

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Interaktion humaner iNKT-Zellen mit dem
Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus***

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Daniel Gundel

aus Langenfeld

Würzburg, 2015



Referent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Eyrich
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juni 2016

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern Hans und Gerlinde

A Einleitung	1
1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1. Geschichte und Biologie von <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1.1. Historie	1
1.1.2 Taxonomie.....	1
1.1.3 Morphologie und Aufbau.....	2
1.1.4 Virulenzfaktoren.....	2
1.2 Klinik der <i>Aspergillus fumigatus</i> Infektion.....	3
1.2.1 Klinische Erscheinungsbilder.....	3
1.2.2 Epidemiologie	5
1.2.3 Pathophysiologie	6
1.2.4 Diagnose	6
1.2.5 Therapie	7
2 NKT-Zellen.....	7
2.1 Entdeckung und Geschichte	7
2.2 Charakterisierung/Definition.....	8
2.3 Das MHC-Klasse-I-Molekül CD1d.....	9
2.3.1 Vorkommen	9
2.3.2 Liganden.....	11
2.4 Entwicklung.....	12
2.5 Funktion	12
2.6 Rolle und Aufgaben	13
3 Zielsetzung der Arbeit	14

B Material und Methoden	15
1 Material	15
1.1 Puffer und Medien.....	15
1.2 Chemikalien	15
1.3 Antikörper und Isotypen	16
1.4 Verbrauchsmaterial.....	17
1.5 Geräte.....	18
1.6 Kits.....	20
1.7 Primer	20
2 Methoden.....	21
2.1 Isolierung mononukleärer Zellen.....	21
2.2 Zellkultur	22
2.3 Magnetische Zellseparation	23
2.4 Durchflusszytometrie	23
2.5 XTT-Assay	25
2.6 ELISA.....	25
2.7 Genexpressionsanalyse.....	28
2.7.1 RNA-Isolierung	28
2.7.2 cDNA-Umschrieb.....	28
2.7.3 Microarray Affymetrix HG-U219.....	28
2.7.4 Pathway Analyse	29
2.7.5 Real-Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	29
2.8 Statistik	31

C Ergebnisse.....	32
1 Phänotypisierung	32
2 iNKT-Zellen haben fungiziden Effekt auf <i>A. fumigatus</i> Keimschläuche.....	33
3 Zytokinsekretion von iNKT-Zellen bei <i>A. fumigatus</i> Exposition	35
4 Differentielle Genexpression von iNKT-Zellen bei <i>A. fumigatus</i> Exposition	39
D Diskussion	46
E Zusammenfassung	58
F Literaturverzeichnis	59
G Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	81
Anhang.....	82
Abkürzungsverzeichnis	87
Danksagung	89
Lebenslauf.....	91

A Einleitung

1. *Aspergillus fumigatus*

1.1 Geschichte und Biologie von *Aspergillus fumigatus*

1.1.1. Historie

Aspergillus fumigatus (*A. f.*) ist der wichtigste humanpathogene Schimmelpilz des Genus *Aspergillus*. Die Genus-Bezeichnung ist auf Antonio Micheli zurückzuführen [1727], der in der Morphologie des Pilzes Ähnlichkeiten zu einem in der katholischen Liturgie verwendeten Weihwassergefäß (*aspergillum*) sah (1). Der wahrscheinlich erste Bericht einer Aspergillose ist auf 1789 datiert und von Plaignaud verfasst. 1856 folgte die erste ausführliche klinische Beschreibung einer pulmonalen Aspergillose durch Rudolph Virchow, woraufhin *A. f.* 1863 von J.B. Georg Fresenius in Frankfurt entdeckt und morphologisch charakterisiert wurde. Dieser hatte hierfür Präparate aus „Bronchien und anderen Lufthöhlen“ der Großtrappe (*otis tarda*) untersucht (2, 3).

1.1.2 Taxonomie

Das Genus *Aspergillus* wird unterteilt in sieben Subgenera, welche sich wiederum aus Sektionen verwandter Spezies zusammensetzen. Bisher sind mehr als 250 Spezies bekannt (4). Die klinisch relevanteste stellt *A. fumigatus* dar. Sie wurde innerhalb der Schimmelpilze lange Zeit zu den *fungi imperfecti* (*Deuteromycetes*) gerechnet, da keine sexuelle Form des Pilzes bekannt war. Wie bei der Mehrzahl der übrigen Spezies, war bei *A. f.* lediglich die mitotische Fortpflanzung bekannt, der Pilz wurde also als anamorph bezeichnet. Genetische Hinweise deuteten jedoch auf das Vorhandensein einer sexuellen/teleomorphen Form von *A. f.* hin (5-8). Diese wurde 2009 entdeckt und als *Neosartorya fumigata* bezeichnet (9). Zwar wird in der Mykologie bevorzugt ein Pilz nach seiner teleomorphen Form benannt, jedoch besteht der Konsens den Namen *Aspergillus fumigatus* weiterzuführen (10).

1.1.3 Morphologie und Aufbau

Im Rahmen des asexuellen Lebenszyklus von *A. fumigatus* treten unterschiedliche Morphologien auf. Das ausgeprägte Pilzgeflecht von *A. f.* bildet Fortpflanzungsorgane aus, sog. Konidiophoren, welche ca. 2-3µm große, runde Konidien absondern. Konidien sind sehr resistent gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen sowie gegenüber dem angeborenen Immunsystem. Herrschen hinsichtlich Feuchtigkeit, Temperatur, pH-Wert und anderen Faktoren günstige Bedingungen, entstehen aus Konidien Keimschläuche, welche sich wiederum zu Hyphen und einem Myzel (Hyphengeflecht) formieren. Wie für Pilze üblich, sind alle Vegetationsstadien von einer Zellwand umgeben. Sie besteht aus zwei Schichten, wobei die der Zellmembran unmittelbar anliegende Schicht bei Konidien und Hyphen weitestgehend identisch ist. Zusammengesetzt wird sie vorwiegend aus den Polysacchariden β -1,3-Glucan, α -1,3-Glucanen, Galactomannan, Galactosaminogalactan und Chitin/Chitosan. Insbesondere bei Konidien ist die äußere Schicht stark melaninhaltig, was ihre Widerstandsfähigkeit erklärt (11). Bei Hyphen hingegen wird zunehmend β -1,3-Glucan und Chitin an der Oberfläche exponiert, was zur Alteration der Immunantwort gegenüber *A. f.* führt (12).

1.1.4 Virulenzfaktoren

Virulenzfaktoren sind Eigenschaften eines Pathogens, welche nicht essentiell für deren Wachstum sind, aber gleichzeitig dem Wirt schaden können. Die Virulenz bzw. Pathogenität von *A. fumigatus* kann nur vor dem Hintergrund einer angeborenen/erworbenen Immunschwäche des Wirtes betrachtet werden, da der Pilz lediglich unter diesen Umständen in der Lage ist eine systemische Infektion zu verursachen (13). Zweifelsohne besitzt *A. f.* Eigenschaften, die ihn im Vergleich mit anderen Pilzen pathogener machen:

- Konidiengröße: Verglichen mit den ebenfalls humanpathogenen Schimmelpilzen *A. niger* und *A. flavus* sind Konidien von *A. f.* mit 2-3µm klein genug, um nach Inhalation Alveolen zu erreichen und dort eine Infektion zu verursachen (13).

- Das in der Zellwand von *A. f.* Konidien enthaltene Melanin ist auch bei zahlreichen anderen Pilzen ein Pathogenitätsfaktor. Es kann reaktive Sauerstoffspezies (ROS) von Makrophagen neutralisieren (14). Entsprechend sind *A. f.*-Stämme mit defekter Melaninsynthese deutlich weniger virulent (15). Schützend gegenüber oxidativem Stress agieren zusätzlich die cytoplasmatisch bzw. mitochondrial lokalisierte Superoxiddismutase sowie Stäbchen (*rodlets*), welche die Konidien-Zellwand bedecken (16, 17).
- Elastase-Aktivität: Elastin ist ein Grundbestandteil des Lungen-Bindegewebes. Einfach nachvollziehbar ist deshalb eine positive Korrelation zwischen Elastase-Aktivität von *A. f.* und dem Grad der Invasivität der Infektion. In der Tat exprimiert *A. f.* mehrere Proteine, welche Elastase-Aktivität besitzen und die zur Virulenz des Pilzes beitragen (13, 18, 19).
- Gliotoxin: In Patienten, die an einer von *A. f.* verursachten invasiven Aspergillose leiden, wird häufig und in wesentlicher Konzentration der sekundäre Metabolit Gliotoxin gefunden (20). Für die Virulenz von Gliotoxin werden zahlreiche Mechanismen verantwortlich gemacht. So kann es durch Generierung von ROS zytotoxisch wirken (21). Es hemmt aber auch die Funktion phagozytierenden Immunzellen, induziert deren Apoptose und mindert die Zytokinsekretion mittels Blockade des NF- κ B-Signalweges (22-24). Gliotoxin scheint bei Neutropenie jedoch nicht in gleichem Maße als Virulenzfaktor eine Rolle zu spielen (25).

1.2 Klinik der *Aspergillus fumigatus* Infektion

1.2.1 Klinische Erscheinungsbilder

Die Inhalation von *Aspergillus*-Sporen führt bei gesunden Menschen in der Regel zur Elimination des Erregers ohne Symptome zu verursachen. Liegen jedoch bei Patienten prädisponierende Faktoren wie eine lokale oder systemische Immunsuppression vor, können humanpathogene *Aspergillus*-

Spezies verschiedene klinische Erscheinungsbilder verursachen. Deren Ausprägung ist wiederum abhängig vom Grad der Immunsuppression, Grunderkrankungen und lokalen anatomischen Gegebenheiten:

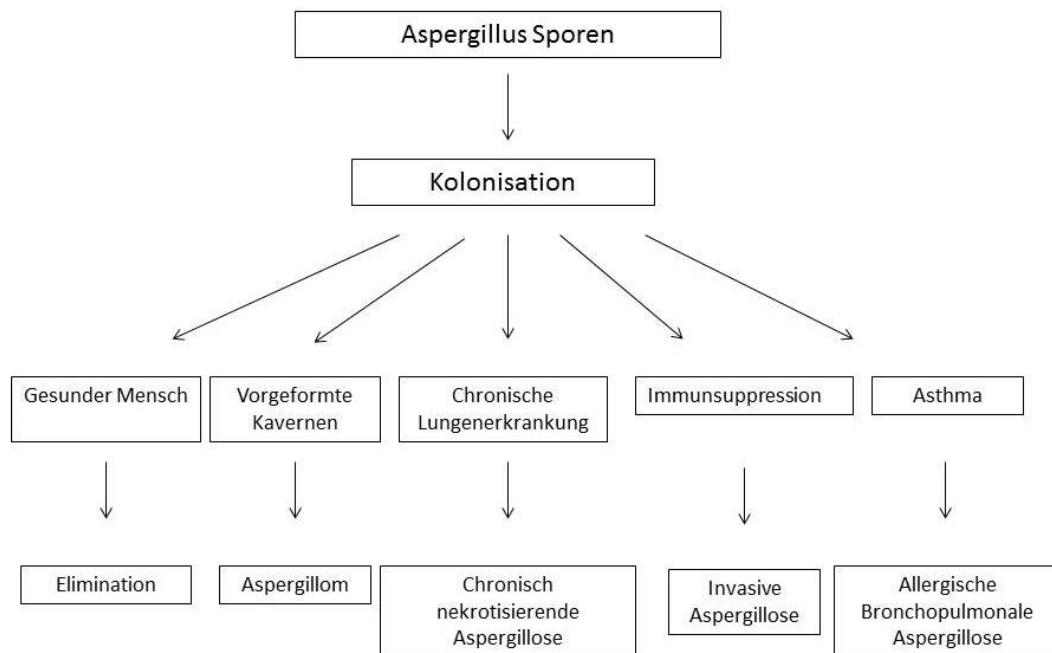


Abbildung 1: Klinische Erscheinungsbilder der Aspergillose, modifiziert nach Soubani (26)

- Bronchopulmonale Aspergillose: Patienten mit Asthma bronchiale oder zystischer Fibrose sind besonders prädisponiert auf die Inhalation von *A. fumigatus*-Sporen hypersensitiv zu reagieren (27, 28).
- Aspergillom: Führen Grunderkrankungen wie Tuberkulose, Sarkoidose, Bronchiektasien o.Ä. zur lokalen Erweiterung des Bronchialsystems, können sich dort nicht selten Konglomerate aus *Aspergillus*-Hyphen, Entzündungszellen und Zelldebris bilden (28).
- Chronisch nekrotisierende Aspergillose: Recht seltenes Krankheitsbild, welches sich meist auf dem Boden einer chronischen Lungenerkrankung (chronisch obstruktive Lungenerkrankung, zystische Fibrose, Strahlentherapie) entwickelt und von manchen Autoren als Vorstufe zur invasiven Aspergillose betrachtet wird (28, 29).

- Invasive Aspergillose: Diese im Fokus dieser Arbeit stehende Erkrankung kann vornehmlich durch vier verschiedene *Aspergillus*-Spezies verursacht werden. Marr et al. isolierten bei Patienten, die eine Hochdosischemotherapie bzw. Stammzelltransplantation erhalten hatten, neben *A. fumigatus* (67%) auch *A. flavus* (13%), *A. niger* (9%) und *A. terreus* (7%) (30). Am häufigsten ist der pulmonale Befall. Durch hämatogene Ausbreitung des Erregers, bzw. *per continuitatem*, können jedoch auch andere Organe in Mitleidenschaft gezogen werden, wie beispielsweise das zentrale Nervensystem, Leber, Milz, Knochen oder Haut. Klinisch ergibt sich daher ein vielseitiges Bild, wobei die pulmonale invasive Aspergillose gekennzeichnet ist von trockenem Husten, Fieber und pulmonalen Infiltraten trotz antibiotischer Therapie (31).

1.2.2 Epidemiologie

Erworbene, oder in seltenen Fällen hereditäre Defekte der angeborenen Immunität sind ein Hauptrisikofaktor der invasiven Aspergillose. So erkrankten Patienten mit chronischer Granulomatose, deren neutrophile Granulozyten eine defekte NADPH-Oxidase exprimieren, gehäuft an einer invasiven Aspergillose (32). Die Rolle der neutrophilen Granulozyten wird auch dadurch unterstrichen, dass Patienten mit Neutropenie, sei es im Rahmen einer Hochdosischemotherapie, Stammzelltransplantation oder Transplantation eines soliden Organes, besonders anfällig für *Aspergillus*-Infektionen sind (31). Unabhängig von einer Neutropenie ist die Inzidenz der invasiven Aspergillose erhöht bei AIDS, Kortikosteroidtherapie und Therapie mit TNF- α -Inhibitoren (31, 33). Auf Intensivstationen beobachtet man gehäuft Infektionen mit *A. fumigatus*, unabhängig vom Immunstatus (34-36). Je nach zugrundeliegender Erkrankung variiert die Inzidenz zwischen 0.7% bei Nierentransplantierten und im Mittel 7% bei Patienten, die sich einer allogenen Stammzelltransplantation unterziehen (37-39). Die Mortalität ist mit über 70% selbst in der Ära neuer antimykotischer Therapien durchgehend unbefriedigend hoch, wobei der Befall des zentralen Nervensystems prognostisch besonders ungünstig zu werten ist (40).

1.2.3 Pathophysiologie

Aspergillus Konidien sind ubiquitär verbreitet und werden in großer Anzahl - Schätzungen gehen von mehreren hundert pro Tag aus- inhaliert (13, 41, 42). Werden Konidien nicht durch die mukoziliäre Reinigung (*clearance*) des Bronchialepithels eliminiert, werden sie von Alveolarmakrophagen phagozytiert und durch das NADPH-Oxidase-abhängige ROS-System unschädlich gemacht (43, 44). Dies geht einher mit einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, welche in der Lage sind Hyphen von *A. fumigatus* zu eliminieren (45-48). Unter anderem deshalb wird davon ausgegangen, dass es bei neutropenen Patienten zu einem unkontrollierten Wachstum des *A. fumigatus* Myzels kommt. Es folgen Thrombosen und Infarzierung des Lungengewebes und letztlich eine Angioinvasion und Dissemination des Schimmelpilzes. Sind Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten lediglich in qualitativer Hinsicht gestört, wie es bei einer Kortikosteroidtherapie der Fall ist, soll eine überschießende Entzündungsreaktion zur hohen Morbidität und Mortalität beitragen (13, 49).

1.2.4 Diagnose

Die aktuelle Leitlinie zur Diagnose der invasiven Aspergillose (und anderer invasiven Mykosen) unterteilt die Wahrscheinlichkeit der korrekten Diagnose „invasive Aspergillose“ in *gesichert*, *wahrscheinlich* und *möglich*. Von einer *gesicherten* Diagnose ist auszugehen, wenn durch eine Biopsie des Infektionsfokus *Aspergillus* histopathologisch und mittels Pilzkultur nachgewiesen werden kann. *Wahrscheinlich* wird die Diagnose, wenn der Patient prädisponiert für eine Aspergillose erscheint (z.B. prolongierte Neutropenie, immunsuppressive Therapie), die klinischen Symptome durch eine invasive Mykose erklärbar sind und gleichzeitig bestimmte mykologische Kriterien erfüllt sind. Letztere umfassen den Nachweis von Galactomannan in Plasma, Serum, bronchoalveolärer Lavage oder Liquor bzw. β -D-Glucan im Serum oder eine auf *Aspergillus* positive Zytologie/Kultur aus Proben, die nicht direkt aus dem Infektionsfokus entnommen wurden. Sind klinische Symptome und prädisponierende Faktoren ohne gleichzeitige mykologische Hinweise auf

invasive Aspergillose vorhanden, wird die Diagnose als *möglich* eingestuft. Konzipiert ist diese Leitlinie lediglich für den Einsatz in klinischen und epidemiologischen Studien (50). Ein breiter Konsens für einen diagnostischen Algorithmus im klinischen Umfeld existiert allerdings nicht. Der molekulargenetische Nachweis von *A. fumigatus* ist möglich, aber noch nicht hinreichend standardisiert und hat daher noch keinen Einzug in aktuell gültige Leitlinien gefunden (51).

1.2.5 Therapie

Medikamente aus der Gruppe der Azole, Polyene und Echinocandine sind wirksam in der Behandlung und z.T. in der Prophylaxe der invasiven Aspergillose. Die beste Evidenz für die Therapie der invasiven Aspergillose besteht momentan für den Einsatz von Voriconazol, wohingegen für die Prophylaxe Posaconazol empfohlen wird (52, 53). In der aktuellen Leitlinie der *Infectious Disease Society of America* wird jedoch auch betont, dass die Beendigung einer temporären Neutropenie prognostisch entscheidend ist (53). Versuche die Phase der Neutropenie zu verkürzen, sei es durch GM-CSF oder Granulozytenkonzentrate, zeigten dementsprechend zum Teil positive Ergebnisse bezüglich Infektionsrate und Prognose (54, 55). Nichtsdestotrotz bleibt die invasive Aspergillose immer noch mit einer erheblichen Mortalität vergesellschaftet (56, 57).

2 NKT-Zellen

2.1 Entdeckung und Geschichte

Zwar wurde der Begriff „NKT-Zelle“ erstmals 1995 publiziert, jedoch wurde man bereits Mitte der 1980er Jahre auf eine murine T-Zell-Population aufmerksam, die sich in mehrerer Hinsicht von den bis dahin bekannten T-Zellen unterschieden (58). In der Zusammensetzung des T-Zell-Rezeptors (TCR) zeigte sich die V β 8-Expression überrepräsentiert (59), die α -Kette des TCR stellte sich als invariant heraus (60). Die Korezeptoren CD4 und CD8 wurden nicht exprimiert (59). Später zeigte man, dass diese Zellen NK1.1 exprimieren,

was bis zu diesem Zeitpunkt nur bei NK-Zellen nachgewiesen worden war (61, 62). Durch gleichzeitige Expression von NK1.1 und TCR entstand der Begriff *NKT-Zelle* (58). Wenig später wurde die Abhängigkeit der NKT-Zell-Entwicklung von CD1d gezeigt und ein Modellligand für CD1d entdeckt: α -Galactosylceramid (α -GalCer) (63-65). Das humane Äquivalent der murinen NKT-Zellen wurde 1993 beschrieben (66). Auch wenn die Koexpression von NK1.1 (bzw. CD161 beim Menschen) und TCR die NKT-Zellen als solche heutzutage nicht mehr definieren, hat sich der Begriff konserviert; unter anderem auch, weil NKT-Zellen funktionelle Eigenschaften von NK- und T-Zellen zeigen.

