen werden. Ein Beispiel hierfür wäre die Kombination mit einem antifungalen Medikament. Ein erster Schritt könnte zunächst darin bestehen, im Rahmen einer prospektiven Datenerhebung die Sicherheit von RhDNase bei Patienten mit CF langfristig zu untersuchen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Cystische Fibrose (CF) ist eine Stoffwechselerkrankung, bei der es als pilzassoziierte Komplikation zur Allergischen Bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) kommen kann. Essentiell in der antifungalen Abwehr sind die Neutrophilen Granulozyten durch a) die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), b) die Freisetzung von Enzymen (z.B. Chitinasen, insbesondere Chitotriosidase (CHIT-1)) aus spezifischen Granula und c) die Bildung von sogenannten neutrophilen extrazellulären Fallen (neutrophil extracellular traps, NETs). Diese extrazellulären DNA-Fäden sind mit antimikrobiellen Proteinen behaftet und können Mikrokompartimente bilden.

Es gibt verschiedene Einflüsse der bei CF eingesetzten Pharmaka auf Neutrophile. Für Corticosteroide, Makrolide und β_2 -Sympathomimetika sind antiinflammatorische bzw. immunmodulatorische Effekte bekannt. Über das Enzym DNase, das als mukolytische Therapie in Form von Inhalationen bei CF-Patienten als RhDNase (Rekombinante humane DNasen, Pulmozyme[®]) ist bisher von keinem spezifischen Effekt auf Neutrophile berichtet worden.

In einer klinischen Studie wurde ein Zusammenhang zwischen einer Sensibilisierung mit *Aspergillus fumigatus* bzw. einer ABPA und Therapie mit Azithromycin und RhDNase beschrieben. Die Hypothese dieser Arbeit lautet, dass die medikamentöse Therapie bei CF, insbesondere Azithromycin und RhDNase einen Einfluss auf die CHIT-1 Aktivität und NETs-Bildung von Neutrophilen hat. Wir beschäftigten uns mit der Stimulierbarkeit der neutrophilen Chitinase-Aktivität, dem Einfluss von CF typischer Medikation und synergistischen Effekten von Chitinasen und NETs.

Methodisch isolierten wir Neutrophile mittels Dichtegradientenzentrifugation. Nach Kultivierung mit verschiedenen Stimulanzien und Wirkstoffen ernteten wir Zellkulturüberstände, die wir einer Aktivitätsmessung unterzogen. Eine Visualisierung von DNA und CHIT-1 gelang mittels Antikörperfärbung.

Wir konnten eine Stimulierbarkeit der CHIT-1 sowohl bei CF als auch bei Nicht-CF durch PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetat) erreichen. Fünf Probanden (=12,5%) konnten als Nicht-Sekretierer klassifiziert werden. Kein Effekt zeigte sich bei Prednisolon, Azithromycin und Salbutamol auf die CHIT-1. Durch RhDNasen erreichten wir eine Steigerung der CHIT-1 Aktivität. Bildmorphologisch gelang uns die Visualisierung von CHIT-1 und DNA, wo sich eine Kolokalisierung zeigte.

Die Aktivitätserhöhung durch RhDNasen in Verbindung mit der gefundenen Kolokalisation von DNA und CHIT-1 lässt auf das Vorhandensein von CHIT-1 in NETs schließen, die durch RhDNasen freigesetzt und detektiert werden kann. Durch Störung der NETs-basierten Kompartimente ist eine verminderte antifungale Abwehr denkbar.

Als klinische Konsequenz könnte sich hieraus ein anderer Umgang mit RhDNasen ergeben. Ein verminderter Einsatz bei gefährdeten Patienten oder eine gleichzeitige Verordnung einer antifungalen Medikation wären denkbar.

