

Aus der Fachrichtung
Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier

Phagozytoseaktivität von Blutleukozyten bei Zystischer Fibrose

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Laura Leuer

geb. am: 20.02.1994 in Adenau

Tag der Promotion: 17.12.2020
Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig
Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
1 Zusammenfassung	1
1.1 Summary	3
2 Einleitung	4
2.1 Zystische Fibrose	4
2.1.1 Pathophysiologie	4
2.1.2 Mutationen des CFTR-Gens	6
2.1.3 Organmanifestation	6
2.1.4 Entzündungsgeschehen in der Lunge bei Zystischer Fibrose	8
2.1.5 Therapie und therapeutische Grenzen	9
2.2 Grundlagen der Phagozytose	9
2.2.1 Phagozytose im Rahmen der Zystischen Fibrose	11
2.3 Zielsetzung der Arbeit	13
3 Material und Methodik	14
3.1 Verwendete Geräte und Materialien	14
3.2 Studienaufbau	15
3.3 Patientenkollektiv	15
3.3.1 Kontrollgruppe	15
3.4 Blutentnahmen	16
3.5 Versuchsaufbau	16
3.5.1 PHAGOTEST™	17
3.5.2 Testablauf	18
3.6 Grundlagen der Durchflusszytometrie	19
3.7 Stimulationsversuche	21
3.7.1 Herstellung der Vorverdünnungen	23
3.7.2 Versuchsdurchführung	23
3.8 Datenverarbeitung und statistische Analyse	24
4 Ergebnisse	26
4.1 Grunddaten der Patienten- und Kontrollgruppe	26
4.2 Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppe	27

4.3	Vergleiche innerhalb der Patientengruppe	31
4.3.1	Vergleich der Leukozytenzahl und der Phagozytosewerte	31
4.3.2	Vergleich der CRP- und Phagozytosewerte	37
4.3.3	Vergleich der Keimbesiedlung und der Phagozytosewerte	43
4.4	Stimulationsversuche	48
4.4.1	Versuch 1: Pilotversuch	48
4.4.2	Versuch 2: Proben ohne Zusatz, LPS 100 ng/ml und MALP-2	49
5	Diskussion	52
5.1	Diskussion der Methodik	52
5.2	Patientenkollektiv	53
5.3	Diskussion der Ergebnisse	55
5.3.1	Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppe	55
5.3.2	Vergleiche innerhalb der Patientengruppe	57
5.4	Stimulationsversuche	59
6	Fazit	60
	Literaturverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	VIII
	Tabellenverzeichnis	X
	Anhang	XII
	Publikation	XVII
	Danksagung	XVIII
	Lebenslauf	XIX

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	adenosin triphosphate-binding-cassette
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclic adenosine monophosphate; zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	Cystic Fibrosis; Zystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CRP	C-reaktives Protein
ENaC	epithelialer Natriumkanal
E. coli	Escherichia coli
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	G-Zahl; Erdbeschleunigung
h	Stunde
HOCL	hypochlorige Säure
I.E.	Internationale Einheit
LPS	Lipopolysaccharid
MALP-2	Makrophagen aktivierendes Lipopeptid (Masse von 2 kD)
min.	Minuten
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MSSA	Methicillin sensibler Staphylococcus aureus
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ng	Nanogramm
p	prozentuale Angabe des Signifikanzniveaus
PBS	phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Salzlösung
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSAE	Pseudomonas aeruginosa
SD	Standardabweichung
STAU	Staphylokokkus aureus
µl	Mikroliter

1 Zusammenfassung

Bei der Zystischen Fibrose (CF) stellt die Lungenbeteiligung auch heute noch die Hauptursache für Morbidität und Mortalität dar. Eine entscheidende Rolle in der Verschlechterung der Lungenfunktion spielen unter anderem chronische bakterielle Infektionen, welche mitverantwortlich für die fortschreitende Lungendestruktion der Patienten sind. Im Rahmen der Zystischen Fibrose wird bereits seit längerer Zeit über eine fehlregulierte zelluläre Immunantwort diskutiert. Mehrere Studien sind sich weiterhin uneinig, inwiefern eine Beeinträchtigung der Phagozytose bei den zur Phagozytose fähigen Zellen, Neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen, vorliegt.

In der folgenden Dissertation sollte erneut die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus dem peripheren Blut von Mukoviszidose-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe untersucht und zusätzlich eventuelle Unterschiede innerhalb der Patientengruppe aufgezeigt werden. Insgesamt wurden 35 Mukoviszidose-Patienten der pulmologischen Mukoviszidose-Spezialambulanz des Universitätsklinikums des Saarlandes sowie 12 freiwillige gesunde Kontrollpersonen untersucht. Die Messungen erfolgten mittels eines standardisierten Reagenzien-Kits zur Phagozytosebestimmung (PHAGOTEST™). Peripher gewonnenes, venöses Vollblut von CF-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe wurde mit Fluoreszenzmarkierten opsonierten Bakterien (*Escherichia coli*) sowie weiteren im Test-Kit enthaltenen Substanzen inkubiert und durchflusszytometrisch gemessen. Es wurden die Prozentzahl der phagozytierenden Neutrophilen und Monozyten sowie deren Phagozytosekapazität (GeoMean-Wert) bestimmt.

Die Blutleukozyten der Patienten und der Kontrollpersonen zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Phagozytosekapazität und der Prozentzahl der phagozytierenden Zellen weder bei den Neutrophilen noch bei den Monozyten. Ebenso ließen sich keine Unterschiede innerhalb der Patientengruppe, aufgeteilt in Untergruppen bezogen auf den CRP-Wert und die Leukozytenzahl im Blut, darstellen. Die Patientenuntergruppierung nach unterschiedlicher Bakterienbesiedlung der Lungen, eingeteilt in eine Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* und Staphylokokken, gab einen Hinweis auf signifikante Unterschiede. In der Gruppe der mit *Pseudomonas aeruginosa* besiedelten Mukoviszidose-

Patienten fiel sowohl die Phagozytosekapazität als auch die Prozentzahl der phagozytierenden Monozyten signifikant geringer aus als in der Gruppe mit Staphylokokkenbesiedlung.

Zusammenfassend konnten die vorliegenden Ergebnisse keine generell verminderte Phagozytoseleistung von Blutleukozyten bei Patienten mit Zystischer Fibrose aufzeigen. Sie geben einen Hinweis auf eine mögliche pathogenassoziierte Beeinträchtigung der Phagozytoseaktivität von Monozyten im Rahmen der Erkrankung.

1.1 Summary

In cystic fibrosis (CF) lung disease remains the main cause of morbidity and mortality. Chronic bacterial infections play a decisive role in the deterioration of lung function and are partly responsible for the progressive lung destruction in CF-patients. In the context of cystic fibrosis an altered cellular immune response has often been discussed. Several studies are still not clear about to what extent there is an impairment of phagocytosis in phagocytic cells, regarding neutrophils and monocytes/macrophages.

The following study was meant to reexamine the phagocytic ability of neutrophils and monocytes of peripheral blood of cystic fibrosis patients and a healthy control group. In addition, it was intended to identify possible differences within the patient group. A total of 35 cystic fibrosis patients from the outpatient unit of the Department of Pneumology, Allergology and Respiratory Critical Care of the University Hospitals of Saarland, as well as 12 healthy volunteers were examined. The measurements were performed using a commercial phagocytosis assay (PHAGOTEST™). Venous blood samples from cystic fibrosis patients and a healthy control group were taken and incubated with fluorescence-labelled opsonized bacteria (*Escherichia coli*) and other substances contained in the test kit. Phagocytosis was measured by flow cytometry. The percentage of phagocytic neutrophils and monocytes and their phagocytic capacity (GeoMean) were determined.

Blood leukocytes of CF-patients and of healthy controls showed no significant differences in phagocytic capacity and the percentage of phagocytic cells neither in neutrophils nor in monocytes. Besides, no differences could be shown within the patient group divided into subgroups regarding CRP and leukocyte count. Patient subgroups according to different bacterial colonization of the lungs, divided into colonization with *Pseudomonas aeruginosa* and staphylococci, gave an indication of significant differences. Phagocytic capacity and the percentage of phagocytic monocytes was significantly lower in CF-patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa* than in the group colonized with staphylococci.

In conclusion, the present results could not demonstrate a generally reduced phagocytic ability of peripheral blood leukocytes in CF-patients. They may provide an indication of a possible pathogen associated impairment of phagocytosis in monocytes.

2 Einleitung

2.1 Zystische Fibrose

Die Zystische Fibrose (cystic fibrosis, CF) ist die häufigste zum Tode führende genetische Erkrankung unter Kaukasiern. Die hochviskösen Sekrete, die im Rahmen des Chloridkanal-Defekts entstehen, machten die Erkrankung auch unter dem Namen Mukoviszidose bekannt. Sie tritt mit einer Häufigkeit von circa 1:3.000 in der weißen Bevölkerung auf. Etwa 5% der Kaukasier sind heterozygot und somit Merkmalsträger (Renz-Polster et al. 2013). In anderen geografischen Regionen wie Asien und Afrika ist das Vorkommen der Erkrankung deutlich seltener (Corriveau et al. 2018).

2.1.1 Pathophysiologie

Der autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselkrankheit liegt eine Mutation des CFTR-Gens (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) zugrunde, welches Ende der achtziger Jahre erstmals auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q31) beschrieben wurde (Rommens et al. 1989). Das Gen kodiert für ein Protein aus 1.480 Aminosäuren, welches als cAMP-abhängiger (cyclic adenosine monophosphate) Chloridkanal insbesondere in der apikalen Membran sekretorischer Epithelzellen fungiert (Riordan et al. 1989; Anderson et al. 1991). Der zur Familie der ABC-Transporter (adenosine triphosphate-binding-cassette-transporter) gehörende Kanal ist in seiner Funktion nicht nur am Chlorid- und Bikarbonattransport, sondern auch an der Interaktion weiterer Ionenkanäle, insbesondere des epithelialen Natriumkanals (ENaC), beteiligt. Zusätzlich wird eine Rolle in der Immunabwehr diskutiert (Dechecchi et al. 2018; Stoltz et al. 2015).

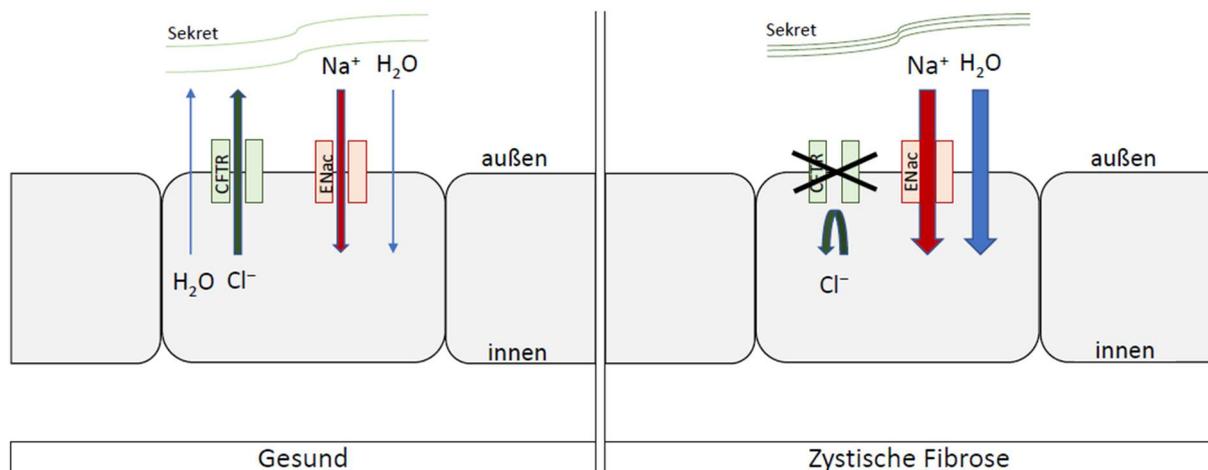


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer sekretorischen Epithelzelle

Ionen- und Wassertransport bei Gesunden mit normaler CFTR-Funktion (links) und bei CF-Patienten mit CFTR-Kanal Defekt (rechts).

Abbildung 1 zeigt schematisch die Pathophysiologie der Zystischen Fibrose. Bei Gesunden ist das CFTR-Protein in der apikalen Zellmembran sekretorischer Epithelzellen als Chloridkanal tätig und für den Transport von Chlorid (Cl^-) aus dem Zellinneren nach außen in das Lumen zuständig. Gleichzeitig wirkt es regulatorisch auf den epithelialen Natriumkanal (ENaC), welcher Natrium-Ionen (Na^+) aus dem Lumen in das Zellinnere schleust. Passiv folgt Wasser dem Ionen-Transport, welcher fein aufeinander abgestimmt ist, um eine optimale Viskosität der Sekrete herzustellen.

Bei der Zystischen Fibrose ist durch die Dysfunktion des CFTR-Kanals der Chlorid-Transport aus der Zelle vermindert und gleichzeitig die Natriumabsorption aus dem Lumen in die Zelle abnorm gesteigert. Osmotisch bedingt folgt Wasser ins Zellinnere, welches dem Sekret im Lumen entzogen wird und dessen Viskosität ansteigen lässt (Rosenstein und Zeitlin 1998). In der Folge staut sich das zähe Sekret in den entsprechenden Organen an und führt dort zum klinischen Erscheinungsbild der Zystischen Fibrose. Vornehmlich betroffen sind die Lungen und das Pankreas, aber auch der übrige Gastrointestinal- sowie der Genitaltrakt (van Biervliet et al. 2016).

2.1.2 Mutationen des CFTR-Gens

Bis heute sind über 2.000 Mutationen des CFTR-Gens bekannt (Rommens 2011). Hierzu zählen Deletionen, Spleiß-, Nonsense-, Frameshift- und Missense-Mutationen (Wilschanski et al. 1995). Die Häufigste, mit einem Anteil von circa 70% aller Mutationen, stellt die Mutation F508del dar. Sie führt zur Deletion (Δ) von drei Basenpaaren in Exon 10, welche einen Verlust der Aminosäure Phenylalanin (F im Einbuchstabencode) an Position 508 zur Folge hat (Gregg et al. 1993; Collins 1992). Die übrigen Mutationen treten deutlich seltener auf, zum Teil nur bei einzelnen Personen (Mutius et al. 2014). Insgesamt werden sie in sechs Klassen eingeteilt, je nach Effekt auf die Bildung und Funktion des CFTR-Proteins (Herold 2015). Dabei umfasst Klasse I Nonsense-Mutationen, bei denen kein Protein gebildet wird. Klasse II beinhaltet Mutationen, die zu einer fehlerhaften Faltung des CFTR-Proteins und daraus folgendem Abbau im Proteasom führen. Hierzu wird ebenfalls die Mutation Δ F508 gezählt. Klasse III und IV beziehen sich auf die Durchlässigkeit des CFTR-Kanals für Chloridionen in der Zellmembran. Während der Kanal in Klasse III funktionslos ist, ist in Klasse IV die Funktion teilweise erhalten. Defekte, die zu einem verminderten Auftreten des Kanals in der Plasmamembran führen, zählen zur Klasse V. Solche Mutationen, die zu einem instabilen Kanal in der Membran führen, gehören der Klasse VI an (Dechecchi et al. 2018). Da die Klassen IV-VI im Gegensatz zu den Klassen I-III noch eine gewisse Restfunktion des CFTR-Kanals aufweisen, verläuft die Erkrankung dort in der Regel etwas milder (Elborn 2016).

2.1.3 Organmanifestation

Durch das Vorkommen des CFTR-Kanals in verschiedenen exokrin aktiven Zell- bzw. Organsystemen, handelt es sich um eine Multisystemerkrankung mit vielfältigen Symptomen. Zu den wichtigsten Manifestationen zählen die Folgenden:

Im Pankreas führt der Sekretstau durch die pankreatischen Verdauungsenzyme zur Pankreatitis mit Zerstörung des Gewebes und fibrotischem Umbau, weshalb die Erkrankung als Zystische Fibrose benannt wurde. Durch die Destruktion des Pankreasgewebes entstehen Symptome wie Steatorrhö, Mangelernährung aufgrund von Maldigestion sowie CF-assoziiertes Diabetes. Hieraus resultieren vor allem Untergewicht sowie eine verminderte Aufnahme von wichtigen

Nährstoffen und fettlöslichen Vitaminen wie Vitamin D, was zusätzlich eine Osteoporose mitbedingen kann (Gibson-Corley et al. 2016).

Durch die Veränderung der Viskosität der Darmsekrete können insbesondere schon im frühen Alter, aber auch als Erwachsener, rezidivierende Obstruktionssyndromen auftreten. Zum Teil entwickelt sich bereits im Mutterleib oder bei der Geburt ein Mekoniumileus. Weiterhin kann es vermehrt zur Bildung von Gallensteinen oder auch zu Veränderungen in der Leber selbst kommen, welche sich in Leberfunktionsstörungen oder in einer Leberfibrose äußern können (Ronan et al. 2017).

Von der Erkrankung betroffene Männer sind in den meisten Fällen unfruchtbar aufgrund einer kongenitalen bilateralen Aplasie des Ductus deferens (Souza et al. 2018). Etwa die Hälfte der Frauen kann eine Schwangerschaft empfangen und bei gutem Allgemeinzustand austragen (Ahmad et al. 2013).

Auch die Schweißdrüsen sind von der Zystischen Fibrose betroffen. Sie sondern einen stark hypertonen Schweiß ab, was bei körperlicher Belastung zu einem lebensbedrohlichen Salzverlustsyndrom führen kann, aber auch zu diagnostischen Zwecken genutzt wird (Yu und Sharma 2019).

2.1.4 Entzündungsgeschehen in der Lunge bei Zystischer Fibrose

Die wohl bedeutendste Rolle in Hinblick auf Morbidität und Mortalität spielt die pulmonale Manifestation. Im Folgenden sind die wichtigsten Einflüsse auf die Pathogenese der chronischen Lungeninflammation und -destruktion zusammengefasst.

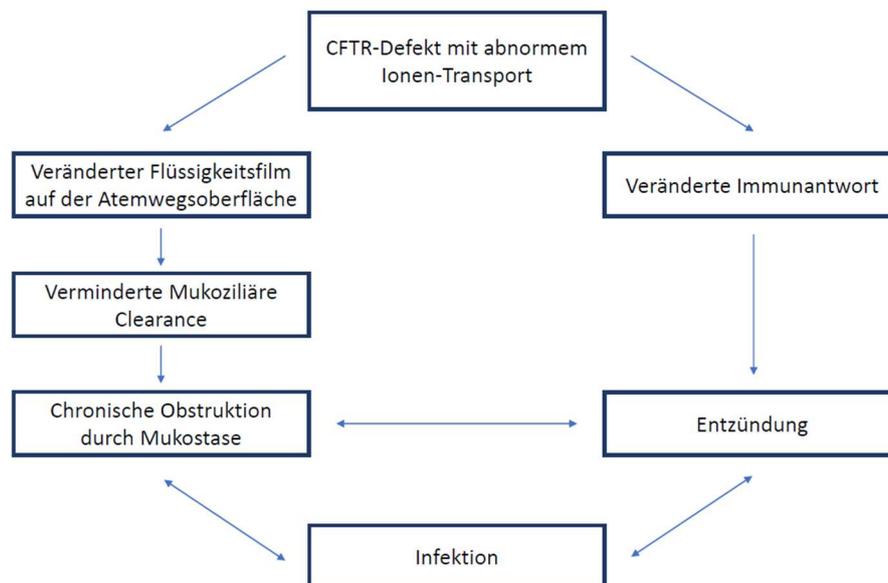


Abbildung 2: Pathogenese der chronischen Lungeninflammation und -destruktion in der Lunge von CF-Patienten (Ratjen 2009; Somayaji et al. 2017)

Abbildung 2 zeigt die sich zum Teil gegenseitig verstärkenden Faktoren in der Entstehung der pulmonalen Manifestation der Zystischen Fibrose. Durch den CFTR-Kanal-Defekt und dem damit einhergehenden abnormen Ionen-Transport wird die Zusammensetzung des Flüssigkeitsfilms auf der Oberfläche der Atemwege verändert. Bedingt durch die zähen Sekrete kommt es zu einer Mukostase, welche den gerichteten Abtransport der Sekrete durch die Zilien der Epithelzellen behindert und zu einer chronischen Bronchialobstruktion führt (Somayaji et al. 2017). Hierdurch wird die Anfälligkeit für bakterielle Infektionen mit problematischen Keimen begünstigt. Als bedeutendste Pathogene sind insbesondere *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE), *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* oder *Haemophilus Influenzae* zu nennen (Boyle 2007). Zusätzlich entstehen durch noch nicht vollständig geklärte, veränderte Immunreaktionen anhaltende Entzündungsprozesse. Insgesamt begünstigen sich die Bronchialobstruktion durch Mukostase, Infektionen mit Problemkeimen und chronische Entzündungsprozesse gegenseitig. Im Verlauf entwickelt sich eine fortschreitende

Lungendestruktion mit rezidivierenden Infektionen, Pneumothoraces, Bronchiektasien, Atelektasen, bis hin zu emphysematische Veränderungen oder einer Lungenfibrose. Nicht selten endet die pulmonale Situation in einem Lungenversagen (Cantin et al. 2015; Somayaji et al. 2017).

2.1.5 Therapie und therapeutische Grenzen

Die Zystische Fibrose ist eine nicht heilbare Erkrankung, deren Prognose sich jedoch durch neue Behandlungsoptionen der letzten Jahre stetig gebessert hat (McIntyre 2013). Im Vordergrund steht bisweilen die symptomatische Therapie. Diese setzt sich vorrangig aus Physiotherapie, Mukolyse sowie dem Einsatz von Medikamenten und Enzymen bei entsprechender Organbeteiligung zusammen. Bei Infektionsgeschehen kommen unter anderem Antibiotika zum Einsatz. Seit einigen Jahren werden zunehmend CFTR-Kanal Korrektoren und Potentioren getestet und vermehrt eingesetzt. Als Ultima Ratio bei schwerer Lungendestruktion kann eine Lungentransplantation in Frage kommen (Burgel und Fajac 2017).