2.2 Charakterisierung/Definition

NKT-Zellen definieren sich als Zellen, die das MHC-Klasse-I-Molekül CD1d erkennen (siehe 2.3). NKT-Zellen sind ferner charakterisiert durch ein beschränktes Repertoire an TCR. So findet man bei einem Großteil humaner NKT-Zellen fast ausschließlich TCR mit einer V α 24J α 18-Kette, welche mit einer V β 11-Kette gepaart ist. Eine gewisse Plastizität des TCR wird dadurch bedingt, dass die J β -Region des TCR variabel bleibt (66, 67). Die Zellen dieser größten Gruppe werden als Typ-I NKT-Zellen oder iNKT-Zellen (für invariant) bezeichnet. Eine weitere, weitaus weniger untersuchte Gruppe CD1d-reaktiver NKT-Zellen, zeigt eine größere Diversität im TCR-Repertoire und werden Typ-II NKT-Zellen oder dNKT-Zellen (für diverse) genannt (68). In dieser Arbeit wird sich auf iNKT-Zellen fokussiert werden.

Phänotypisch nehmen iNKT-Zellen eine Stellung zwischen NK- und T-Zellen ein. Die Beschreibung, dass NK1.1 (beim Menschen CD161), eigentlich ein Marker für NK-Zellen, auch auf NKT-Zellen exprimiert wird, trug zur Entdeckung der selbigen bei (61, 62). Neben dem TCR/CD3 exprimieren NKT-Zellen aber auch andere Marker von T-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß, so z.B. CD4 und/oder CD8. Die differentielle Expression von letztgenannten Korezeptoren findet Einlass in eine weitere Einteilung von NKT-Zellen, um deren Funktionen besser zu beschreiben (68). Alle genannten Marker dienen heutzutage aber nicht mehr zur Definition von NKT-Zellen, da zahlreiche Varianten dieser Zellpopulation beschrieben worden sind. So exprimiert eine Gruppe von NKT-

Zellen kein NK1.1, eine andere Gruppe zeigt keine Expression der Korezeptoren CD4 bzw. CD8 (69-71). Als gemeinsamer Nenner verbleibt lediglich die CD1d-Restriktion.

2.3 Das MHC-Klasse-I-Molekül CD1d

Ähnlich wie Proteine der MHC-Familie (*major histocompatibility complex*) sind Proteine der CD1-Gruppe in der Lage endogene Substanzen an der Zelloberfläche gegenüber T-Zellen zu präsentieren. Anders als bei MHC-I-Molekülen sind dies jedoch nicht Peptide, sondern (Glyko-)Lipide. Während es in der Maus lediglich ein CD1-Molekül gibt (entspricht dem humanen CD1d), besitzt der Mensch fünf verschiedene CD1-Gene, CD1a bis e. Für CD1e ist eine Präsentation von Lipiden gegenüber T-Zellen noch nicht beschrieben worden, sodass dieses Molekül eine Sonderstellung gegenüber den vier restlichen einnimmt. Cd1a-d unterscheiden sich in der Spezifität gegenüber den Lipiden, welche sie exponieren, des Mechanismus der intrazellulären Beladung und der zellulären Verteilung. Während CD1a, CD1b und CD1c eine Klasse I bilden, wird ihnen mit CD1d die Klasse II der CD1 Moleküle gegenübergestellt (72). CD1d interagiert exklusiv mit NKT-Zellen, weswegen sich im Folgenden darauf fokussiert wird.

2.3.1 Vorkommen

CD1d wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, so z.B. auf Thymozyten, Hepatozyten oder Darmepithel (73). Am stärksten und vermutlich auch am bedeutendsten ist jedoch dessen Expression auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), vornehmlich B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen (74, 75).

a. Dendritische Zellen

Entdeckt 1973 vom späteren Nobelpreisträger Ralph M. Steinman und benannt nach der typischen Morphologie mit zahlreichen Ausläufern (Dendriten) werden dendritische Zellen (DCs) mittlerweile als heterogene Gruppe von Zellen angesehen. Jedoch sind sie nach wie vor die wichtigste Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität (76, 77). Im peripheren Blut werden nach aktueller Nomenklatur zwei Gruppen unterschieden. Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) exprimieren im Gegensatz zu myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) das Oberflächenantigen CD68. mDCs werden wiederum subklassifiziert in CD1c⁺- und CD141⁺-Zellen (78). Die Interaktion von CD1d mit iNKT-Zellen ist innerhalb der CD1d-tragenden Zellen bei DCs am besten beschrieben. Auch die intrazellulären Wege von CD1d bzw. das Beladen mit Lipiden ist vornehmlich an DCs untersucht worden (79). DCs sind innerhalb der CD1d⁺-Zellen auch die stärksten Aktivatoren von iNKT-Zellen (Beitz-Heineke et al., vor Publikation).

Auch im peripheren Gewebe gibt es eine Vielzahl verschiedener DCs, auf deren Einteilung im Weiteren nicht genauer eingegangen werden soll. Erwähnt sei jedoch, dass in Luftwegen und Lungenparenchym DCs vorkommen, welche *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuche endozytieren und die darauf folgende Immunantwort orchestrieren können (80).

b. Monozyten

Monozyten zeigen unterschiedliche Profile der Zytokinproduktion und werden deshalb anhand der Expression von CD14 bzw. CD16 in drei Klassen unterteilt: Klassische CD14⁺/CD16⁻, intermediäre CD14⁺⁺/CD16⁺ und nicht-klassische CD14⁺/CD16⁺⁺ Monozyten (78). Es sind Zellen des peripheren Blutes und differenzieren in DCs oder Makrophagen. Die Bedeutung der CD1d-Expression und somit die Interaktion mit iNKT-Zellen ist weit weniger gut beschrieben als für DCs, auch wenn Monozyten effektiv Glykolipide via CD1d präsentieren können (74, 81). Auf der anderen Seite können iNKT-Zellen eine Differenzierung von Monozyten in DCs anstoßen (82).

c. B-Zellen

B-Zellen sind in der Lage mikrobielle Glykolipide zu internalisieren und sie anschließend gegenüber iNKT-Zellen via CD1d zu präsentieren. Die Aufnahme des Antigens kann B-Zell-Rezeptor-vermittelt geschehen, es wird aber auch eine LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose von an ApoE-gebundenen Glykolipiden diskutiert, wie sie für DCs bereits beschrieben ist (83, 84). Umgekehrt wirken sich iNKT-Zellen auch auf B-Zellen und die humorale Immunität aus. So wird die Antikörper-Produktion von B-Zellen gegenüber verschiedenen Pathogenen im Beisein von iNKT-Zellen erhöht bzw. die Antikörperaffinität durch α -GalCer verstärkt (85-88). Ob das Antigen hierfür aber von B-Zellen präsentiert werden muss, oder doch DCs eine Mittlerrolle einnehmen, ist unzureichend beantwortet (84, 89).

2.3.2 Liganden

Via CD1d werden iNKT-Zellen in aller Regel endogene Lipide präsentiert (90). Zur Entdeckung der NKT-Zellen trug jedoch ein exogenes Lipid bei: α -GalCer entstammt dem marinen Schwamm *Agelas mauritianus* und wird seitdem als Modellsubstanz zur Charakterisierung von iNKT-Zellen verwendet (65). Das prototypische endogene Lipid für CD1d ist bisher noch nicht gefunden. Über die Natur des endogenen Liganden herrscht Uneinigkeit. Isoglobotrihexosylceramid (iGb3) wird als Kandidat hierfür herangezogen, da es, von CD1d⁺-Zellen präsentiert, in der Lage ist humane iNKT-Zellen zu aktivieren (91). Jedoch besitzt der Mensch nicht das für die Synthese von iGb3 wichtige Enzym iGb3-Synthase (92). Von CD1d können auch exogene, mikrobielle Lipide präsentiert werden. Mikrobielle Lipide, welche somit einen aktivierenden Einfluss auf iNKT-Zellen haben, wurden aus *Streptococcus pneumoniae*, *Borrellia burgdorferi* und *Leishmania donovani* extrahiert, scheinen insgesamt aber nur eine untergeordnete Rolle bei der Stimulation von iNKT-Zellen zu spielen (93, 94). Zuletzt wurde jedoch das erste fungale Lipid aus *A. fumigatus* isoliert (Asperamid B), welches in der Lage ist iNKT-Zellen zur Zytokinproduktion anzuregen (95).

2.4 Entwicklung

iNKT-Zellen unterliegen im Thymus einer positiven (und möglicherweise auch negativen) Selektion (96, 97). Mit T-Zellen gemeinsame Vorläuferzellen, welche einen auf CD1d präsentierten endogenen Liganden erkennen, entwickeln sich zu iNKT-Zellen (98). CD1d wird im Thymus vorwiegend auf Thymozyten und Stromazellen exprimiert. Über die Natur des endogenen Liganden ist man uneins, Isoglobotrihexosylceramid (iGb3) ist jedoch auch hier ein Kandidat (91). Während im Thymus noch sehr wenige Zellen CD161 exprimieren, wird dieser Reife-Marker vor allem nach Wanderung der iNKT-Zellen ins periphere Blut hochreguliert (99, 100). Dort sind iNKT-Zellen mit einem Anteil von 0.1-1% aller mononukleären Zellen recht selten vorhanden (101).

2.5 Funktion

Die Interaktion mit CD1d-exprimierenden APC ist von entscheidender Bedeutung für Entwicklung und Funktion von iNKT-Zellen. Das Zusammenspiel mit dendritischen Zellen, als spezialisierte APC, ist dabei am besten beschrieben. Damit es zur Aktivierung von iNKT-Zellen kommt, sind hierbei zwei Schritte entscheidend: Zum einen die Bindung des invarianten TCR an mit einem (fremden oder endogenen) Lipid beladenen CD1d-Molekül. Zum anderen ein kostimulatorisches Signal, welches hier in Form von proinflammatorischen Zytokinen (hauptsächlich IL-12) gegeben wird und nicht, wie bei T-Zellen, durch Korezeptoren (68). Eine effektive Aktivierung von iNKT-Zellen ist ohne das kostimulatorische Signal nicht möglich, jedoch ist IL-12 durchaus für sich alleine in der Lage iNKT-Zellen zu stimulieren (93, 102). Hauptquelle des IL-12 sind DCs, welche das Zytokin nach Erkennen fremder Strukturen via *pattern recognition receptors* (PRR) oder anderer Gefahrensignalen sezernieren. Im aktivierten Zustand exprimieren iNKT-Zellen eine Vielzahl von Zytokinen: vornehmlich IFN- γ und TNF- α , aber auch IL-2, IL-4, GM-CSF und andere (103). Diese bewirken die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Effektorzellen, wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen (104, 105). Durch Interaktion von CD40-Rezeptor auf DCs und CD40-Ligand auf iNKT-Zellen kommt es im Sinne einer positiven Rückkopplung zur zusätzlichen Produktion

von IL-12 durch DCs (93). Aber auch Vertreter der adaptiven Immunität werden beeinflusst. So bewirken iNKT-Zellen eine vermehrte Kreuzpräsentation von DCs und somit Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen sowie eine gesteigerte Reaktion CD4⁺ T-Zellen auf Proteinantigene (106-108).

iNKT-Zellen stellen also ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Eine Zwischenstellung zwischen beiden Zweigen der Immunantwort ließ sich auch auf transkriptioneller Ebene nachweisen (109).

2.6 Rolle und Aufgaben

iNKT-Zellen zeigen Eigenschaften beider Zweige der Immunantwort. So kennzeichnet der Besitz eines TCR die Zugehörigkeit zum erworbenen/adaptiven Immunsystem. Gleichzeitig ist die rasche Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine oder andere Stimuli charakteristisch für die angeborene Immunität.

In verschiedensten klinischen Erscheinungen spielen iNKT-Zellen eine Rolle. Mehrmals wurde eine Antitumor-Aktivität gezeigt. Beispielsweise korreliert die Zahl an iNKT-Zellen im peripheren Blut bei bestimmten Tumorpatienten mit deren Prognose (110-112). Auch wurde dem Modellliganden α -GalCer ein Antitumoreffekt zugesprochen (113). Dies führte dazu, dass α -GalCer in klinischen Studien an Tumorpatienten getestet wurde (114, 115). Daneben haben iNKT-Zellen einen gewissen Stellenwert in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, Allergie und Arteriosklerose (116-118).

Besonders hervorzuheben ist sicherlich die Rolle von iNKT-Zellen in der Abwehr von Pathogenen. Eine Mitbeteiligung bei der Abwehr von Bakterien, Viren, Parasiten und zuletzt auch Pilzen wurde beschrieben (79, 94, 119). Am besten belegt ist die Stellung von iNKT-Zellen im Rahmen von bakteriellen Infektionen, z.B. durch *Streptococcus pneumoniae* oder *Borrelia burgdorferi*. Brennan et al stellen in ihrer Übersichtsarbeit die Vorgänge während einer Infektion mit Pneumokokken dar (68). Zunächst binden Mikroben an PRR, welche mikrobielle Strukturen erkennen. Zur Familie der PRR gehören z.B. Toll-like Receptors (TLR) und Dectin-1. Nach Bindung an PRR werden die Mikroben

phagozytiert, degradiert und deren Lipide, neben endogenen Lipiden, via CD1d an der Zelloberfläche präsentiert. Sind kostimulatorische Signale vorhanden (IL-12, CD40-Ligand/CD40-Rezeptor) werden iNKT-Zellen zur Produktion von IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-13 und weiteren Zytokinen bzw. Chemokinen angeregt. Daraufhin werden Makrophagen und neutrophile Granulozyten zum Infektionsort rekrutiert und aktiviert, was zur effektiveren Elimination des Pathogens führen soll.

3 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, humane iNKT-Zellen gesunder Spender selektiv zu kultivieren und anschließend hinsichtlich Phänotyp und Interaktion mit *A. fumigatus* Konidien und Keimschläuchen zu charakterisieren. Die zentrale Frage war, ob iNKT-Zellen in der Lage sind Wachstum und Metabolismus von *A. f. in vitro* zu hemmen. Bis zu diesem Zeitpunkt war eine Rolle von iNKT-Zellen bei bakteriellen, viralen und auch parasitären Infektionen bereits beschrieben (119). Hinweise für einen Effekt von iNKT-Zellen bei Pilzinfektionen gab es nur vereinzelt. So zeigten iNKT-defiziente Mäuse eine abgeschwächte Reaktion auf *Cryptococcus neoformans*, bzw. zeigten mit α -GalCer behandelte wildtypische Mäuse eine stärkere Reaktion auf diesen Pilz (120-122). Zudem sind iNKT-Zellen in Lungengewebe vorhanden und kommt dabei potentiell in Kontakt mit *A. f.* (123). Mechanistisch war von besonderem Interesse, ob iNKT-Zellen in Gegenwart von *A. f.* ein definiertes Zytokinsekretionsmuster zeigen und ob sich dieses gegenüber dem Sekretionsprofil bei Infektionen anderer Genese unterscheidet. Durch Genexpressionsanalysen sollte untersucht werden, welche Gene iNKT-Zellen bei der Interaktion mit *A. f.* Konidien bzw. Keimschläuchen differentiell exprimieren.

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Puffer und Medien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
Hanks' balanced salt solution modified (HBSS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
RPMI 1640 Medium GlutaMAX™ Supplement, HEPES	Gibco®	Darmstadt, Deutschland (D)
- Mit Refobacin 120mg/l	Merck	Darmstadt, D

Zusammensetzung Kulturmedium (10ml)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
RPMI 1640 Medium Glutamax™	9,1ml
Fetal Calf Serum (FCS)	0,9ml
α-GalCer (0.2mg/ml)	5µl
rh-IL2	10µl

1.2 Chemikalien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
2,3-Dimethoxy-5-methyl- <i>p</i> -benzoquinon	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
α-Galactosylceramid (KRN7000)	Enzo	Lörrach, D
Aqua destilliert 1000ml	B. Braun	Melsungen, D
Biocoll	Biochrom AG	Berlin, D

EDTA 0.5M	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ethanol Abs.	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Human IL-2	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
iTaq™ Universal SYBR®	Bio-Rad Laboratories	München, D
Green Supermix		
Refobacin	Merck	Darmstadt, D
Tween20	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
XTT Natriumsalz	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

1.3 Antikörper und Isotypen

<i>Antikörper</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
CD1c-APC	IgG2a	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
CD1d-PE	IgG1	BD Biosciences	Heidelberg, D
CD3-PerCP	IgG1	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
CD4-APC	IgG1	BD Biosciences	Heidelberg, D
CD8-FITC	IgG1	BD Biosciences	Heidelberg, D
CD56-PE	IgG1	BD Biosciences	Heidelberg, D
IFN- γ -FITC	IgG1	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
iNKT-PE	IgG1	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
TNF- α -APC	IgG1	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D

<i>Isotyp</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
IgG1-APC	BD Biosciences	Heidelberg, D
IgG1-FITC	BD Biosciences	Heidelberg, D
IgG1-PE	BD Biosciences	Heidelberg, D
IgG1-PerCP	BD Biosciences	Heidelberg, D
IgG2a-PE	BD Biosciences	Heidelberg, D

<i>Beads</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
CD3	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
PE	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D

1.4 Verbrauchsmaterial

<i>Artikel</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
<u>Reaktionsgefäße</u>		
5ml PS Round-Bottom-Tube	BD Biosciences	Heidelberg, D
Cellstar Tubes PP 15ml	greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Cellstar Tubes PP 50ml	greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Safe-Lock-Tubes 1,5ml	Eppendorf	Hamburg, D
Safe-Lock-Tubes 2,0ml	Eppendorf	Hamburg, D
<u>Well-Platten</u>		
6 Well Cell Culture Plate	Corning Incorporated	Corning, NY, USA
Falcon™ 96-Well	BD Biosciences	Heidelberg, D
Microtest™ Plate		
<u>Pipetten(spitzen)</u>		
Barrier Tip steril 1000µl	Sorenson Bioscience	Salt Lake City, UT, USA
Cellstar 5ml in 1/10ml	greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Cellstar 10ml in 1/10ml	greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Cellstar 25ml in 2/10ml	greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Filterspitzen 20µl Biosphere	Sarstedt	Nümbrecht, D
Filterspitzen 100µl Biosphere	Sarstedt	Nümbrecht, D
Filterspitzen 100µl TipOne	StarLab	Hamburg, D
Pasteurpipetten 3ml	A. Hartenstein Laborbedarf	Würzburg, D

Weiteres

Cell-Scraper 230x13mm	SPL Life Sciences	Pocheon, Südkorea
Deckgläser Hämocytomete HG24	A. Hartenstein Laborbedarf	Würzburg, D
MS-Säule	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
LS-Säule	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
zetBox Labor- und Hygienetücher	A. Hartenstein Laborbedarf	Würzburg, D

1.5 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
<u>Kühlung</u>		
Cup 3021	Liebherr	Biberach an der Riß, D
Heraeus Herafreeze HFU 586 Basic	Kendro	Langenselbold, D
<u>Zentrifugen</u>		
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International	Darmstadt, D
Heraeus Multifuge 3s	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge 3s-r	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
MC 6400	Biospec	Bartlesville, OK, USA
Mikrozentrifuge 5415-R	Eppendorf	Hamburg, D
<u>Inkubatoren</u>		
Schüttler Minitron	Infors	Bottmingen, Schweiz
Heracell™ 240	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Heraeus BBD 6220	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA

Laminar Flow

Herasafe™	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
MSC Advantage™	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA

Pipetten

Multipette® plus	Eppendorf	Hamburg, D
Pipetboy acu	Integra Biosciences	Zizers, Schweiz
Reference® 2.5µl	Eppendorf	Hamburg, D
Reference® 10µl	Eppendorf	Hamburg, D
Reference® 100µl	Eppendorf	Hamburg, D
Reference® 1000µl	Eppendorf	Hamburg, D

Weiteres

FACS-Calibur	BD Biosciences	Heidelberg, D
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, D
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon	Düsseldorf, D
NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie	Erlangen, D
Neubauer Zählkammer	Marienfeld superior	Lauda Königshofen, D
StepOnePlus™ System	Applied Biosystems	Darmstadt, D
UV-cleaner box UVC/T-AR, DNA/RNA	Biosan	Riga, Lettland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, NY, USA
Waage AEJ 120-4M	Kern	Balingen-Frommern, D
Wasserbad	Memmert	Schwabach, D

1.6 Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay	Bio-Rad Laboratories	München, D
Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (inkl. Golgistop™)	BD Biosciences	Heidelberg, D
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, D

1.7 Primer

<i>Gen/Richtung</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Ort</i>
<u><i>h-Alas</i></u>			
<i>forward</i>	GGCAGCACAGATGAATCAGA		
<i>Reverse</i>	CCTCCATCGGTTTTTCACT		
<u><i>CCL15</i></u>			
<i>Forward</i>	CCACCAGGAGGATGAAGGTC		
<i>Reverse</i>	AGTGAAAGCTGTTCAGAACTACTGG		
<u><i>GAPDH</i></u>			
<i>Forward</i>	CACATCGCTCAGACACCATG		
<i>Reverse</i>	TGACGGTGCCATGGAATTTG		

Alle Primer von
Sigma-Aldrich,
MO, USA

HK2

Forward TTCGCACTGAGTTTGACCAG

Reverse TCACCAGGATAAGCCCTCACC

VEGFA

Forward GGGCCTCCGAAACCATGAAC

Reverse TCCATGAACTTCACCACTTCGT

2 Methoden

2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Aus peripherem Blut wurden mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (124-126). Hierzu wurden Leukozytenfilme (*buffy coats*) gesunder freiwilliger Spender des Instituts für Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universität Würzburg bereitgestellt. Der *buffy coat* wurde in ein 50ml Falcon Gefäß entleert und mit HBSS (im Folgenden als *Puffer* bezeichnet) auf 50ml vervollständigt. 25ml hiervon wurden auf 20ml Biocoll vorsichtig geschichtet und bei 2000 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute;rpm*) für 20min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Danach befanden sich am Boden des Gefäßes Granulozyten und Erythrozyten, darüber eine Phase Biocoll. Zwischen Biocoll und Plasma grenzte sich ein Film Leukozyten ab. Mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette wurde der Leukozytenfilm in ein separates steriles 50ml Falcon-Gefäß überführt und mit Puffer auf 50ml aufgefüllt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 200rpm für 15min bei RT. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Pellet in 50ml Puffer suspendiert.

Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurden 10µl der Zellsuspension mit 90µl Puffer verdünnt. 10µl hiervon wurden wiederum mit 10µl Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Gesamtzahl isolierter mononukleärer Zellen errechnete sich wie folgt:

$$\text{gezählte Zellen} \times 20(\text{Verdünnungsfaktor}) \times 50 (\text{Volumen in ml}) \times 10^4$$

Nach nochmaligem Waschen der Zellsuspension bei 1300rpm für 10min bei RT wurde das Zellpellet in 1ml des Kulturmediums gelöst.

2.2 Zellkultur

Im peripheren Blut sind iNKT-Zellen nur in geringer Zahl vorhanden (101). Deshalb wurden sie aus der gewonnenen Zellsuspension selektiv kultiviert und expandiert (127-129). Hierzu wurde dem verwendeten Medium pro ml 100IU IL-2 (Stock 100IU/ μ l) und 100ng α -GalCer (Stock 0,2mg/ml) zugesetzt. Je 3ml des Kulturmediums wurden 1×10^7 mononukleäre Zellen zugefügt. Die Zellen wurden in 6-Loch/Well-Platten (1×10^7 Zellen/Well) ausplattiert und 12-14 Tage bei Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) inkubiert. Jeden dritten Tag wurden je Well 1ml entnommen, der Überstand abzentrifugiert (1300rpm für 10min bei RT), das Zellpellet im Kulturmedium obiger Zusammensetzung resuspendiert und 1ml pro Well der Zellkultur hinzugefügt.

Kokultur

Zur Untersuchung des Einflusses von *A. fumigatus* auf iNKT-Zellen und *vice versa* wurden positiv selektionierte iNKT-Zellen (siehe.2.3) mit *A. f.* Konidien bzw. Keimschläuchen in Kokultur gesetzt.

Zur Gewinnung der genannten *A. f.* Morphologien wurde wie beschrieben vorgegangen (130): Konidien des *A. f.* Stammes ATCC® 46645 wurden auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml in Medium + 10% FCS aliquotiert, bei -20°C gelagert und am Versuchstag aufgetaut.

Für die Gewinnung von *A. f.* Keimschläuchen wurden am Tag vor der Kokultur Konidien des gleichen Stammes ebenfalls in RPMI 1640 Medium + 10% FCS suspendiert und über Nacht zunächst bei RT, in den letzten vier Stunden bei 37°C im Schüttler (200rpm) inkubiert. Die entstandenen Keimschläuche wurden lichtmikroskopisch überprüft und anschließend auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml in Medium + 10% FCS aliquotiert.

Für den XTT-Assay (siehe 2.5) wurden 6×10^5 iNKT-Zellen, die aus vier unterschiedlichen Spendern gewonnen worden waren, mit 2×10^5 *A. f.* Keimschläuche in 2ml-Eppendorfgefäßen für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂

konfrontiert. Die Effetor-Ziel/*target*-Ratio (E:T-Ratio) betrug also 3:1. Als Referenz dienten eine 6-stündige Kultur von iNKT-Zellen bzw. *A. f.* Keimschläuche allein.

Die Kokulturen für IFN- γ /TNF- α -Durchflusszytometrie, Multiplex-ELISA und Genexpressionsuntersuchungen wurden wie für den XTT-Assay beschrieben durchgeführt, jedoch mit folgenden Modifikationen:

- Als Stimulus wurden neben Keimschläuchen auch Konidien benutzt.
- 10^6 iNKT-Zellen wurden mit gleicher Anzahl *A. f.* Konidien bzw. Keimschläuchen konfrontiert (E:T=1:1).
- Als Referenz dienten iNKT-Zellen ohne Stimulus.
- Es wurden iNKT-Zellen von drei unabhängigen Spendern verwendet.

2.3 Magnetische Zellseparation

Zellen mit einem definierten Oberflächenantigen werden mit Antikörpern markiert, welche selbst mit paramagnetischen Mikropartikeln konjugiert sind. Nach Anlegen eines magnetischen Feldes kann man Zellen in eine Fraktion mit und eine Fraktion ohne das entsprechende Oberflächenantigen separieren (131, 132). Dazu werden die markierten Zellen auf eine Trennsäule gegeben, welche durch ihre ferromagnetischen Eigenschaften ein von außen angelegtes Magnetfeld verstärken kann. Dadurch werden die markierten Zellen selektiv retiniert und können nach Entfernen des Magnetfeldes eluiert werden. Um iNKT-Zellen aus der Kultur positiv zu selektionieren, wurden CD3-MicroBeads verwendet und nach Herstellerprotokoll verfahren.

2.4 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können Größe, Morphologie und bestimmte Oberflächeneigenschaften einer Zellpopulation bestimmt werden (133). Zellen passieren hierbei in einer Küvette aus Glas/Quarz einen Laser-/Lichtstrahl. Bei der Passage wird der Laserstrahl durch die Zellen nach vorne (abhängig von

Größe der Zelle; *forward scatter*) bzw. zur Seite (abhängig z.B. von Granularität/Komplexität der Zelle; *sideward scatter*) gestreut und dort detektiert. Durch fluoreszierende Antikörper können spezifische Zellstrukturen markiert und im Durchflusszytometer anhand ihres definierten Emissionsspektrums registriert werden. Sortiert das Gerät die Zellen nach ihrer Färbung, wird die Technik FACS (*Fluorescent Antibody Cell Sorting*) genannt. Das Emissionsspektrum verschiedener Farbstoffe überlappt sich zu einem gewissen Anteil. Dies muss entweder am Gerät oder anschließend bei der Auswertung „kompensiert“ werden. Alle Analysen wurden am Durchflusszytometer FACS-Calibur (BD Biosciences) und mit der Software BD Cellquest™ durchgeführt.

Konventionelle Durchflusszytometrie

Je Versuchsbedingung wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 100µl HBSS + 10% FCS suspendiert und mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper für 15min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 1ml HBSS + 10% FCS (1300rpm, 4min, RT), um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Schließlich wurden die markierten Zellen in 150µl HBSS + 10% FCS aufgenommen und der Analyse am Durchflusszytometer zugeführt.

Intrazelluläre Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie zum Nachweis intrazellulärer Proteine wurde dem Kokulturansatz zu Beginn 2µl Brefeldin A (10µg/ml Endkonzentration) hinzugefügt. Danach produzierte Proteine können die Zelle nicht mehr verlassen und sind somit der Analyse mittels Durchflusszytometrie zugänglich. Die geernteten Zellen (10^7) wurden in 100µl HBSS + 10% FCS aufgenommen, je Ansatz 250µl Cytofix/Cytoperm hinzugefügt und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Cytofix/Cytoperm wird benötigt um intrazellulär lokalisierte Zytokine zugänglich für die fluoreszierenden Antikörper zu machen. Zwei Waschschrten (je 2ml HBSS + 10% FCS bei 1800rpm, 4min, RT) folgte die Inkubation mit fluoreszierenden Antikörpern. Jeder Ansatz inkubierte für 30 Minuten bei RT im

Dunkeln. Nach einem letzten Waschschrift mit 2ml HBSS + 10% FCS (1800rpm, 4min, RT) konnte die Analyse einer konventionellen Durchflusszytometrie entsprechend durchgeführt werden (134).

2.5 XTT-Assay

Hiermit wird die Vitalität und Proliferationsfähigkeit eukaryoter Zellen quantifiziert (135, 136). Das gelbe Tetrazoliumsalz XTT (2,3-Bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilid – Natriumsalz) wird von metabolisch aktiven Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem orangefarbenen Formazan-Derivat reduziert. Der Farbumschlag kann mithilfe eines Luminometers nachgewiesen und quantifiziert werden. Beabsichtigt war die Messung der metabolischen Aktivität von *A. fumigatus* Keimschläuchen. Hierzu wurden in den Kokulturansätzen die iNKT-Zellen durch dreimaliges Waschen mit kaltem Wasser lysiert, um deren metabolische Aktivität zu nivellieren. Die erfolgreiche Lyse wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

Jedem Ansatz wurden 600µl Puffer mit 0,5mg/ml XTT und 50µg/ml Coenzym Q₀ hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Überstände der Ansätze (Dupletten à 100µl) in einem ELISA-Reader photometrisch vermessen und die optische Dichte bei 450nm (Referenzfilter 655nm) gemessen. Der Schaden am Pilz (*fungus damage*) wurde berechnet (130, 137):

$$\text{Schaden}[\%] = \left(1 - \frac{\text{Optische Dichte Kokultur}}{\text{Optische Dichte } A.fumigatus \text{ Keimschläuche alleine}}\right) \times 100$$

2.6 ELISA

Die Überstände der Kokulturen wurden einer Multiplex-ELISA Analyse unterzogen. Dadurch war es möglich simultan das Sekretionsprofil 27 humaner Zytokine/Chemokine bzw. Wachstumsfaktoren zu beschreiben. Überstände der Kokulturen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Oliver Kurzai (Nationales Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen, Jena) mit dem Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-Rad Laboratories, München, D) nach Herstellerprotokoll verarbeitet. Der Arbeitsablauf des besagten Assays

beinhaltet die Auftragung der Probe auf mit Capture-Antikörpern benetzte Kügelchen (*beads*). Bead-Sets einer Farbe tragen Capture-Antikörper einer Spezifität. Die Farbe der Polystyrolbeads entsteht durch definierte Mischungsverhältnisse roten und infraroten Farbstoffes. Biotinylierte Detektionsantikörper binden an ein weiteres Epitop der an den Capture-Antikörpern fixierten Proben und dienen nach Hinzugabe eines Reporter-Substrates (Streptavidin-Phycoerythrin Konjugat) dazu, die Menge des Antigens zu bestimmen (138, 139)

Im verwendeten Assay sind 27 Bead-Sets zum Nachweis folgender Substrate vorhanden (Gruppierung in Anlehnung an Kokkonen et al. (140)):

Aktivierungsmarker

IL-1 β ,	<i>Interleukin-1 beta</i>
IL-1ra	<i>Interleukin 1 receptor antagonist</i>
IL-2	<i>Interleukin-2</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-15	<i>Interleukin-15</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>

Th1-typisch

IL-12 (p70)	<i>Interleukin-12</i>
IFN- γ	<i>Interferon γ</i>

T_H2-typisch

IL-4	<i>Interleukin-4</i>
IL-5	<i>Interleukin-5</i>
IL-9	<i>Interleukin-9</i>
IL-13	<i>Interleukin-13</i>

Eotaxin

Th17-typisch

IL-17	<i>Interleukin-17</i>
-------	-----------------------

Treg-typisch

IL-10	<i>Interleukin-10</i>
-------	-----------------------

Knochenmark-typisch

IL-7	<i>Interleukin-7</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony -Stimulating Factor</i>

Stroma-Zellen und Angiogenese

Basic FGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
PDGF-BB	<i>Platelet-Derived Growth factor-BB</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Chemokine

IL-8	<i>Interleukin-8</i>
IP-10	<i>IFN-γ-induced Protein 10 = CXCL10</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein = CCL2</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1α</i>
MIP-1 β	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1β</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted = CCL5</i>

Tabelle1: Durch Multiplex-ELISA untersuchte Zytokine/Chemokine/Wachstumsfaktoren

2.7 Genexpressionsanalyse

2.7.1 RNA-Isolierung

Verwendet wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) zur Isolierung und Konzentration von bis zu 100µg RNA pro Ansatz aus humanen Zellen. Vorgegangen wurde nach Herstellerprotokoll. Das Prinzip beruht darauf, vorhandene Zellen zu lysieren und die darin enthaltene RNA anschließend selektiv an eine Membran aus Siliziumdioxid zu binden. Nach mehreren Waschschritten kann die RNA von der Membran mittels RNase-freien Wassers eluiert werden. Die gewonnene RNA wurde schließlich mittels Spektralphotometer (Nanodrop ND-1000, PeqLab, Erlangen) auf Menge und Qualität überprüft.

2.7.2 cDNA-Umschrieb

Mittels des QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen (Hilden, D) wurde die gewonnene RNA revers transkribiert und somit in cDNA umgewandelt. cDNA wird als Vorlage für die qRT-PCR Reaktion benötigt. Auch hier wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Dazu wurden 400µg RNA je Ansatz mit 2µl gDNA Wipeout Puffer versetzt, um die Probe von genomischer DNA zu dekontaminieren (Inkubation 5 statt 2 Minuten bei 42°C). Den nun weitgehend von DNA befreiten Proben wurde der Mastermix für die reverse Transkription hinzugefügt (Zusammensetzung siehe Herstellerprotokoll). Die Reaktion lief für 15 Minuten bei 42°C ab, anschließend für 3 Minuten bei 95°C und wurde schließlich auf 4°C heruntergekühlt und gestoppt.

2.7.3 Microarray Affymetrix HG-U219

RNA-Proben der Kokulturen wurden in der Microarray Facility Tübingen (MFT) hinsichtlich differentieller Genexpression untersucht. Dabei kam das Genechip 3' IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara) zum Einsatz. Die Proben wurden anschließend auf einer Human Genome U219 (HG-U219)-Platte (Affymetrix, Santa Clara) hybridisiert. Der Array enthält etwa 530000 Proben, mit denen ca. 36000 Transkripte von über 20000 Genen registriert werden können. RNA-

Transkripte, die mit den auf dem Array fixierten RNA-Proben komplementär sind, werden gebunden und deren Biotin-Konjugat durch eine Nachweisreaktion quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Genspring GX (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

2.7.4 Pathway Analyse

Die unter Punkt 2.7.3 ermittelten Daten wurden mithilfe von QIAGEN's Ingenuity Pathway Analyse Version 9.0 (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) ausgewertet. Diese Software basiert auf der Ingenuity Knowledge Database. Auf PhD-Niveau arbeitende Wissenschaftler erstellen und aktualisieren die Datenbank, welche u.a. Informationen zu Protein-Protein Interaktionen, Signalkaskaden und funktionellen Netzwerken beinhaltet. Grundlage hierfür sind sämtliche publizierte Studien und weitere Datenbanken (IntAct, BIND, DIP, MINT, MIPS, BIOGRID and COGNIA) (141). Bei der Software handelt es sich um eine Online-Plattform. Nachdem die Genexpressionsdaten hochgeladen worden waren, ermittelte die Software, unter anderem, folgende Ergebnisse:

- „Top Moleküle“: Die jeweils 10 am stärksten hoch-/herunterregulierten Gene der Studie. Zur Quantifizierung der Hoch-/Herunterregulation Angabe des \log_2 -Fold Changes.
- „Top Signalwege“: Dabei handelt es sich um bereits bekannte, mit wissenschaftlicher Evidenz belegte, Signalkaskaden. Die IPA-Software ermittelt, inwieweit die differentiell exprimierten Gene diesen *canonical pathways* zuzuordnen sind.

2.7.5 Real-Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist in der Lage sehr sensitiv kleine Mengen an cDNA quantitativ nachzuweisen. Die Konzentration an cDNA in einer Probe korreliert mit der Signalintensität eines Fluorochroms (SYBR-Green), welche in Echtzeit (=real time) registriert wird. Die Experimente wurden am StepOnePlus™

Thermocycler (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Vorgegangen wurde nach Herstellerprotokoll des iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix‘ (USGS) (Bio-Rad) mit folgenden Spezifikationen:

Zusammensetzung Mastermix pro 20µl-Ansatz:

Produkt	Volumen [µl]	Endkonzentration
iTaq USGS (2x)	10	1x
<i>forward</i> Primer [10µM]	1	500nM
<i>reverse</i> Primer [10µM]	1	500nM
RNase-freies Wasser	4	

Mastermix	16	

Dem Mastermix wurden die cDNA-Proben hinzugefügt (4µl, 2,5ng/µl). In den Negativkontrollen wurde RNAase-freies H₂O anstatt cDNA geführt. Je Versuchsansatz wurden zwei unabhängige qRT-PCR-Experimente durchgeführt. Von diesen Dubletten wurde der mittlere Ct-Wert (*cycle threshold*) ermittelt. Dieser gibt an, ab welchem PCR-Zyklus das Signal über dem Hintergrundwert liegt. Zur Normalisierung wurde parallel die Expressionsrate des humanen Housekeeping-Gens δ -Aminolevulinatsynthase (h-Alas) bestimmt (142). Dieses wird unabhängig von verschiedenen physiologischen Bedingungen gleich stark exprimiert. Mit der Software LinregPCR wurde die Primer-Effizienz bestimmt (143). Diese ist nötig, um zusammen mit den mittleren Ct-Werten die relative Expression gegenüber dem Housekeeping-Gen zu ermitteln. Dies geschieht nach folgender Formel, wobei im Zähler Werte des zu untersuchenden Transkriptes eingesetzt werden (im hier vorliegenden Fall GAPDH, HK2, CCL15, VEGFA) und der Nenner für das Housekeeping-Gen reserviert ist (144):

$$Ratio = \frac{E_{target}^{(Ct_{unstim}-Ct_{stim})}}{E_{ref}^{(Ct_{unstim}-Ct_{stim})}}$$

Am Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet:

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
Polymerase Aktivierung und DNA-Denaturierung	95°C	30 sec	
Amplifikation	Denaturierung	15 sec	40 x
	Hybridisierung/Extension	60 sec	
Schmelzkurve	95°C	15 sec	
	60-90°C in 0,5°-Schritten	60 sec	
	95°C	15 sec	

2.8 Statistik

Alle Experimente wurden mit Blutproben von mindestens drei unabhängigen Spendern durchgeführt. Sämtliche statistischen Untersuchungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Verwendet wurde hierfür der zweiseitige und ungepaarte Student's t-test. Hiervon ausgenommen sind die Auswertungen der Microarray-Untersuchungen, welche von der Microarray Facility Tübingen durchgeführt wurden.

* p<0,05

** p<0,01

n.s. p>0,05

C Ergebnisse

1 Phänotypisierung

Nach 12-14-tägiger Kultur wurde der prozentuale Anteil der iNKT-Zellen an den kultivierten mononukleären Zellen gemessen. Als iNKT-Zellen wurden lediglich $CD3^+/iNKT^+$ -Zellen angesehen. Durch konventionelle Durchflusszytometrie konnten maximal 69,3% $CD3^+/iNKT^+$ -Zellen in der Kultur nachgewiesen werden. Eine sensitivere Methode ist die intrazelluläre Durchflusszytometrie, mit deren Hilfe auch intrazellulär lokalisierte TCR detektiert werden können. Demnach befanden sich in der Kultur konstant $>80%$ $CD3^+/iNKT^+$ -Zellen.

Die kultivierten Zellen wurden hinsichtlich weiterer Oberflächenmarker charakterisiert, welche bereits für iNKT-Zellen beschrieben worden waren. So waren in Kultur unter den $CD3^+$ -Zellen 66,3% $CD4^+$, 55,9% $CD8^+$, 25,2% $CD4^+/CD8^+$ bzw. 3,1% $CD4^-/CD8^-$. Den NK-Zell-Marker CD56 exprimierten 58,3% der Zellen in Kultur.

Die positive Selektion mit anti-CD3-Beads erhöhte den Anteil der iNKT-Zellen auf $>90%$. Die selektierten iNKT-Zellen wurden für die folgenden Koinfektionsexperimente verwendet.

Da die TCR von iNKT-Zellen mit CD1d interagieren, wurde der Anteil $CD1d^+$ Zellen in der Kultur quantifiziert. Dieser betrug nach positiver Selektion mit anti-CD3-Beads noch 0,5%.