6. Literaturverzeichnis

- Aguilera, B., Ghauharali-Van Der Vlugt, K., Helmond, M.T.J., Out, J.M.M., Donker-Koopman, W.E., Groener, J.E.M., Boot, R.G., Renkema, G.H., Van Der Marel, G.A., Van Boom, J.H., *et al.* (2003). Transglycosidase Activity of Chitotriosidase IMPROVED ENZYMATIC ASSAY FOR THE HUMAN MACROPHAGE CHITINASE. *J. Biol. Chem.* 278, 40911–40916.
- Balloy, V., and Chignard, M. (2009). The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 11, 919–927.
- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., and Henriques-Normark, B. (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol. CB* 16, 401–407.
- Ben-Ami, R., Lewis, R.E., and Kontoyiannis, D.P. (2010). Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *Br. J. Haematol.* 150, 406–417.
- Berghouse, L.M., Elliott, P.R., Lennard-Jones, J.E., English, J., and Marks, V. (1982). Plasma prednisolone levels during intravenous therapy in acute colitis. *Gut* 23, 980–983.
- Bierbaum, S., Superti-Furga, A., and Heinzmann, A. (2006). Genetic polymorphisms of chitotriosidase in Caucasian children with bronchial asthma. *Int. J. Immunogenet.* 33, 201–204.
- Bonnett, C.R., Cornish, E.J., Harmsen, A.G., and Burritt, J.B. (2006). Early Neutrophil Recruitment and Aggregation in the Murine Lung Inhibit Germination of *Aspergillus Fumigatus* Conidia. *Infect. Immun.* 74, 6528–6539.
- Boot, R.G., Renkema, G.H., Verhoek, M., Strijland, A., Blik, J., De Meulemeester, T.M.A.M.O., Mannens, M.M.A.M., and Aerts, J.M.F.G. (1998a). The Human Chitotriosidase Gene NATURE OF INHERITED ENZYME DEFICIENCY. *J. Biol. Chem.* 273, 25680–25685.
- Boot, R.G., Renkema, G.H., Verhoek, M., Strijland, A., Blik, J., Meulemeester, T.M.A.M.O. de, Mannens, M.M.A.M., and Aerts, J.M.F.G. (1998b). The Human Chitotriosidase Gene NATURE OF INHERITED ENZYME DEFICIENCY. *J. Biol. Chem.* 273, 25680–25685.
- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Bastholm, L., Nielsen, M.H., and Bainton, D.F. (1993). Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol.* 51, 187–198.
- Bosmann, M., Grailer, J.J., Zhu, K., Matthay, M.A., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., and Ward, P.A. (2012). Anti-inflammatory effects of α_2 adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury. *FASEB J.* 26, 2137–2144.
- Brakhage, A.A. (2005). Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Curr. Drug Targets* 6, 875–886.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.
- Brown, D.M., Drost, E., Donaldson, K., and MacNee, W. (1995). Deformability and CD11/CD18 expression of sequestered neutrophils in normal and inflamed lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13, 531–539.
- Brown, R.A., Lever, R., Jones, N.A., and Page, C.P. (2003). Effects of heparin and related molecules upon neutrophil aggregation and elastase release in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 139, 845–853.
- Buchanan, J.T., Simpson, A.J., Aziz, R.K., Liu, G.Y., Kristian, S.A., Kotb, M., Feramisco, J., and Nizet, V. (2006). DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol. CB* 16, 396–400.

- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., und Nishizuka, Y. (1982). Direct Activation of Calcium-Activated, Phospholipid-Dependent Protein Kinase by Tumor-Promoting Phorbol Esters. *J. Biol. Chem.* *257*, 7847–7851.
- Chmiel, J., Berger, M., und Konstan, M. (2002). The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *23*, 5–27.
- Cho, S.J., Nolan, A., Echevarria, G.C., Kwon, S., Naveed, B., Schenck, E., Tsukiji, J., Prezant, D.J., Rom, W.N., und Weiden, M.D. (2013). Chitotriosidase is a Biomarker for the Resistance to World Trade Center Lung Injury in New York City Firefighters. *J. Clin. Immunol.* *33*, 1134–1142.
- Choi, E.H., Zimmerman, P.A., Foster, C.B., Zhu, S., Kumaraswami, V., Nutman, T.B., und Chanock, S.J. (2001). Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun.* *2*, 248–253.
- Duo-Chuan, L.I., Chen, S., und Jing, L.U. (2005). Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia* *159*, 223–229.
- Clark, R.A., Gallin, J.I., und Fauci, A.S. (1979). Effects of in vivo prednisone on in vitro eosinophil and neutrophil adherence and chemotaxis. *Blood* *53*, 633–641.
- Cox, G. (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 4719–4725.
- Culić, O., Eraković, V., Cepelak, I., Barisić, K., Brajsa, K., Ferencić, Z., Galović, R., Glojnarčić, I., Manojlović, Z., Munić, V., *et al.* (2002). Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur. J. Pharmacol.* *450*, 277–289.
- Denning, D.W. (1998). Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *26*, 781–803; quiz 804–805.
- Doerschuk, C.M. (2001). Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirc. N. Y. N* *1994* *8*, 71–88.
- Eaton, D.L., Gallagher, E.P., Bammler, T.K., und Kunze, K.L. (1995). Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* *5*, 259–274.
- EBERT, R.H., und BARCLAY, W.R. (1952). [Changes in connective tissue reaction induced by cortisone]. *Ann. Intern. Med.* *37*, 506–518.
- Van Eijk, M., van Roomen, C.P.A.A., Renkema, G.H., Bussink, A.P., Andrews, L., Blommaart, E.F.C., Sugar, A., Verhoeven, A.J., Boot, R.G., und Aerts, J.M.F.G. (2005). Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int. Immunol.* *17*, 1505–1512.
- Van Eijk, M., Scheij, S.S., van Roomen, C.P.A.A., Speijer, D., Boot, R.G., und Aerts, J.M.F.G. (2007). TLR- and NOD2-dependent regulation of human phagocyte-specific chitotriosidase. *FEBS Lett.* *581*, 5389–5395.
- Elborn, J.S., Shale, D.J., und Britton, J.R. (1991). Cystic fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. *Thorax* *46*, 881–885.
- Farrell, P.M. (2008). The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* *7*, 450–453.
- Flierl, M.A., Rittirsch, D., Nadeau, B.A., Chen, A.J., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., McGuire, S.R., List, R.P., Day, D.E., Hoesel, L.M., *et al.* (2007). Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* *449*, 721–725.
- Fossati, G., Mazzucchelli, I., Gritti, D., Ricevuti, G., Edwards, S.W., Moulding, D.A., und Rossi, M.L. (1998). In vitro effects of GM-CSF on mature peripheral blood neutrophils. *Int. J. Mol. Med.* *1*, 943–951.