Dank des medizinischen Fortschritts liegt die mediane Lebenserwartung bei Kindern, die seit 2018 geboren wurden, mittlerweile bei etwa 47 Jahren (Marshall et al. 2019). Die Haupttodesursache der Zystischen Fibrose stellt jedoch weiterhin insbesondere die pulmonale Beteiligung dar (Antoniou und Elston 2016). Die Patienten leiden oft seit Kindertagen unter einer chronischen Keimbesiedlung der Lunge, die nur schwierig komplett einzudämmen ist und das Fortschreiten der Lungendestruktion mit begünstigt. Bereits seit einigen Jahren ist die Dysregulation der zellulären Immunantwort bei der Zystischen Fibrose Gegenstand intensiver Forschung (Bonfield und Chmiel 2017). Unter diesem Aspekt wurde unter anderem die Rolle einer veränderten Phagozytose durch Leukozyten in der Immunantwort pathogener Keime diskutiert (Belchamber und Donnelly 2017; Lévêque et al. 2017).

2.2 Grundlagen der Phagozytose

Nicht nur bei der angeborenen, sondern auch bei der erworbenen Immunantwort, stellt die Phagozytose einen wichtigen initialen Schritt in der Abwehr pathogener Substanzen dar

(Flannagan et al. 2012). Hinsichtlich der Lunge sind beispielsweise in den Atemwegen, den submukosalen Drüsen und auch dem alveolären Gewebe verschiedene, zur Phagozytose fähige Zellarten repräsentiert. Hierzu zählen neben Untergruppen von ortsansässigen Makrophagen und dendritischen Zellen, auch eingewanderte, durch Entzündungen getriggerte Makrophagen und Monozyten (Tschernig und Pabst 2009; Fliegert et al. 1996). Insbesondere Monozyten/Makrophagen und Neutrophile Granulozyten, welche der zellulären Immunantwort angehören, besitzen die Eigenschaft der Phagozytose, extrazelluläre pathogene Partikel, wie beispielsweise Bakterien, im Körper unschädlich zu machen (Gordon 2016).

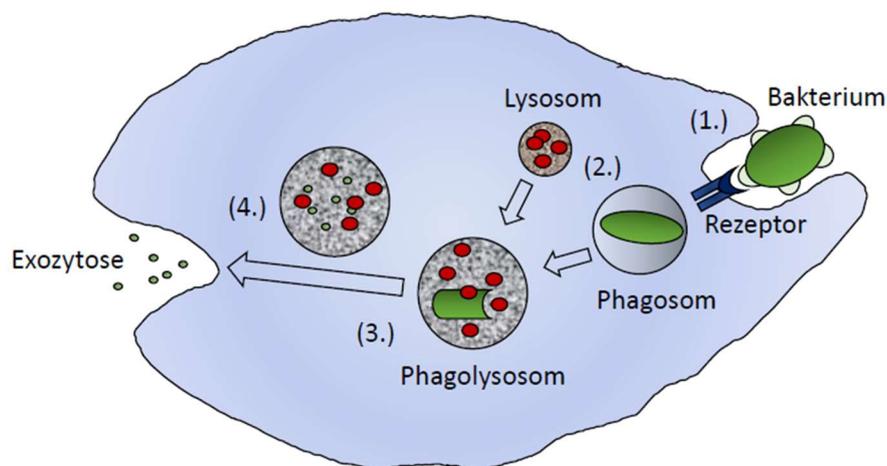


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer phagozytierenden Zelle

Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Teilschritte des Phagozytoseprozesses.

In Abbildung 3 ist schematisch der Ablauf der Phagozytose dargestellt. Der Vorgang der Phagozytose ist eine Form der Endozytose und läuft in mehreren Teilschritten ab. Das Pathogen, z.B. ein Bakterium, wird anhand seiner spezifischen Oberflächenmoleküle durch Rezeptoren auf der Oberfläche der phagozytierenden Zellen erkannt (1.). Es wird durch Umhüllung und Abschnürung der Zellmembran in die Zelle aufgenommen. Auf diese Weise entsteht in der Zelle ein Vesikel, das Phagosom (2.), welches mit Lysosomen zum Phagolysosom verschmilzt (3.). Hier wird das Pathogen durch verschiedene chemische Prozesse und lysosomale Enzyme abgetötet (4.). Dabei spielen nicht nur Verdauungsenzyme wie Lipasen, Proteasen und Nukleasen eine wichtige Rolle, sondern auch ein saurer pH-Wert im Phagolysosom, um ein optimales Milieu für die verschiedenen Enzyme zu schaffen (Gordon 2016). Durch Exozytose werden apathogene Restprodukte des verdauten Partikels aus der Zelle ausgeschleust.

2.2.1 Phagozytose im Rahmen der Zystischen Fibrose

Die Vielzahl unterschiedlicher Bakterienstämme, welche oftmals bereits im frühen Kindesalter die Lungen vieler Mukoviszidose-Patienten zu finden sind (O'Sullivan und Freedman 2009; Hampton et al. 2014), scheinen auf einen frühen Defekt der Immunantwort hinzudeuten. Bei der Elimination von Bakterien in der Lunge spielen vor allem Monozyten/Makrophagen und Neutrophile Granulozyten eine Schlüsselrolle. Seit Längerem wird eine Beeinträchtigung der Phagozytose von Leukozyten bei CF-Patienten diskutiert und versucht genauer zu verstehen, ob und inwiefern das CFTR-Protein Einfluss auf die Phagozytose von pathogenen Keimen nimmt.

Bereits vor einigen Jahren konnte das CFTR-Protein in Monozyten aus dem peripheren Blut von CF-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe (Ettorre et al. 2014; Johansson et al. 2014), sowie bei Neutrophilen im murinen Modell (Ng et al. 2014), detektiert werden. Anfang der 2000er Jahre wurde von einer verminderten Ansäuerung im Phagolysosom und der damit möglichen verschlechterten Abtötung von Bakterien berichtet. Die Ansäuerung des Phagolysosoms spielt eine entscheidende Rolle bei der Elimination von Bakterien. Durch veränderte Ionenströme soll die pH-Wert-Regulation gestört und dadurch der Phagozytoseprozess verändert sein (Di et al. 2006). Diese Hypothese wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (Haggie und Verkman 2009; Law et al. 2019).

In einer Publikation aus dem Jahr 2008 wurden funktionell eingeschränkte Neutrophile in der Lunge von CF-Patienten gefunden (Tirouvanziam et al. 2008). Eine weitere, wenige Jahre später veröffentlichte Studie zeigte an Immunzellen von Mukoviszidose-Patienten, welche entweder mittels markierten Pseudomonaden oder Mikrokügelchen inkubiert wurden, dass die Phagozytoseaktivität von Monozyten aus dem peripheren Blut vermindert war. Im Gegensatz dazu ließen sich bei den Neutrophilen Granulozyten jedoch keine Veränderungen diesbezüglich feststellen (van de Weert-van Leeuwen et al. 2013).

Eine weitere Forschergruppe untersuchte den Einfluss des CFTR-Proteins auf die Phagozytoseaktivität in Hinblick auf bestimmte Pathogene. Barnaby et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Endozytose von Pseudomonaden bei CF-Patienten beeinträchtigt zu sein scheint und durch den CFTR-Korrektor Lumacaftor gebessert werden konnte (Barnaby et al. 2018). Dieser Fund stellt einen wichtigen Aspekt dar, da *Pseudomonas aeruginosa* den am

häufigsten vorkommenden Keim in der Lunge von Mukoviszidose-Patienten ausmacht (Hurt und Bilton 2012) und von großer Bedeutung im Hinblick auf die Verschlechterung der Lungenfunktion ist. Im Erwachsenenalter sind ca. 80% der Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* besiedelt (Hampton et al. 2014).

In Bezug auf die Phagozytoseaktivität im Rahmen der Zystischen Fibrose bestehen weiterhin viele Unklarheiten. In dieser Dissertation werden im Folgenden Ergebnisse präsentiert, die erneut die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten aus peripherem venösem Vollblut mittels eines standardisierten Reagenzien-Kits (PHAGOTEST™) bei CF-Patienten untersucht. Monozyten und Neutrophile Granulozyten wandern nach der Bildung im Knochenmark bei Bedarf über das Blut in das jeweilige Zielgewebe ein, wonach anzunehmen ist, dass die Zellen im Blut denen im Lungengewebe in einem gewissen Umfang ähnlich sind. Aufgrund dessen, dass Monozyten/Makrophagen und Neutrophile Granulozyten schwierig im Patienten selbst zu messen oder aus dem Lungengewebe zu extrahieren sind, wird in dieser Studie peripheres Blut als Quelle für diese Zellart verwendet.

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Die genauere Betrachtung der zellulären Immunantwort der Zystischen Fibrose stellt einen wichtigen Aspekt für das bessere Verständnis der chronischen Inflammation der Lungen von CF-Patienten dar und könnte zur Entwicklung neuer oder verbesserter Therapieoptionen dienen.

Das Ziel der Arbeit ist es,

1. zu prüfen, ob Unterschiede in der Phagozytoseaktivität von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten im venösen Blut von Mukoviszidose-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe bestehen.
2. herauszustellen, ob bestimmte Merkmale (Leukozytenzahl im Blut, CRP-Wert, bakterielle Besiedlung, genetischer Hintergrund) innerhalb der Gruppe der Mukoviszidose-Patienten Einfluss auf die Phagozytoseaktivität nehmen.
3. zu ermitteln, mit Hinblick auf einen eventuellen Phagozytosedefekt, ob die basale Phagozytoserate durch experimentelle Stimulation zusätzlich gesteigert werden kann.

3 Material und Methodik

3.1 Verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Durchflusszytometer: BD FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Eppendorf Research® plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge: Megafuge 16R	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
Braun Inject 2 ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Heparin-Natrium 5.000 I.E./ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
LPS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MALP-2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PHAGOTEST™	Becton Dickinson Bioscience Europe, Heidelberg, Deutschland
PMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proleukin®	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland
Venenpunktionsbesteck Safety Multifly-Set	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

3.2 Studienaufbau

Die Studiendauer erfasste den Zeitraum vom 24.05.2017 bis 12.11.2018. Es wurden alle Mukoviszidose-Patienten ohne Lungentransplantation, die sich während dieses Zeitraums zur Teilnahme an der Studie bereit erklärten, miteinbezogen. Vorab wurden keine Ausschlusskriterien einzelner CF-Patienten definiert. Die Teilnahme an der Studie erfolgte ausschließlich nach mündlicher sowie schriftlicher Aufklärung und Unterzeichnung des Einverständnisbogens durch den Patienten selbst oder einen Erziehungsberechtigten (siehe Anhang 1). Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes geprüft und genehmigt (Kenn-Nummer 241/16).

3.3 Patientenkollektiv

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Innere Medizin V - Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, wurde ein Patientenkollektiv von insgesamt 35 Mukoviszidose-Patienten ohne Lungentransplantation erfasst. Die Koordination der Patienten fand in Absprache mit den Ambulanzschwestern der Klinik für Innere Medizin V statt, die Auskunft über die jeweiligen Wiedervorstellungstermine der Patienten in der Ambulanz gaben. Da eine genaue Auflistung aller Mukoviszidose-Patienten nicht stattfindet, konnte vorab durch die Klinik keine konkrete Anzahl an Patienten gegeben werden. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung befanden sich circa 40 Patienten ohne Lungentransplantation in Behandlung, sodass die anfänglich angedachte Anzahl von 50 Patienten nicht erreicht werden konnte. Unter den insgesamt 35 erfassten Patienten waren 19 Frauen sowieso 16 Männer im Alter von 18 bis 44 Jahren.

3.3.1 Kontrollgruppe

Die Gruppe der gesunden Kontrollpersonen ohne Mukoviszidose umfasste 12 Personen, darunter 3 Männer und 9 Frauen im Alter von 22 bis 54 Jahren, das durchschnittliche Alter lag bei 30 Jahren. Sie waren Mitarbeiter sowie Studierende der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, die sich auf freiwilliger Basis zur Blutentnahme bereit erklärten. Die Auswahl beruhte darauf, dass in der Patientengruppe das mittlere Alter bei 28 Jahren lag und

etwas mehr Frauen als Männer gemessen wurden. Auch in der Kontrollgruppe wurde die Blutentnahme nur nach vorheriger Aufklärung über die Studie sowie nach schriftlicher Einverständniserklärung durchgeführt.

3.4 Blutentnahmen

Die Blutentnahme erfolgte stets in der Spezialambulanz des Universitätsklinikums des Saarlandes, Klinik für Innere Medizin V, während der Spezialambulanzsprechzeiten montags, mittwochs und donnerstags zwischen 13:00 Uhr und 16:00 Uhr. Den zur routinemäßigen Verlaufskontrolle in der Ambulanz erscheinenden Patienten wurde zusätzlich zu der Routineblutentnahme, nach vorheriger Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung, zusätzlich ca. ein- bis anderthalb Milliliter Blut durch die Ambulanzschwestern entnommen. Die venöse Blutentnahme aus der Ellenbeuge erfolgte mittels eines herkömmlichen Butterfly-Venenpunktionssystems sowie einer mit 1 ml Heparin gespülten 2 ml Spritze. Zur Anonymisierung der Blutproben wurde die Kennung LL mit fortlaufender Durchnummerierung der Proben, zugeordnet zu dem jeweiligen Patienten, gewählt. Während des Transports zum Institut für Anatomie und Zellbiologie wurden die Proben in einer Styropor-Box auf Eis gelagert. Die Bearbeitung der Blutproben erfolgte analog der Kriterien des im unteren Abschnitt aufgeführten Test-Kits PHAGOTEST™ im Labor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, Homburg/Saar.

Die Blutentnahmen der Kontrollgruppe wurden im Labor des Anatomischen Instituts, Homburg/Saar durchgeführt. Das venöse Blut wurde entsprechend des im oberen Abschnitt beschriebenen Ablaufs entnommen.

3.5 Versuchsaufbau

Alle heparinisierten Vollblutproben wurden gemäß den Vorschriften des Test-Kits innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme bearbeitet. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt. Zur Phagozytosebestimmung wurde das standardisierte Test-Kit PHAGOTEST™ (Katalognummer 341060) der Firma Becton

Dickinson Bioscience Europe, Heidelberg verwendet. Die anschließende Messung der vorbereiteten Proben erfolgte mittels des Durchflusszytometers BD FACSCalibur.

3.5.1 PHAGOTEST™

Das Reagenzien-Kit PHAGOTEST™ wird angewandt zur quantitativen Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten in heparinisiertem Vollblut. Der Test basiert darauf, dass heparinisiertes Vollblut mit opsonierten, Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) markierten Escherichia coli-Bakterien (E. coli) inkubiert wird. Die fluoreszenzmarkierten Bakterien werden von den phagozytierenden Leukozyten aufgenommen und emittieren in der durchflusszytometrischen Analyse Signale, die detektiert und an eine Computer-Software übermittelt werden. Auf diese Weise kann die Anzahl phagozytischer Zellen in Prozent und die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle dargestellt und beurteilt werden.

Die folgende Tabelle zeigt die für den Test verwendeten Reagenzien:

Tabelle 3: Reagenzien des PHAGOTEST™

Reagenz	Beschreibung
A	Instamed-Salze zum Waschen
B	Opsonierte FITC-markierte E. coli Bakterien
C	Quenchlösung zum Abstoppen der Phagozytose
D	Lyselösung zur Entfernung von Erythrozyten
E	DNA-Färbelösung, um Aggregationsartefakte von Bakterien und Zellen zu verhindern

3.5.2 Testablauf

Im ersten Schritt wurde das heparinisierte humane Vollblut gemischt und pro Ansatz 100 µl in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach 10-minütiger Kühlung der Proben im Eiswasser auf 0°C, wurden zu allen Proben 20 µl der gekühlten und gründlich gemischten E. coli-Bakterienlösung gegeben. Die Bakterien wurden mittels Vortex und Pipette vor jeder Zugabe gemischt. Die Röhrchen wurden gemischt und alle Proben, außer die auf Eis verbleibende Kontrolle, wurden anschließend 10 min. in einem auf 37-37,1°C vorgeheizten, geschlossenen Wasserbad inkubiert. Zum Abstoppen der Phagozytose wurden die Proben nach 10 min. gleichzeitig auf Eis gestellt und nach der Zugabe von 100 µl eiskalter Quenclösung gemischt. Der anschließende Waschschrift erfolgte mittels 3 ml Waschlösung, kurzem Mischen und Zentrifugation. Der Überstand wurde entfernt und der Waschvorgang nochmals wiederholt. Zu den Proben wurde je Ansatz 2 ml Lyselösung auf Raumtemperatur gegeben, sie wurden gemischt und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 min. wurden die Röhrchen nach den unten genannten Einstellungen zentrifugiert, anschließend der Überstand entfernt. Es erfolgte ein letzter Waschschrift mit 3 ml Waschlösung, kurzem Mischen sowie Zentrifugation und Entfernen des Überstandes. Im letzten Schritt wurden zu jedem Ansatz 200 µl DNA-Färbelösung pipettiert, kurz gemischt und alle Ansätze 10 min. lichtgeschützt auf Eis gelagert. Alle Proben wurden bis zu ihrer Messung im lichtgeschützten Eisbad belassen und innerhalb der vorgesehenen 60 min. durchflusszytometrisch gemessen.

Alle Mischvorgänge wurden mittels Vortex durchgeführt. Das Eiswasserbad bestand aus zerstoßenem Eis und kaltem Wasser in einer lichtundurchlässigen Styroporbox mit Deckel. Das Wasserbad wurde vor dem Versuch auf 37-37,1°C vorgewärmt. Die Einstellungen der Zentrifuge betragen bei allen Vorgängen 300 x g, 4°, 5 min. Bei jedem Versuchsdurchgang wurde stets eine Eiskontrolle als Negativkontrolle zusätzlich bearbeitet und gemessen.

3.6 Grundlagen der Durchflusszytometrie

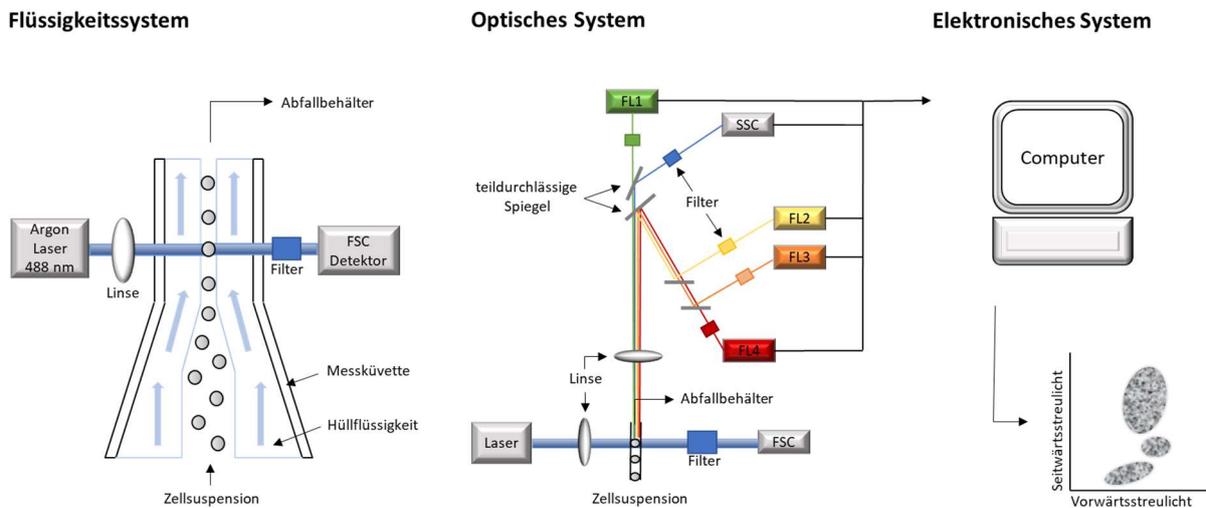


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Mit den drei Hauptkomponenten Flüssigkeitssystem, optisches- und elektronisches System. FSC = forward scatter, Vorwärtsstreulichtdetektor, SSC = side scatter, Seitwärtsstreulichtdetektor, FL1–4 = Fluoreszenzdetektoren.

In Abbildung 4 ist schematisch die Durchflusszytometrie, ein gekoppeltes optisch-elektronisches Verfahren, welches zur Analyse der Größe, Granularität bzw. Komplexität und Fluoreszenz verschiedener Zellen verwendet wird, dargestellt. Zu den drei Hauptkomponenten des Durchflusszytometers zählen das Flüssigkeitssystem, das optische- sowie das elektronische System. Die Messung beruht darauf, dass eine Zellsuspension, umgeben von einer Hüllflüssigkeit, durch eine Messküvette geleitet wird, in der jede Zelle einzeln einen Laserstrahl passiert und durch diesen angeregt wird. Bei dem BD FACSCalibur wird hierzu ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet. Aufgrund der verschiedenen Eigenschaften der Zellen wird der einfallende Laserstrahl in unterschiedliche Richtungen gelenkt. Dabei können pro Zelle bis zu 5 Parameter detektiert werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) dient zur Bestimmung der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter), welches in einem Winkel von ca. 90° detektiert wird, zur Bestimmung der Granularität der Zelle sowie zur Messung der Fluoreszenzen. Es ist möglich die Zelle selbst oder weitere Zellbestandteile mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper zu koppeln. Typische Fluorochrome sind beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex (PerCp), die den eintreffenden Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und in einer neuen, charakteristischen Wellenlänge emittieren. Das emittierte Licht wird durch

verschiedene optische Filter, Linsen und Spiegel gelenkt und durch Detektoren (Photomultiplier) erfasst. Fluoreszenz 1 (FL1) detektiert Wellenlängen um 530 nm (Grün), Fluoreszenz 2 (FL2) von 580 nm (Gelb-orange) und Fluoreszenz 3 und 4 (FL3 und FL4) von > 640 nm (Rot). Das optische Signal wird anschließend linear bzw. logarithmisch verstärkt, in ein entsprechendes elektronisches Signal umgewandelt und an ein Computerprogramm übermittelt. Die gemessenen Rohdaten werden dort in einer Tabelle, einem sogenannten ListMode File, gespeichert und können in verschiedenen Grafiken dargestellt werden.