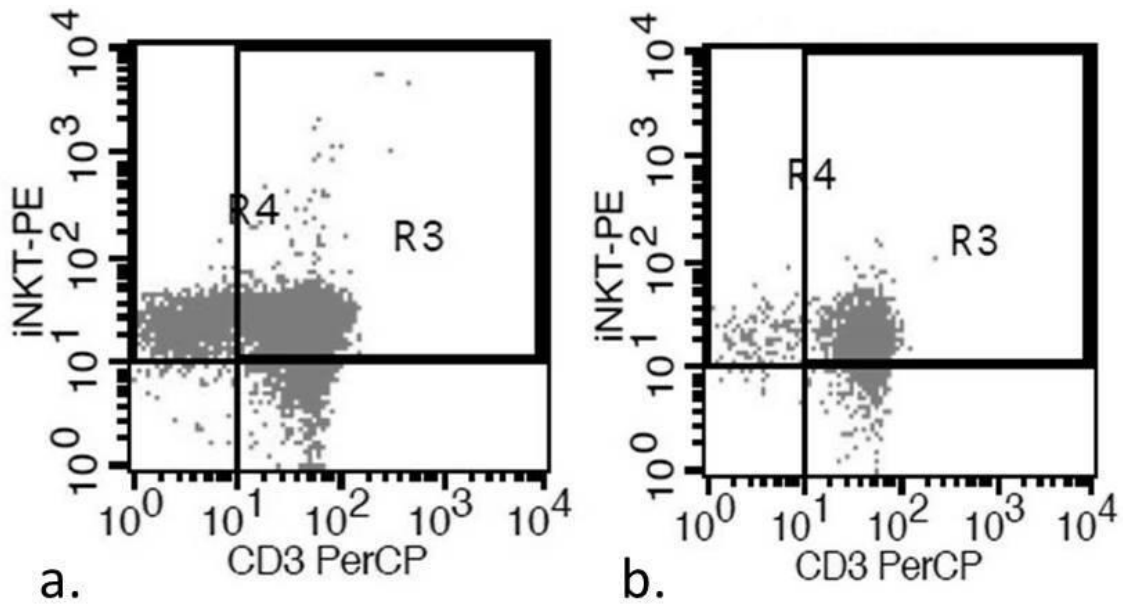


Abbildung 2: Reinheit der iNKT-Zellen Kultur (a.) vor bzw. (b.) nach positiver Selektion mit anti-CD3-Beads. Bei (a.) handelt es sich um eine intrazelluläre, bei (b.) um eine konventionelle Durchflusszytometrie.

2 iNKT-Zellen haben fungiziden Effekt auf *A. fumigatus* Keimschläuche

Der Einfluss von iNKT-Zellen auf den Metabolismus von *A. f.* wurde mittels XTT-Assay untersucht. Bei den oben beschriebenen Bedingungen zeigte sich der Metabolismus von *A. f.* Keimschläuchen bei Anwesenheit von iNKT-Zellen nach 6h erheblich reduziert ($p < 0.001$). Der Anteil der NKT-Zellen am gemessenen Metabolismus wurde durch die vorgenommenen Lyse-Schritte (vgl. Methoden, 2.5) reduziert und war deutlich niedriger als in Anwesenheit von *A. f.* Keimschläuchen (jeweils $p < 0.001$). Der sog. „fungal damage“ bezifferte sich auf 45%.

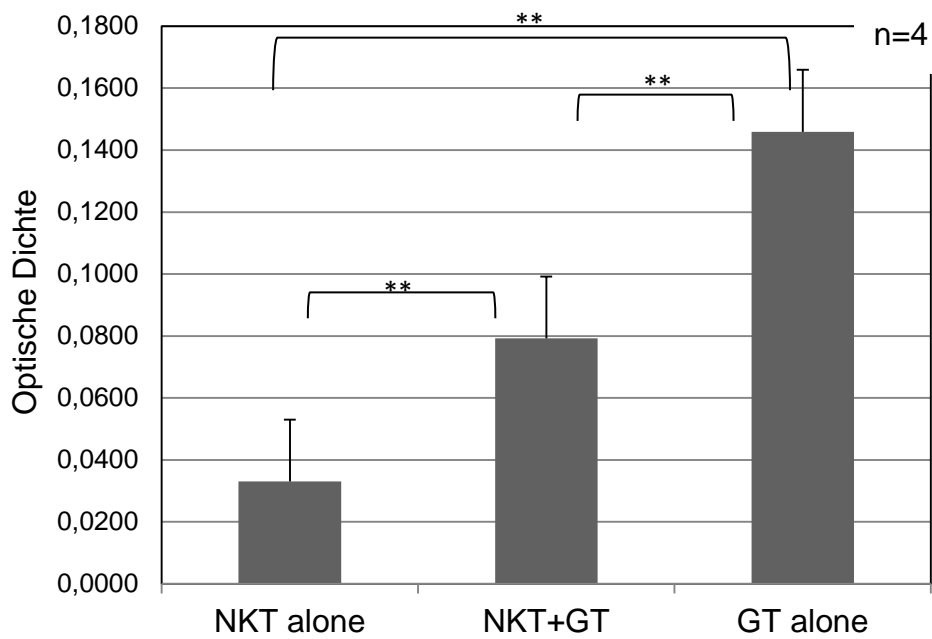


Abbildung 3: Optische Dichte des XTT-Assays als Maß der metabolischen Aktivität von iNKT-Zellen allein, iNKT-Zellen + Keimschläuchen (GT) und GT allein.

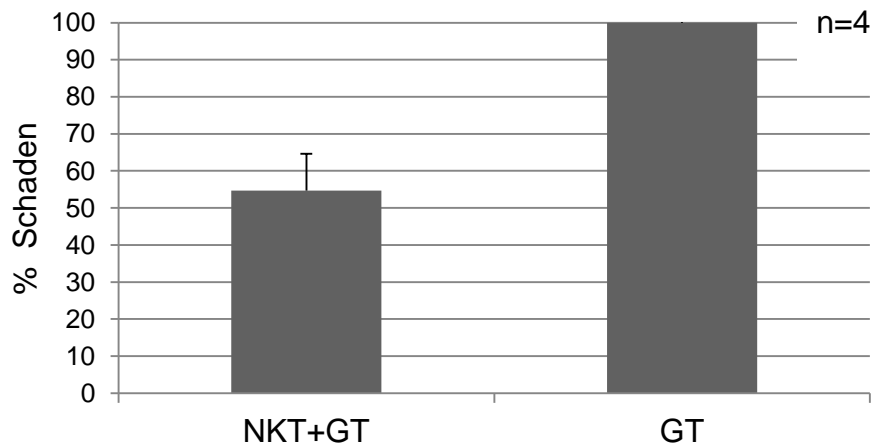


Abbildung 4: Durch Inkubation mit iNKT-Zellen verursachter Schaden an *A. fumigatus* Keimschläuchen, berechnet nach der Formel

$$\text{Schaden}[\%] = \left(1 - \frac{\text{Optische Dichte Kokultur}}{\text{Optische Dichte } A.fumigatus \text{ alleine}}\right) \times 100$$

3 Zytokinsekretion von iNKT-Zellen bei *A. fumigatus* Exposition

iNKT-Zellen sind in der Lage nach Aktivierung beträchtliche Mengen an IFN- γ zu sezernieren (siehe Einleitung, 2.6). Auf der anderen Seite ist der fungizide Effekt von NK-Zellen auf IFN- γ zurückzuführen (130). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass der fungizide Effekt von iNKT-Zellen ebenfalls durch IFN- γ vermittelt wird. Im Rahmen dieser Fragestellung wurde der Anteil IFN- γ^+ iNKT-Zellen nach 6 bzw. 12 Stunden Kokultur mit *A. f.* Konidien oder Keimschläuchen mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie gemessen und mit dem Anteil IFN- γ^+ Zellen vor Stimulus verglichen. Zu den genannten Zeitpunkten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Stimuli hinsichtlich des Anteils IFN- γ^+ Zellen. Im zeitlichen Verlauf erwies sich lediglich eine Abnahme des Anteils IFN- γ -positiver Zellen nach 12h im Vergleich zum 6h-Zeitpunkt als statistisch signifikant ($p < 0.05$), obgleich moderat (vgl. Abbildung 5). Es konnte nicht beobachtet werden, dass Konidien und Keimschläuche im unterschiedlichen Maße zu dieser Veränderung beitragen.

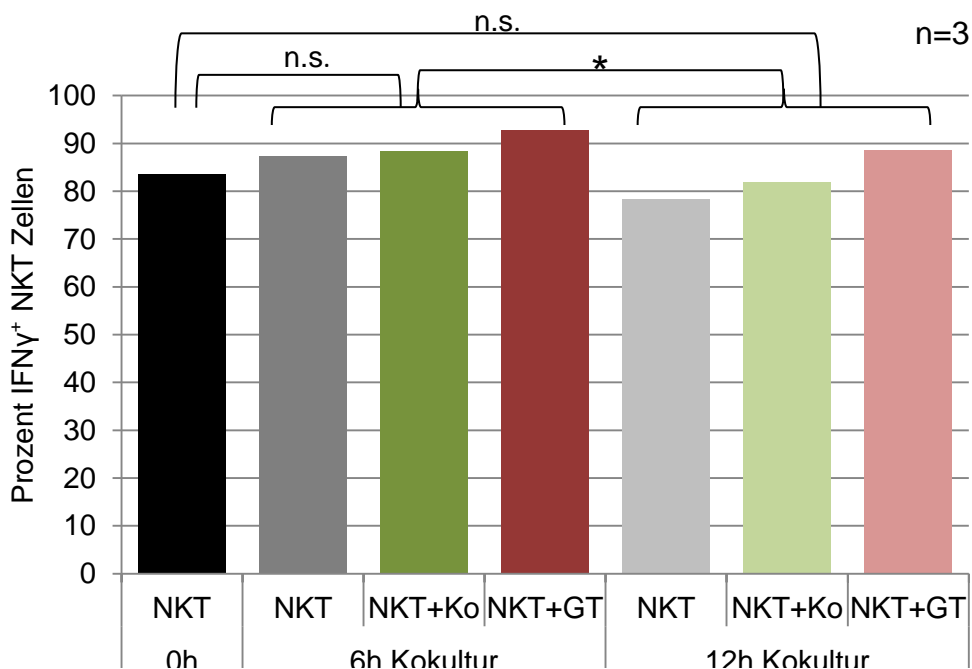


Abbildung 5: Anteil IFN- γ^+ iNKT-Zellen nach 6 bzw. 12 Stunden Kultur von iNKT-Zellen, iNKT-Zellen + Ko (Konidien) bzw. iNKT-Zellen + GT (Keimschläuche).

Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, welches von iNKT-Zellen nach Aktivierung produziert wird, ist TNF- α . Bei dem oben beschriebenen Versuch wurde deshalb zeitgleich der Anteil TNF- α^+ iNKT-Zellen, ebenfalls mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie, quantifiziert. Interessanterweise zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine moderate Zunahme der TNF- α -positiven iNKT-Zellen, die jedoch erst zum Zeitpunkt 12h statistische Signifikanz erreichte ($p < 0.05$). Zwischen den Stimuli zeigten sich jedoch erneut keine signifikanten Unterschiede.

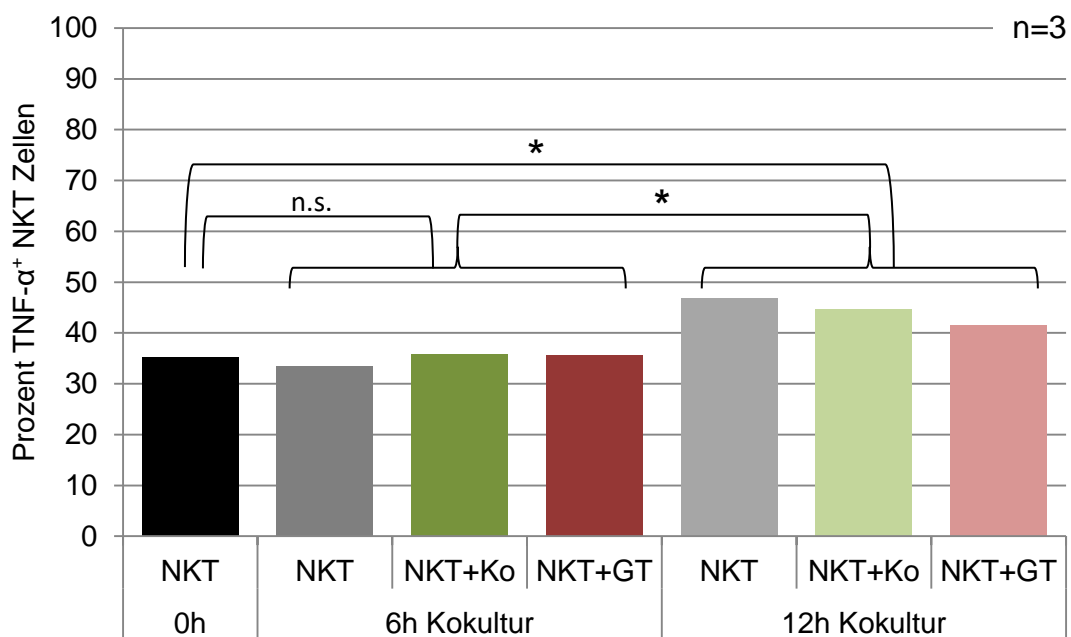


Abbildung 6: Anteil TNF- α^+ Zellen nach 6 bzw. 12 Stunden Kultur von iNKT-Zellen, iNKT-Zellen+Ko (Konidien) bzw. iNKT-Zellen+GT (Keimschläuchen).

iNKT-Zellen sind bekannt dafür, neben IFN- γ und TNF- α , noch weitere Zytokine/Chemokine/Wachstumsfaktoren zu sezernieren (145). Um das Sekretionsmuster ohne bzw. mit *A. f.*-Stimulus zu untersuchen, wurden die Spiegel von 27 humanen Zytokinen/Chemokinen/Wachstumsfaktoren mittels Multiplex-ELISA gemessen. Ebenso sollte hiermit ermittelt werden, ob *A. f.* Konidien bzw. Keimschläuche hinsichtlich IFN- γ bzw. TNF- α Produktion tatsächlich als Stimuli zu vernachlässigen sind. Verwendet wurden Überstände

nach 6h Kokultur, da hier bereits der fungizide Effekt von iNKT-Zellen beobachtet worden war.

Stoff(-gruppen)	iNKT allein	iNKT + Konidien	iNKT + Keim- schläuche	Physiologisch
<u>Allgemeine Aktivierung</u>				
IL-1b	1,53	1,36	1,40	2,6 (0,8–3,9)
IL-1ra	7,85	8,57	8,75	132,6 (89,2-198,4)
IL-6	2,55	2,38	1,61	4,6 (1,1–10,8)
IL-15	0,00	0,00	0,00	0,5 (0,3–4,2)
TNF-a	104,55	115,20	104,40	35,3 (14,2–61,7)
<u>T_H1-typisch</u>				
IL-12(p70)	0,26	0,23	0,00	15,8 (8,6–27,2)
IFN-γ	125,21	127,83	114,84	77,1 (48,4–127,6)
<u>T_H2-typisch</u>				
IL-4	0,65	0,62	0,60	2,7 (1,9–3,8)
IL-13	2,79	2,89	2,53	4,4 (2,7–7,9)
<u>T_H17-typisch</u>				
IL-17	1,13	1,27	1,13	21,1 (6,5–38,5)
<u>Treg-typisch</u>				
IL-10	0,41	0,80	0,44	4,3 (2,4–6,6)
<u>Knochenmark</u>				
IL-7	0,00	0,00	0,00	21,3 (13,9–30,3)
G-CSF	5,22	1,48	1,39	52,4 (42,3–68,5)
GM-CSF	55,77	49,53	50,79	5,6 (2,3–14,7)
<u>Stromazellen und Angiogenese</u>				
PDGF-bb	9,55	8,08	9,06	1571,2 (987,0–2318,2)
<u>Chemokine</u>				
IP-10	207,16	167,58	102,22	591,7 (372,3–854,1)
MCP-1(MCAF)	44,12	38,17	17,96	16,0 (10,6–24,0)
MIP-1α	36,15	42,72	35,18	6,9 (4,9–9,6)
IL-8	84,88	89,88	68,88	3,9 (1,0–8,2)
MIP-1β	775,64	753,47	624,26	35,4 (25,8–45,3)
RANTES	618,98	732,67	613,51	100,0–2282,0

Tabelle 2: Sezernierte Zytokine/Chemokine, Angaben des Mittelwertes in [pg/ml], rechte Spalte zeigt mediane (bzw. Interquartile-Range) Plasmaspiegel der untersuchten Zytokine in einem gesunden Referenzkollektiv (140). Grau hinterlegt: unterhalb des Serumspiegels des Referenzkollektives; grün: im Bereich des Referenzkollektives; rot: höhere Konzentrationen als im Referenzkollektiv; nicht messbar waren IL-2, IL-5, IL-7, IL-9, Eotaxin, FGF basic, VEGF; n=3

Tabelle 2 zeigt das Zytokinsekretionsmuster von iNKT-Zellen nach 6h Kultur ohne Stimulus, bzw. nach Stimulus mit *A. f.* Konidien oder Keimschläuchen. Als Vergleich soll hier eine mit gleicher Methodik von Kokkonen et al. durchgeführte Analyse von 254 Seren gesunder Spender dienen (140). Zwar ist in diesem Fall die Ausgangsprobe eine grundverschiedene, jedoch kann das Sekretionsmuster zumindest qualitativ mit den physiologischen Bedingungen verglichen werden.

In den untersuchten Proben konnten acht (29,6%) Zytokine nicht nachgewiesen werden. Dazu zählte IL-2, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, Eotaxin, basic FGF und VEGF.

Neun Zytokine/Chemokine (33,3%) zeigten, unabhängig vom Stimulus, einen niedrigeren Spiegel als im Serum gesunder Kontrollen (für die Einordnung „niedriger als“ wurde die 25. Perzentile des Referenzkollektiv herangezogen). Dazu gehörten IL-1ra, IL-4, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, IP-10, G-CSF, und PDGF.

Drei Chemokine (IL-8, MIP-1 α und MIP-1 β) sowie 2 weitere Zytokine (TNF- α , GM-CSF) zeigten durchgängig erhöhte (über der 75. Perzentile des Referenzkollektives), z.T. weit über dem Serumspiegel Gesunder liegende, Spiegel.

Die fünf restlichen Zytokine/Chemokine (IL-1b, IL-6, IFN- γ , MCP-1, RANTES) wurden in Konzentrationen produziert, wie sie im Serum vorzufinden sind, bzw. zeigten sie bei unterschiedlichen Stimuli (nichtsifikante) Erhöhungen.

Auch insgesamt waren weder Konidien, noch Keimschläuche in der Lage eine signifikante Veränderung des Sekretionsprofil im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu bewirken. Neben der bereits oben beschriebenen Beobachtung, dass iNKT-Zellen TNF- α und IFN- γ produzieren, konnten iNKT-Zellen als Quelle z.T. erheblicher Mengen an IL-8, RANTES, MIP-1 β und IP-10 identifiziert werden. Der Anteil der Chemokine unter den von iNKT-Zellen sezernierten Stoffen zeigte sich beim Vergleich mit Serumkonzentrationen des gesunden Referenzkollektivs überrepräsentiert. Hingegen waren Zytokine, welche

charakteristisch für T_H2^- , T_{reg}^- oder T_H17 -Zellen sind, kaum oder gar nicht messbar.