- Gao, Y., Flori, L., Lecardonnel, J., Esquerré, D., Hu, Z.-L., Teillaud, A., Lemonnier, G., Lefèvre, F., Oswald, I.P., and Rogel-Gaillard, C. (2010). Transcriptome analysis of porcine PBMCs after in vitro stimulation by LPS or PMA/ionomycin using an expression array targeting the pig immune response. *BMC Genomics* *11*, 292.
- Gavala, M.L., Kelly, E.A.B., Esnault, S., Kukreja, S., Evans, M.D., Bertics, P.J., Chupp, G.L., and Jarjour, N.N. (2013). Segmental allergen challenge enhances chitinase activity and levels of CCL18 in mild atopic asthma. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *43*, 187–197.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., and Samson, R.A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* *59*, 1–10.
- Gladue, R.P., Bright, G.M., Isaacson, R.E., and Newborg, M.F. (1989). In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* *33*, 277–282.
- Gomez-Cambronero, J., Horn, J., Paul, C.C., and Baumann, M.A. (2003). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is a Chemoattractant Cytokine for Human Neutrophils: Involvement of the Ribosomal p70 S6 Kinase Signaling Pathway. *J. Immunol.* *171*, 6846–6855.
- Gozelanny, C., Pöppelmann, B., Pappelbaum, K., Moerschbacher, B.M., and Schneider, S.W. (2010). Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation. *Biomaterials* *31*, 8556–8563.
- Greenberger, P.A. (2003). Clinical aspects of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *8*, s119–s127.
- Hannah, S., Nadra, I., Dransfield, I., Pryde, J.G., Rossi, A.G., and Haslett, C. (1998). Constitutive neutrophil apoptosis in culture is modulated by cell density independently of $\beta 2$ integrin-mediated adhesion. *FEBS Lett.* *421*, 141–146.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., and Denning, D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* *153*, 1677–1692.
- Hirsch, J.G. (1958). BACTERICIDAL ACTION OF HISTONE. *J. Exp. Med.* *108*, 925–944.
- Hong, S.L., and Levine, L. (1976). Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of anti-inflammatory corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 1730–1734.
- Hu, T., Liu, Z., and Shen, X. (2011). Roles of phospholipase D in phorbol myristate acetate-stimulated neutrophil respiratory burst. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 647–653.
- Jubin, V., Ranque, S., Stremmer Le Bel, N., Sarles, J., and Dubus, J.-C. (2010). Risk factors for *Aspergillus* colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* *45*, 764–771.
- Kadir, T., Izzetin, F.V., Cevikbaş, A., Johansson, C.B., and Clark, P. (2000). In vitro effects of clarithromycin on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Chemotherapy* *46*, 198–203.
- Kaufman, S.E., DiPersio, J.F., and Gasson, J.C. (1989). Effects of human GM-CSF on neutrophil degranulation in vitro. *Exp. Hematol.* *17*, 800–804.
- Kaynar, A.M., and Shapiro, S.D. (2010). NET loss of air in cystic fibrosis. *Nat. Med.* *16*, 967–969.
- Kraemer, R., Deloséa, N., Ballinari, P., Gallati, S., and Cramer, R. (2006). Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on lung function in children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *174*, 1211–1220.
- Kunkel, S.L., Standiford, T., Kasahara, K., and Strieter, R.M. (1991). Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp. Lung Res.* *17*, 17–23.

- Labro, M.T., el Benna, J., und Abdelghaffar, H. (1993). Modulation of human polymorphonuclear neutrophil function by macrolides: preliminary data concerning dirithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* *31 Suppl C*, 51–64.
- Levert, H., Gressier, B., Moutard, I., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Cazin, M., und Cazin, J.C. (1998). Azithromycin impact on neutrophil oxidative metabolism depends on exposure time. *Inflammation* *22*, 191–201.
- Levitz, S.M., und Farrell, T.P. (1990). Human neutrophil degranulation stimulated by *Aspergillus fumigatus*. *J. Leukoc. Biol.* *47*, 170–175.
- Levitz, S.M., Selsted, M.E., Ganz, T., Lehrer, R.I., und Diamond, R.D. (1986). In vitro killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. *J. Infect. Dis.* *154*, 483–489.
- Littlewood, J.M. (1992). Gastrointestinal complications. *Br. Med. Bull.* *48*, 847–859.
- MacGregor, R.R., Spagnuolo, P.J., und Lentnek, A.L. (1974). Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone, and aspirin, measured with an assay system. *N. Engl. J. Med.* *291*, 642–646.
- Madan, T., Kishore, U., Singh, M., Strong, P., Hussain, E.M., Reid, K.B., und Sarma, P.U. (2001). Protective role of lung surfactant protein D in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* *69*, 2728–2731.
- Majeski, J.A., und Alexander, J.W. (1976). The steroid effect on the in vitro human neutrophil chemotactic response. *J. Surg. Res.* *21*, 265–268.
- Malaguarnera, L. (2006). Chitotriosidase: the yin and yang. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 3018–3029.
- Malaguarnera, L., Ohazuruike, L.N., Tsianaka, C., Antic, T., Di Rosa, M., und Malaguarnera, M. (2010). Human chitotriosidase polymorphism is associated with human longevity in Mediterranean nonagenarians and centenarians. *J. Hum. Genet.* *55*, 8–12.
- Manno, N., Sherratt, S., Boaretto, F., Coico, F.M., Camus, C.E., Campos, C.J., Musumeci, S., Battisti, A., Quinell, R.J., León, J.M., *et al.* (2014). High prevalence of chitotriosidase deficiency in Peruvian Amerindians exposed to chitin-bearing food and enteroparasites. *Carbohydr. Polym.* *113*, 607–614.
- Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A.O., Bohla, A., Hector, A., Vitkov, L., Wiedenbauer, E.-M., Krautgartner, W.D., Stoiber, W., Belohradsky, B.H., *et al.* (2010). CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat. Med.* *16*, 1018–1023.
- Maris, N.A., de Vos, A.F., Dessing, M.C., Spek, C.A., Lutter, R., Jansen, H.M., van der Zee, J.S., Bresser, P., und van der Poll, T. (2005). Antiinflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *172*, 878–884.
- Masoud, M., Rudensky, B., Elstein, D., und Zimran, A. (2002). Chitotriosidase deficiency in survivors of *Candida* sepsis. *Blood Cells. Mol. Dis.* *29*, 116–118.
- Mastella, G., Rainisio, M., Harms, H.K., Hodson, M.E., Koch, C., Navarro, J., Strandvik, B., und McKenzie, S.G. (2000). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *16*, 464–471.
- Meng, W., Paniel-Görgülü, A., Flohé, S., Witte, I., Schädel-Höpfner, M., Windolf, J., und Lögters, T.T. (2012). Deoxyribonuclease Is a Potential Counter Regulator of Aberrant Neutrophil Extracellular Traps Formation after Major Trauma. *Mediators Inflamm.* *2012*.
- Mowat, A.G., und Baum, J. (1971). Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* *50*, 2541–2549.