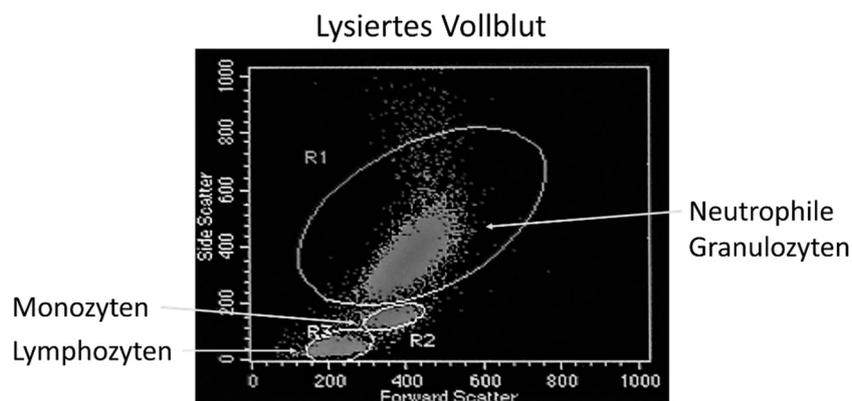


Abbildung 5: Beispiel einer Dot Plot Darstellung

Mit Gating (R1-3) der einzelnen Zellsubpopulationen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Ordinate: Forward Scatter (FSC, Vorwärtsstreulicht), Abszisse: Side Scatter (SSC, Seitwärtsstreulicht).

Üblich sind Darstellungen der Ergebnisse als Dot Plot oder Histogramm. Bei der Dot Plot-Darstellung wird jede Zelle einzeln als Punkt aufgetragen, in der obigen Abbildung je nach gemessener Zellgröße (FCS, Vorwärtsstreulicht) und Komplexität der Zelle (SSC, Seitwärtsstreulicht). Hierdurch lassen sich die einzelnen Zell-Subpopulationen aufgrund ähnlicher Streueigenschaften auch ohne weitere Markierung voneinander unterscheiden.

Desweiteren ist es möglich im Dot Plot ein Gate, eine Begrenzung, auf eine bestimmte Zellpopulation zu setzen. Dieses Gate, auch als Region (R) bezeichnet, lässt sich erneut entweder als Dot Plot oder auch als Histogramm darstellen. Bei der Dot Plot Darstellung einer eingegrenzten Zellpopulationen wird das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen das Fluoreszenzsignal aufgetragen. Bei der Histogramm Darstellung wird die in einem einzigen Kanal erfasste Intensität, in diesem Falle die FITC-Intensität, gegen die Anzahl der erfassten Ereignisse aufgetragen. Durch das Setzen von Markern kann der prozentuale Anteil der Zellen, die phagozytieren und deren mittlere Fluoreszenzintensität durch die Analysesoftware

berechnet werden. Diese Werte werden in einer separaten Tabelle angezeigt. Der GeoMean-Wert entspricht dabei der mittleren Fluoreszenzintensität und stellt die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro einzelner phagozytischer Leukozyt dar.

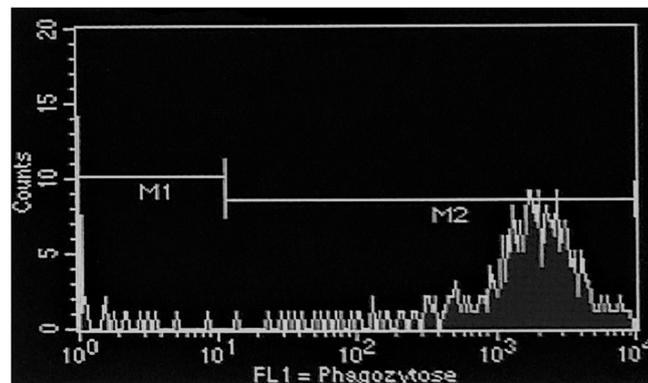


Abbildung 6: Beispiel einer Histogramm Darstellung

Mit Marker 1 (M1) = Eiskontrolle und Marker 2 (M2) = fluoreszierende Probe. Abszisse: Counts = Anzahl der Ereignisse (Zellen), Ordinate: FL1 = Fluoreszenz (FITC)-Intensität, entspricht in diesem Fall der Phagozytose.

3.7 Stimulationsversuche

In einem weiteren Versuch sollte eruiert werden, ob eine experimentelle Stimulation des Immunsystems im Blut Einfluss auf die Phagozytoseaktivität von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nehmen kann. Hierzu wurden zunächst in einem Pilotversuch verschiedene Bakterienbestandteile bzw. Immunstimulanzien mit venösem Vollblut einer gesunden Testperson einmal 4 h und einmal 16 h inkubiert, mittels PHAGOTEST™ bearbeitet und durchflusszytometrisch gemessen. Aufgrund dessen, dass sich bei bestimmten Stimulanzien (LPS 100 ng/ml, MALP-2 1ng/ml) veränderte Werte hinsichtlich der Phagozytose zeigten, wurde der Test mit diesen Substanzen um drei gesunde Testpersonen erweitert.

Als Stimulanzien wurden verschiedene, beispielsweise im Rahmen von Infektionen auftretende, das Immunsystem modulierende Zusätze verwendet, die im Folgenden kurz näher erläutert werden.

Proleukin® (Aldesleukin), gentechnisch aus *E. coli* gewonnen, gehört der Gruppe der Peptidhormone an. Es ist dem körpereigenen Interleukin-2 sehr ähnlich, welches im Körper von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet wird. Es aktiviert weitere T- und B-Zellen, NK-Zellen und erhöht zudem die Zytotoxizität in Makrophagen.

Lipopolysaccharide (LPS), aus *Salmonella typhimurium* gewonnen, sind chemische Verbindungen, welche in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorkommen. Sie setzen sich aus Fett- und Zuckereinheiten zusammen. Im Organismus haben diese Bakterienbestandteile ihre Wirkung als Antigene. Serologisch können sie bestimmten Bakterien zugeordnet werden. Sie werden bei Infektionen erkannt und vom Immunsystem bekämpft.

Makrophagen aktivierendes Antigen-2 (MALP-2) bindet als Agonist an Toll-like-Rezeptoren 2/6 (TLR 2/6). MALP-2 verstärkt die Zusammenarbeit zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem (Makrophagen, dendritische Zellen, Lymphozyten). Es verstärkt außerdem die Bildung von Antikörpern und aktiviert Zellen, die den TLR 2/6 tragen, unter anderem Makrophagen und dendritische Zellen.

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ist ein Proteinkinase C Aktivator, welcher unter anderem beteiligt ist an der Gentranskription, dem Zellwachstum, der Differenzierung, dem programmierten Zelltod und immunologischen Signalwegen.

Die verwendeten Stimulanzien umfassten LPS in drei verschiedenen Konzentrationen, sowie jeweils einen Ansatz mit der Zugabe von MALP-2, Proleukin® und PMA. Zu Beginn wurden Vorverdünnungen der Stimulanzien hergestellt, die anschließend zum Blut pipettiert wurden, um die gewünschten Endkonzentrationen zu erhalten.

Es wurden folgende Substanzen mit den entsprechenden Endkonzentrationen im Blut verwendet:

Tabelle 4: Verwendete Stimulanzien mit den dazugehörigen Konzentrationen ihrer Stocklösung und den gewünschten Endkonzentrationen im Blut

Substanz	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration im Blut
LPS	1 mg/ml	1) 1 ng/ml 2) 10 ng/ml 3) 100 ng/ml
MALP-2	1 mg/ml	1 ng/ml
PMA	1 mg/ml	50 ng/ml
Proleukin®	18 Mio. I.E./ml	200.000 I.E./ml

3.7.1 Herstellung der Vorverdünnungen

Das Proleukin® lag in Pulverform vor und wurde gemäß des Datenblattes in 1,2 ml Wasser gelöst. Diese Lösung enthielt 18 Mio. I.E./ml, sodass eine Gesamtverdünnung von 1:90 benötigt wurde um die gewünschte Endkonzentration des Proleukins® im Blut von 200.000 I.E./ml zu erhalten. Von den 1,2 ml wurde 1 ml abgefüllt um davon eine 1:9 Vorverdünnung, durch Zugabe von 5 µl Proleukin®-Lösung zu 40 µl PBS (phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Salzlösung), herzustellen.

Zur Herstellung der drei verschiedenen LPS-Endkonzentrationen im Blut wurde die Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml schrittweise verdünnt. Um eine Endkonzentration im Blut von LPS 100 ng/ml zu erhalten war eine Gesamtverdünnung von 1:10.000 nötig, für eine Endkonzentration im Blut von LPS 10 ng/ml eine Gesamtverdünnung von 1:100.000 und für eine Endkonzentration im Blut von LPS 1 ng/ml eine Gesamtverdünnung von 1:1.000.000. Zu Beginn erfolgte eine 1:1.000 Vorverdünnung mit 2 µl Stocklösung zu 1.998 µl PBS. Von dieser Vorverdünnung wurden 10 µl zu 90 µl PBS gegeben für eine Verdünnung von 1:10.000. Von dieser Vorverdünnung wurden wiederum 10 µl zu 90 µl PBS pipettiert um auf eine Verdünnung von 1:100.000 zu gelangen.

Die Herstellung der Vorverdünnung für eine Endkonzentration des MALP-2 von 1 ng/ml im Blut mit einer Stocklösung von 1 mg/ml wurde entsprechend der LPS-Verdünnung durchgeführt.

Von der PMA-Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurden 2 µl zu 3.998 µl PBS gegeben, davon wiederum 10 µl zu 90 µl Blut um eine Konzentration von 50 ng/ml bzw. eine Gesamtverdünnung von 1:20.000 zu erhalten.

3.7.2 Versuchsdurchführung

Von den Vorverdünnungen wurden jeweils 10 µl zu 90 µl Blut gegeben, sodass durch die 1:10 Verdünnung die jeweils gewünschten Endkonzentrationen im Blut und ein Endvolumen von 100 µl für den PHAGOTEST™ erreicht wurden. Das venöse Blut wurde morgens um 8:30 Uhr aus der Ellenbeuge der Testperson entnommen und direkt mit den vorbereiteten Vorverdünnungen gemischt. Es wurden insgesamt acht Ansätze für die 4 h-Inkubation bei

Raumtemperatur hergestellt. Darunter sechs Ansätze mit Stimulanzen sowie ein Ansatz ohne Zusatz und eine Eiskontrolle. Um 13:30 Uhr wurden die Proben mittels PHAGOTEST™ bearbeitet und durchflusszytometrisch gemessen. Das restliche Blut wurde bis zur Herstellung der zweiten Ansätze für die 16 h Inkubation im Kühlschrank bei 6 °C aufbewahrt. Um 16:00 Uhr wurden auf die oben beschriebene Weise erneut acht Ansätze hergestellt, die bis um 8:00 Uhr des nächsten Tages bei Raumtemperatur inkubierten. Die Proben wurden anschließend mittels PHAGOTEST™ bearbeitet und durchflusszytometrisch analysiert.

Da sich in der Auswertung des Pilotversuchs insbesondere in der LPS 100 ng/ml- und MALP-2-Gruppe des ersten Durchgangs erhöhte Phagozytosewerte zeigten, wurden drei weitere Blutproben gesunder Probanden mit diesen Stimulanzen getestet. Die drei Probanden waren bereits Bestandteil der Kontrollgruppe. Die Blutproben wurden am selben Tag gegen 8:00 Uhr entnommen und für die 4 h-Inkubation um 8:30 Uhr, für die 16 h-Inkubation um 16:00 Uhr mit den Vorverdünnungen wie oben beschrieben gemischt. Es wurden sowohl bei der 4 h-Inkubation als auch bei der 16 h-Inkubation pro Probanden je drei Röhrchen angesetzt. Ein Röhrchen mit LPS 100 ng/ml-Zusatz, eins mit MALP-2 1 ng/ml-Zusatz sowie eine Probe ohne Zusatz. Weiterhin wurde je eine Eiskontrolle angesetzt. Für die Ansätze wurden die Vorverdünnungen des Pilotversuchs verwendet und vor der Weiterverarbeitung gründlich mittels Vortex und Pipette gemischt. Zu 90 µl Blut wurden 10 µl des jeweiligen Immunmodulators pipettiert um die Gesamtkonzentration von LPS 100 ng/ml und MALP-2 1 ng/ml, sowie ein Volumen von 100 µl für den Phagotest zu erhalten. Die Inkubationszeiten bei Raumtemperatur sowie die anschließende Bearbeitung und Analyse der Proben erfolgten analog des Pilotversuchs.

3.8 Datenverarbeitung und statistische Analyse

Die durchflusszytometrisch gemessenen Prozentwerte der phagozytierenden Neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie deren GeoMean-Werte wurden in die Tabellenkalkulationssoftware Excel (Microsoft Office 2016) eingegeben. Zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung wurden die in Excel erstellten Tabellen in SPSS (IBM SPSS Statistics 25) übertragen. Es wurde zunächst ein Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppe durchgeführt. Als Test auf Normalverteilung wurden der Kolmogorov-Smirnov

Test sowie der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Sowohl die Tests als auch die dazugehörigen Diagramme ergaben keinen Hinweis auf Normalverteilung. Da es sich um nicht normalverteilte, unverbundene Gruppen mit quantitativen Merkmalen handelte, wurde zum Vergleich der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt.

Für einzelne Vergleiche bestimmter Merkmale und Phagozytose-Werte innerhalb der Patientengruppen wurde eine deskriptive Statistik verwendet. Auf der Basis verschiedener Merkmale wurde die Patientengruppe in Subgruppen eingeteilt, welche miteinander hinsichtlich ihrer Phagozytosewerte verglichen wurden. Es wurden Gruppenvergleiche bezüglich der Leukozytenzahl im Blut, des CRP-Werts sowie der vorherrschenden Keimbesiedlung in der Lunge durchgeführt. Die Patientendaten (Alter, Geschlecht, genetischer Hintergrund) und die entsprechenden Laborwerte wurde aus der jeweiligen Patientenakte entnommen (siehe Anhang 2). Die stets nicht normalverteilten Gruppen wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Zur Analyse einer Korrelation zwischen Leukozytenzahl im Blut der Patienten und deren Phagozytosewerten bzw. zwischen dem CRP-Wert und den Phagozytosewerten wurde der Test nach Spearman angewendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ als statistisch signifikant festgesetzt.

Für die statistische Auswertung der Stimulationsversuche mit einer Probandenanzahl von $n=4$ wurde eine deskriptive Statistik gewählt. Es wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Grunddaten der Patienten- und Kontrollgruppe

Tabelle 5: Daten der Patienten- und Kontrollgruppe mit Anzahl der Fälle (n), Geschlechterverteilung und Alter in Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Gruppe	Fälle	Geschlecht	Alter in Jahren
CF-Patienten	n=35	weiblich=19 männlich=16	28 \pm 6,62
Gesunde Kontrollgruppe	n=12	weiblich=9 männlich=3	30 \pm 11,99

Tabelle 5 zeigt die Grunddaten der beiden gemessenen Gruppen. Die Patientengruppe umfasste 35 Mukoviszidose-Patienten sowie eine Kontrollgruppe von 12 Personen. Unter den CF-Patienten waren 19 Frauen und 16 Männer, zwischen 18 und 54 Jahren. Im Schnitt waren die CF-Patienten 28 Jahre alt (SD 6,62). In der Kontrollgruppe waren es 9 weibliche und 3 männliche Personen im Alter von 22 bis 54 Jahre. Im Schnitt war die Kontrollgruppe 30 Jahre alt (SD 11,99).

4.2 Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppe

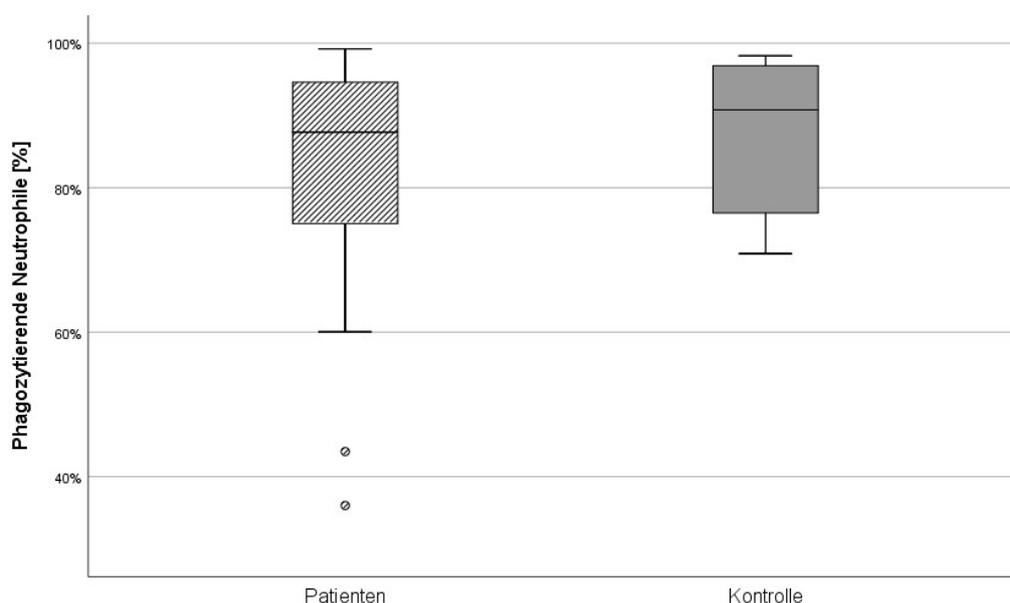


Abbildung 7: Box Plot der Anzahl phagozytierender Neutrophiler [%]

Mit den Gruppen Patienten (n=35) und Kontrolle (n=12). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum sowie Ausreißer (°).

Tabelle 6: Deskriptive Statistik phagozytierender Neutrophiler der Gruppen Patienten und Kontrolle mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
Patienten	84%	15%	88%	75%	95%
Kontrolle	87%	10%	91%	77%	97%

Betrachtet man den prozentualen Anteil der phagozytierenden Neutrophilen im Gruppenvergleich, so sind keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen ($p=0,558$). Es zeigte sich, dass der Mittelwert sowie der Median bei der Kontrollgruppe nur unbedeutend höher ausfielen als in der Patientengruppe.

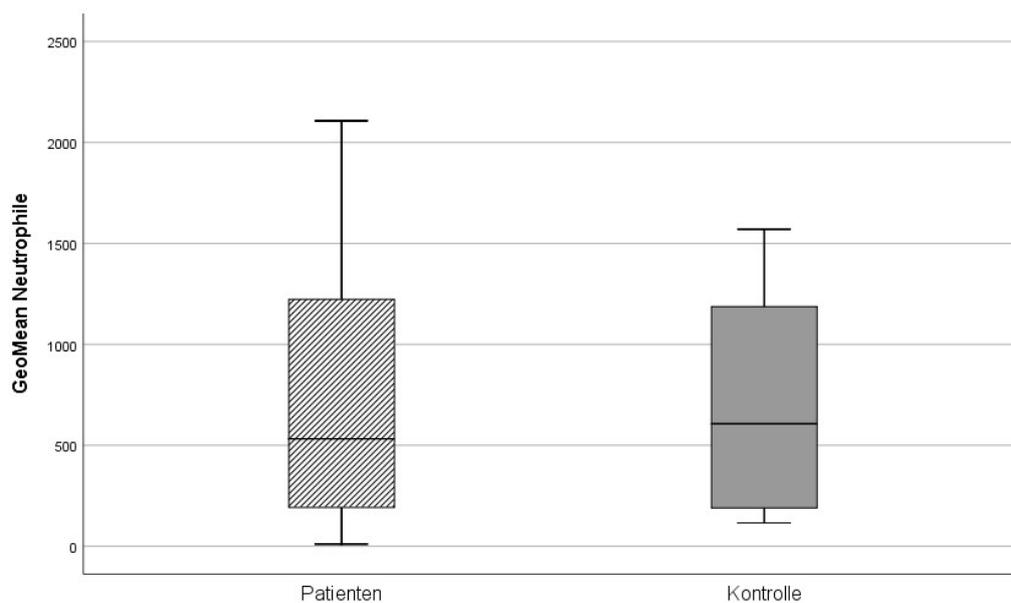


Abbildung 8: Box Plot der GeoMean-Werte der Neutrophilen

Mit den Gruppen Patienten (n=35) und Kontrolle (n=12). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum.

Tabelle 7: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Neutrophilen der Gruppen Patienten und Kontrolle mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
Patienten	763	651	532	182	1.293
Kontrolle	670	528	607	190	1.187

Bei der Auswertung der GeoMean-Werte der Neutrophilen ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf Patienten- und Kontrollgruppe ($p=0,981$).

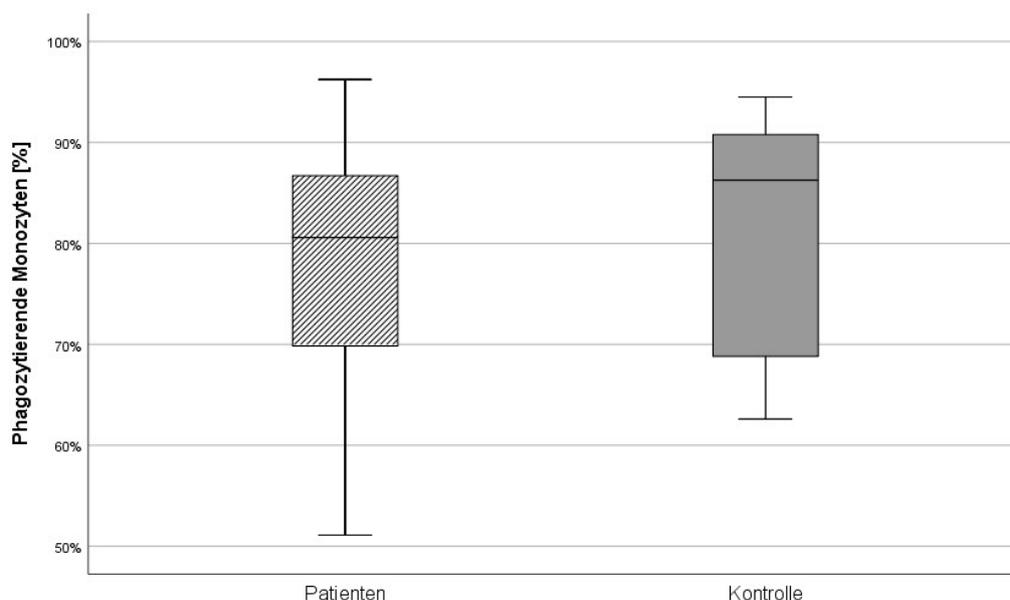


Abbildung 9: Box Plot der Anzahl phagozytierender Monozyten [%]

Mit den Gruppen Patienten (n=35) und Kontrolle (n=12). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum.