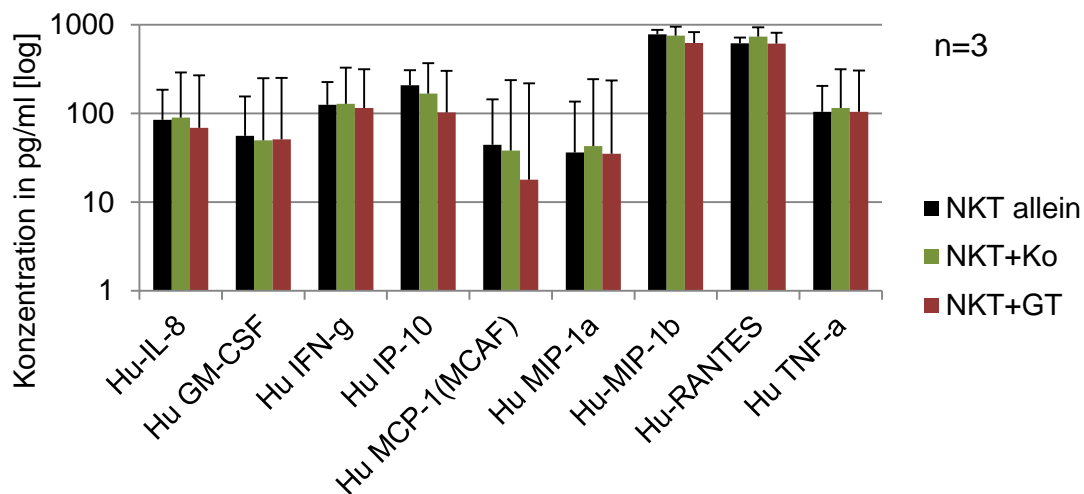


Abbildung 7: Zytokin-/Chemokin/Wachstumsfaktor-Sekretionsprofil humaner iNKT-Zellen, bzw. mit *A. fumigatus* Konidien oder Keimschläuchen konfrontierten iNKT-Zellen. Ko=Konidien; GT=Keimschläuche

4 Differentielle Genexpression von iNKT-Zellen bei *A.fumigatus* Exposition

Ob iNKT-Zellen durch *A. f.* Konidien bzw. Keimschläuche zu einer veränderten Genexpression bewegt werden sollte durch eine Genexpressionsanalyse mit dem Affymetrix HG U219-Array untersucht werden. Dazu wurde RNA aus dem gleichen Experiment extrahiert, aus dem auch die Überstände für die Multiplex-ELISA-Analyse stammen. Dieser Array ist in der Lage die differentielle Expression von ca. 36000 Transkripten zu registrieren, welche wiederum mehr als 20000 Gene repräsentieren. Diese Redundanz ist vor allem darauf zurückzuführen, dass aus einem Gen durch alternatives Splicing mehrere verschiedene Transkripte hervorgehen können.

Die RNA-Qualität wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer unter Zuhilfenahme des RNA Nano Kits (beides Agilent Technologies, Santa Clara, USA) untersucht und mit einer RIN (RNA integrity number) beziffert. Diese soll

untersucherunabhängig die Integrität der RNA beurteilen und beruht u.a. auf dem Verhältnis von ribosomaler RNA der 18S- und 28S-Untereinheit. Ein darauf basierender Algorithmus beschreibt die RNA-Qualität mit Werten zwischen 1 und 10, wobei 1 eine komplett degradierte und 10 eine vollständig intakte RNA repräsentiert (146-148). Die gewonnenen Proben hatten eine mittlere RIN von 8,7 (SD=0,4; n=9) und waren damit geeignet für die Genexpressions-Analyse.

Die Signalintensitäten der Testbedingungen (iNKT-Zellen + Konidien bzw. iNKT-Zellen + Keimschläuche) wurden im Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (iNKT-Zellen allein). Die Ratio wurde zur Basis 2 logarithmiert ($\rightarrow \log_2$ -Fold Change). Transkripte wurden als differentiell exprimiert bezeichnet, wenn im Vergleich zur Kontrolle ein \log_2 -Fold Change von mindestens (+/-) 1,5 bei einem für multiples Testen korrigierten Signifikanzniveau von $p < 0,05$ vorlag (149). Demnach waren bei der Kokultur von iNKT-Zellen und *A. f.* Konidien 152 Transkripte differentiell exprimiert, wovon 41 hoch- und 111 herunterreguliert waren. Diese 152 Transkripte repräsentieren 151 Gene (41 hochreguliert, 110 herunterreguliert).

Bei Konfrontation mit *A. f.* Keimschläuchen zeigten sich 324 Transkripte differentiell exprimiert (254 hoch-, 70 herunterreguliert), was 175 überexprimierten und 67 unterexprimiert (insgesamt 242) Genen entsprach.

Die gewonnenen Rohdaten wurden einer Signalweg (Pathway)- Analyse mit der Ingenuity Pathway Analyse-Software unterzogen. Zunächst sollte ein funktioneller Zusammenhang der differentiell exprimierten Gene gefunden werden, in dem die regulierten Transkripte vorbeschriebenen Signalwegen zugeordnet wurden. Die Ergebnisse wurden nach p -Wert sortiert, welcher mittels des rechtsseitigen Fisher Exact Tests errechnet wurde. Die Ratio gibt an, wie viele der in dem Signalweg beteiligten Transkripte in der untersuchten Probe hoch- bzw. herunterreguliert waren. Folgend werden, sortiert nach p -Wert, die für den jeweiligen Stimulus signifikantesten Signalwege wiedergegeben.

Ingenuity Canonical Pathway	p-Wert	Ratio	Moleküle
<i>iNKT-Zellen+Konidien</i>			
Acute Myeloid Leukemia Signaling	1,65*E-2	3/82 (0,04)	PML,TCF3,FLT3LG
Pyrimidine Metabolism	7,16*E-2	3/213 (0,01)	TYMP,TXNRD2,UNG
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	7,92*E-2	2/68 (0,03)	VEGFA,MDM2
Cleavage and Polyadenylation of Pre-mRNA	8,04*E-2	1/12 (0,08)	CSTF2
Glioblastoma Multiforme Signaling	8,17*E-2	3/164 (0,02)	MDM2,ITPR1, TCF3
<i>iNKT-Zellen + Keimschläuche</i>			
Glycolysis/Gluconeogenesis	6,76*E-16	17/82 (0,21)	PKM2, PGK1 , ENO2, GAPDH, PGM1, TPI1, PFKP, PFKL, BPGM, HK1, GPI, HK2, ENO1, PGAM1, ALDOA, LDHA, ALDOC
Fructose and Mannose Metabolism	2,2*E-10	19/43 (0,44)	PFKFB3, HK1, HK2, PFKFB4, ALDOA, PFKP, PFKL, TPI1, ALDOC, MPI
Pentose Phosphate Pathway	2,63*10-6	6/30 (0,20)	GPI, PGM1, ALDOA, PFKP, PFKL, ALDOC
Inositol Metabolism	2,42*E-5	3/5 (0,60)	ALDOA, TPI1, ALDOC
Galactose Metabolism	2,21*E-4	5/41 (0,12)	HK1, HK2, PGM1, PFKP, PFKL

Tabelle 3: Je Stimulus die 5 signifikantesten Signalwege, sortiert nach p-Wert. Die Ratio gibt den Anteil der differentiell regulierten Transkripte in diesem Pathway an. Diese Transkripte sind in der rechten Spalte aufgeführt. Fett gedruckte Gene sind hoch-, normal gedruckte Gene sind herunterreguliert.

Bei Stimulation mit *A. f.* Konidien erreichte kein alterierter Signalweg das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Jedoch wurden durch *A. f.* Keimschläuche mehrere Stoffwechselwege signifikant alteriert. Hierunter befanden sich vorwiegend solche des Kohlenhydratstoffwechsels (Glykolyse/Glukoneogenese, Fruktose/Mannose-Stoffwechsel, Pentose-phosphatweg und Galaktose-Stoffwechsel) bzw. mit dem Inositol-Stoffwechsel-Signalweg ein Teil des Intermediärstoffwechsels, welcher Enzyme mit dem Kohlenhydratstoffwechsel teilt (ALDOA, ALDOC). Stets zeigten sich die beteiligten Gene (mit einer Ausnahme: BPGM) hochreguliert. Die genannten Stoffwechselwege waren folglich durch *A. f.* Keimschläuche aktiviert worden. Der Anteil der differentiell exprimierten Gene innerhalb der Top-5 Pathways rangierte zwischen 12 und 60%.

Im weiteren Verlauf wurden diejenigen Gene betrachtet, welche den größten Grad der Regulierung, unabhängig vom Signalweg, erfahren hatten. Als Maß der Regulierung diente der \log_2 -Fold Change. Die zehn stärksten über-/unterexprimierten Gene je Stimulus werden im Anhang aufgeführt

Die Kokultur von iNKT-Zellen und *A. f.* Konidien ergab auch bei der Analyse der Top-10 differentiell exprimierten Gene keine richtungsweisenden Ergebnisse. Der \log_2 -Fold Change der am meisten hoch-/herunterregulierten Gene lag bei 2,4 bzw. -2,1, der Großteil der registrierten \log_2 -Fold Changes rangierte nur knapp über dem geforderten Wert von 1,5. Dieses Ergebnis lässt im Einklang mit der Analyse der Signalwege darauf schließen, dass Konidien, wenn überhaupt, lediglich ein schwacher Induktor einer differentiellen Genexpression bei iNKT-Zellen sind.

Ähnlich, wie bei der Pathway Analyse beobachtet, induzieren *A. f.* Keimschläuche die Hochregulierung vieler Stoffwechsel-relevanten Gene. Sechs der zehn am meisten hochregulierten Gene haben eine unmittelbare Rolle im Kohlenhydrat- bzw. Intermediärstoffwechsel (PFKFB4, AK4, ALDOC, ARG2, HK2 und SLC2A3 [besser bekannt unter dem Namen GLUT3]). Die \log_2 -Fold Changes der Top-10-Liste lagen zwischen 4,8 und 13,9, was deutlich über dem geforderten Grenzwert von 1,5 liegt.

Markant herunterreguliert zeigte sich lediglich CCL15, dessen Genprodukt chemotaktisch auf T-Zellen und Monozyten wirkt. Die restlichen herunterregulierten Gene waren lediglich leicht unterexprimiert (max. 2,2).

Sieben Transkripte wurden durch beide Stimuli gleichsinnig über-/unterexprimiert (siehe Abb. 8 und Tabelle 4). Interessanterweise fand man unter beiden Stimuli VEGFA hochreguliert. Durch *A. f.* Konidien geschah dies zwar nur marginal (\log_2 -Fold Change 1,8), unter Keimschläuchen wurde VEGFA jedoch deutlich überexprimiert (\log_2 -Fold Change 7,0).

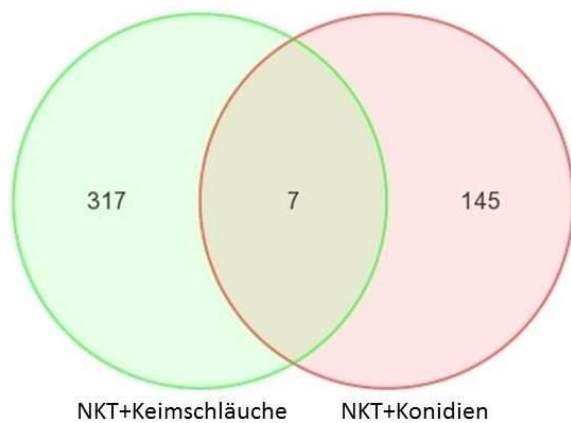


Abbildung 8: Venn-Diagramm: *A. fumigatus* Keimschläuche bzw. Konidien bewegen iNKT-Zellen zur differentiellen Expression von 317 bzw. 145 Transkripten. 7 zusätzliche Transkripte werden unter beiden Stimuli differenziell exprimiert.

ID	Gen	Entrez Gen Name	log ₂ -Fold Change	
			iNKT + Ko	iNKT + GT
11717812_a_at	KIF3C	kinesin family member 3C	-1,686	-1,520
11721917_a_at	ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	1,921	2,786
11722950_a_at	C1orf51	chromosome 1 open reading frame 51	1,678	3,237
11723224_s_at	C6orf211	chromosome 6 open reading frame 211	-1,650	-1,699
11724558_at	GNA15	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)	1,746	3,276
11725370_s_at	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	1,818	7,016
11728257_at	RAD18	RAD18 homolog	-1,645	-1,735

Tabelle 4: Durch Konidien und Keimschläuche gleichsinnig differenziell exprimierte Transkripte

Die Gene der durch Multiplex-ELISA bzw. Durchflusszytometrie gemessenen Zytokine/Chemokine zeigten keine differentielle Expression. Vor allem die für

IFN- γ und TNF- α kodierenden Gene konnten weder durch *A. f.* Konidien, noch durch Keimschläuche signifikant in ihrer Expression beeinflusst werden.

Zur Validierung der Microarray-Ergebnisse wurde die differentielle Expression einiger Transkripte durch qRT-PCR untersucht. Um die These zu stützen, dass Kohlenhydratstoffwechsel-relevante Gene durch *A. f.* hochreguliert werden, wurde die Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hexokinase 2 (HK2) analysiert. Zusätzlich wurde die im Microarray beobachtete differentielle Expression von VEGFA und CCL15 geprüft. Als Referenz diente h-ALAS, welches als Housekeeping-Gen hierfür geeignet ist (142). Hierbei wurde der Trend aus der Microarray-Untersuchung bestätigt. In Anwesenheit von *A. f.* Keimschläuchen zeigten sich GAPDH bzw. HK2 hochreguliert, wobei nur die Überexpression von HK2 statistische Signifikanz erreichte ($p < 0,05$). Ebenso bestätigte sich die Induktion einer VEGFA-Antwort, bzw. eine reduzierte CCL15-Expression bei Kokultur von *A. f.* Keimschläuchen mit iNKT-Zellen ($p < 0,05$). Auch hier war lediglich eine geringe differentielle Genexpression in Anwesenheit von Konidien zu beobachten.

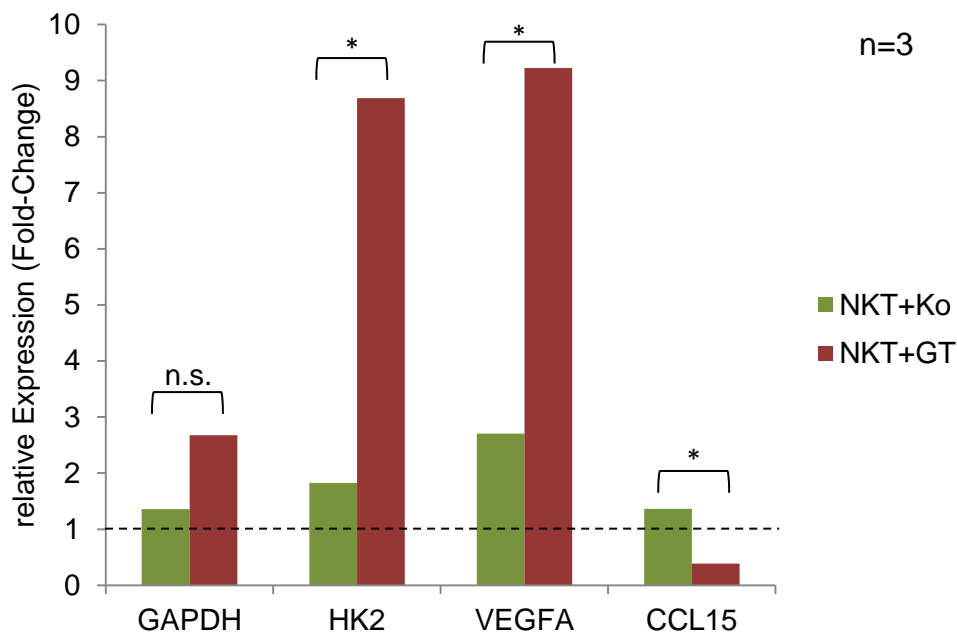


Abbildung 9: Quantifizierung der relativen Expression von GAPDH, HK2, VEGFA und CCL15 in iNKT-Zellen durch *A.f.* Konidien (Ko) und Keimschläuchen (GT).

D Diskussion

Die invasive Aspergillose (IA) ist eine schwere Systemerkrankung, die vorwiegend Patienten mit angeborener oder erworbener Immunkompromittierung betrifft. Verursacht wird sie vom opportunistischen Pathogen *Aspergillus*. Im Genus dieses Schimmelpilzes gibt es mehrere humanpathogene Spezies, von denen *Aspergillus fumigatus* hauptursächlich für die IA ist. Besonders unter Patienten, die sich einer allogenen Stammzelltransplantation unterziehen, ist das Risiko einer IA sehr hoch. Trotz des breiten Einsatzes von Antimykotika in Prophylaxe und Therapie der IA, bleibt deren Morbidität und Mortalität weiterhin unzufriedenstellend hoch. Dies wird nicht nur auf die mitunter schwierige Diagnostik bei einer IA zurückgeführt, sondern auch auf die unzureichende Wirksamkeit der vorhandenen Antimykotika. Angesichts dessen ist es von besonderem Interesse die Interaktion von *A. f.* mit dem Immunsystem genauer zu durchleuchten, um somit möglicherweise neue Therapieansätze erschließen zu können. Ansätze zur Alteration der Immunantwort des Wirtes gegen *Aspergillus* haben z.T. ansprechende Ergebnisse gezeigt. Zum einen hat bereits jetzt die Applikation bestimmter Zytokine Einzug in Leitlinien zur Prophylaxe/Therapie der IA gefunden (53). G-CSF bzw. GM-CSF konnte nachweislich die Inzidenz und Mortalität von IA bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie senken (53, 55). Zum anderen werden zunehmend *Aspergillus*-spezifische Zelltherapien untersucht. Patienten, die nach allogener Stammzelltransplantation selektiv gegen *A. f.* gerichtete Spender T-Zellen erhalten, sterben seltener (150). Auch das *priming* dendritischer Zellen auf *A. f.* zeigte in murinen Modellen erste Erfolge (151, 152).

Als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität erkennen iNKT-Zellen durch ein sehr begrenztes TCR-Repertoire über CD1d präsentierte Lipide und werden dadurch aktiviert. Sie vereinigen phänotypische und funktionelle Eigenschaften von T- und NK-Zellen und sind somit in einer Vielzahl pathologischer Prozesse beteiligt. Ihre Rolle und Funktion in der Abwehr bakterieller, viraler und parasitärer Pathogene ist gut belegt, jedoch

nicht ihr Beitrag bei Pilzinfektionen. iNKT-Zellen sind u.a. als Quelle proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF- α bekannt. Gleichzeitig sind diese Zytokine wichtige Mediatoren zur Kontrolle bzw. Bekämpfung von *A. f.* Rekombinantes IFN- γ wird sogar bei Patienten mit defizienter IFN- γ -Produktion zur Prävention von Pilzinfektionen eingesetzt (153, 154).

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit α -GalCer und IL-2 selektiv kultivierte iNKT-Zellen gesunder Spender die metabolische Aktivität von *A. f.* Keimschläuchen signifikant beeinträchtigen und somit einen fungiziden Effekt ausüben. Die These, dass *A. f.* Konidien oder Keimschläuche als Stimuli für ein spezifisches Sekretionsmuster immunrelevanter Zytokine bzw. Chemokine agieren, konnte nicht unterstützt werden. Jedoch wurden die verwendeten Zellen als Quelle von IFN- γ und, in einem geringeren Maße, von TNF- α identifiziert. Auch RANTES und die Chemokine IL-8, MIP-1 β und IP-10 konnten, wie vorbeschrieben, nachgewiesen werden (145). Bis auf CCL15 wurden auch auf transkriptioneller Ebene keine unmittelbar immunrelevanten Transkripte durch *A. f.* differentiell reguliert. Jedoch zeigte sich eine Vielzahl von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels durch *A. f.* Keimschläuche hochreguliert. CCL15 wurde hierbei herunterreguliert. VEGFA wurde durch beide Pilz-Morphologien überexprimiert.

Methodische Limitationen

Vor der Einordnung dieser Ergebnisse in bereits vorhandene Literatur, sollen zunächst die methodischen Einschränkungen der durchgeführten Untersuchungen aufgeführt werden:

- Stichprobengröße
Je Experiment wurden lediglich Proben von 3 gesunden Spendern verwendet. Um geringere Unterschiede in der Zytokinsekretion durch Multiplex-ELISA bzw. in der Genexpression durch Microarray-Analyse nachzuweisen fehlte deshalb die statistische Power. Beim bereits basal hohen Anteil IFN- γ^+ Zellen (ca. 83%) wäre eine größere

Stichprobengröße nötig gewesen, um einen signifikanten Unterschied bei unterschiedlichen Stimuli registrieren zu können.

- Gewinnung von iNKT-Zellen

Die von Brossay et al. bzw. Nieda et al. beschriebene Methode zur selektiven Kultivierung von iNKT-Zellen wurde verwendet, um eine ausreichend große Menge von den im peripheren Blut nur in geringer Anzahl vorhandenen iNKT-Zellen für die durchzuführenden Experimente zu erhalten (127, 129). Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit für zwei Wochen mit IL-2 und α -GalCer kultivierte Zellen das Verhalten nativer humaner Zellen widerspiegelt. Brossay et al. zeigte, dass durch die hier gewählten Kulturbedingungen (α -GalCer und IL-2) murine iNKT-Zellen zur Produktion von IFN- γ angeregt werden (127). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass bereits vor *Aspergillus*-Stimulus ein hoher Anteil (>80%) IFN- γ ⁺ Zellen vorlag. In jüngerer Zeit wird deshalb die mitunter geringe Ausbeute bei der Gewinnung nativer iNKT-Zellen zunehmend akzeptiert und, vor dem Hintergrund sensitiverer Methodik, toleriert. iNKT-Zellen werden hierbei mittels magnetischen Beads isoliert, die gegen die α -Kette des invarianten TCR gerichtet sind (101, 155). Alternativ werden iNKT-Zellen mit Tetrameren aus mit α -GalCer beladenem CD1d markiert und anschließend mit gegen die Tetramere gerichteten Microbeads magnetisch separiert (69, 156).