Oesch, F., Schmassmann, H., Ohnhaus, E., Althaus, U., und Lorenz, J. (1980). Monooxygenase, epoxide hydrolase, and glutathione-S-transferase activities in human lung. Variation between groups of bronchogenic carcinoma and non-cancer patients and interindividual differences. *Carcinogenesis* 1, 827–835.

Olds, J.W., Reed, W.P., Eberle, B., und Kisch, A.L. (1974). Corticosteroids, Serum, and Phagocytosis: In Vitro and In Vivo Studies. *Infect. Immun.* 9, 524–529.

Papayannopoulos, V., und Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30, 513–521.

Paul, K., Rietschel, E., Ballmann, M., Griese, M., Worlitzsch, D., Shute, J., Chen, C., Schink, T., Döring, G., van Koningsbruggen, S., *et al.* (2004). Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 719–725.

Perfect, J.R., Cox, G.M., Lee, J.Y., Kauffman, C.A., de Repentigny, L., Chapman, S.W., Morrison, V.A., Pappas, P., Hiemenz, J.W., und Stevens, D.A. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 33, 1824–1833.

Perkins, G.D., Nathani, N., McAuley, D.F., Gao, F., und Thickett, D.R. (2007). In vitro and in vivo effects of salbutamol on neutrophil function in acute lung injury. *Thorax* 62, 36–42.

Philippe, B., Ibrahim-Granet, O., Prévost, M.C., Gougerot-Pocidallo, M.A., Sanchez Perez, M., Van Der Meeren, A., und Latgé, J.P. (2003). Killing of *Aspergillus Fumigatus* by Alveolar Macrophages Is Mediated by Reactive Oxidant Intermediates. *Infect. Immun.* 71, 3034–3042.

Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., und Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625–627.

Prasad, R., Garg, R., Sanjay, und Shukla, A.D. (2009). Allergic bronchopulmonary aspergillosis: A review of 42 patients from a tertiary care center in India. *Lung India Off. Organ Indian Chest Soc.* 26, 38–40.

Ramsey, B.W., Davies, J., McElvaney, N.G., Tullis, E., Bell, S.C., Drevinek, P., Griese, M., McKone, E.F., Wainwright, C.E., Konstan, M.W., *et al.* (2011). A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *N. Engl. J. Med.* 365, 1663–1672.

Rex, J.H., Bennett, J.E., Gallin, J.I., Malech, H.L., und Melnick, D.A. (1990). Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J. Infect. Dis.* 162, 523–528.

Safirstein, B.H., D'Souza, M.F., Simon, G., Tai, E.H., und Pepys, J. (1973). Five-year follow-up of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 108, 450–459.

Schleimer, R.P. (1990). Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141, S59–S69.

Seibold, M.A., Donnelly, S., Solon, M., Innes, A., Woodruff, P.G., Boot, R.G., Burchard, E.G., und Fahy, J.V. (2008). Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 944–950.e3.

Shak, S., Capon, D.J., Hellmiss, R., Marsters, S.A., und Baker, C.L. (1990). Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9188–9192.

Simon, S.I., und Kim, M.-H. (2010). A Day (or 5) in a Neutrophil's Life. *Blood* 116, 511–512.

Steinberg, B.E., und Grinstein, S. (2007). Unconventional Roles of the NADPH Oxidase: Signaling, Ion Homeostasis, and Cell Death. *Sci STKE* 2007, pe11.