Tabelle 8: Deskriptive Statistik phagozytierender Monozyten der Gruppen Patienten und Kontrolle mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
Patienten	79%	12%	81%	69%	88%
Kontrolle	81%	12%	86%	69%	91%

Bei Betrachtung des statistischen Vergleichs ließen sich keine signifikanten Gruppenunterschiede hinsichtlich der phagozytierenden Monozyten darstellen ($p=0,591$). Die Werte fielen für beide Gruppen ähnlich aus.

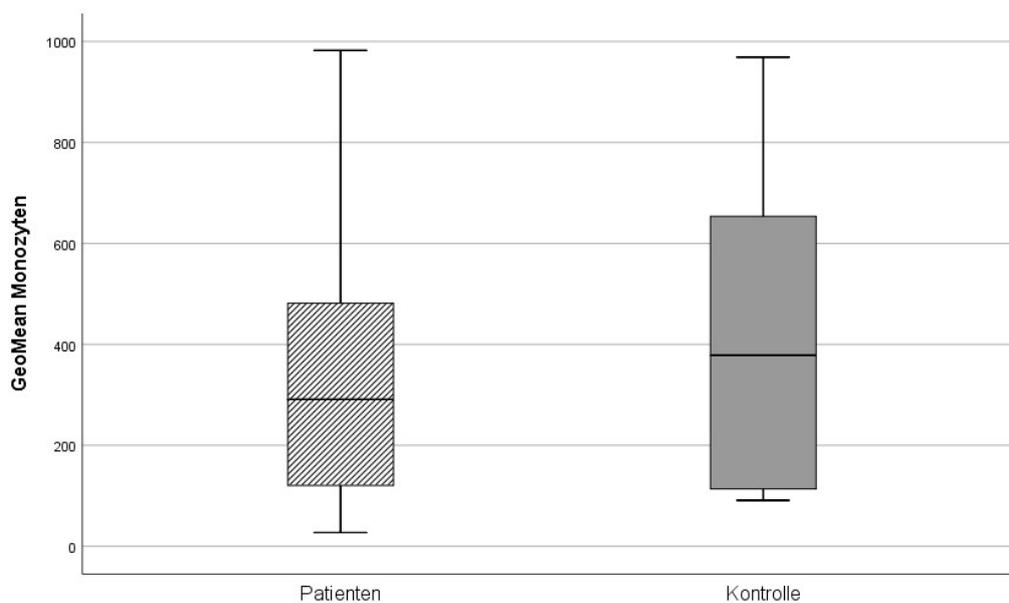


Abbildung 10: Box Plot der GeoMean-Werte der Monozyten

Mit den Gruppen Patienten (n=35) und Kontrolle (n=12). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum.

Tabelle 9: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Monozyten der Gruppen Patienten und Kontrolle mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
Patienten	356	275	291	117	504
Kontrolle	415	299	378	114	654

Im statistischen Vergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,591$). Die GeoMean-Werte der Monozyten fielen in der Kontrollgruppe geringfügig höher aus als in der Patientengruppe.

4.3 Vergleiche innerhalb der Patientengruppe

Die Phagozytosewerte der an Zystischer Fibrose erkrankten Patienten wurden innerhalb der CF-Gruppe nochmals bezüglich verschiedener Parameter verglichen. Als Vergleich wurde zum einen die Leukozytenzahl sowie der CRP-Wert im Blut als Marker für das aktuelle Entzündungsgeschehen im Körper der Patienten herangezogen. Zum anderen wurde die aktuelle bakterielle Besiedlung der Lunge in Hinblick auf die Phagozytoseaktivität innerhalb der Patientenkohorte verglichen (siehe Anhang 2).

4.3.1 Vergleich der Leukozytenzahl und der Phagozytosewerte

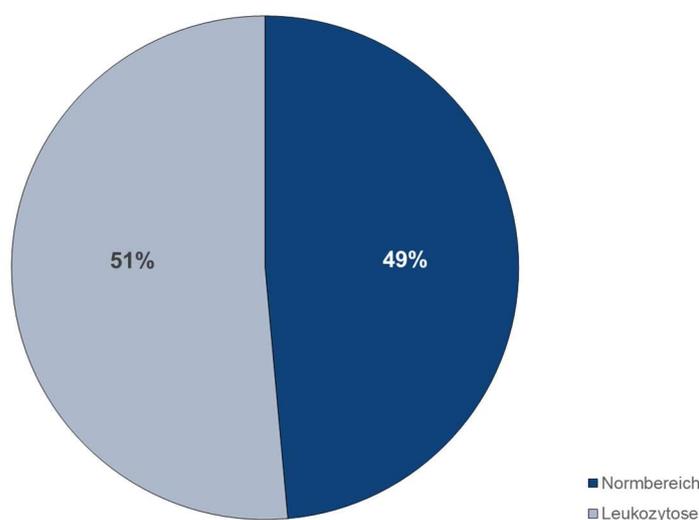


Abbildung 11: Kreisdiagramm der Leukozytenzahl mit den Gruppen Normbereich (n=17) und Leukozytose (n=18)

Die Patientengruppe wurde anhand der Leukozytenzahl im Blut in zwei Gruppen eingeteilt (Abb. 11). Die Gruppe Normbereich (n=17) umfasste alle Patienten mit einer Leukozytenzahl zwischen $3,9-10,2 \times 10^9/l$, die Gruppe Leukozytose (n=18) umfasste alle Patienten mit einer Leukozytenzahl $>10,2 \times 10^9/l$. Die nicht normalverteilten Gruppen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich der Phagozytoseaktivität von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten verglichen. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt. Die Einteilung der Gruppen erfolgte auf Grundlage der gemessenen Routinelaborwerte der Leukozyten des jeweiligen Tages der Blutentnahme.

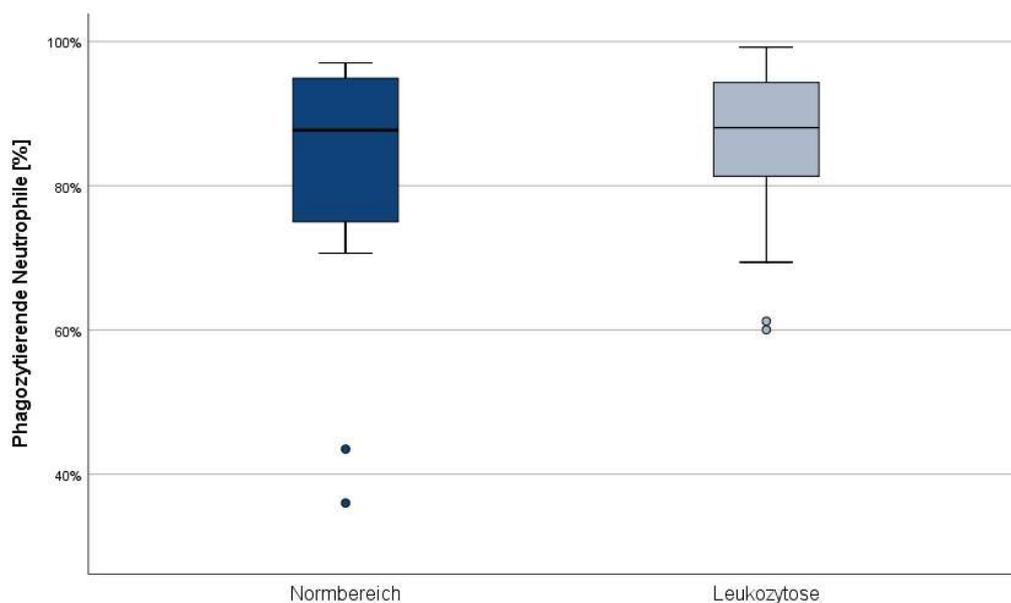


Abbildung 12: Box Plot mit der Anzahl phagozytierender Neutrophiler [%] getrennt nach unterschiedlicher Leukozytenzahl

Mit den Gruppen Normbereich (n=17) und Leukozytose (n=18). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum sowie Ausreißer (°).

Tabelle 10: Deskriptive Statistik phagozytierender Neutrophiler der Gruppen Normbereich und Leukozytose mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
Normbereich	82%	18%	88%	75%	95%
Leukozytose	85%	12%	88%	81%	94%

In der Auswertung der phagozytierenden Neutrophilen [%] ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich darstellen (p=0,782).

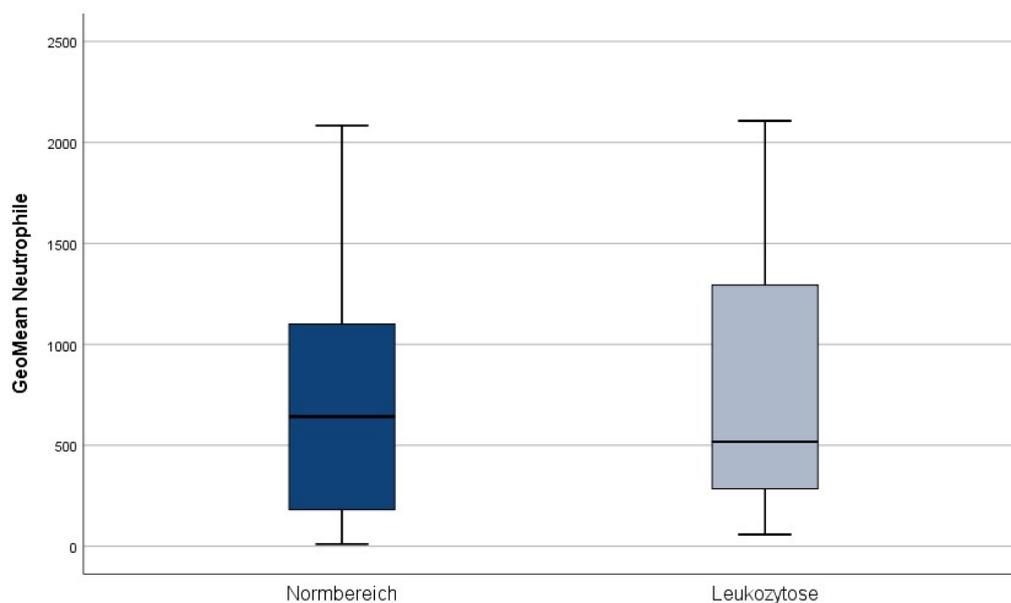


Abbildung 13: Box Plot der GeoMean-Werte Neutrophiler getrennt nach unterschiedlicher Leukozytenzahl

Mit den Gruppen Normbereich (n=17) und Leukozytose (n=18). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum.

Tabelle 11: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Neutrophilen der Gruppen Normbereich und Leukozytose mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
Normbereich	737	631	642	182	1.100
Leukozytose	788	686	518	285	1.293

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich der GeoMean-Werte der Neutrophilen ($p=0,782$).

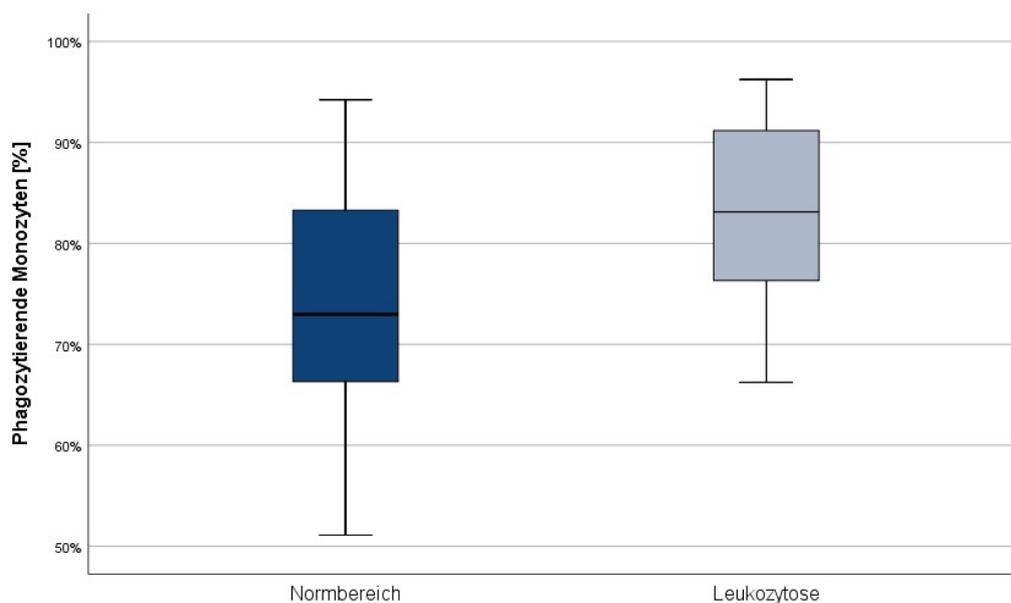


Abbildung 14: Box Plot mit der Anzahl phagozytierender Monozyten [%] getrennt nach unterschiedlicher Leukozytenzahl

Mit den Gruppen Normbereich (n= 17) und Leukozytose (n=18). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum.

Tabelle 12: Deskriptive Statistik phagozytierender Monozyten der Gruppen Normbereich und Leukozytose mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
Normbereich	74%	13%	73%	66%	83%
Leukozytose	83%	10%	83%	76%	91%

Bei Betrachtung der phagozytierenden Monozyten [%] ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich darstellen ($p=0,067$).

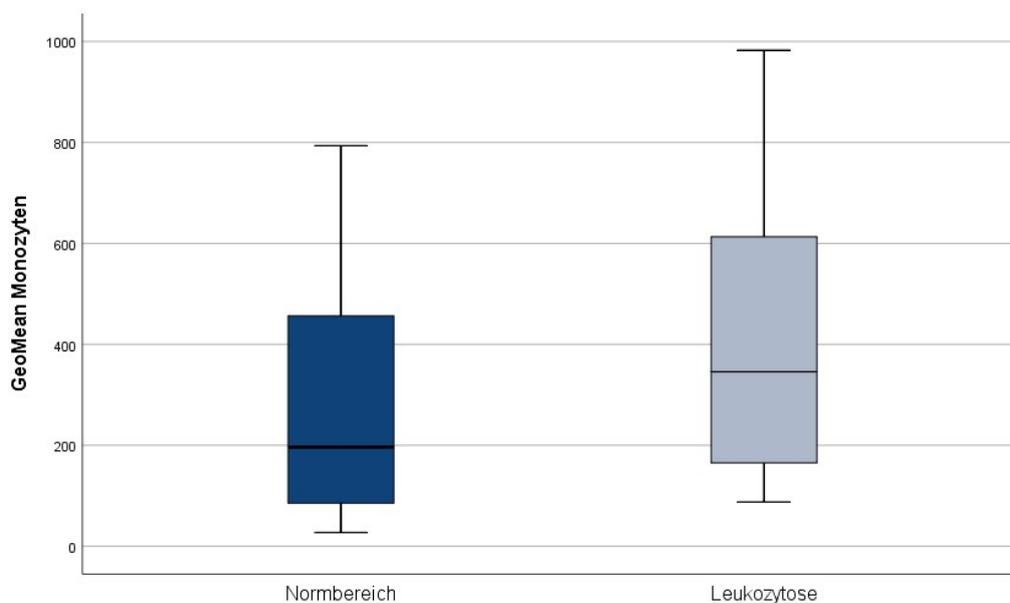


Abbildung 15: Box Plot der GeoMean-Werte der Monozyten getrennt nach unterschiedlicher Leukozytenzahl

Mit den Gruppen Normbereich (n=17) und Leukozytose (n=18). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum.

Tabelle 13: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Monozyten der Gruppen Normbereich und Leukozytose mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
Normbereich	292	258	196	86	456
Leukozytose	416	285	346	165	613

Die statistische Auswertung der GeoMean-Werte der Monozyten ergab keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich ($p=0,126$).

Insgesamt zeigten sich für die Neutrophilen und Monozyten bei allen Vergleichen der Phagozytosewerte der Gruppen Normbereich und Leukozytose ähnliche Werte.

4.3.1.1. Korrelation von Leukozytenzahl und Phagozytose-Werten

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und den Phagozytosewerten darzustellen, wurde der Test nach Spearman angewandt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ angegeben. Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Phagozytosewerten und der Leukozytenzahl dargestellt werden (phagozytierende Neutrophile $p = 0,745$; GeoMean Neutrophile $p = 0,753$; Phagozytierende Monozyten $p = 0,022$; GeoMean Monozyten $p = 0,078$).

4.3.2 Vergleich der CRP- und Phagozytosewerte

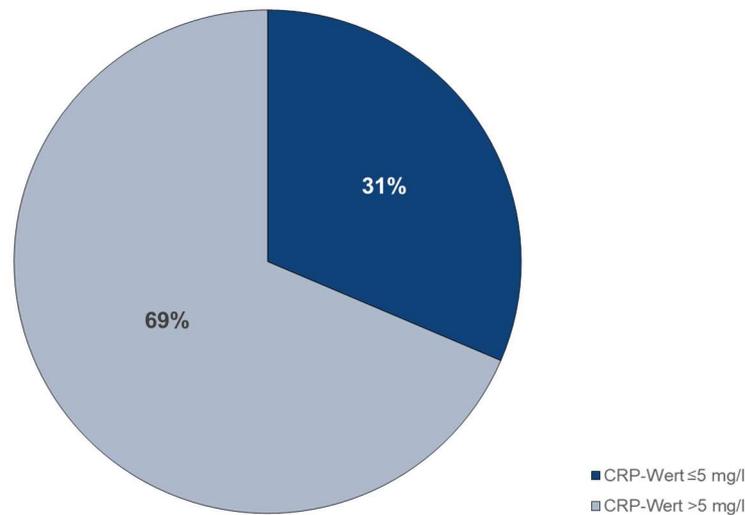


Abbildung 16: Kreisdiagramm mit der Gruppeneinteilung anhand des CRP-Wertes in CRP-Wert ≤ 5 mg/l (n=11) und CRP-Wert > 5 mg/l (n=24)

Die Patientengruppe wurde anhand des CRP-Wertes in zwei Gruppen eingeteilt (Abb. 16). Die Gruppeneinteilung erfolgte auf Grundlage der an dem jeweiligen Tag der Blutentnahme gemessenen CRP-Werte des abgenommenen Routinelabors. Die erste Gruppe umfasste alle Patienten mit einem CRP-Wert ≤ 5 mg/l (n=11), was dem Normbereich entspricht. Die zweite Gruppe schloss alle Patienten mit einem CRP-Wert > 5 mg/l (n=24) ein, welcher auf ein erhöhtes Entzündungsgeschehen im Körper hindeutet. Die nicht normalverteilten Gruppen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich der Phagozytoseaktivität von Neutrophilen und Monozyten verglichen. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

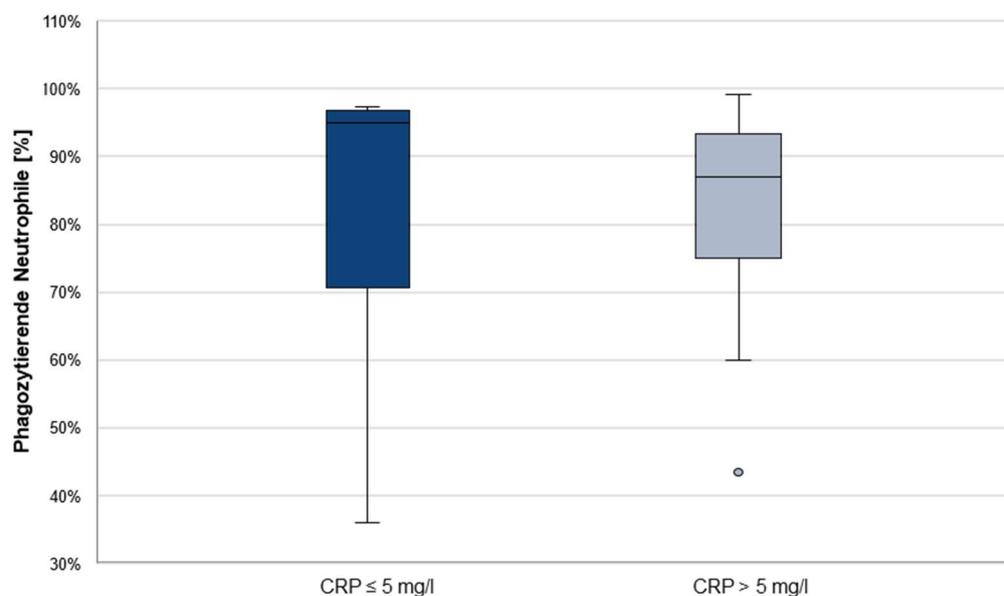


Abbildung 17: Box Plot mit der Anzahl phagozytierender Neutrophiler [%] getrennt nach unterschiedlichem CRP-Wert

Mit den Gruppen CRP ≤5 mg/l (n=11) und CRP >5 mg/l (n=24). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum sowie Ausreißer (°).

Tabelle 14: Deskriptive Statistik phagozytierender Neutrophiler der Gruppen CRP ≤5 mg/l und CRP >5 mg/l mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
≤5 mg/l	84%	19%	95%	71%	97%
>5 mg/l	83%	14%	87%	75%	93%

In der Auswertung der phagozytierenden Neutrophilen [%] ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich darstellen (p=0,390).