- In den durchgeführten Untersuchungen wurde der Einfluss von APCs auf die Interaktion von iNKT-Zellen mit *A. f.* ausgeklammert. Vielmehr sollte gezeigt werden, ob iNKT-Zellen prinzipiell bei der Bekämpfung von *A. f.* mitwirken. iNKT-Zellen benötigen zur Aktivierung, neben der fakultativen Interaktion mit einem über CD1d präsentierten Liganden, ein obligates kostimulatorisches Signal, welches meist in Form von IL-12 von DCs stammt. Es ist deshalb davon auszugehen, dass auch unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Wechselwirkung von iNKT-Zellen mit CD1d-positiven APCs für den fungiziden Effekt essentiell war. Bei bakteriellen Erregern ist dies jedenfalls der Fall (68). Welcher Natur diese APCs sind, wurde in Folgeexperimenten von Beitzhen-Heineke et

al. untersucht (vor Publikation). Darin wurde dargelegt, dass insbesondere CD1c⁺ mDCs in der Lage sind die Stimulation von iNKT-Zellen durch *A. f.* zu mediieren. Welche Pilzbestandteile für die Interaktion entscheidend sind, wird hierbei gegenwärtig intensiv beforscht. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass Asperamide B, ein fungales Glykolipid, als bisher einziges von *A. f.* stammendes Produkt in der Lage ist, CD1d-abhängig iNKT-Zellen zu stimulieren (95, 157). Doch auch CD1d-unabhängige Wechselwirkungen scheinen von Bedeutung zu sein. Cohen et al. beschreibt dies für β -1,3-Glucan, ein Kohlenhydratbestandteil der Zellwand von *A. f.*, der als solcher nicht via CD1d präsentiert werden kann (94). Hier geschieht die Stimulation von iNKT-Zellen durch Aktivierung des TLR Dectin-1 und anschließende IL-12 Produktion der DCs. Vor diesem komplexen Hintergrund wurde der Phänotyp der für iNKT-Zell Marker negativen Zellen in dieser Arbeit leider unzureichend beschrieben, sodass die produzierten Ergebnisse lediglich orientierenden Charakter haben dürften.

Zytokinsekretion von iNKT-Zellen in Anwesenheit von *A. fumigatus*

iNKT-Zellen exprimieren Granzyme B, Perforin und Fas-Ligand. Demnach besitzen sie die Fähigkeit zur direkten Zytolyse. Die direkt zytotoxischen Charakteristika werden jedoch vornehmlich bei Untersuchungen des Antitumor-Effektes von iNKT-Zellen beobachtet (158-160). Ihre antimikrobiellen Eigenschaften werden hingegen vorwiegend der Produktion T_H1-typischer Zytokine (IFN- γ und TNF- α) zugeschrieben. Zwar üben IFN- γ und TNF- α den antimikrobiellen Effekt in der Regel durch Rekrutierung bzw. Aktivierung anderer Effektorzellen aus (z.B. NK-Zellen und Makrophagen), doch wird IFN- γ nach einer Arbeit von Bouzani et al. ebenso ein direkt zytotoxischer Effekt auf *A. f.* Keimlinge beigemessen (68, 130). In hiesiger Arbeit stellten sich nun iNKT-Zellen als Zellen mit fungizidem Effekt heraus. Gleichzeitig erwies sich ein hoher Anteil der verwendeten Zellen als IFN- γ ⁺, bzw., in geringerem Ausmaße, als TNF- α ⁺. Die Expression letztgenannter Stoffe war jedoch nicht dem Stimulus

A. f. zuzuschreiben. Auf transkriptioneller Ebene waren bis auf CCL15 weder IFN- γ und TNF- α , noch andere immunrelevante Faktoren reguliert. Dieser Gegensatz erscheint zunächst wenig intuitiv. Jedoch wurde für iNKT-Zellen gezeigt, dass sie Effektorzytokine in intrazellulären Vesikeln speichern, diese nach Stimulus sehr schnell exozytieren und somit den Charakterzug der angeborenen Immunität ausüben (161-163). Ein Mehr an immunrelevanter Transkripte ist also nicht unmittelbar nötig, damit iNKT-Zellen ihre imminente Aufgabe der schnellen Zytokinsekretion bewerkstelligen können. Der Tatsache, dass *A. f.* nicht als signifikanter Stimulus eines spezifischen Sekretionsprofils dargestellt werden konnte, sind vornehmlich die oben erwähnten methodischen Einschränkungen dieser Arbeit zugrunde zu legen. Die Sekretionsprofile von iNKT-Zellen der Spender zeigten eine recht hohe Varianz. Diese hätte durch eine größere Stichprobe nivelliert werden können. Auch wird eine Regulation der IFN- γ Sekretion in anderen Arbeiten nahegelegt, in denen das Studiendesign ein größeres Augenmerk auf die Interaktion von *A. f.* mit CD1d⁺ Zellen legte. Hier konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Stimulation der IFN- γ Produktion registriert werden (94).

In Gegenwart von *A. f.* Keimschläuchen wurde CCL15 (auch bekannt unter Leukotactin-1, MIP-1 δ oder MIP-5) am stärksten herunterreguliert. Dieses Chemokin wird vornehmlich von T- und B-Lymphozyten, Monozyten und DCs exprimiert (164, 165). Eine differentielle Expression von CCL15 ist für iNKT-Zellen bisher nicht dokumentiert, ebenso ist dessen Rolle bei invasiven Pilzinfektionen kaum untersucht. Lediglich in zwei Studien wurde die Überexpression von CCL15 in Zusammenhang mit Pilzinfektionen gezeigt. Zum einen wird CCL15 in Makrophagen hochreguliert, die mit Mikrosporidien spp. konfrontiert werden (166). Zum anderen produzieren Monozyten vermehrt CCL15, sobald ihnen unter Hinzugabe von Voriconazol *A. f.* Keimschlauch-Fragmente präsentiert werden (167). Dass in hiesiger Arbeit jedoch eine gegenseitige Regulation der CCL15-Transkription demonstriert wurde, welche auf Proteinebene nicht validiert wurde, passt nicht in das von den beiden zitierten Studien gezeichnete Bild. Eine Herunterregulation von CCL15 kann jedoch auch als Reaktion auf eine lokale Hypoxie gewertet werden. Bosco et al.

beschrieb, dass CCL15 dasjenige Chemokin ist, welches unter Hypoxie in Monozyten am stärksten herunterreguliert wird (168). Vor dem Hintergrund der weiteren regulierten Gene, scheint dies eine plausible Erklärung für die gezeigte Repression von CCL15 in NKT-Zellen zu sein.

Kohlenhydratstoffwechsel von iNKT-Zellen

Viel Aufmerksamkeit wurde in der Vergangenheit dem Kohlenhydratstoffwechsel maligner Zellen geschenkt. Damit verbunden ist die Hoffnung, dass sich durch dessen Beeinflussung vielversprechende Therapiemöglichkeiten eröffnen (169, 170). Allerdings wird zunehmend der Metabolismus von Immunzellen beforscht, wobei sich ein Großteil der daraus gewonnenen Erkenntnisse auf Untersuchungen von Makrophagen und T-Zellen stützt. Zuletzt ist dies ausführlich von Ghesquière et al. zusammengefasst worden (171). Für iNKT-Zellen wurden bisher keine Daten zur Regulierung des Kohlenhydratstoffwechsels publiziert, speziell nicht im Kontext des Pilz-Stimulus. Da T- und iNKT-Zellen jedoch nahe verwandt sind, soll zunächst die Datenlage bei T-Zellen betrachtet werden. Je nach Differenzierungsgrad wird bei T-Zellen das Gewicht auf unterschiedliche metabolische Wege gelegt. Während naive T-Zellen ihre Energie vornehmlich aus der oxidativen Phosphorylierung gewinnen, wird bei aktivierten, proliferierenden T-Zellen, bzw. bei einem Teil der differenzierten Effektorzellen (T_H1 , T_H2 , T_H17), der Fokus auf anaerobe Energiegewinnung durch Glykolyse gelegt (171, 172). Zusätzlich wird der Pentosephosphatweg angeregt, wodurch Redoxäquivalente (NADPH) und Ribose-5-phosphat (Grundbaustein für Nukleotide) entstehen.

Zellart	Weg der Energiegewinnung
T _{H1}	Glykolyse ↑
T _{H2}	
T _{H17}	
CD8 ⁺	Fettsäureoxidation ↓
T _{memory}	Fettsäureoxidation ↑
T _{reg}	Oxidative Phosphorylierung ↑

Tabelle 5: T-Effektorzellen und deren bevorzugte Energiegewinnung (171)

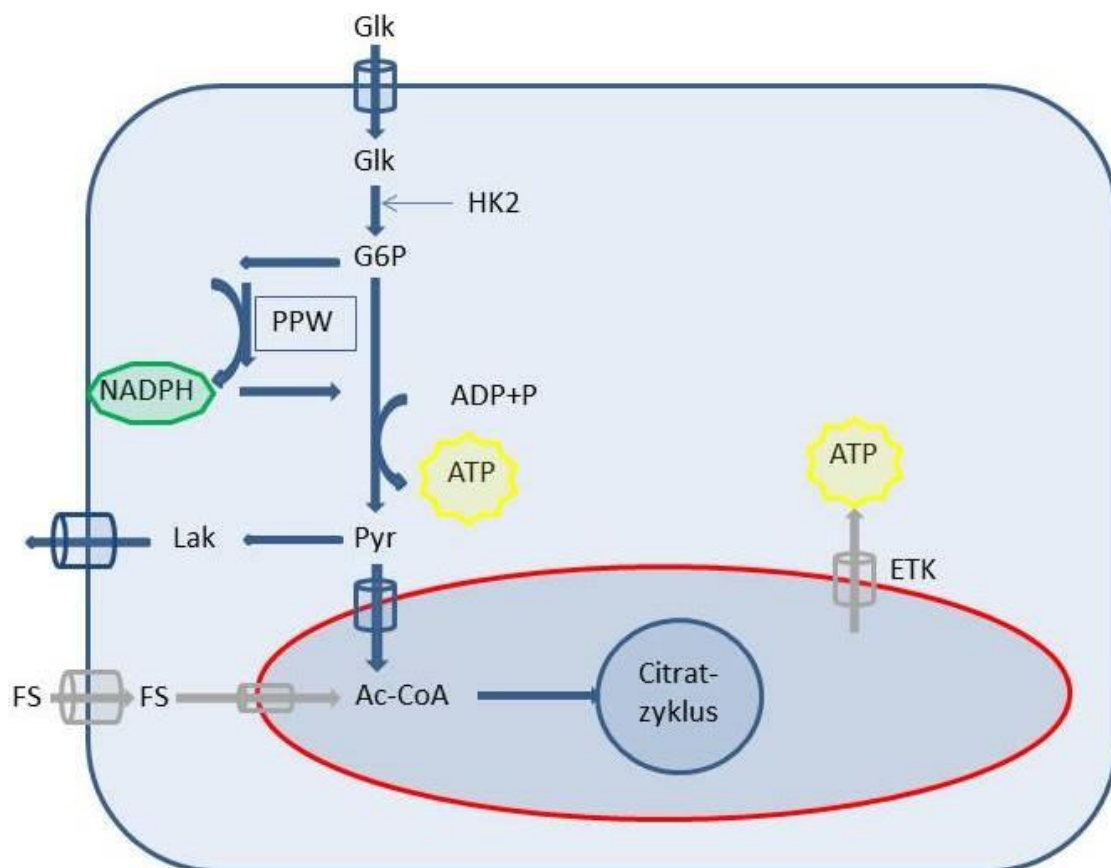


Abbildung 10: Metabolismus aktivierter T-Zellen. Aktivierung von Glykolyse und Pentosephosphatweg (PPW) zur Gewinnung von ATP bzw. NADPH. Oxidative Phosphorylierung und Fettsäureoxidation sind minimiert. U. a. durch aus Glykolyse stammendes Acetyl-CoA (Ac-CoA) wird der Citratzyklus gespeist; ETK=Elektronentransportkette; FS= Fettsäure; G6P= Glukose-6-Phosphat; Glk=Glukose; GLUT= Glukose Transporter; HK2=Hexokinase 2; Lak=Laktat; Pyr=Pyruvat; Abbildung in Anlehnung an Ghesquière et al. (171)

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass *A. f.* Keimschläuche in der Lage sind, mehrere wichtige Gene des Kohlenhydratstoffwechsels von iNKT-Zellen in deren Expression zu stimulieren. Die Pathway Analyse legte offen, dass 21% der in der Glykolyse/Gluconeogenese beteiligten Transkripte (fast ausschließlich hoch-)reguliert sind. Für den Fructose/Mannose-Stoffwechsel bzw. Pentosephosphatweg trifft dies für 44% bzw. 20% der Transkripte zu. Hexokinase 2 (HK2) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zeigten in der Microarray-Analyse nicht nur hohe \log_2 -Fold Changes, sondern es konnte auch in der qRT-PCR eine signifikante Überexpression (zumindest von HK2) bestätigt werden. HK2 phosphoryliert Glucose, welche unmittelbar zuvor via GLUT1 die Zellmembran passiert hat. Nach diesem ersten enzymatischen Schritt der Glykolyse kann Glucose die Zellmembran nicht mehr verlassen. Das Enzym hat einen niedrigen K_m -Wert, folglich eine hohe Affinität zu Glucose und arbeitet somit auch bei niedrigen Glukosekonzentrationen im Sättigungsbereich (173). GAPDH katalysiert die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Zudem ist bekannt, dass GAPDH neben der metabolischen Funktion auch eine Aufgabe als Transkriptionsfaktor innehat und die Translation von IFN- γ mRNA inhibiert (174, 175). In letztgenannter Studie, sowie von Jacob et al., wurde für T-Zellen gezeigt, dass eine intakte Glykolyse essentiell ist, um die Effektorfunktionen nach TCR-Stimulation ausüben zu können (176). Bei iNKT-Zellen scheint eine ähnliche Abhängigkeit von der Glykolyse plausibel, teilen sie doch viele Eigenschaften von T-Zellen. Die Überexpression von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels könnte zum Teil jedoch auf ein hypoxisches Mikromilieu zurückzuführen sein. Da VEGFA im gleichen Sinne reguliert ist (siehe unten), ist die Umstellung des Zellmetabolismus auf anaerobe Energiegewinnung naheliegend. Unter Sauerstoffmangel bieten Glykolyse und Pentosephosphatweg eine Möglichkeit für iNKT-Zellen ihre Effektorfunktion adäquat auszuführen. Welchen Vorteil T-Zellen, oder in diesem Fall iNKT-Zellen, aus der Hochregulierung des Pentosephosphatweges ziehen, hat noch spekulativen Charakter. Denkbar wäre, dass das über diesen Weg generierte NADPH benötigt wird, um im

Rahmen einer Stressreaktion, wie sie bei Konfrontation mit *A. f.* vorliegt, die Redox-Homöostase aufrechtzuerhalten (171). Ebenso wird über den Pentosephosphatweg mit Ribose-5-Phosphat ein Nukleotidbaustein hergestellt, der essentiell für die Proliferation von Immunzellen ist.

VEGFA bei der invasiven Aspergillose

Bemerkenswerterweise konnten beide verwendeten Stimuli iNKT-Zellen zur Überexpression von VEGFA anregen. Erwartungsgemäß geschah das durch Keimschläuche in einem höheren Maße als durch Konidien. VEGFA ist der erstentdeckte und bestuntersuchte Vertreter der humanen VEGF-Familien, zu der noch VEGF B-D sowie PLGF (*placental growth factor*) gehören (177). Von VEGFA existieren mehrere Splice-Varianten, die sich u.a. in ihrem angiogenetischen Potential unterscheiden (178, 179). Es stimuliert vorwiegend Vaskulo- und Angiogenese und steigert die Gefäßpermeabilität; alles Wirkungen, die durch Bindung an VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen vermittelt werden. Ein adäquater Reiz zur Expression von VEGFA ist ein niedriger Sauerstoffpartialdruck. Unter diesen Bedingungen wird der normalerweise sauerstofflabile Transkriptionsfaktor HIF-1 stabilisiert, woraufhin er die Transkription von VEGFA stimuliert. In der Lunge ist VEGFA in hoher Konzentration vorhanden und wird auch von dort residenten Alveolarmakrophagen produziert (180, 181). Gleichzeitig exprimieren z.B. T-Zellen den VEGF-Rezeptor, sodass VEGFA zusätzlich immunrelevante Funktionen ausüben kann, indem es u.a. chemotaktisch auf Monozyten, sowie aktivierend auf T_H1, T_H2 und T_H17-Zellen wirkt (182-186). Im Rahmen einer invasiven Aspergillose sezerniert der Pilz mit Gliotoxin und Fumagillin zwei antiangiogenetische Stoffe, die ihm (im neutropenen Wirt) einen pathogenetischen Vorteil verschaffen (187, 188). Erstaunlicherweise zeigte sich im Mausmodell, dass die Applikation von pro-angiogenetischen Faktoren wie VEGF und bFGF das Outcome einer invasiven Aspergillose verbessern (189). Angenommen wird, dass dadurch Immunzellen und Antimykotika entzündetes und hypoxisches Gewebe besser erreichen (190, 191). Für iNKT-Zellen wurde

bisher noch nicht gezeigt, dass sie VEGFA bzw. dessen Rezeptoren exprimieren. In dieser Arbeit konnte zwar keine Sekretion von VEGFA im ELISA nachgewiesen werden, wohl aber eine Hochregulierung der Transkription. Die Diskrepanz kann durch die umfassende posttranskriptionelle Modifikation bzw. Abbau von VEGFA mRNA erklärt werden (192). Das Transkript hat unter Normoxämie eine Halbwertszeit von 15-40 min, welche sich aber unter Hypoxie deutlich verlängern kann (192-194). Dementsprechend ist nicht auszuschließen, dass die gewählte Kokulturzeit von 6h nicht ausreichte, um eine signifikante Sekretion von VEGFA nachzuweisen. Sollten sich die erzielten Ergebnisse in Zukunft jedoch auch auf Proteinebene bestätigen, hätte das diffizile Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren in der invasiven Aspergillose einen zusätzlichen Akteur.

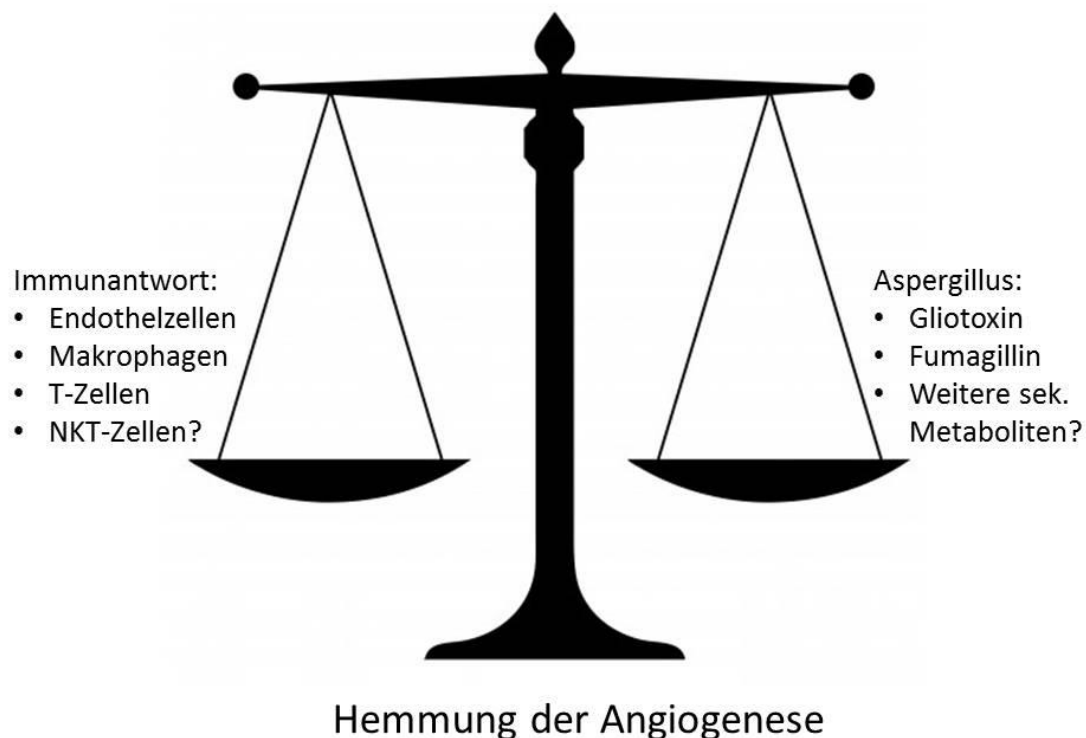


Abbildung 11: Pro- und antiangiogenetische Faktoren im Rahmen der invasiven Aspergillose. Modifiziert nach Kontoyiannis (187).