Stevens, D.A., Moss, R.B., Kurup, V.P., Knutsen, A.P., Greenberger, P., Judson, M.A., Denning, D.W., Cramer, R., Brody, A.S., Light, M., *et al.* (2003). Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic

- Fibrosis—State of the Art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin. Infect. Dis.* 37, S225–S264.
- Sugui, J.A., Kim, H.S., Zarembek, K.A., Chang, Y.C., Gallin, J.I., Nierman, W.C., and Kwon-Chung, K.J. (2008). Genes Differentially Expressed in Conidia and Hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon Exposure to Human Neutrophils. *PLoS ONE* 3, e2655.
- Tamaoki, J., Kadota, J., and Takizawa, H. (2004). Clinical implications of the immunomodulatory effects of macrolides. *Am. J. Med.* 117 *Suppl* 9A, 5S – 11S.
- Tharanathan, R.N., and Kittur, F.S. (2003). Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 61–87.
- Toide, K., Takahashi, Y., Yamazaki, H., Terauchi, Y., Fujii, T., Parkinson, A., and Kamataki, T. (2002). Hepatocyte nuclear factor-1alpha is a causal factor responsible for interindividual differences in the expression of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 mRNA in human livers. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 30, 613–615.
- Tracey, K.J. (2009). Reflex control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 418–428.
- Travis, S.M., Conway, B.A., Zabner, J., Smith, J.J., Anderson, N.N., Singh, P.K., Greenberg, E.P., and Welsh, M.J. (1999). Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20, 872–879.
- Tronsmo, A., and Harman, G.E. (1993). Detection and quantification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal. Biochem.* 208, 74–79.
- Tsai, W.C., Rodriguez, M.L., Young, K.S., Deng, J.C., Thannickal, V.J., Tateda, K., Hershenson, M.B., and Standiford, T.J. (2004). Azithromycin blocks neutrophil recruitment in *Pseudomonas* endobronchial infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 1331–1339.
- Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8, 668–676.
- Verleden, G.M., Vanaudenaerde, B.M., Dupont, L.J., and Van Raemdonck, D.E. (2006). Azithromycin reduces airway neutrophilia and interleukin-8 in patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174, 566–570.
- Vinck, A., Terlouw, M., Pestman, W.R., Martens, E.P., Ram, A.F., van den Hondel, C.A.M.J.J., and Wösten, H.A.B. (2005). Hyphal differentiation in the exploring mycelium of *Aspergillus niger*. *Mol. Microbiol.* 58, 693–699.
- Vlahakis, N.E., and Aksamit, T.R. (2001). Diagnosis and treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mayo Clin. Proc. Mayo Clin.* 76, 930–938.
- Weil, G.J., and Chused, T.M. (1981). Eosinophil autofluorescence and its use in isolation and analysis of human eosinophils using flow microfluorometry. *Blood* 57, 1099–1104.
- Wilms, E.B., Touw, D.J., and Heijerman, H.G.M. (2006). Pharmacokinetics of azithromycin in plasma, blood, polymorphonuclear neutrophils and sputum during long-term therapy in patients with cystic fibrosis. *Ther. Drug Monit.* 28, 219–225.
- Wright, J.R. (2005). Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 58–68.
- Zhang, X., Moilanen, E., and Kankaanranta, H. (2001). Beclomethasone, budesonide and fluticasone propionate inhibit human neutrophil apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* 431, 365–371.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

ABPA	Allergische Bronchopulmonale Aspergillose
AC	Aspergillus Kolonisation
AMC	saure mamilläre Chitinase (acidic mamillian chitinase)
bp	Basenpaare
BSA	bovines serum albumin
CD62-AK	cluster of differentiation 62-Antikörper (gegen das Oberflächenmerkmal 62 gerichteter Antikörper)
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHIT-1	Chitotriosidase
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierende Protein)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfon
H ₂ O	Wasser
IL-8	Interleukin 8
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MPO	Myeloperoxidase
MU-TACT	4-methyl umbiliferyl β-d-N,N',N''-triacetylchitotrioside hydrat
N	normale
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat

NETs	neutrophil extracellular traps (neutrophile extraelluläre Fallen)
OD	optische Dichte
PAMP	Pathogen assoziierten molekularen Mustern
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PI	Propidium-Iodid
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat
PMN	polymorphonukleare Leukozyten
PVP	polyvinylpyrrolidone
rcf	relative centrifugal force (relative Zentrifugalkraft)
RFP	red fluorescent protein (rot fluoreszierendes Protein)
RhDNasen	Rekombinante humane Dnasen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

7.2 Materialliste

Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen 10, 100, 1000 μ l	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
96-well Kultur-Platten	Becton Dickinson&Company, Franklin Lakes, USA
Flachboden 96-well Platten	Nunc TM , Roskilde, Dänemark
50ml Falcon-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5, 10, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger Superfrost	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Pasteurpipetten	K. H. GmbH "Assistent", Sondheim, Deutschland
Chamber Slides	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Geräte

Zentrifuge 5810R	EppendorfAG, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer lab disc white	IKA [®] , Staufen, Deutschland
Vortexer MS3 basic	IKA [®] , Staufen, Deutschland
Schüttelplatte Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroskop EVOS fl	AMG, Bothell, WA, USA