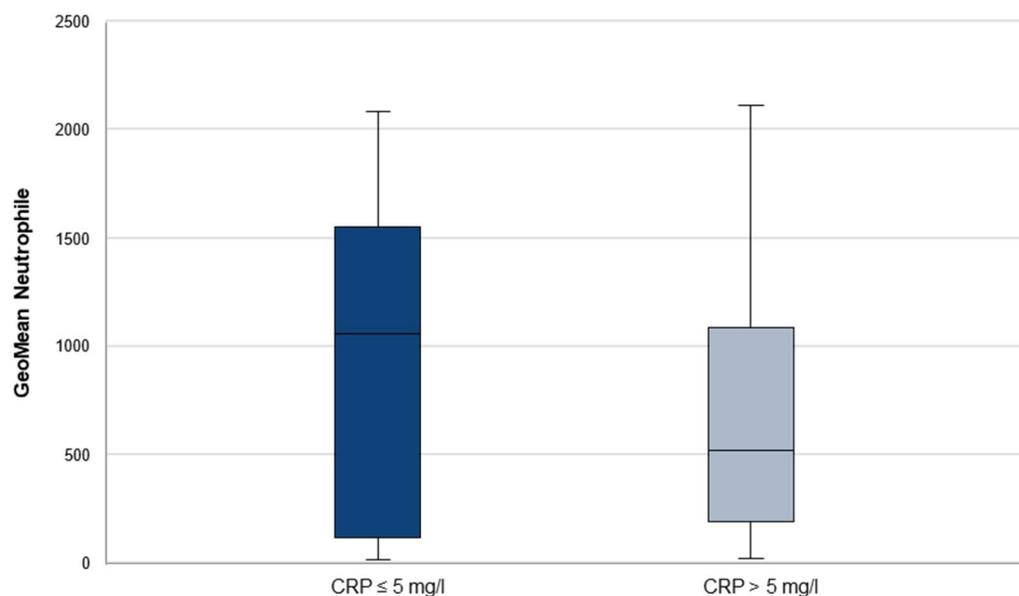


Abbildung 18: Box Plot mit den GeoMean-Werten Neutrophiler getrennt nach unterschiedlichem CRP-Wert

Mit den Gruppen CRP \leq 5 mg/l (n=11) und CRP $>$ 5 mg/l (n=24). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum.

Tabelle 15: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Neutrophilen der Gruppen CRP \leq 5 mg/l und CRP $>$ 5 mg/l mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
\leq 5 mg/l	931	750	1.055	114	1.549
$>$ 5 mg/l	686	601	518	192	1.073

Bei den GeoMean-Werten der Neutrophilen konnte in der Auswertung kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,517$).

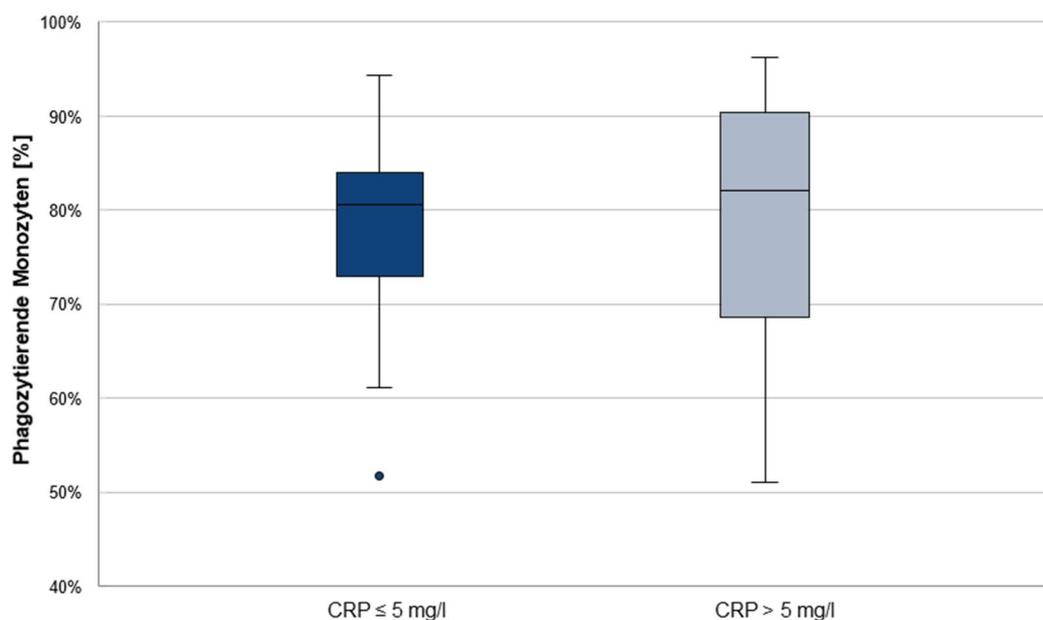


Abbildung 19: Box Plot mit der Anzahl phagozytischer Monozyten [%] getrennt nach unterschiedlichem CRP-Wert

Mit den Gruppen CRP ≤ 5 mg/l (n=11) und CRP > 5 mg/l (n=24). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum sowie Ausreißer (°).

Tabelle 16: Deskriptive Statistik phagozytischer Monozyten der Gruppen CRP ≤ 5 mg/l und CRP > 5 mg/l mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
≤ 5 mg/l	78%	12%	81%	73%	84%
> 5 mg/l	79%	12%	82%	69%	90%

Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich hinsichtlich der phagozytischen Monozyten [%] (p=0,847).

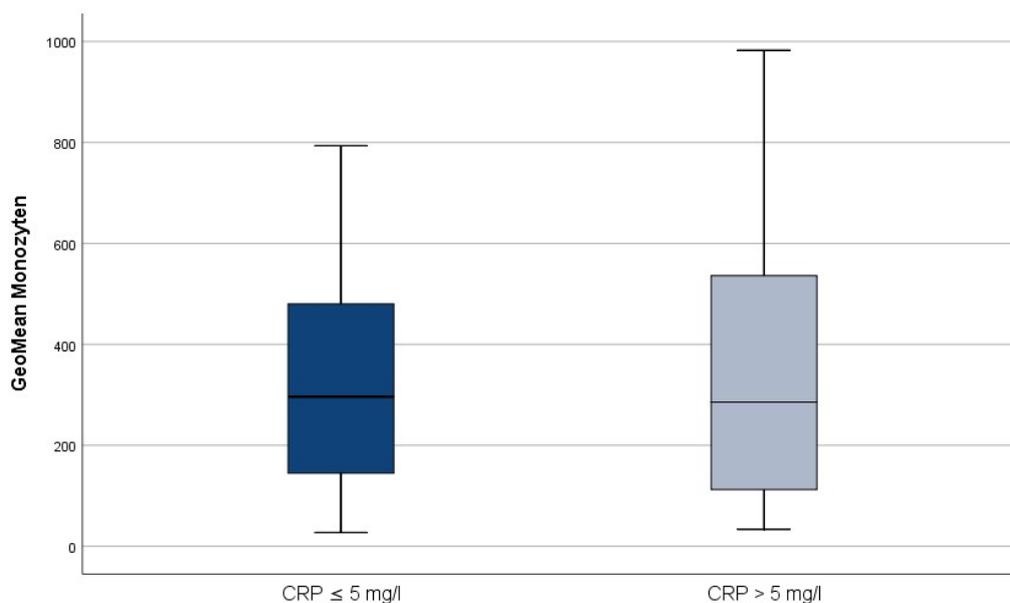


Abbildung 20: Box Plot mit den GeoMean-Werten der Monozyten getrennt nach unterschiedlichem CRP-Wert

Mit den Gruppen CRP ≤5 mg/l (n=11) und CRP >5 mg/l (n=24). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum.

Tabelle 17: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Monozyten der Gruppen CRP ≤5 mg/l und CRP >5 mg/l mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
≤5 mg/l	343	257	296	124	504
>5 mg/l	362	289	286	113	536

Die Auswertung der GeoMean-Werte der Monozyten stellte keine statistisch signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich dar ($p=1,00$).

Insgesamt zeigten sich für die Neutrophilen und Monozyten bei allen Vergleichen der Phagozytosewerte der Gruppen CRP ≤5 mg/l und CRP >5 mg/l ähnlich hohe Werte.

4.3.2.1 Korrelation von CRP-Wert und Phagozytoseaktivität

Zur Darstellung einer möglichen Korrelation zwischen dem CRP-Wert im Blut der CF-Patienten und den gemessenen Phagozytosewerten diente der Test nach Spearman. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ festgelegt. In der Auswertung ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Phagozytosewerten und dem CRP-Wert im Blut (phagozytierende Neutrophile $p = 0,214$; GeoMean Neutrophile $p = 0,280$, Phagozytierende Monozyten $p = 0,964$; GeoMean Monozyten $p = 0,692$).

4.3.3 Vergleich der Keimbesiedlung und der Phagozytosewerte

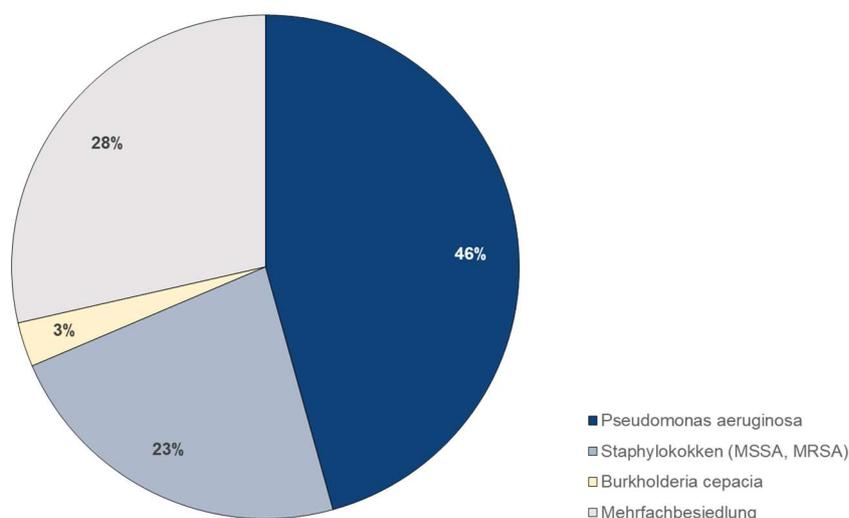


Abbildung 21: Kreisdiagramm der Keimbesiedlung innerhalb der Patientengruppe

Mit den Gruppen *Pseudomonas aeruginosa* (n=16), Staphylokokken (MSSA, MRSA) (n=8), *Burkholderia cepacia* (n=1), Mehrfachbesiedlung (n=6)

Die Patienten wurden in Hinblick auf die Keimbesiedlung in unterschiedliche Gruppen eingeteilt (Abb. 21). Der Großteil der Patienten verzeichnete eine Einzelbesiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE) (n=16) oder Staphylokokken (Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus* (MSSA), Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)) (n=8). Auch *Burkholderia cepacia* kam einzeln vor (n=1). Bei einigen der Erkrankten konnte eine Mehrfachbesiedlung mit einer Mischflora aus *Pseudomonas aeruginosa* oder Staphylokokken und *Stenothrophomonas maltophilia* (n=2), *Scedosporium prolificans* (n=1), *Scedosporium apiospermum* (n=1), *Burkholderia gladioli* (n=1) oder *E. coli* (n=1) nachgewiesen werden. Auch Mischinfektionen, lediglich aus *Pseudomonas aeruginosa* und Staphylokokken bestehend, lagen vor (n=4).

Da sich bei der Keimbesiedlung insgesamt ein recht heterogenes Bild darstellte, konzentrierte sich die statistische Auswertung vorwiegend auf die zwei bedeutendsten Gruppen im Zusammenhang mit der Zystischen Fibrose, *Pseudomonas aeruginosa* (n=16) und Staphylokokken (MRSA, MSSA) (n=8), welche bezüglich ihrer Phagozytosewerte miteinander verglichen wurden.

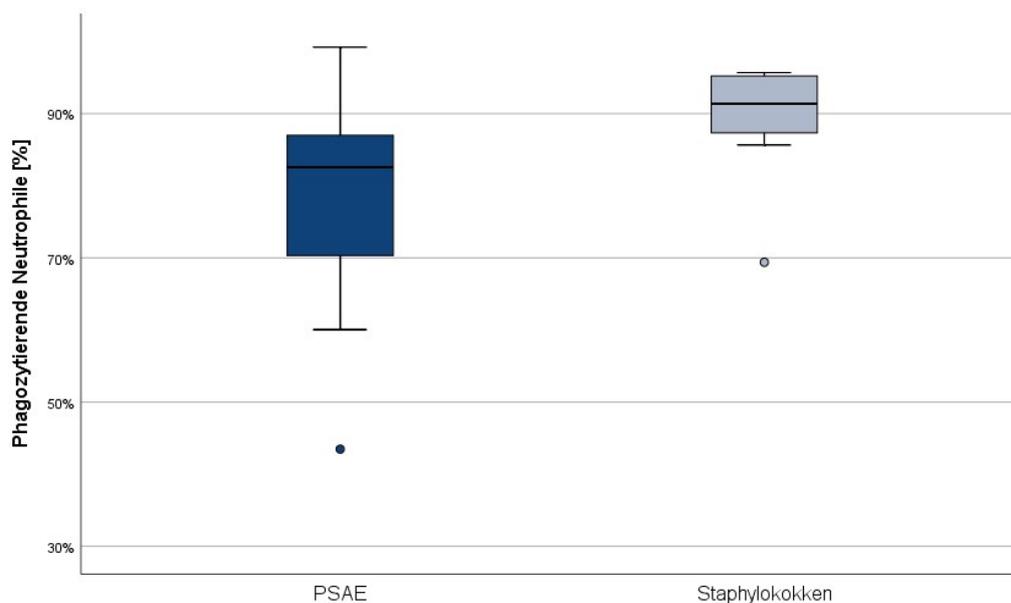


Abbildung 22: Box Plot der Anzahl phagozytierender Neutrophiler [%] getrennt nach unterschiedlicher Keimbesiedlung

Mit den Gruppen PSAE (n=16) und Staphylokokken (n=8). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum sowie Ausreißer (°).

Tabelle 18: Deskriptive Statistik phagozytierender Neutrophiler der Gruppen PSAE und Staphylokokken mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
PSAE	78%	15%	83%	70%	87%
Staphylokokken	89%	9%	91%	87%	95%

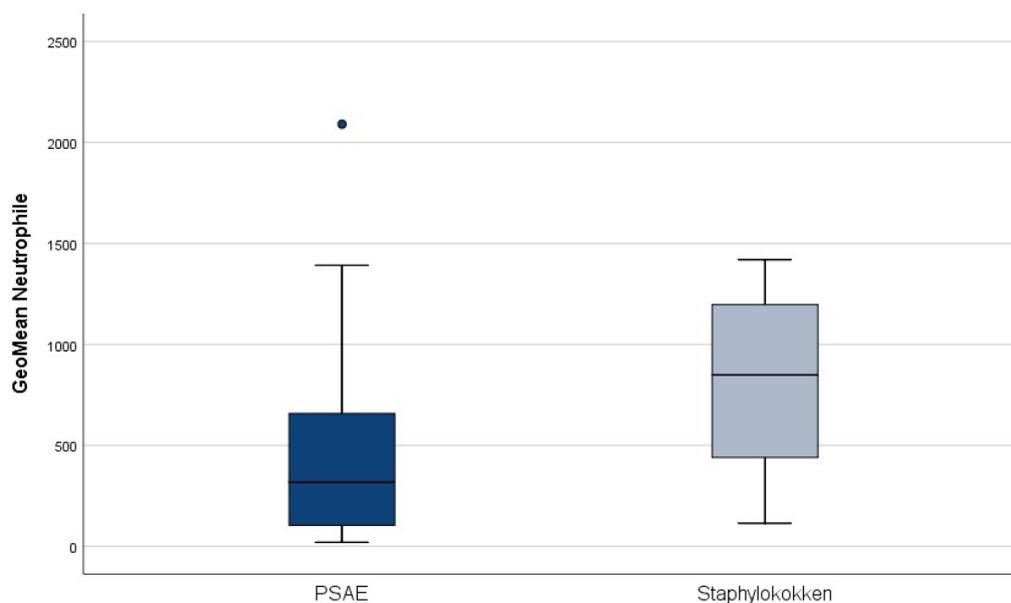


Abbildung 23: Box Plot der GeoMean-Werte Neutrophiler getrennt nach unterschiedlicher Keimbefestigung

Mit den Gruppen PSAE (n=16) und Staphylokokken (n=8). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum sowie Ausreißer (°).

Tabelle 19: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Neutrophilen der Gruppen PSAE und Staphylokokken mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
PSAE	492	566	317	103	657
Staphylokokken	813	471	848	440	1.197

In der Auswertung der Neutrophilen zeigten sich zwar verminderte Phagozytosewerte in der PSAE-Gruppe im Vergleich zur Staphylokokkengruppe, jedoch konnten in der statistischen Analyse keine statistisch signifikanten Unterschiede, weder für die Anzahl phagozytischer Neutrophiler ($p=0,052$) noch für die GeoMean-Werte der Neutrophilen ($p=0,070$), zwischen beiden Gruppen dargestellt werden.

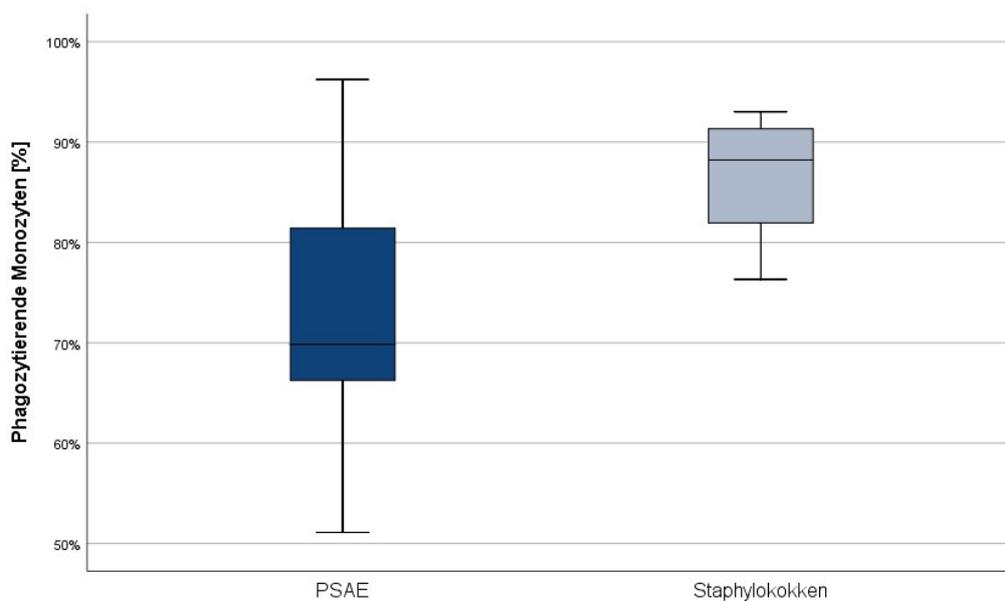


Abbildung 24: Box Plot der Anzahl phagozytierender Monozyten [%] getrennt nach unterschiedlicher Keimbesiedlung

Mit den Gruppen PSAE (n=16) und Staphylokokken (n=8). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum.

Tabelle 20: Deskriptive Statistik phagozytierender Monozyten der Gruppen PSAE und Staphylokokken mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
PSAE	72%	12%	70%	66%	81%
Staphylokokken	87%	6%	88%	82%	91%

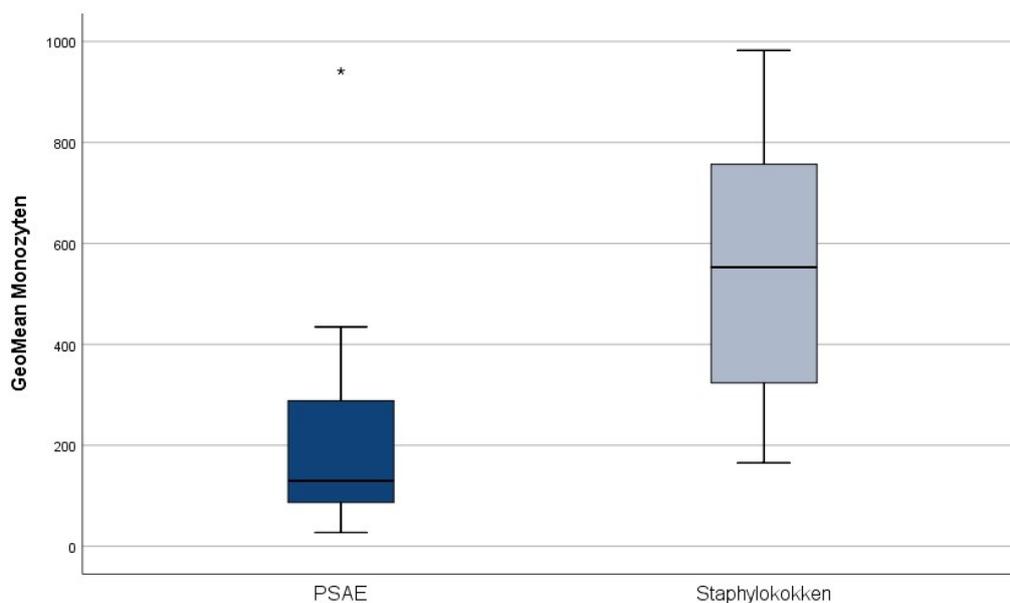


Abbildung 25: Box Plot der GeoMean-Werte der Monozyten getrennt nach unterschiedlicher Keimbesiedlung

Mit den Gruppen PSAE (n=16) und Staphylokokken (n=8). Dargestellt sind der Median (Zentralwert), 1. und 3. Quartil (25%- und 75%-Perzentil), Minimum und Maximum sowie Extremwerte (*).

Tabelle 21: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Monozyten der Gruppen PSAE und Staphylokokken mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil

Gruppe	MW	SD	Median	25%-Perzentil	75%-Perzentil
PSAE	217	229	130	87	288
Staphylokokken	552	279	553	324	757

In der Auswertung der Phagozytosewerte der Monozyten ließen sich hingegen statistisch signifikante Unterschiede sowohl für die Anzahl der phagozytierenden Monozyten [%] ($p=0,005$) als auch für die GeoMean-Werte der Monozyten ($p=0,003$) darstellen. Die Phagozytosewerte fielen in der Gruppe mit PSAE-Besiedlung deutlich geringer aus im Vergleich zur Gruppe mit Staphylokokkenbesiedlung.

Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich innerhalb der Gruppen um sehr kleine Fallzahlen handelte.

4.4 Stimulationsversuche

4.4.1 Versuch 1: Pilotversuch

Neutrophile Granulozyten

Tabelle 22: Experimentelle Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit phagozytierenden Zellen und GeoMean-Werten nach 4 h und 16 h Inkubation mit Stimulanzien

Probe	4 h Phagozytierende Zellen [%]	16 h Phagozytierende Zellen [%]	4 h GeoMean	16 h GeoMean
Ohne Zusatz	83%	90%	217	453
LPS 1 ng/ml	94%	86%	670	411
LPS 10 ng/ml	94%	92%	764	616
LPS 100 ng/ml	95%	91%	772	610
MALP-2	91%	93%	471	665
PMA	81%	46%	203	23
Proleukin®	86%	90%	268	430

Bei den Neutrophilen Granulozyten zeigte sich bei dem Zusatz mit PMA keine Verbesserung der Phagozytoseaktivität. In allen Messungen wurden zum Teil deutlich geringere Werte als in der Probe ohne Zusatz gemessen, insbesondere nach 16 h Inkubation. Auch für die Proleukin®-Probe konnte keine bedeutsame Erhöhung der Phagozytose erfasst werden. In allen Proben die mit LPS und MALP-2 inkubiert wurden, ließ sich eine erhöhte Phagozytoseaktivität darstellen.

Monozyten

Tabelle 23: Experimentelle Stimulation der Monozyten mit phagozytierenden Zellen und GeoMean-Werten nach 4 h und 16 h Inkubation mit Stimulantien

Probe	4 h Phagozytierende Zellen [%]	16 h Phagozytierende Zellen [%]	4 h GeoMean	16 h GeoMean
Ohne Zusatz	90%	88%	387	480
LPS 1 ng/ml	87%	83%	369	340
LPS 10 ng/ml	87%	90%	351	507
LPS 100 ng/ml	85%	86%	324	487
MALP-2	89%	89%	394	555
PMA	42%	23%	14	7
Proleukin®	83%	90%	244	474

Bei den Monozyten zeigten sich in der Probe mit Proleukin® als Zusatz keine nennenswerten Veränderungen in der Phagozytoseaktivität im Vergleich zu der Probe ohne Zusatz. Alle Werte waren tendenziell erniedrigt. Gleiches ließ sich für die Probe mit PMA als Zusatz darstellen. Eine verbesserte Phagozytose zeichnete sich hingegen insbesondere in der Probe mit MALP-2 Zusatz sowie den Proben mit LPS ab. Aufgrund der Ergebnisse des Pilotversuchs wurden zusätzlich drei weitere Proben mit den Stimulanzen LPS 100 ng/ml und MALP-2.

4.4.2 Versuch 2: Proben ohne Zusatz, LPS 100 ng/ml und MALP-2

Neutrophile Granulozyten

Phagozytierende Zellen [%]

Tabelle 24: Deskriptive Statistik der Anzahl phagozytierender Neutrophiler der Proben ohne Zusatz, mit LPS-Zusatz und MALP-2-Zusatz

Proband	4 h			16 h		
	ohne Zusatz	LPS 100 ng/ml	MALP-2	ohne Zusatz	LPS 100 ng/ml	MALP-2
1	84%	94%	92%	95%	97%	98%
2	78%	97%	94%	76%	84%	82%
3	79%	95%	85%	95%	94%	98%
4	83%	95%	91%	90%	91%	93%
MW	81%	95%	91%	89%	92%	93%
SD	3%	1%	4%	9%	6%	8%

GeoMean-Werte

Tabelle 25: Deskriptive Statistik der GeoMean-Werte der Neutrophilen der Proben ohne Zusatz, mit LPS-Zusatz und MALP-2-Zusatz

Proband	4 h			16 h		
	ohne Zusatz	LPS 100 ng/ml	MALP-2	ohne Zusatz	LPS 100 ng/ml	MALP-2
1	300	1.090	546	878	1.160	1.190
2	158	625	624	139	254	230
3	221	1.247	374	1.061	1.148	1.637
4	217	772	471	453	610	665
MW	224	933	503	633	793	930
SD	58	285	107	416	441	613

Vergleicht man die drei Gruppen untereinander fällt auf, dass im Mittel die Neutrophilen-Werte der Proben mit LPS- und MALP-2-Zusatz in der 4 h sowieso 16 h Inkubation höher ausfielen als die der Proben ohne Zusatz. Dies ließ sich sowohl für die GeoMean-Werte als auch für die Anzahl der phagozytierenden Zellen feststellen. Nach 4 h lag der GeoMean-Mittelwert ohne Zusatz bei 224 (SD=58) im Vergleich zum LPS GeoMean-Mittelwert von 933 (SD=285) und MALP-2 GeoMean-Mittelwert von 503 (SD=107). Nach 16 h zeigte sich in der Probe ohne Zusatz zwar ein höherer Mittelwert als nach 4 h, dieser war jedoch mit 633 (SD=416) geringer als der der LPS-Proben mit einem Mittelwert von 793 (SD=441) und der MALP-2-Proben mit einem Mittelwert von 930 (SD=613).

Bei Betrachtung lediglich der beiden Stimulanzen zeigte sich bei den Neutrophilen, dass der GeoMean-Mittelwert der LPS-Proben nach 4 h Inkubation mit 993 (SD=285) deutlich höher ausfiel als der der MALP-2-Proben mit 503 (SD=107). Allerdings fiel der GeoMean-Mittelwert in der 16 h Inkubation bei den LPS-Proben leicht auf 793 (SD=441) ab, während er bei den MALP-2-Proben auf 930 (SD=613) anstieg. Nach 4 h Inkubation ist im Mittel die Anzahl der phagozytierenden Neutrophilen der LPS-Proben bei 95% (SD=1%), die der MALP-2-Gruppe etwas niedriger mit 91% (SD=4%). Hier zeigte sich jedoch in der 16 h Inkubation erneut, dass der Mittelwert der LPS-Proben etwas abfällt auf 92% (SD=6%) und der der MALP-2-Proben etwas ansteigt auf 93% (SD=8%)

Monozyten

Phagozytierende Zellen [%]

Tabelle 26: Deskriptive Statistik der Anzahl phagozytierender Monozyten der Proben ohne Zusatz, mit LPS-Zusatz und MALP-2-Zusatz

Proband	4 h			16 h		
	ohne Zusatz	LPS 100 ng/ml	MALP-2	ohne Zusatz	LPS 100 ng/ml	MALP-2
1	76%	82%	81%	87%	88%	90%
2	80%	87%	86%	86%	87%	78%
3	81%	96%	87%	96%	90%	93%
4	90%	85%	89%	88%	86%	89%
MW	82%	88%	86%	89%	88%	88%
SD	6%	6%	3%	5%	2%	7%

GeoMean-Werte**Tabelle 27: Deskriptive Statistik der GeoMean-Werte der Monozyten der Proben ohne Zusatz, mit LPS-Zusatz und MALP-2-Zusatz**

Proband	4 h			16 h		
	ohne Zusatz	LPS 100 ng/ml	MALP-2	ohne Zusatz	LPS 100 ng/ml	MALP-2
1	212	329	282	597	522	715
2	256	453	410	377	527	216
3	288	913	444	1.198	791	1.257
4	387	324	394	480	487	555
MW	286	505	383	663	582	686
SD	74	278	70	368	141	434

In der Auswertung der drei Gruppen fiel der GeoMean-Mittelwert der Monozyten der LPS- und MALP-2-Proben in der 4 h Inkubation deutlich höher aus als zu der Probe ohne Zusatz, von 286 (SD=74) im Vergleich zu 505 (SD=278), LPS-Proben bzw. 383 (SD=70), MALP-2-Proben. Nach 16 h zeigten sich jedoch nur geringere bis fallende GeoMean-Mittelwerte. Bei der Probe ohne Zusatz ergab sich ein Mittelwert von 663 (SD=368) zu 582 (SD=141) bei den LPS-Proben und 686 (SD=434) bei den MALP-2-Proben. Ähnliches stellte sich für die Anzahl an phagozytierenden Zellen dar. Während in der 4 h Inkubation die Mittelwerte mit 82% (SD=6%) ohne Zusatz zu 88% (SD=6%) der LPS-Proben und 86% (SD=3%) der MALP-2-Proben stiegen, bleiben sie in 16 h Inkubation alle auf einem fast gleichen Niveau von 89% (SD=5%) in der Probe ohne Zusatz und 88% (SD=2%) bei der LPS- sowie 88% (SD=6%) der MALP-2-Proben.

Im Vergleich der Stimulanzen untereinander präsentierten sich die GeoMean-Mittelwerte der Monozyten der LPS-Proben nach 4 h mit 505 (SD=278) höher als die der MALP-2-Proben mit 383 (SD=70). Nach 16 h stiegen die Mittelwerte der LPS-Proben mit 582 (SD=141) allerdings geringer an als die der MALP-2-Proben mit 686 (SD=434). Im Mittel blieb die Anzahl der phagozytierenden Monozyten bei den LPS-Proben mit 88% (SD=6%) sowohl nach 4 h als auch mit 88% (SD=2%) nach 16 h gleich. Bei den MALP-2-Proben waren es im Mittel 86% (SD=3%) nach 4h und 88% (SD=7%) nach 16 h.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen Granulozyten sowie von Monozyten in venösem Vollblut bei Patienten mit CFTR-Gen Mutation erneut zu untersuchen. Der angewandte Test diente zur Bestimmung des ersten Schrittes der Phagozytose, der Aufnahme des Pathogens in die Zelle. Es wurde untersucht, wie viel Prozent der Zellen phagozytieren und wie viele Bakterien pro phagozytierende Zelle aufgenommen werden (GeoMean-Wert). Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob eine experimentelle Stimulation des Immunsystems, durch die Zugabe von Bakterienbestandteile beziehungsweise Immunmodulatoren zu venösem Blut, eine zusätzliche Steigerung der basalen Phagozytoseaktivität bewirken kann.

In dieser Studie werden Ergebnisse zur Phagozytoseaktivität präsentiert, die mittels FITC-markierten *E. coli* Bakterien inkubiert wurden. Das verwendete Test-Kit PHAGOTEST™ ist ein standardisiertes Verfahren, welches bereits im Labor des Anatomischen Instituts Homburg für die Untersuchung von phagozytierenden Zellen bei mit Zigarettenrauch ausgesetzten Mäusen erfolgreich Verwendung fand (Voss et al. 2015). Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass alle Zwischenschritte des Tests bei jeder Probe standardisiert ablaufen und somit vergleichbare Ergebnisse liefern. Bei allen Blutproben wurden die vom Hersteller vorgeschriebenen Zeiten und Temperaturen sowie auch die Einstellungen der verwendeten Geräte wie Zentrifuge, Wasserbad und Durchflusszytometer bei allen Messungen exakt eingehalten. Die Blutproben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 6°C im Kühlschrank gelagert, da nicht alle Proben direkt gemessen wurden, aber bei einer vergleichbaren Temperatur gelagert werden sollten, um möglichst einheitliche Untersuchungsbedingungen zu schaffen. Diese Vorgehensweise wurde nicht explizit empfohlen, jedoch nach Rücksprache mit dem Hersteller des Tests als nicht problematisch angesehen.

Bei dem zur Inkubation und Phagozytose-Messung verwendeten Bakterium handelte es sich um *E. coli*. Eine Überlegung wäre ein anderes opsoniertes Bakterium zu verwenden, welches häufiger in der Lunge von CF-Patienten eine Rolle spielt. *E. coli* ist ein gramnegatives Bakterium, welches zur natürlichen Darmflora des Menschen gehört. Einige Stämme werden insbesondere mit Infektionen des Urogenitaltraktes, aber auch mit sekundären Bakteriämien

und gegebenenfalls einer Sepsis in Verbindung gebracht. Zudem existieren unterschiedliche darmpathogene Serotypen (Stenutz et al. 2006). Selten werden Lungeninfektionen mit diesem Pathogen assoziiert, sie können jedoch ebenfalls durch *E. coli* hervorgerufen werden (Ruiz et al. 2008). In einer Studie konnte im Sputum und Rachenabstrich von CF-Patienten *E. coli* in bis zu 25% einmalig sowie in 11% in einen Zeitraum über 6 Monate hinaus nachgewiesen werden (Barillova et al. 2014). Zwar sind *E. coli* Infektionen in der Lunge von CF-Patienten beschrieben (Seidmon et al. 1975), sie gehen aber nicht mit einem schlechteren Outcome einher (Edwards et al. 2020). Besiedlungen mit Staphylokokken oder Pseudomonaden treten in der Regel häufiger auf und stellen weiterhin die Hauptproblemkeime in Bezug auf chronische Infektionen und Lungenverschlechterung dar (Lipuma 2010; Dasenbrook et al. 2010).

Des Weiteren wäre eine Phagozytosebestimmung von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen direkt aus dem Lungengewebe, gewonnen durch eine Bronchoalveoläre Lavage (BAL), nochmals interessant gewesen. Dieses Verfahren ist allerdings nicht nur aufwendiger und unangenehmer für die Patienten, sondern auch im Rahmen einer Studie mit überschaubarer Patientenzahl wie dieser, schwierig zu realisieren. Wie bereits eingangs erwähnt, leiden an Zystischer Fibrose erkrankte Kinder oft kurz nach der Geburt an einer bakteriellen Mehrfachbesiedlung der Lunge, welche darauf schließen lassen könnte, dass generelle Veränderungen in den Leukozyten bestehen. Durch die Tatsache, dass die Immunzellen aus dem peripheren Blut durch Entzündungsmediatoren getriggert in die Lunge einwandern, ist davon auszugehen, dass die Zellen aus dem Blut zumindest in einem gewissen Umfang denen in der Lunge ähnlich sind und schon bei Eintritt in das entsprechende Gewebe Defekte aufweisen könnten. Das Ziel war es zu eruieren, ob die phagozytierenden Immunzellen schon vor Eintritt in die Lunge eine Veränderung in ihrer Phagozytoseaktivität aufweisen. Daher wurde für diese Arbeit peripheres venöses Vollblut verwendet.

5.2 Patientenkollektiv

Die Mukoviszidose Sprechstunde erfasste im Zeitraum der Probengewinnung ca. 35-40 Patienten. In dieser Arbeit war die Gruppe, der an Zystischer Fibrose erkrankten Patienten, auf eine geringe Anzahl beschränkt. Dies lag einerseits daran, dass es sich um eine genetische Erkrankung handelt sowie andererseits, dass lediglich eine einzige Klinik betrachtet wurde.

Zusätzlich kam es dazu, dass Patienten ihre Ambulanztermine nicht einhielten oder ohne Terminabsage nicht erschienen sind. Durch die Wiedereinbestellung der Patienten in unterschiedlichen zeitlichen Intervallen, je nach Krankheitsaktivität, kam es des Öfteren zu Kollisionen der Ambulanzzeiten mit Pflichtveranstaltungen der Universität, sodass manche Patienten nicht oder nicht an dem vorgesehen Datum wahrgenommen werden konnte. Da einige Patienten bereits durch vorherige Blutentnahmeanfragen anderer Doktoranden belegt waren, konnte die Blutentnahme nicht oder nicht immer am angedachten Termin durchgeführt werden. Auch wurde die Teilnahme an der Studie durch eine Patientin abgelehnt.

In Deutschland sind derzeit etwa 8.000 gemeldete Patienten an Zystischer Fibrose erkrankt. Die Versorgung der Patienten ist auf momentan circa 100 CF-Einrichtungen bundesweit verteilt (Mukoviszidose e.V. 2020). Eine groß angelegte Multi-Center Studie mit hunderten von Patienten würde eventuelle Unterschiede zwischen Mukoviszidose-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe aufzeigen und könnte durch eine höhere Patientenzahl gegebenenfalls den Vergleich unterschiedlicher Mutationen in Hinblick auf die Phagozytoseaktivität zulassen.

Bezogen auf die erhobenen Patientendaten sind die vorwiegende Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* und Staphylokokken mit der Literatur deckungsgleich, sowie auch das vereinzelte Auftreten von weiteren Problemkeimen wie *Burkholderia Cepacia* Komplex oder *Stenotrophomonas maltophilia* (Lipuma 2010; Amin und Waters 2016; Regan und Bhatt 2014). Ebenfalls ließ sich bei den meisten der Patienten eine homozygote oder heterozygote Mutation für die Deletion von $\Delta F508$ nachweisen (n=31) und nur einzelne weitere Mutationen, was ebenfalls typisch ist (Lao et al. 2003). In der CF-Patientengruppe dieser Arbeit wurden etwas mehr Frauen als Männer betrachtet. Generell lässt sich bei der Zystischen Fibrose keine nennenswerte Geschlechterbevorzugung feststellen (Bremer et al. 2019). Der älteste Mukoviszidose Patient war zum Zeitpunkt der Messung 44 Jahre. Die steigende Lebenserwartung, welche auf die verbesserte Prognose durch Fortschritte in der medizinischen Versorgung zurückzuführen ist, ist auch insgesamt unter CF-Patienten seit einigen Jahren zu beobachten (Dodge et al. 2007; Bremer et al. 2019; Marshall et al. 2019).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppe

Unter Verwendung des standardisierten PHAGOTEST™ mit *E. coli* ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Phagozytoseaktivität zwischen CF-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe darstellen. Weder in der Gruppe der Neutrophilen Granulozyten noch in der Gruppe der Monozyten für die Prozentzahl der phagozytierenden Zellen und die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle. Die Ergebnisse stärken somit nicht die Hypothese einer generell verminderten Phagozytoseaktivität bei Immunzellen aus dem peripheren Blut von Mukoviszidose Patienten.

Inwiefern das CFTR-Protein in Neutrophilen nachweisbar ist, wird weiterhin diskutiert (van de Weert-van Leeuwen et al. 2013; Painter et al. 2006). Dass intrazelluläre Veränderungen der pH-Wert Regulation und der Degranulation in Neutrophilen an einer veränderten Immunantwort bei CF-Patienten beteiligt sein könnte, wurde bereits öfter beschrieben (Coakley et al. 2000; Painter et al. 2006; Hayes et al. 2011; Zhou et al. 2013). In einer Studie am murinen Modell zeigte sich bei einer CFTR-Mutation ohne Exon 10, ähnlich der häufigsten Mutation $\Delta F508$, dass das CFTR-Protein bei Neutrophilen nicht in den Phagosomen eingebaut wurde. Dies hatte eine verminderte intraphagosomale HOCl (hypochlorige Säure) Produktion und damit einhergehende verminderte Abtötung von Pathogenen in Neutrophilen zur Folge. Es konnte demonstriert werden, dass hohe Dosen *Pseudomonas aeruginosa* in CFTR-negativen Mäusen im Gegensatz zu einer gesunden Kontrollgruppe zu einer erhöhten Mortalität führten. Die CFTR-negative Gruppe zeigte Symptome der ineffizienten Immunabwehr wie es bei CF-Patienten in der Lunge zu beobachten ist, welche sie anfälliger für Infektionen machen könnte (Ng et al. 2014). Auch Dickerhof et al. stellten kürzlich ähnliche Ergebnisse zu einer verminderten HOCl-Produktion in den Phagosomen der Neutrophilen von CF-Patienten dar (Dickerhof et al. 2019).

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen in Bezug auf Neutrophile Granulozyten die eingangs erwähnte Hypothese von Tirouvanziam et al., dass die Immunzellen im Blut noch ihre normale Funktion besitzen. Die Forschergruppe beschrieb, dass die Neutrophilen in der Lunge von CF-Patienten zwar überlebensfähig zu sein scheinen, aber funktionsunfähig im Vergleich zu Zellen aus dem peripheren Blut. Sie vermuteten, dass Neutrophile bei der Rekrutierung in die Lunge,

vermutlich durch das spezielle Milieu der Lunge bedingt, ihre „Voreinstellung“ und damit ihre Funktion verändern. Es konnte eine Verminderung der Phosphotyrosin-Level in der Lunge im Vergleich zu Blut-Neutrophilen detektiert werden, welche auf einen post-aktivierten Zustand der Neutrophilen in der Lunge hinzuweisen scheint (Tirouvanziam et al. 2008).

In Zusammenschau ist die Phagozytose der Neutrophilen Granulozyten bei CF-Patienten vermutlich nicht durch eine verminderte Bakterienaufnahme, sondern vielmehr durch abweichende intrazelluläre Prozesse verändert und die Phagozytoseaktivität scheint in Hinblick auf die bisher erhobenen Daten zumindest im peripheren Blut noch normal zu sein.

Bezogen auf Monozyten/Makrophagen konnte das CFTR-Protein grundsätzlich in verschiedenen Studien in murinen sowie auch in humanen Monozyten/Makrophagen detektiert werden (Sorio et al. 2011; Porto et al. 2011; van de Weert-van Leeuwen et al. 2013). Eine Studie, welche Monozyten/Makrophagen von CF-Patienten mit der genetischen Mutation $\Delta F508$ homozygot untersuchte, fand heraus, dass die Immunzellen der CF-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine reduzierte Phagozytose und Abtötungsrate von *Pseudomonas aeruginosa* aufwies. Die verwendeten Monozyten wurden zuvor mithilfe eines Kolonie-stimulierenden Faktors zu Makrophagen-ähnlichen Zellen aktiviert. Unter Anwendung des CFTR-Korrektors Lumacaftor konnte die pathologischen Veränderungen der Phagozytose jedoch korrigiert werden (Barnaby et al. 2018). In einer ähnlichen Studie von Zhang et al. wurde ebenfalls gezeigt, dass das CFTR-Protein am Phagozytoseprozess beteiligt zu sein scheint. Die Forschergruppe zeigte, dass CFTR in Makrophagen exprimiert wird und die Phagozytose von Makrophagen durch die Gabe von Ivacaftor, wenn auch nur geringfügig, insgesamt verbessert werden konnte (Zhang et al. 2018).