A. fumigatus Keimschläuche sind der relevante Stimulus für iNKT-Zellen

VEGFA ist eines von nur sieben Transkripten, welches durch Konidien und Keimschläuche differentiell reguliert wurde. Diese beiden Morphologien von *A. f.* unterscheiden sich u.a. in deren Zusammensetzung der Zellwand (siehe Einleitung, 1.1.3). Während die Zellwand von Konidien durch einen hohen Melanin Gehalt weitestgehend inert ist, exponieren Keimschläuche immunstimulatorisches β -1,3-Glucan und Chitin an deren Oberfläche. Durch Interaktion mit Pattern Recognition Receptors auf DCs wird eine proinflammatorische Antwort induziert. *A. f.* Keimschläuche interagieren dabei vorwiegend mit TLR2, TLR4 und TLR6, sowie dem C-Typ Lektin Dectin-1 (195). VEGFA ist demnach wahrscheinlich durch einen Faktor induziert worden, der beiden Pilzmorphologien eigen ist. Ob diese Eigenschaft jedoch in der Zellwand liegt, bleibt offen; ebenso die Frage, ob eine physische Interaktion von iNKT-Zellen mit dem Schimmelpilz von Nöten ist, um sie zu aktivieren. Zumindest deutet die bereits zitierte Untersuchung von Cohen et al. darauf hin, dass der aktivierende Effekt auf iNKT-Zellen durch IL-12 aus DCs vermittelt wird, welche Dectin-1-vermittelt Kohlenhydrate der *A. f.* Zellwand erkennen (94).

Ausblick

Diese Arbeit zeigt erste Einblicke in die Interaktion von iNKT-Zellen mit *A. f.* Hierbei wurde sich auf die Charakterisierung selektiv kultivierter iNKT-Zellen gesunder Spender beschränkt. Zweifelsohne ist es nötig die physiologische Rolle von iNKT-Zellen in der Abwehr von pathogenen Pilzen zu definieren und zu charakterisieren, was Folgeuntersuchungen von Beitzgen-Heineke bereits getan haben. Zeitgleich wurde bereits begonnen am Mausmodell weiteres Licht in die Interaktion von Pilz und iNKT-Zelle zu bringen (94). Jedoch wird es in Zukunft auch von Bedeutung sein zu erforschen, inwiefern iNKT-Zellen von mit *A. f.* infizierten Patienten quantitativ und qualitativ beeinträchtigt sind. Beispielsweise wurden die numerischen und funktionellen Einschränkungen bereits für iNKT-Zellen bei Malignomen beschrieben (196). Es besteht die Hoffnung, dass aus diesen Untersuchungen Erkenntnisse erwachsen werden,

welche zukünftig die Behandlung von *Aspergillus fumigatus* assoziierten Erkrankungen erfolgreicher gestalten werden.

E Zusammenfassung

Natürliche Killer T-Zellen stellen ein verbindendes Element zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar und sind durch die Expression von T- und NK-Zell-Markern, sowie eines invarianten T-Zell-Rezeptors charakterisiert. Damit erkennen sie Lipide, welche vorwiegend durch dendritische Zellen mittels des MHC-I-ähnlichen Moleküls CD1d präsentiert werden. Die protektive Rolle von iNKT-Zellen bei Autoimmun- und malignen Erkrankungen ist nachgewiesen, ebenso ihre wichtige Aufgabe bei der Abwehr bakterieller, viraler und parasitärer Pathogene. Inwiefern iNKT-Zellen mit Pilzen und im speziellen *Aspergillus fumigatus* (*A. f.*) interagieren ist jedoch unzureichend beschrieben.

iNKT-Zellen gesunder Spender wurden *ex vivo* selektiv kultiviert und mit *A. f.* Konidien und Keimschläuchen kokultiviert. Microarray-Analyse, bzw. Multiplex-ELISA fanden Anwendung, um eine durch *A. f.* induzierte differentielle Genexpression bzw. Zytokinsekretion bei iNKT-Zellen zu detektieren. Zusätzlich wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen, ob *A. f.* die Produktion des T_H1-Zytokins IFN- γ beeinflusst. Schließlich wurde der fungizide Effekt von iNKT-Zellen auf *A. f.* via XTT-Assay quantifiziert.

iNKT-Zellen zeigten einen ausgeprägten fungiziden Effekt auf *A. f.* Keimschläuche, welcher mit einem hohen Anteil IFN- γ ⁺ iNKT-Zellen vergesellschaftet war. Hingegen zeigte sich kein Stimulus-spezifisches Zytokinsekretionsmuster. Besonders Keimschläuche induzierten eine differentielle Genexpression bei iNKT-Zellen. Diese war gekennzeichnet durch eine Hochregulierung von Genen des anaeroben Glukosemetabolismus. Als Zeichen einer möglicherweise lokalen Hypoxie waren VEGFA hoch-, bzw. CCL15 in ihrer Transkription herunterreguliert. Vor dem Hintergrund einer unbefriedigend hohen Mortalität der durch *A. f.* verursachten invasiven Aspergillose können diese ersten Ergebnisse der Interaktion des Schimmelpilzes mit iNKT-Zellen Grundlage für weitere Untersuchungen sein, um deren Wechselwirkung besser zu verstehen und möglicherweise zur Verbesserung der Therapie der Aspergillose beizutragen.

F Literaturverzeichnis

1. Bennett JW. *Aspergillus: a primer for the novice*. Medical mycology. 2009;47 Suppl 1:S5-12.
2. Schmidt A. Georg Fresenius und die Spezies *Aspergillus fumigatus*. Mycoses. 1998;41:89-91.
3. Fresenius G. Beiträge zur Mykologie. Frankfurt am Main: Brönnner, H. I.; 1863.
4. Klich MA. Identification of clinically relevant aspergilli. Medical mycology. 2006;44(Supplement 1):S127-S31.
5. Varga J, Toth B. Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus*. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2003;3(1):3-17.
6. Pringle A, Baker DM, Platt JL, Wares JP, Latge JP, Taylor JW. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. Evolution; international journal of organic evolution. 2005;59(9):1886-99.
7. Dyer PS, Paoletti M. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? Medical mycology. 2005;43 Suppl 1:S7-14.
8. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature. 2005;438(7071):1151-6.
9. O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature. 2009;457(7228):471-4.
10. Pitt JI, Samson RA. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. Studies in mycology. 2007;59:67-70.
11. Latge JP, Beauvais A. Functional duality of the cell wall. Curr Opin Microbiol. 2014;20c:111-7.
12. Chai LY, Vonk AG, Kullberg BJ, Verweij PE, Verschueren I, van der Meer JW, et al. *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially

- modulate host TLR2 and TLR4 responses. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2011;13(2):151-9.
13. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(3):447-65.
 14. Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(4):708-17.
 15. Jahn B, Koch A, Schmidt A, Wanner G, Gehringer H, Bhakdi S, et al. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infection and immunity*. 1997;65(12):5110-7.
 16. Paris S, Debeaupuis JP, Crameri R, Carey M, Charles F, Prevost MC, et al. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(3):1581-8.
 17. McDonagh A, Fedorova ND, Crabtree J, Yu Y, Kim S, Chen D, et al. Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. *PLoS pathogens*. 2008;4(9):e1000154.
 18. Khosravi AR, Mahdavi Omran S, Shokri H, Lotfi A, Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis. *Journal de mycologie medicale*. 2012;22(2):167-72.
 19. Alp S, Arıkan S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *Journal of basic microbiology*. 2008;48(5):331-7.
 20. Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakis MS, Prince RA, Kontoyiannis DP. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(12):6120-2.
 21. Gardiner DM, Waring P, Howlett BJ. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology (Reading, England)*. 2005;151(Pt 4):1021-32.

22. Eichner RD, Al Salami M, Wood PR, Mullbacher A. The effect of gliotoxin upon macrophage function. *International journal of immunopharmacology*. 1986;8(7):789-97.
23. Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SL, St John LS, et al. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood*. 2005;105(6):2258-65.
24. Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, Decker T, Traenckner EB, Vogt M, et al. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(4):1829-40.
25. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? *Medical mycology*. 2009;47 Suppl 1:S97-103.
26. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest*. 2002;121(6):1988-99.
27. Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;110(5):685-92.
28. Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2007;100(6):317-34.
29. Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003;37 Suppl 3:S265-80.
30. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;34(7):909-17.
31. Segal BH. Aspergillosis. *The New England journal of medicine*. 2009;360(18):1870-84.

32. Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, Root RK, Wilfert CM, Gutman L, et al. Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. *The American journal of medicine*. 1981;71(1):59-66.
33. Warris A, Bjorneklett A, Gaustad P. Invasive pulmonary aspergillosis associated with infliximab therapy. *The New England journal of medicine*. 2001;344(14):1099-100.
34. Baddley JW, Stephens JM, Ji X, Gao X, Schlamm HT, Tarallo M. Aspergillosis in Intensive Care Unit (ICU) patients: epidemiology and economic outcomes. *BMC infectious diseases*. 2013;13:29.
35. Koulenti D, Garnacho-Montero J, Blot S. Approach to invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Current opinion in infectious diseases*. 2014;27(2):174-83.
36. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45(2):205-16.
37. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Kontoyiannis DP, Walsh TJ, et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Medical mycology*. 2005;43 Suppl 1:S49-58.
38. Singh N, Paterson DL. Aspergillus infections in transplant recipients. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(1):44-69.
39. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002;100(13):4358-66.
40. Schwartz S, Ruhnke M, Ribaud P, Reed E, Troke P, Thiel E. Poor efficacy of amphotericin B-based therapy in CNS aspergillosis. *Mycoses*. 2007;50(3):196-200.
41. Mueller-Loebnitz C, Ostermann H, Franzke A, Loeffler J, Uharek L, Topp M, et al. Immunological aspects of Candida and Aspergillus systemic

- fungal infections. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2013;2013:102934.
42. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(2):310-50.
 43. Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, et al. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infection and immunity*. 2003;71(2):891-903.
 44. Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, Gougerot-Pocidallo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infection and immunity*. 2003;71(6):3034-42.
 45. Diamond RD, Clark RA. Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils in vitro. *Infection and immunity*. 1982;38(2):487-95.
 46. Levitz SM, Farrell TP. Human neutrophil degranulation stimulated by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of leukocyte biology*. 1990;47(2):170-5.
 47. von Kockritz-Blickwede M, Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2009;87(8):775-83.
 48. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):699-705.
 49. Stergiopoulou T, Meletiadis J, Roilides E, Kleiner DE, Schaufele R, Roden M, et al. Host-dependent patterns of tissue injury in invasive pulmonary aspergillosis. *American journal of clinical pathology*. 2007;127(3):349-55.
 50. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus

- Group. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(12):1813-21.
51. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious diseases*. 2009;9(2):89-96.
 52. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine*. 2007;356(4):335-47.
 53. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(3):327-60.
 54. Bhatia S, McCullough J, Perry EH, Clay M, Ramsay NK, Neglia JP. Granulocyte transfusions: efficacy in treating fungal infections in neutropenic patients following bone marrow transplantation. *Transfusion*. 1994;34(3):226-32.
 55. Rowe JM, Andersen JW, Mazza JJ, Bennett JM, Paietta E, Hayes FA, et al. A randomized placebo-controlled phase III study of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adult patients (> 55 to 70 years of age) with acute myelogenous leukemia: a study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E1490). *Blood*. 1995;86(2):457-62.
 56. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001;32(3):358-66.
 57. Pagano L, Caira M, Picardi M, Candoni A, Melillo L, Fianchi L, et al. Invasive Aspergillosis in patients with acute leukemia: update on morbidity and mortality--SEIFEM-C Report. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(11):1524-5.

58. Makino Y, Kanno R, Ito T, Higashino K, Taniguchi M. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. *International immunology*. 1995;7(7):1157-61.
59. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, et al. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature*. 1987;329(6136):251-4.
60. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(3):1097-106.
61. Sykes M. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1990;145(10):3209-15.
62. Levitsky HI, Golumbek PT, Pardoll DM. The fate of CD4-8- T cell receptor-alpha beta+ thymocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1991;146(4):1113-7.
63. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science (New York, NY)*. 1995;268(5212):863-5.
64. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science (New York, NY)*. 1997;278(5343):1626-9.
65. T. N. Agelasphins, Novel Antitumor and Immunostimulatory Cerebrosides from the Marine Sponge *Agelasmauritianus*. *Tetrahedron Letters*. 1993;34(35):5591-2.
66. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(1):1-16.

67. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(3):1171-6.
68. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):101-17.
69. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(5):741-54.
70. Benlagha K, Weiss A, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(11):1895-903.
71. Seino K-i, Taniguchi M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(12):1623-6.
72. Adams EJ. Lipid presentation by human CD1 molecules and the diverse T cell populations that respond to them. *Current opinion in immunology*. 2014;26:1-6.
73. Canchis PW, Bhan AK, Landau SB, Yang L, Balk SP, Blumberg RS. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology*. 1993;80(4):561-5.
74. Exley M, Garcia J, Wilson SB, Spada F, Gerdes D, Tahir SMA, et al. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. *Immunology*. 2000;100(1):37-47.
75. Smed-Sørensen A, Moll M, Cheng T-Y, Loré K, Norlin A-C, Perbeck L, et al. IgG regulates the CD1 expression profile and lipid antigen-presenting function in human dendritic cells via FcγRIIa. *2008-05-15 00:00:00*. 5037-46 p.
76. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449(7161):419-26.

77. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*. 1973;137(5):1142-62.
78. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
79. Cohen NR, Garg S, Brenner MB. Chapter 1 Antigen Presentation by CD1: Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. In: Frederick WA, editor. *Advances in immunology*. Volume 102: Academic Press; 2009. p. 1-94.
80. Langlois RA, Legge KL. Respiratory dendritic cells: mediators of tolerance and immunity. *Immunologic research*. 2007;39(1-3):128-45.
81. Spada FM, Borriello F, Sugita M, Watts GF, Koezuka Y, Porcelli SA. Low expression level but potent antigen presenting function of CD1d on monocyte lineage cells. *European journal of immunology*. 2000;30(12):3468-77.
82. Hegde S, Chen X, Keaton JM, Reddington F, Besra GS, Gumperz JE. NKT cells direct monocytes into a DC differentiation pathway. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(5):1224-35.
83. van den Elzen P, Garg S, Leon L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, et al. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature*. 2005;437(7060):906-10.
84. Lang ML. How do natural killer T cells help B cells? Expert review of vaccines. 2009;8(8):1109-21.
85. Schofield L, McConville MJ, Hansen D, Campbell AS, Fraser-Reid B, Grusby MJ, et al. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science (New York, NY)*. 1999;283(5399):225-9.
86. Kobrynski LJ, Sousa AO, Nahmias AJ, Lee FK. Cutting edge: antibody production to pneumococcal polysaccharides requires CD1 molecules and CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;174(4):1787-90.

87. Ko SY, Ko HJ, Chang WS, Park SH, Kweon MN, Kang CY. alpha-Galactosylceramide can act as a nasal vaccine adjuvant inducing protective immune responses against viral infection and tumor. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;175(5):3309-17.
88. Devera TS, Shah HB, Lang GA, Lang ML. Glycolipid-activated NKT cells support the induction of persistent plasma cell responses and antibody titers. *European journal of immunology*. 2008;38(4):1001-11.
89. Tonti E, Galli G, Malzone C, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. NKT-cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction. *Blood*. 2009;113(2):370-6.
90. Brigl M, Brenner MB. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Seminars in Immunology*. 2010;22(2):79-86.
91. Godfrey DI, McConville MJ, Pellicci DG. Chewing the fat on natural killer T cell development. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(10):2229-32.
92. Sanderson JP, Brennan PJ, Mansour S, Matulis G, Patel O, Lissin N, et al. CD1d protein structure determines species-selective antigenicity of isoglobotrihexosylceramide (iGb3) to invariant NKT cells. *European journal of immunology*. 2013;43(3):815-25.
93. Brigl M, Tatituri RV, Watts GF, Bhowruth V, Leadbetter EA, Barton N, et al. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(6):1163-77.
94. Cohen NR, Tatituri RV, Rivera A, Watts GF, Kim EY, Chiba A, et al. Innate recognition of cell wall beta-glucans drives invariant natural killer T cell responses against fungi. *Cell host & microbe*. 2011;10(5):437-50.
95. Albacker LA, Chaudhary V, Chang YJ, Kim HY, Chuang YT, Pichavant M, et al. Invariant natural killer T cells recognize a fungal glycosphingolipid that can induce airway hyperreactivity. *Nature medicine*. 2013;19(10):1297-304.

96. Coles MC, Raulet DH. NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;164(5):2412-8.
97. Bendelac A. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(6):2091-6.
98. Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(7):505-18.
99. Baev DV, Peng XH, Song L, Barnhart JR, Crooks GM, Weinberg KI, et al. Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4- subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood*. 2004;104(13):4150-6.
100. Berzins SP, Cochrane AD, Pellicci DG, Smyth MJ, Godfrey DI. Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1399-407.
101. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C, Mulder CB, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*. 2007;122(1):1-14.
102. Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nature immunology*. 2003;4(12):1230-7.
103. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(32):11287-92.
104. Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(5):995-1001.

105. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;163(9):4647-50.
106. Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(2):267-79.
107. Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Salio M, Mathew B, Ritter G, et al. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;171(10):5140-7.
108. Semmling V, Lukacs-Kornek V, Thaiss CA, Quast T, Hochheiser K, Panzer U, et al. Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nature immunology*. 2010;11(4):313-20.
109. Cohen NR, Brennan PJ, Shay T, Watts GF, Brigl M, Kang J, et al. Shared and distinct transcriptional programs underlie the hybrid nature of iNKT cells. *Nature immunology*. 2013;14(1):90-9.
110. Tachibana T, Onodera H, Tsuruyama T, Mori A, Nagayama S, Hiai H, et al. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(20):7322-7.
111. Schneiders FL, de Bruin RC, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, Leemans CR, Brakenhoff RH, et al. Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(5):567-70.

112. Molling JW, Langius JA, Langendijk JA, Leemans CR, Bontkes HJ, van der Vliet HJ, et al. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(7):862-8.
113. Natori T, Morita M, Akimoto K, Koezuka Y. Agelasphins, novel antitumor and immunostimulatory cerebroside from the marine sponge *Agelas mauritianus*. *Tetrahedron*. 1994;50(9):2771-84.
114. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, et al. Therapeutic activation of $V\alpha 24+V\beta 11+$ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood*. 2004;103(2):383-9.
115. Motohashi S, Nagato K, Kunii N, Yamamoto H, Yamasaki K, Okita K, et al. A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(4):2492-501.
116. Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. iNKT cells in allergic disease. *Current topics in microbiology and immunology*. 2007;314:269-91.
117. Novak J, Lehen A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine*. 2011;53(3):263-70.
118. Getz GS, Vanderlaan PA, Reardon CA. Natural killer T cells in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;106(5):814-9.
119. Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(6):405-17.
120. Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1-Dependent Increase of $V\alpha 14$ NKT Cells in Lungs and Their Roles in Th1 Response and Host Defense in Cryptococcal Infection. *The Journal of Immunology*. 2001;167(11):6525-32.

121. Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Koguchi Y, Uezu K, Nakayama T, et al. Activation of Valpha14(+) natural killer T cells by alpha-galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*. 2001;69(1):213-20.
122. Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Koguchi Y, Tohyama M, et al. Enhanced gamma interferon production through activation of Valpha14(+) natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in interleukin-18-deficient mice with systemic cryptococcosis. *Infection and immunity*. 2001;69(11):6643-50.
123. Scanlon ST, Thomas SY, Ferreira CM, Bai L, Krausz T, Savage PB, et al. Airborne lipid antigens mobilize resident intravascular NKT cells to induce allergic airway inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(10):2113-24.
124. Boyum A. SEPARATION OF WHITE BLOOD CELLS. *Nature*. 1964;204:793-4.
125. Holter H, Moller KM. A substance for aqueous density gradients. *Experimental cell research*. 1958;15(3):631-2.
126. Noble PB, Cutts JH. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *The Canadian veterinary journal La revue veterinaire canadienne*. 1967;8(5):110-1.
127. Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, et al. CD1d-mediated Recognition of an α -Galactosylceramide by Natural Killer T Cells Is Highly Conserved through Mammalian Evolution. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(8):1521-8.
128. Brossay L, Naidenko O, Burdin N, Matsuda J, Sakai T, Kronenberg M. Structural requirements for galactosylceramide recognition by CD1-restricted NK T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;161(10):5124-8.
129. Nieda M, Nicol A, Koezuka Y, Kikuchi A, Takahashi T, Nakamura H, et al. Activation of human Valpha24NKT cells by alpha-glycosylceramide in

- a CD1d-restricted and Valpha24TCR-mediated manner. *Human immunology*. 1999;60(1):10-9.
130. Bouzani M, Ok M, McCormick A, Ebel F, Kurzai O, Morton CO, et al. Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;187(3):1369-76.
 131. Grutzkau A, Radbruch A. Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010;77(7):643-7.
 132. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231-8.
 133. Julius MH, Masuda T, Herzenberg LA. Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(7):1934-8.
 134. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 1993;159(1-2):197-207.
 135. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of immunological methods*. 1991;142(2):257-65.
 136. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*. 1988;48(17):4827-33.
 137. Meshulam T, Levitz SM, Christin L, Diamond RD. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-

- (2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT).
The Journal of infectious diseases. 1995;172(4):1153-6.
138. Houser B. Bio-Rad's Bio-Plex(R) suspension array system, xMAP technology overview. Archives of physiology and biochemistry. 2012;118(4):192-6.
 139. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences. 2008;63(8):879-84.
 140. Kokkonen H, Soderstrom I, Rocklov J, Hallmans G, Lejon K, Rantapaa Dahlqvist S. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. Arthritis and rheumatism. 2010;62(2):383-91.
 141. Thomas S, Bonchev D. A survey of current software for network analysis in molecular biology. Human genomics. 2010;4(5):353-60.
 142. Bishop DF, Henderson AS, Astrin KH. Human delta-aminolevulinatase synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. Genomics. 1990;7(2):207-14.
 143. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience letters. 2003;339(1):62-6.
 144. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research. 2001;29(9):e45.
 145. Snyder-Cappione JE, Tincati C, Eccles-James IG, Cappione AJ, Ndhlovu LC, Koth LL, et al. A comprehensive ex vivo functional analysis of human NKT cells reveals production of MIP1-alpha and MIP1-beta, a lack of IL-17, and a Th1-bias in males. PloS one. 2010;5(11):e15412.
 146. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. Nucleic acids research. 2005;33(6):e56.

147. Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, et al. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis*. 2000;21(1):128-34.
148. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*. 2006;7:3.
149. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
150. Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, Topini F, Ruggeri L, Carotti A, et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood*. 2005;106(13):4397-406.
151. Montagnoli C, Perruccio K, Bozza S, Bonifazi P, Zelante T, De Luca A, et al. Provision of antifungal immunity and concomitant alloantigen tolerization by conditioned dendritic cells in experimental hematopoietic transplantation. *Blood cells, molecules & diseases*. 2008;40(1):55-62.
152. Shao C, Qu J, He L, Zhang Y, Wang J, Zhou H, et al. Dendritic cells transduced with an adenovirus vector encoding interleukin-12 are a potent vaccine for invasive pulmonary aspergillosis. *Genes and immunity*. 2005;6(2):103-14.
153. Smith NL, Denning DW. Clinical implications of interferon gamma genetic and epigenetic variants. *Immunology*. 2014.
154. Nagai H, Guo J, Choi H, Kurup V. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis. *The Journal of infectious diseases*. 1995;172(6):1554-60.
155. Exley MA, Hou R, Shaulov A, Tonti E, Dellabona P, Casorati G, et al. Selective activation, expansion, and monitoring of human iNKT cells with a monoclonal antibody specific for the TCR alpha-chain CDR3 loop. *European journal of immunology*. 2008;38(6):1756-66.
156. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nature reviews Immunology*. 2004;4(3):231-7.

157. Zhang Y, Wang S, Li X-M, Cui C-M, Feng C, Wang B-G. New Sphingolipids with a Previously Unreported 9-Methyl-C20-sphingosine Moiety from a Marine Algous Endophytic Fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Lipids*. 2007;42(8):759-64.
158. Kawano T, Nakayama T, Kamada N, Kaneko Y, Harada M, Ogura N, et al. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. *Cancer research*. 1999;59(20):5102-5.
159. Wingender G, Krebs P, Beutler B, Kronenberg M. Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(5):2721-9.
160. Swain MG. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clinical science (London, England : 1979)*. 2008;114(7):457-66.
161. Prlic M, Hohl TM. iNKTs foil fungi. *Cell host & microbe*. 2011;10(5):421-2.
162. Matsuda JL, Gapin L, Baron JL, Sidobre S, Stetson DB, Mohrs M, et al. Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8395-400.
163. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang ZE, Gapin L, et al. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(7):1069-76.
164. Wang W, Bacon KB, Oldham ER, Schall TJ. Molecular cloning and functional characterization of human MIP-1 delta, a new C-C chemokine related to mouse CCF-18 and C10. *Journal of clinical immunology*. 1998;18(3):214-22.
165. Forssmann U, Magert HJ, Adermann K, Escher SE, Forssmann WG. Hemofiltrate CC chemokines with unique biochemical properties: HCC-1/CCL14a and HCC-2/CCL15. *Journal of leukocyte biology*. 2001;70(3):357-66.

166. Fischer J, West J, Agochukwu N, Suire C, Hale-Donze H. Induction of host chemotactic response by *Encephalitozoon* spp. *Infection and immunity*. 2007;75(4):1619-25.
167. Simitopoulou M, Roilides E, Likartsis C, Ioannidis J, Orfanou A, Paliogianni F, et al. Expression of immunomodulatory genes in human monocytes induced by voriconazole in the presence of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(3):1048-54.
168. Bosco MC, Puppo M, Santangelo C, Anfosso L, Pfeffer U, Fardin P, et al. Hypoxia modifies the transcriptome of primary human monocytes: modulation of novel immune-related genes and identification of CC-chemokine ligand 20 as a new hypoxia-inducible gene. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(3):1941-55.
169. Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*. 2012;491(7424):364-73.
170. Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(11):829-46.
171. Ghesquiere B, Wong BW, Kuchnio A, Carmeliet P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature*. 2014;511(7508):167-76.
172. Wahl DR, Byersdorfer CA, Ferrara JL, Opipari AW, Jr., Glick GD. Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation. *Immunological reviews*. 2012;249(1):104-15.
173. Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*. 2006;25(34):4683-96.
174. Zheng L, Roeder RG, Luo Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell*. 2003;114(2):255-66.
175. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Jr., Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*. 2013;153(6):1239-51.
176. Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ, et al. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires

- CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(7):4476-86.
177. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(10):1015-26.
178. Hilmi C, Guyot M, Pages G. VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *Journal of nucleic acids*. 2012;2012:162692.
179. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews Cancer*. 2008;8(11):880-7.
180. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *The American journal of physiology*. 1993;264(4 Pt 1):C995-1002.
181. Tsokos M, Pufe T, Paulsen F, Anders S, Mentlein R. Pulmonary expression of vascular endothelial growth factor in sepsis. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2003;127(3):331-5.
182. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87(8):3336-43.
183. Mor F, Quintana FJ, Cohen IR. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(7):4618-23.
184. Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nature medicine*. 2004;10(10):1095-103.
185. Kim YS, Hong SW, Choi JP, Shin TS, Moon HG, Choi EJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a key mediator in the development of T cell priming and its polarization to type 1 and type 17 T helper cells in the

- airways. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2009;183(8):5113-20.
186. Shin JY, Yoon IH, Kim JS, Kim B, Park CG. Vascular endothelial growth factor-induced chemotaxis and IL-10 from T cells. *Cellular immunology*. 2009;256(1-2):72-8.
187. Ben-Ami R, Lewis RE, Leventakos K, Kontoyiannis DP. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. *Blood*. 2009;114(26):5393-9.
188. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*. 1990;348(6301):555-7.
189. Ben-Ami R, Albert ND, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Proangiogenic growth factors potentiate in situ angiogenesis and enhance antifungal drug activity in murine invasive aspergillosis. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(7):1066-74.
190. Kontoyiannis DP. Manipulation of host angiogenesis: A critical link for understanding the pathogenesis of invasive mold infections? *Virulence*. 2010;1(3):192-6.
191. Ito JI. Enhancing angiogenesis in invasive aspergillosis: a novel therapeutic approach. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(7):1031-3.
192. Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic acids research*. 2013.
193. Dibbens JA, Miller DL, Damert A, Risau W, Vadas MA, Goodall GJ. Hypoxic Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stability Requires the Cooperation of Multiple RNA Elements. *Molecular Biology of the Cell*. 1999;10(4):907-19.
194. Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(5):2746-53.

195. Ok M, Einsele H, Loeffler J. Genetic susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infections. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2011;301(5):445-52.
196. Motohashi S, Nakayama T. Natural killer T cell-mediated immunotherapy for malignant diseases. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2009;1:108-16.

G Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Klinische Erscheinungsbilder der Aspergillose, Quelle s. Abb.....	4
Abbildung 2: Reinheit iNKT-Zellen vor/nach positiver Selektion.....	33
Abbildung 3: XTT-Assay, optische Dichte der Proben.....	34
Abbildung 4: XTT-Assay, <i>fungus damage</i>	34
Abbildung 5: Anteil IFN- γ^+ iNKT-Zellen nach Kokultur.....	35
Abbildung 6: Anteil TNF- α^+ iNKT-Zellen nach Kokultur.	36
Abbildung 7: iNKT-Zellen Sekretionsprofil.....	39
Abbildung 8: Venn-Diagramm: Differentielle Genexpression	44
Abbildung 9: qRT-PCR-Ergebnisse- relative Expression Kandidatengene.	45
Abbildung 10: Metabolismus aktivierter T-Zellen.....	52
Abbildung 11: Pro- und antiangiogenetische Faktoren im Rahmen der invasiven Aspergillose. Quelle s. Abb..	55
Tabelle 1: Bead-Sets Multiplex-ELISA	27
Tabelle 2: Ergebnis Multiplex-ELISA, Quelle s. Abb.....	37
Tabelle 3: Top 5 regulierte Signalwege je Stimulus.....	41
Tabelle 4: Durch beide Stimuli gleichsinnig differentiell expr. Transkripte.....	44
Tabelle 5: T-Effektorzellen und deren bevorzugte Energiegewinnung	52

Anhang

Top 10 regulierte Gene in der iNKT-Kokultur mit *A. fumigatus*

In den Tabellen angegeben ist die ID (*identifizier*) des Probe-Sets mit dem das regulierte Gen nachgewiesen wurde, das Gen-Kürzel, dessen Name (laut Entrez Gene Database), die Art des kodierten Proteins und der Grad der Regulierung. Die Suffixe der ID beschreiben, mit welcher Spezifität ein Probe-Set eine bestimmte Sequenz nachweisen kann.

- *_at:*
Alle Proben eines Probe-Sets detektieren ein definiertes Transkript
- *_a_at:*
Die im Probe-Set vorhandenen Proben detektieren alternative Transkripte eines definierten Genes
- *_s_at:*
Die in einem Set enthaltenen Proben können Transkripte verschiedener Gene detektieren.
- *_x_at:*
Mindestens eine der in einem Set enthaltenen Proben kann ein Transkript eines anderen Gens 1detektieren.

ID	Gen	Entrez Gen Name	Typ	log ₂ -Fold Change
11761278_at	FLT3LG	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	Zytokin	2,369
11730471_a_at	SCGB2a2	secretoglobin, family 2A, member 2	Sonstige	2,120
11749355_a_at	CFB	complement factor B	Peptidase	2,018
11725370_s_at	VEGFA	vascular endothelial growth factor	Wachstumsfaktor	1,818
11724558_at	GNA15	guanine nucleotide binding protein alpha 15	Enzym	1,746
11745937_a_at	TCF3	transcription factor 3	Sonstige	1,719
11735736_a_at	CREB3L3	cAMP responsive element binding protein 3-like 3	Enzym	1,713
11722950_a_at	C1orf51	chromosome 1 open reading frame 51	Sonstige	1,678
11715309_s_at	MLXIPL	MLX interacting protein-like	Transkriptions Regulator	1,663
11740153_a_at	ZNF384	zinc finger protein 384	Sonstige	1,665

Top-10 hochregulierte Gene iNKT-Zellen + *A. fumigatus* Konidien

ID	Gen	Entrez Gen Name	Typ	log ₂ -Fold Change
11758998_at	STIM2	stromal interacting molecule 2	Transporter	-2,132
11728508_at	FKTN	fukutin	Sonstige	-2,084
11733789_a_at	HSDL1	hydroxysteroid dehydrogenase like 1	Enzym	-1,989
11736142_at	ENPP4	ectonucleotide pyrophosphatase 4	Enzym	-1,977
11743517_a_at	NNT	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	Enzym	-1,927
11720185_a_at	MAD2L1	mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	Sonstige	-1,916
11716417_a_at	UNG	uracil-DNA glycosylase	Enzym	-1,867
11759821_at	RPL37A	ribosomal protein L37a	Sonstige	-1,839
11762617_x_at	ANKRD36B	ankyrin repeat domain 36b	Transkriptions Regulator	-1,838
11752757_s_at	EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	Translations Regulator	-1,830

Top-10 herabregulierte Gene iNKT-Zellen + *A. fumigatus* Konidien

ID	Gen	Entrez Gen Name	Typ	log ₂ -Fold Change
11722406_at	PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	Kinase	13,947
11754959_a_at	AK4	adenylate Kinase 4	Kinase	10,832
11743161_x_at	C7orf68	chromosome 7 open reading frame 68	Sonstige	10,158
11725370_s_at	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	Wachstumsfaktor	7,016
11747079_x_at	ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate	Enzym	6,256
11728049_s_at	HIST1H4C	histone cluster 1, H4c	Sonstige	6,085
11757776_s_at	ARG2	arginase, type II	Enzym	5,852
11743084_s_at	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	Sonstige	5,420
11756138_a_at	HK2	hexokinase 2	Enzym	4,867
11736556_s_at	SLC2A3	solute Carrier Family 2, Member 3	Transporter	4,829

Top-10 hochregulierte Gene iNKT-Zellen + *A. fumigatus* Keimschläuche

ID	Gen	Entrez Gen Name	Typ	log ₂ -Fold Change
11726213_x_at	CCL15	chemokine ligand 15	Zytokin	-3,712
11730219_s_at	SPG20	spastic paraplegia 20	Sonstige	-2,202
11743636_at	TNFAIP6	tumor necrosis factor alpha-induced protein 6	Sonstige	-2,116
11728128_a_at	APTX	aprataxin	Phosphatase	-1,946
∞ 11729278_x_at	CRCP	CGRP receptor component	Transmembran Rezeptor	-1,905
11743656_a_at	HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15(NAD)	Enzym	-1,867
11724652_a_at	LMBR1	limb development membrane protein 1	Transmembran Rezeptor	-1,843
11762003_at	RGS12	regulator of G-protein signaling 12	Sonstige	-1,785
11721733_a_at	GCH1	GTP cyclohydrolase 1	Enzym	-1,779
11748963_x_at	ASPSCR1	alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1	Sonstige	-1,747

Top-10 herabregulierte Gene iNKT-Zellen + *A. fumigatus* Keimschläuche

Abkürzungsverzeichnis

α -GalCer	alpha-Galactosylceramid
(c)DNA	(complementary) desoxyribonucleic acid
(m)RNA	(messenger) ribonucleic acid
A.f.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK4	Adenylat Kinase 4
ALDOA	Aldolase A
ALDOC	Aldolase C
APC	antigenpräsentierende Zelle(n)
ApoE	Apolipoprotein E
ARG2	Arginase 2
ATCC	American type culture collection
bFGF	basic fibroblast growth factor
BPGM	Bisphosphoglyceratmutase
CCL15	chemokine (C-C-motif) ligand
CD	cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	cycle threshold
DAG	Diaacylglycerol
DCs	dendritische Zellen
mDCs	myeloide dendritische Zellen
pDCs	plasmazytoide dendritische Zellen
DOC	Dexoxyceramid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GLUT	Glukose Transporter
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMM	Glukose Monomykolat
H ₂ O	Wasser
h-Alas	δ -Aminolevulinatsynthase
HIF-1	hypoxia inducible factor 1
HK2	Hexokinase 2

IA	invasive Aspergillose
ID	Identifier
IFN- γ	Interferon gamma
iGb3	Isoglobotrihexosylceramid
IL	Interleukin
IP-10	interferon gamma induced protein 10
IPA	Ingenuity Pathway Analyse
Km-Wert	Michaeliskonstante
LDL-Rezeptor	Rezeptor für low density lipoprotein
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
MIP	macrophage inflammatory protein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
iNKT-Zellen	Invariante NKT-Zellen
dNKT-Zellen	Diverse NKT-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFKFB4	6-phosphofructo-2-Kinase/fructose-2,6-Biphosphatase 4
PLGF	placental growth factor
PRR	pattern recognition receptor(s)
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RIN	RNA integrity number
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygene species)
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SLC2A4	soluble carrier 2A3
spp	species pluralis
TCR	T-Zell Rezeptor
TLR	toll-like receptor(s)
Tmemory	T- Gedächtniszellen
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
Treg	T-regulatorische Zellen
VEGF	vascular endothelial growth factor
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid – Natriumsalz

Danksagung

Diese Arbeit ist beileibe kein Werk eines Einzelnen, sodass mein tiefer Dank an eine Vielzahl an Personen geht, die während der Promotionszeit zum Gelingen beigetragen haben.

Zuvorderst gebührt der Dank Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele, unter dessen Leitung ich die Gelegenheit bekommen habe, wissenschaftlich zu arbeiten.

Ebenso zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler. Nicht nur verschaffte er mir die Möglichkeit in seinem Labor ein überaus spannendes und anspruchsvolles Thema zu bearbeiten, er betreute mich darüber hinaus äußerst kompetent und animierte mich, die gewonnenen Erkenntnisse auf internationalen Kongressen vorzustellen.

Im gleichen Atemzug möchte ich mich bei Maria Bouzani bedanken, welche mit neuen Ideen die Arbeit vorantrieb, mich im Untersuchungs-Design unterstützte und als Medizinerin mir auch persönlich wertvolle Ratschläge gab. Nicht zu vergessen sei das Korrekturlesen der Kongress-Manuskripte.

Alle weiteren Mitglieder der AG Löffler sei auch großer Dank ausgesprochen für eine äußerst angenehme, kollegiale und kurzweilige Zeit im Labor. Bei Anna-Lena Schmitt und Hannes Schlossnagel bedanke ich mich besonders für die sehr gute und geduldige technische Unterstützung. Kristin Czakai und Mirjam Fließner standen mir besonders bei der Pathway-Analyse mit Rat und Tat zur Seite. Auch Dr. Jan Springer und Antonia Beitzen-Heineke, welche die Untersuchungen von iNKT-Zellen weiterführte, seien hier nicht vergessen.

Ganz besonderer Dank geht an die Kooperationspartner in Jena und Tübingen. Prof. Dr. med. Oliver Kurzai vom Nationalen Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen, in dessen Labor der Multiplex-ELISA durchgeführt werden konnte und Dr. Michael Bonin von der Microarray Facility in Tübingen sind zwei Personen, ohne die meine Dissertation in dieser Form nicht hätte durchgeführt werden können.

Der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg und hier besonders dem Dekan Prof. Dr. Matthias Frosch sei hier mein großer Dank ausgesprochen für die Förderung des Promotionsvorhabens durch ein Promotionsstipendium für Studierende der Medizin.

Vor allem jedoch bedanke ich mich bei meinen Eltern Hans und Gerlinde für ihre immer währende Unterstützung und Geduld. Ihre Wertschätzung war ein steter Ansporn für mich. Abschließend möchte ich mich bei meiner Freundin Theresa Hardörfer bedanken, die mich in der Zeit der Niederschrift stets motiviert hat, für inhaltliche und formelle Fragen zur Diskussion immer bereit stand und deren Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Daniel Gundel

24. Juni 1987 in

Neustadt an der Aisch

Schule

09/1994 - 07/1998 Ehegrundschule Sugenheim

09/1998 – 06/2007 Gymnasium Scheinfeld

06/2007 Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM & Ausbildung

seit 12/2014 Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II, Uniklinikum Würzburg

10/2007-04/2014 Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Studium der Humanmedizin

- 08/2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 04/2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/2009-09/2012 Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Begleitstudiengang Experimentelle Medizin

Seit 03/2011 Medizinische Klinik II Universität Würzburg,

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

Promotionsarbeit zum Thema „Interaktion humaner iNKT-Zellen mit dem Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*“

Praktisches Jahr

02-04/2013 University of North Carolina, Chapel Hill, USA (Innere Medizin)

04-06/2013 University of Rochester, Rochester, USA (Innere Medizin)

06-09/2013 Klinikum Aschaffenburg (Chirurgie)

09/2013-01/2014 Universitätshautklinik Würzburg (Wahlfach Dermatologie)