Brutschrank Forma Scientific	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Mehrkanalpipette Transferpette S (20-200µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Mehrkanalpipette research plus (10-100µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten research plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multistepper Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ELISA-reader FLUO star Omega	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
Varioklav Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Laboklav HSP	WEBECO, Selmsdorf, Deutschland
Absaug-Pumpe	Neuberger KNF, Freiburg, Deutschland
Wasserbad Isotemp	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Flow Biohazard, Clean Air	Contained Air Solutions, Manchester, UK
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht „Assistent“ GmbH, Sondheim/Rhön, Deutschland

Neutrophilenisolation und –aufbereitung

S-Monovette 9ml LH	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Percoll (P1644)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
HCl	MERCK, Darmstadt, Detuschland
Natronlauge	ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	MERCK, Darmstadt, Detuschland
PBS (G1001,3010)	Dulbecco's PBS (1x) Powder, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PBS (H15-011)	Dulbecco's PBS (10x), PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PBS (20012068)	Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
RPMI-1640 Medium (R8758)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA (11930.03)	SERVA GmbH, Heidelberg, Deutschland
HEPES (HN774)	ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PI (P4864)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland

CD62L-AK (IM1231U)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Aqua Spüllösung	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
May-Grünwald-Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Giemsa-Lösung	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	BÜFA GmbH, Hulde, Deutschland
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
o-Xylene	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland

Zellkultur

Prednisolon	mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland
Azithromycin (PZ0007)	Geyer, Hamburg, Deutschland
Salbutamol	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Pulmozyme [®]	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
PMA (P1585)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO (D8418)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Peptidoglycan aus <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> (72789)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Peptidoglycan aus <i>Staphylococcus aureus</i> (77140)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Humanes GM-CSF (300-03)	PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland
Zymosan A von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Z4250)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Aktivitätsmessung

MU-TACT (M5639)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ Disodiumphosphat (S5136)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Citronensäure (27109)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chitinase von <i>Trichoderma viride</i> (C6242)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcarbonat (A135.1)	ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (68852)	ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (N9376)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland

4-Nitrophenyl N,N'-diacetyl- β -D-chitobioside (N6133)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Nitrophenyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose (N8638)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
p-Nitrophenol Lösung (N7660)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Methylumbelliferone (M1381)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetate (sc-216940A)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA
4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotrioside hydrate (M5639)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chitin from Shrimp shells (C9752)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland

Antikörper-Färbung

Tween	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glutaraldehyd (49626)	SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chitotriosidase C-18 goat polyclonal IgG (sc-46855)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA
Donkey anti-goat IgG-PE (sc-3743)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA
Hoechst 33342 (ABD-17533)	BIOMOL GmbH, Hamburg, Deutschland
Vecta shield (H-1400)	Vector Laboratires, Inc., Burlingame, CA, USA

Antikörper und rekombinante Proteine

Chitotriosidase (N-16) sc-46858	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA
Chitotriosidase (A-3) sc-271282	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA
Rekombinante humane CHIT-1 (3559-GH-010)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Rekombinantes humanes Lysozym (L1667)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rekombinantes humanes IL-8 72aa (34-8089-82)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Anti human Chitotriosidase (MAB35591)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

7.3 Fragebogen für Nicht-CF Probanden

Fragebogen gesunde Probanden

Liebe freiwillige Studienteilnehmer!

Wir möchten Sie bitten vor der Blutentnahme noch einige Angaben zu machen bzw. einige kurze Fragen für unsere Studie zu beantworten.

Geschlecht:

Geburtsdatum:

Größe:

Gewicht:

Nehmen Sie aktuell Medikamente oder haben Sie bis vor Kurzem Medikamente genommen? (Bitte denken Sie auch an Medikamente gegen Heuschnupfen, Erkältung, Empfängnisverhütung ...)

NEIN

JA, nämlich Folgende: _____

Haben Sie Asthma oder hatten Sie Asthma als Kind/Jugendlicher?

NEIN

JA (Bitte geben Sie Schweregrad, Dauer oder Zeitraum der Erkrankung an!)

Haben Sie bekannte Allergien oder Unverträglichkeiten?

NEIN

JA, nämlich Folgende: _____

Rauchen Sie?

NEIN

JA (Bitte geben Sie an seit wann und wie viel Sie rauchen!)

Haben Sie andere (chronische) Erkrankungen?

NEIN

JA, nämlich Folgende: _____

Wann war Ihr letzter Luftwegsinfekt/Ihre letzte Lungenentzündung?

Herzlichen Dank für Ihre Hilfe!

7.4 Aufklärung und Einverständniserklärung für Probanden und Patienten

Für minderjährige Studienteilnehmer und ihre Erziehungsberechtigten Personen wurden entsprechend angepasste Aufklärungsformulare verwendet. Allen anderen Teilnehmern wurde folgendes Formular ausgehändigt:

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Lübeck
Schwerpunkt Kinderpneumologie & Allergologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck
Ärztliche Projektleitung: Prof. Dr. Matthias Kopp
Projektleiter: Dr. Markus Weckmann
e-mail: kopp@paedia.ukl.mu-luebeck.de

Lübeck, im Mai 2011

Informations- und Aufklärungsformular zur Studie „Pilzinfektionen bei Mukoviszidose“

1. Allgemeine Informationen

Bitte lesen Sie diese Information sorgfältig durch. Ihr Arzt wird mit Ihnen auch direkt über die Studie sprechen. Bitte fragen Sie Ihren Arzt, wenn Sie etwas nicht verstehen oder wenn Sie zusätzlich etwas wissen möchten.