Eine Verminderung der Phagozytoseaktivität von Monozyten bei CF-Patienten im Vergleich zu Gesunden konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse festigen vielmehr die Arbeit von Porto et al., welche bei Makrophagen zu dem Ergebnis kamen, dass die Phagozytoseaktivität, also die Aufnahme des Pathogens in die Zelle, normal funktioniert, aber die Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* in der Zelle im Rahmen der Phagozytose verändert zu sein scheint. Für Ihren Versuch wurden Monozyten aus peripherem Blut, welche zu Makrophagen aktiviert wurden, verwendet. Die Rate an intrazellulär überlebenden Bakterien fiel bei CF-Patienten signifikant höher aus als in der gesunden Kontrollgruppe (Porto et al. 2011). Di Brown et al. beschrieben ebenfalls eine normale

Internalisierungsrate von Pathogenen und deuteten auf eine Veränderung der intrazellulären Prozesse hin (Di et al. 2006).

Aufgrund dessen, dass in der vorliegenden Arbeit keine Verminderung in der Phagozytose zwischen Gesunden und CF-Patienten vorlag, könnte unter Einbezug vergangener Studien eine Schlussfolgerung sein, dass das CFTR-Protein die Phagozytoseaktivität der in die Lunge eingewanderten und differenzierten Makrophagen, jedoch nicht die der Monozyten aus dem peripheren Blut beeinflusst (Leuer et al. 2019).

5.3.2 Vergleiche innerhalb der Patientengruppe

Die Gruppe der CF-Patienten wurde anhand verschiedener Merkmale nochmals in Untergruppen aufgeteilt, um festzustellen, ob bestimmte gemeinsame Merkmale einen Unterschied in der Phagozytoseaktivität von Neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten/Makrophagen zeigt. Ausgewählte Faktoren, die betrachtet wurden, waren die Entzündungsaktivität, bezogen auf die Leukozytenzahl und den CRP-Wert im peripheren Blut der Patienten, sowie die bakterielle Besiedlung und der genetische Hintergrund.

In Bezug auf das Entzündungsgeschehen ließen sich weder für die Leukozytenzahlen noch für die CRP-Werte im Blut signifikante Veränderungen hinsichtlich der Phagozytosewerte darstellen. Was vielmehr von Bedeutung zu sein scheint, ist die bakterielle Dauerbesiedlung durch spezielle Keime. Van de Weert-van Leeuwen et al. zeigten, dass die Phagozytoseaktivität von Monozyten bei Mukoviszidose-Patienten bei der Verwendung von *Pseudomonas aeruginosa* als opsonierende Substanz reduziert war. Sie beschrieben, dass das CFTR-Protein in Monozyten für die Funktion von C11b benötigt wird und somit wichtig für die optimale Komplement-aktivierte Phagozytose und intrazelluläre Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* ist (van de Weert-van Leeuwen et al. 2013). Aufgrund dessen, dass *Pseudomonas aeruginosa*, wie eingangs beschrieben, einen der opportunistischen Hauptproblemkeime in der chronischen Infektion bei der pulmonalen Beteiligung der Erkrankung darstellt, ist diese Entdeckung sehr bedeutend. Die in dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse könnten somit einen Hinweis darauf geben, dass die Effekte der Erkrankung auf die Phagozytose von Monozyten spezifisch für spezielle Pathogene sind. Aufgrund der geringen Fallzahl sind die Unterschiede in dieser Arbeit zwischen peripheren Blutzellen von Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa*- und

Staphylokokkenbesiedlung jedoch mit Vorsicht zu interpretieren. Bezogen auf *Pseudomonas aeruginosa* wurde ferner in einer vergangenen Studie berichtet, dass es die Autophagozytose sowohl in humanen als auch in murinen Makrophagen stärkt, was zur Verminderung der bakteriellen Phagozytose und interzellulärer Abtötung führt. Diese Studie behandelte jedoch nicht speziell Monozyten/Makrophagen von CF-Patienten. Die Zellen wurden aus dem peripherem Blut entnommen und hatte somit nur in einem gewissen Umfang Kontakt mit dem alveolären Milieu (Wu et al. 2016).

Auch der genetische Hintergrund könnte eine wichtige Rolle im veränderten Phagozytoseprozess spielen, da bei verschiedenen Mutationen keine oder eine gewisse Restfunktion des CFTR-Proteins vorhanden ist. Die unterschiedlichen Gruppen der Genmutationen waren in diesem Falle allerdings zu klein, um aussagekräftige Vergleiche herstellen zu können. Der Großteil der Patienten, aber nicht alle, wies eine Mutation des CFTR-Gens in Form einer Deletion von F508 auf. Deriy et al. untersuchten an Alveolarmakrophagen von Mäusen der häufigsten CFTR-Genmutationen $\Delta F508$ sowie der Mutation G551D, mögliche Auswirkungen der Mutationen auf verschiedene mikrobizide Aspekte der Makrophagen. Beide Mutationen zeigten im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine veränderte lysosomale Ansäuerung, einen Sekretionsdefekt sowie eine verminderte mikrobizide Fähigkeit (Deriy et al. 2009).

Ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen CFTR-Gen Mutationen und dem daraus resultierenden Effekt auf die Phagozytoseaktivität von Leukozyten, generell und auch bezogen auf spezielle Erreger, ist noch nicht vollständig geklärt und wäre ein interessanter Aspekt in weiteren Studien eingehender zu untersuchen.

5.4 Stimulationsversuche

In den Stimulationsversuchen konnte im Blut der Kontrollgruppe die basale Phagozytose durch eine spezifische Stimulation experimentell zusätzlich gesteigert werden. Interessanterweise lässt sich die Phagozytoserate, welche an sich bereits einen stimulierenden Prozess darstellt, extern nochmals anregen. Aufgrund dessen, dass sich in dieser Arbeit bereits keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Phagozytoseaktivität zwischen CF-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe zeigte, ist für die CF-Gruppe von einem ähnlichen Ergebnis durch Immunstimulanzen auszugehen. Ob dies einen Therapieansatz für die klinische Anwendung darstellen könnte, ist jedoch fraglich.

6 Fazit

Abschließend ist festzuhalten, dass in dieser Arbeit unter Verwendung des standardisierten Tests zur Phagozytosemessung mit FITC-markierten *E. coli* Bakterien keine signifikanten Unterschiede in der Phagozytoseaktivität von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren venösen Blut bei CF-Patienten gezeigt werden konnten. Um das Patientenkollektiv zu erweitern könnten mehrere CF-Einrichtungen in Deutschland miteinbezogen werden, um eventuelle Unterschiede zwischen Mukoviszidose-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe aufzuzeigen. Diese Arbeit trägt zu einer generellen Einschätzung der Wirtsabwehr von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten im Blut von Mukoviszidose Patienten bei und zeigte im Ingesamten keine größeren Unterschiede in der Phagozytoseaktivität im Vergleich zu Gesunden. Die Ergebnisse könnten insbesondere in Hinblick auf veränderte Phagozytoseprozesse bei unterschiedlichen Genmutationen und spezieller bakterieller Besiedlung eine Anregung zu weiteren Studien geben. In Hinblick auf den Problemkeim *Pseudomonas aeruginosa*, stellt der Aspekt der vergangenen Studie von Van de Weert-van Leeuwen et al., dass CFTR-abhängige Varianten von C11b als Problem im Phagozytoseprozess von *Pseudomonas aeruginosa* involviert sein könnten, eine interessante Anregung zu weiteren Forschungsarbeiten dar.

Literaturverzeichnis

1. Ahmad, Asima; Ahmed, Aysha; Patrizio, Pasquale (2013): Cystic fibrosis and fertility. In: *Current opinion in obstetrics & gynecology* 25 (3), S. 167–172. DOI: 10.1097/GCO.0b013e32835f1745.
2. Amin, Reshma; Waters, Valerie (2016): Antibiotic treatment for *Stenotrophomonas maltophilia* in people with cystic fibrosis. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 7, CD009249. DOI: 10.1002/14651858.CD009249.pub4.
3. Anderson, M.; Gregory, R.; Thompson, S.; Souza, D.; Paul, S.; Mulligan, R. et al. (1991): Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. In: *Science* 253 (5016), S. 202–205. DOI: 10.1126/science.1712984.
4. Antoniou, Sophia; Elston, Caroline (2016): Cystic fibrosis. In: *Medicine* 44 (5), S. 321–325. DOI: 10.1016/j.mpmed.2016.02.016.
5. Barillova, Petra; Tchesnokova, Veronika; Dübbers, Angelika; Küster, Peter; Peters, Georg; Dobrindt, Ulrich et al. (2014): Prevalence and persistence of *Escherichia coli* in the airways of cystic fibrosis patients - an unrecognized CF pathogen? In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 304 (3-4), S. 415–421. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.02.008.
6. Barnaby, Roxanna; Koeppen, Katja; Nymon, Amanda; Hampton, Thomas H.; Berwin, Brent; Ashare, Alix; Stanton, Bruce A. (2018): Lumacaftor (VX-809) restores the ability of CF macrophages to phagocytose and kill *Pseudomonas aeruginosa*. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 314 (3), L432-L438. DOI: 10.1152/ajplung.00461.2017.
7. Belchamber, Kylie B. R.; Donnelly, Louise E. (2017): Macrophage Dysfunction in Respiratory Disease. In: *Results and problems in cell differentiation* 62, S. 299–313. DOI: 10.1007/978-3-319-54090-0_12.
8. Bonfield, Tracey; Chmiel, James F. (2017): Impaired innate immune cells in cystic fibrosis: Is it really a surprise? In: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 16 (4), S. 433–435. DOI: 10.1016/j.jcf.2017.06.001.
9. Boyle, Michael P. (2007): Adult cystic fibrosis. In: *JAMA* 298 (15), S. 1787–1793. DOI: 10.1001/jama.298.15.1787.
10. Bremer, W.; Burkhart, M.; Deiters, S. (2019): Zahlen, Daten & Fakten für Patienten & Angehörige 2019. Daten aus dem Deutschen Mukoviszidose-Register.
11. Burgel, Pierre-Régis; Fajac, Isabelle (2017): Cystic fibrosis: Current aspects and perspectives. In: *Presse medicale (Paris, France : 1983)* 46 (6 Pt 2), e85-e86. DOI: 10.1016/j.lpm.2017.06.001.

12. Cantin, André M.; Hartl, Dominik; Konstan, Michael W.; Chmiel, James F. (2015): Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. In: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 14 (4), S. 419–430. DOI: 10.1016/j.jcf.2015.03.003.
13. Coakley, R. J.; Taggart, C.; Canny, G.; Grealley, P.; O'Neill, S. J.; McElvaney, N. G. (2000): Altered intracellular pH regulation in neutrophils from patients with cystic fibrosis. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279 (1), L66-74. DOI: 10.1152/ajplung.2000.279.1.L66.
14. Collins, F. S. (1992): Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. In: *Science* 256 (5058), S. 774–779.
15. Corriveau, Sophie; Sykes, Jenna; Stephenson, Anne L. (2018): Cystic fibrosis survival: the changing epidemiology. In: *Current opinion in pulmonary medicine* 24 (6), S. 574–578. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000520.
16. Dasenbrook, Elliott C.; Checkley, William; Merlo, Christian A.; Konstan, Michael W.; Lechtzin, Noah; Boyle, Michael P. (2010): Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. In: *JAMA* 303 (23), S. 2386–2392. DOI: 10.1001/jama.2010.791.
17. Dececchi, Maria Cristina; Tamanini, Anna; Cabrini, Giulio (2018): Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside. In: *Annals of translational medicine* 6 (17), S. 334. DOI: 10.21037/atm.2018.06.48.
18. Deriy, Ludmila V.; Gomez, Erwin A.; Zhang, Guangping; Beacham, Daniel W.; Hopson, Jessika A.; Gallan, Alexander J. et al. (2009): Disease-causing mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determine the functional responses of alveolar macrophages. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (51), S. 35926–35938. DOI: 10.1074/jbc.M109.057372.
19. Di, Anke; Brown, Mary E.; Deriy, Ludmila V.; Li, Chunying; Szeto, Frances L.; Chen, Yimei et al. (2006): CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. In: *Nature cell biology* 8 (9), S. 933–944. DOI: 10.1038/ncb1456.
20. Dickerhof, Nina; Isles, Vivienne; Pattemore, Philip; Hampton, Mark B.; Kettle, Anthony J. (2019): Exposure of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal hypochlorous acid during neutrophil phagocytosis is compromised in cystic fibrosis. In: *The Journal of biological chemistry* 294 (36), S. 13502–13514. DOI: 10.1074/jbc.RA119.009934.
21. Dodge, J. A.; Lewis, P. A.; Stanton, M.; Wilsher, J. (2007): Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. In: *The European respiratory journal* 29 (3), S. 522–526. DOI: 10.1183/09031936.00099506.

22. Edwards, B. D.; Somayaji, R.; Greysen-Wong, J.; Izydorczyk, C.; Waddell, B.; Storey, D. G. et al. (2020): Clinical Outcomes Associated With *Escherichia coli* Infections in Adults With Cystic Fibrosis: A Cohort Study. In: *Open forum infectious diseases* 7 (1), ofz476. DOI: 10.1093/ofid/ofz476.
23. Elborn, J. Stuart (2016): Cystic fibrosis. In: *The Lancet* 388 (10059), S. 2519–2531. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00576-6.
24. Ettorre, Michele; Verzè, Genny; Caldrea, Sara; Johansson, Jan; Calcaterra, Elisa; Assael, Barouk Maurice et al. (2014): Electrophysiological evaluation of cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) expression in human monocytes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1840 (10), S. 3088–3095. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.07.010.
25. Flannagan, R. S.; Jaumouillé, V.; Grinstein, S. (2012): The cell biology of phagocytosis. In: *Annual review of pathology* 7. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445.
26. Fliegert, F. G.; Tschernig, T.; Pabst, R. (1996): Comparison of lymphocyte subsets, monocytes, and NK cells in three different lung compartments and peripheral blood in the rat. In: *Experimental lung research* 22 (6), S. 677–690. DOI: 10.3109/01902149609070037.
27. Gibson-Corley, Katherine N.; Meyerholz, David K.; Engelhardt, John F. (2016): Pancreatic pathophysiology in cystic fibrosis. In: *The Journal of pathology* 238 (2), S. 311–320. DOI: 10.1002/path.4634.
28. Gordon, Siamon (2016): Phagocytosis: An Immunobiologic Process. In: *Immunity* 44 (3), S. 463–475. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.026.
29. Gregg, R. G.; Wilfond, B. S.; Farrell, P. M.; Laxova, A.; Hassemer, D.; Mischler, E. H. (1993): Application of DNA analysis in a population-screening program for neonatal diagnosis of cystic fibrosis (CF): comparison of screening protocols. In: *American Journal of Human Genetics* 52 (3), S. 616–626.
30. Haggie, Peter M.; Verkman, A. S. (2009): Defective organellar acidification as a cause of cystic fibrosis lung disease: reexamination of a recurring hypothesis. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 296 (6), L859-67. DOI: 10.1152/ajplung.00018.2009.
31. Hampton, Thomas H.; Green, Deanna M.; Cutting, Garry R.; Morrison, Hilary G.; Sogin, Mitchell L.; Gifford, Alex H. et al. (2014): The microbiome in pediatric cystic fibrosis patients: the role of shared environment suggests a window of intervention. In: *Microbiome* 2, S. 14. DOI: 10.1186/2049-2618-2-14.
32. Hayes, Elaine; Pohl, Kerstin; McElvaney, Noel G.; Reeves, Emer P. (2011): The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell. In: *Archivum*

- immunologiae et therapiae experimentalis* 59 (2), S. 97–112. DOI: 10.1007/s00005-011-0113-6.
33. Herold, Gerd (Hg.) (2015): Innere Medizin 2015. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Selbstverl.
34. Hurt, Katharine; Bilton, Diana (2012): Cystic fibrosis. In: *Medicine* 40 (5), S. 273–276. DOI: 10.1016/j.mpmed.2012.02.006.
35. Johansson, Jan; Vezzalini, Marzia; Verzè, Genny; Caldrier, Sara; Bolognin, Silvia; Buffelli, Mario et al. (2014): Detection of CFTR protein in human leukocytes by flow cytometry. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 85 (7), S. 611–620. DOI: 10.1002/cyto.a.22456.
36. Lao, Oscar; Andrés, Aida M.; Mateu, Eva; Bertranpetit, Jaume; Calafell, Francesc (2003): Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. In: *European journal of human genetics : EJHG* 11 (5), S. 385–394. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200970.
37. Law, Sheonagh M.; Stanfield, Samuel J.; Hardisty, Gareth R.; Dransfield, Ian; Campbell, Colin J.; Gray, Robert D. (2019): Human cystic fibrosis monocyte derived macrophages display no defect in acidification of phagolysosomes when measured by optical nanosensors. In: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.09.003.
38. Leuer, Laura; Krill, Angelika; Wilkens, Heinrike; Wagenpfeil, Gudrun; Bischoff, Markus; Meier, Carola et al. (2019): The Phagocytosis of Blood Leukocytes from Cystic Fibrosis Patients is not Impaired in General. In: *Lung*. DOI: 10.1007/s00408-019-00290-9.
39. Lévêque, Manuella; Le Trionnaire, Sophie; Del Porto, Paola; Martin-Chouly, Corinne (2017): The impact of impaired macrophage functions in cystic fibrosis disease progression. In: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 16 (4), S. 443–453. DOI: 10.1016/j.jcf.2016.10.011.
40. Lipuma, John J. (2010): The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. In: *Clinical microbiology reviews* 23 (2), S. 299–323. DOI: 10.1128/CMR.00068-09.
41. Marshall, Bruce; Faro, Albert; Elbert, Alexander; Fink, Aliza; Sewall, Ase; Loeffler, Deena et al. (2019): Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry - 2018 Annual Data Report.
42. McIntyre, Kieran (2013): Gender and survival in cystic fibrosis. In: *Current opinion in pulmonary medicine* 19 (6), S. 692–697. DOI: 10.1097/MCP.0b013e328365af49.

43. Mukoviszidose e.V. (2020): Mukoviszidose-Einrichtungen in Deutschland finden. Online verfügbar unter <https://www.muko.info/adressen/cf-einrichtungen>, zuletzt aktualisiert am 13.06.2020.000Z, zuletzt geprüft am 13.06.2020.
44. Mutius, E. von; Gappa, M.; Eber, E.; Frey, U. (Hg.) (2014): Pädiatrische Pneumologie. Mit 196 Tabellen; plus Extras online. 3., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer Medizin.
45. Ng, Hang Pong; Zhou, Yun; Song, Kejing; Hodges, Craig A.; Drumm, Mitchell L.; Wang, Guoshun (2014): Neutrophil-Mediated Phagocytic Host Defense Defect in Myeloid Cftr-Inactivated Mice. In: *PLoS ONE* 9 (9), e106813. DOI: 10.1371/journal.pone.0106813.
46. O'Sullivan, Brian P.; Freedman, Steven D. (2009): Cystic fibrosis. In: *The Lancet* 373 (9678), S. 1891–1904. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60327-5.
47. Painter, Richard G.; Valentine, Vincent G.; Lanson, Nicholas A.; Leidal, Kevin; Zhang, Qiang; Lombard, Gisele et al. (2006): CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. In: *Biochemistry* 45 (34), S. 10260–10269. DOI: 10.1021/bi060490t.
48. Porto, Paola Del; Cifani, Noemi; Guarnieri, Simone; Di Domenico, Enea Gino; Marigliò, Maria A.; Spadaro, Francesca et al. (2011): Dysfunctional CFTR Alters the Bactericidal Activity of Human Macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. In: *PLoS ONE* 6 (5). DOI: 10.1371/journal.pone.0019970.
49. Ratjen, Felix A. (2009): Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. In: *Respiratory care* 54 (5), S. 595–605. DOI: 10.4187/aarc0427.
50. Regan, Kate H.; Bhatt, Jayesh (2014): Eradication therapy for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (10), CD009876. DOI: 10.1002/14651858.CD009876.pub2.
51. Renz-Polster, Herbert; Krautzig, Steffen; Bätge, Boris; Stoll, Matthias (Hg.) (2013): Basislehrbuch Innere Medizin. Kompakt - greifbar - verständlich ; [Plus im Web, mediscript. 5. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer.
52. Riordan; Rommens, J.; Kerem, B.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z. et al. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. In: *Science* 245 (4922), S. 1066–1073. DOI: 10.1126/science.2475911.
53. Rommens, J. M. (2011): Cystic Fibrosis Mutation Database: CFMDB Statistics. Online verfügbar unter <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>, zuletzt geprüft am 16.11.2018.