Sollten Sie weitere Fragen bezüglich der Studie haben, wenden Sie sich bitte an die aufklärende Person oder direkt an Prof. Kopp (Tel.: 0451/500-2550, Fax: 0451/500 2546, Mail: kopp@paedia.ukl.mu-luebeck.de)

2. Informationen zur Studie und dem Hintergrund

Patienten mit Mukoviszidose haben nicht nur mit der ihnen angeborenen Erkrankung zu kämpfen, im Krankheitsverlauf können auch weitere Komplikationen entstehen. Hierzu zählen z.B. eine Pilzbesiedelung der Atemwege, die eine allergische Reaktion hervorrufen kann. In der Fachsprache wird dies „allergische bronchopulmonale Aspergillose“, kurz ABPA genannt. In den letzten Jahren wurde ABPA häufiger bei Mukoviszidose-Patienten festgestellt. Wir wollen nun in einem Forschungsprojekt die Ursachen hierfür besser verstehen. Bei der geplanten Untersuchung an Blutzellen von Patienten mit Mukoviszidose und gesunden Probanden möchten wir herausfinden, ob sich die Gabe von Medikamenten, wie sie Mukoviszidose-Patienten typischerweise erhalten (Antibiotika, Cortison, atemwegserweiternde Medikamente) auf bestimmte Immunzellen des Körpers auswirken und ihn damit möglicherweise anfälliger für Pilzinfektionen und damit ABPA machen.

Diese Studie wird gefördert mit den Mitteln der Sektion Medizin an der Universität zu Lübeck E42-2012.

Wir möchten Sie hiermit fragen, ob Sie Interesse an der Teilnahme haben.

- Im Rahmen einer regulären Blutabnahme, die bei Ihnen durchgeführt wird, möchten wir zusätzlich 50 ml Blut für unsere Untersuchung gewinnen. Die Menge an zusätzlich abgenommenem Blut stellt dabei keine Belastung für den Körper dar. Wir

benötigen lediglich für die Blutabnahme etwas länger Zeit. Es entstehen hierbei neben den bei jeder Blutentnahme üblichen Risiken (zum Beispiel Bluterguss an der Einstichstelle, kurzfristige Nachblutung) keine zusätzlichen Unannehmlichkeiten.

- Aus der Patientenakte möchten wir in pseudonymisierter Form, d.h. ohne direkten Bezug zu Ihrem Namen, Daten zur Medikamenteneinnahme, Lungenfunktion und zu dem aktuellen Sputumbefund erheben.

Diese Untersuchung wird im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie durchgeführt. Ein direkter Nutzen für Sie nicht. Wir können jedoch möglicherweise neue Erkenntnisse über Pilzinfektionen bei Mukoviszidose-Patienten erhalten und dadurch Therapiepläne in Zukunft besser gestalten, um eine Pilzinfektion und ABPA zu verhindern.

Selbstverständlich ist die Teilnahme an der Studie freiwillig, es entstehen dadurch keine Behandlungskosten für Sie. Es steht Ihnen jederzeit frei, die weitere Teilnahme an dieser Studie ohne Nennung von Gründen zu widerrufen. Es entstehen Ihnen dabei keine Nachteile im Hinblick auf die Behandlung oder Ihr Verhältnis zu Ihrer behandelnden Ärztin bzw. Arzt. Nach Beendigung Ihrer Teilnahme werden keine weiteren Daten von Ihnen erhoben. Ihre bisherigen Daten werden unwiderruflich anonymisiert, d.h. Sie können nicht mehr anhand der Daten identifiziert werden.

Wir würden uns sehr freuen, wenn Sie uns bei unserem Anliegen unterstützen könnten.

3. Datenschutzrechtliche Informationen

Verantwortlich für Datenschutz: Prof. Matthias Kopp

Verantwortlich für Datenverarbeitung: Dr. Markus Weckmann, Christiane Schultheiß

Die Datenerhebung erfolgt ausschließlich zum Zweck des oben genannten Studienziels. Erhoben werden Geburtsdatum, einzelne medizinische Befunde (aktueller Sputumbefund, Lungenfunktion, Laborwerte soweit vorhanden) und verordnete Medikamente.

Ihre Daten werden in pseudonymisierter Form, d.h. ohne direkten Bezug zu Ihrem Namen, elektronisch gespeichert und ausgewertet. Die Daten werden entsprechend den Vorschriften der Datenschutzbestimmung pseudonymisiert.

Zugriff auf Ihre Daten haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet. Die Daten sind vor fremdem Zugriff geschützt.

Die personenbezogenen Daten werden am Ende des Forschungsvorhabens, spätestens jedoch nach 3 Jahren anonymisiert.

Aus der von Ihnen stammenden Blutprobe planen wir die Isolation und Analyse von Zellen, die Ausbringung der Zellen auf Kulturplatten mit Stimulantien und Medikamenten. Die maximale Dauer der Zellkultur beträgt 24 Stunden. Einzelne Zellbestandteile werden für die gesamte Dauer der Studie gelagert, maximal 3 Jahre. Anschließend erfolgt eine statistische Auswertung der erhobenen Daten.

Die Entsorgung der Biomaterialien erfolgt nach den laborüblichen Standards und beinhaltet eine vollkommene Vernichtung der Biomaterialien spätestens nach Abschluss der Studie.

Informations- und Aufklärungsformular zur Studie „Pilzinfektionen bei Mukoviszidose“

Einwilligungserklärung

Studienteilnehmer:

Name
Vorname
Geburtsdatum

Aufklärende Person:

Name
Vorname
Tel.Nr.

Die oben genannte Person hat mich über die Studie informiert.

Ich habe die schriftliche Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden. Ich hatte Gelegenheit alle meine Fragen zu stellen und diese wurden zufriedenstellend und vollständig beantwortet. Ich wurde ausführlich über das Ziel und den Verlauf der Studie, Chancen und Risiken der Teilnahme, meine Rechte und Pflichten und die Freiwilligkeit der Teilnahme aufgeklärt.

Ich erkläre hiermit meine Teilnahme an der oben genannten Studie. Ich wurde darauf hingewiesen, dass meine Teilnahme freiwillig ist und dass ich das Recht habe, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne dass mir Nachteile entstehen.

Datenschutzrechtliche Einwilligung:

Ich wurde über meine Datenschutzrechte informiert. Mit der Erhebung, Verarbeitung und Speicherung meiner Daten im Rahmen der Studie bin ich einverstanden.

Datum	Unterschrift des Studienteilnehmers

Datum	Unterschrift des aufklärenden Arztes/Person

7.5 Votum der Ethikkommission



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. med. Kopp
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

im Hause

nachrichtlich:

Herrn Prof. Herting, Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Sitzung der Ethik-Kommission am 12. April 2011 – Ihr Schreiben vom 21. Juni 2011

Antragsteller: Herr Prof. Kopp / Herr Prof. Herting

Titel: Effect of standard therapy on innate immune responses to Asperigillus spc.

Sehr geehrter Herr Prof. Kopp,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

vielen Dank für Ihren Neuantrag, in dem Sie unserem Wunsch nach weiteren Informationen zum Studienvorhaben nachkommen und die überarbeiteten Aufklärungsmaterialien sowie Antworten hinsichtlich der Statistik und Fallzahl vorlegen.

Die Kommission hat nunmehr keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden. Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind. Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie, Stellv. Vors.)
 Prof. Dr. Schweiger
(Psychiatrie)
Prof. Dr. Handel
(Medizinische Informatik)
Frau Prof. E. Stubbe
(Theologin)
Prof. Dr. Borck
(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller
(Pflege)
 Dr. Kaiser
(Kinderchirurgie)
Herr Dr. Fieber
(Richter am Amtsgericht Ahrensburg)
 Prof. Schwinger
(Humangenetik)
 Dr. R. Vonthein
(Zentrum für Klin. Studien)

Herr Prof. Dr. Giesler
(Medizinische Klinik I)
Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
 Herr PD Lauten
(Kinder- und Jugendmedizin)
 Frau A. Farries
(Richterin am Amtsgericht Lübeck)

Ethik-Kom
Vorsitzend

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 500 4639
Fax: +49 451 500 3026
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 11-044

Datum: 27. Juni 2011

Bilte
3 Kopien an
Dr. Weidmann
dann Ablage unter
"Ethikvoten"

8. Danksagungen

Ich möchte allen herzlich danken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben:

Allen voran Prof. Dr. med. Matthias Kopp, der mir diese Arbeit ermöglicht hat und den ich als stets sehr freundlichen, kompetenten und mir Vertrauen schenkenden Doktorvater erlebt habe.

Dr. rer. nat. Markus Weckmann der mich ausgezeichnet betreut hat, immer ein offenes Ohr und hilfreiche Ratschläge für mich hatte.

Anneke Holländer und Birgit Rohlf aus dem Team der AG Kopp für die Unterstützung bei der Laborarbeit und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Dem Team der Transfusionsmedizin Lübeck und den Blutspendern, die eine kontinuierliche Versorgung mit Proben ermöglichten.

Dr. med. Ingrid Bobis, die mich mit großem Engagement und sehr herzlich bei der Patientenrekrutierung unterstützt hat.

Allen pädiatrischen und erwachsenen CF Patienten, die mir ihre Blutproben und Patientendaten überlassen haben. Dass sie trotz ihrer Erkrankung, die häufige Arztkontakte und Klinikaufenthalte notwendig macht, offen und motiviert waren an der Studie teilzunehmen, finde ich besonders erwähnenswert.

Dr. Ralf Werner und seiner Arbeitsgruppe, die mich insbesondere in der Anfangsphase meiner Laborarbeit mit vielen praktischen Hilfestellungen unterstützt und mir somit den Einstieg in die experimentelle Phase erleichtert haben.

Allen Menschen, die ich in meinem Herzen trage.

9. Lebenslauf

Die Seite 82 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Universität Lübeck zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss von Medikamenten in der Therapie der Cystischen Fibrose auf die Aktivität von Chitotriosidase in humanen Neutrophilen Granulozyten

unter Leitung von Prof. Dr. med. Matthias Kopp in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe weder vorher noch gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Arbeit als Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Ich widerspreche der Zulassung von Zuhörerinnen oder Zuhörern bei der mündlichen Prüfung nicht.

Freiburg, August 2015

Christiane Schultheiß