-
54. Rommens, J. M.; Iannuzzi, M. C.; Kerem, B.; Drumm, M. L.; Melmer, G.; Dean, M. et al. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. In: *Science* 245 (4922), S. 1059–1065.
55. Ronan, Nicola J.; Elborn, Joseph Stuart; Plant, Barry J. (2017): Current and emerging comorbidities in cystic fibrosis. In: *Presse medicale (Paris, France : 1983)* 46 (6 Pt 2), e125-e138. DOI: 10.1016/j.lpm.2017.05.011.
56. Rosenstein, Beryl J.; Zeitlin, Pamela L. (1998): Cystic fibrosis. In: *The Lancet* 351 (9098), S. 277–282. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)09174-5.
57. Ruiz, Luis Alberto; Zalacain, Rafael; Gómez, Ainhoa; Camino, Jesús; Jaca, Carmen; Núñez, Juan Manuel (2008): Escherichia coli: an unknown and infrequent cause of community acquired pneumonia. In: *Scandinavian journal of infectious diseases* 40 (5), S. 424–427. DOI: 10.1080/00365540701732913.
58. Seidmon, Edward J.; Mosovich, Luis L.; Neter, Erwin (1975): Colonization by Enterobacteriaceae of the respiratory tract of children with cystic fibrosis of the pancreas and their antibody response. In: *The Journal of Pediatrics* 87 (4), S. 528–533. DOI: 10.1016/S0022-3476(75)80814-6.
59. Somayaji, Ranjani; Ramos, Kathleen J.; Kapnadak, Siddhartha G.; Aitken, Moira L.; Goss, Christopher H. (2017): Common clinical features of CF (respiratory disease and exocrine pancreatic insufficiency). In: *Presse medicale (Paris, France : 1983)* 46 (6 Pt 2), e109-e124. DOI: 10.1016/j.lpm.2017.03.021.
60. Sorio, C.; Buffelli, M.; Angiari, C.; Ettore, M.; Johansson, J.; Vezzalini, M. et al. (2011): Defective CFTR Expression and Function Are Detectable in Blood Monocytes: Development of a New Blood Test for Cystic Fibrosis. In: *PLoS ONE* 6 (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0022212.
61. Souza, D. A. S. de; Faucz, F. R.; Pereira-Ferrari, L.; Sotomaior, V. S.; Raskin, S. (2018): Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. In: *Andrology* 6 (1), S. 127–135. DOI: 10.1111/andr.12450.
62. Stenutz, Roland; Weintraub, Andrej; Widmalm, Göran (2006): The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens. In: *FEMS microbiology reviews* 30 (3), S. 382–403. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x.
63. Stoltz, David A.; Meyerholz, David K.; Welsh, Michael J. (2015): Origins of cystic fibrosis lung disease. In: *The New England journal of medicine* 372 (4), S. 351–362. DOI: 10.1056/NEJMra1300109.
64. Tirouvanziam, Rabindra; Gernez, Yael; Conrad, Carol K.; Moss, Richard B.; Schrijver, Iris; Dunn, Colleen E. et al. (2008): Profound functional and signaling changes in viable inflammatory neutrophils homing to cystic fibrosis airways. In:

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (11), S. 4335–4339. DOI: 10.1073/pnas.0712386105.
65. Tschernig, Thomas; Pabst, Reinhard (2009): What is the clinical relevance of different lung compartments? In: *BMC pulmonary medicine* 9, S. 39. DOI: 10.1186/1471-2466-9-39.
66. van Biervliet, S.; Clercq, C. de; Declercq, D.; van Braeckel, E.; van Daele, S.; Baets, F. de; Looze, D. de (2016): Gastro-intestinal manifestations in cystic fibrosis patients. In: *Acta gastro-enterologica Belgica* 79 (4), S. 481–486.
67. van de Weert-van Leeuwen, Pauline B.; van Meegen, Marit A.; Speirs, Jennifer J.; Pals, D. J.; Rooijackers, Suzan H. M.; van der Ent, Cornelis K. et al. (2013): Optimal complement-mediated phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by monocytes is cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49 (3), S. 463–470. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0502OC.
68. Voss, Meike; Wonnenberg, Bodo; Honecker, Anja; Kamyschnikow, Andreas; Herr, Christian; Bischoff, Markus et al. (2015): Cigarette smoke-promoted acquisition of bacterial pathogens in the upper respiratory tract leads to enhanced inflammation in mice. In: *Respiratory research* 16, S. 41. DOI: 10.1186/s12931-015-0204-8.
69. Wilschanski, Michael; Zielenski, Julian; Markiewicz, Danuta; Tsui, Lap-Chee; Corey, Mary; Levison, Henry; Durie, Peter R. (1995): Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. In: *The Journal of Pediatrics* 127 (5), S. 705–710. DOI: 10.1016/S0022-3476(95)70157-5.
70. Wu, Yongjian; Li, Dandan; Wang, Yi; Chen, Kang; Yang, Kun; Huang, Xi et al. (2016): *Pseudomonas aeruginosa* promotes autophagy to suppress macrophage-mediated bacterial eradication. In: *International immunopharmacology* 38, S. 214–222. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.04.044.
71. Yu, Elaine; Sharma, Sandeep (2019): Cystic Fibrosis. In: *StatPearls* 2019.
72. Zhang, Shuzhong; Shrestha, Chandra L.; Kopp, Benjamin T. (2018): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators have differential effects on cystic fibrosis macrophage function. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 17066. DOI: 10.1038/s41598-018-35151-7.
73. Zhou, Y.; Song, K.; Painter, R. G.; Aiken, M.; Reiser, J.; Stanton, B. A. et al. (2013): Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Recruitment to Phagosomes in Neutrophils. In: *Journal of innate immunity* 5 (3). DOI: 10.1159/000346568.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer sekretorischen Epithelzelle	5
Abbildung 2: Pathogenese der chronischen Lungeninflammation und -destruktion in der Lunge von CF-Patienten (Ratjen 2009; Somayaji et al. 2017)	8
Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer phagozytierenden Zelle	10
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers	19
Abbildung 5: Beispiel einer Dot Plot Darstellung	20
Abbildung 6: Beispiel einer Histogramm Darstellung	21
Abbildung 7: Box Plot der Anzahl phagozytierender Neutrophiler [%]	27
Abbildung 8: Box Plot der GeoMean-Werte der Neutrophilen	28
Abbildung 9: Box Plot der Anzahl phagozytierender Monozyten [%]	29
Abbildung 10: Box Plot der GeoMean-Werte der Monozyten	30
Abbildung 11: Kreisdiagramm der Leukozytenzahl mit den Gruppen Normbereich (n=17) und Leukozytose (n=18)	31
Abbildung 12: Box Plot mit der Anzahl phagozytierender Neutrophiler [%] getrennt nach unterschiedlicher Leukozytenzahl	32
Abbildung 13: Box Plot der GeoMean-Werte Neutrophiler getrennt nach unterschiedlicher Leukozytenzahl	33
Abbildung 14: Box Plot mit der Anzahl phagozytierender Monozyten [%] getrennt nach unterschiedlicher Leukozytenzahl.	34
Abbildung 15: Box Plot der GeoMean-Werte der Monozyten getrennt nach unterschiedlicher Leukozytenzahl.	35
Abbildung 16: Kreisdiagramm mit der Gruppeneinteilung anhand des CRP-Wertes in CRP-Wert ≤ 5 mg/l (n=11) und CRP-Wert >5 mg/l (n=24)	37
Abbildung 17: Box Plot mit der Anzahl phagozytierender Neutrophiler [%] getrennt nach unterschiedlichem CRP-Wert	38
Abbildung 18: Box Plot mit den GeoMean-Werten Neutrophiler getrennt nach unterschiedlichem CRP-Wert	39
Abbildung 19: Box Plot mit der Anzahl phagozytierender Monozyten [%] getrennt nach unterschiedlichem CRP-Wert	40
Abbildung 20: Box Plot mit den GeoMean-Werten der Monozyten getrennt nach unterschiedlichem CRP-Wert	41

Abbildung 21: Kreisdiagramm der Keimbeseidlung innerhalb der Patientengruppe	43
Abbildung 22: Box Plot der Anzahl phagozytierender Neutrophiler [%] getrennt nach unterschiedlicher Keimbeseidlung	44
Abbildung 23: Box Plot der GeoMean-Werte Neutrophiler getrennt nach unterschiedlicher Keimbeseidlung	45
Abbildung 24: Box Plot der Anzahl phagozytierender Monozyten [%] getrennt nach unterschiedlicher Keimbeseidlung	46
Abbildung 25: Box Plot der GeoMean-Werte der Monozyten getrennt nach unterschiedlicher Keimbeseidlung	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	14
Tabelle 2: Verwendete Materialien	14
Tabelle 3: Reagenzien des PHAGOTEST™	17
Tabelle 4: Verwendete Stimulanzen mit den dazugehörigen Konzentrationen ihrer Stocklösung und den gewünschten Endkonzentrationen im Blut	22
Tabelle 5: Daten der Patienten- und Kontrollgruppe mit Anzahl der Fälle (n), Geschlechterverteilung und Alter in Jahren (Mittelwert ± Standardabweichung)	26
Tabelle 6: Deskriptive Statistik phagozytischer Neutrophiler der Gruppen Patienten und Kontrolle mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	27
Tabelle 7: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Neutrophilen der Gruppen Patienten und Kontrolle mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	28
Tabelle 8: Deskriptive Statistik phagozytischer Monozyten der Gruppen Patienten und Kontrolle mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	29
Tabelle 9: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Monozyten der Gruppen Patienten und Kontrolle mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	30
Tabelle 10: Deskriptive Statistik phagozytischer Neutrophiler der Gruppen Normbereich und Leukozytose mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	32
Tabelle 11: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Neutrophilen der Gruppen Normbereich und Leukozytose mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	33
Tabelle 12: Deskriptive Statistik phagozytischer Monozyten der Gruppen Normbereich und Leukozytose mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	34
Tabelle 13: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Monozyten der Gruppen Normbereich und Leukozytose mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	35

Tabelle 14: Deskriptive Statistik phagozytischer Neutrophiler der Gruppen CRP ≤ 5 mg/l und CRP > 5 mg/l mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	38
Tabelle 15: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Neutrophilen der Gruppen CRP ≤ 5 mg/l und CRP > 5 mg/l mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	39
Tabelle 16: Deskriptive Statistik phagozytischer Monozyten der Gruppen CRP ≤ 5 mg/l und CRP > 5 mg/l mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	40
Tabelle 17: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Monozyten der Gruppen CRP ≤ 5 mg/l und CRP > 5 mg/l mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	41
Tabelle 18: Deskriptive Statistik phagozytischer Neutrophiler der Gruppen PSAE und Staphylokokken mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	44
Tabelle 19: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Neutrophilen der Gruppen PSAE und Staphylokokken mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	45
Tabelle 20: Deskriptive Statistik phagozytischer Monozyten der Gruppen PSAE und Staphylokokken mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	46
Tabelle 21: Deskriptive Statistik des GeoMean-Werts der Monozyten der Gruppen PSAE und Staphylokokken mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, 25%- und 75%-Perzentil	47
Tabelle 22: Experimentelle Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit phagozytierenden Zellen und GeoMean-Werten nach 4 h und 16 h Inkubation mit Stimulanzien	48
Tabelle 23: Experimentelle Stimulation der Monozyten mit phagozytierenden Zellen und GeoMean-Werten nach 4 h und 16 h Inkubation mit Stimulantien	48
Tabelle 24: Deskriptive Statistik der Anzahl phagozytischer Neutrophiler der Proben ohne Zusatz, mit LPS-Zusatz und MALP-2-Zusatz	49
Tabelle 25: Deskriptive Statistik der GeoMean-Werte der Neutrophilen der Proben ohne Zusatz, mit LPS-Zusatz und MALP-2-Zusatz	49
Tabelle 26: Deskriptive Statistik der Anzahl phagozytischer Monozyten der Proben ohne Zusatz, mit LPS-Zusatz und MALP-2-Zusatz	50
Tabelle 27: Deskriptive Statistik der GeoMean-Werte der Monozyten der Proben ohne Zusatz, mit LPS-Zusatz und MALP-2-Zusatz	51

Anhang

Anhang 1: Informationsblatt und Einverständniserklärung

Universitätsklinikum des Saarlandes
Pneumologie, Ltg. Prof. Dr. Dr. R. Bals

Informationsblatt und Einwilligung

Studie: Phagozytose-Aktivität von Blutleukozyten bei Mukoviszidose

(unter Berücksichtigung der entsprechenden Checkliste des Arbeitskreises Medizinischer Ethik-Kommissionen in der Bundesrepublik Deutschland e.V.)

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

zur Behandlung Ihrer Erkrankung sind ärztliche Maßnahmen meinerseits nötig, in deren Verlauf unter anderem auch eine Blutentnahme durchgeführt wird.

Für eine wissenschaftliche Untersuchung bitten wir Sie, dass wir zusätzlich eine kleine Menge, ca. einen Milliliter entnehmen dürfen. Diese zusätzliche kleine Blutprobe ist für Sie mit keinen zusätzlichen Risiken oder Nebenwirkungen verbunden.

Sie werden keinen persönlichen Nutzen von der Blutentnahme haben, die Ergebnisse dieser Untersuchung werden jedoch zum wissenschaftlichen Verständnis von immunologischen Vorgängen bei Ihrer Erkrankung beitragen, die in der Anatomie der Universität des Saarlandes, Campus Homburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Tschernig, analysiert wird (Kirrberger Straße, 66424 Homburg/Saar).

Ihre Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung ist vollkommen freiwillig. Sie können jederzeit Ihr Einverständnis zur Studienteilnahme ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne dass Ihnen daraus Nachteile für die weitere Behandlung entstehen. Die Daten dieser Untersuchung werden anonym analysiert und die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen gegebenenfalls veröffentlicht werden.

Ausführliche Informationen nach der o.g. Checkliste:

- Titel: Phagozytose- oder „Freiß“-Aktivität von Blutzellen bei Lungenerkrankungen
- Ziel: Die Studie soll zeigen, ob bei Lungenerkrankungen die Fähigkeit bestimmter Blutzellen beeinträchtigt ist, Bakterien aufzunehmen.
- Studiendesign: Die Proben werden gesammelt und im Labor analysiert.
- Ablauf: Die Studie dauert etwa ein Jahr (Ende 2016 bis Anfang 2018).

- Nutzen-Risiko-Abwägung: Durch die zu gewinnenden Informationen wird ein Nutzen für die Allgemeinheit erwartet, der im besseren Verständnis der Abwehrmechanismen bei Lungenerkrankungen liegt. Sie haben persönlich keinen direkten Nutzen von den Ergebnissen aus der Studie.
- Informationen zu einzelnen Aspekten:
 - o Es wird zusätzlich ein Milliliter Blut abgenommen und direkt im Labor untersucht.
 - o Der Zweck ist die Bestimmung der Phagozytose-Fähigkeit von weißen Blutzellen.
 - o Das Blut wird verbraucht bzw. eventuelle Reste werden vernichtet.
 - o Den einzelnen Proben werden Diagnose, Alter und Geschlecht des Patienten bzw. der Patientin zugeordnet. Die Daten werden vertraulich behandelt.
 - o Sie bekommen keine Information über die Ergebnisse des von Ihnen stammenden Materials und Sie haben keinen persönlichen Nutzen. Ihr weiterbehandelnder Arzt wird nicht über die Daten aus Ihrem Material informiert. Das Restmaterial wird vernichtet und eine kommerzielle Verwertung des Materials findet nicht statt.
- Datenschutz: Die Daten werden vertraulich behandelt.
- Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und Sie können Ihre Einwilligung jederzeit zurückziehen, also von der Teilnahme zurücktreten. Bei einem Rücktritt innerhalb der Studiendauer werden Ihre Daten vernichtet.

Einwilligung zur Studie

Phagozytose-Aktivität von Blutleukozyten bei Mukoviszidose

Hiermit erkläre ich meine Einwilligung zur Blutentnahme in der oben beschriebenen Form. Ich kann meine Einwilligung jederzeit, formlos ohne Nachteile widerrufen. Alle Fragen zur Studie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet. Die Daten werden anonym ausgewertet.

Eine Kopie des Informationsblattes habe ich erhalten.

Datum

Patientin/Patient

Aufklärende/r Ärztin/Arzt

Anhang 2: Übersicht der CF-Patientengruppe

Patient	Geschlecht	Alter zum Zeitpunkt der Messung (in Jahren)	Mutation	CRP in mg/l	Leukozyten in $\cdot 10^9/l$	Keimbildung der Lungen
LL1	m	21	N1303K homozygot	6,1	13,7	PSAE
LL2	m	26	G542X / G542	8,9	15	PSAE
LL3	m	38	DF 508 homozygot	36,7	13,7	PSAE
LL4	m	39	DF 508 homozygot	7,6	12,4	PSAE, STAU
LL5	w	30	DF 508 homozygot	3,6	8,7	PSAE, E.coli
LL6	w	44	DF 508 homozygot	7,1	12,6	PSAE
LL7	m	22	DF 508 homozygot	9,2	9,3	PSAE
LL8	w	29	DF 508 / c.3276>A (p.Tyr1092*)	16,6	9,2	PSAE
LL9	w	23	DF 508 homozygot	6,8	12,8	STAU
LL10	w	22	DF 508 homozygot	0,6	11,1	STAU, Stenotrophomonas maltophilia
LL11	w	33	I 148 T / IVS 8-5 T	6,6	7,2	STAU
LL12	m	25	DF 508 homozygot	0,3	8,7	PSAE
LL13	m	30	DF 508 homozygot	16,1	7,2	Burkholderia cepacia
LL14	w	34	DF 508/G542X	15	16,6	PSAE, Stenotrophomonas maltophilia
LL15	w	28	DF508 / p.Leu999Ter (c.2996T>G)	44,5	8,1	PSAE
LL16	m	33	DF 508 homozygot	21,2	12,4	PSAE
LL17	w	33	Compound Heterozygotie DF 508 / W1282X	0,3	9,6	MRSA
LL18	w	28	DF 508 homozygot	4,2	12,2	Burkholderia gladioli, STAU
LL19	m	23	DF 508 homozygot	0,3	7	PSAE
LL20	w	30	DF 508 homozygot	8,6	6,1	PSAE, STAU
LL21	m	27	DF 508/G542X	7,5	9,8	STAU, Scedosporium apiospermum im Bronchialaspirat, atyp. Mycobakterien im Sputum
LL22	m	33	DF 508 homozygot	6,3	4,4	PSAE
LL23	m	36	DF 508 homozygot	3,9	6,5	PSAE, MRSA
LL24	w	19	DF 508 homozygot	8	14,3	STAU
LL25	m	23	DF 508 homozygot	1,9	9,3	STAU
LL26	m	23	DF 508 homozygot	12	19,8	PSAE, Scedosporium prolificans
LL27	w	29	I336K / unidentifiziert	18,6	19,2	MRSA
LL28	w	18	DF 508 homozygot	1,1	10,3	STAU
LL29	w	32	DF homozygot	6,8	9,6	PSAE
LL30	m	31	Compound-Heterozygotie dF508 / N1303K	9,3	11,6	PSAE
LL31	w	25	DF 508 heterozygot	25,9	14,4	PSAE
LL32	w	18	DF 508 homozygot	6,1	14,7	MRSA
LL33	w	18	DF 508 homozygot	0,9	7,5	STAU, PSAE
LL34	w	34	DF 508 / nicht identifiziert	0,5	6,2	PSAE
LL35	w	39	DF 508 heterozygot	29,7	22,4	PSAE

Anhang 3: Übersicht der gemessenen Phagozytosewerte der Patienten- und Kontrollgruppe

Patient	Geschlecht	Alter zum Zeitpunkt der Messung (in Jahren)	Phagozytierende Neutrophile [%]	GeoMean Neutrophile	Phagozytierende Monozyten [%]	GeoMean Monozyten
LL1	m	21	60%	60	69%	108
LL2	m	26	85%	503	71%	142
LL3	m	38	90%	859	82%	434
LL4	m	39	94%	1.449	82%	403
LL5	w	30	96%	2.083	84%	456
LL6	w	44	85%	498	68%	143
LL7	m	22	75%	182	68%	117
LL8	w	29	86%	435	66%	86
LL9	w	23	96%	1.293	93%	982
LL10	w	22	86%	433	77%	244
LL11	w	33	89%	642	83%	459
LL12	m	25	84%	349	61%	73
LL13	m	30	75%	203	60%	75
LL14	w	34	94%	1.152	80%	267
LL15	w	28	43%	20	51%	34
LL16	m	33	81%	285	66%	88
LL17	w	33	96%	1.420	81%	357
LL18	w	28	97%	1.737	84%	504
LL19	m	23	97%	1.392	81%	296
LL20	w	30	94%	1.045	83%	321
LL21	m	27	93%	1.100	91%	720
LL22	m	33	88%	811	72%	196
LL23	m	36	36%	11	73%	124
LL24	w	19	86%	347	91%	646
LL25	m	23	95%	1.055	91%	793
LL26	m	23	99%	2.107	95%	839
LL27	w	29	90%	532	85%	291
LL28	w	18	69%	114	76%	165
LL29	w	32	75%	128	71%	101
LL30	m	31	99%	2.091	96%	941
LL31	w	25	70%	109	86%	280
LL32	w	18	91%	562	96%	613
LL33	w	18	97%	1.549	94%	734
LL34	w	34	71%	98	52%	27
LL35	w	39	61%	58	88%	401

Kontrollperson	Geschlecht	Alter zum Zeitpunkt der Messung (in Jahren)	Phagozytierende Neutrophile [%]	GeoMean Neutrophile	Phagozytierende Monozyten [%]	GeoMean Monozyten
LKG1	m	54	92%	194	66%	91
LKG2	w	23	74%	654	63%	92
LKG3	w	22	81%	223	84%	278
LKG4	w	22	78%	185	80%	235
LKG5	w	25	75%	153	71%	123
LKG6	m	26	71%	115	66%	105
LKG7	w	22	98%	1.357	89%	613
LKG8	w	23	92%	592	90%	479
LKG9	w	22	90%	621	91%	659
LKG10	w	39	98%	1.570	95%	969
LKG11	w	53	96%	1.161	91%	692
LKG12	m	31	97%	1.214	91%	648

Publikation

Leuer, Laura; Krill, Angelika; Wilkens, Heinrike; Wagenpfeil, Gudrun; Bischoff, Markus; Meier, Carola; Bals, Robert; Tschernig, Thomas (2019): The Phagocytosis of Blood Leukocytes from Cystic Fibrosis Patients is not Impaired in General. In: *Lung*. DOI: 10.1007/s00408-019-00290-9.

Danksagung

Zuletzt möchte ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig, als Doktorvater und Betreuer, für die Vergabe des Themas der Doktorarbeit, sein Engagement und die gute fachliche Betreuung.

Danken möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals, Frau Prof. Dr. Heinrike Wilkens und Frau Dr. Krill sowie dem Personal der pulmologischen Ambulanz für die Hilfe bei der Koordination der Patiententermine und der Blutentnahmen.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Carola Meier für die Aufnahme in Ihre Abteilung und die Bereitstellung von Geräten und Materialien. Ebenfalls gilt mein Dank den Mitarbeitern des Labors, insbesondere Frau Andrea Rabung, für Hilfestellungen bezüglich technischer Details und der Durchführung der Versuche. Frau Prof. Gudrun Wagenpfeil danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Zum Schluss möchte ich mich herzlich bedanken bei meinem Freund Victor, meiner Familie und meinen Freunden für die stetige Unterstützung und die motivierenden Worte während meines gesamten Studiums.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.